

## Die unerträgliche Leichtigkeit der Pilzbestimmung

Die Anlehnung der Überschrift an den berühmten Roman „*L'Insoutenable Légèreté de l'être*“ („Die unerträgliche Leichtigkeit des Seins“) von Milan Kundera ist wenn, dann nur indirekt beabsichtigt. In Wirklichkeit bezieht sie sich auf den erst kürzlich erschienenen Aufsatz von HOFSTETTER et al. (2019), welcher den Titel „*The unbearable lightness of sequenced-based identification*“ trägt.

Die Sequenzierung ist ein Thema, das dank der mittlerweile erschwinglichen Kosten auch in die Amateurmykologie Einzug gehalten hat. So ist es heutzutage selbstverständlich, bei Neubeschreibungen abzuklären, ob ähnliche Sequenzen von bereits beschriebenen Arten vorhanden sind. Die These, dass eine Aufsammlung eine neue Art darstelle, wird auf diese Weise molekular überprüft.

Doch auch bei der reinen Pilzbestimmung kann die Sequenzierung sehr hilfreich sein. Immer mehr Fälle treten auf, bei denen nach aktuellem Kenntnisstand eine genaue Bestimmung mit klassischen Methoden nicht möglich ist. Ohne Sequenzierung kann man hier keinen gesicherten Artnamen angeben. Und ein großer Vorteil: wirklich jeder kann diese Bestimmungsmethode probieren. Es ist nicht schwierig. So hatte ich beispielsweise einen Dachpilz aus dem sehr schwierigen *Pluteus cervinus*-Aggregat aufgesammelt (Abb. 1) und anatomisch anhand der bifurkaten Hakenausprägung der Pleurozystiden – JUSTO et al. (2014) folgend – als *Pluteus hongoi* Singer bestimmt. Der Bestimmungsvorgang war aufwendig. Erfassen der Makroskopie (Stiel war glatt, passend für *Pluteus hongoi*, Hutfarbe zu dunkel, da eher *Pluteus cervinus*), dann die Mikroskopie, Sporen vermessen, unterschiedliche Zystidentypen prüfen, schlüsseln und nach einigen Stunden des Hin- und Hers entschied ich mich



für *Pluteus hongoi* als Ergebnis. Aber mit dem berühmten „cf.“ dazwischen, also *Pluteus cf. hongoi*, gedanklich mit einem groß geschriebenen und fett gedruckten cf., schwankend, ob *Pluteus cervinus* (Schaeff.) P. Kumm. agg. nicht besser wäre.

**Abb. 1:** *Pluteus cervinus*, 6. Juni 2020, als *Plutues hongoi* bestimmt, molekular jedoch klar *Pluteus cervinus* s. str.

Foto: C. HAHN



Die Sequenz des *tef1*-Gens (die ITS-Region ist hier nicht aussagekräftig genug) dieser Kollektion ergab aber sofort Aufschluss. Es ist doch „nur“ *Pluteus cervinus* s. str., *Pluteus hongoi* ist weit entfernt. Die Bestimmung erfolgte hier also molekular. Auch *Pluteus rangifer* Justo, E.F. Malysheva & Bulyonk. und *Pluteus exilis* Singer, die *Pluteus cervinus* am nächsten stehen, unterschieden sich hier bereits deutlich. Dank der Studie von Justo et al. (2014), die sehr viele Sequenzen für ihre Revision der „Rehbraunen Dachpilze“ im weitesten Sinn verwendeten, ist das Bestimmungsergebnis hier klar. Es wurde auch der Epitypus von *Pluteus cervinus* sequenziert (REG 13641) – die Sequenz meiner Kollektion stimmt zu 99,43 % mit der des Typus überein. Die Information, dass es der Typus ist, wird aber leider nicht erkennbar in der Ergebnisliste der BLAST-Analyse angegeben – sie ist in den Metadaten versteckt.

Welche „Skills“ brauchte ich für diese Bestimmung? Nun, eigentlich musste ich nur in der Lage sein, den Pilz zu trocknen, zu verschicken, ein Programm auf meinem PC zu installieren, eine Datei damit zu öffnen und für den Export in GenBank abzuspeichern, die Seite von GenBank aufzurufen, dort auf den Link für die „BLAST“-Analyse zu klicken, meine Datei (die Sequenz) dann dort hochzuladen und schließlich auf einen großen, blauen Button, auf dem „BLAST“ steht, zu klicken. Sprich: wirklich jeder kann, wenn man bereit ist Geld auszugeben, so Pilze bestimmen, ohne vorher jahrelang Feld- oder Mikroskopie-Erfahrung zu sammeln. Einzig das Herausfinden, welche der vielen Sequenzen vom Typus stammt, erforderte Mühe.

Tja, wenn das Wörtchen wenn nicht wäre. Und da sind wir wieder bei dem lesenswerten Artikel von HOFSTETTER et al. (2019). Wer sagt denn, ob eine Kollektion, deren Sequenz in der GenBank hinterlegt ist, überhaupt richtig bestimmt ist? HOFSTETTER et al. (2019) gehen davon aus, dass ungefähr ein Drittel der Datensätze in der GenBank einen falschen Namen tragen, da falsch bestimmt (zumindest bei den sogenannten „Großpilzen“)! Dabei stammen die Sequenzen (wenn ein Artnamen damit verbunden ist) – und davon gehe ich aus – von Proben, die eingehend bestimmt wurden, die also mikroskopiert wurden und von denen Belege gemacht und hinterlegt wurden. Würde jeder, der Sequenzen in der GenBank speichert, nachträglich Bestimmungen berichtigen, also die Metadaten bearbeiten, wäre die Fehlerquote wohl geringer. Was ich mich hierbei auch frage: Wie groß ist dann die Quote der Fehlbestimmungen bei der Pilzkartierung, wo ja oft rein makroskopisch bestimmt wird? Und da schließe ich natürlich auch meine eigenen Fundmeldungen mit ein. Aber das ist ein anderes Thema.

Dass es molekular eben oft doch nicht so einfach geht, habe ich selber auch schon feststellen können. Ich hatte die ITS-Region einer von mir als *Russula grisea* Fr. s.l. bestimmten Probe (Abb. 2), bei der ich u.a. aufgrund von dunklem Sporenpulver *Russula ionochlora* Romagn. ausgeschlossen hatte, sequenzieren lassen. Zufälligerweise sammelte ich diesen Täubling im gleichen Waldgebiet und am gleichen Tag wie den Dachpilz, der molekular als *Pluteus cervinus* bestimmbar war. Das BLAST-Ergebnis spuckte zu der erhaltenen Sequenz des Täublings mehrere zu 100 % identische, hinterlegte Sequenzen aus, von denen einige nur als *Russula spec.* benannt sind (das ist zumindest ehrlich, manche dieser unbestimmten Proben



**Abb. 2:** *Russula* spec., 6. Juni 2020, molekular im Moment nicht bestimmbar. Foto: C. HAHN

kommen aber auch von Wurzelspitzen und nicht von Fruchtkörpern – hier wurde die Mykorrhiza sequenziert und so grob eine Bestimmung vorgenommen). Andere, zumindest zu fast 100 % passende Sequenzen, sollen *Russula ionochlora* sein, wieder andere *Russula grisea*. Lasse ich mir das Ergebnis als Baum darstellen, finde ich Proben, die als *Russula grisea* bzw. *R. ionochlora* bestimmt wurden, auch in anderen Ästen, also weit verstreut. Kurz gesagt: es ist völlig klar, dass einige der Proben falsch bestimmt sind. Nicht klar ist, welche nun richtig und welche falsch bestimmt wurden oder ob sogar alle Benennungen falsch sind – die *Griseinae* haben es in sich! Klar ist nur: die Bestimmung per BLAST ist hier im Moment nicht möglich.

Das Problem ist, dass bislang kein Typusmaterial der gerade genannten Arten sequenziert wurde. Niemand weiß also, wie die Sequenz von *Russula grisea* s.str. oder von *Russula ionochlora* aussieht. Wie leicht ist da doch die Bestimmung der früher so gefürchteten Wasserköpfe (*Cortinarius* subgen. *Telamonia*) geworden. Alle greifbaren Typen wurden sequenziert und dienen nun als Fixpunkte für die sequenzbasierte Bestimmung (vgl. LIIMATAINEN et al. 2020). Mit entsprechenden finanziellen Mitteln kann man also die meisten Wasserköpfe Europas sogar als Nichtmykologe bestimmen oder feststellen, ob man gar eine noch nicht beschriebenen Art vor sich hat. Das zeigt wieder eine Grenze der Bestimmung auf. Fehlt das mykologische Wissen, eine Kollektion klassisch vorzubestimmen, um abzuschätzen, ob es sich lohnt, sie sequenzieren zu lassen, wird man arm – zu viele Wasserköpfe trifft man an. Wenn man häufige Arten hundertmal sequenzieren lässt, weil man auch bei der hundertsten Kollektion den Geranienduft nicht erkennt, wird das Vergnügen eben ziemlich teuer.

Was macht man nun, wenn kein Typusmaterial – wie hier beim Beispiel meines Täublings – sequenziert wurde? Naja, dann kann ja schauen, welche der Sequenzen auf Material beruht, das von Spezialisten bestimmt wurde – so könnte man meinen. Wenn eine berühmte Persönlichkeit, die in der Gattung als Spezialist gilt, die Proben bestimmt und publiziert hat, dann muss doch alles stimmen! Und da muss man leider

sagen: äh, nein, nicht unbedingt. Jeder ist fehlbar, niemand ist vor Fehlbestimmungen gefeit. Und manchmal sind simple Tippfehler der Grund oder ein falsches copy & paste beim Eingeben oder Benennen der Daten oder schlicht ein Vertauschen der Herbartütchen oder der Belege, die ausgepackt sind (oder auf dem Dörrgerät liegen, man stößt dran, alles rutscht durcheinander und das Auseinandersortieren war nicht ganz richtig...).

HOFSTETTER et al. (2019) nennen einige Beispiele frappierender Fehler. So auch in der Gattung der Helmlinge im weiteren Sinn. *Mycena rosea* Gramberg und *Mycena rosella* (Fr.) P. Kumm. ähneln sich sehr im Namen, aber eben auch nur im Namen. Weder ein Spezialist, noch ein Anfänger würde diese beiden Arten verwechseln. Und doch: ein Beleg, der von Robich selbst gesammelt und bestimmt wurde und zudem in seiner Monographie (ROBICH 2016) als Beleg für *Mycena rosella* angegeben wird, stellte sich per Sequenzierung als *Mycena rosea* heraus. Eine weitere „*Mycena rosella*“ von Antonini & Robich bestimmt, stellt sich wiederum als *Mycena pura* (Fr.) P. Kumm. (s.l., Clade 2) heraus – hier ist sowohl die Beschriftung als auch die Bestimmung wohl unkorrekt gewesen. Auch weitere der von Robich hinterlegten Proben sind offenbar falsch bestimmt (oder falsch beschriftet) worden – und natürlich auch von anderen Autoren. HOFSTETTER et al. (2019) zeigen, dass viele *Mycena*-Sequenzen in der GenBank grob fehlbestimmt sind.

Was auch immer der Grund dafür sein mag – mal ist es eine reine Namensverwechslung, mal werden zwei Proben vertauscht und sind dann beide falsch beschriftet, mal ist es wirklich eine Fehlbestimmung – es bleibt die Tatsache, dass niemand unfehlbar ist. Und wer viel sammelt, bearbeitet und bestimmt, der macht auch viele Fehler. Und diese Fehler finden sich auch in der GenBank. Die Gefahr besteht aber, dass die Bestimmung mit dem BLAST-Tool diese Fehler immer wieder erneut als Basis nimmt und sich so ein Fehler über Jahre durch die Literatur zieht.

Es ist also wie so oft: gewusst wie! Vertraue nur den Typusequenzen. Oder zumindest denen, die repräsentativ für publizierte Stammbäume verwendet wurden und dafür morphologisch, anatomisch und genetisch untersucht wurden und als Blaupause dienen würden. Natürlich wäre so ein repräsentativer Beleg auch als Epi- oder Neotypus bestens geeignet. Typisierungen sind folglich essentiell für die Zukunft der Bestimmung per Sequenz. Zu leichtfertig sollte aber auch nicht typisiert werden (und dabei sollte bitte tunlichst vermieden werden, dass Proben vertauscht werden), denn nicht immer ist es trivial, was die Originalinterpretation einer Art ist.

Aktuell sind aber nur relativ wenige Typusbelege als Sequenz in der GenBank enthalten. Die Abdeckung ist noch viel zu gering, als dass eine sichere Bestimmung eines völlig unbekanntem Pilzes per Sequenz hohen Erfolg verspräche. Und nur noch Wasserköpfe anzuschauen... mag vielleicht nicht Jeder. Ob man aber irgendwann Täublinge sequenzbasiert bestimmen kann?

Es ist nicht alles so leicht, wie es scheint. Manches aber viel leichter, als man meinen könnte. Beides trifft auf die sequenzbasierte Bestimmung zu. In der richtigen Gattung ist sie schon heute ein sehr praktisches Tool. Und bei anderen Gattungen muss



man halt noch warten. Für diejenigen, die in diese Methodik einsteigen möchten – für den Fall, dass die Sequenz für die sichere Bestimmung im Rahmen eines Artikels in der *Mycologia Bavarica* benötigt wird – gibt es die Möglichkeit, die Sequenzierkosten von den beiden Trägervereinen unserer Zeitschrift, der Bayerischen Mykologischen Gesellschaft und dem Verein für Pilzkunde München, erstattet zu bekommen (solange das dafür vorgesehene Budget nicht überschritten wird). So z.B. geschehen bei dem in diesem Heft erscheinenden Artikel über *Psathyrella* – DONDL et al. (2021).

Doch was hat all das nun mit der „Unerträglichen Leichtigkeit des Seins“ zu tun? Vielleicht findet sich ein passender Bezug im Grundgedanken der „ewigen Wiederkunft“ von Friedrich Nietzsche, welcher ein Hintergrundthema des Romans ist. Es ist der Gedanke, dass sich im Laufe der Geschichte immer wieder alles in gewisser Weise wiederholt.

Bestimmt man mit klassischen Methoden, ist man davon abhängig, dass die Merkmalsbeschreibungen und Artinterpretationen, denen man folgt, richtig sind. Eigentlich müsste man ja immer alles am Typusmaterial abgleichen – das geht natürlich nicht, aber es gibt ja Typusstudien, denen man folgen kann, solange diese keine Fehler enthalten. Dies wiederholt sich hier nun, denn man ist davon abhängig, wie gut die den Sequenzen zugrundeliegenden Proben bestimmt sind. Und auch hier müsste man sich eigentlich auf die Typen beziehen. Und auch das geht, natürlich, solange bei der Sequenzierung keine Fehler aufgetreten sind. Neue Methode, aber gleiches Prinzip. Irgendwie wiederholt sich wohl wirklich alles (oder zumindest vieles).

## Literatur

- DONDL M, CHRISTAN J, HUSSONG A (2021) – Beiträge zur Familie Psathyrellaceae III: *Britzelmayria multipedata*, *Psathyrella psammophila* (= *P. obtusata* s.l.), *Psathyrella rostellata*. *Mycologia Bavarica* **21**: 99-129.
- HOFSTETTER V, BUYCK B, EYSSARTIER G, SCHNEE S, GINDRO K (2019) – The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity* **96**: 243-284. DOI 10.1007/s13225-019-00428-3.
- JUSTO A, MALYSHEVA E, BULYONKOVA T, VELLINGA EC, COBIAN G, NGUYEN N, MINNIS AM, HIBBETT DS (2014) – Molecular phylogeny and phylogeography of Holarctic species of *Pluteus* section *Pluteus* (Agaricales: Pluteaceae), with description of twelve new species. *Phytotaxa* **180**: 1-85. DOI 10.11646/phytotaxa.180.1.1.
- LIIMATAINEN K, NISKANEN T, DIMA B, AMMIRATI JF, KIRK PM, KYTÖVUORI I (2020) – Mission impossible completed: unlocking the nomenclature of the largest and most complicated subgenus of *Cortinarius*, *Telamonia*. *Fungal Diversity* **104**: 291-331. DOI 10.1007/s13225-020-00459-1.
- ROBICH G (2016) – *Mycena* d'Europa. Associazione Mycologica. Bresadola, Trento.

**Christoph Hahn**