

Konservierung von Flechten für DNA-Analysen in GBOL – German Barcode of Life



Version vom 29.03.2012

Für das GBOL-Projekt, German Barcode of Life, sollen für alle **Flechten-Arten, die in Deutschland vorkommen**, insgesamt im Projekt **bis zu 10 artgleiche Individuen von möglichst weit auseinander liegenden Fundpunkten** gesammelt werden (diese können auch im Ausland liegen). Allgemeine Infos zum Projekt und mittelfristig auch die Information dazu, welche Arten schon gesammelt wurden, finden Sie auf dem GBOL-Portal:

<http://www.bolgermany.de/>

In dem vorliegenden Leitfaden sind die wesentlichen Faktoren für die Bereitstellung von geeigneten Flechtenproben für GBOL knapp dargestellt. Details können Sie mit dem für die entsprechende Tiergruppe zuständigen Koordinator klären. Diesen finden Sie unter:

<http://www.bolgermany.de/kontakt> oder <http://www.bolgermany.de/team/projekte>

Anforderungen für Flechtenproben in GBOL:

ALLGEMEINES

- Die Proben sollten **frisch gesammelt oder höchstens wenige Jahre alt** sein.
- Die Proben sollten aus dem **gesamten Flechtenlager** bestehen (also Pilz- und Algenzellen beinhalten), ausreichend groß sein und die diagnostisch wichtigen Merkmale aufweisen: wir brauchen einen Voucher, um die zukünftige Nachprüfbarkeit und aufbauende Forschung zu gewährleisten. (Ausnahmen, z.B. bei Material aus einem Museum, bitte mit dem zuständigen GBOL-Koordinator besprechen):
- Bitte identifizieren Sie die Proben so genau wie möglich, d.h. bis zur Art (ggf. Unterart).
- Soweit möglich, bitte nach Arten bzw. Populationen getrennt sammeln, d.h. von Anfang an **in eine Kapsel nur eine Art** geben, **damit keine DNA von Soredien oder Sporen übertragen werden kann**. Gerne kann ein zu sequenzierender Teil der Probe in ein Schraubdeckel-Eppi separiert werden. Schraubdeckel-Eppis werden von GBOL gestellt. Bitte geben Sie nicht genutzte Röhrchen wieder zurück.
- Zeitgleich mit den Proben brauchen wir die dazugehörigen **Daten** (Sammelinfos inkl. GPS-Koordinaten, Determination); bitte nutzen Sie hierfür unsere aktuelle **GBOL-Excel-Tabelle**, die Sie über das GBOL-Portal herunterladen können.
- Wir müssen davon ausgehen können, dass die Proben 'legal' gesammelt wurden (d.h. entsprechende Genehmigungen vorlagen, wo dies nötig war).

KONSERVIERUNG

*Sofort nach dem Tod des Organismus beginnt der **Abbau der DNA** (der Erbsubstanz) in den Zellen. Damit die DNA nicht innerhalb kurzer Zeit zersetzt und die Probe für Barcoding-Analysen wertlos ist, muss man diesen Abbau stoppen. Hierzu sollten die Proben am besten möglichst früh schonend getrocknet (z.B. mit Silikagel) und gekühlt werden. Silikagel entzieht dem Gewebe das für den Abbau der DNA nötige Wasser und inaktiviert die DNAsen. **Wasser / Feuchtigkeit ist die größte Gefahr für die Konservierung von DNA!***

- Die Proben sollten **frisch gesammelt oder** höchstens **wenige Jahre alt** sein.
- Die Proben sollten **möglichst schnell und schonend getrocknet werden (z.B. mit Silikagel).**
 - alternative Konservierungsflüssigkeiten (z.B. DMSO-NaCl, Propylenglykol) sind meistens suboptimal für die DNA – deren Einsatz bitte mit dem zuständigen Koordinator absprechen.
- Die Proben sollten **trocken** und **kühl gelagert** worden sein.
 - **Für kurze Zeit** nicht einfrieren, sondern **trocken** in einer **verschlossenen Plastiktüte im Kühlschrank oder bei Zimmertemperatur** lagern.
 - **Für längere Zeit**, ab ca. 4 Wochen, möglichst **einfrieren und bis zur Übergabe nicht mehr auftauen**; wiederholtes **Auftauen-Einfrieren** schadet der DNA! Ideal wäre das Einfrieren des Schraubdeckel-Eppis mit der separierten Flechtenprobe. Dann kann sofort nach dem Auftauen die DNA-Extraktion durchgeführt werden.

Tips für das Sammeln von GBOL-Proben zur DNA-Isolation:

PROBENGRÖSSE zur Sequenzierung (im Schraubdeckel-Eppi)

- **Bei Makroflechten:** ca. 100 mg Flechtenlager möglichst aus dem Randbereich entnehmen. Das verbleibende Bruchstück bitte in eine separate Tüte einpacken.
- **Bei Krustenflechten mit großen Apothecien:** ca. 10 Apothecien mit darunter befindlichem Lager separieren (gerne mehr).
- **Bei Krustenflechten mit sehr kleinen Apothecien:** ca. 20 Apothecien mit darunter befindlichem Lager separieren (gerne mehr).
- **Bei Krustenflechten mit Arten ohne Apothecien:** ca. 40 mg Flechtenlager aus einem homogenen Bereich entnehmen (gerne mehr, bis 100 mg). Diesen Bereich markieren oder auf einer Skizze nachvollziehbar dokumentieren.

Dabei ist dringend zu beachten, dass das morphologische Belegexemplar **dieselbe Identifizierungsnummer** wie die Gewebe-Unterprobe bekommt (es bietet sich die GBOL-ID an, sofern vor-zugewiesen). Diese Form des Sammelns ist für die Morphologie immer schonender und kann gerne auch für kleinere Proben angewendet werden, allerdings ist sie auch aufwendiger und fordert große Sorgfalt, um Zuordnungsfehler zu vermeiden. Bitte lassen Sie uns wissen, falls Sie routinemäßig so sammeln möchten, damit wir Ihnen die dazu am besten passenden Röhrchen zukommen lassen können.

WEITERE TIPS

- Generell **starke Sonneneinstrahlung** oder aufgeheiztes Fahrzeug möglichst **meiden**.
- Bitte entfernen Sie, wenn möglich, sichtbare Fremdorganismen von der Oberfläche der separierten Probe. Insbesondere anheftende Pflanzenteile und Pilze zwischen den Rhizinen erschweren die weitere Bearbeitung (aber auch z.B. Milben, sollten im Vorfeld entfernt werden).
- Die Probe bitte von jungen Teilen des Lagers (oft der Randbereich) entnehmen. Sich teilende Zellen enthalten in Verhältnis zum Gewicht die meiste DNA.
- Bitte keine von lichenicolen Pilzen besiedelten Bereiche des Lagers verwenden. Proben von lichenicolen Pilzen separat, mit eigener Identifizierungsnummer, sammeln.
- Sterilisieren von schneidenden/spitzen Instrumenten (Spritzen, Mikroscheren, Rasierklingen o.ä. – bitte Vorsicht bei der Handhabung) sollte mindestens durch Spülen in 96% Alkohol und Abwischen mit jeweils unbenutztem Papier-Tuch erfolgen (besser: Abflammen).
- Im Labor wird in Platten von 96 Proben gearbeitet. Wenn Sie uns größere Zahlen an Proben zukommen lassen, **denken Sie bitte in 96er-Schritten** oder 48er-Schritten, (z.B. geben Sie uns 96 statt 100). Danke, das macht uns die Arbeit viel leichter! Wenn Sie Boxen im 96er-Format befüllen, ist es eine gute Idee, artgleiche Proben oder Schwesterarten räumlich zu trennen (nicht in die angrenzende Position, sondern einige Positionen/Röhrchen weiter zu stecken), um eventuelle Laborfehler gleich zu sehen.
- Sammeln Sie bitte nachhaltig, insbesondere wenn die natürlichen Ressourcen knapp sind.

Versand

- Legen Sie der Sendung bitte ein **Übersichtsblatt** bei, um welche Proben es sich handelt; dieses können Sie sich für den Ausdruck ausgeben lassen, wenn Sie Ihre Probendaten auf dem GBOL-Portal eingeben/hochladen: www.bolgermany.de

Fotos

Gerne nehmen wir auch **digitale Farbfotographien** entgegen, insbesondere **des Habitats**, in dem die Flechte gefunden wurde, ebenso **'Live-Bilder'** (z.B. Farbveränderung bei Tüpfelreaktionen).

Hierfür beachten Sie bitte:

- Die Kamera sollte auf **höchste Auflösung** eingestellt sein und ohne spezielle Farbkorrektur (keine "kräftigen Farben" o.ä.). Die Bilder sollten nicht verwackelt sein.
- Das Objekt sollte zentriert und ohne viel seitlichen Freiraum sein.
- Wenn dies ohne Präparation möglich ist, sollten die **diagnostischen Charaktere** sichtbar sein. Eine Maßstab-Skala kann immer gerne hinzugefügt werden.
- Benennung der Bilder bitte anpassen an die Identifizierungsnummer der Probe, z.B. GBOL-400789. Zur eindeutigen Identifizierung fügen Sie bitte Datum und Uhrzeit der Aufnahme hinzu: GBOL-400789_YYYYMMDD_HHMMSS. Wenn Habitatbilder für mehr als eine Probe passen, bitte separat die Zuordnung auflisten.
- Eventuelle Erläuterungen/Kommentare bitte in der GBOL-Sammeltabelle im Feld "Bemerkungen zur Probe" vornehmen, und davorschreiben: *Foto:*
- Wenn Ihre Bilder in die Datenbank aufgenommen und online angezeigt werden, geschieht dies unter einer **Creative Commons (CC) BY-Lizenz** (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/de/>), d.h. Sie geben das Werk für die weitere Nutzung frei, es muss aber stets Ihr Name als Autor angezeigt werden (sollten Sie dies anders als Vorname und Nachname wünschen, bitte mitteilen).