

**Phylogenie und Divergenz der arbuskulären Mykorrhizapilze  
und *Geosiphon pyriformis*:  
Analyse von 18S rRNA-Gensequenzen und  
Entwicklung molekularer Sonden**

vom Fachbereich Biologie  
der Technischen Universität Darmstadt  
genehmigte

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades des  
*Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

vorgelegt von  
**Daniel Schwarzott**  
aus Darmstadt

Berichterstatter: PD Dr. A. Schüßler  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kluge  
Eingereicht am: 20.08.2003  
Mündliche Prüfung: 07.11.2003

Darmstadt 2004

D17

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Dr. A. Schüßler in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Kluge durchgeführt. Die Arbeit wurde unter dem Geschäftszeichen Schu 1203/1-1 von der deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## Zusammenfassung

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Frage nach der systematischen Stellung des Pilzes *Geosiphon pyriformis* (v.Wettstein), eines Pilzes, der mit dem Cyanobacterium *Nostoc punctiforme* in endosymbiotischer Gemeinschaft lebt. Es wurde schon früher vermutet, dass der Pilz *Geosiphon* zu den *Glomales* (orthografisch richtig: *Glomerales*) gehören könnte, einem Taxon, das ausschließlich arbuskuläre Mykorrhiza (AM) bildende Pilze umfasst. Als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, galt die auf morphologische Merkmale beruhende Lehrmeinung, dass die AM-Pilze dem Phylum *Zygomycota* zuzuordnen sind und dort eine eigene Ordnung, die *Glomerales*, bilden. Allerdings gab es für die Ordnung keinerlei Nachweis von Zygosporien, welche das Hauptmerkmal der *Zygomycota* bilden. Auch ist nicht für alle Pilze der Ordnung *Glomerales* das Merkmal Arbuskelbildung nachgewiesen.

Wegen dieser Unsicherheiten in der Zuordnung wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die phylogenetische Struktur der *Glomerales* auf molekularer Ebene zu untersuchen, und dabei auch nähere Informationen über die Verwandtschaft von *Geosiphon pyriformis* zu den *Glomerales* zu gelangen. Als Basis für die Untersuchung diente das 18S rRNA-Gen, welches schon bei einigen anderen morphologisch schwer unterscheidbaren Pilzgruppen zur phylogenetischen Analyse benutzt wurde. Alle untersuchten AM-Pilzarten wurden vor der molekularen Analyse von C. Walker, einem Spezialisten in der AM-Pilztaxonomie, nach ihrer Sporenmorphologie klassifiziert und Belegexemplaren angelegt.

Zunächst wurde eine verlässliche Methode entwickelt, mit der das fast vollständige 18S rRNA-Gen aus Einzelsporen von AM-Pilzen analysiert werden konnte. Durch Analyse von Einzelsporen ist weitestgehend sichergestellt, dass bei der PCR tatsächlich die Sequenzen des Zielorganismus und nicht die von Kontaminanten amplifiziert werden. Ein Fehler, der bei einigen früheren Autoren bereits zu falschen Interpretationen bezüglich der Phylogenie der AM-Pilze geführt hat. In der vorliegenden Arbeit gelang es, durch Analyse von Einzelsporen, das 18S rRNA-Gen von über 40% der bisher beschriebenen AM-Pilzarten zu charakterisieren.

Mit diesen eigenen Daten und über 160 18S rDNA-Sequenzen der Pilzphyla *Chitridiomyota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* und *Basidiomycota* aus Datenbanken wurde eine Datenmatrix angefertigt, um die phylogenetische Stellung der AM-Pilze und *Geosiphon pyriformis* innerhalb des Reiches *Fungi* zu untersuchen. Die Analysen nach der Neighbour-Joining und Maximum-Parsimony Methode zeigten, dass die AM-Pilze und *Geosiphon pyriformis* eine monophyletische Einheit bilden, die von allen anderen höheren Taxa abgetrennt werden kann. Aus diesem Ergebnis resultierte die formale Errichtung und Beschreibung eines neuen Pilzphylums, die *Glomeromycota*. Dieses

neue Phylum besitzt wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung mit den höheren Pilzen, d.h. mit denen der Phyla *Asco-* und *Basidiomycota*. Innerhalb des Phylums *Glomeromycota* wurden zusätzlich zu der bestehenden Ordnung *Glomerales* drei neue Ordnungen beschrieben. Es sind dies die *Diversisporales*, die *Paraglomerales* und die *Archaeosporales*, zu der auch *Geosiphon pyriformis* gehört.

Neben der Stellung der AM-Pilze im Reich *Fungi* wurde auch die Familienstruktur innerhalb der *Glomeromycota* analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Gattung *Glomus* nicht monophyletisch ist, wie bisher angenommen. Insgesamt bildet diese Gattung mindestens vier Gruppen, welche untereinander genetische Distanzen zeigen, die vergleichbar mit den morphologisch und molekularbiologisch abgesicherten *Glomeromycota*-Familien *Acaulosporaceae* und *Gigasporaceae* sind. Weiterhin wird *Geosiphon pyriformis* (*Geosiphonaceae*) in der 18S rDNA-Analyse eindeutig zu den *Archaeosporaceae* (*Archaeosporales*) gestellt, was bedeutet, dass hier ein paraphyletisches Taxon vorliegt. Aus den Daten ergibt sich die Forderung nach der Aufstellung neuer Familien innerhalb der *Glomeromycota*; eine formale Errichtung bedarf jedoch weiterer morphologischer und molekularer Daten.

Nachdem die 18S rDNA-Analyse die Zugehörigkeit von *Geosiphon pyriformis* zu den AM-Pilzen bestätigte, wurde versucht, aus den charakterisierten Sequenzen molekulare Sonden spezifisch für die *Archaeosporales* und für *Geosiphon* abzuleiten. Mit Hilfe dieser Sonden sollte untersucht werden, ob *Geosiphon* auch mit Pflanzen eine AM-artige Symbiose eingehen kann. Es gelang, spezifische PCR-Primer abzuleiten, und diese an Pflanzenmaterial vom *Geosiphon*-Standort zu testen. Zwar wurden tatsächlich bei einigen Pflanzenproben *Geosiphon*-Sequenzen nachgewiesen, jedoch waren mit den benutzten Methoden bisher noch keine gesicherten Aussagen möglich, ob der Pilz tatsächlich innerhalb des Pflanzengewebes vorkommt. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass außen an den Proben anhaftende Kontaminationen für den positiven Nachweis verantwortlich waren.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf Basis des 18S rRNA-Gens neu aufgestellte Taxonomie der AM-Pilze wird in Zusammenhang mit ihrer ursprünglichen, auf klassischen Merkmalen beruhenden Klassifizierung diskutiert. Die Ergebnisse liefern neue Interpretationsmöglichkeiten über die Bedeutung der AM-Symbiose beim Übergang der Pflanzen vom Wasser zum Land. Außerdem ist die vorliegende Arbeit für die AM-Forschung generell interessant, weil sie die Basis legt, AM-Pilze anhand molekularer Daten eindeutiger als bisher identifizieren zu können. Damit eröffnen sich weitere Einblicke in die Evolution, Funktion und Verbreitung der AM-Symbiose.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Kramadibrata K., Walker C., **Schwarzott D.**, Schüßler A. (2000). A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann. Bot.* 86: 21–27.

Schüßler A., **Schwarzott D.**, Walker C. (2001). A new fungal Phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105** (12): 1413-1421.

Schüßler A., **Schwarzott D.**, Walker C. (2003). *Glomeromycota* rRNA genes – the diversity of myths?. *Mycorrhiza*: angenommen Mai 2003, im Druck

Schüßler A., Gehrig H., **Schwarzott D.**, Walker, C. (2001). Analysis of partial Glomales SSU rRNA genes: Implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* **105**: 5–15.

**Schwarzott D.**, Schüßler A. (2001). A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA-extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* **10**: 203-207.

**Schwarzott D.**, Walker C., Schüßler, A. (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is non-monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**: 190-197.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	3
1.1	Die Mykorrhiza .....	3
1.1.1	Morphologie und Funktion der arbuskulären Mykorrhiza (AM).....	4
1.1.2	Die symbiotische Interaktion in der AM.....	6
1.1.3	Die ökologische Bedeutung der AM.....	8
1.1.4	Klassifizierung der AM-Pilze .....	8
1.1.5	<i>Geosiphon pyriformis</i> und dessen Beziehung zu den AM-Pilzen .....	13
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	15
2	Material und Methoden .....	17
2.1	Material .....	17
2.1.1	Geräte .....	17
2.1.2	Chemikalien.....	17
2.1.3	Puffer und Lösungen .....	17
2.1.4	Nährmedien.....	19
2.1.5	Enzyme .....	20
2.1.6	Kit-Systeme .....	20
2.1.7	Bakterienstämme.....	20
2.1.8	Vektoren.....	21
2.1.9	DNA-Längenstandard .....	23
2.1.10	Oligonukleotide.....	24
2.1.11	Die untersuchten Arten / Isolate von AM-Pilzen .....	25
2.1.12	18S rDNA-Gensequenzen aus Datenbanken .....	31
2.2	Methoden .....	35
2.2.1	Reinigung der AM-Pilzsporen .....	35
2.2.2	Isolierung von chrDNA aus Einzelsporen.....	35
2.2.3	DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial .....	37
2.2.4	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	38
2.2.5	Geschachtelte PCR (nested-PCR) .....	39
2.2.6	PCR zur Amplifikation der 18S rDNA aus Sporen.....	40
2.2.7	PCR zur Amplifikation von <i>Archaeosporales</i> 18S rDNA.....	41
2.2.8	Ligation mit den Topo TA Cloning-Kits.....	43
2.2.9	Transformation der Bakterien .....	44
2.2.10	Selektion positiver Klone .....	45
2.2.11	Übernachtskulturen der transformierten Zellen.....	45
2.2.12	Plasmid-Schnellpräparation (Holmes und Quigley 1981).....	46

Inhaltsverzeichnis	2
2.2.13	Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide.....46
2.2.14	Restriktionsanalyse zur Identifikation spezifischer Sequenzen (RFLP) .47
2.2.15	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen .....47
2.2.16	Plasmidpräparation für die Sequenzierung (Qiaprep-spin Plasmid Kit) .48
2.2.17	Dauerkulturen .....48
2.2.18	Sequenzierung .....48
2.2.19	Methoden zur Bestimmung der AM-Pilz-Phylogenie .....49
2.2.20	Grafische Darstellung der Stammbäume .....52
2.2.21	Spezifische Färbung von Chitin mit Lektin .....52
3	Ergebnisse und Diskussion .....54
3.1	DNA-Isolation aus Einzelsporen, Amplifikation und Klonierung der 18S rDNA .....54
3.1.1	Ergebnisse .....54
3.1.2	Diskussion .....57
3.2	Phylogenetische Stellung der AM-Pilze im Reich <i>Fungi</i> .....58
3.2.1	Verwendete Daten.....58
3.2.2	Ergebnisse aus den Analysen zur phylogenetische Stellung der AM- Pilze im Reich <i>Fungi</i> .....59
3.2.3	Diskussion der phylogenetischen Ergebnisse.....64
3.2.4	<i>Geosiphon pyriformis</i> , AM-Pilze und die Evolution der Landpflanzen ...67
3.3	Vorgeschlagenes Konzept zur Unterteilung der <i>Glomeromycota</i> in Familien.....70
3.3.1	Verwendete Daten:.....70
3.3.2	Ergebnisse aus den Analysen zur Familienstruktur .....71
3.3.3	Diskussion .....76
3.4	Entwicklung spezifischer Primer für die <i>Archaeosporales</i> .....83
3.4.1	Ergebnisse .....83
3.4.2	Diskussion .....93
3.5	Abschließende Diskussion.....96
3.6	Ausblick .....100
4	Literaturverzeichnis .....103
5	Anhang.....113
	Abkürzungen .....113
	Lage der verwendeten Primer auf dem 18S rRNA-Gen .....114
	Danksagungen .....115
	Lebenslauf.....116
	Vorträge und Posterpräsentationen .....117
	Eidesstattliche Erklärung .....118

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Mykorrhiza

Der Begriff Mykorrhiza („Pilzwurzel“) wurde 1885 von A.B. Frank eingeführt und beschreibt die Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzenwurzeln (Harley und Smith 1983).

Mykorrhizen sind an der Wasser- und Nährstoffaufnahme aus dem Substrat beteiligt. Sie haben unterschiedliche Erscheinungsformen, welche sich in verschiedene morphologische, funktionale und evolutorische Kategorien unterteilen lassen (Smith und Read 1997).

Eine allgemeinere, auch wurzellose Bryophyten einschließende Definition der Mykorrhiza, von der es sieben Haupttypen gibt (siehe Tabelle 1), wird von M. Brundrett (persönliche Mitteilung) wie folgt gegeben:

„Symbiotische Assoziation zwischen einem Pilz, der auf das Leben im Boden und Pflanzen spezialisiert ist, und der Wurzel (oder einem anderen Pflanzenorgan, welches mit dem Bodensubstrat in Verbindung steht). Die Symbiose ist hauptsächlich für den Transfer von Nährstoffen verantwortlich und entsteht durch synchronisierte Entwicklung zwischen Pilz und Pflanze“.

Die Ektomykorrhiza und Ektendomykorrhiza spielen vor allem bei Gymnospermen und Angiospermen gemäßigter Breiten eine Rolle (Jacksons und Mason 1984), während die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) eine ubiquitäre Wurzel-Pilz Assoziation ist, welche bei etwa 70-90% aller Gefäßpflanzen, inklusive der *Pteridophyta*, auftritt. Auch viele Bryophyten bilden eine solche Symbiose aus (Peterson, Howarth und Whittier 1981, Schmid und Oberwinkler 1993, Smith und Read 1997, Trappe 1987).

Andere Typen der Mykorrhiza sind beschränkt auf bestimmte Pflanzenklassen oder -familien. Hier ist beispielsweise die Symbiose der *Ericaceae* mit Basidio- oder Ascomyceten zu nennen, oder auch die Mykorrhiza der *Orchidaceae* mit Basidiomyceten (Brundrett 1991 2002, Smith und Read 1997).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Ermittlung der Verwandtschaftsverhältnisse der arbuskulären Mykorrhizapilze (AM-Pilze) auf molekularbiologischer Ebene. Aus der Arbeit ergab sich auch eine orthografische Korrektur der bislang benutzten Taxa nach dem Internationalen Code für botanische Nomenklatur (Greuter *et al.* 2000, Schüßler, Schwarzott und Walker 2001). Zum besseren Verständnis werden in der Arbeit in manchen Fällen sowohl die neuen als auch die alten Namen in Klammern aufgeführt: *Glomeromycetes* (= *Glomomycetes*), *Glomerales*

(= *Glomales*), *Glomeraceae* (= *Glomaceae*), *Paraglomerales* (= *Paraglomales*), *Paraglomeraceae* (= *Paraglomaceae*). Weiter wurde bei der Abkürzung für die Gattungsnamen nicht wie üblich nur der erste Buchstabe benutzt, sondern für *Gigaspora*: *Gi.*, *Geosiphon*: *Ge.* und *Archaeospora*: *Ar.*, um Verwechslungen mit *Glomus*: *G.* beziehungsweise *Acaulospora*: *A.* zu vermeiden.

**Tabelle 1:** Charakteristika der verschiedenen Mykorrhiza-Typen (nach Smith und Read 1997, verändert) \*Bei den Pilztaxa sind Abkürzungen von *Zygomycota*, *Basidiomycota* und *Ascomycota* benutzt worden; für die Pflanzentaxa Abkürzungen von *Bryophyta*, *Pteridopyhta*, *Gymnospermae* und *Angiospermae*. Die *Glomerales* (= *Glomales*) entsprechen den *Glomeromycota* (siehe 3.2)

Merkmale:	Mykorrhiza-Typen:						
	Arbuskulär	Ekto-	Ekt-endo	Arbutoid	Monotropoid	Ericoid	Orchid
Pilzhyphen septiert	-	+	+	+	+	+	+
Pilzhyphen unseptiert	+	-	-	-	-	-	-
Intrazelluläre Kolonisation der Wurzel	+	-	+	+	+	+	+
Ausbildung des Hartig'schen Netzes	-	+	+	+	+	-	-
Pilzmantel („fungal sheath“)	-	+	+ oder -	+ oder -	+	-	-
Vesikel in Zellen oder Geweben	+ oder -	-	-	-	-	-	-
Pilztaxa*	<i>Glomerales</i>	<i>Basidio</i> <i>Asco</i> ( <i>Zygo</i> )	<i>Basidio</i> <i>Asco</i>	<i>Basidio</i>	<i>Basidio</i>	<i>Asco</i>	<i>Basidio</i>
Pflanzentaxa*	<i>Bryo</i> <i>Pterido</i> <i>Gymno</i> <i>Angio</i>	<i>Gymno</i> <i>Angio</i>	<i>Gymno</i> <i>Angio</i>	<i>Ericales</i>	<i>Monotropa-</i> <i>ceae</i>	<i>Ericales</i> <i>Bryo</i>	<i>Orchi-</i> <i>dea-</i> <i>ceae</i>

### 1.1.1 Morphologie und Funktion der arbuskulären Mykorrhiza (AM)

Diese Form der Mykorrhiza erhielt ihren Namen durch das Auftreten typischer Strukturen, die von den beteiligten Pilzen innerhalb der Pflanzenwurzel gebildet werden, den „Arbuskeln“.

Diese typische baumartige Morphologie der Hyphen, welche auch als Hauptmerkmal zur klassisch-taxonomischen Einteilung dieser Pilze in die Ordnung *Glomales* (orthografisch korrekt: *Glomerales*) diente (Morton und Benny 1990), entsteht durch intrazelluläre Verzweigung unseptierter Hyphen im Wurzelkortex, wobei das Plasmalemma der Pflanzenzelle nicht durchbrochen wird, sondern als Grenzmembran fungiert

(Bonfante und Perotto 1995). An der symbiotischen Grenzfläche („symbiotic interface“) zwischen intrazellulären Hyphen und Arbuskeln des Pilzes und Plasmalemma der Wurzelzelle findet der Transport von Photosyntheseassimilaten von Pflanze zu Pilz, sowie der Transfer anorganischer Nährstoffe, Spurenelemente und Wasser von Pilz zu Pflanze statt (Smith und Read 1997).

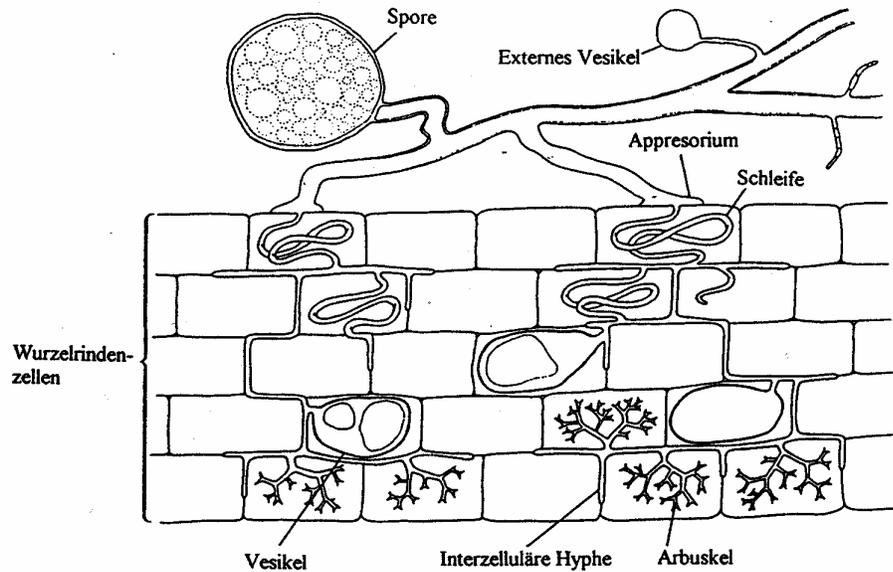
Bei der Ausprägung der Arbuskeln lassen sich zwei Typen unterscheiden, die als *Paris*- und *Arum*-Typ bezeichnet werden. Der *Paris*-Typ zeichnet sich durch die Bildung von intrazellulär gebildeten, spiralförmigen Hyphen aus, welche sich innerhalb des Wurzelkortex von Zelle zu Zelle ausbreiten. Ausgehend von diesen spiraligen Strukturen werden in den Zellen Arbuskel gebildet und es gibt kaum interzelluläres Hyphen-Wachstum. Beim *Arum*-Typ breitet sich der Pilz über interzelluläre Hyphen aus, von denen kurze Abzweigungen ausgehen, die in die Wurzelzelle eindringen, sich dort dichotom aufspalten und die charakteristischen Arbuskel bilden.

Sowohl das vegetative Myzelium als auch in den Wurzeln gebildeten Strukturen aller Mitglieder der AM-Pilze zeichnen sich - im lebenden Zustand - durch das Fehlen von Septen aus und sind vielkernig (coenocytisch).

Eine weitere, häufig auftretende Struktur dieser Pilze sind die Vesikel. Sie besitzen dicke Zellwände, eine meist ovale Morphologie, werden in oder zwischen kortikalen Zellen gefunden und entstehen terminal an einzelnen Hyphen. Sie dienen als Speicherorgane für Lipide (Smith und Read 1997). Vesikel wurden ursprünglich auch als allgemeines morphologisches Merkmal dieser Pilze gesehen, was zur ursprünglichen Bezeichnung dieser Pilz-Pflanzen-Symbiose als „vesikulär arbuskuläre Mykorrhiza“ (VAM) führte. Dies trifft jedoch nicht für alle Taxa zu, so dass es angemessener ist, von arbuskulären Mykorrhizapilzen (AM-Pilzen) zu sprechen (Walker 1992).

Außerhalb der Wurzel bilden die AM-Pilze neben einem feinen Hyphengeflecht als auffälligste Struktur ihre Reproduktionsorgane, die asexuell gebildeten Sporen. Zwar können Sporen auch innerhalb der Wurzel gebildet werden, meist entstehen sie aber an den Hyphenenden des Bodenmyzels. Ihre Größe variiert zwischen 40 und 800 µm und sie können >1000 Zellkerne enthalten (Viera und Glenn 1990). Ein Schema der AM-Morphologie ist in Abbildung 1 gezeigt.

Bisher sind bei keinem AM-Pilz sexuelle Stadien gefunden worden. Aus diesem Grund ist auch unklar, zu welcher der bei Pilzen beschriebenen Typen von Sporen oder Sporenträgern die Fortpflanzungsorgane der AM-Pilze gezählt werden sollen. Im Allgemeinen werden sie deswegen als Chlamydosporen beschrieben.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der arbuskulären Mykorrhiza (aus: Isaacs 1992, verändert)

### 1.1.2 Die symbiotische Interaktion in der AM

Die biotrophen AM-Pilze bilden mit Pflanzen eine sogenannte mutualistische Symbiose, welche vor allem auf dem bidirektionalen Austausch von Nährstoffen zwischen beiden Partnern basiert.

Insbesondere die Versorgung der Pflanzen mit Phosphat durch den Pilz ist seit langer Zeit Gegenstand der Untersuchung dieser Symbiose. Es ist mittlerweile für den größten Teil der Landpflanzen allgemein anerkannt, dass eher Mykorrhizen als Wurzeln alleine an der Versorgung der Pflanzen mit dem in der Natur oft wachstums-limitierenden Phosphat beteiligt sind. Daneben spielen die AM-Pilze bei der Versorgung der Pflanze mit Stickstoff und Spurenelementen wie Kupfer und Zink eine Rolle (Smith und Read 1997).

Die Nährstoffe werden durch die im Boden ein feines Netzwerk bildende Hyphen zur Pflanze transportiert. Daraus ergibt sich für die Pflanze ein größeres erschließbares Bodenvolumen als alleine durch die eigenen Wurzeln. Es wird unter anderem vermutet, dass die im Vergleich zu Wurzeln im Durchmesser kleineren Hyphen, unzugängliche Bereiche des Bodens zu nutzbaren Nährstoffressourcen für die Pflanzen machen (Smith und Read 1997).

Weitere positive Effekte dieser Symbiose auf die Pflanze sind zum Beispiel die Erhöhung der Resistenz gegen Schädlinge wie Nematoden oder pathogene Pilze (Azcon-Aguilar und Barea 1996) sowie eine höhere Widerstandskraft gegen Umweltverschmutzung (Hildebrandt, Kaldorf und Bothe 1999). Außerdem scheint die Vergrößerung der Oberfläche durch das Pilzmyzel zu einer besseren Versorgung der

Pflanze mit Wasser zu führen, und es werden positive Effekte des Myzels auf die Bodenerosion beschrieben. Eine Rolle spielt dabei das von den Hyphen ausgeschiedene Glykoprotein Glomalin, welches die Bodenstruktur durch Verkleben von Partikeln stabilisiert (Sylvia 1990, Wright, Upadhyaya und Buyer 1998).

Während die meisten Pflanzen unter optimalen Umweltbedingungen durchaus auch ohne den Pilzpartner leben können, ist die Symbiose für die AM-Pilze obligat. Sie zeigen keine saprophytische Lebensweise und sind vollständig auf die Versorgung mit Kohlenhydraten durch die Pflanze angewiesen. Messungen mit radioaktiv markiertem Kohlenstoff haben gezeigt, dass 4-20% der Nettophotosyntheserate von mykorrhizierten Pflanzen für Substanzen investiert wird, die an den Pilz "geliefert" werden (Douds, Johnson und Koch 1988, Jakobsen und Rosendahl 1990, Pearson und Jakobsen 1993).

Der Aufwand der Pflanze, fixierten Kohlenstoff an den Pilz zu liefern, ist letztendlich als Investition zu sehen, um in nährstoffarmen Böden eine bessere Versorgung mit Nährstoffen zu gewährleisten. Diese Balance kann sich aber durchaus zu einem der beiden Partner verschieben. So kann sich zum Beispiel bei Lichtmangel der Verlust von Photosyntheseprodukten an den Pilz zusätzlich negativ auf die Entwicklung des photoautotrophen Partners auswirken.

Bei den hier gemachten Aussagen bezüglich des Nutzens und der Kosten für den jeweiligen Partner ist zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse zum großen Teil aus Versuchen unter künstlichen Bedingungen stammen und die Reaktionen der Symbiosepartner auch abhängig von den untersuchten Arten, ihrem Genotyp und den Umweltbedingungen sind (Helgason, Fitter und Young 1999, Smith und Read 1997, Streitwolf-Engel *et al.* 1997). So gibt es Belege dafür, dass unterschiedliche AM-Pilz-Arten oder Isolate verschiedene Effizienz bezüglich der Phosphataufnahme besitzen (Jakobsen, Abbott und Robson 1992) und unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum von Pflanzen zeigen (Sanders, Clapp und Wiemken 1996, Van der Heijden *et al.* 1998 a/b).

Auch wenn es scheinbar keine hohe Spezifität bei der Besiedelung von Pflanzenwurzeln gibt, so zeigen AM-Pilze unter natürlichen Bedingungen doch Unterschiede bei dem Grad der Kolonisation der Wurzel und verursachen unterschiedliche Reaktionen der Pflanzen bzw. Pflanzengemeinschaften. Weiterhin sind unter natürlichen Umständen häufig verschiedene Arten von AM-Pilzen gleichzeitig in einer Wurzel vertreten, wodurch Effekte der Symbiose auf die Pflanzen und Wechselwirkungen der Pilze untereinander schwer zuzuordnen sind (Helgason, Fitter und Young 1999, Sanders, Clapp und Wiemken 1996, Smith und Read 1997, Van der Heijden *et al.* 1998a/b).

### 1.1.3 Die ökologische Bedeutung der AM

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, kommen die AM-Pilze ubiquitär in Bodenökosystemen vor. Solche Gruppen von Organismen, die in hoher Dichte auftreten, haben großen Einfluss auf Funktion und Struktur von Lebensgemeinschaften (Grime 1987).

Gerade in den letzten Jahren wird zunehmend versucht, den Einfluss von Biodiversität auf das Funktionieren und die Stabilität von Ökosystemen zu verstehen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass AM-Pilze eine wichtige Rolle bei der Entstehung, Zusammensetzung und Produktivität von Pflanzengemeinschaften spielen. Das Verständnis dieser Mechanismen hat große Bedeutung für den Erhalt und auch die Wiederherstellung verschiedener natürlicher Ökosysteme (Daniell *et al.* 1999, Grime 1987, Helgason *et al.* 1998, Van der Heijden *et al.* 1998a/b).

Neben dem Ansatz der Simulation solcher Ökosysteme in Mikrokosmen unter Gewächshausbedingungen (Van der Heijden 1998a) werden zunehmend molekularbiologische Methoden in Feldstudien eingesetzt, wie z.B. der Nachweis mittels spezifischer PCR-Sonden, um die Funktion und Diversität der AM-Pilze in Ökosystemen aufzuklären (Chelius und Triplett 1999, Helgason *et al.* 1998, Kjoller und Rosendahl 2001, Kowalchuk *et al.* 2001, Turnau *et al.* 2001).

Bei der Diversitätsbestimmung von AM-Pilzen im Freiland anhand vorgefundener Sporen treten jedoch Probleme auf, die mit molekularbiologischen Methoden umgangen werden können. Zum einen ist die Sporenbildung stark von physiologischen Bedingungen abhängig, zum anderen können zur Bestimmung nötige Charaktere bei älteren Sporen im Boden verloren gehen, bzw. bei sehr jungen Sporen noch nicht vorliegen. Auch der Nachweis von AM-Pilzstrukturen durch Anfärben von Pflanzenwurzeln gelingt maximal bis zur Unterscheidung von „klassischen“ Gattungen (Clapp *et al.* 1995, Helgason *et al.* 1998), wobei hier schon zu erwähnen ist, dass diese Gattungen nach den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen polyphyletisch sind. Mit den molekularen Nachweismethoden besteht dagegen die Möglichkeit, AM-Pilze direkt in den Pflanzenwurzeln nachzuweisen, und damit die tatsächliche Besiedlung zu dokumentieren. Allerdings hat sich auch gezeigt, dass einige dieser Sonden auf zu kleinen Sequenzdatensätzen basieren und nicht die gewünschte Spezifität besitzen (Schüßler *et al.* 2001).

### 1.1.4 Klassifizierung der AM-Pilze

Die etwa 130 bis 150 Arten beschriebener AM-Pilzen (einige Arten sind als Synonyme aufzufassen) wurden traditionell dem Phylum (Abteilung, Division) *Zygomycota*, Klasse *Zygomycetes*, zugerechnet (Smith und Read 1997, Walker und Trappe 1993).

Im Gegensatz zu den durch morphologische, biochemische und molekularbiologische Arbeiten gut abgesicherten Phyla *Ascomycota* und *Basidiomycota*, die auch in manchen Fällen als Unterabteilungen des Phylums *Dikaryomycota* (dann: *Ascomycotina* und *Basidiomycotina*) gesehen werden, sind die *Zygomycota* wie sie bisher klassifiziert wurden als polyphyletisch anzusehen und kein echtes phylogenetisches Taxon (Benny, Humber und Morton 2000, O'Donnell *et al.* 2001, Tanabe *et al.* 2000, Tehler *et al.* 2000).

Die Klassifizierung der *Zygomycota* basiert auf der Morphologie der sporenbildenden Strukturen, Sporangien und (oder) Sporangiolen, oder Merosporangien (Benny 1995). Allerdings fehlt bei dem Großteil der zu diesem Phylum gezählten Organismen (wie auch den AM-Pilzen) der Nachweis des charakteristischen Merkmals, die sexuell gebildeten Sporen (Zygosporen). Aus der vermeintlichen Ähnlichkeit der untersuchten Sporen und Myzelien resultierte eine Vereinigung von eher oberflächlich ähnlichen morphologischen Einheiten zu einer inhomogenen, künstlichen Gruppe von zum Teil konvergenten Linien (Schüßler, Schwarzott und Walker 2001).

Historisch gesehen wurden die ersten AM-Pilze der Gattung *Glomus* 1844 anhand von Sporocarpn beschrieben (Tulasne und Tulasne 1844). Die nach damaligem Wissensstand morphologisch ähnlichste Pilzgruppe waren Arten der Gattung *Endogone* (Ordnung *Endogonales*, Familie *Endogonaceae*). Aufgrund von Analogien der analysierten Strukturen wurden die von Tulasne und Tulasne (1844) beschriebenen AM-Pilze (*Glomus microcarpum* und *Glomus macrocarpum*) später der Gattung *Endogone* zugerechnet (Gerdemann und Trappe 1975, Tulasne und Tulasne 1851). Diese Klassifizierung war vor allem deswegen zweifelhaft, weil - im Gegensatz zu den anderen Pilzen dieser Gattung - von den AM-Pilzen keine Bildung von Zygosporen bekannt war. Einer der Hauptgründe für diese Zuordnung lag wohl in der Analyse von Sporocarpn in denen sich sowohl Sporen der Gattungen *Endogone* als auch *Glomus* fanden, wobei diese als anamorph gedeutet wurden (Thaxter 1922).

1939 fasste Butler die Studien von Tulasne und Tulasne (1844) zusammen. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits Vesikel als auch Arbuskeln bekannt und illustriert (Janse 1896) und wurden als Strukturen eines symbiotisch in Wurzeln lebenden Pilzes erkannt. Den endgültigen Nachweis, dass ein Pilz für die arbuskuläre Mykorrhizierung von Wurzeln verantwortlich ist, führte Mosse (1953) in Versuchen mit einem AM-Pilz, welcher später als *Glomus mosseae* beschrieben wurde, an Erdbeerwurzeln durch.

Gerdemann und Trappe (1974) publizierten eine umfangreiche Revision der Familie *Endogonaceae*, ohne jedoch Taxonomie und Phylogenie dieser Gruppe in Zusammenhang zu bringen. In dieser Arbeit kam es zur Aufstellung zweier neuer Gattungen (*Gigaspora* und *Acaulospora*), neben den bereits bestehenden Gattungen *Glomus*, *Endogone*, *Modicella*, *Sclerocystis* und *Glaziella* innerhalb der Familie *Endogonaceae*.

1979 wurde durch Benjamin den Pilzen in dieser Familie formal eine eigene Ordnung, die *Endogonales*, zugeschrieben. Erst 1990 kam es dann zur Beschreibung einer eigenen Ordnung für die AM-Pilze, der *Glomales* (Morton und Benny 1990, orthografisch richtig: *Glomerales*).

Die zu Beginn meiner Arbeit gebräuchliche Klassifizierung der AM-Pilze in einer eigenen Ordnung entstand aus einer cladistischen Analyse von morphologischen Merkmalen. Dabei wurden hauptsächlich die Struktur und Entstehung der Pilzsporen untersucht. Als Resultat wurde eine neue Ordnung, die *Glomales* (= *Glomerales*), neben den *Endogonales* eingeführt. Sie umfasste nur Pilze, welche obligat Kohlenstoff von Pflanzen über arbuskuläre Strukturen in Wurzeln beziehen (Morton 1990, Morton und Benny 1990). Weiterhin ergab sich eine Aufteilung in zwei Unterordnungen und drei Familien. Eine Übersicht der Klassifizierung und der verwendeten Merkmale nach Morton und Benny (1990) ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Neben dem Problem, dass in der Arbeit von Morton und Benny (1990) die grundsätzliche Frage nach der Stellung der AM-Pilze innerhalb des Reiches *Fungi* nicht analysiert wurde, ist der Erwerb von Kohlenstoff ausschließlich über Arbuskeln keineswegs experimentell gesichert. Weiterhin beeinflusst auch die Art der Pflanze die Morphologie des Pilzes innerhalb der Wurzel, und es sind bisher überhaupt nur von ca. 40% der beschriebenen Arten der AM-Pilze auch arbuskuläre Strukturen nachgewiesen worden (Schüßler, Schwarzott und Walker 2001, Smith und Read 1997, Walker 1992).

Die Analyse von Morton und Benny (1990), die auf Annahmen bezüglich der Evolution morphologischer Merkmale beruht, war der erste Versuch, eine phylogenetische Taxonomie dieser Pilze zu erstellen. Das größte Problem dieser Einteilung ist jedoch die Wertung der untersuchten Merkmale, zum einen wegen der unsicheren Erkenntnisse bezüglich ihrer Funktion, zum anderen wegen fehlender Fossilien, mit deren Hilfe ursprüngliche und abgeleitete Merkmale unterschieden werden können (Smith und Read 1997).

Aus den oben genannten Gründen wurden die Ergebnisse von Morton und Benny (1990) an verschiedenen Stellen angezweifelt. So wurde zum Beispiel die Monophylie der artenreichsten Gattung *Glomus* in Frage gestellt und vermutet, dass es sich um mehrere Gattungen (Walker 1992) oder sogar Familien handelt (Simon 1993). Daraus ergaben sich Forderungen, die Ergebnisse mit weiteren Methoden zu überprüfen, wobei vor allem molekularbiologische Methoden favorisiert wurden (Sanders 1996, Simon 1993 1996).

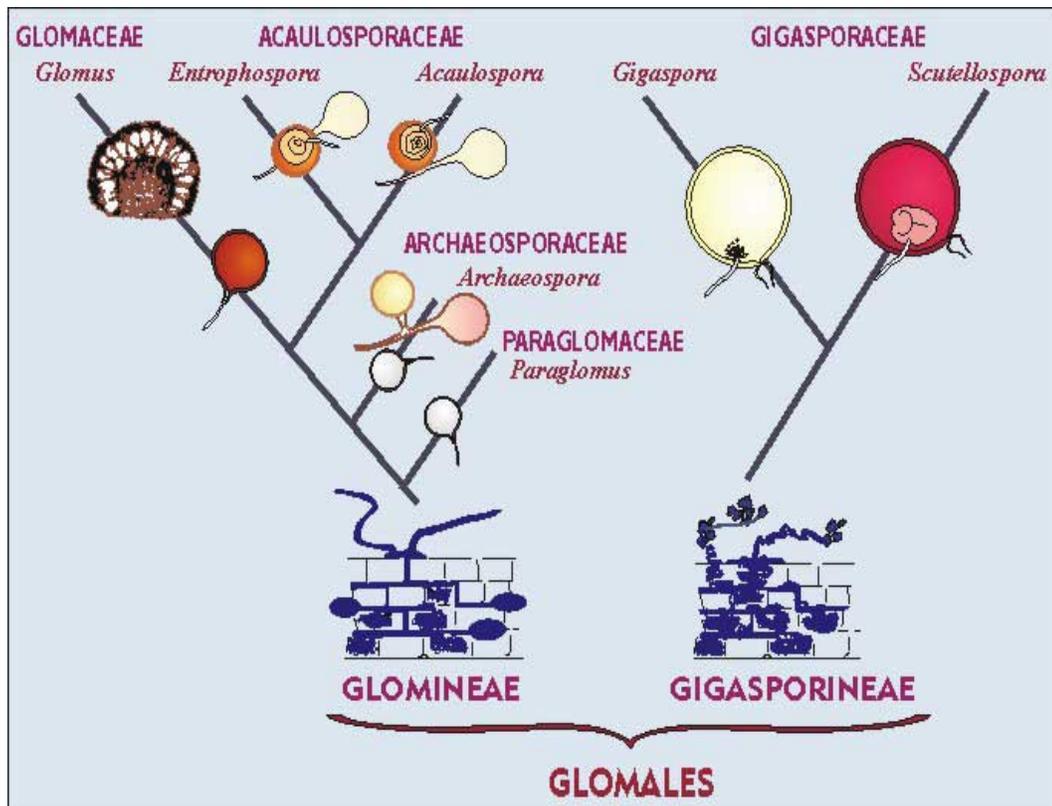
Während der Durchführung der hier vorliegenden Arbeit führten ebensolche Methoden zu einer Revision der AM-Pilztaxonomie, welche bereits an dieser Stelle erwähnt werden soll. So wurde *Sclerocystis* als separate Gattung in der Familie *Glomaceae* (=

*Glomeraceae*) aufgelöst (Redecker, Morton und Bruns 2000) und zwei neue, ursprüngliche Familien der AM-Pilze, die *Paraglomeraceae* (= *Paraglomeraceae*) und *Archaeosporaceae*, beschrieben (Morton und Redecker 2001, Redecker, Morton und Bruns 2000). Wichtig ist hierbei, dass Sporen von Arten der beiden letztgenannten Familien aufgrund der Morphologie nicht von denen der Gattung *Glomus* unterschieden werden können und die Taxonomie im Wesentlichen auf der phylogenetischen Analyse des Gens, welches die rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit (18S rRNA) codiert, sowie dort gefundener spezifischer Sequenzmotive beruht.

**Tabelle 2:** Klassifizierung der Ordnungen *Endogonales* und *Glomerales* und deren Merkmale nach Morton und Benny 1990 (aus Smith und Read 1997, verändert)

Taxon	Merkmale
<b>Ordnung:</b> <i>Endogonales</i>	Reproduktion durch Zygosporien; häufige Ausbildung von Sporocarpen. Saprophytisch oder Ausbildung von Ektomykorrhizen.
<b>Familie:</b> <i>Endogonaceae</i> <b>Gattung:</b> <i>Endogone</i> <i>Sclerogone</i>	
<b>Ordnung:</b> <i>Glomerales</i>	Obligate, biotrophe Pilze, die Kohlenstoff über intrazelluläre Arbuskeln von der Wirtspflanze aufnehmen.
<b>Unterordnung:</b> <i>Glomineae</i>	Vesikel und Arbuskel vorhanden; Sporenbildung an den Hyphen terminal oder lateral; „Helferzellen“ (Auxiliary cells) fehlen.
<b>Familie:</b> <i>Glomeraceae</i> <b>Gattungen:</b> <i>Glomus</i> <i>Sclerocystis</i>	Sporenbildung an der Basis steriler Hyphen. Bei <i>Glomus</i> entwickeln sich die Sporen einzeln oder in lockeren Aggregaten; Bei <i>Sclerocystis</i> ist der Fruchtkörper ein Sporocarp, welches aus Sporen besteht, die durch seitliche Wände Kontakt haben.
<b>Familie:</b> <i>Acaulosporaceae</i> <b>Gattungen:</b> <i>Acaulospora</i> <i>Entrophospora</i>	Sporenbildung auf oder innerhalb des Halses eines spezialisierten, „sporenbildenden Sacculus“ (sporiferous saccule)
<b>Unterordnung:</b> <i>Gigasporineae</i>	Nur Arbuskel, keine Vesikel; Sporenbildung an zwiebförmiger Zelle (bulbous cell), normalerweise Ausbildung von „Helferzellen“ an Hyphen außerhalb der Pflanzenwurzel.
<b>Familie:</b> <i>Gigasporaceae</i> <b>Gattungen:</b> <i>Gigaspora</i> <i>Scutellospora</i>	Unterscheidung der Gattungen anhand der Sporenceimung. Bei <i>Scutellospora</i> findet sich in den Sporen eine Lage flexibler Wände. Unterschiede in der Ornamentation der „Helferzellen“.

Zusätzlich zu der Errichtung neuer Familien wurde von Morton (2000) auch die Monophylie der Ordnung *Glomerales* angezweifelt und eine konvergente Entwicklung der Linien, die zu dieser Zeit als Unterordnungen *Glomineae* und *Gigasporineae* beschrieben waren, vermutet. Dies würde bedeuten, dass die AM-Pilze sich nicht von einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. Das taxonomische Konzept von Morton ist in Abbildung 2 wiedergegeben.



**Abbildung 2:** Klassifizierung der *Glomales* (= *Glomerales*) nach Morton (<http://invam.caf.wvu.edu>, 2002) basierend auf Analysen von morphologischen und molekularen Eigenschaften der AM-Pilze. Die morphologischen Merkmale aus Tabelle 2 sind hier zum Teil schematisch wiedergegeben.

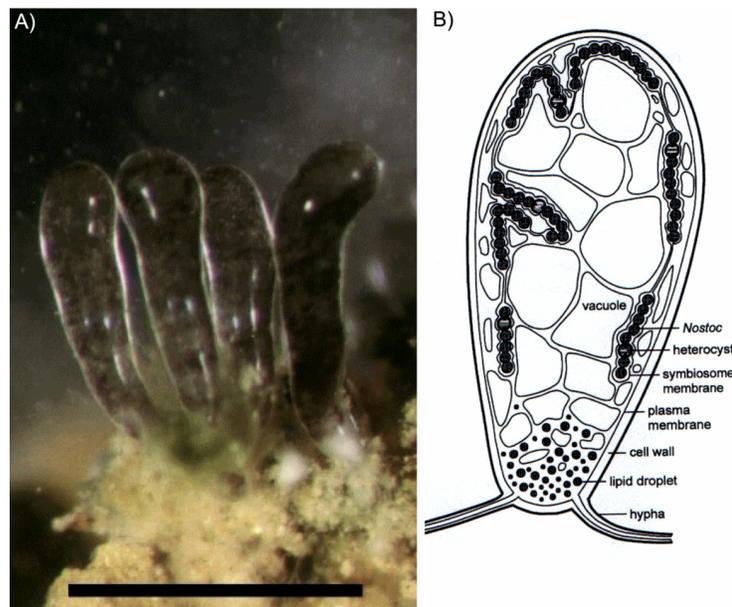
Dieses Konzept widerspricht jedoch der molekularen Phylogenie, die aus Analysen des 18S rRNA-Gens resultierte und auch auf der INVAM Internetseite von J. B. Morton bis 2002 (<http://invam.caf.wvu.edu>) dokumentiert wurde.

Cavalier-Smith (1998) eröffnete dann in einer bei Mykologen kaum bekannten Arbeit mit einer kurzen lateinischen Beschreibung eine neue Klasse innerhalb der *Zygomycota*, die *Glomomycetes* (orthografisch richtig: *Glomeromycetes*), welche die beiden Ordnungen *Endogonales* (Benjamin 1979) und *Glomerales* (AM-Pilze) umfassen sollte. Zu dieser Zeit war allerdings bereits bekannt, dass diese beiden Gruppen nicht monophyletisch sind.

Der Ausgangspunkt für diese Arbeit, die Phylogenie und Taxonomie der AM-Pilze genauer zu untersuchen, war der Pilz *Geosiphon pyriformis*, dessen taxonomische Stellung lange Zeit unklar war (Gehrig, Schüßler und Kluge 1996, Schüßler *et al.* 1994) und dessen Endosymbiose mit Cyanobakterien einige Parallelen zur AM-Symbiose aufweist (Schüßler und Kluge 2001).

### 1.1.5 *Geosiphon pyriformis* und dessen Beziehung zu den AM-Pilzen

*Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein ist das bisher einzig bekannte Beispiel einer endocytobiotischen Symbiose zwischen einem Pilz und einem Cyanobakterium (*Nostoc punctiforme*) und wurde ursprünglich als siphonale Alge, *Botrydium pyriforme*, beschrieben (Kützing 1862). F.v. Wettstein (1915) beschrieb das Konsortium zum ersten Mal als Symbiose, aber erst Knapp (1933) erkannte, dass der Makrosymbiont pilzlicher Natur ist, wobei der Artnamen *Ge. pyriformis* sowohl für die Benennung des Pilzes alleine als auch für die Symbiose verwendet wurde (Schüßler und Kluge 2001). Korrekterweise sollte der Artnamen aber nur den Pilzpartner der Symbiose beschreiben (Schüßler 2002).



**Abbildung 3:** *Geosiphon pyriformis* **A)** *Geosiphon*-Blasen aus einer Erdkultur. Der Größenstandard entspricht 1 mm. **B)** Schematischer Querschnitt einer *Geosiphon*-Blase (nach Schüßler und Kluge 2001).

Das Habitat der Symbiose sind feuchte Böden, die arm an Nährstoffen, besonders Phosphat, sind. Dort lebt *Geosiphon* auf der Oberfläche sowie in den oberen Bodenschichten, und findet sich in einer Pflanzengemeinschaft mit dem Hornmoos *Anthoceros*, dem Lebermoos *Blasia* und dem Laubmoos *Dicranella* (Kluge *et al.* 2002, Schüßler und Kluge 2001).

Die Etablierung der Symbiose geschieht durch Kontakt der Pilzhyphen mit freilebenden, unbeweglichen *Nostoc*-Filamenten (Primordienstadium). Dabei schwillt die Hyphenspitze an und umschließt schrittweise die *Nostoc*-Zellen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung einer 1-2 mm großen, einzelligen Blase. Jede Blase stellt einen spezialisierten, polyenergidigen Teil des Pilzmyzels dar, welches coenocytisch den Boden durchzieht (Kluge *et al.* 2002). Ein Schema der Blase und ihr natürliches Aussehen werden in Abbildung 3 gezeigt.

In beiden Systemen wird die Etablierung der Symbiose durch niedrige Phosphatkonzentrationen gefördert, wohingegen es bei ausreichender Phosphatversorgung der photoautotrophe Symbiosepartner zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in der mutualistischen Beziehung kommt, und der Pilz in seinem Wachstum eingeschränkt wird. Allerdings ist bei *Ge. pyriformis* der Pilzpartner, im Gegensatz zur AM, der Makrosymbiont und als photoautotropher Partner dient ein prokaryotischer Organismus.

Die ersten Vermutungen, dass bei *Geosiphon pyriformis* eine Verwandtschaft zur AM-Pilz Gattung *Glomus* bestehen könnte, äußerte 1992 Mollenhauer aufgrund von Ähnlichkeiten in der Sporenmorphologie. Durch einen Vergleich morphologischer und ultrastruktureller Eigenschaften der Sporen von *Geosiphon* und *Glomus versiforme* konnte gezeigt werden, dass die *Geosiphon* Sporen tatsächlich die typischen Merkmale bestimmter AM-Pilze aufweisen (Schüßler *et al.* 1994). Weiterhin konnten auch große Ähnlichkeiten beim Aufbau und der Funktion der symbiotischen Kontaktgrenzflächen zwischen *Ge. pyriformis* und der AM-Pilz und Pflanzenzellensymbiose gezeigt werden (Schüßler *et al.* 1996).

Auch auf molekularbiologischer Ebene wurde dann durch die phylogenetische Analyse des 18S rRNA Gens der Nachweis geführt, dass ein verwandtschaftlicher Zusammenhang zu den AM-Pilzen besteht. *Ge. pyriformis* erschien in den mit verschiedenen Analysemethoden gewonnenen, phylogenetischen Stammbäumen als basaler Zweig, und es wurde gemutmaßt, dass *Ge. pyriformis* Mitglied einer ursprünglichen AM-Pilzlinie sein könnte und mit den AM-Pilzen eine monophyletische Gruppe bildet, welche einen gemeinsamen Ursprung mit den *Ascomycota* und *Basidiomycota* hat (Gehrig, Schüßler und Kluge 1996). Dies stand im Gegensatz zu der Einordnung der AM-Pilze in die *Zygomycota*. Allerdings war die Zahl der zur Verfügung stehenden 18S rRNA-Gensequenzen zu dieser Zeit zu gering, um abgesicherte Ergebnisse zu liefern.

Ausgehend von den oben genannten Ergebnissen besteht in unserer Arbeitsgruppe die Hypothese, dass *Ge. pyriformis* eine spezielle Ausbildung der "AM" darstellt und solch eine Symbiose von Pilz und photoautotrophen Bakterien eine frühe Evolutionsstufe der AM repräsentieren könnte (Schüßler und Kluge 2001, Schüßler 2002).

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von den Arbeiten zu *Geosiphon pyriformis* und dessen Beziehung zu den AM-Pilzen sollte die molekulare Phylogenie der AM-Pilze anhand von Sequenzen, die nahezu das komplette Gen der 18S rRNA umfassen, untersucht werden und auf dieser Basis eine natürliche taxonomische Einteilung der AM-Pilze entwickelt werden.

Diese Analyse dient auch zur Ableitung molekularer Sonden, die unter anderem in Experimenten zur Ökophysiologie, Biodiversität und Evolution der AM-Pilze eingesetzt werden können.

Das 18S rRNA Gen hat im Gegensatz zu früher angewandten morphologischen und molekularen Methoden (Bentivenga und Morton 1994, Dodd *et al.* 1996, Hahn *et al.* 1993) den Vorteil, sich nicht während der Ontogenese oder Ausdifferenzierung von Organen zu verändern, da die untersuchten Charaktere konstant sind. Das Gen liegt als Multicopy-Gen vor und hat bei Pilzen in verschiedenen Studien verlässliche phylogenetische Informationen geliefert (Bruns, White und Taylor 1991, Bruns *et al.* 1992). Es wird deshalb gerade auch bei morphologisch schwer unterscheidbaren Pilzgruppen zur Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse herangezogen (Sugiyama, Nagahama und Nishida 1996, Tanabe *et al.* 2000, Tehler *et al.* 2000). Das Gen enthält neben hoch konservierten Regionen, die als Zielsequenzen für „universelle“ Primer dienen können, auch variabelere Regionen, welche zur Entwicklung von familien-, gattungs-, oder - im günstigsten Fall - artspezifischen molekularen Sonden geeignet sind (Bruns, White und Taylor 1991, Bruns *et al.* 1992, Simon, Lalonde und Bruns 1992, Simon, Lévesque und Lalonde 1993).

Die Vorgehensweise bei der vorliegenden Arbeit sah dabei wie folgt aus: Am Anfang stand die Entwicklung einer Methode, mit der aus einzelnen AM-Pilzsporen DNA isoliert, und das 18S rRNA Gen mittels universeller Primer in der PCR amplifiziert werden kann. Durch die DNA-Isolation aus Einzelsporen sollte vor allem erreicht werden, dass die Gefahr der Kontamination mit anderen AM-Pilzisolaten oder auch anderen Pilzen weitestgehend reduziert wird.

Die zu untersuchenden Sporen stammten meist aus internationalen Kultursammlungen, wie der BEG (La Banque Européenne des Glomales, seit kurzem „The International Bank of *Glomeromycota*“, INRA, Dijon Cedex, France; <http://www.kent.ac.uk/bio/beg/>) und der INVAM (International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi; Morgantown, USA; <http://invam.caf.wvu.edu>) oder der Sammlung von Dr. Chris Walker, einem der führenden AM-Pilz-Taxonomen.

Die Identität aller Sporen wurde vor den molekularbiologischen Untersuchungen von Dr. Chris Walker anhand morphologischer Merkmale überprüft. Von diesen Sporen wurden Belegexemplare im Herbar von Dr. Chris Walker hinterlegt, mit deren Hilfe es

möglich sein sollte, die Ergebnisse aus dieser Arbeit auf morphologischer Ebene zu überprüfen (Walker 1979).

Die in der PCR erhaltenen Amplifikate sollten in einen geeigneten Vektor ligiert und in *E. coli* Zellen transformiert werden. Die klonierten Plasmide wurden danach isoliert, sequenziert und von den Klonen Dauerkulturen angelegt und gelagert.

Über einen Datenbankabgleich fand zunächst eine erste Charakterisierung der Sequenzen statt, die anschließend manuell, unter Berücksichtigung der 18S rRNA Sekundärstruktur (Van de Peer *et al.* 1998), in eine Datenmatrix überführt wurden, um sie vergleichen zu können. Neben den AM-Pilzsequenzen aus unserem Labor wurden auch Sequenzen von AM-Pilzen und allen höheren Pilztaxa aus Datenbanken in das Alignment mit einbezogen. Diese Matrix diente dann als Grundlage zur Berechnung phylogenetischer Stammbäume, aufgrund der großen Datensätze vor allem mittels der Neighbour-Joining und Maximum-Parsimony Methode (Felsenstein 1983). Aus diesen Daten sollte versucht werden, eine natürliche Phylogenie und Taxonomie der AM-Pilze zu erstellen. Zur Absicherung der Ergebnisse ist es dabei nötig eine möglichst große Anzahl an AM-Pilzisolaten auf genetischer Ebene zu charakterisieren.

Aus den bei der Genanalyse gefundenen Sequenzmotiven sollte weiterhin versucht werden, spezifische PCR-Primer abzuleiten. Deren Spezifität wurde zunächst an klonierten AM-Pilzsequenzen getestet. Anschließend sollte mit diesen Sonden sowohl an Pflanzenmaterial aus Laborkulturen als auch aus dem Freiland versucht werden, die entsprechenden Pilztaxa nachzuweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Schüttler Certomat R und HK	B. Braun, Melsungen
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	E. Merck, Darmstadt
Dokumentationssystem Gel Print 2000i	BioPhotonics, Ann-Arbor (USA)
Minifuge RF	Heraeus, Osterode
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Osterode
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Stereomikroskop MZ 9.5	Leica, Bensheim
Inversmikroskop DM <i>IRBE</i>	Leica, Bensheim
Photometer DMS 70	Varian, Darmstadt
Ultraschallbad Sonorex super 10P	Bandelin Electronic, Berlin
Plastik-Einmalmaterial	Eppendorf, Greiner, Sarstedt, Perkin-Elmer

#### 2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien der Firmen Merck, Darmstadt, und Roth, Karlsruhe, in der Qualität „pro analysi“ verwendet.

#### 2.1.3 Puffer und Lösungen

TE-Puffer (1x):

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

TAE-Puffer (50x):

242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0

## DNA-Auftragspuffer (10x)

50% Glycerin  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylencyanol  
10 mM Tris-HCl, pH 8,0

## Ethidiumbromid-Lösung:

5 mg Ethidiumbromid/l  $H_2O_{\text{bidest}}$

## STET-Puffer:

8% (w/v) Saccharose  
5% (w/v) Triton X-100  
50 mM EDTA  
50 mM Tris/HCL, pH 8,0

## STETL-Puffer:

STET-Puffer + Lysozym (10mg/ml)

## HEPES-Puffer:

50 mM, pH 7,5 in  $H_2O_{\text{bidest}}$   
titriert mit 1M KOH

## SDS-Lösung:

1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in  $H_2O_{\text{bidest}}$

## Chitin-Färbelösung:

Fluoreszenzmarkiertes Lektin Wheat Germ Agglutinin  
(Oregon Green<sup>®</sup> 488 conjugate, Molecular Probes  
Europe, Leiden, Niederlande) 25 µg/ml in 50 mM HEPES-  
Puffer, pH 7,5

## Antifading-Lösung:

2.5% DABCO (1,4 Diazobicyclo 2,2,2,octan), und 0.1% p-  
Phenylendiamin gelöst in 100 mM HEPES-Puffer (pH 7.5)

### 2.1.4 Nährmedien

SOC-Medium:

20 g/l Bactotrypton  
5 g/l Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
20 mM Mg<sup>2+</sup>  
(der Stammlösung:  
10 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
10 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O)  
20 mM Glucose  
Das Gemisch wird sterilfiltriert

LB-Medium:

10 g/l Bactotrypton  
10 g/l NaCl  
5 g/l Hefeextrakt  
gelöst in H<sub>2</sub>O bidest und auf pH 7,5 eingestellt.

LB/Amp bzw. LB/Kanamycin-Medium:

LB-Medium mit 50 mg Ampicilin bzw. Kanamycin/l \*

LB/Amp bzw. LB/Kanamycin -Platten:

32 g/l LB-Agar, eingestellt auf pH 7,5 \*

\* Das Ampicilin / Kanamycin wird nach dem Autoklavieren  
zugefügt, wenn das Medium auf höchstens 55 °C abge-  
kühlt ist.

### 2.1.5 Enzyme

#### a) Polymerasen

<i>AmpliTaq</i> <sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/μl)	Perkin Elmer, Dreieich
SAWDY <i>Taq</i> <sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/μl)	Peqlab, Erlangen
AGS Gold <i>Taq</i> <sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/μl)	Hybaid, Heidelberg

#### b) Restriktionsenzyme

<i>EcoRI</i> (20 U/μl)	Boehringer, Mannheim
<i>HaeIII</i> (10 U/μl)	Amersham Pharmacia Gmbh, Freiburg

Die Enzyme wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit den oben angegebenen Aktivitäten (U/μl) in der Arbeit eingesetzt.

### 2.1.6 Kit-Systeme

Dynabeads <sup>®</sup> DNA DIRECT Kit	Dynal, Hamburg
Qiaprep spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit (Versionen E und E2)	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.7 Bakterienstämme

Zur Transformation wurden folgende *E. coli* -Stämme verwendet:

Stammbezeichnung:

TOP 10F'

Genotyp:

F' {*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

Stammbezeichnung:

TOP 10

Genotyp:

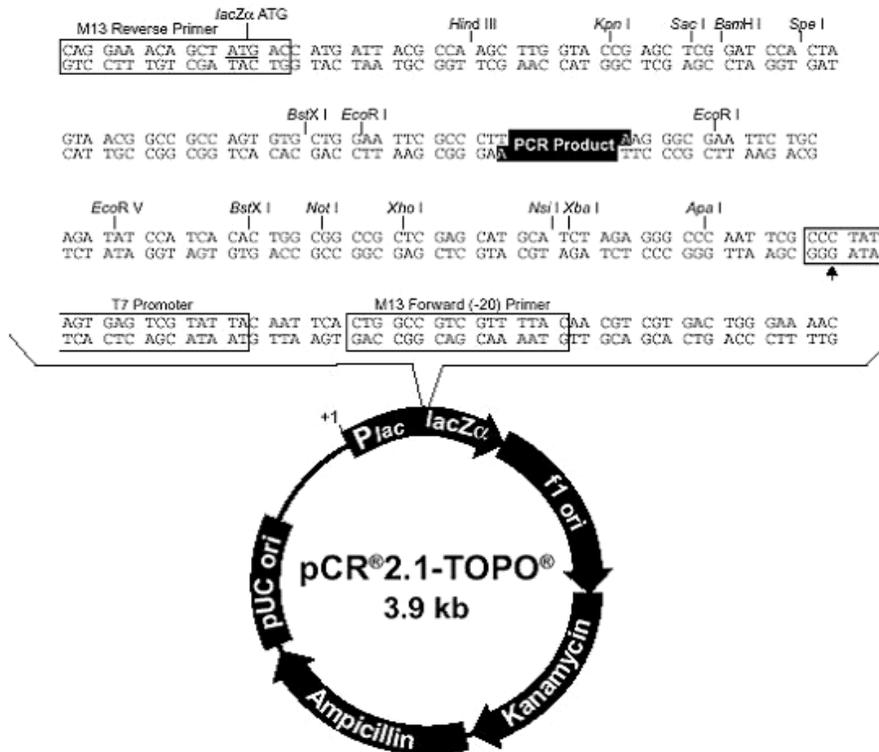
F' *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15Δ*lacX74 recA1 deoR araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

**2.1.8 Vektoren**

a) Vektor pCR 2.1-TOPO (Klonierungskit Version E)

Der Vektor pCR 2.1-TOPO hat eine Größe von 3908 bp. Im Folgenden ist die Orientierung und Größe wichtiger Regionen auf dem Vektor aufgeführt:

- LacZ $\alpha$ -Fragment: bp 1-571,
- M13 reverse priming site: bp 205-221,
- Multiple cloning site: bp 234-357,
- T7 promoter/priming site: bp 364-383,
- M13 forward (-20) priming site: bp 391-406,
- M13 forward (-40) priming site: bp 411-426,
- f1 origin: bp 548-962,
- Kanamycin resistance ORF: bp1296-2090,
- Ampicillin resistance ORF: bp 2108-2968,
- ColE1 origin: bp 3133-3786.



**Abbildung 4:** Der Vektor pCR 2.1-TOPO TA. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Vektor mit einem inserierten PCR-Produkt nach erfolgreicher TOPO-Cloning-Reaktion.

## b) Vektor pCR4-TOPO (Klonierungskit Version E2)

Der Vektor pCR4-TOPO hat eine Größe von 3957 bp. Im Folgenden ist die Orientierung und Größe wichtiger Regionen auf dem Vektor angeführt:

*lac* promotor region: bp 2-216

Start of transcription: bp179

M13 Reverse priming site: bp 205-221

LacZ $\alpha$ -*ccdB* gene fusion: bp 217-810

T3 priming site: bp 243-262

TOPO<sup>®</sup> Cloning site: bp 294-295

T7 priming site: bp 328-347

M13 Forward (-20) priming site: bp 355-370

*neo* (Kanamycin) promoter region: bp 1021-1070

*neo* (Kanamycin) resistance gene (ORF): bp 1159-1953

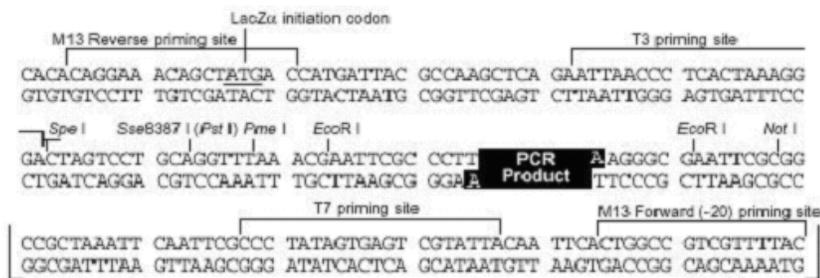
*bla* promoter region: bp 2062-2143

Start of transcription: bp 2122

Ribosome binding site: bp 2145-2149

Bla (Ampicillin) resistance gene (ORF): bp 2157-3017

pUC origin: bp 3162-3835



**Abbildung 5:** Der Vektor pCR 4-TOPO TA. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Vektor mit einem inserierten PCR-Produkt nach erfolgreicher TOPO-Cloning-Reaktion.

### 2.1.9 DNA-Längenstandard

#### Marker 1:

SPPI / *EcoR1*

Dieser Längenstandard wurde durch enzymatischen Verdau von SPP1-Phagen-DNA mit *EcoR1* im eigenen Labor hergestellt:

**Tabelle 3:** Restriktionsansatz für Marker 1

SPP1-Phagen-DNA	500 µl
10x <i>EcoR1</i> -Puffer	60 µl
<i>EcoR1</i>	10 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	30 µl
Σ	600 µl

über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert  
ad 1000 µl mit DNA-Auftragspuffer (10x Farbmarker) aufgefüllt

#### Marker 2:

MIX aus λ-DNA / *HindIII* und ΦX174-DNA / *HaeIII*;

Hersteller: Finnzymes, Espoo, Finnland

**Tabelle 4:** Fragmentlängen der verwendeten Längenstandards

Fragment-Nr. ↓	Marker 1	Marker 2
	[bp]	[bp]
17	-	23130
16	-	9416
15	8100	6682
14	7100	4361
13	6000	2322
12	4800	2027
11	3500	1353
10	2700	1078
9	1900	872
8	1850	603
7	1500	564
6	1400	310
5	1150	271/281
4	1000	234
3	680	194
2	490	118
1	370	72

### 2.1.10 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Carl Roth, Karlsruhe, in lyophilisiertem Zustand geliefert.

**Tabelle 5:** In der Arbeit verwendetet Oligonukleotide. Ein Lageschema der Primer auf dem 18S rDNA-Gen ist dem Anhang (Abbildung 23) beigefügt.

Name	Konzentration [pMol/ $\mu$ l]	Nukleotidsequenz		Tm [°C]
		5'	3'	
GeoA1	10	GGTTGATCCTGCCAGTAGTC		62
ART4	10	TCCGCAGGTTACCTACGG		62
GeoA2	10	CCAGTAGTCATATGCTTGTCTC		64
NS1	10	GTAGTCATATGCTTGTCTC		54
GeoNS1	10	ATGGCTCATTAAATCAGTTAT		54
Geo11	10	ACCTTGTTACGACTTTTACTTC		64
Geo10	10	ACCTTGTTACGACTTTTACTTC		60
NS8	10	TCCGCAGGTTACCTACGGA		64
NS3	10	GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC		70
Geo223	10	GTCTAAGTATAAGCAAGTATAC		58
Geo2651	10	GCTGTTTCCAGCCACCCA		58
Archeo 1a	10	TATTTGATAGTGCCTTACTACT		58
Archeo 5b	10	GCAACAGTCCCTCTAAGAAG		60
Archeo 6a	10	GGCTAATCGCGCAACAGTC		60
Gloma 1	10	CATGCATGTCTAAGTATAAATCG		62
Gloma 2	10	CCATGCATGTCTAAGTATAAATC		62

### 2.1.11 Die untersuchten Arten / Isolate von AM-Pilzen

**Tabelle. 6: Gesamtüberblick der analysierten AM-Pilzisolat**

<sup>a</sup> Die Zahlen geben an in welcher phylogenetischen Analyse die 18S DNA Sequenzen benutzt wurden: 1 = Schwarzott, Walker und Schüßler 2001 (in dieser Arbeit unter Punkt 3.3 aufgeführt); 2 = Schüßler, Schwarzott und Walker 2001 (in dieser Arbeit unter Punkt 3.2 aufgeführt); 0 = in der vorliegenden Arbeit zusätzlich analysierte Sequenzen; Kont. = Kontamination

<sup>b</sup> DAOM-Nr. (Department of Agriculture and Agri-Food Ottawa, National Myological Herbarium) = Herbar-Belegnummer; W-Nr. / Att-Nr. (Sammlung von Chris Walker, England) = Beleg-Nr. / Kultur-Nr.; MAFF-Nr. (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan) = Kultur-Nr.; BEG-Nr. ( La Banque Européenne des Glomales; INRA, Frankreich) = Kultur-Nr., INVAM-Nr.(Internatinal Collection of Arbuscular and Vesicular–Arbuscular Mycorrhizal Fungi, USA) = Kultur-Nr.

<sup>c</sup> N = unbekannt, F = aus pilzinfizierten Wurzelstücken gezogen, M = Multisporenkultur, S = Einzelsporenkultur, SC = Sporencluster-Kultur, ST = Kulturansatz mit aus der Natur entnommener Erde, DS = Sporen, die direkt aus Freilanderde isoliert wurden

<sup>d</sup> Klonbezeichnung, Fett = Kontaminationssequenzen, Kursiv = nicht sequenziert

<sup>e</sup> Datenbankidentifikationsnummer ( Fett = eingereichte Sequenzen aus dieser Arbeit )

Artname	Analyse	Isolat-Code(s) und / oder Voucher-Nr. / Kultur-Nr. <sup>b</sup>	Kulturtyp, Ursprung <sup>c</sup>	Herkunft der sequenzierten Kultur	Klon (zur Accession-Nummer) <sup>d</sup>	Accession-Nummer <sup>e</sup>
(1) <i>A. foveata</i>	2	BEG33, W2393 / Att 209-37	M, England, Walker	Gianinazzi-Pearson	PWD159_1_1	<b>AJ306442</b>
(2) <i>A. lacunosa</i>	0	BEG78 / W3289 / Att 626-8	M, USA, Watson	Gianinazzi-Pearson	PWD195_1_2 / <b>PWD 158_2_3</b> / <b>PWD148_1_4</b> / <b>PWD171_2_2</b> / <b>PWD181_2_5</b>	
(3) <i>A. laevis</i>	2	WUM46, W3107 / Att 896-8	M, Australien, Abbott	Abbott	PWD95_1_4	<b>Y17633</b>
(4) <i>A. laevis</i> (?)	Kont.	BEG13 / W3291 / Att 192-4	M, New Zealand, Mosse	Gianinazzi-Pearson	<b>PWD131_1</b>	
(5) <i>A. longula</i>	2	W3302 / Att 698-3	M, Venezuela, Cuenca	Walker	PWD150_1_7	<b>AJ306439</b>
(6) <i>A. rugosa</i>	1 + 2	WV949, früher WV935	N, unbekannt, Dant	INVAM		Z14005
(7) <i>A. sp.</i>	2	W3424 / Att 729-0	ST, Venezuela, Cuenca	Cuenca	PWD152_3_5	<b>AJ306440</b>
(8) <i>A. spinosa</i>	1 + 2	WV860	N, unbekannt, unbekannt	INVAM		Z14004
(9) <i>A. spinosa</i>	0	W3574 / Att keine / EX_HOLOTYP	M, Australien, Abbott	Abbott	PWD210_1_1	
(10) <i>A. undulata</i> (?)	2	WUM18, W2941 / Att 869-3	M, Australien, Abbott	Abbott	PWD157_2_3	<b>AJ306441</b>

(11) <i>Ar. leptoticha</i>	1 + 2	NC176	N, unbekannt, unbekannt	INVAM	PWD147_1_1	AJ006466, <b>AJ301861</b>
(12) <i>Ar. leptoticha</i>	2	MAFF520055	S, Japan, Murakoshi and Siato	MAFF		AB015052
(13) <i>Ar. (A.?) nicholsonii</i>	0	W3847 / Att 200-21	??	Walker	PWD265_1_1	
(14) <i>Ar. trappei</i>	1 + 2	NB112	N, Namibia, Klopatek	INVAM,		AJ006800
(15) <i>Ar. trappei</i>	1 + 2	W3179 / Att186-1	ST, Australien, Schweiger	Walker	PWD103_3_8 / PWD 103_3_10	<b>Y17634</b> (Klon PWD 103_3_8)
(16) <i>Ar. trappei</i>	1	AU219, WUM19(1)	N, Australien, Gazei	INVAM		AJ006801 (Teilsequenz)
(17) <i>E. `contigua`</i>	1 + 2	WV201, früher WV796	N, unbekannt, Morton	INVAM		Z14011
(18) <i>E. colombiana</i>	1 + 2	FL356, früher WV877	N, unbekannt, unbekannt	INVAM		Z14006
(19) <i>E. colombiana</i>	Kont.	W3791 / Att 921-0	N, Kolumbien, Sieverding	CIAT	<b>PWD246_1_5</b>	
(20) <i>E. aff infrequens</i>	Kont.	W3067 / Att 672-5	M, Island, Griepsson	Vestberg	<b>PWD137_23 / PWD137_N_11 / PWD137_5_6 / PWD137_5_13 / PWD137_5_14</b>	
(21) <i>E. infrequens</i>	Kont.	W3872 / Att keine	DS, England, Walker	Walker	<b>PWD280_2_6 / PWD281_3_4</b>	
(22) <i>E. kentinensis</i>	Kont.	W2326 / Att 559-0 / EX HOLOTYP	N, Taiwan, Wu	Wu	<b>PWD197_1_3 / PWD248_2_6</b>	
(23) <i>E. schenkii</i>	Kont.	W3571 / Att 58-6 / EX HOLOTYP	M, Kolumbien, Sieverding	Walker	<b>PWD198_1_6 / PWD247_4_6</b>	
(24) <i>Ge. pyriformis</i>	1 + 2	W3619 / GEO1	S, Deutschland, Mollenhauer	Schüßler		X86686, AJ276074, AJ132665, Y15904 & 05, Y17831
(25) <i>Ge. pyriformis</i>	0	aus Laborkultur	S, Deutschland, Mollenhauer	Schüßler	<b>PWD205_1_2 / PWD205_2_1 / PWD205_2_2 / PWD205_2_3 / PWD205_2_5</b>	
(26) <i>Gi. aff. margarita</i>	2	W2992 / Att keine	DS, Argentinien, Cabello	Cabello	PWD143_12	<b>AJ276090</b>
(27) <i>Gi. albida</i>	1 + 2	FL927, früher WV1034	N, USA, Perez	INVAM		Z14009
(28) <i>Gi. candida</i>	2	BEG17, W3292 / Att 26-19	S, Taiwan, Wen-Neng Chou	Gianinazzi-Pearson	PWD131_7	<b>AJ276091</b>
(29) <i>Gi. decipiens</i>	1	BEG45	M, Australien, Mercer	INRA		U96146 (Teilsequenz)
(30) <i>Gi. gigantea</i>	1 + 2	WV932	N, unbekannt, unbekannt	INVAM		Z14010
(31) <i>Gi. rosea</i>	1 + 2	DAOM194757	N, USA, Menge	Kalifornien		X58726
(32) <i>G. aggregatum</i>	Kont.	W3871 / Att 1057-2	F, Frankreich, Plenchette	Plenchette	<b>PWD276_2_3</b>	
(33) <i>G. aggregatum (?)</i>	Kont.	W3233 / Att 574-10	M, Bangladesch, Mridha	Walker	<b>PWD184_2_5</b>	
(34) <i>G. caledonium</i>	1 + 2	BEG15	M, Dänemark, Jakobsen	INRA		Y17653, AJ301854
(35) <i>G. caledonium</i>	1 + 2	BEG20, W3294 / Att 263-15, "Rothamsted Isolat"	N, England, Hayman	Walker	PWD135_1	<b>Y17635</b> , AJ301853
(36) <i>G. claroideum</i>	1 + 2	BEG31, W1843 / Att 79-3	M, Finland, Vestberg	Walker		Y17641, AJ276079
(37) <i>G. claroideum</i>	1 + 2	BEG23	M, Tschechische Republik, Gryndler	INRA		AJ276080, Y17642
(38) <i>G. claroideum</i>	1 + 2	BEG14	N, Dänemark, Rosendahl	INRA		AJ301851 & 52, AJ276075, Y17636
(39) <i>G. candida</i>	Kont.	W3020 / Att 26-10	S, Taiwan, Chou	Gianinazzi-Pearson	<b>PWD161_1_1 / PWD177_2_2</b>	
(40) <i>G. coremioides</i>	2	"Biorize"	N, Elfenbeinküste, Blal	Societe Biorize, Dijon, Frankreich		AJ249715

(41) <i>G. coronatum</i>	1 + 2	COG1, W3153 / Att 143-5	S, Australien, McGee	Walker	PWD93_2_1	<b>AJ276086</b>
(42) <i>G. coronatum</i>	0	W3582 / Att 108-7, EX-HOLOTYP	M, Italien, Giovannetti	Merryweather	PWD203_1_1 / PWD203_1_4	
(43) <i>G. etunicatum</i>	1 + 2.	UT316, W3093 / ATT 678-4	N, unbekannt, Wood	INVAM	PWD106_3_2	Z14008, <b>Y17639</b>
(44) <i>G. etunicatum</i>	1 + 2.	W2423 / Att 382-16	M, Schottland, Walker	Walker		Y17644, AJ276076, AJ301860 & 63
(45) <i>G. etunicatum</i>	Kont.	W3248 / Att 367-1	M, Schottland, Walker	Walker	<b>PWD122_1</b>	
(46) <i>G. etunicatum</i>	Kont.	W3546 / Att 382-16	M, Schottland, Walker	Walker	<b>PWD196_1_1</b>	
(47) <i>G. etunicatum</i> (?)	0	W3816 / Att 844-2	S, Mexiko, Walker	Walker	<b>PWD279_1_1</b> / PWD279_1_3	
(48) <i>G. etunicatum</i> (?)	0	W3808 / Att 367-3	S, Schottland, Walker	Walker	PWD249_1_4	
(49) <i>G. etunicatum</i> (?)	0	W3815 / Att 843-1	S, Mexiko, Rodriguez	Walker	PWD255_2_1	
(50) <i>G. fasciculatum</i>	1 + 2	BEG53	S, Kanada, Furlan	INRA		Y17640
(51) <i>G. fissuratum</i>	0	W3577 / Att keine, EX-HOLOTYP	DS, Polen, Blaszkowski	Walker	PWD211_2_1 / PWD211_2_4	
(52) <i>G. fragilistratum</i>	1 + 2	W3238 / Att 112-6, EX-HOLOTYP	M, Dänemark Jakobsen	Walker	PWD114_3_3	<b>AJ276085</b>
(53) <i>G. geosporum</i>	1 + 2	BEG11, W992 / Att 191-1	S, England, Dodd	Walker und INRA		Y17643, AJ132664, AJ245637
(54) <i>G. intraradices</i>	1 + 2	DAOM197198 / W 3182/ Att 690-7	N, Kanada, Parent	Piché	PWD164_1_5	X58725, <b>AJ301859</b>
(55) <i>G. lamellosum</i>	1 + 2	W3161 / Att 672-13	S, Island, Vestberg	Walker	PWD116_1_2	<b>AJ276083</b>
(56) <i>G. lamellosum</i>	1 + 2	W3160 / Att 244-13, EX-HOLOTYP	S, Kanada, Vestberg	Walker	PWD100_2_6	<b>AJ276087</b>
(57) <i>G. lamellosum</i>	0	W3814 / Att 756-1	S, Deutschland, Walker	Walker	PWD252_1_6	
(58) <i>G. lamellosum</i>	1 + 2	W3158 / Att 244-7, EX-HOLOTYP	S, Kanada, Vestberg	Walker	PWD99_5_1 / PWD99_5_2	
(59) <i>G. luteum</i>	1 + 2	SA101-3, W3090 / Att 676-0, früher "G. clarum NT4"	N, unbekannt, Talukdar	INVAM	PWD141_1	U36591(Teilsequenz), <b>AJ276089</b> , Y17645 (Teilsequenz)
(60) <i>G. macrocarpum</i>	Kont.	W941 / Att keine / LECTOTYP	DS, Sporokarp, Frankreich, Tulasne	Herbar Paris	<b>PWD208_1_3</b>	
(61) <i>G. manihotis / clarum</i>	2	W3224 / Att575-9, EX-HOLOTYP (CIAT-C-1-1)	F, unbekannt, Howeler	Walker	PWD113_4_1	<b>Y17648</b>
(62) <i>G. manihotis / clarum</i>	2	FL879-3, W3181 / Att575-25, EX-HOLOTYP (CIAT C-1-1)	F, unbekannt, Howeler	INVAM		Y17638, U36590 (Teilsequenz)
(63) <i>G. manihotis / clarum</i>	0	FL879-6, / W3095 / Att 575-24	N, Kolumbien, Howeler	INVAM	PWD82_2_1 / PWD82_2_2	
(64) <i>G. manihoti / clarum</i>	0	W3776 / Att 894-7	S, Island, Greipsson	Walker	PWD236_1_3	
(65) <i>G. manihotis / clarum</i>	1 + 2	BR147B-8, W3163 / Att 72-1	N, unbekannt, Ming Lin	Bioplanta, Inc., Brasilien	PWD125_1	<b>AJ276084</b>
(66) <i>G. manihotis / clarum</i>	1 + 2	BR212, (isolate lost)	N, Brasilien, Sturmer	INVAM		U36592, Steht als Gl. sp bei BLAST
(67) <i>G. microaggregatum</i>	1	DAOM215235	N, Kanada, Dalpe´ und Mitrow	DAOM		U96144 (Teilsequenz)

(68) <i>G. microcarpum</i>	Kont.	W942 / Att keine / LECTOTYP	DS, Sporokarp, France, Tulasne	Herbar Paris	PWD260_5_1 / PWD260_5_12 / PWD260_5_glo2_1 / PWD261_3_3 / PWD261_3_2 / PWD261_3_10 / PWD261_3_11 / PWD261_3_12 / PWD278_2_1	
(69) <i>G. mosseae</i>	2	W3528 / Att 867-10	S, Australien, Abbott	Walker	PWD187_2_1	<b>AJ306438,</b>
(70) <i>G. mosseae</i>	1 + 2	BEG12, Rothamsted "Yellow Vacuolate"	M, England, Mosse	INRA		U31995 (Teilsequenz), U96139 (Teilsequenz,)
(71) <i>G. mosseae</i>	Kont	BEG12 / W3811 / Att 109-18	M, England, Mosse	Walker	<b>PWD277_1_2 / PWD277_1_3</b>	
(72) <i>G. mosseae</i>	1	FL156B, früher WV156	N, USA, Schenck	INVAM		Z14007
(73) <i>G. mosseae</i>	1	DAOM221475	N, Kanada, unbekannt	DAOM		U96145 (Teilsequenz)
(74) <i>G. mosseae</i>	1	DAOM212595	N, Kanada, Dalpe´ und Mitrow	DAOM		U96143 (Teilsequenz)
(75) <i>G. mosseae</i>	1	DAOM198394	N, Kanada, Furlan	DAOM		U96142 (Teilsequenz)
(76) <i>G. mosseae</i>	1	BEG25	S, England, Dodd	INVAM		U96140 (Teilsequenz)
(77) <i>G. mosseae</i>	1	BEG69	S, Frankreich, Leyval	INVAM		U96141 (Teilsequenz,)
(78) <i>G. proliferum</i>	1 + 2	DAOM226389 / MUCL41827, EX-HOLOTYP	F, Guadeloupe, Risède	aus Guadeloupe		AF213462 (Teilsequenz,)
(79) <i>G. scintillans</i>	0	Voucher D-1 (Sample3)	DS, Deutschland, Walker	Walker	PWD200_2_5 / PWD200_2_6	
(80) <i>G. scintillans</i>	0	W3793 / Att keine	DS, Deutschland, Walker	Walker	PWD245_1_5 / PWD245_1_2	
(81) <i>G. scintillans</i>	0	W3849 / Att 961-0	S, Polen, Blaszkowski	Walker	pWD273_3_1 / pWD273_3_2 / pWD273_3_5	
(82) <i>G. scintillans</i>	0	W3862 / Att keine	DS, Deutschland, Walker	Walker	pWD274_3_1 / pWD274_3_2 / pWD274_3_3	
(83) <i>G. sinuosum</i>	1	MD126, früher <i>S. sinuosa</i> ,	N, USA, Chabot	INVAM		AJ133706
(84) <i>G. sp.</i>	1 + 2	UY110.6.10, W3347 / Att 565-7	SC, England, Merryweather	Walker	PWD145_6_4	<b>AJ301857</b>
(85) <i>G. sp.</i>	1 + 2	UY110.6.9, W3349 / Att 565-11	SC, England, Merryweather	Walker	PWD175_1_5	<b>AJ301856</b>
(86) <i>G. sp.</i>	1	DAOM225952	N, Deutschland, Vandenkoornhuysse	DAOM		AF139733 (Teilsequenz)
(87) <i>G. sp.</i>	Kont.	WUM 50 / W3113 / Att 654-11	M, Australien, Abbott	Walker	PWD94_3_5	
(88) <i>G. sp. (Browncluster)</i>	Kont.	W3194 / Att 115-3	M, Schweiz, Sanders	Walker	<b>PWD109_3_7 / PWD109_N_x</b>	
(89) <i>G. sp. (Brown-spored)</i>	Kont.	W3844 / Att 892-1	Kontaminante in Topfkultur, Schottland, Walker	Walker	<b>PWD282_1_1 / PWD282_1_4</b>	
(90) <i>G. sp. (clustered)</i>	1 + 2	W3234 / Att 13-7	SC, Indien, Walker	Walker	PWD176_1_5	<b>AJ301855</b>

(91) <i>G. sp. (Glomus-morph, Archaeospora)</i>	Kont.	W3570 / Att 200-11	M, Finnland, Vestberg	Walker	PWD199_2_3	
(92) <i>G. sp. (morph1)</i>	1 + 2	WUM3, W2940/Att 15-5	M, Australien, Abbott	Walker	PWD160_1_1	<b>AJ301864</b>
(93) <i>G. sp. (morph2)</i>	1 + 2	WUM3, W2939/Att 15-5	M, Australien, Abbott	Walker	PWD169_1_4	<b>AJ301865</b>
(94) <i>G. sp. (Little Glomus)</i>	Kont.	W3192 / Att 602-1	M, Spanien, Jeffries	Walker	PWD104_2_x	
(95) <i>G. sp. (macrocarpum?)</i>	0	W3347 / Att 565-7	M, England, Merryweather	Merryweather	PWD145_5_4	
(96) <i>G. sp. (microbrown)</i>	Kont.	UY1333 / W3127 / Att 901-1	SC, England, Merryweather	Walker	<b>PWD110_2_5</b>	
(97) <i>G. sp. (White reticulate)</i>	Kont.	W3251 / Att 599-7	ST, Deutschland, Vandenkoornhuysse	Walker	PWD121_x	
(98) <i>G. spurcum</i>	0	W4119 / Att 246-18, EX_HOLOTYP	M, USA, Pfeiffer	Walker	PWD296_1_6	
(99) <i>G. spurcum</i>	1 + 2	W3239 / Att 246-4, EX-HOLOTYP	M, USA, Pfeiffer	Walker	PWD115_1_9	<b>AJ276077</b> & 78, Y17650 & 49
(100) <i>G. trimurales</i>	0	W4124 / Att keine		Walker	PWD294_1_1 / PWD294_B_1_3	
(101) <i>G. verruculosum</i>	1 + 2	W3295 / Att 298-6, EX-HOLOTYP	S, Polen, Blaszkowski	Walker	PWD154_1_1	<b>AJ301858</b>
(102) <i>G. versiforme</i>	1 + 2	BEG47, W3221 / Att 475-21, EX-HOLOTYP	M, unbekannt, Daniels	INRA und Turin	PWD111_2_1	Y17651, AJ132666, <b>AJ276088</b>
(103) <i>G. versiforme</i>	1 + 2	BEG47, W3180 / Att 475-22, EX-HOLOTYP	M, unbekannt, Daniels	INRA und Turin	<b>PWD136_6 / PWD136_N_2 / PWD189_1_6 / PWD191_3_2 / PWD191_3_5</b>	<b>X86687</b> (Klon PWD 191_3_5)
(104) <i>G. vesiculiferum</i>	1 + 2	keine	N, Kanada, Chabot	Chabot		L20824
(105) <i>G. vesiculiferum</i>	0	W2857 / Att 14-8	N, Kanada, Furlan	Walker	<b>PWD173_1_6 / PWD180_1_4 / PWD192_1_1 / PWD193_2_3</b>	
(106) <i>G. viscosum</i>	1 + 2	BEG27, W3207 / Att 179-8, EX-HOLOTYP	ST, unbekannt, Giovannetti	Walker	PWD107_1_2	<b>Y17652</b>
(107) <i>P. brasilianum</i>	1 + 2	BR105, W3086 / Att 260-4, EX-HOLOTYP	M, Brasilien, Spain	Walker	PWD178_1_1	<b>AJ301862</b>
(108) <i>P. occultum</i>	1 + 2	IA702-3 / W3166 / Att 677-4	N, USA, Klopfenstein	INVAM	PWD108_2_1	<b>AJ276081</b>
(109) <i>P. occultum</i>	1 + 2	IA702-3 / W3091 / Att 677-3	N, USA, Klopfenstein	INVAM	PWD117_1_1	<b>AJ276082</b>
(110) <i>P. occultum</i>	Kont.	IA702-3 / W3097 / Att 677-3	N, USA, Klopfenstein	INVAM	PWD119_2_x	
(111) <i>P. occultum</i>	Kont.	CL700C-2 / W3094 / Att 679-6	N, unbekannt, unbekannt	INVAM	<b>PWD118_1_4</b>	
(112) <i>P. occultum</i>	Kont.	CL700C-2 / W3099/ Att 679-6	N, unbekannt, unbekannt	INVAM	<b>PWD105_3_1 / PWD105_N_x</b>	
(113) <i>P. occultum</i>	1 + 2	HA771	N, Hawaii, Koske	INVAM		AJ006799
(114) <i>P. occultum</i>	1	CL700	N, unbekannt, unbekannt	INVAM		AJ006798 (Teilsequenz)
(115) <i>P. sp. (occultum-like Spores)</i>	0	W3563 / Att keine	DS, Uganda, Pettit	Pettit	PWD194_1_1	
(116) <i>S. aurigloba</i>	2	WUM53, W3121 / Att860-10	M, Australien, Abbott	Abbott	PWD66_5 / PWD66_26	<b>AJ276092 &amp; 93</b>
(117) <i>S. aurigloba</i>	Kont.	WUM47 / W3105 / Att 871-3	M, Australien, Abbott	Abbott	<b>PWD49_2_4</b>	
(118) <i>S. calospora</i>	2	BEG32, W3290 / Att333-17	S, Schotland, Walker	Gianinazzi-Pearson	PWD153_1_1	<b>AJ306443</b>
(119) <i>S. calospora</i>	2	BEG32, W3213 / Att 209-33	M, England, Walker	Gianinazzi-Pearson	PWD162_1_5 / PWD162_1_6	<b>AJ306445 &amp; 46</b>

(120) <i>S. castanea</i>	1 + 2	BEG1, EX-HOLOTYP	M, Frankreich, Gianinazzi-Pearson	INRA		U31997 (Teilsequenz), AF038590
(121) <i>S. cerradensis</i>	1 + 2	MAFF520056	S, Japan, Saito	MAFF		AB041344, AB041345
(122) <i>S. coremioides</i>	Kont.	W3021 / Att 892-0	Topfpflanze in Gewächshaus, Schottland, Walker	Royal Botanic Garden, Edinburgh	<b>PWD139_N_16</b>	
(123) <i>S. fulgida</i>	2	W2993	DS, Argentinien, Cabello	Cabello	PWD167_1_6	<b>AJ306435</b>
(124) <i>S. gilmorei</i>	2	W3085 / Att590-1	S, USA, Walker,	Walker	PWD140_3	<b>AJ276094</b>
(125) <i>S. heterogama</i>	2	BEG35, W3214 / Att 334-16, 'Rothamsted culture'	N, unbekannt, unbekannt	Walker	PWD163_2_6	<b>AJ306434</b>
(126) <i>S. heterogama</i>	1 + 2	BR154-5	N, Brasilien, Ming Lin	INVAM		U36593
(127) <i>S. heterogama</i>	1 + 2	WV858B, früher WV929 ( <i>S. dipapillosa</i> )	N, USA, Morton	INVAM		Z14013,
(128) <i>S. nodosa</i>	2	BEG4, W3485 / Att 209-44	M, England, Walker	Walker	PWD186_1_2	<b>AJ306437</b>
(129) <i>S. pellucida</i>	1 + 2	WV873	N, unbekannt, Morton	INVAM		Z14012
(130) <i>S. projecturata</i>	1 + 2	W3254 / Att 697-0, EX- HOLOTYP	ST, Indonesien, Kramadibrata	Walker	PWD120_1_5	<b>AJ242729</b>
(131) <i>S. spinosissima</i>	2	W3009 / Att 664-1	ST, Venezuela, Cuenca	Walker	PWD188_2_3	<b>AJ306436</b>
(132) <i>S. weresubiae</i>	2	W2988	DS, Argentinien, Cabello	Cabello	PWD170_1_4	<b>AJ306444</b>

### 2.1.12 18S rDNA-Gensequenzen aus Datenbanken

#### a) Sequenzen anderer Pilztaxa

**Tabelle 7:** 18S rDNA-Sequenzen der *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota* und *Chytridiomycota* aus Datenbanken, die in die in den phylogenetischen Analysen benutzt wurden. Die Angaben zur Taxonomie stammen aus der BLASTsearch Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, 2002).

Artname	Accessionnummer	Abteilung
1. <i>Absidia blakesleeana</i>	AF157117	<i>Zygomycota</i>
2. <i>Absidia coerulea</i>	AF113405, AF113406	<i>Zygomycota</i>
3. <i>Absidia corymbifera</i>	AF113407, AF113408	<i>Zygomycota</i>
4. <i>Absidia glauca</i>	AF113409, AF157118	<i>Zygomycota</i>
5. <i>Absidia repens</i>	AF113410	<i>Zygomycota</i>
6. <i>Actinomucor elegans</i>	AF157119	<i>Zygomycota</i>
7. <i>Allomyces macrogynus</i>	U23935	<i>Chytridiomycota</i>
8. <i>Amylomyces rouxii</i>	AF157120	<i>Zygomycota</i>
9. <i>Apophysomyces elegans</i>	AF113411, AF113412	<i>Zygomycota</i>
10. <i>Aspergillus fumigatus</i>	M55626	<i>Ascomycota</i>
11. <i>Athelia bombacina</i>	M55638	<i>Basidiomycota</i>
12. <i>Aureobasidium pullulans</i>	M55639	<i>Ascomycota</i>
13. <i>Backusella ctenidia</i>	AF157122	<i>Zygomycota</i>
14. <i>Basidiobolus haptosporus</i>	AF113413	<i>Zygomycota</i>
15. <i>Basidiobolus ranarum</i>	AF113414, D29946	<i>Zygomycota</i>
16. <i>Blakeslea trispora</i>	AF157124	<i>Zygomycota</i>
17. <i>Blastocladiella emersonii</i>	X54264	<i>Chytridiomycota</i>
18. <i>Blastomyces dermatidis</i>	M55624	<i>Ascomycota</i>
19. <i>Blumeria graminis</i>	L26253	<i>Ascomycota</i>
20. <i>Boletus satanas</i>	M94337	<i>Basidiomycota</i>
21. <i>Candida albicans</i>	X53497	<i>Ascomycota</i>
22. <i>Capniomyces stellatus</i>	AF007531	<i>Zygomycota</i>
23. <i>Capronia pilosella</i>	U42473	<i>Ascomycota</i>
24. <i>Chaetocladium brefeldii</i>	AF157125	<i>Zygomycota</i>
25. <i>Chaetocladium jonesii</i>	AF157126	<i>Zygomycota</i>
26. <i>Chlamydoabsidia padenii</i>	AF113415	<i>Zygomycota</i>
27. <i>Choanephora cucurbitarum</i>	AF157127	<i>Zygomycota</i>
28. <i>Chytridium confervae</i>	M59758	<i>Chytridiomycota</i>
29. <i>Circinella umbellata</i>	AF157128	<i>Zygomycota</i>
30. <i>Circinomucor circinelloides</i>	AF157129	<i>Zygomycota</i>
31. <i>Coccidioides immitis</i>	M55627	<i>Ascomycota</i>
32. <i>Coemansia braziliensis</i>	AF007532	<i>Zygomycota</i>
33. <i>Coemansia reversa</i>	AF007533	<i>Zygomycota</i>
34. <i>Cokeromyces recurvatus</i>	AF113416	<i>Zygomycota</i>
35. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	M55640	<i>Ascomycota</i>
36. <i>Conidiobolus coronatus</i>	AF113417, AF113418	<i>Zygomycota</i>

37. <i>Conidiobolus incongruus</i>	AF113419	Zygomycota
38. <i>Conidiobolus lamprauges</i>	AF113420	Zygomycota
39. <i>Conidiobolus thromboides</i>	AF052401	Zygomycota
40. <i>Coprinus cinereus</i>	M92991	Basidiomycota
41. <i>Cronartium ribicola</i>	M94338	Basidiomycota
42. <i>Cryptococcus neoformans</i>	L05428	Basidiomycota
43. <i>Cunninghamella bertholletiae</i>	AF113421	Zygomycota
44. <i>Cunninghamella echinulata</i>	AF157130	Zygomycota
45. <i>Cunninghamella elegans</i>	AF113422	Zygomycota
46. <i>Cunninghamella polymorpha</i>	AF113423	Zygomycota
47. <i>Dichotomocladium elegans</i>	AF157131	Zygomycota
48. <i>Dicranophora fulva</i>	AF157132	Zygomycota
49. <i>Dipodascopsis uninucleata</i>	U00969	Ascomycota
50. <i>Dipsacomyces acuminosporus</i>	AF007534	Zygomycota
51. <i>Dissophora decumbens</i>	AF157133	Zygomycota
52. <i>Echinosporangium transversale</i>	AF113424	Zygomycota
53. <i>Ellisomyces anomalus</i>	AF157134	Zygomycota
54. <i>Endogone pisiformis</i>	X58724	Zygomycota
55. <i>Entomophaga aulicae</i>	U35394	Zygomycota
56. <i>Entomophthora muscae</i>	D29948	Zygomycota
57. <i>Entomophthora. schizophora</i>	AF052402	Zygomycota
58. <i>Eremascus albus</i>	M83258	Ascomycota
59. <i>Eryniopsis ptycopterae</i>	AF052403	Zygomycota
60. <i>Eurotium rubrum</i>	U00970	Ascomycota
61. <i>Fennellomyces linderi</i>	AF157135	Zygomycota
62. <i>Furculomyces boomerangus</i>	AF007535	Zygomycota
63. <i>Galactomyces geotrichum</i>	U00974	Ascomycota
64. <i>Genistelloides hibernus</i>	AF007536	Zygomycota
65. <i>Gilbertella persicaria</i>	AF157136	Zygomycota
66. <i>Gongronella butleri</i>	AF157137	Zygomycota
67. <i>Halteromyces radiatus</i>	AF157138	Zygomycota
68. <i>Helicostylum elegans</i>	AF157139	Zygomycota
69. <i>Herpotrichia juniperi</i>	U42483	Ascomycota
70. <i>Hesseltinella vesiculosa</i>	AF157140	Zygomycota
71. <i>Hyphomucor assamensis</i>	AF157141	Zygomycota
72. <i>Hypomyces chrysospermus</i>	M89993	Ascomycota
73. <i>Kickxella alabastrina</i>	AF007537	Zygomycota
74. <i>Kirkomyces cordense</i>	AF157142	Zygomycota
75. <i>Kluyveromyces lactis</i>	X51830	Ascomycota
76. <i>Lecanora dispersa</i>	L37734	Ascomycota
77. <i>Leucosporidium scottii</i>	X53499	Basidiomycota
78. <i>Leucostoma persoonii</i>	M83259	Ascomycota
79. <i>Linderina pennispora</i>	AF007538	Zygomycota
80. <i>Martensiomycetes pterosporus</i>	AF007539	Zygomycota

81. <i>Morchella elata</i>	L37537	Ascomycota
82. <i>Mortierella chlamydospora</i>	AF157143	Zygomycota
83. <i>Mortierella multidivariata</i>	AF157144	Zygomycota
84. <i>Mortierella polycephala</i>	X89436	Zygomycota
85. <i>Mortierella verticillata</i>	AF157145	Zygomycota
86. <i>Mortierella wolfii</i>	AF113425	Zygomycota
87. <i>Mucor circinelloides f. lusitanicus</i>	AF113427	Zygomycota
88. <i>Mucor indicus</i>	AF113429	Zygomycota
89. <i>Mucor amphibiorum</i>	AF113426	Zygomycota
90. <i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	AF113428	Zygomycota
91. <i>Mucor mucedo</i>	X89434	Zygomycota
92. <i>Mucor racemosus</i>	AF113430	Zygomycota
93. <i>Mucor ramosissimus</i>	AF113431	Zygomycota
94. <i>Mucor recurvus var. indicus</i>	AF157146	Zygomycota
95. <i>Mycotypha africana</i>	AF157147	Zygomycota
96. <i>Mycotypha microspora</i>	AF157148	Zygomycota
97. <i>Neocallimastix frontalis</i>	M62704	Chytridiomycota
98. <i>Neocallimastix joyonii</i>	M62705	Chytridiomycota
99. <i>Neocallimastix sp.</i>	M59761	Chytridiomycota
100. <u><i>Neurospora crassa</i></u>	X04971	Ascomycota
101. <i>Ophiostoma ulmi</i>	M83261	Ascomycota
102. <i>Pandora neoaphidis</i>	AF052405	Zygomycota
103. <i>Parasitella parasitica</i>	AF157149	Zygomycota
104. <u><i>Penicillium notatum</i></u>	M55628	Ascomycota
105. <i>Peridermium harknessii</i>	M94339	Basidiomycota
106. <i>Peziza badia</i>	L37539	Ascomycota
107. <i>Phascolomyces articulatus</i>	AF157150	Zygomycota
108. <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	AF157151	Zygomycota
109. <i>Pilaira anomala</i>	AF157152	Zygomycota
110. <i>Pilobolus umbonatus</i>	AF157153	Zygomycota
111. <i>Piromyces communis</i>	M62706	Chytridiomycota
112. <i>Pleospora rudis</i>	U00975	Ascomycota
113. <i>Pneumocystis carinii</i>	X12708	Ascomycota
114. <i>Podospora anserina</i>	X54864	Ascomycota
115. <i>Poitrasia circinans</i>	AF157155	Zygomycota
116. <i>Porpidia crustulata</i>	L37735	Ascomycota
117. <i>Protomycocladus faisalabadensis</i>	AF157156	Zygomycota
118. <i>Radiomyces spectabilis</i>	AF157157	Zygomycota
119. <i>Rhizomucor miehei</i>	AF113432, AF192506	Zygomycota
120. <i>Rhizomucor pusillus</i>	AF113433, AF113434	Zygomycota
121. <i>Rhizomucor racemosus</i>	X54863	Zygomycota
122. <i>Rhizomucor variabilis</i>	AF113435	Zygomycota
123. <i>Rhizopus azygosporus</i>	AF113436	Zygomycota
124. <i>Rhizopus microsporus var. chinensis</i>	AF113437	Zygomycota

125. <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	AF113438	Zygomycota
126. <i>Rhizopus oryzae</i>	AF113440	Zygomycota
127. <i>Rhizopus stolonifer</i>	AF113441	Zygomycota
128. <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	AF157158	Zygomycota
129. <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>rhizopodiformis</i>	AF113439	Zygomycota
130. <i>Russula compacta</i>	U59093	Basidiomycota
131. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	J01353	Ascomycota
132. <i>Saksenaea vasiformis</i>	AF113442	Zygomycota
133. <i>Schizophyllum commune</i>	X54865	Basidiomycota
134. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	X54866	Ascomycota
135. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	X69850	Ascomycota
136. <i>Smittium culisetae</i>	AF007540, D29950	Zygomycota
137. <i>Sphaeromonas communis</i>	M62707	Chytridiomycota
138. <i>Spinellus fusiger</i>	AF157159	Zygomycota
139. <i>Spiromyces spiralis</i>	AF007543	Zygomycota
140. <i>Spiromyces minutus</i>	AF007542	Zygomycota
141. <i>Spizellomyces acuminatus</i>	M59759	Chytridiomycota
142. <i>Spongipellis unicolor</i>	M59760	Basidiomycota
143. <i>Sporodiniella umbellata</i>	AF157160	Zygomycota
144. <i>Strongwellsea castrans</i>	AF052406	Zygomycota
145. <i>Syzygites megalocarpus</i>	AF157162	Zygomycota
146. <i>Talaromyces avus</i>	M83262	Ascomycota
147. <i>Taphrina deformans</i>	U00971	Ascomycota
148. <i>Thamnidium elegans</i>	AF157163	Zygomycota
149. <i>Thamnostylum piriforme</i>	AF157164	Zygomycota
150. <i>Thanatephorus praticola</i>	M92990	Basidiomycota
151. <i>Thermomucor indicae</i>	AF157165	Zygomycota
152. <i>Tilletia caries</i>	U00972	Basidiomycota
153. <i>Tremella globospora</i>	U00976	Basidiomycota
154. <i>Ustilago hordii</i>	U00973	Basidiomycota
155. <i>Utharomyces epallocaulus</i>	AF157168	Zygomycota
156. <i>Xerocomus chrysenteron</i>	M94340	Basidiomycota
157. <i>Zoophagus insidians</i>	AB016009	Zygomycota
158. <i>Zoophthora radicans</i> (syn. z. <i>culisetae</i> )	D61381	Zygomycota
159. <i>Zoophthora radicans</i>	AF052404	Zygomycota
160. <i>Zychaea mexicana</i>	AF157169	Zygomycota
161. <i>Zygorhynchus heterogamus</i>	AF157170	Zygomycota

b) Sequenzen phylogenetischer Gruppen außerhalb der Pilze

**Tabelle 8:** 18S rDNA-Sequenzen, die als Außengruppe bei der phylogenetischen Analyse der Pilzphyla (Abteilungen) einbezogen wurden.

Artname	Accession-Nummer	Taxonomie
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	X63520	Viridiplantae, Chlorophyta
<i>Aphrodita aculeata</i>	Z83749	Annelida, Polychaeta
<i>Dermocystidium salmonis</i>	U21337	Ichthyosporea, Dermocystida
<i>Diaphanoeca grandis</i>	L10824	Flagellata, Choanoflagellata
<i>Dictyostelium discoideum</i>	X00134	Rhizopoda, Amoebina
<i>Homo sapiens</i>	M10098	Chordata, Mammalia
<i>Ichthyophonus hoferi</i>	U25637	Ichthyosporea, Ichthyophonida
<i>Stylonychia pustulata</i>	X03947	Ciliata, Spirotricha
<i>Thraustochytrium kinnei</i>	L34668	Stramenopiles
<i>Ulkenia profunda</i>	L34054	Stramenopiles
<i>Zea mays</i>	K02202	Viridiplantae, Streptophyta, Embryophyta

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Reinigung der AM-Pilzsporen

Die von Chris Walker erhaltenen Sporen wurden einzeln in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt, die 200 µl 1% SDS - Lösung enthielten. Um anhaftendes organisches Material von der Sporenoberfläche zu entfernen, wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Reinigung erfolgte bei 35 kHz und eingeschalteter Entgasungsfunktion. Die Länge der Ultraschallbehandlung schwankte zwischen 10-30 sec und war abhängig von der mechanischen Stabilität der Sporen. Die Überprüfung der Reinigung fand unter dem Binokular statt.

Anschließend wurden die Sporen zweimal in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und danach in 0,5 ml Eppendorfgefäße mit 10 µl vorgelegtem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> überführt. So behandelte Sporen wurden, wenn keine sofortige DNA Isolation erfolgte, zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.2.2 Isolierung von chrDNA aus Einzelsporen

#### Methode 1:

1. Zerquetschen der Spore in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> mittels Pipettenspitze durch drehende Bewegung an der Wand des Eppendorfgefäßes.
2. Erhitzen der Probe in der Mikrowelle für 30 sec.
3. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff.

4. Zweimalige Wiederholung der Schritte 2 und 3.
5. Zentrifugation des Extraktes für 5 min bei 13.000 rpm und anschließende Lagerung auf Eis.

In der PCR wurden dann verschiedene Volumina (1-5 µl) des Überstands eingesetzt.

#### Methode 2:

1. Spore in 0,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vorlegen.
2. 2,5 µl 0,25 M NaOH zugeben und Spore zerquetschen.
3. Kurz abzentrifugieren.
4. 1 min in kochendem Wasser inkubieren.
5. Zugabe von 1 µl 0,5M TRIS/HCl (pH8,0) und 2,5 µl ,0,25M HCl.
6. Erneutes Inkubieren in kochendem Wasser für 2 min.
7. Kurz abzentrifugieren.

In der PCR wurden zwischen 2,5 und 5 µl des Extraktes eingesetzt.

#### Methode 3:

Isolation mit dem Dynabeads<sup>®</sup> DNA DIRECT Kit

Dieses System basiert auf einer magnetischen Separation der chromosomalen DNA. Dazu werden paramagnetische, polymere Partikel, die hier die Bezeichnung Dynabeads<sup>®</sup> tragen, eingesetzt. Diese an der Oberfläche positiv geladenen Partikel binden die, bei entsprechendem pH-Wert, negativ geladene DNA elektrostatisch und bilden mit ihr einen Komplex. Die Abtrennung des Komplexes vom Rest der Lösung kann nun mit Hilfe eines Magneten (Dyna MPC) stattfinden. Der durch mehrere Waschschriffe gereinigte Komplex wird direkt in der PCR eingesetzt. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch Erhitzen des Komplexes eine Elution der reinen DNA durch-zuführen.

Das Protokoll des Herstellers wurde bei Schritt 4 (um 5-10 min verlängerte Inkubationszeit) und bei der Anzahl der Waschschriffe (nur 1 Waschschriff) modifiziert (Schwarzott und Schüßler 2001).

Durchführung:

1. Dynabeads<sup>®</sup> auf Raumtemperatur erwärmen lassen, Dynabeads<sup>®</sup>- Suspension durch Schütteln homogenisieren.
2. Einzelspore in 1, 5ml Eppendorfgefäß mit 1,5 µl vorgelegtem, sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zerquetschen.

3. 200 µl Dynabeads® DNA-Direct™ dazugeben; mit Schwung, aber nicht zusätzlich mischen.
4. Inkubation bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten.
5. Eppendorfgefäß für 90 sec in Magneten stellen, Überstand abziehen und werfen.
6. Eppendorfgefäß aus Magneten nehmen DNA/Dynabeads®-Komplex mit 200 µl Waschpuffer **vorsichtig** waschen, ohne zu durchmischen. Hier muß sehr vorsichtig gearbeitet werden, da es an dieser Stelle zu Verlust von DNA kommen kann. Das entstandene Pellet darf deswegen nur leicht von dem Puffer umspült werden, ohne es dabei zu zerstören.
7. Eppendorfgefäß für 90 sec in Magneten stellen; Überstand abziehen und werfen.
8. Eppendorfgefäß aus Magneten nehmen, 30 µl TE-Puffer zugeben, DNA/Dynabeads® resuspendieren.
9. 5 µl DNA/Dynabeads®-TE-Suspension in 25 µl PCR-Ansatz einsetzen.

### 2.2.3 DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Zum Nachweis spezifischer Pilzsequenzen in Pflanzenmaterial wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Die Reinigung der Pflanzen von anhaftendem organischem Material vor der Isolation sah wie folgt aus (De Rooij-van der Goes *et al.* 1995, Kowalchuk *et al.* 2002):

1. Grobe Reinigung des Pflanzenmaterials unter fließendem Wasser.
2. 5 min Ultraschallbehandlung in 10 mM Natriumpyrophosphat; wobei die Dauer der Ultraschallbehandlung bei weicherem Gewebe wie z.B. Thalli von *Anthoceros punctatus* verkürzt wurde. Die Verweilzeit in der Natriumpyrophosphat-Lösung lag aber immer bei 5 min.
3. 2x 5 min Ultraschall in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; auch hier wurde je nach Gewebe variiert. Anschließend Trocknen der Proben auf Papiertüchern.
4. Zerkleinern des Materials mit einer Rasierklinge in etwa 100 mg schwere Stücke.
5. Schockgefrieren der Stücke mit flüssigem Stickstoff in 1,5 ml Eppendorfgefäßen und homogenisieren der Proben mit einem Plastikpistill.

### **2.2.3.1 Methode 1: Isolation nach Redecker (2000)**

Bei der Isolation nach Redecker (2000) wurde die Vorbereitung der Proben nach Schritt 4 beendet und danach wie folgt vorgegangen:

1. Die Stücke wurden in 0,5 ml Eppendorfgläser überführt und mit 40 µl 0,25 M NaOH versetzt.
2. Inkubation des Ansatzes bei 90°C für 10 min im Wasserbad.
3. Neutralisation mit 20 µl 0,5 M Tris HCl und 40 µl 0,25 M HCl und Inkubation für weitere 10 min bei 90°C.
4. Der Überstand wurde durch Abpipettieren von dem Pflanzenmaterial abgetrennt, in TE-Puffer 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und als Template in der PCR eingesetzt.

### **2.2.3.2 Methode 2: Isolation mit Dynabeads®**

Bei der DNA-Isolation aus Pflanzenmaterial mit Dynabeads® wurde nach dem Homogenisieren der Probe wie bei der DNA-Isolation aus Sporen (siehe 2.2.2 Methode 3, Schritt 5) verfahren. Lediglich der Waschschriff unter Punkt 6 wurde zweimal durchgeführt.

## **2.2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Mit der PCR können DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen eingrahmt sind, *in vitro* vervielfältigt werden. Diese Methode wurde von Mullis *et al.* 1986, Mullis und Faloona 1987) entwickelt, und ist mittlerweile ein etabliertes Verfahren bei der Genanalyse.

### Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

Die zu vermehrende Sequenz aus einem DNA-Abschnitt wird wiederholt folgenden Reaktionsschritten unterworfen:

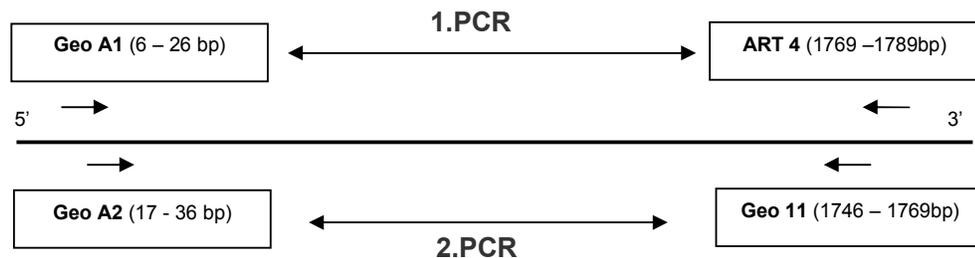
1. Hitzedenaturierung („Aufschmelzen“) der DNA in Einzelstränge bei Temperaturen um 95°C.
2. Hybridisierung chemisch synthetisierter Oligonukleotide („Primer“) an ihre entsprechenden komplementären Sequenzen („Primerannealing“). Die Primersequenz leitet sich aus bekannten, die gesuchte Sequenz flankierenden DNA Bereichen ab. Die entstehenden, kurzen, doppelsträngigen DNA Bereiche dienen als Ansatzstelle einer DNA-Polymerase. Die Hybridisierungstemperatur ist von der Primerstruktur abhängig und liegt zwischen 30° und 70°C.

3. Verlängerung („Elongation“) der Primer in 3'-Richtung durch die DNA-Polymerase unter Einbau von 3'-Desoxyribo-nucleosid-5'-triphosphaten (dNTPs) und Verwendung des DNA-Einzelstranges als Matrize für die Synthese. Die Temperatur hängt dabei vom Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase ab. Für die heute meist verwendete hitzebeständige Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* liegt die optimale Reaktionstemperatur bei 72°C.

Die drei Reaktionsschritte werden nun in  $n$  Zyklen wiederholt und man erhält bei optimalem Reaktionsverlauf, von einem DNA-Molekül ausgehend, theoretisch  $2^n$  Kopien.

### 2.2.5 Geschachtelte PCR (nested-PCR)

Bei dieser speziellen Form der PCR wird ein zweites Primerpaar verwendet, welches innerhalb eines durch das erste Primerpaar amplifizierte DNA-Fragment bindet. Als Beispiel ist die Lage zweier Primerpaare in Abbildung 6 gezeigt, die zur Amplifikation der 18S rRNA aus Sporen genutzt wurden.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Lage universeller Primer, die in der geschachtelten PCR verwendet wurden. Die Angaben in Basenpaaren beziehen sich auf das 18S rRNA-Gen von *S.cerevisiae* (J01353).

Durch diese Methode wird die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erhöht, weil zu geringe Produktmengen des gewünschten Abschnitts aus der 1. PCR in einer zweiten Runde angereichert werden und unspezifische Produkte aus der 1. PCR mit den Primern in der 2. PCR nicht amplifiziert werden.

Allerdings birgt die Empfindlichkeit der Methode auch eine höhere Gefahr der Vervielfältigung von Sequenzen, die aus Verunreinigungen stammen (Newton und Graham 1994), da die in der Arbeit benutzten universellen Primer auf Sequenzmotive passen, die bei einer Vielzahl von Organismen vorkommen. Deswegen wurden die PCR Ansätze zu jeder Zeit unter einer Sterilbank pipettiert und immer Nullkontrollen, d.h. Ansätze ohne DNA-Matrize, durchgeführt.

### 2.2.6 PCR zur Amplifikation der 18S rDNA aus Sporen

Die PCR-Ansätze wurden beim Zusammenpipettieren auf Eis gekühlt. Als Reaktionsgefäße dienten 0,2 ml Thermo Tube™ PCR-Gefäße der Firma Peqlab. Die PCR wurde mit dem Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf durchgeführt.

**Tabelle 9:** Standardansatz der 1. PCR zur Amplifikation des 18S rRNA-Gens aus Sporen. \*chrDNA als an Dynabeads® gebundener Komplex.\*\* DNA-Polymerase Puffer [10x] enthält: 10 mM Tris/HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0,1% Triton X-100

chrDNA*	5 µl
Puffer [10x]**	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
GeoA1 [10 pM/µl]	0,5 µl
ART4 [10 pM/µl]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	15,5 µl
Σ	25 µl

**Tabelle 10:** Temperaturprofil der 1. PCR

1. Schritt	Denaturierung	94 °C	2 min
2. Schritt	Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Schritt	Primerannealing	59 °C	60 sec
4. Schritt	Synthese	72 °C	180 sec
5. Schritt	Synthese	72 °C	10 min
6. Schritt	Lagerung im Cycler	4 °C	variabel

Die Schritte 2 bis 4 werden 35x wiederholt, während Schritt 1 nur am Beginn, die Schritte 5 und 6 nur am Ende der PCR ein einziges Mal durchgeführt werden.

**Tabelle 11:** Standardansatz der 2. PCR zur Amplifikation des 18S rRNA-Gens aus Sporen. Die Standardmäßig benutzten Primer sind fett dargestellt. \*Als DNA-Matrize dient das Produkt der 1. PCR.

DNA-Matrize*	1 µl
Puffer [10x]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
<b>GeoA2</b> oder NS1 oder GeoNS1 [10 pM/µl]	0,5 µl
<b>Geo11</b> oder NS8 oder Geo10 [10 pM/µl]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O bidest	15,5 µl
Σ	25 µl

**Tabelle 12:** Temperaturprofil der 2.PCR

1. Schritt	Denaturierung	94 °C	2 min
2. Schritt	Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Schritt	Primerannealing	63 °C	60 sec
4. Schritt	Synthese	72 °C	180 sec
5. Schritt	Synthese	72 °C	10 min
6. Schritt	Lagerung im Cyclor	4 °C	variabel

Die Schritte 2 bis 4 werden 35x wiederholt, während Schritt 1 nur am Beginn, die Schritte 5 und 6 nur am Ende der PCR ein einziges Mal durchgeführt werden. Die Annealingtemperatur bezieht sich auf das meist benutzte Primerpaar GeoA2 / Geo11.

### 2.2.7 PCR zur Amplifikation von *Archaeosporales* 18S rDNA

Beim Nachweis von 18S rDNA Sequenzen der *Archaeosporales*-Gruppe und *Geopyriformis* aus Pflanzenmaterial oder *Geosiphon*-Kulturen wurde zunächst die unter 2.2.5 beschriebene, geschachtelten PCR durchgeführt, um anschließend als Matrize in der Reaktion mit spezifischen Primern zu dienen.

a) PCR mit *Archaeosporales*-Primern**Tabelle 13:** Standardansatz der PCR zur spezifischen Amplifikation des *Archaeosporales* 18S rRNA-Gens. \*Als DNA-Matrize dient das Produkt der 2. universellen PCR.

DNA-Matrize*	1 µl
Puffer [10x]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Archeo 1a [10 pM/µl]	0,5 µl
Archeo 5b oder Archeo6a oder Archeo 6b [10 pM/µl]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	15,5 µl
Σ	25 µl

**Tabelle 14:** Temperaturprofil der „*Archaeosporales*-PCR“

1. Schritt	Denaturierung	94 °C	2 min
2. Schritt	Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Schritt	Primerannealing	58,3 °C	60 sec
4. Schritt	Synthese	72 °C	120 sec
5. Schritt	Synthese	72 °C	5 min
6. Schritt	Lagerung im Cycler	4 °C	variabel

Die Schritte 2 bis 4 werden 35x wiederholt, während Schritt 1 nur am Beginn, die Schritte 5 und 6 nur am Ende der PCR ein einziges Mal durchgeführt werden.

b) PCR mit *Ge. pyriformis*-Primern**Tabelle 15:** Standardansatz der PCR zur spezifischen Amplifikation des *Geosiphon pyriformis* 18S rRNA-Gens. \* Als DNA-Matrize dient das Produkt der 2. universellen PCR.

DNA-Matrize*	1 µl
Puffer [10x]	2,5 µl
dNTPs [10 mM]	0,5 µl
Geo223 [10 pM/µl]	0,5 µl
Geo2651 [10 pM/µl]	0,5 µl
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	15,5 µl
Σ	25 µl

**Tabelle 16:** Temperaturprofil der „*Ge. pyriformis*-PCR“

1. Schritt	Denaturierung	94 °C	2 min
2. Schritt	Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Schritt	Primerannealing	58,3 °C	60 sec
4. Schritt	Synthese	72 °C	120 sec
5. Schritt	Synthese	72 °C	5 min
6. Schritt	Lagerung im Cycler	4 °C	variabel

Die Schritte 2 bis 4 werden 35x wiederholt, während Schritt 1 nur am Beginn, die Schritte 5 und 6 nur am Ende der PCR ein einziges Mal durchgeführt werden.

### 2.2.8 Ligation mit den Topo TA Cloning-Kits

Dieses Kits machen sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zunutze, jedem PCR-Produkt ein Desoxyadenosin (A) am 3'-Ende anzufügen. Diese Transferaseaktivität ist unabhängig von der DNA-Matrize.

Die in dem Kit enthaltenen Vektoren pCR 2.1-TOPO in Version E und pCR 4-TOPO in Version E2 liegen linearisiert vor und besitzen ein einzelnes 3'-überhängendes Thymin (T). Mit Hilfe einer Topoisomerase kann das PCR-Produkt mit dem Vektor ligieren. Der Ligationsansatz (Tabelle 17 für Version E und Tabelle 18 für Version E2) wurde nach dem Zusammenpipettieren vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

**Tabelle 17:** Zusammensetzung des Ligationsansatzes für Version E. \*die Konzentration des PCR-Produkts wurde nach Agarosegelelektrophorese abgeschätzt

PCR-Produkt*	0,5-2 µl
H <sub>2</sub> O bidest	3,5-2 µl
pCR 2.1-TOPO-Vektor	1 µl
Σ	5 µl

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des Ligationsansatzes für Version E2. \*die Konzentration des PCR-Produkts wurde nach Agarosegelelektrophorese abgeschätzt

PCR-Produkt*	0,5-4 $\mu$ l
Salzlösung	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <small>bidest</small>	4,5-0 $\mu$ l
pCR 4 TOPO-Vektor	1 $\mu$ l
$\Sigma$	5 $\mu$ l

### 2.2.9 Transformation der Bakterien

Bei der Transformation wird der Vektor mit dem inserierten PCR-Produkt in die kompetenten Bakterienzellen eingeschleust.

#### Durchführung

1. 50  $\mu$ l kompetente Zellen werden mit 2  $\mu$ l einer 0,5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung versetzt. Dieser Schritt entfällt bei Version E2.
2. Zu den kompetenten Zellen werden 2  $\mu$ l des Ligationsansatz gegeben und vorsichtig vermengt.
3. 15 min Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis. Dieser Schritt ist bei Version E2 auf 5 min Inkubation bei Raumtemperatur verkürzt.
4. Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 sec.
5. Der Ansatz wird kurz auf Eis abgekühlt und anschließend 250  $\mu$ l SOC-Medium zugegeben.
6. Schütteln des Ansatzes mit 220 rpm bei 37 °C für 30 min.
7. Nach der Inkubation werden dem Ansatz 100  $\mu$ l X-Gal [20 mg/ml], sowie 50  $\mu$ l IPTG [23,4 mg/ml] zugesetzt. Dieser Schritt entfällt bei Version E2, da hier die Selektion über das Letal-Gen *ccdB* stattfindet (siehe 2.2.10).
8. Ausplattieren der Bakterien auf LB<sub>Amp/Kana</sub>-Platten und Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### 2.2.10 Selektion positiver Klone

Bei den zwei verwendeten Klonierungskits werden verschiedene Methoden benutzt, um eine erfolgreiche Ligation und Klonierung zu überprüfen.

#### $\alpha$ -Komplementationstest (Kitversion E)

Normalerweise wird die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase durch IPTG induziert. In den verwendeten *E. coli*-Laborstämmen ist das Gen für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase durch Deletion zerstört. Deshalb kann das chromogene Substrat X-Gal nicht gespalten werden und der normalerweise entstehende blaue Indigofarbstoff tritt nicht auf. In der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pCR2.1-TOPO befindet sich dagegen das codierende Gen für das  $\alpha$ -Peptid. Wird die Sequenz nicht durch ein Insert unterbrochen, ist es der Bakterienzelle wieder möglich, X-Gal zu spalten, und die Kolonien erscheinen blau. Die inserttragenden Zellen erscheinen dagegen weiß. Diese Reaktion ist ein erster Hinweis auf eine gelungene Ligation und Transformation.

#### Selektion über das letale *ccdB* Gen (Kitversion E2)

Bei dem Vektor pCR4-TOPO wird die Selektion durch die Unterbrechung der Expression des letalen *ccdB* – Gens bei der Ligation erreicht.

Dieses Gen ist mit dem *lacZ $\alpha$*  Gen am C-Terminus fusioniert. Bei der Ligation mit einem PCR-Produkt kommt es zu einer Unterbrechung zwischen *lacZ $\alpha$* -Operon und Fusionsgen wodurch positive Rekombinanten auf der Kulturplatte wachsen, während bei misslungener Ligation von PCR-Produkten die Bakterienzellen absterben.

### 2.2.11 Übernachtkulturen der transformierten Zellen

Für die Vermehrung der gewünschten Zellen werden 10 ml LB-Medium steril angeimpft. Um zu gewährleisten, dass sich nur erwünschte Bakterien reproduzieren, werden dem Medium 15  $\mu$ l Ampicillin oder Kanamycin [50 mg/ml] zugegeben. Die so beschickten Glasröhrchen werden über Nacht bei 37°C und 220 rpm im Brutraum inkubiert.

### 2.2.12 Plasmid-Schnellpräparation (Holmes und Quigley 1981)

Mit dieser Methode ist es möglich, eine große Anzahl von Zellkulturen daraufhin zu untersuchen, ob sie wirklich den Vektor einem Insert besitzen.

Durchführung:

1. Die Übernachtskulturen werden gründlich gemischt; 1,5 ml der Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert.
2. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 200 µl STETL-Puffer resuspendiert und sofort auf Eis gelagert.
3. Anschließend wird das in der Lösung enthaltene Lysozym im Wasserbad bei 100°C (45 sec) denaturiert.
4. Sammeln der Zellrückstände durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min. Das entstandene Pellet wird mit einem Zahnstocher vorsichtig entfernt.
5. Ausfällen der Plasmid-DNA mit 200 µl Isopropanol und Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm.
6. Der Überstand wird verworfen und die Plasmid-DNA in 50 µl RNase-Wasser [10 µg/ml] aufgenommen.
7. Mit ca. 5 µl der Lösung wird eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.
8. Lagerung bei -20 °C.

### 2.2.13 Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide

Mit dieser Methode wird überprüft, ob die präparierten Plasmide das Insert mit der gewünschten Größe enthalten. Die Vektoren sind so konstruiert, dass rechts und links der Insertionsstelle Basensequenzen liegen, die von Restriktionsenzymen als Schnittstelle erkannt werden. Wie aus Abbildung 4 und 5 ersichtlich, sind das im Falle der Vektoren pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym *EcoR1*. Der Restriktionsansatz wird im Brutschrank bei 37 °C für mindestens 2 h inkubiert. Nachdem das Insert aus der multiplen Klonierungsstelle herausgeschnitten wurde, findet eine Analyse durch Agarosegelelektrophorese statt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird der unter 2.1.9 aufgeführte Längenstandard "Marker 1" mit auf das Gel aufgetragen.

**Tabelle 19:** Standardansatz einer Restriktionsanalyse

Plasmid-DNA	5 $\mu$ l
Puffer [10x]	1,5 $\mu$ l
Restriktionsendonuklease <i>EcoR</i> 1 [20 U/ $\mu$ l]	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	6,5 $\mu$ l
$\Sigma$	15 $\mu$ l

### 2.2.14 Restriktionsanalyse zur Identifikation spezifischer Sequenzen (RFLP)

Der sogenannte Restriktionfragment Längenpolymorphismus (RFLP) dient zur Identifikation spezifischer Gensequenzen.

Dabei wird der genetische Polymorphismus des 18S rRNA-Gens genutzt, der bei den untersuchten Pilzen auftritt. Die genetischen Unterschiede generieren oder eliminieren definierte Restriktionsschnittstellen, die sich letztendlich nach dem Schneiden des Gens mit einem geeigneten Restriktionsenzym durch verschiedene DNA-Bandenmuster auf dem Agarosegel ausdrücken.

Diese Vorgehensweise ermöglicht eine Unterscheidung von Gensequenzen ohne eine vollständige Sequenzierung und ist damit weniger zeit- und kostenaufwendig.

Mittlerweile gibt es verschiedene Computerprogramme, die bekannte Gensequenzen auf Erkennungsmotive von Restriktionsendonucleasen analysieren, und Voraussagen über die zu erwartenden Bandenmuster liefern, ohne die Enzyme zunächst im Experiment testen zu müssen. In der Arbeit wurde das Online-Analyseprogramm NEBcutter V1.0 der Firma New England Biolabs, Inc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter/index.php3>) benutzt, um typische Bandenmuster für die sequenzierten 18S rRNA-Gene der *Archaeosporales*-Gruppe und *Ge. pyriformis* zu erkennen, die mit den spezifischen Primern amplifiziert wurden.

### 2.2.15 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration richtete sich dabei nach der Größe der zu erwarteten DNA-Fragmente. Die Agarose wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle in 1x TAE-Puffer vollständig gelöst und nach leichter Abkühlung in einem Gelschlitten gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1/10 Volumen Blaumarker versetzt und aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden anschließend bei konstanter Spannung von 80-120 Volt separiert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad

gefärbt. Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz durch freies Ethidiumbromid und zur besseren Analyse komplexer DNA-Bandenmuster wurden die Gele in Wasser entfärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 305 nm ausgewertet und photographiert.

#### **2.2.16 Plasmidpräparation für die Sequenzierung (Qiaprep-spin Plasmid Kit)**

Dieses Kit liefert besonders reine und aufkonzentrierte Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen, die in der anschließenden Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird. Auch hier wird durch Fällungen und mechanischer Reinigung mit einer porösen Membran die Abtrennung störender Zellbestandteile erreicht.

Die Durchführung entsprach dem Protokoll des Herstellers, lediglich die Elution der Plasmide fand anstelle von TE-Puffer mit  $H_2O_{\text{bidest}}$  statt.

#### **2.2.17 Dauerkulturen**

Für spätere Untersuchungen wurden von den Bakterien, die das gewünschte Insert tragen, Dauerkulturen aus 700  $\mu\text{l}$  der Übernachtskulturen und 500  $\mu\text{l}$  autoklaviertem Glycerin angelegt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.2.18 Sequenzierung**

Da es in unserem Labor nicht möglich war, eigene DNA-Sequenzierungen durchzuführen, wurden die aufgereinigten Plasmide in Labore geschickt, die diesen Service kommerziell anbieten (Agowa, Berlin; Seqlab, Göttingen).

Dabei wurde zunächst immer nur ein Teilstück (ca. 600 - 900bp) der etwa 1500 - 1800bp langen, klonierten PCR-Produkte mit dem universellen Sequenzierungsprimer M13fwd (-20) sequenziert und anschließend in unserem Labor phylogenetisch analysiert oder ein BLAST-Vergleich (Basic Local Alignment Search Tool) mit Sequenzen in Online-Datenbanken durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Wenn die beiden Analysemethoden bestätigten, dass die PCR Produkte den gewünschten Ursprung hatten und nicht durch Kontaminanten verursacht waren, wurde eine vollständige Sequenzierung mit den Primer NS3 und M13rev durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme der Teilsequenzen wurden mit dem PC-Programm Chromas 1.44 (Chromas, <http://www.technelysium.com.au>) auf Sequenzierungsfehler untersucht, manuell korrigiert und anschließend mit dem Programm ALIGN 4.0 (D. Hepperle, <http://wwwuser.gwdg.de/~dhepper/>) zusammengefügt.

### **2.2.19 Methoden zur Bestimmung der AM-Pilz-Phylogenie**

Hier wird nur ein Überblick über die verwendeten phylogenetischen Methoden gegeben. Die bei den einzelnen Stammbaumanalysen benutzten Datensätze und Berechnungsparameter werden im Ergebnisteil gesondert beschrieben.

#### **2.2.19.1 Sequenzvergleich: Das Alignment**

Zur Analyse phylogenetischer Zusammenhänge ist es nötig, homologe Merkmale miteinander zu vergleichen. Gerade bei Nukleotidsequenzen, die nur vier verschiedene Merkmale – die Nukleotidbasen Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin – besitzen, ist es zunächst schwer zu entscheiden, welche der Basen homolog zueinander sind. Dabei können während der Evolution des Gens verschiedene Ereignisse wie die Deletion, Insertion, Transition oder Transversion von Nukleotiden stattfinden, die es erschweren, Homologien bei Sequenzmotiven zu erkennen. Gerade Deletionen und Insertionen können in einem Alignment dazu führen, dass Leerstellen (gaps) in Sequenzen eingeführt werden müssen, um homologe Abschnitte vergleichbar zu machen.

Beim Alignment von ribosomalen Genen kann man sich bei der Entscheidung, wie plausibel eingeführte Leerstellen sind und welche Bereiche Homologien aufweisen, an der Sekundärstruktur der rRNA orientieren. Sequenzvergleiche von rRNAs verschiedener Spezies zeigen, dass diese Struktur im Laufe der Evolution konserviert wurde, was die Zuordnung von Basen zu bestimmten Stellen oft erst ermöglicht. Aus diesem Grund wurde bei dem Alignment der Pilzsequenzen die bekannte Sekundärstruktur der 18S rRNA von *Sacharomyces cerevisiae* als Grundlage benutzt (Van de Peer *et al.* 1998).

#### **2.2.19.2 Phylogenetische Auswertung des Alignments**

Für die phylogenetische Analyse der Daten dienten verschiedene Programme aus dem Programmpaket PHYLIP (**Phy**logeny **I**nference **P**ackage, Felsenstein 1993) in der Version 3.573.

Die Handhabung der Programme ist im PHYLIP-Handbuch beschrieben, welches dem PHYLIP Programmpaket beiliegt. PHYLIP ist im Internet unter folgender URL frei erhältlich: <http://evolution.genetics.washington.edu/phyliip.html>

#### **2.2.19.3 Neighbour-Joining Methode**

Bei der Neighbour-Joining Methode (Saitou und Nei 1987) handelt es sich um eine sogenannte distanzbasierte Methode, bei welcher die genetischen Distanzen von Sequenzen nacheinander paarweise, mit Hilfe eines Algorithmus verglichen werden. Die Methode beruht auf der Theorie der Molekularen Uhr, die besagt, dass die Zahl von Mutationen auf einem Gen pro Zeiteinheit ungefähr konstant ist. Dadurch wird es

möglich, bei der Distanzmessung einen numerischen Wert mit einem Paar Sequenzen zu assoziieren.

Zunächst werden zur Baumberechnung die evolutiven Distanzen zwischen einem Paar von Sequenzen abgeschätzt. Diese Distanzen geben die mittlere Anzahl von Veränderungen pro Position an, die seit dem Divergieren von einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind.

Die Distanzwerte werden unter Zuhilfenahme von verschiedenen Evolutionsmodellen korrigiert, um in den Primärdaten (Sequenzen) nicht zu erkennenden, evolutive Ereignisse zu berücksichtigen. Dazu gehören z. B. Rückmutationen oder konvergente Basensubstitutionen.

In dieser Arbeit wurden die genetischen Distanzen mit Hilfe des sogenannten Kimura-2-Parameter Modells berechnet. Bei diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die Rate von Transitionen pro Base sich von der Rate der Transversionen unterscheidet und die Transition die wahrscheinlichere Form der Basensubstitution ist. In der Arbeit wurde für die 18S rDNA der Wert 2 eingesetzt (Kimura 1980).

Der Vorteil der Neighbour-Joining Methode liegt vor allem in der Schnelligkeit, mit der sich große Datensätze analysieren lassen.

#### **2.2.19.4 Maximum-Parsimony-Methode**

Das Maximum-Parsimony-Verfahren (Swofford und Olsen 1990) ist eine so genannte merkmalsbasierende Methode, die ursprünglich für morphologische Daten entwickelt wurde. Bei dieser Methode wird versucht, aus allen möglichen Stammbäumen denjenigen zu finden, für den die geringste Anzahl an Mutationen nötig ist. Dabei werden die Sequenzdaten direkt miteinander verglichen, ohne sie in genetische Distanzen umzurechnen. Dazu wird das Prinzip der maximalen Sparsamkeit angewendet, das heißt, es wird der Baum gesucht, der die geringste Anzahl an evolutionären Ereignissen benötigt, um die beobachteten Sequenzunterschiede zu erklären. Als Merkmal dienen dabei nur solche Nukleotidaustausche, die in mindestens zwei Sequenzen gefunden werden.

Bei der Analyse in dieser Arbeit wurden dabei Leerstellen und polymorphe Positionen im Alignment als fehlende Daten interpretiert.

#### **2.2.19.5 Der Bootstrap-Test**

Der Bootstrap-Test wurde von Felsenstein 1985 zur statistischen Absicherung von phylogenetischen Berechnungen etabliert. Er zeigt die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Gruppierung in den erhaltenen Stammbaumdiagrammen unterstützt wird. Durch diese Veränderung wird die "Robustheit" der Baum-Topologien überprüft.

Zur Unsicherheit bei Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer bestimmten phylogenetischen Beziehung tragen nicht nur die Berechnungsmethoden (Neighbour-Joining, Maximum-Parsimony, etc.) sondern auch die Sequenzdaten selbst bei.

Ein Beispiel dazu ist das Auftreten von Homoplasie. Man versteht darunter eine Übereinstimmung ohne Homologie, die durch unabhängige Evolution (Konvergenz, Reversion) entsteht. Tritt in einem Nukleotiddatensatz Homoplasie auf, können verschiedene Stellen (sites) in Sequenzen unterschiedliche Verwandtschaftsverhältnisse in den Stammbäumen unterstützen - damit sind die Verhältnisse abhängig von den ausgewählten Charakteren. Das heißt, phylogenetische Berechnungen sind abhängig von Fehlern bei der Probenahme („Sampling error“).

Mit dem Bootstrap-Test können diese Fehler korrigiert werden, ohne die Zahl der Proben zu erhöhen, was häufig durch die Verfügbarkeit von Proben oder Zeit- und Geldaufwand beschränkt ist.

„Bootstrappen“ bedeutet, dass aus den vorhandenen Sequenzdaten so genannte Pseudoproben generiert werden. Bestimmte Bereiche des ursprünglichen Datensatzes werden zufällig entfernt, andere Bereiche treten mehrfach auf, wobei die Länge der Pseudodatensätze mit dem ursprünglichen Datensatz identisch bleibt. Daher ähneln diese Pseudoproben den Originaldaten, unterscheiden sich jedoch in der Frequenz, mit der bestimmte Stellen aus dem Originaldatensatz auftauchen. Aus dieser Pseudoprobe kann nun wiederum mit den verschiedenen Berechnungsmethoden ein Stammbaum erstellt werden. Dieser Vorgang wird 100-10.000-fach wiederholt (Abhängig von Art und Länge der Sequenz) und man erhält einen Satz von Bäumen, aus denen sich ein Bootstrap-Konsensusbaum erstellen lässt. In diesem wird die Häufigkeit angezeigt, mit der bestimmte Gruppierungen in der gewählten phylogenetischen Berechnungsmethode unterstützt werden. Die Frequenz mit der eine bestimmte Verzweigung auftritt dient der Entscheidung, wie signifikant das Auftreten eines Knoten ist, an dem phylogenetische Gruppen aufgetrennt werden. Erst bei Werten über 70-80% bei der Maximum-Parsimony Analyse und etwa 90% bei der Neighbour-Joining-Analyse kann die jeweilige Topologie als gesichert angesehen werden (Swofford und Olsen 1990, Hillis und Bull 1993), wobei diese Werte allerdings auch von der Art und Länge der Sequenz abhängen. Es ist jedoch immer zu beachten, dass dieses Verfahren nur die Wahrscheinlichkeiten von Gruppierungen bei der angewandten Berechnungsmethode angibt, aber nicht notwendigerweise deren Richtigkeit bezüglich der „wahren“ phylogenetischen Beziehungen.

Zur Auswertung der Bäume aus diesen Stichproben wurde das PHYLIP-Programm "consense" verwendet, das aus den errechneten Bäumen einen Konsensusbaum nach dem Majoritätsprinzip generiert und zu jedem Teilbaum den Bootstrap-Wert angibt, d.h. mit welcher prozentualen Häufigkeit dieser Teilbaum in allen Bäumen gefunden wurde.

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Bäumen der Neighbour-Joining und Maximum-Parsimony Methode wurde jeweils ein 1000 faches Bootstrapping durchgeführt.

### 2.2.20 Grafische Darstellung der Stammbäume

Zur grafischen Darstellung der berechneten Bäume wurde zunächst das Programm Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) benutzt. Mit dem Programm lassen sich die Daten in den verschiedenen Baumformen darstellen, die Außengruppen definieren und die Bootstrapwerte anzeigen.

Da in der Darstellung mit Treeview die Isolatnamen nur entsprechend ihrer Abkürzung im Alignment übernommen werden, wurden die Bäume anschließend mit dem Programm Micrografx Designer 7 (Micrografx Inc., 1997) nachbearbeitet.

### 2.2.21 Spezifische Färbung von Chitin mit Lektin

Mit dieser Methode ist es möglich, das Vorhandensein von Pilzmaterial in und an Pflanzen zu überprüfen. Sie wurde eingesetzt bei Topfexperimenten mit *Ge. pyriformis* und pilzfreiem *Anthoceros punctatus* oder bei dem Nachweis von Pilzsequenzen mit spezifischen Primern. Bei Sequenzanalysen wurde so überprüft, inwieweit durch die vorhergehende Reinigung das Pflanzenmaterial von außen anhaftenden Pilzhyphen befreit wurde.

Durchführung:

1. Pflanzenmaterial maximal 1 h bei 90°C in 1 M KOH inkubieren. Bei weicherem Gewebe von *Anthoceros punctatus* wurde die Inkubationzeit bis auf 15 min verkürzt.
2. Danach 2-3 x in H<sub>2</sub>O für je 10 min waschen (KOH entfernen!).
3. Anschließend Überführung des Materials in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,5) und entweder Lagerung bei 4°C oder Färbung.
4. 1h in Oregon-Green488®-WGA Färbelösung inkubieren (immer im Dunkeln, da der Farbstoff lichtempfindlich ist).
5. Mindestens 2-3x je 15 min mit HEPES-Puffer waschen (im Dunkeln aufbewahren).
6. Einbetten auf Objektträger in „anti-fading“ Substanz zur Verhinderung des Ausbleichens des Farbstoffs. Abdichten des Deckglases mit Nagellack.
7. Präparate immer im Dunkeln, möglichst im Kühlschrank, aufbewahren!

Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon-Green488<sup>®</sup> zeigt ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie FITC. Die Absorptions/Emissions-Maxima liegen bei 496/524 nm und die Fluoreszenz wurde mit dem entsprechenden Filtersatz im Fluoreszenzmikroskop dargestellt.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

Die aus der Arbeit entstandenen Ergebnisse sind in vier Abschnitte unterteilt:

- 3.1. DNA-Isolation aus Einzelsporen, Amplifikation und Klonierung des 18S rRNA-Gens
- 3.2 Phylogenetische Stellung der AM-Pilze, ein neues Pilz-Phylum: *Glomeromycota*
- 3.3 Vorgesprochenes Konzept zur Unterteilung der *Glomeromycota* in Familien
- 3.4 Entwicklung spezifischer Primern für die Archaeosporales

Die Diskussion wird zum besseren Verständnis direkt hinter den einzelnen Ergebnisteilen durchgeführt.

### 3.1 DNA-Isolation aus Einzelsporen, Amplifikation und Klonierung der 18S rDNA

#### 3.1.1 Ergebnisse

Zu Anfang der Arbeit wurden die drei, unter 2.2.2 beschriebenen Methoden der DNA-Isolation getestet, wobei sich die Isolationsmethode mit den Dynabeads als die verlässlichste und schnellste Methode zeigte.

Bei der Auswahl der Methoden wurden von vornherein aufwendigere Vorgehensweisen, die z. B. eine Proteinase K Behandlung erfordern (Biancotto *et al.* 1996) oder mit Chelex-100 arbeiten (Sanders *et al.* 1995, Simon 1996, Simon, Lalonde und Bruns 1992), ausgeschlossen.

Die Methoden 1 und 2 lieferten bei PCR Vorversuchen mit *Geosiphon pyriformis*-Sporen in den meisten Fällen keine Amplifikationsprodukte, wohingegen mit der Dynabeadsmethode nach leichter Veränderung des Herstellerprotokolls erfolgreich das 18S rRNA Gen aus Sporen von allen Familien der AM-Pilze in einer geschachtelten PCR (2.2.5 und 2.2.6) amplifiziert werden konnte. Als geeignete Primerkombinationen erwiesen sich GeoA1 mit Art4 in der ersten PCR und GeoA2 mit Geo11 in der zweiten, geschachtelten PCR, um einen möglichst großen Abschnitt der 18S rDNA zu amplifizieren,.

Allen Methoden zur DNA-Isolation aus AM-Pilzsporen geht ein mechanischer Sporenaufschluss voran, um die Chitin-Zellwand aufzubrechen und zu entfernen. Anschließend werden durch mechanische (Methode 1, 2.2.2) oder chemische Aufschlussmethoden (Methode 2 und 3) die Kernmembranen aufgelöst und die DNA freigesetzt.

Da bei AM-Pilzsporen nur äußerst geringe Mengen an DNA zur Isolation vorhanden sind, kommt diesen Schritten eine große Bedeutung zu.

Der mechanische Aufschluss fand in 1,5 ml Eppendorfgefäßen statt. Dazu wurde eine einzelne Spore in dem Gefäß mit 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vorgelegt und mit einer Pipettenspitze durch drehende Bewegung an der Gefäßwand zerquetscht. Die 1,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> zeigten sich als das optimale Volumen, um zum einen den Aufschluss unter dem Binokular verfolgen zu können, und zum anderen zu vermeiden, dass die Flüssigkeit durch Adhäsion an der Pipettenspitze hängen bleibt.

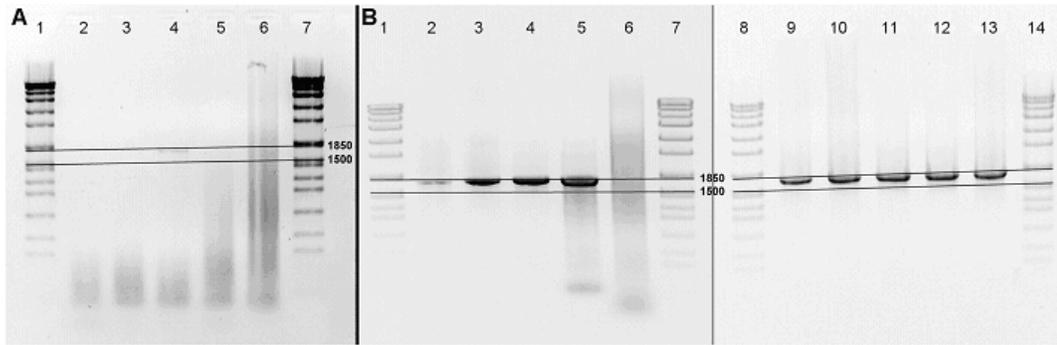
Die geringe Menge an Ausgangsmaterial war auch der Grund, das Dynabeadsprotokoll in zwei Punkten zu ändern. Zunächst wurde die Inkubation in dem die Dynabeadspartikel enthaltenden Lysispuffer von 5 auf 10 Minuten erhöht, um eine optimale Freisetzung der DNA aus den Kernmembranen zu gewährleisten, und die Bindung der DNA an die Dynabeads zu erreichen. Des Weiteren wurde auf ein zweites Waschen mit dem Waschpuffer aus dem Kit verzichtet. Das Kit ist vom Hersteller ursprünglich für größere Probenmengen vorgesehen, die auch größere Mengen PCR-inhibierende Stoffe enthalten können. Diese Stoffe werden bei der geringen Sporengröße bereits durch einen einzigen Waschschrift entfernt. Außerdem besteht die Gefahr, durch weiteres Waschen den Dynabeads/DNA-Komplex zu zerstören, und dadurch DNA zu verlieren.

Nach dem Waschen wurde der Komplex in 30 µl Resuspensionspuffer durch vorsichtiges Pipettieren gelöst und in dieser Form in der PCR eingesetzt.

Von dem Komplex wurden 5 µl als DNA-Matrize in der 1. PCR eingesetzt (Tabelle 9 und 10), und das Resultat auf einem 0,8% Agarosegel überprüft. Nur in sechs Fällen konnte dabei bereits ein Amplifikationsprodukt von etwa 1,8 kbp nachgewiesen werden (Abbildung 7A, Spur 4), so dass es nötig war, mittels einer geschachtelten PCR (Tabelle 10 und 11) die Menge der gewünschten Zielsequenz zu erhöhen, die eine Größe von etwa 1,76 kbp besitzt (siehe Abbildung 7B).

Die unter 2.1.5 aufgeführten Polymerasen zeigten keine nachweisbaren Unterschiede, so dass in der Arbeit standardmäßig die SAWDY $Taq^{\circledR}$  DNA Polymerase verwendet wurde.

Die PCR-Produkte mit erwarteter Größe wurden mit Hilfe der Klonierungskits von Invitrogen (siehe 2.2.8 - 2.2.10) ligiert und kloniert. Die Klonierung war in allen Fällen erfolgreich und unabhängig vom verwendeten Kit. Es zeigte sich jedoch, dass die ältere Kitversion, bei der die Selektion Klone über das sogenannte „Blue/White-Screening“ stattfindet, häufiger „falsch-positive“ Klone mit PCR-Nebenprodukten hervorbrachte.



**Abbildung 7:** Gelbilder der PCR-Produkte aus Einzelsporen DNA-Extraktionen. Die Spuren 1 / 7 in Bild A und die Spuren 1 / 7 / 8 / 14 in Bild B entsprechen Marker 1; die eingefügten, durchgezogenen Linien verlaufen in Höhe der Fragmentgrößen 1500 bp und 1850 bp. **A)** 1. PCR aus Einzelsporenextrakten: 6 = Kontrolle, 2 = *G. luteum* SA101, 3 = *Sc. gilmorei* W3085, 4 = *Gi.aff. margarita* W2992, 5 = *Gl. caledonium* BEG20, Probenmenge 10 µl, 0,8% Agarosegel. **B)** 2. (geschachtelte) PCR: Spur 2-6 PCR-Produkte der Isolate entsprechend Bild A, Bild B 9 - 13 Produkte weiterer Isolate: 9 = *Ar. gerdemannii* NC176, 10 = *Gl. versiforme* W3221, 11 = *G. manihotis* W3224, 12 = *Gl. clarum* W3161, 13 = *Gl. occultum* IA702, Probenmenge 5 µl, 0,8% Agarosegel. (aus: Schwarzott und Schüßler 2001).

Die neuere Version (Kitversion E2) war auch bei PCR Ansätzen, die neben dem gewünschten Produkt noch unspezifische Amplifikate bei der Gelanalyse zeigten, selektiver bezüglich des Hauptprodukts. Der Klonierungserfolg wurde jeweils mit den unter 2.2.12 und 2.2.13 beschriebenen Methoden überprüft.

Der Ursprung der klonierten Sequenzen wurde durch die Sequenzierung eines Teilstücks der DNA (ca. 500 - 600bp) und anschließender phylogenetischer Analyse (Schüßler 1999) überprüft. Auch wurde es im Verlauf der Arbeit durch die zunehmende Anzahl von 18S rDNA-Sequenzen der *Glomeromycota* in Datenbanken möglich, eine erste schnelle Überprüfung durch eine BLAST-Suche durchzuführen.

Insgesamt konnten von 92 Isolaten Produkte in der PCR gewonnen und kloniert werden. Von 135 analysierten Sequenzen hatten 78 einen AM-Pilz Ursprung (57,7%), 51 Sequenzen stammten von Kontaminanten und klonierte Sequenzen von 6 Isolaten wurden nicht überprüft, da Verdacht auf Kontamination vorlag, beziehungsweise keine klare Artzuordnung (*Gl. sp.*) vorhanden war (Tabelle 6).

Von den Kontaminationssequenzen stammten 18 der 18S rDNA Fragmente von Ascomyceten, 22 von Basidiomyceten und eine wurde bei der BLAST-Suche Hypochytridiomyceten zugeordnet. Drei weitere Klone enthielten pflanzliche 18S rDNA-Sequenzen, eine war tierischer Herkunft (*Amöbina*) und ein, von der Größe her zu kleines Fragment erwies sich als bakterielle 16S rRNA.

Bei vier Klonen zeigte sich, dass sie AM-Pilzsequenzen enthielten, die jedoch nicht zu der analysierten Art gehörten. Es waren dies die Klone PWD137\_5\_6, PWD137\_5\_13, PWD137\_5\_14 (*E. aff. infrequens*), die in der phylogenetischen Analyse *G. claroideum*

zugeordnet wurden, und PWD198\_1\_6 (*E. schenkii*), der eine mit *A. trapei* übereinstimmende Sequenz erhielt.

### 3.1.2 Diskussion

Die Extraktion von DNA aus AM-Pilzeinzelsporen mit Dynabeads in der Kombination mit einer geschachtelten PCR und der Klonierung der Produkte mittels des TOPO-Cloning Systems zeigte sich als verlässliche und schnelle Methode, 18S rDNA von AM-Pilzen zur Sequenzierung zu erhalten.

Die Isolation aus Einzelsporen ist aus verschiedenen Gründen der Isolation aus einer größeren Anzahl von AM-Pilzsporen vorzuziehen. Gerade bei der Analyse von Sporen, die direkt aus Freilanderde isoliert werden und von denen keine Laborkulturen vorliegen, steht oft keine große Anzahl Sporen zur Verfügung. Auch ist es so möglich, aus gemischten AM-Pilzkulturen einzelne Sporen mit klarer Morphologie, aber unsicherer taxonomischer Stellung auszusortieren, und deren phylogenetische Stellung mittels Sequenzanalyse zu untersuchen. Dies wurde während meiner Arbeit zum Beispiel für die neu beschriebene Art *Scutellospora projecturata* durchgeführt (Kramadibrata *et al.* 2000). Auch wird zeitaufwendiges Sammeln von größeren Sporenmengen vermieden. Der größte Vorteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass es zu einer Reduzierung bzw. besseren Einschätzbarkeit von Kontaminationsquellen durch andere Organismen kommt. Dazu gehören z. B. Kreuzkontamination durch andere AM-Pilze in offenen Topfkulturen, oder an den Sporenwänden haftende Kontaminationsquellen. Es ist wesentlich leichter und weniger zeitaufwendig, die unter 2.2.1 beschriebene Reinigungsmethode auf einzelne Sporen als auf große Mengen anzuwenden.

Die Amplifikation von 18S rRNA-Genen, die von Kontaminanten stammten, hat bei AM-Pilzen in mehreren Fällen bei molekularbiologischen Untersuchungen zu falschen Ergebnissen geführt, was von Redecker (1999), Schüßler (1999) und Schüßler *et al.* (2003) nachgewiesen wurde. Die in verschiedenen Veröffentlichungen beschriebenen Ergebnisse, dass AM-Pilzsporen Sequenzen beinhalten, die phylogenetisch extrem divergent seien und verschiedenen Familien zugeordnet werden könnten (Sanders 1999, Rodriguez *et al.* 2001), sind meist darauf zurückzuführen, dass Multisporen DNA-Isolationen zur Anwendung kamen, und die Sporen in manchen Fällen aus Kulturen stammten, die verschiedene AM-Pilze enthielten. Eine andere Ursache ist, dass es auch bei DNA-Isolationen aus Einzelsporen praktisch nicht vermeidbar ist, zum Teil auch Kontaminanten-DNA zu amplifizieren, was in einigen Arbeiten ignoriert und nicht ausreichend phylogenetisch überprüft wurde (Schüßler 1999, Schüßler, Schwarzott und Walker 2003).

Da die geschachtelte PCR eine äußerst sensitive Methode ist, besteht hier die Gefahr, dass im Experiment Sequenzen von Kontaminanten amplifiziert werden. Es ist bekannt, dass AM-Pilzsporen auch von parasitären Pilzen befallen sein können, die nicht durch Reinigung entfernt werden können. Deswegen wurde für jede Sequenz zunächst ein Teilstück von etwa 600 bp sequenziert, und deren phylogenetischer Ursprung mit Hilfe eines großen Datensatzes an 18S rRNA Sequenzen bestimmt (Schüßler 1999). Der hohe Anteil an gefundenen Kontaminationssequenzen in der vorliegenden Arbeit - etwa ein Drittel der analysierten 18s rRNA-Gene - zeigt wie wichtig dieses Vorgehen ist, um bei der phylogenetischen Analyse der AM-Pilze falsche Schlüsse zu vermeiden. Obwohl das Dynabeads-Kit ursprünglich für die DNA-Isolation aus größeren Mengen biologischen Materials ausgelegt worden ist (bis 100 mg), eignet sich das System auch für geringere Mengen. Es ist möglich, in weniger als 30 min vier AM-Pilzisolat gleichzeitig zu bearbeiten. Ein Nachteil ist, dass die erfolgreiche DNA-Isolation nicht bereits durch eine Gelanalyse bestimmt werden kann, sondern sich erst nach der Durchführung der PCR zeigt. Auch war die Templatekonzentration oft so gering, dass mehrere PCR-Ansätze von einer Isolation gemacht werden mussten, bis das Genfragment erhalten wurde. Dies scheint aber auch von Zustand der Spore abhängig zu sein, die möglichst frisch isoliert, beziehungsweise nach der Isolation aus Bodensubstrat und Reinigung bei -80°C gelagert werden sollten. Die Methode hat sich bei der Analyse des 18S rRNA-Gens als gut geeignet erwiesen und sollte auch bei der Isolation anderer Gene anwendbar sein.

### **3.2 Phylogenetische Stellung der AM-Pilze im Reich *Fungi***

Wie in der Einleitung (1.1.4) bereits dargestellt, wurden die AM-Pilze traditionell dem Phylum *Zygomycota* zugerechnet. Das Phylum ist jedoch in der bisherigen Definition polyphyletisch und auch die Zuordnung der Ordnung *Glomerales* in dieses Phylum kann morphologisch nicht begründet werden, sondern beruht auf Fehlern bei der ursprünglichen Beschreibung der Beleg-Art (Gerdemann und Trappe 1974).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit phylogenetische Analysen des 18S rRNA-Gens durchgeführt, die Sequenzen aller höherer Pilztaxa enthielten, um mittels molekularbiologischer Methoden eine natürliche Einordnung der AM-Pilze in das Reich *Fungi* zu erreichen.

#### **3.2.1 Verwendete Daten**

Für die in diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden zur phylogenetischen Analyse zwei verschiedene Datensätze benutzt. Die erste Datenmatrix für die phylo-

genetische Berechnung umfasste insgesamt 259 Sequenzen mit 1346 vergleichbaren Positionen, die von Hand, unter Berücksichtigung der 18S rRNA Sekundärstruktur ausgerichtet wurden (2.2.19). Der Datensatz enthielt alle in Tabelle 7 (Pilze) und 8 (Außengruppen) aufgeführten 18S rDNA-Sequenzen und die in Tabelle 6 unter dem Punkt Analyse mit 2 vermerkten AM-Pilz und *Geosiphon pyriformis*-Sequenzen. Dies entspricht 51 beschriebenen und 6 unbeschriebenen Arten von AM-Pilzen (inklusive *Ge. pyriformis*), repräsentiert durch 72 Sequenzen. Waren von gut charakterisierten Isolaten mehrere Sequenzen vorhanden, wurden Konsensussequenzen für diese Isolate erstellt.

Der zweite, kleinere Datensatz bestand aus 82 Sequenzen mit 1699 vergleichbaren Positionen. Die in Tabelle 7 mit Unterstrich markierten *Basidio*- und *Ascomycota* dienten als Außengruppe; die verwendeten AM-Pilzsequenzen entsprachen denen des großen Datensatzes (Tabelle 6, Analyse 2).

Das verwendete Alignment wurde in der EMBL Datenbank (<http://www3.ebi.ac.uk/Services/align/listali.html>) unter der Accession-Nummer ALIGN\_000208 hinterlegt.

Mit jedem der beiden Datensätze wurde eine Neighbour-Joining und eine Maximum-Parsimony Analyse mit tausendfachem Bootstrapping durchgeführt und daraus Konsensusbäume berechnet (2.2.20). Die in den Abbildungen 8 und 9 gezeigten phylogenetischen Distanzen beruhen auf nichtgebootstrappten Neighbour-Joining Berechnungen.

Zwischen den Bäumen, die aus den beiden Berechnungsmethoden resultierten, gab es keine Unterschiede in der Baumtopologie und nur geringe Abweichung in der statistischen Unterstützung der hier gezeigten phylogenetischen Einteilung.

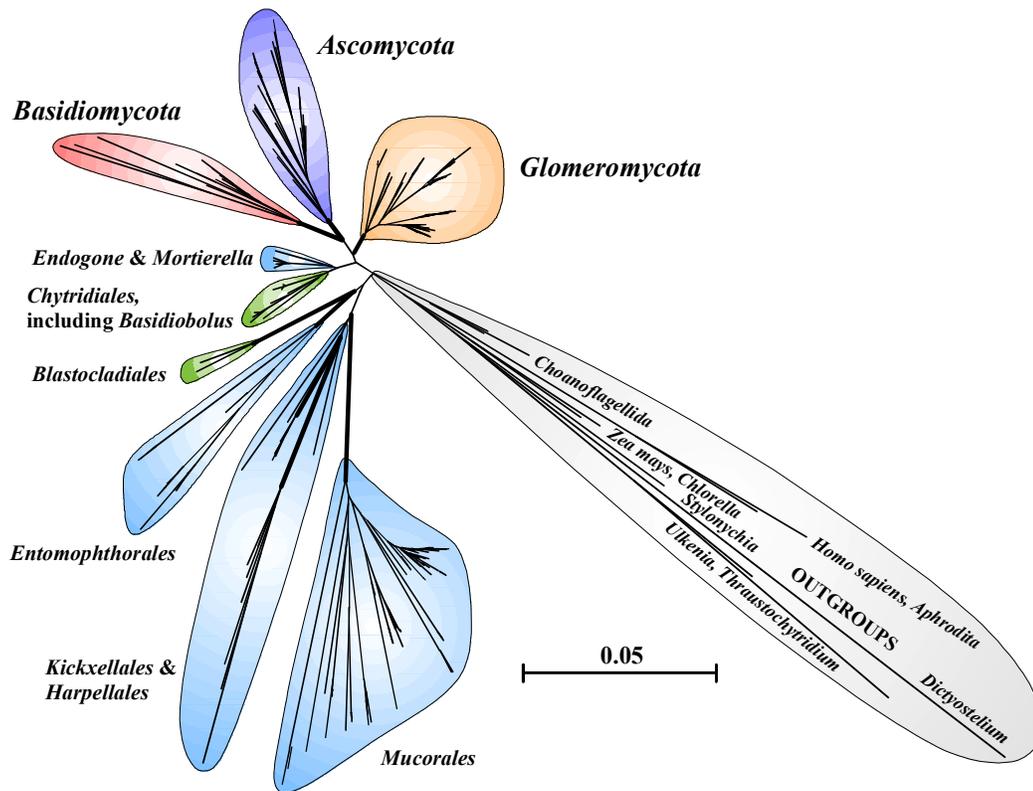
### **3.2.2 Ergebnisse aus den Analysen zur phylogenetische Stellung der AM-Pilze im Reich *Fungi***

#### **Ein neues Phylum *Glomeromycota* Walker und Schüßler *phyl. nov* mit vier Ordnungen**

In der Analyse des großen Datensatzes, welcher etwa 100 Zygomyceten-Sequenzen enthielt, konnte gezeigt werden, dass die AM-Pilze einen eigenen, monophyletischen Stamm zuzuordnen sind, der wahrscheinlich eine Schwestergruppe zu den *Ascomycota* und *Basidiomycota* bildet. Im Gegensatz dazu zeigten die *Zygomycota* und *Chitridiomycota* Polyphylye und sind damit im herkömmlichen Sinn keine natürlichen Gruppen.

Die AM-Pilze inklusive *Ge. pyriformis* bildeten, wie die *Ascomycota* und *Basidiomycota*, eine Gruppe, welche in der Kalkulation statistisch mit einem Bootstrapwert von >90% unterstützt wurde. Alle drei monophyletischen Gruppen zeigten auch vergleichbare genetische Distanzen.

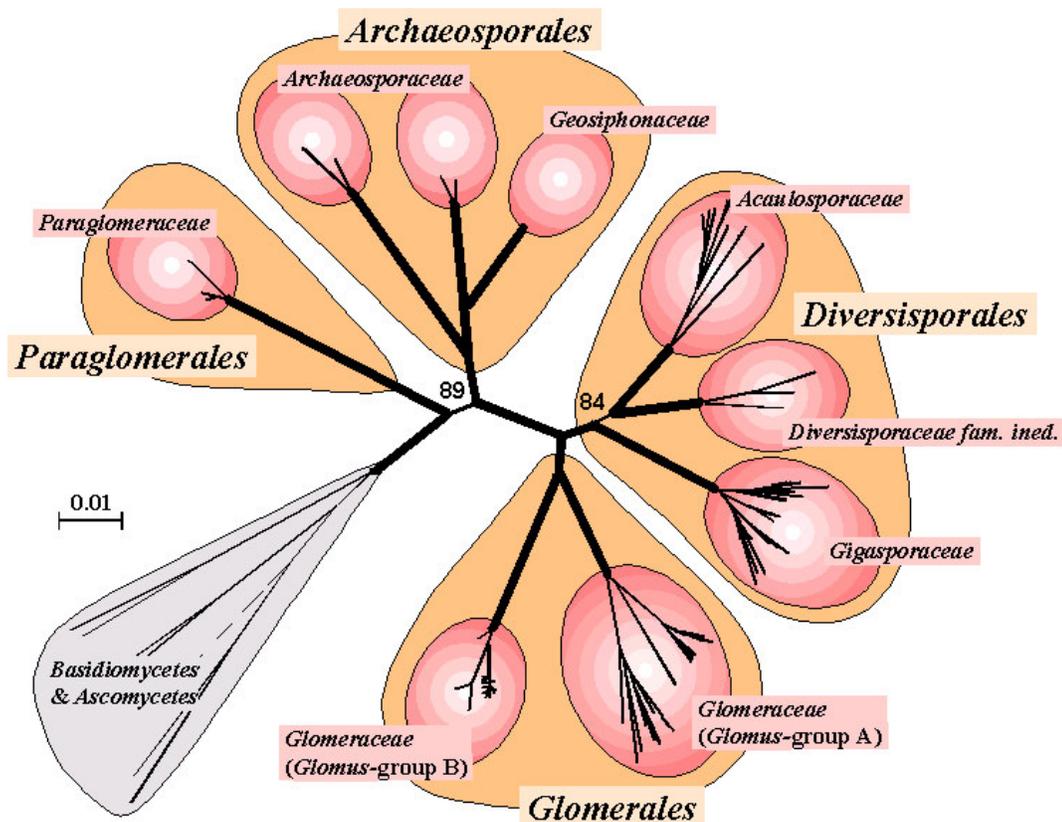
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in Zusammenarbeit mit C. Walker ein neues Phylum, die *Glomeromycota phyl. nov.*, beschrieben, das mit den *Asco-* und *Basidiomycota* wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung besitzt und unter molekularbiologischen, morphologischen und ökologischen Merkmalen von allen anderen Pilzgruppen abgetrennt werden kann (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Phylogenetischer Stammbaum des Pilzreiches basierend auf 18S rDNA-Sequenzen. Fett gezeichnete Abzweigungen werden mit Bootstrapwerten über 90% unterstützt. Die *Zygomycota* und *Chytridiomycota* zeigen keine Monophylie weswegen zu den einzelnen Zweigen das entsprechende Taxon (Ordnung und/oder Gattung) angegeben wird. (aus: Schüßler, Schwarzott und Walker 2001)

Das Phylum *Glomeromycota* enthält eine Klasse, die *Glomeromycetes* (orthografisch falsch beschrieben und auch phylogenetisch falsch eingeordnet als *Glomomycetes* in Cavalier-Smith 1998). Die Beschreibung der Klasse entspricht der des neuen Phylums. Innerhalb der *Glomeromycetes* konnte mit Hilfe der phylogenetischen Analysen in dieser Arbeit auch eine natürliche Strukturierung auf der Ebene der Ordnung durchgeführt werden.

Die Glomeromyceten teilten sich in der phylogenetischen Untersuchung in drei statistisch hoch unterstützte Hauptzweige auf. Das sind zum einen die zwei Ordnungen *Archaeosporales ord. nov.* und *Paraglomerales ord. nov.*, die ursprünglichere Arten der AM-Pilze umfassen. Ein weiterer Zweig entspricht zum großen Teil der von Morton und Benny (1990) beschriebenen Ordnung *Glomerales*. Vom phylogenetischen Standpunkt aus, unter Berücksichtigung der großen phylogenetischen Distanzen und den morphologischen Unterschieden, welche in der Beschreibung der Ordnung aufgeführt sind, muss diese Gruppe jedoch in zwei weitere Ordnungen unterteilt werden: die *Glomerales* und die *Diversisporales ord. nov.* (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Vorgeschlagene Taxonomie der AM-Pilze und *Ge. pyriformis* (Glomeromycota). Der Stammbaum basiert auf dem kleineren 18S rDNA-Datensatz. Fette gezeichnete Linien entsprechen einer Bootstrap-Unterstützung von mehr als 95%, niedrigere Werte sind an den entsprechenden Zweigen verzeichnet (aus: Schüßler, Schwarzott und Walker 2001).

Auch auf der Ebene der Familien werden die einzelnen Zweige von der 18S rDNA basierten Phylogenie mit Bootstrap-Werten über 95% statistisch hoch unterstützt. Die in Abbildung 9 gezeigte Familienstruktur wird unter Punkt 3.3 in einer weiteren phylogenetischen Analyse, die eine größere Zahl an AM-Pilz 18S rDNA-Sequenzen umfasst, beschrieben und diskutiert.

**Beschreibung der neuen AM–Pilz-Taxa (Phylum und Ordnungen)**

Die zur Anerkennung eines neuen Taxons nötige lateinische Beschreibung nach dem Internationalen Botanischen Code (Greuter *et al.* 2000) wurde in Schüßler, Schwarzott und Walker (2001) veröffentlicht. Aus diesem Grund wird hier nur eine deutsche Beschreibung der neuen taxonomischen Klassifizierung aufgeführt.

**Phylum: *Glomeromycota* Walker und Schüßler, *phylum. nov.***

Pilze mit coenocystischen oder schwach septiertem Myzel, meistens unter der Erde, manchmal ebenerdig lebend.

Sporenbildung:

Bildung von Chlamydosporen in manchen Gattungen an sich aufblähenden Hyphenspitzen, gefolgt von der Bildung verstärkender Wandkomponenten und anschließendem Abschluss durch ein Septum, einer Sporenwandverstärkung, oder der Ablagerung eines amorphen Verschlusses im Lumen zwischen einer sporenbildenden Hyphe und der daran gebildeten Spore.

In manchen Gattungen Bildung komplexer Sporen mit einer starren, chitinösen Wandkomponente innerhalb eines blasenförmigen, terminalen Sacculus, oder durch Erweiterung an einer zwiebförmigen Basis, mit oder ohne flexiblen Wandkomponenten.

Sporenbildung einzeln, in losen Ansammlungen, in dichten Ansammlungen (ohne strukturiertes Peridium), in Sporkarpen (mit Peridium) oder innerhalb von Pflanzenwurzeln.

Habitat: Im Boden, Wurzeln, oder auf der Bodenoberfläche, zwischen Vegetation oder verrottendem Substrat.

Lebensweise: Bildung enger symbiotischer Beziehungen mit photoautotrophen Organismen. Soweit bekannt Bildung von arbuskulären oder vesikulär-arbuskulären Mykorrhizen, der arbuskulären Mykorrhiza ähnliche Symbiosen mit niederen Pflanzen, oder Endocytosymbiosen mit Cyanobakterien.

Besteht aus einer Klasse: *Glomeromycetes*

**Klasse: *Glomeromycetes* Cavalier – Smith, 1998**

Die erweiterte Beschreibung in Schüßler, Schwarzott und Walker (2001) entspricht der des Phylums

**1.Ordnung: *Glomerales* Morton und Benny, 1990**

Pilze, meist unterirdisch, manchmal ebenerdig wachsend. Bildung von Endomykorrhizen oder Mykorrhiza-ähnlichen Symbiosen mit Sporen, Vesikeln und/oder

Arbuskeln in Pflanzen. Die Hyphen des vegetativen Myzeliums sind meist nicht septiert, es werden jedoch Septen in älteren Hyphen beim Zurückziehen von Cytoplasma, beziehungsweise beim Abschnüren von Sporen gebildet.

Reproduktion durch asexuell gebildete Sporen (glomoiden Sporen, Morton und Redecker 2001). Sporenbildung an den Hyphen hauptsächlich terminal, manchmal auch interkalar. Die Sporen liegen einzeln vor, in Ansammlungen oder es werden Sporokarpe gebildet.

Unterscheidung von anderen arbuskulären Mykorrhizapilzen durch den Besitz des spezifischen Sequenzmusters YTRRY / 2-5 / RYYARGTYGNCARCTTCTTAGAGGGA CTATCGGIGTYTAACCGRTGG auf dem 18S rRNA-Gen. Das Sequenzmotiv korrespondiert mit der *Saccharomyces cerevisiae*-Sequenz mit der Accession-Nr. J01353 ab der homologen Position 1353.

## **2. Ordnung: Paraglomerales** Walker und Schüßler

Pilze leben unter der Erdoberfläche; bilden Endomykorrhizen mit Arbuskeln und intraradikalem Myzelium, selten mit Vesikeln. Produktion glomoider Sporen ohne Pigmentierung.

Unterscheidung durch das 18S rRNA-Sequenzmotiv GCGAAGCGTCATGGCCTTAA CCGGCCGT. Das Sequenzmotiv korrespondiert mit der *Saccharomyces cerevisiae*-Sequenz (J01353) ab der homologen Position 703.

## **3. Ordnung: Diversisporales** Walker und Schüßler *ord. nov.*

Pilze leben unter der Erdoberfläche; bilden Endomykorrhizen mit Arbuskeln; Vesikel fehlen oft. Mit oder ohne unterirdisch gebildeten Helferzellen (Auxilliary Cells). Bildung von komplexen Sporen innerhalb eines sporenbildenden Sacculus (acaulosporoide Sporen; Morton und Redecker 2001). Bildung komplexer Sporen (Sporangiolen?), die sich von einer zwiebelartige Basis aus an der sporenbildenden Hyphe bilden (gigasporoide Spore) oder glomoiden Sporen.

Unterscheidung von anderen Mykorrhizapilzen durch den Besitz des 18S rDNA-Sequenzmotivs YVRRYW / 1-5 / NGY<sup>u</sup>YGB und GTYARDYHMHYY / 2-4 / GRADRK KYG. Die Sequenzmotive korrespondieren mit der *Saccharomyces cerevisiae*-Sequenz (J01353) ab der homologen Position 658 beziehungsweise 1346. Die unterstrichenen Nukleotide sind spezifisch für das Taxon.

## **4. Ordnung: Archaeosporales** Walker und Schüßler *ord. nov.*

Pilze leben unter der Erdoberfläche. Sie bilden Endocytosymbiosen mit photoautotrophen Prokaryonten oder arbuskuläre Mykorrhizen mit oder ohne Vesikel. Sporen ohne Pigmentierung oder keine Färbereaktion mit Melzer's Reagenz. Bildung

einzelner oder in losen Ansammlungen vorliegende, glomoide Sporen auf oder im Boden, oder einzelne im Boden gebildete, komplexe, acaulosporoide Sporen (Sporangiolen?). Enge Sporenansammlungen sind unbekannt.

Unterscheidung von anderen arbuskulären Mykorrhizapilzen durch das 18S rDNA-Sequenzmotiv YCAATCYKYCTGGTGAKRCG. Das Sequenzmotiv korrespondiert mit der *Saccharomyces cerevisiae*-Sequenz mit der Accession-Nummer. J01353 ab der homologen Position 691.

### 3.2.3 Diskussion der phylogenetischen Ergebnisse

#### Das Phylum *Glomeromycota* und die vier Ordnungen

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, handelt es sich bei den AM-Pilzen um eine sehr alte Gruppe innerhalb der Pilze (Berbee und Taylor 2001, Redecker, Kodner und Graham 2000), deren phylogenetische Stellung im Reich der Pilze bisher unklar war. Sie wurde bislang einem bekanntermaßen polyphyletischen Taxon, den *Zygomycota*, zugeordnet. Selbst die Monophylie innerhalb der AM-Pilze wurde in Zweifel gezogen (Morton, 2000).

In der hier durchgeführten Analyse des fast vollständigen 18S rRNA-Gens von 51 beschriebenen Arten und 6 unbeschriebenen Isolaten von AM-Pilzen, konnte gezeigt werden, dass diese Spezies unzweifelhaft eine eigenständige monophyletische Gruppe bilden, die sich von allen anderen, höheren Pilztaxa absetzt. Dies wurde vor allem durch die Verfügbarkeit von etwa 100 *Zygomycota*-Sequenzen verschiedenster Taxa aus Datenbanken möglich (O'Donnell *et al.* 2001, O'Donnell, Cigelnik und Benny 1998, Tanabe *et al.* 2000).

Die AM-Pilze inklusive *Ge. pyriformis* bilden in allen durchgeführten phylogenetischen Berechnungen eine monophyletische Gruppe, die sehr wahrscheinlich einen gemeinsamen Ursprung mit den *Asco-* und *Basidiomycota* besitzt. Auf der anderen Seite geht aus den Analysen eindeutig hervor, dass das Phylum *Zygomycota* eine polyphyletische Gruppierung darstellt und die bisherige Zuordnung der AM-Pilze zu diesem Taxon falsch ist.

Die gefundenen phylogenetischen Distanzen, welche in den gezeigten Stammbäumen dargestellt werden, und die hohe statistische Unterstützung für die Monophylie der AM-Pilze zeigen, dass der Ordnung *Glomerales s. lat.* eine taxonomische Ebene entsprechend der Phyla *Ascomycota* und *Basidiomycota* zugeordnet werden muss. Daraus ergab sich die Aufstellung eines neuen Phylums, um die AM-Pilze innerhalb einer natürlichen Phylogenie im Reich der Pilze einzuordnen und ihnen den entsprechenden Rang zu geben.

Einhergehend mit den Ergebnissen aus der molekularbiologischen Verwandtschaftsanalyse wurde eine formale Beschreibung des neuen Phylums *Glomeromycota* bis auf die Ebene der Ordnungen durchgeführt und veröffentlicht (Schüßler, Schwarzott und Walker 2001). Die bisherige Ordnung *Glomerales* erhält damit den Rang einer Abteilung (= Division, = Phylum).

Aufgrund der umfangreichen Analyse mit 259 Sequenzen aus verschiedensten Pilztaxa inklusive der darin enthaltenen AM-Pilzsequenzen, die etwa ein Drittel der bekannten Arten repräsentieren, und der hohen statistischen Unterstützung der gefundenen monophyletischen Gruppen, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Analyse weiterer Gene zu abweichenden Ergebnissen führt und sich die Phylogenie der neu beschriebenen höheren Taxa ändert. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass zusätzliche 18S rDNA Sequenzen von AM-Pilzen zu weiteren, bisher noch nicht gefundenen, Gruppierungen innerhalb der *Glomeromycota* führen. Dies gilt vor allem auf der Ebene der Familienstruktur innerhalb der AM-Pilze, die unter Punkt 3.3 detailliert besprochen wird.

Die *Glomeromycota* spalten sich in der durchgeführten Analyse in vier statistisch hoch unterstützte Hauptzweige auf. Um das bisher bestehende taxonomische Konzept für die gefundenen Gruppen so wenig wie möglich zu verändern, wurde diesen Gruppen der Status von Ordnungen zugesprochen. Es sind dies die *Glomerales*, die *Diversisporales*, die *Archaeosporales* und die *Paraglomerales*, wobei die Ordnung *Glomerales* den Grossteil der „klassischen“ AM-Pilzarten umfasst, wie sie nach Morton und Benny (1990) beschrieben wurden. Für einige der höheren Taxa, wie sie in Abbildung 9 gezeigt werden, fehlen allerdings bisher überzeugende morphologische Merkmale zu den molekularen Daten. Dies ist für diese, sich asexuell vermehrenden Organismen mit einfachem Bauplan nicht überraschend. Auch das für die Definition der *Glomeromycota* (= *Glomales sensu* Morton und Benny) benutzte Merkmal „intrazelluläre Arbuskelbildung“ kann in der molekularen Analyse nicht nachvollzogen werden (siehe auch 3.3.3). Mit Hilfe zusätzlicher molekularbiologischer Untersuchungen und auf Basis der hier aufgestellten, natürlichen Phylogenie besteht die Möglichkeit einer neuen Bewertung der morphologischen Daten, und damit der Aufstellung einer allgemein akzeptierten Taxonomie für diese wichtige Pilzgruppe auch auf Familien- und Gattungs-Ebene (siehe 3.3).

#### **Die Unterordnungen *Glomineae* und *Gigasporineae* (Morton und Benny 1990)**

Abweichend von der AM-Pilz-Systematik nach Morton und Benny (1990) ist auch die Unterteilung der *Glomeromycota*-Arten in die beiden Unterordnungen *Glomineae* und *Gigasporineae*. Sie erscheinen auch nicht als getrennte Linien, die unabhängig voneinander entstanden sind, wie es von Morton (2000) vermutet wurde. Diese

Inkongruenz zwischen molekularen und morphologischen Merkmalen wurde schon in verschiedenen Studien erkannt (Gehrig *et al.* 1996, Redecker, Morton und Bruns 2000, Schüßler 1999, Tanabe *et al.* 2000) und wird mit dieser bisher umfangreichsten phylogenetischen Analyse von AM-Pilzen untermauert. Die molekularen Daten führen zu einem wesentlich komplexeren Bild der *Glomeromycota*-Phylogenie. Dies legt nahe, dass die bisherige Interpretation morphologischer Merkmale falsch ist und auch auf dieser taxonomischen Ebene einer Reevaluation der Daten nötig ist.

In der 18S rRNA-Phylogenie bilden die beiden Familien *Gigasporaceae* und *Acaulosporaceae*, neben den beiden *Glomus*-Gruppen C (*Diversisporaceae* fam. ined.) und D (fam. ined.; siehe Abbildung 9, 11 und 22) eine monophyletische Einheit, die von der monophyletischen Einheit der beiden *Glomus*-Gruppen A und B abgegrenzt ist (siehe 3.3 bezüglich der *Glomus*-Gruppe D). Die morphologischen Merkmale, die diese Unterordnungen definieren (Tabelle 2), scheinen damit eine erneute phylogenetische Einordnung zu erfordern. Gerade die Untersuchung der wirklichen Funktion sowie das Vorkommen von Vesikeln (*Glomineae*) und Helferzellen (*Gigasporineae*) muss überprüft werden, da Vesikel bei den monophyletischen *Glomeromycota* in verschiedenen taxonomischen Gruppen zu finden sind (*Paraglomeraceae*, *Acaulosporaceae* und *Glomeraceae*) und damit nicht als autapomorph gelten können. Auch zeigen zum Beispiel die Vesikel bestimmter *Glomus*-Arten eine Analogie zu den Helferzellen der *Gigasporinae* (Morton 2000). Bemerkenswert ist daran, dass Morton 1990 in seiner kladistischen Analyse der AM-Pilze die beiden Organe als unabhängige Entwicklungen darstellt, da es keine physiologischen und morphologischen Gemeinsamkeiten gebe. Gleichzeitig werden aber in der Arbeit Studien zitiert, die den beiden Organen eine Rolle bei der Speicherung von Nährstoffen zusprechen. Ein Zusammenhang zwischen den beiden Organen wird von Morton deswegen verneint, weil sich die in den Vesikeln und Helferzellen gefundenen Lipide unterscheiden. Zumindest dieses Kriterium kann nach den Analysen in der vorliegenden Arbeit nicht die Grundlage bilden, die beiden Organe als unabhängige Entwicklungen zu werten.

Auch die genauere Analyse des sporenbildenden Sacculus bei den *Acaulosporaceae* und der zwiebförmigen Zelle bei den *Gigasporaceae* als Organe, die an der Sporenbildung beteiligt sind, könnte dabei helfen die hier gefundenen Ergebnisse zu überprüfen. Der sporenbildende Sacculus ist sowohl bei der ursprünglichen AM-Pilzgattung *Archaeospora*, als auch bei den Gattungen *Entrophospora* und *Acaulospora* zu finden (Redecker, Morton und Bruns 2000, Morton und Redecker 2001). Dies würde bedeuten, dass ein symplesiomorphes Merkmal vorliegt, welches nicht zur Begründung dieser phylogenetischen Gruppen herangezogen werden dürfte. Ob die zwiebförmige Zelle, als weiteres Merkmal, welches die *Gigasporineae* von den *Glomineae* unterscheidet (Morton und Benny 1990, siehe auch Tabelle 2,

Abbildungen 2 und 22), ein Derivat des „sporenbildenden Sacculus“ darstellt, kann hier nur vermutet werden, ist aber nach den Ergebnissen der 18S rDNA-Analysen denkbar. Ein weiteres Merkmal, welches die Einteilung in die beiden Unterordnungen zweifelhaft macht, ist die Art der Hyphenkeimung beziehungsweise der Strukturen, die dafür gebildet werden. Diese werden als „germination compartment“ bei den *Acaulosporaceae* („*Glomineae*“) beziehungsweise „germination shield“ bei den *Gigasporaceae* („*Gigasporineae*“) bezeichnet und auch *G. scintillans*, der eine Schwestergruppe zu den *Gigasporaceae* bildet, zeigt solche Strukturen. Diese sind vermutlich, wenn auch nicht abgesichert, homologe Strukturen (C. Walker, persönliche Mitteilung), die eher für die in den 18S rDNA-Untersuchungen gefundenen phylogenetischen Zusammenhänge sprechen.

Für die Überprüfung dieser Hypothesen, die sich aus der vorliegenden 18S rDNA-Analysen ergeben, bedarf es neben umfangreichen Funktionsanalysen der hier als Beispiele genannten Organe auch zusätzlicher fossiler Funde, um Homologien und Konvergenzen unterscheiden zu können.

### **3.2.4 *Geosiphon pyriformis*, AM-Pilze und die Evolution der Landpflanzen**

Pyrozynski und Malloch postulierten bereits 1975, dass die Gemeinschaft zweier ursprünglich wasserlebender Organismen, einer Alge und eines „Phycomyceten“, den ersten Schritt der Landpflanzenevolution darstellen könnte. Allerdings fehlten damals noch direkte Anhaltspunkte für diese Hypothese.

Die größte Barriere bei der Besiedlung des Landes durch Pflanzen dürfte die Versorgung mit Wasser und Nährstoffen, vor allem Phosphat, gewesen sein. Neben der Tatsache, dass AM-Pilze auch heute bei dieser Versorgung für den Grossteil der Landpflanzen eine wichtige Aufgabe haben, gibt es auch Fossilienfunde, die auf eine wichtige Rolle der AM-Pilze bei der Entstehung von Landpflanzen hinweisen. So wurden unter anderem Arbuskelstrukturen in 400 Millionen Jahre alten *Aglaophyton*-Fossilien gefunden (Remy *et al.* 1994, Stubblefield 1987). *Aglaophyton* zeigt morphologische Eigenschaften von Gefäßpflanzen wie auch Bryophyten und besitzt noch keine Wurzeln, doch auch für rezente niedere Pflanzen ohne Wurzeln sind AM-artige Assoziationen bekannt (Parke und Linderman 1980, Stahl 1949). Der Nachweis einer AM-artigen Symbiose zwischen *Anthoceros punctatus* und *G. clarioideum* zeigte zum ersten Mal, dass diese Pilze in der Lage sind sowohl mit höheren Pflanzen als auch Bryophyten, die keine Wurzeln besitzen, eine Gemeinschaft einzugehen (Schüßler 2000). Zwar sind AM-ähnliche Symbiosen bei verschiedenen Leber- und Hornmoosen bekannt, die genaue systematische Zuordnung der Pilzpartner ist jedoch ungesichert. So ist zum Beispiel ein sogenannter „fine endophyte“, der als *G. tenuis*

klassifiziert wird, bekannt dafür, dass er Lebermoose (Turnau, Ronikier und Unrug 1999) und Laubmoose (Rabatin 1980) kolonisiert. Ob es sich in den beschriebenen Fällen wirklich um einen Pilz aus dem Phylum der *Glomeromycota* handelt, ist aber nicht gesichert. Da morphologische Merkmale zur Bestimmung von Pilzen auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene oftmals nur spärlich vorhanden sind, wurden evolutionäre Zusammenhänge bei den Pilzen oftmals unzureichend erkannt und beruhen zum Teil auf Konvergenzen und Homoplasien. Phylogenetische Studien von DNA-Sequenzen haben die Möglichkeit geliefert, ohne Interpretation unsicherer phänotypischer Charaktere, neue Einsicht in die Evolution von Pilzen zu erhalten (Redecker 2002).

Da der Ursprung und die Evolution der AM-Pilze offensichtlich in engem Zusammenhang mit der Entwicklung von Landpflanzen stehen, ist es wichtig zu verstehen, ob diese Pilzgruppe eine monophyletische Einheit darstellt. Dies könnte erklären helfen, ob die heutigen AM-Symbiosen unabhängig voneinander entstandene, also konvergente Ereignisse bei der Evolution der Landpflanzen repräsentieren, die aus verschiedenen Pilzlinien entstanden sind, oder einen gemeinsamen Ursprung besitzen. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass die Entstehung der Landpflanzen etwa im Übergang vom Silur zum Devon, also vor circa 400 Millionen Jahren, liegt. Die ältesten Fossilfunde von Sporen und Hyphen, die typische Merkmale von AM-Pilzen aufzeigen, stammen heute aus dem Ordovizium und sind etwa 460 Mio. Jahre alt (Redecker, Kodner und Graham 2000). Die neuesten Analysen von molekularen Uhren haben ergeben, dass die ersten Pilze vermutlich vor etwa 900 Mio. Jahren und die ersten Pflanzen bereits vor etwa 700-450 Mio. Jahren das Land besiedelten (Heckman *et al.* 2001). Aus diesem Grund ist es denkbar, dass sich die AM-Pilze vor den Landpflanzen entwickelt haben, und *Ge. pyriformis* könnte eine frühe evolutionäre Form der AM widerspiegeln, die existierte, als bereits Cyanobakterien, aber noch keine Pflanzen an Land vorkamen (Hoehler, Bebout und Marais 2001, Schüßler 2002). Dies bedeutet nicht, dass die *Geosiphon*-Symbiose als lebendes Fossil angesehen werden sollte, aber sie legt die Möglichkeit der Existenz einer solchen fossilen Symbiose nahe. Aufgrund dieser Annahmen stellt sich die Frage, ob auch der Pilzpartner von *Ge. pyriformis* in der Lage ist, arbuskuläre Mykorrhizen zu bilden, und wenn ja, mit welchen Pflanzen. Die Ergebnisse aus den phylogenetischen Analysen können die AM-Evolution zwar nicht erklären, aber neue Interpretationsmöglichkeiten und Sichtweisen liefern. Interessant ist zum Beispiel der Gesichtspunkt, dass die *Glomeromycota*, wie unter 3.2 gezeigt, eine Schwestergruppe zu den *Asco*- und *Basidiomycota* darstellt und diese Pilzgruppen sehr oft mit Pflanzen assoziiert sind. Mit einer einzigen bekannten Ausnahme, der Ektomykorrhiza des Zygomyceten *Endogone*, findet man nur bei den

Pilzen der oben genannten Phyla mutualistische Pilz-Pflanzen-Gemeinschaften (Redecker 2002).

Neben der Möglichkeit, dass eine *Geosiphon*-ähnliche Symbiose zwischen Pilz und photoautotrophen Cyanobakterien die Grundlage der AM gebildet hat, gibt es weitere mögliche Wege, auf denen sich diese ubiquitär vorkommende Pilz-Pflanzen-Symbiose entwickelt haben könnte:

- a) die Assoziation zwischen Pilz und Pflanze wurde bereits im aquatischen Milieu gebildet. Die Funktion des Pilzpartners dürfte dabei jedoch eine andere als bei der heutigen AM-Symbiose gewesen sein, da die Verhältnisse bei der Nährstoffversorgung im Wasser völlig anders sind als an Land. Eher wahrscheinlich wäre in diesem Fall, dass die Pilze saprophytisch oder parasitisch mit Algen assoziiert waren (Brundrett 2002).
- b) Die AM-Symbiose entwickelte sich erst, als die Landpflanzen bereits vorhanden waren. Da die ersten „*Glomeromycota*“ bereits vor den ersten Landpflanzen entstanden, besteht die Möglichkeit, dass die Pilze bereits bessere Wege entwickelt hatten, dem Boden Mineralstoffe zu entziehen und diese Fähigkeit in die Pilz-Pflanzen-Assoziation mit eingebracht haben. Gleichzeitig mussten die ersten Landpflanzen eine hohe Oberflächenpermeabilität für Wasser und Nährstoffe besessen haben und damit auch für die Penetration durch Pilze zugänglicher gewesen sein. Aus einer zunächst parasitischen Lebensweise der Pilze hat sich dann ein Vorteil für die mutualistische AM-Symbiose ergeben, der diese auf Dauer etablierte (Brundrett 2002).

Welche der verschiedenen Möglichkeiten die Wahrscheinlichste kann mit Sicherheit nicht gesagt werden, und eine weitere Absicherung ist nur durch weitere fossile Funde und zusätzlicher molekularer Daten noch existierender Organismen möglich. Die Ergebnisse aus der phylogenetischen Analyse legen jedoch nahe, dass die Bildung einer Symbiose zwischen Pilz und photoautotrophen Partner ein wichtiger Schritt bei der Besiedlung des Landes durch Pflanzen war.

### 3.3 Vorgeschlagenes Konzept zur Unterteilung der *Glomeromycota* in Familien

Wie die Einordnung der AM-Pilze zu den Zygomyceten innerhalb des Reich *Fungi* beruhte auch das Familien- und Gattungskonzept der Ordnung *Glomerales* (*Glomales*, Morton und Benny 1990) zu Beginn der Arbeit auf der Analyse rein morphologischer Merkmale, über deren Funktion und Evolution jedoch wenig bekannt war und auch immer noch ist.

Die Monophylie der Ordnung *Glomerales* und der darin beschriebenen Gattungen (vor allem *Glomus*) wurde bereits von Walker 1992 aufgrund morphologischer Charaktere in Zweifel gezogen und erste molekularbiologische Analysen des 18S rRNA-Gens (Simon 1996) lieferten weitere Hinweise auf eine unnatürliche Familiensystematik der AM-Pilze.

Aus diesem Grund wurden während der Arbeit zunächst Arten der Familie *Glomeraceae* auf Basis des 18S rRNA-Gens analysiert, um Aufschluss über die natürliche Phylogenie in dieser Gruppe zu erhalten. Die aus dieser Untersuchung entstandenen Veränderungen in der AM-Pilz-Familiensystematik (Schwarzott, Walker und Schüßler 2001) werden hier in Zusammenhang mit einer zweiten Analyse, welche bisher noch nicht veröffentlichte Sequenzdaten enthält, vorgestellt und diskutiert.

#### 3.3.1 Verwendete Daten:

Für die Berechnung des in Abbildung 10 gezeigten Stammbaums (Schwarzott, Walker und Schüßler 2001) wurden 18S rRNA Sequenzen von insgesamt 71 AM-Pilz-Isolaten benutzt (siehe Tabelle 6).

Das Alignment und die phylogenetischen Berechnungen wurden entsprechend 2.2.19 durchgeführt, wobei 1680 Positionen in Übereinstimmung zu bringen waren. Der dargestellte Stammbaum resultierte aus einer 10.000-fach gebootstrappten Neighbour-Joining- und einer 1000-fach gebootstrappten Maximum-Parsimony-Analyse. Das Alignment wurde in der EMBL Datenbank (<http://www3.ebi.ac.uk/Services/align/listali.html>) unter der Accession-Nummer ALIGN\_000124 hinterlegt.

Für den Stammbaum in Abbildung 11 wurden Sequenzen von insgesamt 90 verschiedenen AM-Pilzisolaten benutzt, die 63 beschriebene (inklusive *Ge. pyriformis*) und 7 unbeschriebene Arten repräsentieren (siehe Tabelle 6). In der phylogenetischen Berechnung wurden 1735 alignbare Positionen des 18S rRNA-Gens benutzt und eine 1000-fach gebootstrappte Neighbour-Joining-Analyse durchgeführt.

Waren von den einzelnen Isolaten mehrere Sequenzen verfügbar, wurden Konsensussequenzen erstellt. Im umfangreicheren zweiten Stammbaum wurden Teilsequenzen, die große Anteile an unsicheren Positionen aufwiesen ausgeschlossen,

wenn komplette Sequenzdaten für die Art verfügbar waren. So sind z.B. die *G. mossae* Sequenzen der Isolate DAOM221475, DAOM212595, DAOM198394, BEG25, BEG69 bzw. *G. sp.* DAOM225952 im zweiten Stammbaum nicht berücksichtigt worden. In beiden gezeigten Stammbäumen dienten *Mortierella polycephala* und *Endogone pisiformis* als Außengruppe.

### 3.3.2 Ergebnisse aus den Analysen zur Familienstruktur

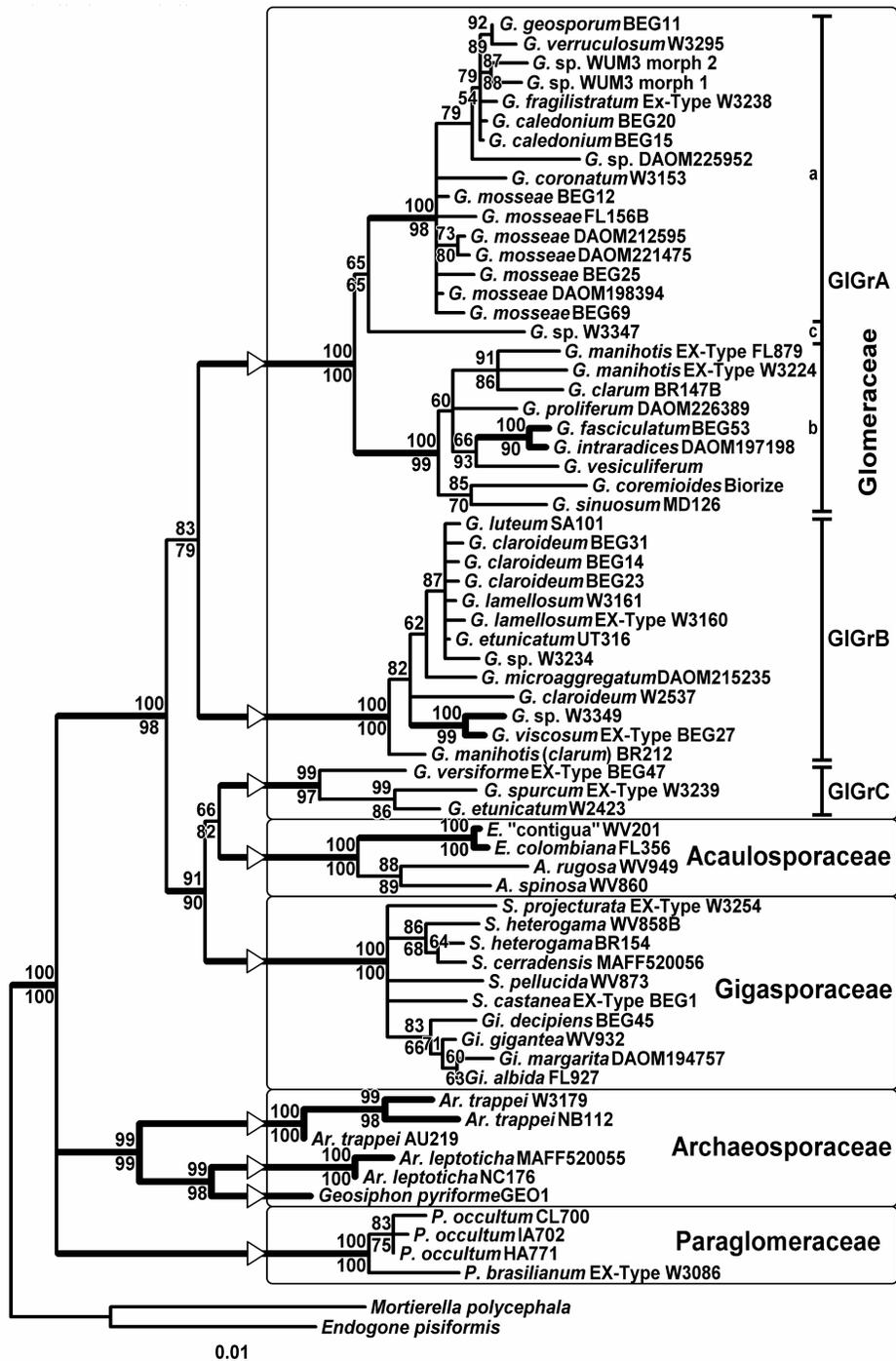
Wie bereits unter 3.2 dargestellt bilden die AM-Pilze innerhalb des Reiches *Fungi* eine monophyletische Gruppierung. Zur besseren Auflösung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *Glomeromycota* wurden die oben dargestellten Phylogenien mit *Endogone pisiformis* und *Mortierella polycephala* als Außengruppe durchgeführt. Dies ermöglichte die Benutzung von bis zu 390bp längeren Alignments, als es in der unter 3.2 gezeigten Analyse möglich war. Innerhalb der *Glomeromycota* bilden die ursprünglicheren Linien (Ordnung *Archaeosporales ord. nov.* und *Paraglomerales ord. nov.*) eigene Gruppen, die von den Ordnungen *Glomerales* (Morton und Benny 1990) und *Diversisporales* (Walker, Schwarzott und Schüßler 2001) mit hoher statistischer Unterstützung ( $\geq 99\%$ ) abgetrennt werden können.

Die Ordnung *Paraglomerales* (Walker, Schwarzott und Schüßler 2001) besteht aus der Familie *Paraglomeraceae* mit einer Gattung *Paraglomus* (Morton und Redecker 2001), welche die beiden Arten *P. occultum* und *P. brasilianum* umfasst.

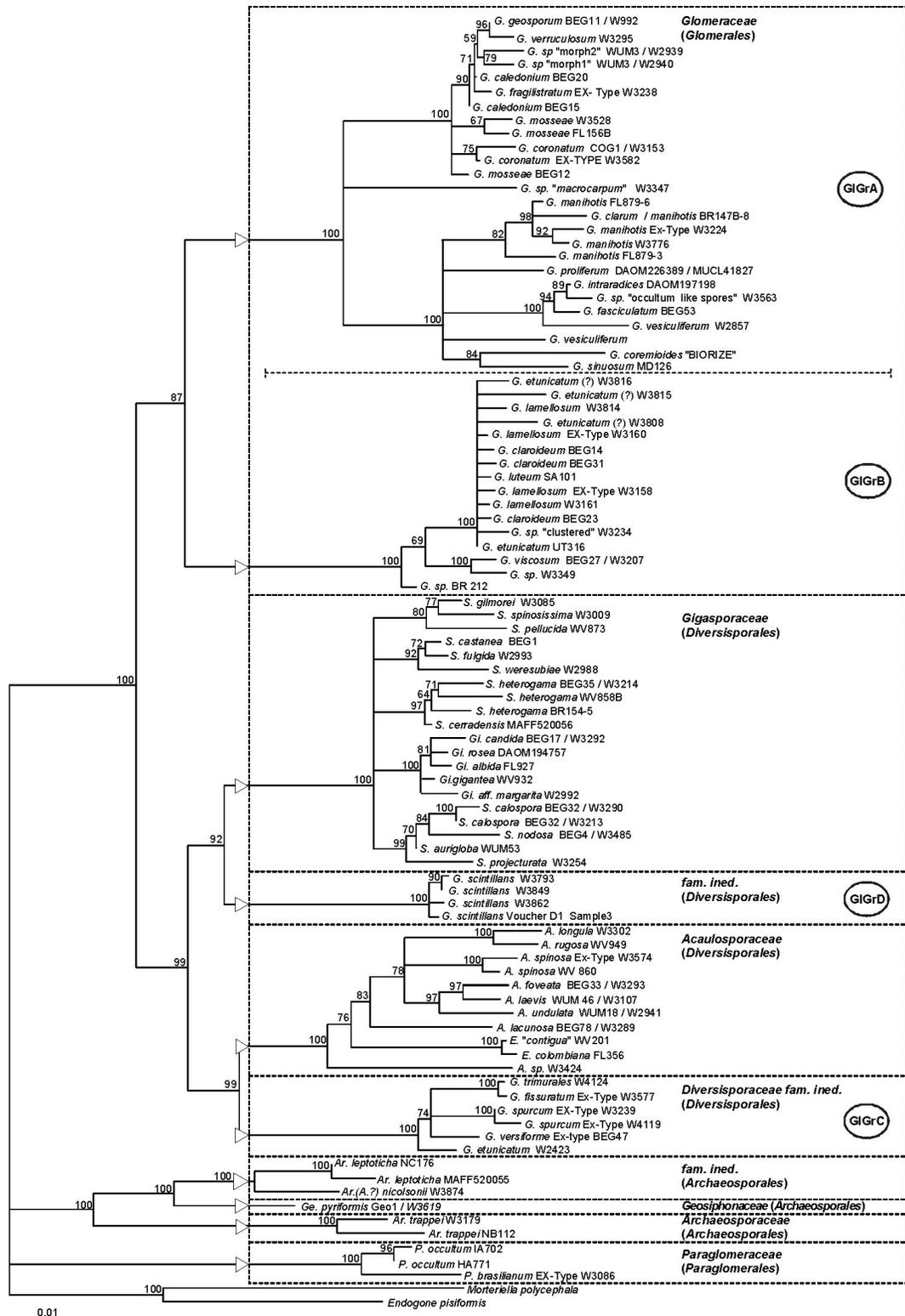
Die Ordnung *Archaeosporales* (Walker, Schwarzott und Schüßler 2001) umfasst bisher zwei formal beschriebene Familien. Dazu gehört neben den *Archaeosporaceae* auch *Ge. pyriformis* aus der Familie *Geosiphonaceae*.

Die zweite Familie innerhalb dieser Ordnung, die *Archaeosporaceae* mit der Gattung *Archaeospora* (Morton und Redecker 2001) enthält drei Arten, *Ar. trappei*, *Ar. leptoticha* und *Ar. (A.?) nicolsonii*. Die Zugehörigkeit der letztgenannten Art zu dieser Familie war bisher noch nicht bekannt und es wurde noch keine offiziell gültige Reklassifizierung durchgeführt. Aus diesem Grund wird die bisherige Gattungsbezeichnung (*Acaulospora*) mit aufgeführt.

Die Ordnung *Glomerales* bildet in beiden unter 3.3 dargestellten Bäumen eine monophyletische Einheit mit 98% beziehungsweise 100% statistischer Unterstützung. Sie enthält eine Familie, die *Glomeraceae*, mit der Gattung *Glomus sensu* Morton und Redecker. Diese Gruppe beinhaltet die größte Anzahl der bisher beschriebenen AM-Pilzarten. Die Familie *Glomeraceae* spaltet sich in den Bäumen in zwei Linien auf, die als *Glomus*-Gruppe A (GIGrA) und *Glomus*-Gruppe B (GIGrB) bezeichnet werden. Diese Aufteilung wird je nach Analyse mit 79% – 87% statistisch unterstützt.



**Abbildung 10:** Phylogenetischer Neighbour-Joining-Konsensusbaum der AM-Pilze (*Glomeromycota*). Die Bootstrapwerte für die Neighbour-Joining-Analyse sind jeweils über den Ästen angegeben, die Werte in der Maximum-Parsimony-Analyse stehen darunter. Fehlen die Werte für die Maximum-Parsimony Berechnung waren verschiedene Topologien in den zwei Analysen vorhanden. Bootstrapwerte unter 60% sind nicht verzeichnet und bei Werten unter 60% für beide Berechnungsmethoden wurden die entsprechenden Äste zu einer Polytomie zusammengefasst. Werte über 90% in beiden Analysen sind durch fette Linien gekennzeichnet. Das diskutierte Familienkonzept für die *Glomeromycota* wird durch entsprechende Pfeile hervorgehoben. Die gezeigten genetischen Distanzen stammen aus einer nicht-gebootstrappten Neighbour-Joining-Analyse.



**Abbildung 11:** Phylogenetischer Neighbour-Joining-Konsensusbaum der *Glomeromycota*. Die Bootstrapwerte für die Neighbour-Joining-Analyse sind jeweils über den Ästen angegeben. Bootstrapwerte unter 60% sind nicht verzeichnet und führten zur Zusammenfassung der entsprechenden Äste in eine Polytomie. Das diskutierte Familienkonzept für die *Glomeromycota* wird durch entsprechende Pfeile hervorgehoben. Die gezeigten genetischen Distanzen stammen aus einer nicht-gebootstrapten Neighbour-Joining-Analyse.

Die *Glomus*-Gruppe A kann wiederum in zwei weitere Gruppierungen aufgespalten werden. Die GIGrAa (nach Schüßler *et al.* 2001) besteht aus den Arten *G. geosporum*, *G. verruculosum*, *G. sp.* WUM3, *G. caledonium*, *G. mossae*, *G. coronatum*, *G. fragilistratum* und *G. sp.* DAOM225952. GIGrAb umfasst die Arten *G. proliferum*, *G. intraradices*, *G. sp.* „occultum like“, *G. fasciculatum*, *G. vesiculiferum*, *G. coremioides*, *G. sinuosum* und *G. manihotis* / *G. clarum*. Die beiden letztgenannten Arten stellen wahrscheinlich Synonyme dar. Eine weitere publizierte *G. manihotis* / *clarum*-Sequenz (Isolat BR212) wird in den Analysen der weiter unten beschriebenen *Glomus*-Gruppe B zugeordnet. Eine zusätzliche morphologische und molekularbiologische Überprüfung dieses Isolates war leider nicht möglich, da die Kultur nicht mehr verfügbar ist.

Eine weitere Untergruppe, GIGrAc mit der Art *G. sp.* „*macrocarpum*“ W3347 wurde nur der ersten Analyse mit 65% statistisch unterstützt. In der mehr Arten enthaltenden zweiten Berechnung wurde diese Abzweigung in einer Polytomie zusammengefasst (Bootstrapwert 55%). Die *Glomus*-Gruppe B enthält die Arten *G. etunicatum*, *G. lamellosum*, *G. sp.* „clustered“ W3234, *G. viscosum*, *G. sp.* W3349, und das bereits erwähnte *G. sp.* BR212 Isolat.

Neben den beiden *Glomus*-Gruppen A und B finden sich zwei weitere Gruppe von Isolaten, die bisher nach morphologischen Kriterien der Gattung *Glomus* zugeordnet wurden. Die eine, kurz als GIGrC bezeichnete, phylogenetische Gruppierung ist jedoch nach der 18S rDNA Phylogenie nicht näher mit den anderen Arten der „Gattung“ *Glomus* verwandt. In diesem Zweig des Stammbaums befinden sich die Arten *G. trimurales* (unpublizierte Sequenz; nur im zweiten Baum enthalten), *G. fissuratum*, *G. spurcum*, *G. versiforme* und eine Art, die der Beschreibung von *G. etunicatum* entspricht. Die Arten in dieser Gruppe teilen sich nur wenige morphologische Eigenschaften, außer dass sie leicht über die Sporenentwicklung und Sporenmorphologie von anderen Arten außerhalb der Gattung *Glomus* unterschieden werden können. GIGrC wird mit einer Bootstrap-Unterstützung von 90 und 91% im Baum der ersten Analyse (Abbildung 10) beziehungsweise 99% im zweiten Baum (Abbildung 11) der Ordnung *Diversisporales* zugerechnet und ein gemeinsamer Ursprung mit der Familie *Acaulosporaceae* scheint somit gesichert.

Auch die untersuchten Isolate von *G. scintillans* werden in der phylogenetischen Analyse zur Ordnung *Diversisporales* gestellt und haben einen gemeinsamen Ursprung mit der Familie der *Gigasporaceae* (Bootstrap-Unterstützung 99%). Es zeigt sich, dass die Gattung *Glomus sensu* Morton und Redecker auf Basis der 18S rDNA phylogenetisch in insgesamt vier Gruppen aufgeteilt ist, die alle durch vergleichbare genetische Distanzen voneinander getrennt sind. Die bisherige Klassifizierung ist damit nicht monophyletisch und bedarf einer Revision.

Neben den zwei *Glomus*-Gruppen C und D umfasst die Ordnung *Diversisporales ord. nov.* die beiden Familien *Acaulosporaceae* und *Gigasporaceae*. Die Auftrennung der beiden Familien wird mit 90 und 91% (Abbildung 10) beziehungsweise 99% (Abbildung 11) in der 18S rDNA-Analyse unterstützt.

Die *Gigasporaceae* umfassen zwei Gattungen: *Scutellospora* und *Gigaspora*, die sich mit einem Bootstrap-Wert von 100% von der *Glomus*-Gruppe D abtrennen. In der Gattung *Scutellospora* finden sich die Arten *S. gilmorei*, *S. spinosissima*, *S. pellucida*, *S. castanea*, *S. fulgida*, *S. weresubiae*, *S. heterogama*, *S. cerradensis*, *S. calospora*, *S. nodosa*, *S. aurigloba*, *S. projecturata*. Die Arten bilden in der zweiten Analyse insgesamt vier interne Gruppen. Die phylogenetische Beziehung zwischen diesen Gruppen und zu der Gruppe von Arten aus der Gattung *Gigaspora* kann jedoch nicht aufgelöst werden.

Die Gattung *Gigaspora* wird durch fünf analysierte Arten repräsentiert, die in der Analyse eine geschlossene phylogenetische Gruppe darstellt, welche sich mit 100% statistischer Unterstützung von den Arten der Gattung *Scutellospora* separieren lässt. Es sind dies *Gi. candida*, *Gi. rosea*, *Gi. albida*, *Gi. gigantea* und *Gi. aff. margarita*.

Die Familie der *Acaulosporaceae* wird durch zwei Gattungen repräsentiert: *Entrophospora* und *Acaulospora*, die sich mit 100% Bootstrapp-Unterstützung von der *Glomus*-Gruppe C abspalten. Die analysierten rDNA-Sequenzen der Gattung *Acaulospora* stammten von den Arten: *A. longula*, *A. rugosa*, *A. spinosa*, *A. foveata*, *A. laevis*, *A. undulata*, *A. lacunosa* und *A. sp. W3424*; die *Entrophospora*-Arten werden durch Sequenzen der Arten *E. „contigua“* und *E. colombiana* repräsentiert. Eine genaue verwandtschaftliche Beziehung zwischen beiden Gattungen der *Gigasporaceae* lässt sich in der vorliegenden Phylogenie nicht aufklären. Zwar wird der Großteil der *Acaulospora*-Arten mit 83% von den beiden *Entrophospora*-Arten abgetrennt, es scheint aber, dass diese Gruppen einen gemeinsamen Ursprung mit einer bisher nicht genauer beschriebenen *Acaulospora*-Art besitzen (*A. sp. W3424*).

Während die Verwandtschaftsbeziehungen auf Gattungs- und Artebene mit der 18S rDNA-Analyse hier in vielen Fällen nicht eindeutig gelöst werden können, kann man im Gegensatz dazu auf der Ebene der Familie die Notwendigkeit der Revision des bisherigen taxonomischen Konzepts erkennen. Diese Neueinteilung basiert auf hohen statistischen Absicherungen und vergleichbaren genetischen Distanzen zwischen den gefundenen Gruppen und soll dazu dienen innerhalb der *Glomeromycota*, zu einer natürlichen Familienphylogenie zu gelangen.

### 3.3.3 Diskussion

Der Ausgangspunkt für die phylogenetische Analyse der *Glomeromycota* war die Vermutung, dass die größte Gattung dieser Pilzgruppe, *Glomus*, polyphyletisch ist und die bisher benutzten Merkmale zur Klassifizierung nicht die natürlichen Verwandtschaftsbeziehungen widerspiegeln (Walker 1992). Auch bereits die ersten Analysen von rDNA-Sequenzen der AM-Pilze zeigten unerwartet große genetische Distanzen innerhalb der Gattung *Glomus* (Simon *et al.* 1993).

Im Verlauf der Arbeit kam es bereits zu einer Revision der *Glomeromycota*-Phylogenie (*Glomerales sensu* Morton und Benny), wobei die beiden neuen Familien *Archaeosporaceae* und *Paraglomeraceae* etabliert wurden. Diese ursprünglichen Zweige der *Glomeromycota* konnten auf Basis der 18S rDNA erkannt werden (Sawaki, Sugawara und Saito 1998, Redecker 2000), und gerade die genetischen Distanzen zwischen diesen neuen Familien und den anderen *Glomus*-Arten dienten als Hauptargument zur Erneuerung der taxonomischen Struktur (Morton und Redecker 2001). Daneben waren lediglich das Vorhandensein einer spezifischen Fettsäure, wobei allerdings in der Untersuchung nur insgesamt fünf *Glomeromycota*-Arten untersucht wurden (Graham, Hodge und Morton 1995), und das schwache Färbeverhalten von Pilzstrukturen in Wurzeln gegenüber Trypan-Blau, Argumente für die Separation dieser Familien von den *Glomeraceae*. Mit der Arbeit von Morton und Redecker (2001) wurde auch die Gültigkeit der bis dahin gebräuchlichen morphologischen Merkmale zur Einteilung der Familien in Frage gestellt. So sind die Sporen und die Art ihrer Entwicklung bei den *Paraglomus*-Arten nicht von denen anderer *Glomus*-Arten zu unterscheiden. Bei den *Archaeosporaceae* wiederum finden sich dimorphe Arten, die bei der Sporenbildung Merkmale zeigen können, wie sie bis dahin ausschließlich den *Acaulosporaceae* zugerechnet wurden (sporenbildender Sacculus, siehe Tabelle 2 und Abbildungen 2 und 22). Sie bilden aber auch typische „*Glomus*“-Sporen.

#### **Die Familie *Archaeosporaceae* und *Ge. pyriformis***

Die Familie *Archaeosporaceae sensu* Morton und Redecker erscheint nach der 18S rDNA-Phylogenie als kein gültiges, monophyletisches Taxon. Die Analysen zeigen, dass *Ge. pyriformis* (*Geosiphonaceae*) ohne Zweifel einen gemeinsamen Ursprung mit den Arten der Familie *Archaeosporaceae* besitzt (Bootstrapwerte 99%-100% in beiden Stammbäumen), obwohl diese Tatsache im Protolog nicht berücksichtigt wurde (Morton und Redecker 2001, Redecker, Morton und Bruns 2000).

Dieses Ergebnis stellt die Eignung des morphologischen Charakters „Arbuskelbildung“ (Tabelle 2, synapomorphes Merkmal) als Grundlage zur Definition der *Glomeromycota*

(= *Glomales sensu* Morton und Benny) in Frage. Es ist zurzeit nicht möglich eine Aussage darüber zu machen, ob der intrazelluläre Arbuskel ein Merkmal ist, welches sich konvergent bei den *Glomeromycota* entwickelt hat und somit eine Homoplasie darstellt, oder ein symplesiomorpher Charakter vorliegt.

Zwar fehlt bisher der Beweis, dass *Ge. pyriformis* neben der Symbiose mit Cyanobakterien auch mit Pflanzen Symbiosen bildet und zur Arbuskelbildung fähig ist, dies kann jedoch nicht als Begründung zum Ausschluss dieser Art aus den *Glomeromycota* herangezogen werden, da der Nachweis von Arbuskeln auch bei einigen AM-Pilzen fehlt, die bisher nur aufgrund ihrer Sporenmorphologie dieser Gruppe zugerechnet werden (Walker 1992).

Will man zu einer natürlichen Familientaxonomie innerhalb der *Glomeromycota* kommen, dann ist das bestehende Konzept für die Familie *Archaeosporaceae sensu* Morton und Redecker mit der Gattung *Archaeospora* nach dem jetzigen Erkenntnisstand zu revidieren. Bisher liegt ein paraphyletisches Taxon vor, da die gültige Familie *Geosiphonaceae* eindeutig in diese Gruppe fällt.

Dies wäre durch eine neue Familienstruktur innerhalb der Ordnung *Archaeosporales* zu erreichen, welche aus drei taxonomischen Einheiten besteht: Die *Archaeosporaceae* mit der Gattung *Archaeospora* und der bisher einzigen Art *Ar. trappei*, die *Geosiphonaceae* mit *Ge. pyriformis*, und einer neu zu beschreibenden Familie mit einer neuen Gattung, welche die derzeit als *Ar. leptoticha* und *Ar. (A. ?) nicolsonii* beschriebenen Arten beinhaltet. Für diese Neuordnung bedarf es aber der Aufdeckung weiterer Merkmale, damit eine formale Beschreibung möglich ist.

### **Phylogenie der Gattung *Glomus***

Selbst nach der Abtrennung der beiden Familien *Archaeosporaceae* und *Paraglomeraceae* zeigen sich in unseren Analysen bei den AM-Pilzen, die bisher den *Glomeraceae* zugeordnet wurden, weitere Gruppierungen, die untereinander genetische Distanzen zeigen, welche vergleichbar sind zu denen der Familien *Acaulosporaceae* oder *Gigasporaceae*.

Mit den gefundenen Daten kann man die Gattung *Glomus sensu* Morton und Redecker in insgesamt vier weitere phylogenetische Gruppen aufteilen (GIGrA-D), um zu einem natürlichen System bezüglich der Familienstruktur der *Glomeromycota* zu kommen.

Während die beiden *Glomus*-Gruppen A und B sich zusammen von den restlichen AM-Pilz-Arten als monophyletische Einheit abgrenzen, und damit das ursprüngliche Familienkonzept für die Arten in dieser Abzweigung erhalten werden kann, besteht für die beiden monophyletischen Gruppen GIGrC und GIGrD die Notwendigkeit zur Aufstellung einer neuen taxonomischen Klassifizierung mit mutmaßlich zwei neuen Familien. Da dieses Konzept jedoch bisher ausschließlich auf der Analyse der 18S

rDNA-Sequenzen beruht, bedarf es weiterer morphologischer, biochemischer oder molekularbiologischer Daten, damit die Familien auch formal aufgestellt werden können.

#### Die *Glomus*-Gruppen A und B:

Bereits die ersten molekularen Studien zur AM-Pilz-Phylogenie, basierend auf der 18S rDNA, zeigten, dass ein *G. etunicatum*-Isolat unerwartet große genetische Distanzen zu anderen Pilzen der Familie *Glomeraceae* aufwies und eventuell verschiedenen Familien bestehen (Simon *et al.* 1993). Da in dieser Arbeit jedoch nur insgesamt zwölf AM-Pilzarten berücksichtigt wurden, kam es zu keiner formellen Veränderung der bestehenden Familienstruktur nach Morton und Benny (1990). Für das Isolat *G. etunicatum* UT316 konnte bereits bei einer früheren Analyse eines 550 bp 18S rDNA-Fragments in unserem Labor gezeigt werden, dass es zu einer eigenständigen Gruppe mit verschiedenen *Glomus*-Arten gehört, die als GIGrB bezeichnet wurde (Schüßler *et al.* 2001). Diese Gruppe war abgetrennt von den ebenfalls erkennbaren Zweigen der GIGrA und C. Eine genauere Auflösung zwischen den Gruppierungen war jedoch wegen der Kürze des untersuchten Fragments nicht möglich.

Mit den hier und in Schwarzott, Walker und Schüßler (2001) gezeigten Daten, die auf der Analyse des fast vollständigen 18S rRNA-Gens beruhen, ist nun eine bessere Auflösung der phylogenetischen Verhältnisse möglich. Dabei stellt sich die GIGrB als Schwestergruppe zur GIGrA dar, die den größten Teil der bisher untersuchten *Glomus*-Arten *sensu lato* umfasst. Die GIGrA kann weiter in zwei eindeutig voneinander getrennte Untergruppen aufgetrennt werden (GIGrAa und b). Eine dritte Untergruppe, GIGrAc, welche durch *G. sp.* 3347 repräsentiert wird, kann vermutet werden, ist aber nicht eindeutig abgesichert.

In GIGrA bilden alle untersuchten Sequenzen der *G. clarum*- / *manihotis*-Arten eine eigene Gruppe, wodurch die Vermutung unterstützt wird, dass es sich bei den Artnamen um Synonyme handelt. Die wirkliche Identität des Isolats *G. sp.* BR212, welches ursprünglich bei INVAM als *G. manihotis* / *clarum* geführt, konnte nicht geklärt werden, da das Isolat nicht mehr verfügbar ist und damit keine morphologische und molekularbiologische Nachuntersuchung mehr möglich war. Die eindeutige Abtrennung dieses Isolats von den anderen *G. clarum* / *manihotis* – Isolaten in den Analysen legt jedoch nahe, dass die ursprüngliche Zuordnung falsch war. Während sich in der GIGrA verschiedene Gruppen von Isolaten voneinander abgrenzen lassen, findet sich in GIGrB eine große Gruppe, die aus *G. lamellosum*-, *G. etunicatum*- und *G. clarioideum*-Isolaten besteht, die mit der 18S rDNA-Analyse nicht eindeutig voneinander unterschieden werden können. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass es sich auch hier um synonyme Beschreibungen handelt und die benutzten morphologischen

Merkmale keine phylogenetische Gültigkeit besitzen, zum anderen, dass sich diese Gruppe erst vor kürzerer Zeit phylogenetisch aufgetrennt hat und die Evolutionsrate der 18S rRNA zu gering ist, um die verwandtschaftlichen Beziehungen aufzulösen. Für eine Analyse auf Gattungsebene eignen sich dabei die schneller evolvierten ITS-Bereiche (Abbildung 23, Anhang), während die 18S rRNA vor allem verlässliche Information auf der Ebene von Ordnungen und Familien liefert (Ben Ali *et al.* 2001, Bruns, White und Taylor 1991, Gehrig *et al.* 2001, Olsen und Woese 1993, Soltis und Soltis 2000).

Dagegen ist die Phylogenie der beiden großen Gruppen GIGrA und B mit der angewandten Methode abgesichert, wenn man die gefundenen Distanzen mit denen der Familien der *Acaulosporaceae* beziehungsweise *Gigasporaceae* vergleicht. Um die Arten in diesen Gruppen in eine verbesserte natürliche Phylogenie einzuordnen, kann man aus den erzielten Ergebnissen die Errichtung einer weiteren Familie innerhalb der Ordnung *Glomerales* fordern. Dazu bedarf es jedoch der 18s rDNA-Sequenz des Belegexemplars für die Gattung *Glomus*, *G. microcarpum*. Trotz mehrerer Versuche, aus Herbarmaterial die 18S rDNA-Sequenz zu charakterisieren (siehe Tabelle 6), stellten sich alle bis zum Abschluss der Arbeit gewonnen 18S rDNA Fragmente als Basidio- oder Ascomyceten-Kontaminationen heraus. Auch der Versuch die Sequenz dieser Kontaminanten durch die Verwendung gruppenspezifischer Primer in der 2. PCR (nested PCR) auszuschließen (Gloma 1 und 2, Schüßler *et al.* 2001) führte zu keinem Erfolg. Weiterhin war kein Isolat in Kultur zur Verfügung, um eine erneute morphologische und molekularbiologische Klassifizierung der Typ-Art durchzuführen. Damit ist es zurzeit nicht möglich, Daten zur Aufstellung einer gesicherten Familientaxonomie für diese beiden *Glomus*-Gruppen zu erhalten.

#### Die *Glomus*-Gruppe C: „*Diversisporaceae*“ fam. ined.

Im Gegensatz zu den Gruppen A und B zeigt sich für die Gruppe C eine eindeutige Notwendigkeit für die Errichtung eines neuen taxonomischen Konzepts innerhalb der *Glomeromycota*-Familienstruktur. Die Arten in dieser Gruppe, *G. trimurales*, *G. fissuratum*, *G. spurcum*, *G. versiforme* und ein Pilz (W2423), welcher der Beschreibung von *G. etunicatum* entspricht, gehören nach der 18S rDNA-Phylogenie nicht zu den *Glomeraceae*. Diese Arten sollten damit eine neue Einordnung auf Gattungs-, Familien- und Ordnungsebene erfahren, wie es für die Arten der *Paraglomerales* und *Archaeosporales* durchgeführt wurde (Morton und Redecker 2001, Schüßler, Schwarzott und Walker 2001).

GIGrC repräsentiert eine Schwestergroupe zu den *Acaulosporaceae*. Während die statistische Unterstützung in der ersten veröffentlichten Analyse (Schwarzott, Walker und Schüßler 2001, siehe auch Abbildung 10) nur bei 66% in der Neighbour-Joining-

Analyse und 82% in der Maximum-Parsimony Analyse lag (Abbildung 10), findet die Gruppe in der mehr Arten umfassenden, zweiten Neighbour-Joining-Analyse (Abbildung 11) eine Unterstützung von 99%. Aber schon die bereits in der ersten Analyse unterstützte Zuordnung der Arten in den Zweig *Acaulosporaceae* / *Gigasporaceae* / GIGrC zeigte, dass die Gattung *Glomus* nicht monophyletisch ist. Die Bootstrapwerte liegen je nach Analyse zwischen 90 und 99% (Abbildung 10 und 11). Aus diesem Grund wurde die Errichtung einer neuen Familie, *Diversisporaceae* fam. ined., auf Basis der molekularen Daten vorgeschlagen.

Die molekularen Daten bieten bisher die einzige Möglichkeit, die Arten dieser Familie zuzuordnen. Die 18S rDNA zeigt dabei einige spezifische Sequenzmotive wie zum Beispiel GTGAGATGRRCTCTACCTTC (korrespondiert mit der homologen Position 677 von *Saccharomyces cerevisiae* J01353), die entsprechend der Beschreibung von *Paraglomus* (Morton und Redecker 2001) als Merkmal für die vorgeschlagene Familie genutzt werden können. Allerdings sind die Arten in dieser Gruppe morphologisch untereinander und zu *Acaulospora* so unterschiedlich, dass die gesicherte Einführung einer neuen Familie – wenn möglich - weiterer morphologischer, biochemischer oder molekularbiologischer Daten bedarf. Daher werden zurzeit morphologische Untersuchungen von Dr. C. Walker durchgeführt, damit eine formale Beschreibung der neuen Familie „*Diversisporaceae*“ und für die darin enthaltene neue Gattung, welche die Arten der GIGrC enthält, möglich wird.

#### Die *Glomus*-Gruppe D - eine weitere Familie innerhalb der *Diversisporales*?

Neben den „*Diversisporaceae*“, für deren Existenz schon seit längerem molekulare Daten sprachen (Schüßler *et al.* 2001) konnten in der Arbeit 18S rDNA Sequenzen charakterisiert werden, welche die Existenz einer weiteren Familie in der *Glomeromycota*-Phylogenie nachweisen und die These von Walker (1992) bezüglich Polyphilie innerhalb der Gattung *Glomus* unterstützen. Bereits in dieser Veröffentlichung wurde vermutet, dass *G. scintillans* aufgrund von morphologischen Merkmalen eher der Familie *Gigasporaceae* zugeordnet werden müsse, und nicht in die Definition von *Glomus* passe.

In den Jahren 2001 und 2002 konnten in der Nähe von Darmstadt („Griesheimer Sand“) zusammen mit Dr. C. Walker Sporen dieser Art in großer Menge isoliert werden. Neben den Sporen von diesem Standort (Belegexemplare: W3793, W3862, D1 Sample3) wurden zusätzlich Sequenzen von Sporen dieser Art aus einer Kultur in Polen (W3849) untersucht. Die phylogenetische Analyse ergab dabei eine eindeutige Zuordnung dieser Art zu der Ordnung *Diversisporales* mit 99% Bootstrap-Unterstützung und einen vermutlichen gemeinsamen Ursprung mit den *Gigasporaceae* (92% statistische Unterstützung). Hier finden sich wiederum genetische Distanzen,

welche die Errichtung einer neuen Familie und Gattung innerhalb der *Diversisporales* unterstützen. Aber auch für diese Art stehen bisher nur Sequenzmuster zur Unterscheidung von anderen Gruppen zur Verfügung, und abgesicherte morphologische Daten fehlen.

### **Die Familie Gigasporaceae**

Diese Familie mit den zwei Gattungen *Scutellospora* und *Gigaspora* wird auch in allen 18S rDNA-Analysen als monophyletisch bestätigt. In diesem Fall stimmen die molekularen Daten mit der Phylogenie nach Morton und Benny (1990) überein.

Die Familie ist besonders dadurch gekennzeichnet, dass die Sporen terminal an einer speziellen zwiebelartigen Zelle (bulbous cell) gebildet werden. Dieses Merkmal scheint einen Charakter darzustellen, der diese Gruppe sicher von vermutlich *Glomus*-ähnlichen Vorfahren abhebt (Morton 1990). Auch das Vorkommen der sogenannten Helferzellen (auxilliary cells) scheint ein gültiges Merkmal zur Abtrennung dieser Familie von den anderen AM-Pilzen zu sein, nicht jedoch zur Definition von Unterordnungen (siehe 3.2.3).

Zur Unterscheidung der beiden Gattungen in dieser Familie wurde angegeben (Morton 1990, Morton und Benny 1990), dass keine Autapomorphien bei *Gigaspora* vorliegen, die in der Gattung *Scutellospora* nicht auch zu finden sind. Dahingegen wird die Entwicklung eines Keimschildes (germination shield) und eine differenziertere Struktur bei der Entwicklung der Sporenwände als Hinweis gesehen, dass sich die Gattung *Scutellospora* von *Gigaspora* ableitet. Mit der vorliegenden 18s rDNA-Analyse kann keine derartige Hierarchie nachgewiesen oder bestätigt werden. Zwar bilden die untersuchten *Scutellospora* Arten vier abgesicherte Gruppen, die zu der Gruppe der *Gigaspora*-Arten vergleichbare genetische Distanzen zeigen, aber wo der Ursprung der einzelnen Zweige liegt kann bisher nicht sicher gesagt werden.

### **Die Familie Acaulosporaceae**

Wie die untersuchten Arten der *Gigasporaceae*, bilden alle 18S rDNA-Sequenzen der *Acaulosporaceae* eine geschlossene Gruppe und bestätigen damit die Monophylie dieses Taxons. Andererseits ist durch die Errichtung der phylogenetisch ursprünglicheren Familie *Archaeosporaceae* das definierende Hauptmerkmal für diese Gruppe: „Sporenbildung auf oder innerhalb des Halses eines spezialisierten, sporenbildenden Sacculus“, (Tabelle 2) als symplesiomorph anzusehen, und kann somit nicht zur Beschreibung des Taxons herangezogen werden.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb der Familie kann hier nicht weiter aufgeklärt werden. Die beiden *Entrophospora* Arten bilden einen Zweig mit den meisten der untersuchten *Acaulospora*-Arten, der einen Ursprung mit einer nicht

genauer beschriebenen Art, *A. sp.* W2423, bildet. Ob die Bildung der Spore innerhalb des Halses des sporenbildenden Sacculus ein ausreichendes Merkmal ist, um die Gattung *Entrophospora* von *Acaulospora* (Sporenbildung seitlich des Sacculushalses) abzuheben, bleibt zweifelhaft. Bemerkenswert ist, dass von der Typ-Art der Gattung *E. infrequens* bisher keine Einzelkulturen bekannt sind, sondern ein Auftreten immer nur in Kulturen beobachtet werden konnte, die auch andere AM-Pilze enthielten. Nach Aussage von C. Walker ist auch die Beschreibung der Gattung *Entrophospora* nach morphologischen Kriterien nicht abgesichert, da für die Typart *E. infrequens* kein eindeutiger Nachweis für Mykorrhizierung vorhanden ist. Damit stellt sich die Frage, ob es sich hier wirklich um eine eigenständige Gattung innerhalb der *Glomeromycota* handelt oder ob lediglich eine morphologische Variation von *Acaulospora* Arten vorliegt, die ihre Ursache zum Beispiel in einem Befall durch Mykoparasiten hat.

Während der Arbeit gelang es nicht, Sequenzen von *Entrophospora* Arten zu charakterisieren. Der größte Teil der erhaltenen Sequenzen stellte sich als Kontaminationen heraus, die von Basidio- oder Ascomyceten stammten. In zwei weiteren Fällen wurden Sequenzen gefunden, die anderen AM-Pilzfamilien zurechnen waren (siehe Tabelle 6 und 3.1). Dieses Resultat wurde auch bei der Analyse der großen ribosomalen Untereinheit (LSU) von *E. infrequens* beschrieben, und daraus der Schluss gezogen, dass *Entrophospora* ribosomale Gene verschiedener Linien der AM-Pilze enthält. (Rodriguez *et al.* 2001). Allerdings stammten die analysierten Sporen alle aus gemischten AM-Pilzkulturen, beziehungsweise von Freilandproben. Aus den Sporen wurden in der Arbeit von Rodriguez genau solche „Kontaminations“-Sequenzen isoliert, die mit Arten in den Kulturen korrelierten. Außerdem fanden sich auch Sequenzen, die zu den typischen Bodenpilzen der Gattung *Rhizopus* passten.

Die einfachste Erklärung für diese Ergebnisse, welche auch für die beiden gefundenen AM-Pilzsequenzen aus *Entrophospora*-Sporen in dieser Arbeit gilt, wäre an den Sporen anhaftende DNA, die bei der Isolation zur Kontamination geführt hat. Auch dass *E. infrequens*-Sporen keine typischen AM-Pilzsporen sind, sondern die Morphologie durch Befall mit einem Mykoparasiten entsteht, ist eine wahrscheinlichere Erklärung als das Vorkommen von Genen aus verschiedenen AM-Pilzgruppen. Diese Möglichkeit wurde auch bereits bei der Beschreibung für die Gattung *Entrophospora* diskutiert (Ames und Scheider 1979, Schüßler, Schwarzott und Walker 2003).

Eine weitere Untersuchung dieser beiden Gattungen auf 18S rDNA- und ITS-Ebene ist nötig, um eine Absicherung der phylogenetischen Beziehungen zwischen diesen Gruppen zu erhalten. Kürzlich konnte von C. Walker ein vermeintliches *Entrophospora infrequens*- Isolat aus einer Einzelsporenkultur gewonnen, aber bis zum Abschluss der Arbeit molekularbiologisch noch nicht genauer analysiert werden.

### 3.4 Entwicklung spezifischer Primer für die *Archaeosporales*

#### 3.4.1 Ergebnisse

Die phylogenetischen Ergebnisse, wie auch einige morphologische Daten (Schüßler *et al.* 1994, Schüßler *et al.* 1996), zeigen, dass der Pilz *Ge. pyriformis* den *Glomeromycota* zugeordnet werden kann. Ihm fehlt aber nach der morphologischen Charakterisierung der AM-Pilze das Merkmal „Bildung arbuskulärer Mykorrhizen“ und die Symbiose wird, soweit bekannt, nur mit Cyanobakterien gebildet. Darum wurde versucht, spezifische molekulare Sonden zu entwickeln, um das Vorkommen von *Ge. pyriformis* auch in Bryophyten oder höheren Pflanzen mittels PCR nachweisen zu können. Diese Versuche wurden in Kombination mit spezifischer Färbung von Hyphen (Chitinfärbung, 2.2.21) durchgeführt, um eine zusätzliche morphologische Analyse neben den molekularbiologischen Ergebnissen zu ermöglichen. Dazu wurden Primer aus dem Sequenzalignment für die phylogenetischen Untersuchungen abgeleitet, sowohl mit Spezifität für die Ordnung als auch mit Spezifität für die bisher einzige Art der Familie *Geosiphonaceae*, *Ge. pyriformis*.

Neben der Spezifität war ein zweites Kriterium bei der Entwicklung, mit den Sonden ein möglichst großes Fragment der 18S rDNA zu amplifizieren. Damit sollte es möglich werden, eventuell vorhandene Sequenzen von bisher noch nicht bekannten Isolaten aus diesen Gruppen (*Archaeosporales* beziehungsweise *Geosiphonaceae*), die bei der Anwendung der Primer an Freilandproben gefunden werden, auch phylogenetisch zu analysieren.

#### Vorgehensweise bei der Primerentwicklung

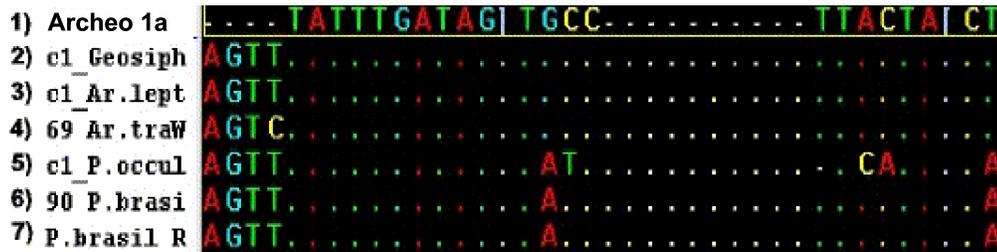
##### a) Ermittlung von spezifischen Sequenzmotiven

Zunächst wurden die Sequenzen im Alignment nach den phylogenetischen Gruppen sortiert und zwar derart, dass die Sequenzen, von denen die Primer abgeleitet werden sollten oben angeordnet sind. Anschließend kann man mit dem Alignment Programm im Menü Setup -> Display mit der Funktion „Equal with 1st as dots“ die Sequenzen so darstellen, dass alle mit der ersten Sequenz identischen Basen der weiter unten stehenden Motive durch Punkte ersetzt werden. Dadurch lassen sich auf einfache Weise variable Abschnitte der 18S rDNA finden, die zur Entwicklung der Sonden geeignet sind. Ein Beispiel dazu ist in Abbildung 13 gegeben.

Wichtig war bei der Auswahl auch, dass vor allem die 3'-Enden von Motiven ähnlicher Sequenzen abweichen, weil damit die Spezifität in der PCR erhöht wird. Zusätzlich

wurden die Sequenzmotive der Primer nach ihrer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) ausgewählt, der in einem möglichst schmalen Bereich liegen sollte, damit die Sonden untereinander in verschiedenen Kombinationen verwendet werden können.

Die danach ausgewählten Primermotive wurden anschließend auf komplementäre Rückfaltung (Hairpin-loops) überprüft.

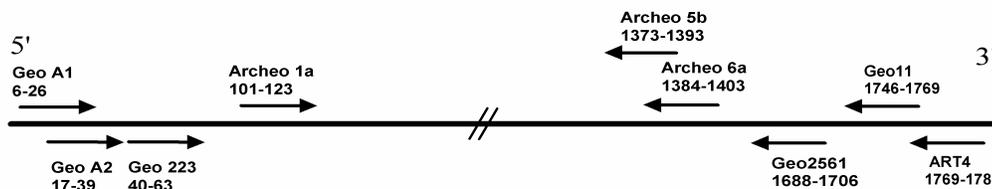


**Abbildung 13:** Motiv des Primers Archeo 1a. Alle Sequenzen der *Archaeosporales*-Gruppe (2. *Ge. pyriformis*-Konsensussequenz, 3. *Ar. leptoticha*-Konsensussequenz, 4. *Ar. trappei* 17634) sind an dieser Stelle identisch. Die Abweichung von diesem Motiv liegt in der Gruppe der *Paraglomerales* (hier 5. *P. occultum*-Konsensussequenz, *P. brasilianum* J301862 und *P. brasilianum* AJ012203) zwischen fünf Basen (*P. occultum*) und zwei Basen (*P. brasilianum*).

#### b) BLAST-Analyse der gefundenen Sequenzmotive

Mit den gefundenen Sequenzmotive wurde zur Absicherung der Spezifität noch zusätzlich ein BLAST Vergleich mit Sequenzen in Onlinedatenbanken durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Dadurch können zusätzliche Sequenzen, die nicht im Alignment vorkommen, beziehungsweise passende Motive anderer bekannter Gene, ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden auf diese Weise drei *Archaeosporales*-spezifische PCR-Primer (Archeo 1a, Archeo 5b, Archeo 6a) und zwei *Ge. pyriformis*-spezifische Primer (Geo 223 und Geo 2561) abgeleitet, die zunächst an klonierter 18S rDNA in der PCR getestet wurden (siehe Abbildung 14 und Tabelle 5).

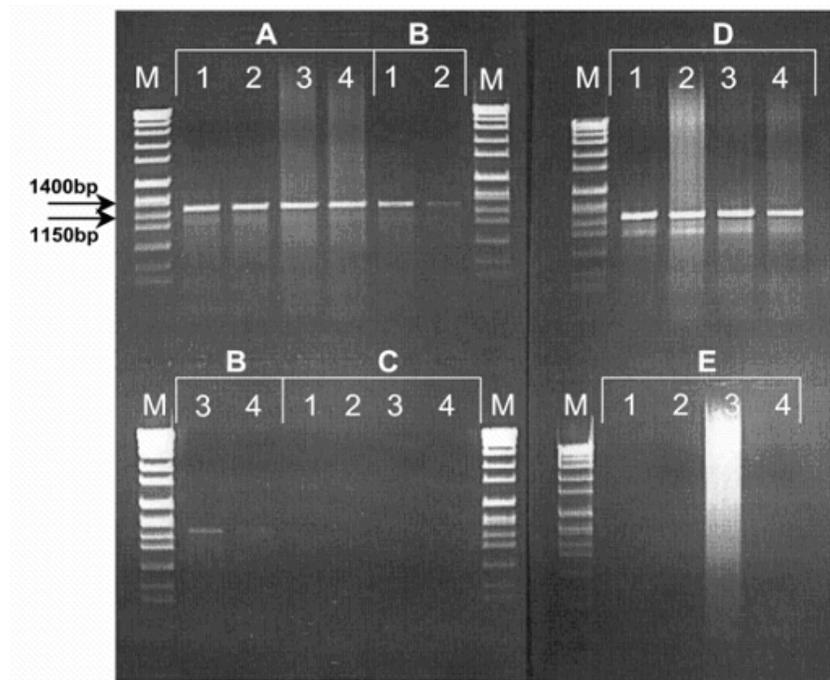


**Abbildung 14:** Lage der spezifischen *Archaeosporales* / *Geosiphonaceae* Primer. Neben den spezifischen Primern ist auch die Lage der universellen 18S rDNA-Primer GeoA1 / GeoA2 / Geo11 / ART4 angegeben. Die Lage der Primer auf der 18S rDNA ist jeweils unter dem Namen angegeben [bp] und bezieht sich auf die *S. cerevisiae*-Sequenz (J01353).

### Erprobung der Primer an klonierten Sequenzen

#### a) Primertest mit gereinigter DNA

Die abgeleiteten Primer wurden anschließend an klonierten Sequenzen auf ihre Spezifität hin überprüft. Dazu wurde DNA, die nach Punkt 2.2.16 aus Übernachtskulturen gewonnen wurde, als Template eingesetzt (0,5 ng, siehe auch Tabellen 13 und 15). Zur Ermittlung der optimalen Annaelingtemperatur kam ein Temperaturgradient während der Reaktion zum Einsatz. Als Beispiel ist in Abbildung 15 das Ergebnis mit der Primerkombination Archeo 1a / Archeo 6a angegeben.



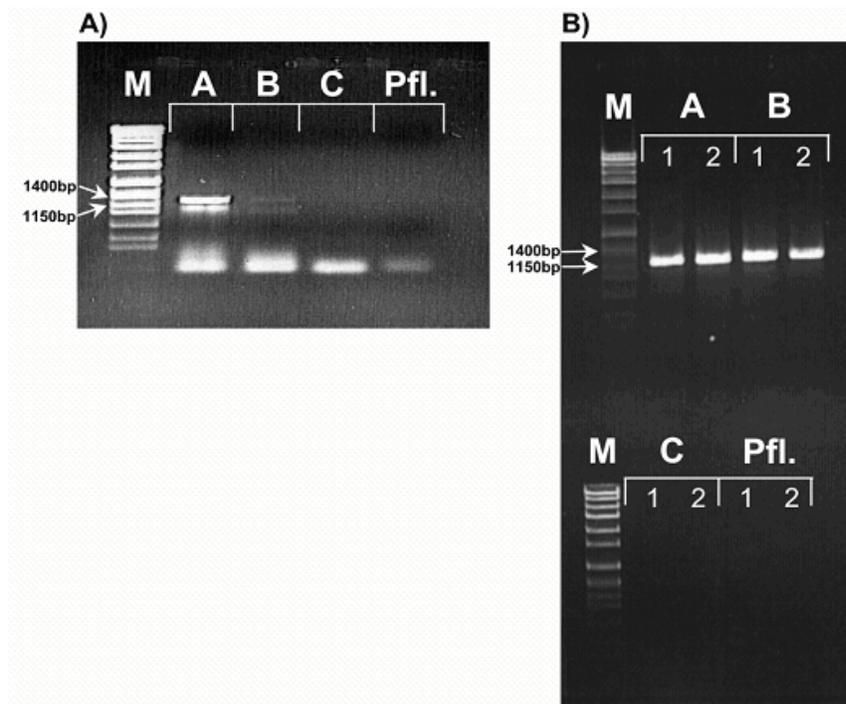
**Abbildung 15:** Test der Primer Archeo 1a / Archeo 6a. Als Template-DNA wurden verwendet: A) *Ar. trappei* aus Klon pWD103.3.8, B) *Ge. pyriformis* aus Klon pWD205.1.1, C) *P. brasilianum* aus Klon pWD178.1.1, D) *Ar. leptoticha* aus Klon pWD147.1.1 und E) *P. occultum* aus Klon pWD117.1.1. Als Annaelingtemperaturen wurden 1) 57,4°C; 2) 58,3°C; 3) 59,9°C und 4) 61,3°C gewählt. M = Marker 1. Die Markerbanden mit der Größe 1400bp und 1150bp sind exemplarisch an der ersten Gelbahn angezeigt (siehe auch Tabelle 4). 0,8% Agarosegel.

In Abbildung 15 ist gezeigt, dass die Primer Archeo 1a / Archeo 6a nur *Archaeo-sporales* Templatessequenzen in der PCR amplifizierten und beide Sequenzen der *Paraglomerales* (*P. brasilianum* und *P. occultum*) keine Reaktion zeigten. Als optimale Annaelingtemperatur, die auch in allen folgenden Versuchen benutzt wurde, konnte 58,3°C ermittelt werden, da hier *Ge. pyriformis* noch sicher amplifiziert wird. Zwar waren auch Produkte bei 59,9°C und 61,3°C sichtbar, da hier aber optimale

Bedingungen bezüglich der DNA-Reinheit und Konzentration vorlagen, wurde die niedrigere Annaelingtemperatur bei Versuchen mit Pflanzenmaterial angewendet.

b) Primertest mit aufgereinigter DNA und zusätzlicher, pflanzlicher DNA

Bei diesen Vorversuchen zur Spezifität wurde zusätzlich pflanzliche DNA in den PCR-Ansatz gegeben, die mit der Dynabeadsmethode aus 40 mg Wurzelmaterial isoliert wurde (siehe Punkt 2.2.3.2). Als Pflanze diente steril angezogene *Dactylis glomerata*. Von dieser Dynabeads-DNA-Isolation wurden 4 µl eingesetzt. Zunächst wurde eine geschachtelte PCR mit den universellen Primern durchgeführt (Tabellen 9, 10, 11 und 12) und aus diesen Ansätzen 1 µl in der Reaktion mit den spezifischen Primern eingesetzt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 16 A) und B) angegeben.



**Abbildung 16:** PCR mit *Archaeosporales* Primern und zugesetzter pflanzlicher DNA. A = *Ar. trappei* + pfl. DNA, B = *Ge. pyriformis* + pfl. DNA, C = *P. occultum* + pfl. DNA, Pfl. = nur DNA aus *Dactylis glomerata*. **A)** Archeo 1a / Archeo 6a,  $T_m=58,3^\circ\text{C}$ . **B)** Archeo 1a / Archeo 5b.  $T_m$ : 1=58,3°C, 2= 59,1°C. M = Marker 1. 0,8% Agarosegel.

Auch in den Versuchen mit zugesetzter DNA aus Pflanzen konnte die Spezifität der untersuchten Primer bestätigt werden. In allen Versuchen wurde die *Ge. pyriformis*-Sequenz mit der Archeo 1a / Archeo 6a Primerkombination weniger stark amplifiziert als die von *Ar. trappei* und *Ar. leptoticha*. Auch tritt noch eine unspezifische Bande auf, die etwas kleiner als die erwartete Bande von ~1,3 kbp ist (Abbildung 16A). Durch Einsatz des Primers Archeo 5b mit Archeo 1a in einer weiteren, nachfolgenden PCR

hat man jedoch die Möglichkeit, die Empfindlichkeit zu verbessern, und zusätzlich wird durch den Einsatz von Archeo 5b die Spezifität der PCR bezüglich der *Archaeosporales* noch weiter erhöht (siehe 2.2.5). Die Spezifität der beiden *Ge. pyriformis*-Primer wurde zusätzlich an *Geosiphon*-Blasen überprüft, die aus unsterilen Kulturen stammten. In diesen Kulturen trat häufig ein nicht näher bestimmter Pilz auf, womit die Möglichkeit gegeben war, die Primer auch gegen Pilze zu testen, die in Gegenwart von *Ge. pyriformis* existieren. Aus den unsterilen *Geosiphon*-Kulturen wurden dazu zwischen drei und fünf Blasen entnommen, ohne eine weitere Reinigung von Erde oder sonstigem anhängendem Material durchzuführen. Die DNA aus diesen Blasen wurde nach der Dynabeadsmethode isoliert und die 18S rDNA auch hier zunächst mit universellen Primern amplifiziert, wie sie auch für die Amplifikation aus Einzelsporen benutzt wurden. Von den Produkten aus der universellen PCR wurden 0,5 µl in der Reaktion mit den spezifischen Primern Geo223 und Geo2561 eingesetzt. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die amplifizierten Fragmente kloniert und der Ursprung der DNA von insgesamt acht Klonen durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde ausnahmslos 18S rDNA von *Ge. pyriformis* nachgewiesen.

### C) Identifikation der PCR-Fragmente mittels RFLP

Wie unter Punkt 2.2.14 beschrieben, kann mittels RFLP eine erste Identifikation amplifizierter Fragmente stattfinden, ohne dass zunächst eine Sequenzierung vorgenommen wird. In den Vorexperimenten mit spezifischen Primern konnte gezeigt werden, dass nur 18S rDNA der *Archaeosporales* mit den Primern Archeo 1a / Archeo 6a, beziehungsweise Archeo 1a / Archeo 5b, amplifiziert wird (Abbildung 15 und 16). Danach wurden die Sequenzen der Klone, die in diesen Vorversuche benutzt wurden mit dem Online-Analyseprogramm NEBcutter V1.0 der Firma New England Biolabs, Inc. (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) auf spezifische Restriktionsfragmentmuster untersucht. Dazu werden die Vollängensequenzen aus dem Alignment auf die von den speziellen Primern amplifizierte Fragmentlänge verkürzt. Die DNA-Abschnitte können dann Online nach Restriktionsschnittstellen von verschiedenen Restriktionsendonukleasen untersucht werden, wobei das Programm zu erwartende Fragmentmuster in Form einer Tabelle sowie einem virtuellen Gel anzeigt. Dies wurde mit den Daten der Klone pWD205.1.1 (*Ge. pyriformis*), pWD108.3.8 (*Ar. trappei*), pWD147.1.1 (*Ar. leptoticha*), pWD178.1.1 (*P. brasilianum*) und pWD117.1.1 (*P. occultum*) durchgeführt. Das Restriktionsenzyme *Hae* III erwies sich in der Analyse als geeignet, Bandenmuster zu generieren, welche die Unterscheidung der bekannten *Archaeosporales*-Sequenzen möglich machen. Das Ergebnis der Onlineanalyse ist in Tabelle 20 dargestellt. Die drei untersuchten Arten der *Archaeosporales* lassen sich danach

über das jeweils größte Fragment gut voneinander unterscheiden. Zum Vergleich ist zusätzlich das Muster für die nah verwandte *P. occultum*-Sequenz aufgeführt, die sich über die Bande der Größe 306 bp von den *Archaeosporales* sicher unterscheiden lässt. Gleiches gilt für *P. brasilianum*, wo die Sequenz eine typische Bande bei 305 bp zeigt.

**Tabelle 20:** Analyse von Restriktionsschnittstellen. In den einzelnen Tabellen zu den analysierten Sequenzen wird die zu erwartende Zahl an Fragmenten, deren Position auf der Sequenz und die entsprechende Länge angegeben. Durch Pfeile sind zur Identifikation geeignete Bandengrößen angegeben. A) *Ar. trappei* (pWD103.3.8), B) *Ge. pyriformis* (pWD205.1.1), C) *Ar. leptoticha* (pWD147.1.1) und E) *P. occultum* (pWD117.1.1)

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HaeIII-HaeIII	379-1171	793
2	(LeftEnd)-HaeIII	1-164	164
3	HaeIII-HaeIII	228-378	151
4	HaeIII-(RightEnd)	1172-1298	127
5	HaeIII-HaeIII	165-227	63

A) *Ar. trappei*

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HaeIII-HaeIII	539-1174	636
2	(LeftEnd)-HaeIII	1-163	163
3	HaeIII-HaeIII	379-538	160
4	HaeIII-HaeIII	228-378	151
5	HaeIII-(RightEnd)	1175-1301	127
6	HaeIII-HaeIII	164-227	64

B) *Ge. pyriformis*

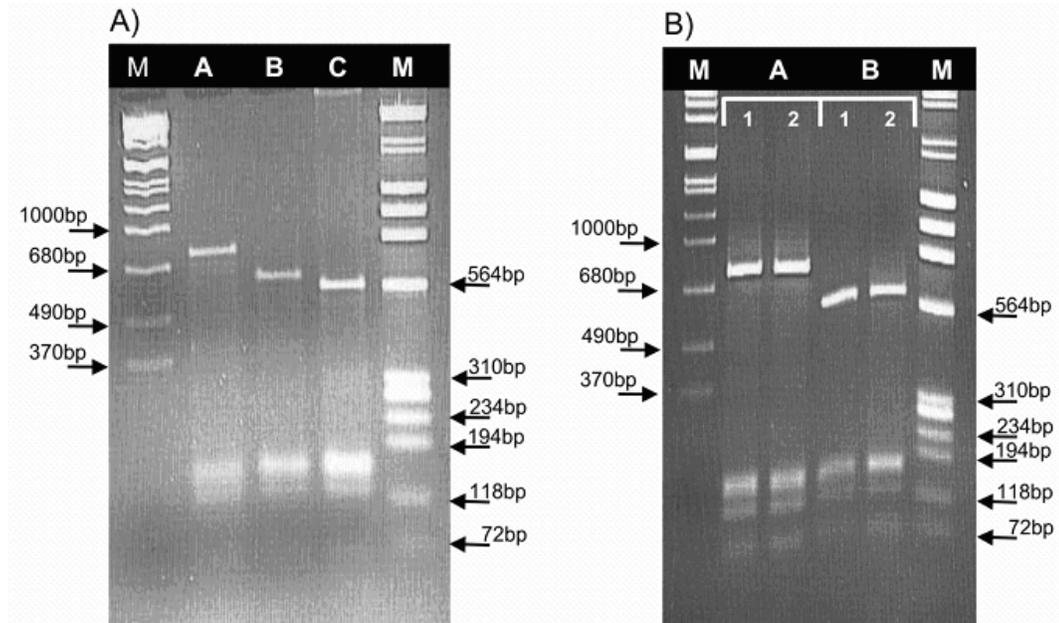
#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HaeIII-HaeIII	578-1169	592
2	(LeftEnd)-HaeIII	1-161	161
3	HaeIII-HaeIII	376-535	160
4	HaeIII-HaeIII	225-375	151
5	HaeIII-(RightEnd)	1170-1296	127
6	HaeIII-HaeIII	162-224	63
7	HaeIII-HaeIII	536-577	42

C) *Ar. leptoticha*

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	HaeIII-HaeIII	612-1165	554
2	HaeIII-HaeIII	223-528	306
3	(LeftEnd)-HaeIII	1-158	158
4	HaeIII-(RightEnd)	1166-1291	126
5	HaeIII-HaeIII	529-601	73
6	HaeIII-HaeIII	159-222	64
7	HaeIII-HaeIII	602-611	10

D) *P. occultum*

Zur Überprüfung der in Tabelle 20 gezeigten Analyse wurden die *Archaeosporales*-Sequenzen aus den Vorversuchen (Abbildung 15) mit *HaeIII* geschnitten und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Auf die gleiche Weise wurden auch die Banden, welche in dem Versuch mit zugesetzter pflanzlicher DNA und Archeo 1a / Archeo 5b auftraten (Abbildung 16 B) untersucht, und zur zusätzlichen Absicherung sequenziert.



**Abbildung 17:** Restriktion der *Archaeosporales*-Sequenzen mit *HaeIII*. **A)** Geschnittene DNA-Fragmente aus dem in Abbildung 15 dargestellten Versuch. **B)** Geschnittene DNA-Fragmente aus dem in Abbildung 16B dargestellten Versuch. A = *Ar. trappei*, B = *Ge. pyriformis*, C = *Ar. leptoticha*. M = Marker, jeweils links Marker 1, jeweils rechts Marker. 2% Agarosegel

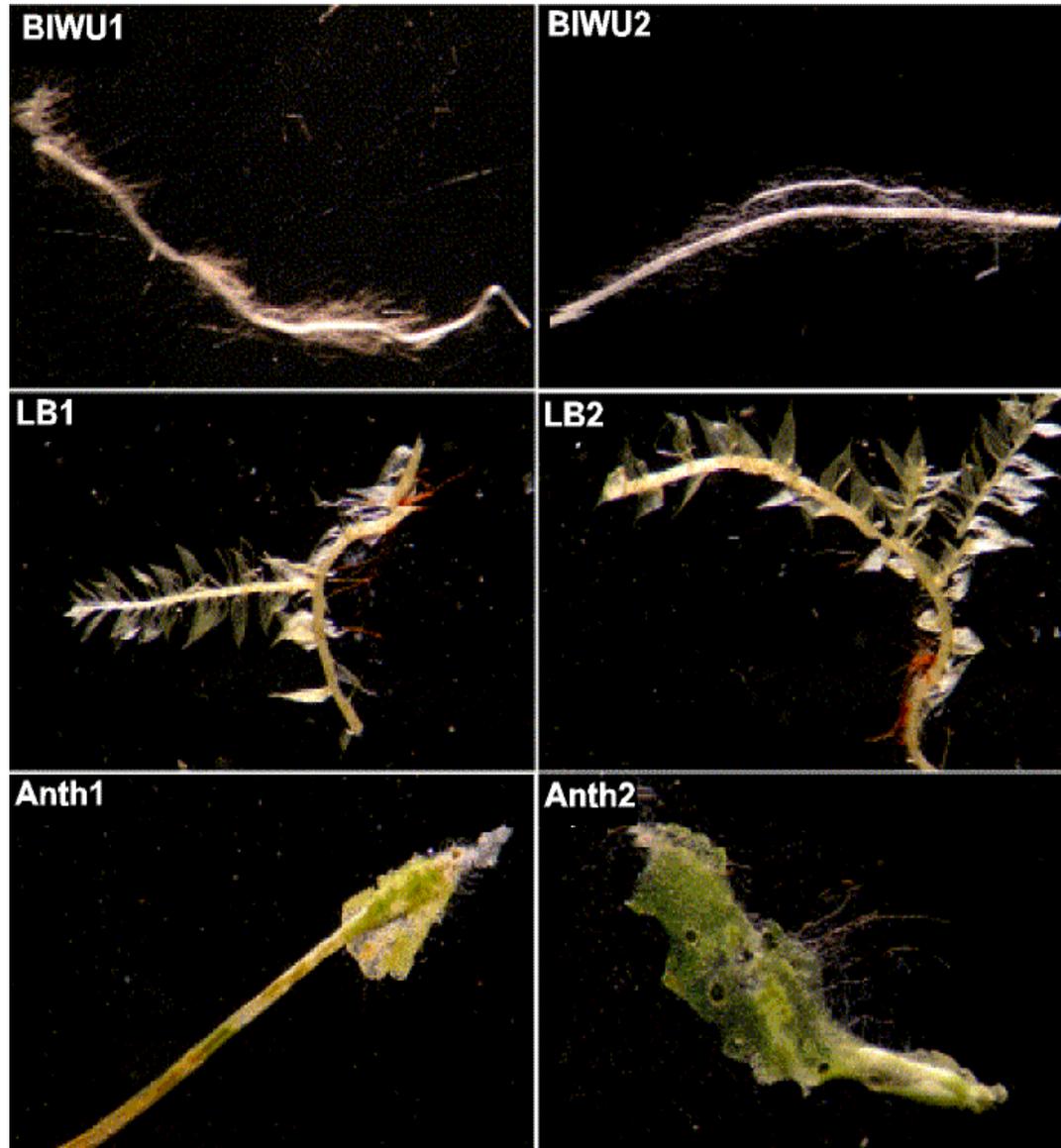
Auf dem Gel in Abbildung 17A können die drei *Archaeosporales* Sequenzen eindeutig über die großen Banden voneinander unterscheiden werden. Auch das Gel in Abbildung 17B zeigt ein Muster, dass mit Bild 17A und der in diesem Versuch eingesetzten Template-DNA übereinstimmt. Das Ergebnis aus Abbildung 17B wurde dabei auch in der anschließenden Sequenzierung bestätigt.

### **Anwendung der Primer bei Pflanzenmaterial vom *Geosiphon*-Fundort**

Nach den Tests der spezifischen Primer wurde versucht, das Vorkommen von *Ge. pyriformis* in Pflanzen vom natürlichen Standort des symbiotischen Konsortiums zu untersuchen. *Ge. pyriformis* kommt in der Natur in einer typischen Pflanzengemeinschaft, die vor allem durch Moose gekennzeichnet ist, vor. Die *Geosiphon*-Blasen sind

dabei in direkter Nachbarschaft mit dem Hornmoos *Anthoceros*, dem Lebermoos *Blasia* und dem Laubmoos *Dicranella* zu finden.

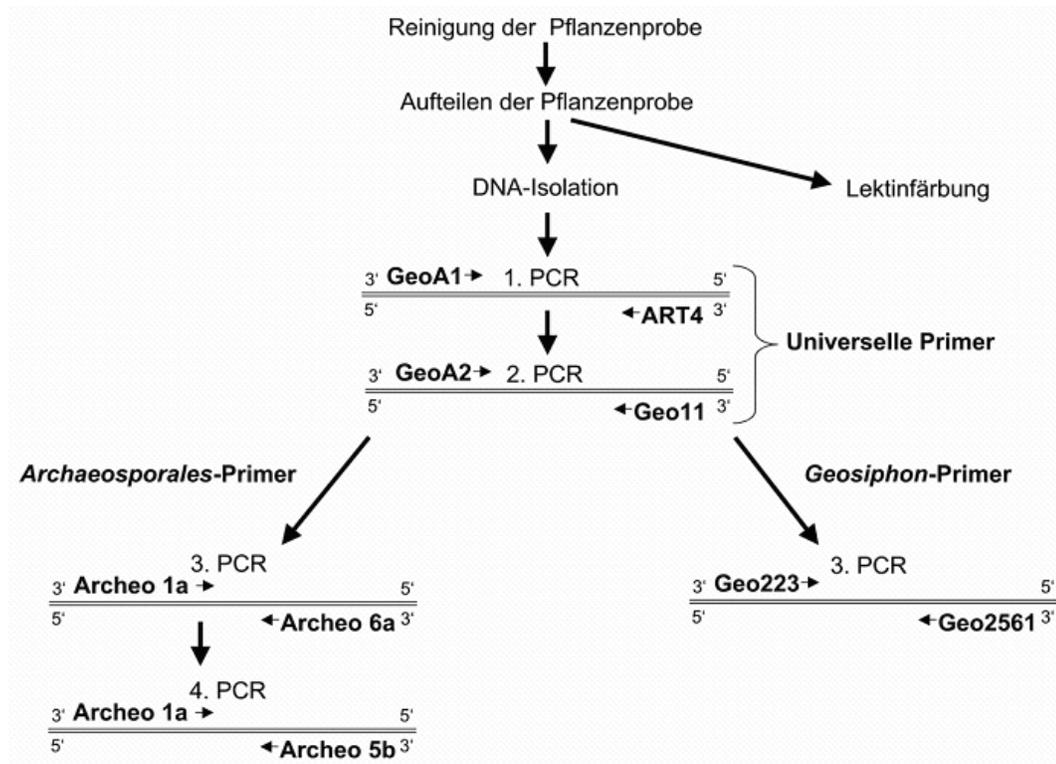
Von einer Erdscholle, die vom natürlichen Standort im Spessart stammte, wurden verschiedenen Pflanzenproben entnommen und entsprechend 2.2.3 gereinigt. Mit der DNA-Isolationsmethode nach Redecker (2000, siehe auch 2.2.3.1) wurde versucht das Pflanzengewebe in seiner Struktur so zu erhalten, dass anschließend mit einer Lektinfärbung ein zusätzlicher mikroskopischer Nachweis des Pilzes möglich ist (2.2.21).



**Abbildung 18:** Pflanzenproben vom *Geosiphon*-Standort. BIWU1 und BIWU2= Wurzelstücke von *Juncus bufonis*, LB1 und LB2 = nicht bestimmtes Laubmoos und Anth1 und Anth2 = *Anthoceros punctatus*. Aus diesen Proben wurde die DNA für die in Abbildung 19 und 20 dargestellten Experimente isoliert. Die Abbildungen sind nicht maßstabsgerecht.

Diese DNA-Isolationsmethode lieferte jedoch kein geeignetes Template für die PCR. Es wurde keine Amplifikation mit den universellen Primern GeoA1 / ART4 (1. PCR) und Geo A2 / Geo 11 (2. PCR) erzielt, die immer zuerst durchgeführt wurde, um die Menge an 18S rDNA für die Reaktionen mit spezifischen Primern zu erhöhen. Dabei wurden zwischen 1 und 4 µl des 1:10 beziehungsweise 1:100 verdünnten Extraktes eingesetzt. Auch die sich anschließenden PCR-Ansätze mit spezifischen Primern, bei denen jeweils 1 µl der 2. PCR eingesetzt wurde, zeigten in keiner Primerkombination ein Produkt. Damit war es nicht möglich, einen gleichzeitigen Nachweis von Pilzmaterial mittels PCR und Färbung an einem Pflanzenstück vorzunehmen.

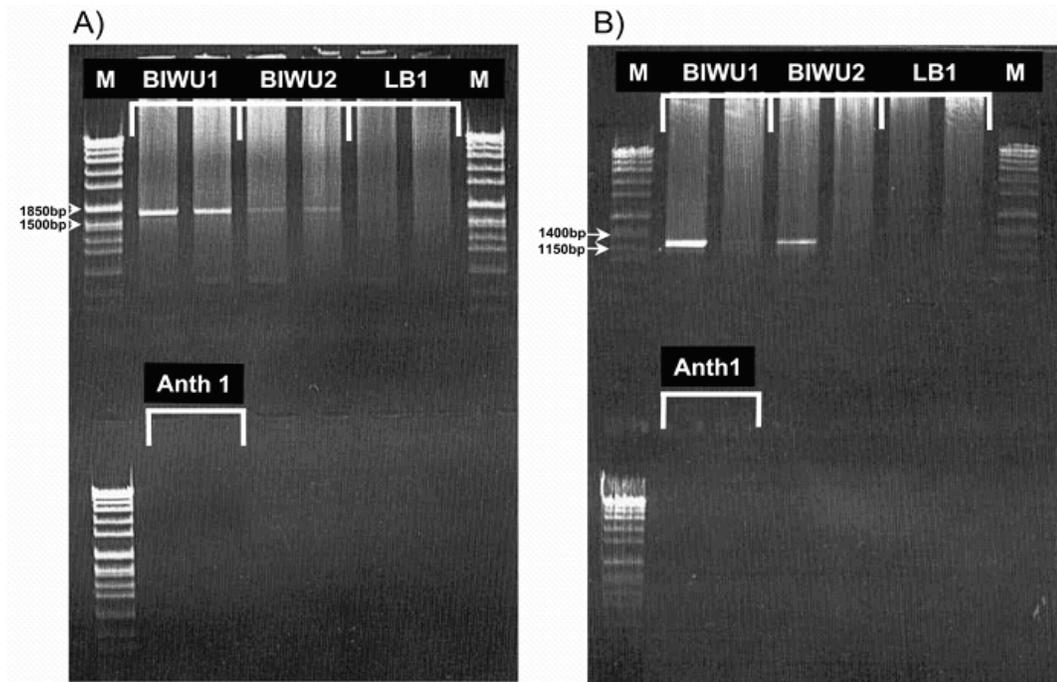
Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen die DNA Isolationmethode mit Dynabeads (2.2.3.2) benutzt, die Pflanzenstücke nach dem Reinigen mittels Skalpell geteilt und eine Hälfte in der Lektinfärbung eingesetzt. Ein Schema der Vorgehensweise ist in Abbildung 19 gezeigt.



**Abbildung 19:** Nachweis von *Archaeosporales*-Arten / *Ge. pyriformis* in Pflanzen mittels nested-PCR und Lektinfärbung. Diese Vorgehensweise wurde bei der DNA-Isolation mit Dynabeads angewandt. Die Lage der Primer auf dem 18S rRNA Gen ist Abbildung 14 zu entnehmen.

In Abbildung 20A ist das Ergebnis der 2. PCR mit den universellen 18S Primern Geo A2 / Geo11 gezeigt. Auch hier konnte eine sichtbare Amplifikation der 18S rDNA nicht in allen Fällen erreicht werden. Trotzdem wurden von allen Ansätzen 0,5 µl in der folgenden PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Die Ansätze mit Geo223 und

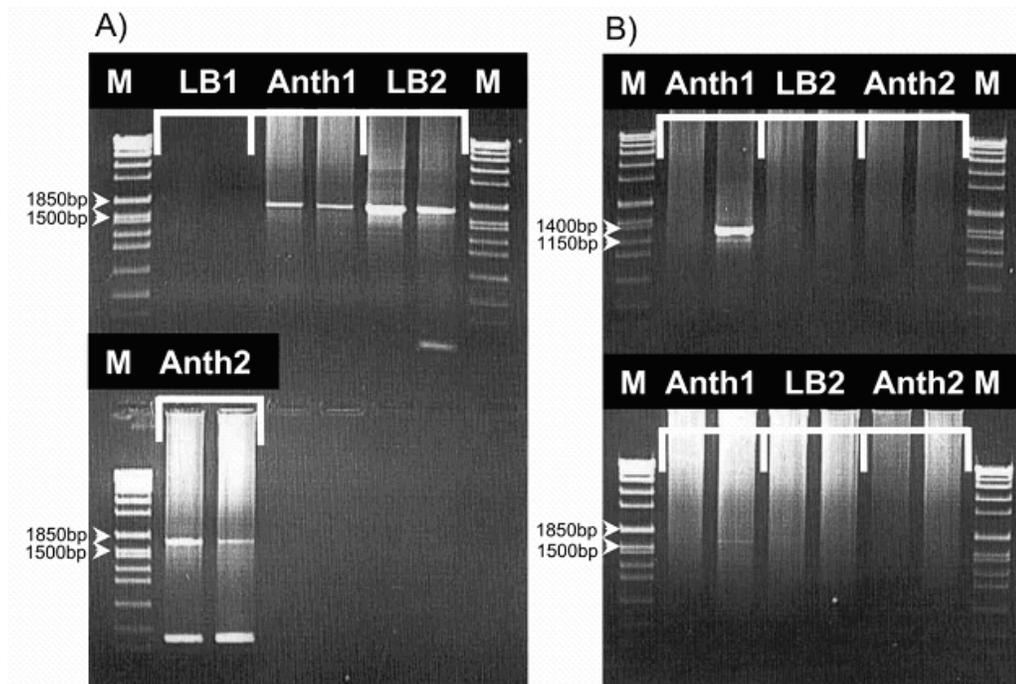
Geo2561 zeigten keine Ergebnisse (ohne Abbildung). Mit der Primerkombination Archeo 1a und Archeo 6a konnte jedoch bei den Proben, die aus den beiden Wurzelstücken von *Juncus bufonis* (BIWU1 und 2) stammten, DNA-Fragmente amplifiziert werden. Beide Produkte wurden kloniert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Alle untersuchten Klone zeigten dabei identische Bandenmuster und bei jeweils vier Klonen der beiden Klonierungen wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Alle acht Sequenzen zeigten im BLASTsearch, dass sie von *Ge. pyriformis* stammten und stimmten über die gesamte Sequenz mit bereits vorhandenen Daten in unserem Alignment überein.



**Abbildung 20:** PCR-Experiment mit Pflanzenproben vom *Geosiphon*-Standort (siehe Abbildung 18). **A)** zeigt das Ergebnis der 2. PCR mit universellen Primern (GeoA2 / Geo11). **B)** zeigt das PCR-Ergebnis mit den Primern Archeo 1a / Archeo 6a. Von jeder DNA-Extraktion wurden jeweils zwei Reaktionen durchgeführt. M = Marker 1. 0,8% Agarosegel.

Das Experiment wurde mit weiteren Pflanzenproben wiederholt. Dabei wurden zwei neue DNA-Isolationen von *Anthoceros* (Anth2) sowie des Laubmooses (LB2) durchgeführt und zusätzlich je zwei erneute Ansätze aus den Isolationen Isolationen BIWU1 und LB1 in der PCR eingesetzt. LB1 zeigte in der PCR mit universellen 18S Primern keinerlei Produkt und wurde bei den Reaktionen mit spezifischen Primern ausgeschlossen (Abbildung 21 A). Mit den drei positiven Proben wurden Experimente mit den *Geosiphon*-spezifischen Primern und den *Archaeosporales*-Primern Archeo 1a / Archeo 6a durchgeführt. In diesem Fall zeigte die Probe Anth1, die im ersten Experiment keine Reaktion ergab, in jeweils einem Ansatz bei beiden Primerpaaren

positive Reaktionen mit DNA-Fragmenten der entsprechenden Größe (Abbildung 21 B). Beide DNA-Banden wurden kloniert und jeweils zwei Klone sequenziert. Auch hier ergaben die analysierten Sequenzen eine eindeutige Zuordnung zu *Ge. pyriformis*. Die vom zweiten Stück der Pflanzenproben angelegten Chitinfärbungen zeigten jedoch bei der Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie, dass neben dem Vorkommen von Hyphen innerhalb der Pflanzen trotz Reinigung mit Natriumpyrophosphat und Ultraschall in allen Fällen Pilzmaterial außen an den Proben anhaftete. Damit ist nicht gesichert, ob die amplifizierte 18S rDNA von *Ge. pyriformis* tatsächlich aus den Pflanzen extrahiert wurde oder anhaftendes Material für die positiven Ergebnisse verantwortlich ist.



**Abbildung 21:** PCR Experiment mit Pflanzenproben vom *Geosiphon*-Standort (siehe Abbildung 18). **A)** zeigt das Ergebnis der 2. PCR mit universellen Primern (GeoA2 / Geo11). **B)** zeigt in der oberen Reihe das Ergebnis der PCR mit den Primern Archeo 1a / 6a und in der unteren Reihe das mit den Primern Geo223 / Geo2561. Von jeder DNA-Extraktion wurden jeweils zwei Reaktionen durchgeführt. M = Marker 1. 0,8% Agarosegel.

Das Ergebnis aus der Lektinfärbung konnte nicht fotografisch dokumentiert werden, da die digitalen Bilder bei einem technischen Defekt zerstört wurden und die Proben bereits so ausgebleicht waren, dass keine neuen Bilder angefertigt werden konnten.

### 3.4.2 Diskussion

Der Nachweis von nicht kultivierbaren, beziehungsweise morphologisch schwer unterscheidbaren Organismen wurde in den vergangenen 15 Jahren zunehmend mit Hilfe molekularer Sonden und PCR Methoden durchgeführt. Der Nachweis mittels PCR wird

dabei in vielen Fällen mit Methoden kombiniert, bei denen ein spezifischer Nachweis ohne Sequenzierung des amplifizierten Fragments möglich ist, wie zum Beispiel Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP) oder Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (SSCP) (Kjoller und Rosendahl 2000, Kowalchuk, De Souza und Van Veen 2002, Renker *et al.* 2003, Van Elsas *et al.* 2000). Eine der neuesten Entwicklungen ist der Nachweis mittels Real Time PCR, bei der durch Kombination von spezifischen Primern und Fluoreszenzfarbstoffen das Vorkommen bestimmter Sequenzen direkt während der PCR nachgewiesen werden kann (Filion, St-Arnaud und Jabaji-Hare 2003).

Bei den AM-Pilzen werden diese molekularbiologische Ansätze seit der Veröffentlichung der ersten rDNA Sequenzen auf verschiedenen taxonomischen Ebenen verfolgt und versucht, auf diesem Weg Zusammenhänge mit morphologischen, ökologischen und physiologischen Daten herzustellen (Chelius und Triplett 1999, Di Bonito, Elliott und Jardin 1995, Helgason *et al.* 1998, Helgason, Fitter und Young 1999, Sanders, Clapp und Wiemken 1996, Simon, Lalonde und Bruns 1992).

Dabei wurden Sonden für verschiedene taxonomische Ebenen der AM-Pilze eingesetzt, von denen bei einigen mittlerweile bekannt ist, dass sie nicht die gewünschte Spezifität besitzen, da zum Zeitpunkt ihrer Entwicklung zu wenig Sequenzdaten verfügbar waren. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der Primer VANS1 (Simon, Lalonde und Bruns 1992), der für die *Glomeromycota* spezifisch sein sollten, nur für eine kleine Gruppe dieser Pilze anwendbar ist und damit nicht alle Arten von AM-Pilzen in Diversitätsstudien nachgewiesen werden können. Auch der häufig in Diversitätsstudien genutzte Primer AM1 schließt nach seiner Sequenz gerade die ursprünglicheren Gruppen der *Glomeromycota* aus (Schüßler *et al.* 2001).

Mittlerweile wird vermehrt der Ansatz verfolgt, Primer auf niederen taxonomischen Ebenen, wie Ordnungen oder Familien zu entwickeln, und dann in Diversitätsstudien verschiedene Kombinationen dieser Primer einzusetzen (Redecker 2000). Mit diesen Primern ist es zum einen möglich, die Gefahr von Kontaminationen durch nicht-AM-Pilze zu reduzieren, und gleichzeitig neue Sequenztypen zu finden, die auf bisher unbekannte Arten Hinweis geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Primer für die Ordnung *Archaeosporales* und für die Familie *Geosiphonaceae* auf Basis einer vorangegangenen, umfangreichen phylogenetischen Analyse der 18S rDNA entwickelt. Ihre Spezifität konnte in Vorversuchen an Sequenzen von passenden und nahe verwandten Arten überprüft werden, die bei den phylogenetischen Analysen der rDNA erhalten wurden. Auch gegenüber zugesetzte pflanzliche DNA wirkten die Primer diskriminierend. Dieses artifizielle Vorgehen bezüglich der pflanzlichen DNA sollte zusätzlich an Wurzelmaterial getestet werden, welches mit den entsprechenden Pilzarten inokuliert wurde, da die

Verhältnisse zwischen pflanzlicher und pilzlicher DNA sowie PCR-inhibierende Komponenten einen Einfluss auf den Erfolg der PCR haben. Die Zusammensetzung und Qualität der Template-DNA kann zum Beispiel eine Rolle bei der Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur (höhere oder niedrigere Stringenz der Reaktion) und der benötigten PCR-Zyklen spielen. Bei den Versuchen an Pflanzen vom *Geosiphon*-Standort wurden keine unerwünschten Sequenzen amplifiziert, aber auch nur *Ge. pyriformis* nachgewiesen. Durch Versuche mit Wurzeln, die mit verschiedenen *Archaeospora*-Arten besiedelt sind, müsste zusätzlich überprüft werden, ob Sequenzen bestimmter Arten aus dieser Gruppe bevorzugt amplifiziert werden, was der Absicherung von Ergebnisse bei der Anwendung im Feldversuch dient. Damit wäre es dann möglich, das gemeinsame Vorkommen der Arten aus dieser Gruppe im Freiland zu untersuchen, neue Arten nachzuweisen, und Rückschlüsse auf deren Ökologie sowie Verbreitung zu ziehen.

Als hilfreiche Methode zur Unterscheidung der Sequenzen hat sich die Anwendung von RFLPs erwiesen. Durch die Selektion mittels spezifischer Primer wird von vorneherein ein Teil der möglichen Kontaminationen ausgeschlossen, so dass ein schnellerer Vergleich mit bekannten Mustern möglich ist. Der Einsatz spezifischer Primer in Kombination mit dem RFLP erlaubte eine eindeutige Unterscheidung der bisher bekannten Arten aus der Gruppe der *Archaeosporales* und ermöglicht damit eine Identifizierung ohne aufwendige Sequenzierung.

Für das ursprüngliche Ziel, *Ge. pyriformis* in Pflanzen nachzuweisen, zeigte sich, dass dies von der Primerspezifität her möglich ist. Wurden in der PCR mit DNA von Pflanzenproben Produkte erhalten, stammten diese ausschließlich von *Ge. pyriformis*, was durch Datenbankabgleich bestätigt wurde. Allerdings bestehen methodische Probleme bezüglich der Frage, ob *Ge. pyriformis* innerhalb der Pflanzengewebe vorkommt. Dies gilt vor allem für die Reinigung der verwendeten Gewebe. Hier besteht die Gefahr, dass die Ultraschallbehandlungen und das Waschen mit Natriumpyrophosphat gewebezerstörend wirken, was sich beim Nachweis von Pilzstrukturen in Pflanzenproben mittels Lektinfärbung nachteilig auswirkt. Auch gelang es bisher nicht, außen anhaftendes Pilzmyzel sicher zu entfernen. An allen gefärbten Pflanzenstücken, die entsprechend der Proben gereinigt wurden, welche der DNA-Gewinnung dienten, konnte Pilzmaterial auch an der Oberfläche der Gewebe gefunden werden. Damit ist nicht ausgeschlossen, dass der Nachweis von *Ge. pyriformis* bei *Juncus bufonius* und *Anthoceros punctatus* aufgrund von außen anhaftendem Pilzmaterial positiv ausfiel. Auch der Ansatz, die Pflanzenproben gleichzeitig zur DNA-Extraktion und zum Nachweis von Pilzstrukturen mittels Lektinfärbung nutzen zu können, war nicht erfolgreich. Mit dieser Methode wurden gerade sehr weiche Gewebe, wie die von *Anthoceros punctatus*, bei der Extraktion mit erhitzter NaOH stark zerstört, während

gleichzeitig nicht genügend Template für die PCR gewonnen werden konnte. Diese Methoden bedürfen damit weiterer Optimierung.

Aufgrund der gemachten Erfahrung besteht grundsätzlicher Zweifel, in wie weit der Nachweis von AM-Pilzen in Wurzeln mittels PCR die wirkliche Besiedelung wiedergibt. Mit dem Einsatz dieser Technik sollen die Probleme umgangen werden, die beim morphologischen Nachweis über Sporenvorkommen auftreten, da diese temporär auftreten und nicht in jedem Fall die aktuelle Besiedelung von Wurzeln wiedergeben. Auch der Nachweis von AM-Pilzen über angefärbte Wurzeln, der maximal bis zur Familienebene möglich ist, ist für Diversitätsstudien nicht zufriedenstellend und sollte mittels PCR-Nachweis besser abgesichert werden. Allerdings werden in den meisten solcher Arbeiten keine oder nur sehr einfache Reinigungsschritte für das Wurzelmaterial, wie Waschen mit destilliertem Wasser, angegeben (Chelius und Triplett 1999, Kjoller und Rosendahl 1999, Turnau *et al.* 2001) und das Hauptaugenmerk auf das Funktionieren der molekularen Sonden gelegt. Lediglich bei Kowalchuk, De Souza und Van Veen (2002) wurde die auch in dieser Arbeit benutzte Reinigung von Wurzeln mittels Natriumpyrophosphat angewandt. Wie sich gezeigt hat, scheint auch diese oxidative Reinigung keine vollständige Sicherheit bei der Entfernung anhaftender Kontaminationen zu gewährleisten. Dies sollte bei allen Aussagen zum Nachweis von AM-Pilz-Diversität in Wurzeln berücksichtigt werden. Ein Ansatz, dieses Problem zu umgehen, wäre zum Beispiel der Einsatz der bestehenden molekularen Sonden bei Techniken wie *in situ*-Hybridisierung oder *in situ*-PCR, bei denen ein direkter Nachweis innerhalb des untersuchten Gewebes möglich ist. Bei beiden Methoden ist jedoch die Zugänglichkeit der untersuchten Gewebe für die Sonden von großer Bedeutung, ohne dabei die Gewebemorphologie zu zerstören. Das gleichzeitige Vorkommen von pflanzlicher wie pilzlicher Gewebe bedarf dabei sehr wahrscheinlich umfangreicher Optimierungsschritte (Sterflinger, Krumbein und Schwirtz 1998) und ist bisher bei den AM-Pilzen lediglich an isolierten Sporen angewendet worden (Bago, Piché und Simon 1998). Die in dieser Arbeit entwickelten Primer könnten dabei als Grundlage für solche Experimente dienen.

### 3.5 Abschließende Diskussion

Die vorliegende Arbeit und die daraus entstandenen Veröffentlichungen stellen die bisher umfangreichste Untersuchung zur Phylogenie der AM-Pilze auf molekularbiologischer Ebene dar. Insgesamt konnten mit der hier beschriebenen Methode zur Extraktion und Amplifikation von 18S rDNA aus Einzelsporen die entsprechenden Sequenzen von 63 beschriebenen AM-Pilzarten analysiert werden. Zusätzlich wurden die Sequenzen von 7 unbeschriebenen Arten charakterisiert. Dies entspricht >40%

aller bekannten AM-Pilzarten. Da von allen untersuchten Sporen Belegexemplare angelegt wurden, ist es möglich, die Ergebnisse aus den phylogenetischen Analysen mit morphologischen Merkmalen in Beziehung zu setzen. Dies ermöglicht die Reevaluation des bisherigen taxo-nomischen Systems, welches hauptsächlich auf morphologischen Merkmalen basiert und nach den bisherigen molekularbiologischen Daten nicht die natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse der *Glomeromycota* wiedergibt. Diese Annäherung an ein natürliches System ermöglicht es weiter, Daten aus physiologischen, ökologischen und molekularbiologischen Untersuchungen miteinander in Beziehung zu setzen, und damit neben der reinen Systematik auch evolutionsbiologische Fragen aufzuklären.

Aus der hier vorliegenden Arbeit resultierte, dass die AM-Pilze ein eigenes Phylum neben den *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* und *Ascomycota* repräsentieren. Damit wird die willkürliche Zuordnung zu den *Zygomycota* aufgrund zweifelhafter Daten zur Sporenbildung aufgelöst, und es ergibt sich ein wahrscheinlicher gemeinsamer Ursprung mit den höheren Pilzen der Phyla *Asco-* und *Basidio-**mycota*. Auch das Merkmal Arbuskelbildung scheint kein geeignetes Mittel zur taxo-nomischen Zusammenfassung dieser Pilze zu sein, da *Ge. pyriformis* eindeutig einer, wenn auch vermutlich ursprüngliche, Gruppe der AM-Pilze (*Archaeosporales*) zuzuordnen ist. Dieses Ergebnis liefert neue Daten zur Interpretation der Besiedlung des Landes durch Pflanzen, da symbiotische Beziehungen zwischen Pilzen dieser Gruppe und photoautotrophen Organismen nicht auf Pflanzen beschränkt sind, sondern auch mit Cyanobakterien eingegangen werden können, die entwicklungsgeschichtlich älter sind (Hoehler, Bebout und Des Marais 2001, Pirozynski und Malloch 1975, Schüßler und Kluge 2001).

Die Frage, ob die AM eine konvergente Entwicklung von verschiedenen Pilzlinien darstellt (Morton 2000) konnte verneint werden, da in der molekularen Phylogenie alle untersuchten Pilze, die das Merkmal Arbuskelbildung zeigten, einer monophyletischen Einheit zu zuordnen sind. Die bisherige Unterteilung der AM-Pilze in die Unterordnungen *Glomineae* und *Gigasporineae* und deren vermutliche getrennte Entstehung ist hier nicht nachzuvollziehen und die Gültigkeit der zur Definition benutzten morphologischen Merkmale zweifelhaft.

Aus der Beschreibung eines neuen Phylums für die bisher zur Ordnung *Glomerales* (= *Glomales*) gezählten AM-Pilzen und *Ge. pyriformis* ergab sich die Aufstellung dreier neuer Ordnungen. Die ursprüngliche Ordnung *Glomerales* bleibt erhalten und umfasst den größten Teil der bisher beschriebenen *Glomeromycota*-Arten. Daneben bestehen die Ordnungen *Paraglomerales* und *Archaeosporales*, welche ursprüngliche Linien repräsentieren, und die Ordnung *Diversisporales*. Die taxonomischen Einheiten Phylum und Ordnungen wurden nach dem Internationalen Code für botanische

Nomenklatur (Greuter *et al.* 2000) formal beschrieben und veröffentlicht (Schüßler, Schwarzott und Walker 2001).

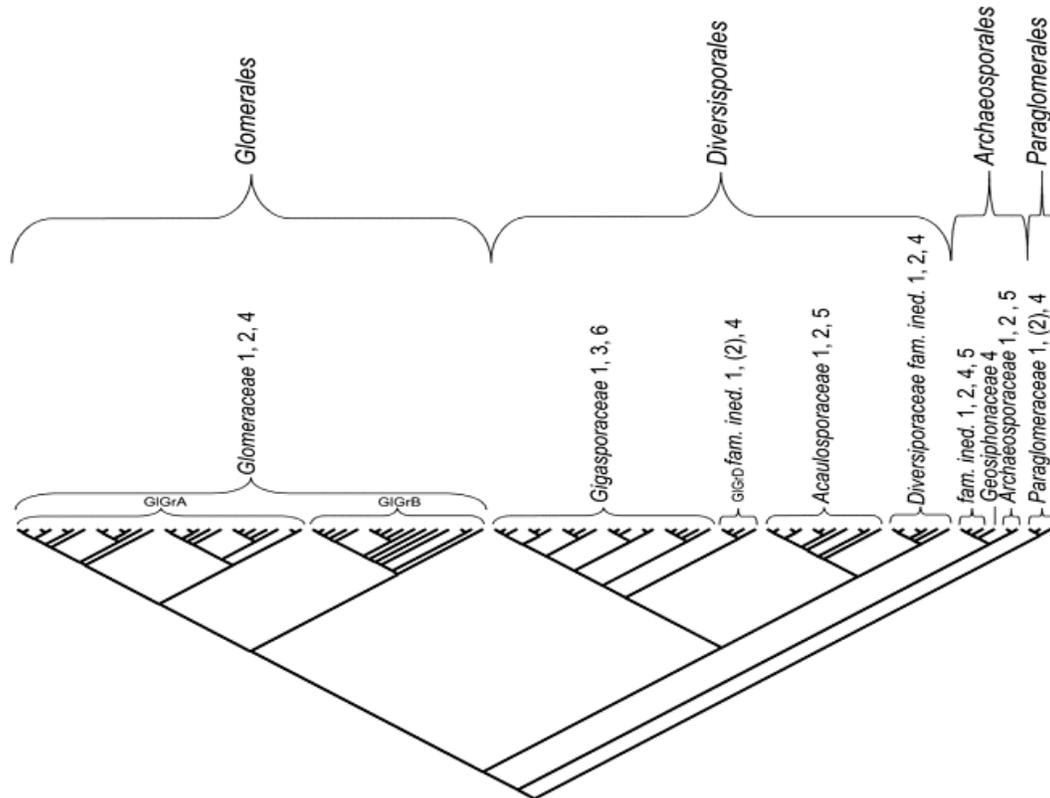
Aus der molekularbiologischen Untersuchung der Gattung *Glomus* ergab sich, dass diese Gruppe nicht monophyletisch ist. Die untersuchten Pilze aus dieser Gattung bildeten insgesamt mindestens vier voneinander getrennte Gruppen (*Glomus* A-D), die genetische Distanzen zueinander zeigen, wie sie auch zwischen den nicht nur morphologisch, sondern auch molekularbiologisch abgesicherten Familien *Acaulosporaceae* und *Gigasporaceae* bestehen. Die beiden *Glomus*-Gruppen A und B sind Schwestergruppen und es ist zunächst keine neue Beschreibung einer neuen Familie nötig, solange die Zuordnung der Typ-Art für die Gattung *Glomus* (Familie *Glomeraceae*), *G. microcarpum*, unklar bleibt. Für die beiden Gruppen C und D muß dagegen die Aufstellung neuer Familien gefordert werden. Eine formale Beschreibung dieses vorgeschlagenen neuen Familienkonzepts bedarf weiterer Daten, da bisher außer bestimmten Sequenzmotiven keine gesicherten morphologischen Anhaltspunkte zur Unterscheidung dieser „*Glomus*“-Gruppen bestehen (Schwarzott, Walker und Schüßler 2001).

Neben den genannten Änderungen auf Familienebene, welche die *Glomeraceae sensu* Morton und Benny (1990) betreffen, muss auch für die Ordnung *Archaeosporales* eine Revision gefordert werden, da *Ge. pyriformis* aus der Familie *Geosiphonaceae* bei der Beschreibung der Familie *Archaeosporaceae* nicht berücksichtigt wurde, aber nach den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit in diese Gruppe fällt. Damit ist die Familie *Archaeosporaceae* als paraphyletisches Taxon anzusehen.

In Abbildung 22 ist in Form eines einfachen Kladograms, welches lediglich die gemeinsamen Ursprünge der einzelnen *Glomeromycota*-Gruppen ohne genetische Distanzen angibt, die Verteilung morphologischer Merkmale nach Morton und Benny in Bezug zur molekularen Analyse gezeigt. Die Ergebnisse zur AM-Pilz-Phylogenie und die daraus entstandenen Taxonomie auf Basis der 18S rDNA widerspricht in großen Teilen den Befunden nach morphologischen Daten, die Grundlage der bisherigen Systematik war. Während die Sporenmorphologie auf Artbene ein (in den meisten Fällen) geeignetes Mittel zur Unterscheidung darstellt, scheinen die Strukturen, welche zur Einteilung höherer Taxa dienen, nicht die natürlichen Beziehungen wiederzugeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch versucht mittels spezifischer Primer zu klären, ob das Merkmal Arbuskelbildung zur Definition der AM Pilze Gültigkeit besitzt. Außer diesem Merkmal bestätigen alle bisherigen Untersuchungen die Zuordnung von *Ge. pyriformis* zu dieser Gruppe, lediglich die Mykorrhizierung von Pflanzen durch diesen Pilz konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Der Ansatz, einen Nachweis mittels PCR und spezifischer Lektinfärbung lieferte dabei keine eindeutigen Ergebnisse, da vor allem methodische Probleme keine gesicherten Aussagen zulassen. Mit der

Entwicklung von spezifischen Primern für diesen Pilz ist jedoch die Grundlage gelegt worden, um dies mit Methoden wie *in situ*-PCR in Zukunft weiter untersuchen zu können.



**Abbildung 22:** Klassifizierung der *Glomeromycota* und die Verteilung ausgewählter morphologischer Merkmale nach Morton und Benny (1990) innerhalb der taxonomischen Einheiten. 1 = intrazelluläre Arbuskel, 2 = Vesikel, 3 = Helferzellen, 4 = glomoide Sporenbildung (Sporenbildung an der Basis steriler Hyphen), 5 = acaulosporoide Sporenbildung (sporenbildender Sacculus), 6 = gigasporoide Sporenbildung (zwiebförmiger Zelle), ( ) = Merkmal ist nicht gesichert nachgewiesen. Siehe auch Tabelle 2 und Abbildung 2.

Neben den Änderungen in der Taxonomie ergibt sich aus dem entstandenen Datenmaterial auch die Möglichkeit, qualitative Aussagen bei molekularen Diversitätsstudien zu machen, in welchen „AM-Pilz-spezifische“ Primer zum Einsatz kommen (Helgason *et al.* 1998). Die in der EMBL Datenbank hinterlegten Sequenzdaten aus dieser Arbeit ermöglichen dabei die Zuordnung im Freiland gefundener Sequenzen mittels phylogenetischer Berechnung und dem Vergleich gefundener Sequenzmotive. Aus diesen Ergebnissen ist es dann wiederum möglich, die ökologischen Zusammenhänge zwischen Pflanzen- und AM-Pilz-Gemeinschaften aufzudecken und detaillierter zu interpretieren. Auch ist es möglich, mit dem Datenmaterial spezifische Sonden für bestimmte taxonomische Gruppen zu entwickeln und damit deren Verbreitung zu überprüfen.

Die Kombination von morphologischer Bestimmung anhand von Sporen und molekularer Analyse der Phylogenie, wie sie in dieser Arbeit zusammen mit C. Walker durchgeführt wurde, ermöglicht auch rückwirkend die Absicherung der Sequenzen aus Datenbanken, da die Sporenmorphologie an den Belegexemplaren überprüft werden kann, falls es zu Diskrepanzen zwischen verschiedenen Analysen kommt. Zwar ist die 18S rDNA nicht in allen Fällen geeignet, bis auf Artebene zu differenzieren, kann aber Hinweise auf falsche Ergebnisse liefern. So konnte zum Beispiel bei einer Nachuntersuchung das Isolat W3213, welches ursprünglich als *S. nodosa* geführt wurde, aber in der phylogenetischen Analyse *S. calospora* BEG 32 / W3290 zugeordnet war, im Nachhinein als *S. calospora* BEG32 Isolat identifiziert und der Fehler bei der Bezeichnung der Pilzkultur korrigiert werden (Abbildung 11).

Ein weiterer Fortschritt, der durch die erarbeitete Datenbasis erzielt wurde, sind zuverlässige Ergebnisse bei der BLAST-Suche. Gerade die alleinige Analyse von Sequenzen mittels BLAST birgt die Gefahr, dass die Ergebnisse Daten zugeordnet werden, die in Wirklichkeit von Kontaminanten stammen, welche falsch annotiert wurden. Auch können falsche Schlüsse gezogen werden, wenn zu der geblasteten Sequenz keine Daten von näheren Verwandten vorhanden sind. Solche Fehler sind also abhängig von der Absicherung der Daten mittels phylogenetischer Analyse und damit von der Menge an verfügbaren Sequenzen einer phylogenetischen Einheit (Schüßler, Schwarzott und Walker 2003). Die Daten aus dieser Arbeit helfen, auf der 18S rDNA Ebene solche Missinterpretationen bei den *Glomeromycota* zu vermeiden, beziehungsweise aufzudecken.

Neben einer, den natürlichen Verhältnissen angenähernden Phylogenie liefert die Arbeit damit die Möglichkeit einer abgesicherten Identifikation von AM-Pilzen auf molekularer Basis. Die Sequenzdaten und die klonierten 18S rDNA-Fragmente bilden zudem eine Basis für die Entwicklung und Erprobung weiterer molekularbiologischer Ansätze zur Identifikation dieser ökologisch wichtigen Pilzgruppe im Freiland und Labor.

### **3.6 Ausblick**

Der Ansatz, die *Glomeromycota* umfangreich auf molekularer Ebene zu untersuchen, hat neue Erkenntnisse zur natürlichen Phylogenie dieser Pilze ergeben. Bisher wurde etwa >40% der bekannten Arten auf 18S rDNA Ebene analysiert und es ergibt sich ein wesentlich komplexeres Bild der Verwandtschaftsbeziehungen als es bisher bekannt war (Morton und Benny 1990, Morton und Redecker 2001). Es ist zu erwarten, dass gerade bei Pilzen, die bisher der Gattung *Glomus* zugesprochen wurden, weitere phylogenetische Gruppen gefunden und neue Familien beschrieben werden müssen. Dazu ist eine genaue Zuordnung der Typ-Art dieser Gattung, *G. microcarpum*, not-

wendig, die bisher anhand des verfügbaren Herbarmaterials nicht gelang. Auch die Gattung *Entrophospora* und deren genaue phylogenetische Position muss auf molekularer Ebene weiter untersucht wird. Gerade von dieser Gattung konnten zum Abschluss der Arbeit von C. Walker noch weitere Isolate gewonnen werden, die nun in unserem Labor verfügbar sind.

Obwohl die 18S rDNA Phylogenie mit hohen statistischen Werten auf der Ebene des Phylums, der Ordnungen und Familien unterstützt wird, sollte eine Überprüfung der Ergebnisse durch weitere molekulare Marker, wie zum Beispiel des Elongationsfaktor 1- $\alpha$  Gens (EF-1 $\alpha$ ) durchgeführt werden. Ein in vielen Studien benutzter Teil dieses Gens konnte noch während der Entstehung der vorliegenden Arbeit für *Ge. pyriformis* von mir charakterisiert werden. Allerdings ist dies bisher die einzige verfügbare Ef-1 $\alpha$ -Sequenz bei den *Glomeromycota*, so dass bisher noch keine klaren phylogenetischen Aussagen auf Basis dieses Gens gemacht werden können. Durch solche weitergehenden Untersuchungen und ihre Einbindung in Projekte wie das Research Coordination Network in Biological Sciences: A Phylogeny for Kingdom *Fungi* (Deep Hypha, <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/index.php>) sollte es möglich werden, die Evolutionsgeschichte der Pilze sowie die Entwicklung von Ökosystemen besser zu verstehen. Dabei wird zusätzlich die Grundlage zur Identifikation weiterer Spezies gelegt.

Mit Hilfe der Daten wird es möglich, die häufig nicht kultivierbaren und morphologisch schwer unterscheidbaren Organismen aus dem Reich *Fungi* auf Basis sogenannter „Molekularer Barcodes“ (Hebert *et al.* 2002, Floyd *et al.* 2002) anzusprechen. Die phylogenetische Analyse von DNA-Sequenzen, die Zuordnung von Sequenzmotiven zu taxonomischen Einheiten und ihrer Verfügbarkeit in Datenbanken macht es möglich, biologische Diversität leichter zu erkennen. Die hauptsächlich auf Morphologie basierende Identifikation von Arten wird im Allgemeinen nur von wenigen Spezialisten beherrscht und ist limitiert durch die Fähigkeit des Menschen morphologische Variationen zu erkennen, und sich daran zu erinnern. Dies führt zu dem neuen Ansatz in Zusammenarbeit mit der klassischen Taxonomie sogenannte „Molekulare operative taxonomische Einheiten“ (molecular operational taxonomic unit, MOTU) zu beschreiben, die es möglich machen, auch ohne Verfügbarkeit von Lebendmaterial und zeitaufwendiges Erlernen der Morphologie, die Diversität in Ökosystemen zu erkennen (Floyd *et al.* 2002, <http://www.barcodinglife.com>). Gerade auch bei den *Glomeromycota* sind nur noch wenige Experten in der Lage die Arten morphologisch zu unterscheiden, weswegen die mit der vorliegenden Arbeit begonnenen Vereinigung von morphologischem Wissen und molekularer Daten fortgeführt werden sollte, solange dieses Wissen noch verfügbar ist.

Auf Grundlage der gefundenen Sequenzen können dann Methoden zur schnellen Identifikation im Freiland entwickelt werden, die unabhängig von aufwendiger Sequenzierung sind. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel die Entwicklung sogenannter Mikroarrays, die auf Basis von Oligonukleotid-Hybridisierung arbeiten, welche als „high throughput“ Systeme eine schnelle Analyse der Diversität in Ökosystemen ermöglichen (Small *et al.* 2001)

Das neu aufgestellte taxonomische Konzept ermöglicht es weiterhin, zusätzliche Erkenntnisse zur physiologischen Bedeutung der arbuskulären Mykorrhiza zu gewinnen, wobei *Ge. pyriformis* als möglicher Modellorganismus für die *Glomeromycota* dienen kann. Da bei dieser Symbiose nur ein Eukaryont zugegen ist, wird es möglich relativ einfach pilzspezifische mRNA zu isolieren, da *Nostoc* als Prokaryont keine mRNA mit poly-A-Schwanz besitzt. Die gewonnene mRNA kann anschließend in cDNA umgeschrieben werden und differentiell exprimierte Pilzgene können mit Methoden wie DDRT-PCR (Differential Display Reverse Transcription PCR) oder substraktiver Hybridisierung identifiziert werden, die wichtig bei der Aufnahme und dem Metabolismus von Phosphat und weiteren physiologischen Vorgängen in der AM sind. Auf dieser Grundlage könnten die entsprechenden Gene bei anderen AM-Pilzen identifiziert werden, was bisher wegen der obligat symbiotischen Lebensweise dieser Pilze und der damit immer gleichzeitig vorhandenen pflanzlichen mRNA methodisch nur schwer möglich ist (Schüßler und Kluge 2001).

Um die bisher gefundenen verwandtschaftlichen Beziehungen von *Ge. pyriformis* innerhalb der *Glomeromycota* auf morphologischer und molekularer Ebene weiter abzusichern, sollte auch der noch unbeantworteten Frage, ob *Ge. pyriformis* mit anderen photoautotrophen Organismen -neben *Nostoc*- Symbiosen bilden kann, weiter nachgegangen werden (Kluge *et al.* 2002).

Mit den genannten Ansätzen in Verbindung mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wird es möglich, das Wissen über Evolution, Funktion und Verbreitung der ökologisch und ökonomisch wichtigen AM-Symbiose weiter zu vertiefen.

## 4 Literaturverzeichnis

Abbas J.D., Hetrick B.A.D., Jurgenson J.E. (1996). Isolate specific detection of mycorrhizal fungi using genome specific primerpairs. *Mycologia* **88**: 939–946.

Ames R.N., Schneider R.W. (1979). *Entrophospora*, a new genus in the *Endogonaceae*. *Mycotaxon* **8**: 347-352.

Azcon-Aguilar C., Barea J.M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soilborne plant pathogens - an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* **6**: 457-464.

Bago B., Bentivenga S., Brenac V., Dodd J.C., Piché Y., Simon L. (1998). Molecular analysis of *Gigaspora* (*Glomales*, *Gigasporaceae*). *New Phytol* **139**: 581–588.

Bago B; Piche Y; Simon L. (1998). Fluorescently-primed in situ PCR in arbuscular mycorrhizas. *Mycol. Res.* **102**: 1540-1544.

Ben Ali A., De Baere R., Van der Auwera G., De Wachter R., Van de Peer Y. (2001). Phylogenetic relationships among algae based on complete large subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 737-749.

Benjamin R.K. (1979). *Zygomycetes* and their spores. In: *The Whole Fungus* (B. Kendrick, ed.) **2**: 573-622. National Museum of Natural Sciences and National Museum of Canada, Ottawa

Benny G.L. (1995). Classical morphology in zygomycete taxonomy. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1): 725-730.

Benny G.L., Humber R.A., Morton J. B. (2000). *Zygomycota: Zygomycetes*. In: *The Mycota*. Vol. 7, Part A. *Systematics and Evolution* (D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke, eds.): 113-146. Springer-Verlag, Berlin.

Bentivenga S.P., Morton J.B. (1996). Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in Gigasporaceae. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **93**: 559-566.

Berbee M.L., Taylor J.W. (2001). Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. In: *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Volume **VII**: Systematics and Evolution, Part B: 229-245. Springer Verl., Berlin, Heidelberg.

Biancotto V., Bandi C., Minerdi D., Sironi M., Tichy H.V., Bonfante P. (1996). An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbours obligately intracellular bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3005–3010.

Bonfante P., Perotto S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* **130**: 3–21.

Brundrett M.C. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. In: *Advances in Ecological Research* (Macfayden A., Begon M. & Fitter A.H., eds.), Vol. **21**: 171-313. Academic Press, London.

- Brundrett M.C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* **154**(2): 275-304.
- Bruns T.D., White, T.J, Taylor J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 525-564.
- Bruns T.D., Vilgalys R., Barns S.M., Gonzalez D., Hibbett D.S., Lane D.J., Simon L., Stickel S., Szaro T.M., Weisburg W.G. Sogin M.L. (1992). Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* **1**: 231-241.
- Butler E.J. (1939). The occurrence and systematic position of the vesicular- arbuscular type of mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **22**: 274-301.
- Cavalier-Smith T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* **73**: 203-266.
- Chelius M.K., Triplett E.W. (1999). Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turf-grass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* **9**: 61-64
- Clapp J.P., Young J.P.W., Merryweather J.W., Fitter A.H. (1995). Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytol.* **130**: 259-265.
- Daniell T.J., Hodge A., Young J.P.W., Fitter A. (1999). How many fungi does it take to change a plant community? *Trends Plant Sci.* **4**: 81-82.
- De Rooij-Van der Goes P.C.E.M., Van der Putten W.H., Van Dijk C. (1995). Analysis of nematodes and soil-borne fungi from *Ammophila arenaria* (marram grass) in Dutch coastal foredunes by multivariate techniques. *Eur. J. Plant Pathol.* **101**: 149-162.
- Di Bonito R., Elliott M.L., Jardin E.A. (1995). Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (7): 2809-2810.
- Dodd J.C., Rosendahl S., Giovannetti M., Broome A., Lanfranco L., Walker C. (1996). Inter- and intraspecific variation within the morphologically-similar arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Glomus coronatum*. *New Phytol.* **133**: 113-122.
- Douds D.D., Johnson C.R., Koch K.E. (1988). Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* **86**: 491-496.
- Edwards S.G., Fitter A.H., Young J.P.W. (1997). Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* **101**: 1440-1444.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Felsenstein J. (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Felsenstein J. (1989). PHYLIP: phylogeny inference package. Version 3.2. *Cladistics* **5**: 164-166.

- Felsenstein, J. (1983). Parsimony in systematics: Biological and statistical issues. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **14**: 313–333.
- Filion M., St-Arnaud M., Jabaji-Hare S.H. (2003). Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* **53**(1): 67-76.
- Floyd R., Abebe E., Papert A., Blaxter M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* **4**: 839-50.
- Frank A.B. (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **3**: 128-145.
- Gadkar V., Adholeya A., Satyanarayana T. (1997). Randomly amplified polymorphic DNA using the M13 core sequence of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora margarita* and *Gigaspora gigantea*. *Can. J. Microbiol.* **43**: 795–798.
- Gehrig H., Schüßler A., Kluge M. (1996). *Geosiphon pyriforme*, a fungus forming endocytobiosis with *Nostoc* (Cyanobacteria), is an ancestral member of the Glomales: evidence by SSU rRNA analysis. *J. Mol. Evol.* **43**: 71–81
- Gehrig H., Gaussmann O., Marx H., Schwarzott D., Kluge M. (2001). Molecular phylogeny of the genus *Kalanchoe* (*Crassulaceae*) inferred from nucleotide sequences of the ITS-1 and ITS-2 regions. *Plant Sciences* **160**: 827-835.
- Gerdemann, J.W., Trappe, J.M. (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycolog. Mem.* **5**: 1–76.
- Graham J.H., Hodge N.C., Morton J.B. (1995). Fatty acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and endomycorrhizae. *App. & Env. Micro.* **61**: 58-64.
- Greuter W., McNeill J., Barrie F.R., Burdet H.M, Demoulin V., Filgueiras T.S., Nicolson D.H., Silva P.C., Skog J.E., Trehane P., Turland N.J., Hawksworth D.L. (2000). *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code)*. [Regnum Vegetabile Vol. **138**.] Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Grime J.P. (1987). Dominant and subordinate components of plant communities – implications for succession, stability and diversity. In : *Colonization, succession and stability*. (Gray A, Edwards P, Crawley M., eds.): 413-428. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hahn A., Bonfante P., Horn K., Pausch F., Hock B. (1993). Production of monoclonal antibodies against surface antigens of spores from arbuscular mycorrhizal fungi by an improved immunization and screening procedure. *Mycorrhiza* **4**: 69–78.
- Harley J.L., Smith S.E. (1983): *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. London.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **270**(1512): 313-21.
- Heckmann D.S., Geiser D.M., Eidell B.R., Stauffer R.L., Kardos N.L., Hedges S.B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**: 1129-1133.
- Helgason T., Daniell T.J., Husban R., Fitter A. H., Young J.J.W. (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**: 431.

- Helgason T., Fitter A.H., Young J.P.W. (1999). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (Bluebell) in a seminatural woodland. *Mol. Ecol.* **8**(4): 659-666.
- Hildebrandt U., Kaldorf M., Bothe H. (1999). The zinc violet and its colonisation by arbuscular mycorrhizal fungi. *J. Plant Physiol.* **154**: 709-717.
- Hillis D.M., Bull J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.
- Hoehler T.M., Bebout B.M., des Marais D.J. (2001). The role of microbial mats in the production of reduced gases on the early earth. *Nature* **412**: 324-327.
- Holmes D.S., Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
- Hosny M., Hijiri M., Passerieux E., Dulieu H. (1999). rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* **226**: 61-71.
- Isaacs S. (1992). *Fungal-plant interactions*. Chapman and Hall, London
- Jackson R.M., Mason P.A. (1984). *Mycorrhiza*. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London
- Jakobsen I., Abbott L.K., Robson A.D. (1992). External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum*. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.* **120**: 371-380.
- Jakobsen I., Rosendahl L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol.* **115**: 77-83.
- Janse J.M. (1896). Les endophytes radicaux de quelques plantes Javanese. *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg* **15**: 53-212.
- Kimura M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Kjoller R., Rosendahl S. (2001). Molecular diversity of glomalean (arbuscular mycorrhizal) fungi determined as distinct *Glomus* specific DNA sequences from roots of field grown peas. *Mycol. Res.* **105**: 1027-1032.
- Kjoller R., Rosendahl S. (2000). Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). *Plant and Soil* **226** (2): 189-196.
- Kluge M., Mollenhauer D., Wolf E., Schüßler A. (2002). The *Nostoc* - *Geosiphon* endocytobiosis. In: *Cyanobacteria in Symbiosis*. (Rai A.N, Bergman B, Rasmussen U., eds), Chapter **3**: 19-30. Kluwer Academic Publishers
- Knapp E. (1933). Über *Geosiphon pyriforme* Fr. Wttst., eine intrazelluläre Pilz-Algen-Symbiose. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **L1**: 210-216.
- Kowalchuk G.A., De Souza F.A., Van Veen J.A. (2002). Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. *Mol. Ecol.* **11**(3): 571-581.

- Kramadibrata K., Walker C., Schwarzott D., Schüßler A. (2000). A new species of *Scutellospora* with a coiled germination shield. *Ann. Bot.* 86: 21–27.
- Kumar S., Gadkar S.R. (2000). Efficiency of the neighbour-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *J. Mol. Evol.* 51: 544–553.
- Kützing F.T. (1849). *Botrydium pyriforme*. In: Species algarum (F. A. Brockhaus, ed.): 486. Leipzig.,
- Lanfranco L., Delpero M., Bonfante P. (1999). Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mol. Ecol.* 8: 37–46.
- Lanfranco L., Wyss P., Marzachi C., Bonfante P. (1995). Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol. Ecol.* 4: 61–68.
- Longato S., Bonfante P. (1997) Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.* 101: 425–432.
- Malloch D.W., Pirozynski K.A., Raven P.H. (1980). Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbiosis in vascular plants (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2113-2118.
- Millner P.D., Mulbry W.W., Reynolds S.L., Patterson C.A. (1998). A taxon specific oligonucleotide probe for temperate zone soil isolates of *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 8: 19–27.
- Mollenhauer D. (1992). *Geosiphon pyriforme* In: Algae and Symbiosis: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored. (Reisser W., ed.), Vol. 1.17 : 339-351. Biopress Limited, Bristol.
- Morton, J.B. (1990). Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. *Mycologia* 82: 192-207.
- Morton J.B. (2000). Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of *Glomales*. In: *Microbial Endophytes* (Bacon C.W., White J.H., eds.): 121-140. Marcel Dekker, New York.
- Morton J.B., Benny G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471–491.
- Morton J. B., Redecker D. (2001). Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Mosse B. (1953). Fructifications associated with mycorrhizal strawberry roots. *Nature* 171: 974.
- Mullis K. B., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 51: 263.
- Mullis K. B.; Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* 155: 336.

- Newton C.R., Graham A. (1994). *PCR*. Spektrum, Akad. Verl. Heidelberg, Berlin, Oxford.
- O'Donnell K., Cigelnik E., Benny, G.L. (1998). Phylogenetic relationships among the *Harpellales* and *Kickxellales*. *Mycologia* **90**: 624-639.
- O'Donnell K., Lutzoni F., Ward T.J., Benny G.L. (2001). Evolutionary relationships among mucoralean fungi (*Zygomycota*) : evidence for family polyphyly on a large scale. *Mycologia* **93**: 286-297.
- Olsen G.J., Woese C.R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB. J.* **7**: 113-123.
- Parke J.L., Lindermann R.G. (1980). Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with the moss *Funaria hygrometrica*. *Can. J. Botany* **58**: 1898-1904.
- Pearson J.N., Jakobsen I. (1993). The relative contribution of hyphae and roots to phosphorus uptake by arbuscular mycorrhizal plants, measured by dual labelling with <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. *New Phytol.* **24**: 489-494.
- Peterson R. L., Howarth M.J., Whittier D.P. (1981). Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nodum*. *Can. J. Bot.* **59**: 711-720.
- Pirozynski K.A., Malloch D.W. (1975). The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**: 153-164.
- Rabatin S.C. (1980). The occurrence of the vesicular-arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus tenuis* with moss. *Mycologia* **72**: 191-195.
- Redecker D. (2000). Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) within colonised roots. *Mycorrhiza* **1**: 73-80.
- Redecker D. (2002). New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Res. Microbiol.* **153**: 125-130.
- Redecker D., Kodner R., Graham L.E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921.
- Redecker D., Morton J.B., Bruns T.D. (2000). Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Phylogenet. Evol.* **14**: 276-284.
- Redecker D., Thierfelder H., Walker C., Werner D. (1997). Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order *Glomales*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1-6.
- Redecker D., Hijri M., Dulieu H., Sanders I.R. (1999). Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8 S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of ascomycete origin. *Fungal Genet. Biol.* **28**: 238-244.
- Remy W., Taylor T.N., Hass H., Kerp H. (1994). Four hundred million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11841-11843.
- Renker C., Heinrichs J., Kaldorf M., Buscot F. (2003). Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. *Mycorrhiza*, online: DOI 10.1007/s00572-002-0214-5.

- Rodriguez A., Dougall T., Dodd J.C., Clapp J.P. (2001). The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytol.* **152**: 159-167.
- Rosendahl S. (1989). Comparisons of spore-cluster forming *Glomus* species (*Endogonaceae*) based on morphological characteristics and isoenzyme banding pattern. *Op. Bot* **100**: 215-223.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sanders I.R. (1999). No sex please, we're fungi. *Nature* **399**: 737-739.
- Sanders I.R., Clapp J.P., Wiemken A. (1996). The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems – a key to understanding the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **133**: 123-134.
- Sanders I.R., Alt M., Groppe K., Boller T., Wiemken A. (1995). Identification of ribosomal DNA polymorphism among and within spores of the *Glomales*: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytol.* **130**: 419-427.
- Sawaki H., Sugawara K., Saito M. (1998). Phylogenetic position of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its synanamorph *Glomus leptotichum*, based upon 18S rRNA gene sequence. *Mycoscience* **39**: 477-480.
- Schmid E., Oberwinkler F. (1993). Mycorrhiza-like interaction between the achlorophyllous gametophyte of *Lycopodium clavatum* L. and its fungal endophyte studied by light and electron microscopy. *New Phytol.* **124**: 69-81.
- Schüßler A. (1999). *Glomales* SSU rRNA gene diversity. *New Phytol.* **144**: 205-207.
- Schüßler A. (2000). *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* **1**: 15-21.
- Schüßler A. (2002). Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244**: 75-83.
- Schüßler A., Kluge M. (2001). *Geosiphon pyriforme*, an endo-cytosymbiosis between fungus and cyanobacteria, and its meaning as a model system for arbuscular mycorrhizal research. In: *The Mycota IX—Fungal Associations* (Hock B., ed.): 151-161. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2001). A new fungal Phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105** (12): 1413-1421.
- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. (2003). *Glomeromycota* rRNA genes – the diversity of myths?. *Mycorrhiza*: angenommen Mai 2003, im Druck.
- Schüßler A., Mollenhauer D., Schnepf E., Kluge M. (1994). *Geosiphon pyriforme*, an endosymbiotic association of fungus and cyanobacteria: the spore structure resembles that of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Bot. Acta* **107**: 36-45.
- Schüßler A., Bonfante P., Schnepf E., Mollenhauer D., Kluge M. (1996). Characterisation of the *Geosiphon pyriforme* symbiosome by affinity techniques : confocal laser scanning microscopy (CLSM) and electron microscopy. *Protoplasma* **190**: 53-67.

- Schüßler A., Gehrig H., Schwarzott D., Walker C. (2001). Analysis of partial Glomales SSU rRNA genes: Implications for primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* **105**: 5–15.
- Schwarzott D., Schüßler A. (2001). A simple and reliable method for SSU rRNA gene DNA-extraction, amplification, and cloning from single AM fungal spores. *Mycorrhiza* **10**: 203-207.
- Schwarzott D., Walker C., Schüßler, A. (2001). *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is non-monophyletic. *Mol. Phylogenet. Evol.* **21**: 190-197.
- Simon L. (1996). Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. *New Phytol.* **133**: 95–101.
- Simon L., Lalonde M., Bruns T. D. (1992). Specific amplification of 18 S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonising roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 291–295.
- Simon L., Bousquet J., Levesque R. C., Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.
- Small J., Call D.R., Brockman F.J., Straub T.M., Chandler D.P.(2001). Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(10):4708-16.
- Smith S.E., Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd edn. Academic Press, London.
- Soltis E.D., Soltis P.S. (2000). Contributions of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant. Mol. Biol.* **42**: 45-75.
- Stahl M. (1949) Die Mycorrhiza der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung der thallosen Formen. *Planta* **37**: 103-148.
- Sterflinger K., Krumbein W.E., Schwiertz A. (1998). A protocol for PCR in situ hybridization of hyphomycetes. *Internatl. Microbiol.* **1**: 217-220.
- Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. (1997). Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from a calcareous grassland. *J. Ecol.* **85**: 181–191.
- Stubblefield S.P., Taylor T.N., Trappe J.M. (1987). Fossil mycorrhizae: a case for symbiosis. *Science* **237**: 59-60.
- Sugiyama J., Nagahama T., Nishida H. (1996). Fungal diversity and phylogeny with emphasis on 18s ribosomal sequence divergence. In: *Microbial diversity in Time and Space*. (Colwell et al., eds.). Plenum Press, New York.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J. (1990). Phylogeny reconstruction. In: *Molecular Systematics*. (Hillis, D.M., Moritz C., eds.), Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sylvia D. M. (1990) Distribution, structure, and function of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Rhizosphere dynamics*. (Box J.E., Hammond L.C., eds.): 144-165. Westview, Boulder, Colo.

- Tanabe, Y., O'Donnell, K., Saikawa, M., and Sugiyama, J. (2000). Molecular phylogeny of parasitic *Zygomycota* (*Dimargaritales*, *Zoopagales*) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **16**: 253–262.
- Taylor T.N., Remy W., Hass H., Kerp H. (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* **87**: 560–573.
- Tehler A., Farris J.S., Lipscomb D.J., Källersjö M. (2000). Phylogenetic analyses of the fungi based on large rDNA data sets. *Mycologia* **92**: 459-474.
- Thaxter R. (1922). A revision of the *Endogonaceae*. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* **57**: 291-341.
- Trappe J.M. (1987). Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. (Safir G.R., ed.): 5-25. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Tulasne L.R., Tulasne C. (1844). Fungi nonnulli hipogaei, novi v. minus cogniti auct. *Giorn. Bot. Ital.* **2**: 55-63.
- Tulasne L.R. (1851) Fungi Hypogaei. Histoire et monographie des champignons Hypogés. Collaboration pour l'iconographie analytique de Charles Tulasne. Paris.
- Turnau K., Ronikier M., Unrug J. (1999). Role of mycorrhizal links between plants in establishment of liverworts thalli in natural habitats. *Acta Soc. Bot. Pol.* **68**(1): 63-68.
- Turnau K., Ryszka P., Gianinazzi-Pearson V., Van Tuinen D. (2001). Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*. **10**(4): 169-174.
- Van de Peer Y., Caers A., De Rijk P., De Waechter R. (1998). Database on the structure of small subunit RNA. *Nucleic. Acids. Res.* **26**: 179–182.
- Van de Peer Y., Baldauf S.L., Doolittle W.F., Meyer A. (2000). An updated and comprehensive rRNA phylogeny of (crown) eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *J. Mol. Evol.* **51**: 565-576.
- Van der Heijden M.G.A., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., Streitwolf-Engel R., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. (1998a). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 72-75.
- Van der Heijden M.G.A., Boller T., Wiemken A., Sanders I.R. (1998b). Different arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. *Ecology* **79**: 2082-2091.
- Van Elsas J.D., Duarte G.F., Keijzer-Wolters A., Smit E. (2000). Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* **43**(2): 133-51.
- Van Tuinen D., Jacquot E., Zhao B., Gollotte A., Gianinazzi-Pearson V. (1998). Characterisation of root colonisation profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25 S rDNA-targeted nested PCR. *Mol. Ecol.* **7**: 879–887.
- Vandenkoornhuysse P., Leyval C. (1998). SSU rDNA sequencing and PCR-fingerprinting reveal genetic variation within *Glomus mosseae*. *Mycologia* **90**: 791–797.

Viera A., Glenn M. G. (1990). DNA content of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores. *Mycologia* **82**: 263-267.

Walker C. (1979). The mycorrhizas and the herbarium: The preservation of specimens from VA mycorrhizal studies. In: *Program and Abstracts of the 4th North American Conference on Mycorrhizas*. Fort Collins, Colorado.

Walker C. (1983). Taxonomic concepts in the *Endogonaceae*: Sporewall characteristics in species descriptions. *Mycotaxon* **18**: 443–455.

Walker C. (1992). Systematics and taxonomy of the arbuscular endo-mycorrhizal fungi (*Glomales*) - a possible way forward. *Agronomie* **12**: 887-897.

Walker C., Trappe J.M. (1993). Names and epithets in the *Glomales* and *Endogonales*. *Mycol. Res.* **97**: 339 –344.

Walker C., Vestberg M. (1998). Synonymy amongst the arbuscular mycorrhizal fungi : *Glomus claroideum*, *G. maculosum*, *G. multisubstensum* and *G. fistulosum*. *Ann. Bot.* **82**: 601-624.

Wettstein F. v.(1915). *Österr. Bot. Z.* **65**: 145.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols, a guide to methods and applications*. (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., eds.): 315–322. Academic, San Diego.

Wright S.F., Upadhyaya A., Buyer J.S. (1998). Comparison of N-linked oligo-saccharides of glomalins from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1853-1857.

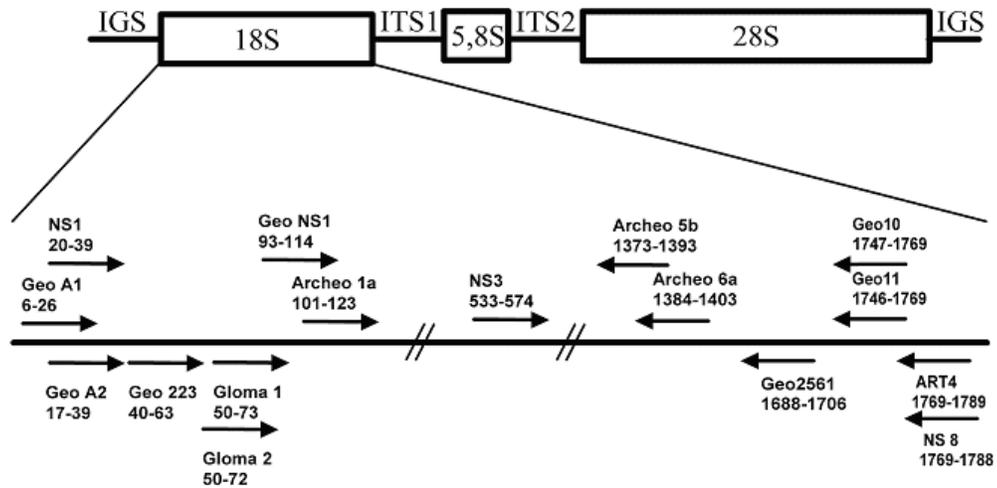
Zézé A., Sulistyowati E., Ophelkeller K., Barker S., Smith S. (1997). Intersporal genetic variation of *Gigaspora margarita*, a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus, revealed by m13 minisatellite-primed PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 676–678.

## 5 Anhang

### Abkürzungen

A	Adenin
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CcdB	“Kontrol of cell leath“-Gun
chrDNE	chromosomale Desoxyribonucleinsäure
DNI	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
G	Guanin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
Kana	Kanamycin
lac Z	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LSU	large subunit / große ribosomale Untereinheit = 28S rRNA
m	Milli ( $\times 10^{-3}$ )
M	Molar
$\mu$	Mikro ( $\times 10^{-6}$ )
min	Minute
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
T	Thymin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtszusatz
x-Gal	5-Brom-3-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid

## Lage der verwendeten Primer auf dem 18S rRNA-Gen



**Abbildung 23:** Genmodell der ribosomalen Untereinheiten und Lage der in der Arbeit verwendeten PCR-Primer auf dem 18S rDNA-Gen. IGS= nicht-codierender „Intergenic spacer“, ITS1 und 2 = nicht-codierende „Internal transcribed spacer“. Die Sequenzmotive der Primer sind der Tabelle 5 zu entnehmen. Die Zahlenangaben [bp] unter den Primer-namen entsprechen der Position auf dem 18S rDNA-Gen von *S. cerevisiae* (J01353)

## Danksagungen

Herrn Prof. Kluge und Dr. A. Schüßler danke ich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Diskussionsbereitschaft und die freien Arbeitsmöglichkeiten in einem guten Arbeitsklima.

Mein besonderer Dank geht dabei an Herrn Dr. A. Schüßler, der mich als direkter Betreuer in die arbuskuläre Mykorrhizaforschung eingeführt hat. Seine umfangreichen Kenntnisse zu diesem Thema, das Interesse an den Experimenten und seine Diskussionsbereitschaft waren die Grundlage für die Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Dr. C. Walker danke ich für die die morphologische Analyse und Bereitsstellung des Sporenmaterials. Er hat mit seinen AM-Pilzkulturen und der jahrelangen Erfahrung als Taxonom die Basis für diese Arbeit geschaffen. Ich bedanke mich bei ihm auch für die interessanten Diskussionen, die wegen seines typisch englischen Humors immer eine Freude waren.

Frau Karin Faist danke ich herzlich für die technische Unterstützung bei Laborarbeiten und vor allem für ihr freundliches Wesen. Sie hat als „ruhender Pol“ ganz maßgeblich zu dem guten Arbeitsklima in der Arbeitsgruppe beigetragen.

Mein Dank geht auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppen von Prof. M. Kluge, Prof. Dr. W. Ullrich und Prof. Dr. C. Stöhr, für die engegebrachte Kollegialität, Diskussionsbereitschaft und die schöne Zeit, auch außerhalb des Instituts.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern danken, die mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.

## Lebenslauf

Persönliche Daten      Name:                              Schwarzott  
   Vorname:                          Werner Daniel  
   Geburtsdatum:                      6.2.1968  
   Geburtsort:                          Darmstadt  
   Familienstand:                      ledig  
   Staatsangehörigkeit:                deutsch

Schulische Ausbildung:      1974 – 1978  
   Wilhelm Leuschner – Grundschule  
   Griesheim

   1978 – 1987  
   Justus Liebig – Gymnasium

Abschluss:                      Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:                      1987  
   vom Wehrdienst befreit

Wartezeit auf Studienplatz: 4 Semester

Dazwischen Arbeitsverhältnisse:  
Juni 1987 – August 1987  
Fa. Nohl GmbH, Darmstadt

September 1987 – Januar 1988  
Fa. Schenk, Darmstadt

Juni 1998 - Juli 1998  
Fa. Röhm GmbH, Darmstadt

Auslandsaufenthalte:  
März 1988 – September 1988  
Januar 1998 – April 1998  
Spanien

Berufliche Ausbildung:	August 1989 – Juni 1991 BBS Ludwigshafen: Berufsfachschule für Chemisch – technische – Assistenten
Abschluss:	Staatlich geprüfter Chemisch – technischer - Assistent
Studium:	Oktober 1991 – Juni 1998 TU Darmstadt Studiengang für das höhere Lehramt an Gymnasien Fächer: Biologie / Chemie
Abschluss:	1. Staatsexamen Thema der Examensarbeit: „Identifizierung von ITS-Regionen bei Arten der Gattung <i>Kalanchoe</i> als Merkmal für Stammbäume der Evolution“
Arbeitsverhältnisse:	Seit Oktober 1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Darmstadt

### Vorträge und Posterpräsentationen

September 1999	Summer School des Graduiertenkollegs 340, Hirschegg <u>Vortrag:</u> „Phylogeny of <i>Geosiphon pyriformis</i> and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi ( <i>Glomales</i> )“
August 2000	Third International Congress on Symbiosis (TICS), Marburg. <u>Posterpräsentation:</u> „Development of specific primers for arbuscular mycorrhizal (AM) fungi detection“
März 2001	Rhein-Main-Kolloquium der Botanischen Institute, Gießen. <u>Vortrag:</u> „Die Taxonomie der VA-Mykorrhizapilze im Spiegel von 18S rRNA Gensequenzen“
Juli 2001	International Conference on Mycorrhizas (ICOM3), Adelaide. <u>Vortrag:</u> „A natural taxonomy of AM fungi ( <i>Glomales</i> ) based on the 18S rRNA-gene“

**Eidesstattliche Erklärung****Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt habe.

Darmstadt, den 20. 08.2003