

ABOL Mollusken – Barcoding im Schneckentempo?

Luise KRUCKENHAUSER, Anita ESCHNER & Michael DUDA

Das ABOL Pilotprojekt Mollusken wird am Naturhistorischen Museum Wien (NHM) in Kooperation des Forschungslabors für Molekulare Systematik (Abteilung Zentrale Forschungslaboratorien) und der Molluskensammlung (3. Zoologische Abteilung) durchgeführt (vgl. Eschner et al. 2015). Ziel dieses Projektes ist es, von allen heimischen Molluskenarten (rund 365 Schnecken- und 32 Muschelarten vgl. Reischütz A. & P.L. 2007) DNA-Barcodes, ein 650 bp langes Fragment des mitochondrialen Gens für die Untereinheit I der Cytochrome-c-Oxidase (COI) zu erstellen. Während in anderen nationalen Projekten DNA-Barcoding für viele Organismengruppen gut etabliert ist, stellen Mollusken vielfach eine besondere Herausforderung dar. Man vermutet, dass der mucopolysaccharidreiche Schleim Probleme bei der DNA-Extraktion und der anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) verursachen könnte (vgl. Huelskens et al. 2011, Pereira et al. 2011, Skujiene & Soroka 2003, Sokolov E.P. 2000). Eine weitere Schwierigkeit stellt die hohe Divergenz der COI Sequenzen innerhalb der Mollusken dar. Bei mehreren Taxongruppen führen Mutationen in den Regionen der Primerbindung dazu, dass mit universellen Primern nur eine schlechte bzw. gar keine Amplifikation erfolgt.

Belegexemplare der Molluskensammlung des NHM, die für das Projekt ABOL Mollusken herangezogen werden können, liegen für 234 Arten vor. Diese Belegstücke stammen zu einem Großteil aus Projekten des NHM (z.B. <http://snails.nhm-wien.ac.at/>). Sie wurden speziell für DNA-Analysen gesammelt und nach einem eigens erarbeiteten Protokoll (Kruckenhauser et al. 2011) konserviert. Zusätzlich wird auch älteres Material aus der Molluskensammlung für die Analysen verwendet - vor allem von Arten, die sehr selten oder sehr schwierig zu sammeln sind. Die DNA von altem Museumsmaterial ist jedoch oft stark fragmentiert, daher ist dieses Material nur eingeschränkt für genetische Untersuchungen verwendbar. Momentan sind 26 Arten aus den älteren Beständen der Molluskensammlung in Bearbeitung. Bisher wurden im Rahmen des Pilotprojektes insgesamt 180 Barcodes von 105 Arten aus 32 Familien erstellt.

Der Arbeitsablauf im Rahmen von ABOL Mollusken ist am NHM gut etabliert und erfordert die enge Zusammenarbeit der beiden involvierten Abteilungen. Zusätzlich ist die Unterstützung von Kooperationspartnern entscheidend, die vor allem an der Materialaufsammlung aber auch an der Bestimmung beteiligt sind. Um die Effizienz der Aufsammlungen zu steigern, werden potentielle Fundorte der noch fehlenden Arten vorab eruiert und dann möglichst viele Arten gemeinsam bei gezielten Exkursionen gesammelt. Eine „Artenampel“, die regelmäßig aktualisiert und allen Mitarbeitern und Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wird, erleichtert den Überblick, von welchen Arten noch Material benötigt wird. In dieser Artenliste zeigt ein Farbcode an, welche Arten noch gänzlich fehlen (rot), von welchen Arten noch weitere Individuen benötigt werden (gelb) und von welchen Arten bereits genügend Tiere analysiert wurden (grün). Weiters erhalten Personen, die für das Projekt sammeln, ein Informationsblatt in dem die optimalen Konservierungs- und Lagerungskonditionen ausführlich beschrieben sind, sowie eine Excel-Liste, in die notwendige Informationen zu den Belegexemplaren standardisiert eingegeben werden können. Die taxonomische Bestimmung erfolgt oftmals durch die Kooperationspartner, die Aufsammlungen für ABOL Mollusken durchführen oder durch ProjektmitarbeiterInnen am NHM selbst. Nach der Aufnahme des Materials in die Mollusken-Sammlung und der Erfassung der zugehörigen Daten in der Datenbank werden geeignete adulte Exemplare für die Bearbeitung ausgewählt. Vor der Probenentnahme erfolgt die Fotodokumentation. Frühe Fotodokumentation ist vor allem bei sehr kleinen Arten wichtig, bei denen für die Weichkörperentnahme teilweise die Schale zerstört werden muss. Fotografiert wird mit einem digitalen Kamerasystem, das je nach Größe des Individuums entweder über ein Binokular oder makroskopisch aufnimmt. Es werden bis zu drei für die Artenkennung relevante Perspektiven gewählt, mehrere Schärferebenen zu einem Bild zusammengeführt und ein Maßstab in das Foto eingeblendet. Anschließend wird eine Gewebeprobe

genommen, DNA extrahiert und in der Datenbank der DNA- und Gewebesammlung eingetragen. Der gesuchte Abschnitt des COI-Gens wird mittels PCR und der Verwendung universeller Primer amplifiziert und das Fragment in beiden Leserichtungen sequenziert. In Fällen, wo der erste Versuch kein positives Ergebnis bringt, werden weitere modifizierte Versuche vorgenommen (z.B. Änderungen der DNA-Menge und/ oder alternative Primer). Die DNA-Sequenzen werden editiert und einer Qualitätsprüfung unterzogen. Dabei wird zum einen die Qualität der DNA-Sequenz selbst geprüft und zum anderen ein Ähnlichkeitsvergleich, mit bereits gespeicherten DNA-Sequenzen, durchgeführt. Hierzu werden Sequenzen aus der eigenen Datenbank sowie Sequenzen, die in der öffentlich zugänglichen internationalen NCBI-Datenbank (GenBank) gespeichert sind, herangezogen.

Die Resultate werden kritisch auf Plausibilität geprüft und entsprechende Informationen an die Personen zurückgemeldet, die die Bestimmung durchgeführt haben. Nach Zusammenführung aller Daten eines Individuums, sollen diese gemeinsam mit dem DNA-Barcode in der öffentlich zugänglichen internationalen Datenbank BOLD eingetragen werden.

KRUCKENHAUSER L., ESCHNER A. & DUDA M., 2016: ABOL Molluscs – Barcoding at a snail's pace?

The ABOL pilot project Mollusca is conducted at the Natural History Museum Vienna in cooperation of the DNA laboratory (department Central Research Laboratories) with the mollusc collection (3rd Zoological department) from July 2014 to July 2017 (see Eschner et al 2015). Aim of the project is to get a genetic barcode (a fragment of the mitochondrial cytochrome oxidase 1 gene, 650 bp long) from all Austrian mollusc species (about 365 snail and 32 mussel species, see Reischütz A. & P.L. 2007).

While DNA-barcoding is well established for many groups of organisms in other national projects, in many cases molluscs pose a special challenge. It is assumed that the mucopolysaccharide-rich mucus may cause problems during the DNA-extraction and the subsequent polymerase chain reaction (PCR) (vgl. Huelskens et al. 2011, Pereira et al. 2011, Skujiene & Soroka 2003, Sokolov E.P. 2000). The great divergence of COI sequences within the Mollusca is another difficulty. In multiple taxa, mutations in regions of primer binding lead to severe problems in amplification when using universal primers.

Specimens from 234 different species are currently available in the collections of the NHM. Most of them derive from ongoing and recently finished projects (<http://snails.nhm-wien.ac.at/>). They were collected for the purpose of DNA analyses and were preserved following a specially created protocol (Kruckenhauser et al. 2011). Additionally, previously preserved material from the mollusc collection will be used for analyses of hardly detectable taxa due to small size or inaccessible habitats. Ancient DNA of this material is often highly fragmented and therefore of reduced usefulness for genetic analyses. A total of 26 species taken from previously collected material of the mollusc collection is currently being processed. 180 barcodes of 105 species belonging to 32 families have been generated in the course of the pilot project so far.

The work flow is well established at the NHM and requires close cooperation of both involved departments. The support of cooperation partners, who are mainly involved in sampling and species determination, is also essential. In order to raise sampling efficiency, potential locations of missing species are selected prior to concerted field trips, in the course of which as many species as possible are collected. To get an easy overview on the needed material, a frequently updated "species traffic light" was established and provided to all co-workers and cooperation partners. The "species traffic light" combines a list of species with a colour code depicting missing species in red and species with more material needed in yellow. Additional features are an excel sheet providing the collectors with the possibility to add essential information concerning the sampled specimen and a sheet containing information on conservation and storing conditions. Species determination is conducted either by the collector or at the Museum of Natural History. The material is incorporated to the NHMW Collection and added to the database. Suitable adult specimens are selected for processing. Photo documentation is carried out prior to tissue sampling, as soft-body-samples can, in some cases, only be retrieved by breaking or, in very small species, completely destroying the shell. Therefore a digital camera system is applied, which records either via a stereo microscope or

macroscopically, depending on the size of the specimen. Up to three different perspectives relevant for species recognition are chosen, different levels of image sharpness are stacked, and a scale bar is added to the picture. Subsequently, a tissue sample for genetic analyses is cut out inside the cleanroom of the laboratory. DNA is extracted and entered to the database of the DNA- and tissue collection. A 650bp long fragment of mitochondrial COI is amplified with a universal primer pair and sequenced in both directions. Relevant modifications are made regarding the used amount of DNA and the chosen primers, since not every DNA sample shows a positive result at the first try. In the further process DNA sequences are edited and undergo a proof of quality, which includes a quality check of the sequence as well as a similarity comparison with data stored in our database and in the NCBI GenBank DNA.

The results are critically checked for plausibility and the taxonomists are provided with the relevant outcome. The information obtained at each single step is brought together and made available to the community as documentation for the DNA barcode of the respective species. This procedure ensures the quick creation of high-quality data in a specific group of organisms, which usually represents a particular challenge in barcoding projects.

Keywords: Mollusken, DNA Barcoding, Workflow, molluscs.

Literatur

- ESCHNER A., KRUCKENHAUSER L. & DUDA M., 2015: DNA-Barcoding Mollusken – Verborgene Diversität (Extended Abstract). *Acta ZooBot Austria*, 152, 165–167.
- HUELSKENS T., SCHREIBER S. & HOLLMANN M., 2011: COI amplification success from mucus-rich marine gastropods (Gastropoda : Naticidae) depends on DNA extraction method and preserving agent. *Mitt. dtsh. malakozool. Ges.*, 85, 17–26.
- KRUCKENHAUSER L., HARL J. & SATTMANN H., 2011: Optimized drowning procedures for pulmonate land snails allowing subsequent DNA Analysis and anatomical dissections. *Ann. Nat. Hist. Mus. Wien, Ser. B Bot Zool.* 112, 173–175.
- PEREIRA J.C., CHAVES R., BASTOS E., LEITÃO A. & GUEDES-PINTO H., 2011: An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 8086–8095.
- REISCHÜTZ A. & REISCHÜTZ P.L., 2007: Rote Liste der Weichtiere (Mollusca) Österreichs. In ZULKA K.P. (Ed.): Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs, Teil 2: Kriechtiere, Lurche, Fische, Nachtfalter, Weichtiere. *Grüne Reihe* 14(2), 363–433, Böhlau Verlag, Wien.
- SKUJENE G. & SOROKA M., 2003: A comparison of different DNA extraction methods for slugs (Mollusca: Pulmonata). *Ekologija*, 1, 12–16.
- SOKOLOV E.P., 2000: An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *J. Molluscan Stud.* 66, 573–575.

Anschriften:

Dr. Luise KRUCKENHAUSER, Zentrale Forschungslaboratorien, Naturhistorisches Museum Wien, Burgring 7, A-1010 Wien. E-Mail: luise.kruckenhauser@nhm-wien.ac.at

Mag. Anita ESCHNER, 3. Zoologische Abteilung, Naturhistorisches Museum Wien, Burg-ring 7, A-1010 Wien. E-Mail: anita.eschner@nhm-wien.ac.at

Dr. Michael DUDA, Zentrale Forschungslaboratorien, Naturhistorisches Museum Wien, Burgring 7, A-1010 Wien. E-Mail: michael.duda@nhm-wien.ac.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"](#)

Jahr/Year: 2016

Band/Volume: [153](#)

Autor(en)/Author(s): Kruckenhauser Luise, Eschner Anita, Duda Michael

Artikel/Article: [ABOL Mollusken - Barcoding im Schneckentempo? 169-171](#)