



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Extraktion und Amplifikation von Pilz-DNA aus
Kleinsäugerkotproben

Verfasserin

Katharina Kräutler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, im November 2009

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 444
Studienrichtung lt. Studienblatt: Ökologie
Betreuerin: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Irmgard Krisai-Greilhuber

Abstract

DNA-based analysis of faecal samples is essential for research about ecology of rare, elusive or endangered species, where invasive sampling is impossible or not practicable. When investigating small species, sample size constraints risk impairing molecular investigations, because of low DNA amounts present in sample sizes of a few milligrams. Comparison of existing methods led to the development of an improved protocol for DNA extraction optimised for the assessment of mycophagy among small mammals. Stool samples from four different species (*Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus agrestis* and *Sorex minutus*) containing varying amounts of fungal spores were used to assess the extraction ability of two commercial stool DNA extraction kits and of two different in-house extraction protocols. The simplest extraction buffer in combination with an adequate mechanical and heat lysis treatment yielded best results regarding amount and amplification of the extracted DNA. Because of the possibility to work with very small samples, buffer simplicity, and easy extraction and purification procedure, we regard our newly developed extraction protocol for (fungal) DNA from mammalian faeces as very suitable for use in other studies, possibly involving different vector species as well as other sources of DNA, with probably only minor modifications necessary for adaptation.

Further molecular work was done with the faecal samples extracted with the improved in-house protocols to find out which fungi were preferably eaten by small mammals. In nine out of eleven samples ectomycorrhizal fungi were identified.

Kurzfassung

Das Sammeln von Kotproben von Kleinsäugetieren und deren genetische Analyse stellt eine nicht invasive Art der Beprobung dar. Diese kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn es sich um seltene, unauffällige oder störungsanfällige Arten handelt, oder wenn invasive Probenentnahmen nicht erlaubt bzw. nicht durchführbar sind. Solche Proben bergen eine Reihe von technischen Problemen. Der geringe Probenumfang von wenigen Milligramm Kot kann die molekularen Analysen beeinträchtigen. Die Proben enthalten unter Umständen nur sehr geringe Mengen der zu extrahierenden und amplifizierenden DNA.

Es wurde ein gegenüber existierenden Methoden verbessertes Extraktionsprotokoll entwickelt, optimiert für die Beurteilung von Mykophagie unter Kleinsäugetieren. Kotproben von vier Kleinsäugerarten (*Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus agrestis* und *Sorex minutus*), mit unterschiedlich enthaltener Menge an Pilzsporen wurden verwendet, um die Extraktionsleistung zweier kommerzieller Extraktionskits und zweier selbsthergestellter Extraktionspuffer mit modifiziertem Extraktionsprotokoll, zu vergleichen.

Die besten Resultate bezüglich Menge und Amplifikation der extrahierten Ziel-DNA erzielte der einfachere der beiden selbstgemachten Extraktionspuffern in Kombination mit mechanischem Aufschluss und Hitzebehandlung. Die Puffersimplizität, einfache Extraktions- und Aufreinigungsschritte und vor allem die Möglichkeit der Arbeit mit sehr kleinen Probenmengen lassen den Schluss zu, dass das neu entwickelte Extraktionsprotokoll neben der Extraktion von (Pilz) DNA aus Säugetierkot möglicherweise auch passend für andere, ähnliche Studien wäre (andere Vektorart, andere DNA-Quellen).

Weiters sollte die Frage geklärt werden, welche Pilze die Kleinsäuger bevorzugt konsumieren. Nach Klonierung und Sequenzierung von elf Proben konnten in neun Proben Ektomykorrhizapilze nachgewiesen werden.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu schreiben.

Dem FWF für die Unterstützung des Projektes.

Dem Institut für Wildbiologie und Jagdwirtschaft der Universität für Bodenkultur Wien für die
Bereitstellung des Themas.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mycology und Molecular Laboratory für die stets
freundliche und kompetente Unterstützung in den vielen Laborstunden sowie besonders
Susanne Schickmann die mir mit viel Geduld alle Feinheiten des Kleinsäugerfanges gezeigt
und viele Fragen beantwortet hat.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Fragestellung.....	6
Material und Methoden.....	9
Die Untersuchungsgebiete	9
Kleinsäugerfang, Probennahme und Aufbewahrung der Proben	11
Mikroskopische Analyse	14
Auswahl der Proben für den molekularen Extraktionsvergleich	14
Extraktionskits und verwendete Puffer	15
Extraktionsprotokoll (AnDNA, TNES)	17
PCR Analyse	19
Klonierung	20
PCR und RFLP Analyse	21
PCR und Sequenzierung.....	23
Blasting.....	24
Ergebnisse	25
Kleinsäugerfang	25
Extraktionsvergleich	26
PCR	30
Klonierung, RFLP und Sequenzierung	33
Diskussion	37
Anhang	43
Poster	43
Curriculum vitae	44
Literatur	45

Einleitung und Fragestellung

Mykorrhiza, die mutualistische Symbiose zwischen Pilz und Pflanze ist weit verbreitet, fast alle, unseren heimischen Bestand bildenden Waldbäume (*Pinus*, *Picea*, *Fagus*) gehen diese Art der Lebensgemeinschaft ein. Der Einfluss von Kleinsäugetern, wie ihre Rolle bei der Ausbreitung der Pilzsporen sowie die Neuetablierung von Symbiosen in Waldverjüngungs- und Wiederaufforstungsgebieten sollten im Rahmen eines FWF-Projektes (P19236, Kleinsäuger und die Verbreitung von Mykorrhiza-Sporen) erforscht werden.

Bei vielen Ektomykorrhizapilzen handelt es sich um Hypogäen, deren Fruchtkörper sich unterirdisch entwickeln. Tiere übernehmen die Verbreitung der Sporen der unterirdisch fruchtenden Pilze, denen der Transport über Wind, Wasser und andere abiotische Faktoren verwehrt bleibt (Claridge & May 1994, Johnson 1996). Die Funktion als Vektor, in diesem Fall durch Nahrungsaufnahme und Passage durch den Verdauungstrakt der Tiere, sowie die Präferenz der Säuger für bestimmte Pilzarten sollten geklärt werden. Dafür war eine Methode erforderlich, die eine eindeutige Identifizierung der in den Kotproben enthaltenen Pilzsporen zulässt. Da mehr als 800 gesammelte Proben von neun verschiedenen Kleinsäugerarten mit hoch variabler Anzahl konsumierter Pilzarten und Sporenmenge gewonnen wurden, musste eine einfache, schnelle und effiziente DNA Extraktionsmethode entwickelt werden.

Vielfältige Varianten molekularer Analysen (Bellemain *et al.* 2005; Palomares *et al.* 2002; Paxinos *et al.* 1997), sind vorhanden, die Extraktion von DNA aus Kotproben ist kein neuer Ansatz der Forschung. Aufgrund ihres hohen Informationsgehaltes sind Kotproben ein wertvolles Hilfsmittel für die Klärung vieler Forschungsfragen und können vergleichsweise einfach gewonnen werden. Nicht selten sind sie der Schlüssel zur Antwort, wenn nur eine nicht invasive Art der Probengewinnung in Frage kommt. Eine Anleitung für die Extraktion der gesamten im Kot vorhandenen Pilz-DNA gab es bisher jedoch noch nicht.

Wie alle Umweltproben erschweren auch Kotproben die Gewinnung von DNA. Die größten Probleme ergeben sich daraus, dass die Zusammensetzung der Proben nie ident, sondern stets variabel ist. Sie beinhalten sowohl DNA unterschiedlicher Herkunft (arteigene DNA,

DNA des Nahrungsinhaltes, Bakterien, Hefen, etc.) und Menge als auch inhibierende Substanzen wie DNAsen, Proteine oder Chemikalien, die in der Umwelt vorkommen. Weitere Schwierigkeiten ergeben sich bei der Amplifikation durch mitaufgereinigte Kontaminanten (Miller *et al.* 1999).

Außerdem besitzen Pilzsporen als Verbreitungs- und Überdauerungseinheit eine zum Teil stark ausgebildete Sporenwand, daraus ergeben sich sowohl Vor.- als auch Nachteile. Der wohl größte Vorteil besteht darin, dass diese im Gegensatz zu den Hyphen und anderen Geweben des Pilzes den Verdauungstrakt der Mykophagen unbeschadet überstehen (Trappe & Maser 1976; Ure & Maser 1982). Deshalb sind Sporen oft die einzig mögliche Quelle gefressene Pilze mithilfe molekularer Analysen zu detektieren. Diese Robustheit der Sporen verlangt jedoch eine zusätzliche Behandlung vor der DNA-Extraktion, die Pilzsporen müssen mechanisch zerstört werden.

Zahlreiche Ansätze nach unterschiedlichsten Protokollen (Cubero *et al.* 1999; Gardes & Bruns 1993; Kuske *et al.* 1998; Manian *et al.* 2001; Miller *et al.* 1988) sowie mit kommerziell erhältlichen Extraktionskits führten zu einem ausführlichen Methodikvergleich und zu einem neu entwickeltem Extraktionsprotokoll. Durch eine Kombination aus mechanischem Sporenwandaufschluss und nachfolgender Hitzebehandlung zusammen mit einem einfachen und verlässlichen Puffer eignet sich diese Methode hervorragend für die Untersuchung der Pilzartenzusammensetzung von Mykophagen. Möglicherweise erleichtert das modifizierte Protokoll auch weitere, aus anderen Quellen stammende DNA Extraktionen, die mit gleichen oder ähnlichen Schwierigkeiten behaftet sind.

Der Extraktionsvergleich wurde zwischen vier verschiedenen Methoden durchgeführt, zwei kommerziellen Extraktionskits, dem INVITEK PSP® Spin Stool DNA Kit für Extraktion und Aufreinigung der gesamten DNA (Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin, Germany), dem MO BIO Ultra Clean™ Fecal DNA Sample Kit (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) und mit zwei bereits für die DNA-Extraktion existierenden, etwas modifizierten Puffern statt. Diese Puffer wurden noch nie für die Extraktion der DNA aus Pilzsporen verwendet. Sieben, bzw. vier Proben wurden für den Vergleich herangezogen.

Diese unterschieden sich nicht nur in der Sporenzusammensetzung und -Menge, sondern waren auch von vier unterschiedlichen Kleinsäugerarten.

Ein weiteres Ziel neben der erfolgreichen Extraktion war die Klonierung und Sequenzierung zur eindeutigen Identifikation der Pilzarten in den Kleinsäugerkotproben. Da dieser Schritt im Vorfeld des Extraktionsvergleiches stattfand, sind die Proben, die für diese Untersuchungen herangezogen wurden, nicht ident mit denen des Extraktionsvergleiches. Sie stammen jedoch aus den gleichen Kleinsäugerfängen und wurden ebenfalls mit den beiden modifizierten Puffern extrahiert.

Material und Methoden

Die Untersuchungsgebiete

1. Das Wildnisgebiet Dürrenstein, nach IUCU Kriterien ein Kategorie-I-Gebiet, liegt im südwestlichen Niederösterreich, im östlichen Teil der Nördlichen Kalkalpen. Die Größe des gesamten Wildnisgebietes beträgt ca. 2.300 ha, es reicht von etwa 770 m bis 1.878 m ü. NN und schließt den größten zusammenhängenden Urwald Österreichs mit 460 ha Primärwald ein. Das Klima ist kühl und humid, es zählt zu den niederschlagsreichsten Gebieten Österreichs mit mehr als 2000 mm/Jahr, mit einem Niederschlagsmaximum im Sommer und schneereichen aber milden Wintern (Zukrigl 1961). Aufgrund der abgeschiedenen Lage war der menschliche Einfluss immer relativ gering, das Kerngebiet, der Urwald Rothwald, wurde bis heute nicht wirtschaftlich genutzt. Im Rahmen des LIFE-Projektes „Wildnisgebiet Dürrenstein“ wurde im Jahre 1998 und 1999 eine Erhebung der Mykoflora unter Leitung von Gabriele Kovacs durchgeführt. Mit mehr als 600 Arten an Großpilzen hat es einen hohen pilzökologischen Wert. Aber auch der enorme Anteil an symbiontischen Pilzen machte dieses Gebiet für die Fragestellung des Projektes besonders interessant.



Abb. 1 Windwurf- und Urwaldfläche im Wildnisgebiet Dürrenstein

2. Das Lehrforstzentrum Heuberg liegt an der niederösterreichisch burgenländischen Grenze im Rosaliengebirge. Es hat eine Fläche von 930 ha und reicht bis in Höhen von 725 m ü. NN. Die Wälder des Gebiets werden bewirtschaftet und ermöglichen so auch tiefergehende

Experimente. Der Niederschlag mit ca. 800 mm/Jahr ist deutlich geringer als der des Wildnisgebietes Dürrenstein und besitzt ein ausgeprägtes sommerliches Maximum. Die beiden Flächen unterscheiden sich trotz räumlicher Nähe in ihrer Baumartenzusammensetzung. Die eine Fläche (Abb. 2 links) ist heterogener, Buchen, Fichten und wenige Tannen mit reichlich Unterwuchs prägen das Bild. Die zweite Fläche (Abb. 2 rechts) wird von der Buche dominiert, Unterwuchs ist bis auf einige junge Buchen sehr gering ausgebildet.



Abb. 2 Die beiden Untersuchungsflächen im Lehrforst Rosaliengebirge

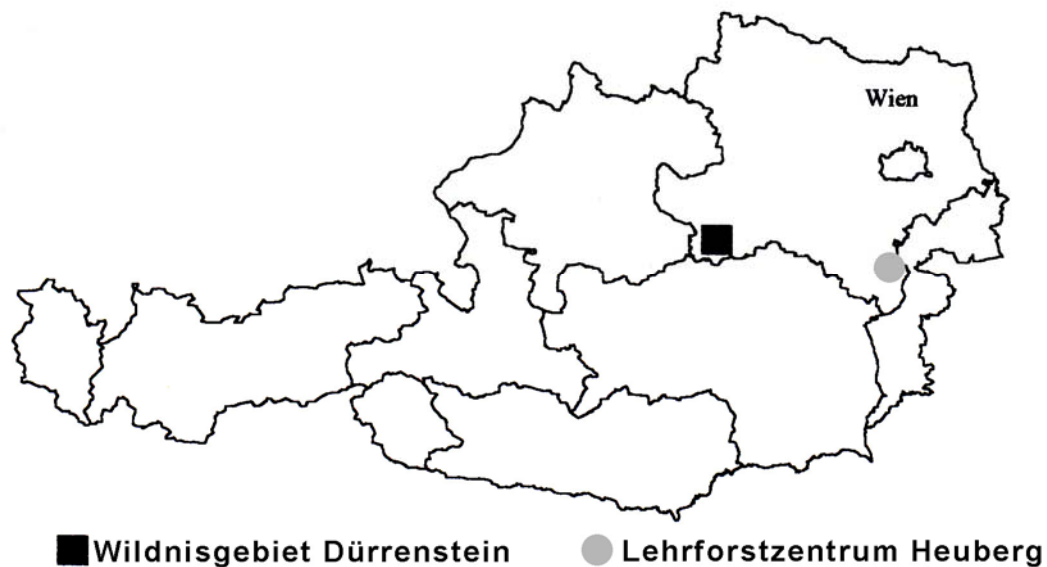


Abb. 3 Lage der beiden Untersuchungsgebiete in Österreich (Grenzen der Bundesländer eingezeichnet)

Kleinsäugerfang, Probennahme und Aufbewahrung der Proben

Der Kleinsäugerfang sowie die Probennahme fanden in den Jahren 2006 und 2007 im Wildnisgebiet Dürrenstein und im Lehrforstzentrum Heuberg statt. Die fünf Fangperioden des Wildnisgebietes deckten den gesamten saisonalen Verlauf der Kleinsäugerpopulation sowie die Vegetationsperioden ab. Im Lehrforst konnte der Kleinsäugerfang insgesamt achtmal durchgeführt werden, da aufgrund der Witterungen und der geringeren Schneebelastung auch Fänge im Winter und Frühjahr möglich waren.

Im Wildnisgebiet Dürrenstein wurde in drei unterschiedlich bewirtschafteten Waldtypen (Urwald, Wirtschaftswald, Windwurf), im Lehrforstzentrum Heuberg auf zwei bewirtschafteten Waldflächen mit je zwei Kontrollflächen gefangen.

Die Erlaubnis für den Kleinsäugerfang und die Probengewinnung im Wildnisgebiet Dürrenstein wurden von der Schutzgebietsverwaltung erteilt.

In einem bestehenden Raster mit 60 x 60 m Außenmaß, 25 Fallenpunkten mit je 15 m Abstand zueinander wurden 2 Lebendfallen in geeigneten Mikrohabitaten in unmittelbarer Nähe des Fallenpunktes platziert. Die Kleinsäugerfänge wurden nach internationalen Standards durchgeführt (Kirkland Jr., 1998; Powell & Proulx, 2003). Da von den Tieren ausschließlich die Kotproben benötigt wurden, stellte der Lebendfang die beste und am wenigsten invasive Art der Probennahme dar.

Zwei unterschiedliche Fallentypen (Holzkastenfallen, HKF, hergestellt für das Institut für Wildbiologie und Jagdwirtschaft; Field Trip Trap – Kleinsäugerfallen, FTT, Alana Ecology, Shropshire GB) wurden eingesetzt, zum einen um das seit Jahren laufende Kleinsäugermonitoring auf den Untersuchungsflächen zu gewährleisten, zum anderen um einen Vergleich hinsichtlich Fangerfolg und Überlebensrate der Fallen zu ermöglichen. Bis zum Jahr 2005 wurde das Monitoring ausschließlich mit den Holzkastenfallen durchgeführt.

Die HKF wird nach dem Auslösen durch ein Metallplättchen verschlossen. Dieser, durch eine Wippe ausgelöster Fallmechanismus hat ein Auslösegewicht von etwa > 4 g. Die Box besitzt keine räumliche Differenzierung. Aufgrund dessen musste auf die Bereitstellung von Nestmaterial und Futter verzichtet werden, da diese das Schließen der Falle durch

blockieren der Wippe behindert hätten. Als Köder kamen nur Erdnussbutterkekse und Apfelstücke, möglichst am hinteren Ende der Falle platziert, zum Einsatz. Die Fallenkonstruktion der FTT Kleinsäugerfalle ermöglicht die Bereitstellung von Nestmaterial und Futter, neben den auch hier als Köder verwendeten Erdnussbutterkekse und Apfelstücken. Das Auslösegewicht der FTT liegt bei $< 2\text{ g}$.

Beobachtete Fehlauflösungen, und dadurch für den Fangzeitraum bis zur nächsten Kontrolle nicht mehr verfügbare Fallen, waren bei den FTT höher, jedoch konnte nur mit diesem Fallentyp das gesamte Artenspektrum bodenlebender Kleinsäuger nachgewiesen werden zu fangen. Um die platzierten Fallen an den jeweiligen Fallenpunkten vor Feuchtigkeit und Überhitzung zu schützen sie mit Gras oder Rinde abgedeckt. Alle Fallen wurden an vor Sonneneinstrahlung geschützten Punkten aufgestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass der Fallenboden leicht abfällt, um bei starkem Regen eine Wasseransammlung in den Fallen zu verhindern.



Abb. 4 Die beiden verwendeten Fallentypen (links) sowie die Platzierung der Falle an einem geeigneten Standort (rechts)

Die Kontrolle der Fallen erfolgte täglich. Um den Aufenthalt der Tiere in den Fallen so kurz wie möglich zu halten wurde die erste Kontrolle zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Tagesanbruch und die zweite so spät als möglich durchgeführt. Eine empfohlene Fallenkontrolle bei Kleinsäufern von 4 x pro 24 h (Churchfield 1990), morgens, mittags, nachmittags und abends, war aufgrund der Kontrolldauer der einzelnen Flächen, der

Unzugänglichkeit des Gebietes, sowie den gesetzlichen Vorschriften im Untersuchungsgebiet nicht möglich.

Von den gefangenen Tieren wurden Daten wie Art, Gewicht, Schwanzlänge, Hinterfußlänge, Geschlecht und besondere Auffälligkeiten notiert. Bei den Wiederfängen wurde lediglich das Gewicht und das Geschlecht erneut bestimmt. Sofort nach Beendigung der Datenaufnahme wurden die Tiere vor Ort in die Freiheit entlassen. Beim ersten Fangerfolg wurde bei den Tieren ein Fellschnitt durchgeführt um diese eindeutig als Wiederfang identifizieren zu können. Kotproben wurden nur bei Neufängen genommen.

Die Entnahme der Probe erfolgte unterschiedlich abhängig vom Fallentyp. Während in der HKF der Kot aus der gesamten Box entnommen werden konnte, und diese nach jedem Fang komplett gereinigt und neubefüllt wurde, ermöglichte der Fallenaufbau der FTT, eine Probenentnahme nur aus dem Tunnel, der nach jedem Fang gründlich gereinigt wurde. Die Box wurde gereinigt und erneut mit frischem Material gefüllt.



Abb. 5 Arbeitsschritte des Kleinsäugerfanges: Platzierung der Falle; Entlassen des Säugers aus der Falle in ein Plastiksackerl für die Artbestimmung; Zuordnung des Geschlechtes; Kontrolle auf besondere Auffälligkeiten; Entnahme der Probe; Vermesung der Hinterfuß- und

Schwanzlänge; Bestimmung des Gewichtes mit einer Federwaage; Markierung durch einen Fellschnitt und Freilassen des gefangenen Tieres

Die Aufbewahrung und Lagerung der Proben erfolgte in zur Hälfte mit Silicagel gefüllten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die individuell nummeriert wurden, so dass deren Beschriftung eine Zuordnung zu Gebiet, Saison, Fläche, Kontrolle und Fallenpunkt zuließ. Diese konnten bis zur Weiterverarbeitung für mikroskopische und molekulare Analysen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Mikroskopische Analyse

Vor der mikroskopischen Analyse wurden die Kotpellets von überschüssigem Pflanzenmaterial und Silicagel getrennt und in 600 µl destilliertem Wasser aufgelöst. Nach der Entnahme des Anteils für die mikroskopische Analyse wurde der Rest bis zur molekularen Weiterverarbeitung tiefgefroren.

Auswahl der Proben für den molekularen Extraktionsvergleich

Die Auswahl der Kotproben für den Extraktionsvergleich erfolgte nach Kleinsäugerart, durchschnittlicher Sporenanzahl und Sporenzusammensetzung. Faktoren wie inhibierende Substanzen, geringe Sporenanzahl oder artspezifische Nahrungspräferenzen wurden mit der Wahl der Proben bestmöglich abgedeckt. Kotproben von vier verschiedenen Kleinsäugerarten (*Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus agrestis* und *Sorex minutus*) (Abb. 6) mit geringer, mittlerer sowie hoher Sporenanzahl wurden für den Extraktionsvergleich verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1 Kleinsäugerart, durchschnittliche Anzahl der Sporen pro Gesichtsfeld (bei 400facher Vergrößerung und 50 ausgezählten Gesichtsfeldern) sowie Anzahl der Sporentypen der für den Vergleich verwendeten Kleinsäugerkotproben (1-7)

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
Art	<i>M. glar</i>	<i>A. flav</i>	<i>M. agr.</i>	<i>M. glar</i>	<i>S. min.</i>	<i>M. glar.</i>	<i>M. glar.</i>
Sporen/Gf	8,86	29,42	13,8	94,38	1,26	1,62	74,38
Sporentypen	7	5	7	7	3	6	6



Abb. 6 Die vier verschiedenen Kleinsäugerarten (l.o.:*Myodes glareolus*, l.u.:*Apodemus flavicollis*, r.o.: *Microtus agrestis* und r.u.:*Sorex minutus*) deren Proben für den Extraktionsvergleich verwendet wurden

Extraktionskits und verwendete Puffer

Getestet wurden zwei kommerzielle Extraktionskits, der INVITEK PSP® Spin Stool DNA Kit für Extraktion und Aufreinigung vollständiger DNA (Invitek Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin, Germany) sowie der MO BIO Ultra Clean™ Fecal DNA Sample Kit

(MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA). Beide Extraktionen wurden bis auf die vorangehende Zugabe von Quarzsand und Glasperlen für den mechanischen Aufschluss der Sporen beim INVITEK PSP® Extraktionskit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Fall des Ultra Clean™ Fecal DNA Sample Kit standen nur vier Stück zu Verfügung, deswegen mussten im Vorfeld vier der sieben für den Vergleich gewählten Proben vorselektiert werden. Die Proben mit der Nummer 1, 3, 4 und 5 erfüllten die Voraussetzungen, nämlich eine möglichst große Bandbreite bezogen auf Art, Probenmenge, Anzahl der durchschnittlichen Sporen sowie Menge durchschnittlicher Sporentypen abzudecken, am besten. Alle Proben wurden im Anschluss an den mechanischen Sporenwandaufschluss mikroskopisch auf noch intakte Pilzsporen kontrolliert.

Das adaptierte Extraktionsprotokoll wurde mit zwei bereits für die DNA-Extraktion verwendeten Puffern durchgeführt. Der erste (AnDNA) wurde für die Extraktion sehr alter DNA entwickelt (Rohland & Hofreiter, 2007), der zweite (TNES) ist ein bewährter Lysispuffer (Manian *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 1988; Paolocci *et al.*, 1999) für die Extraktion von RNA und DNA aus verschiedensten Materialien. Beide wurden jedoch noch nie für die Extraktion der DNA aus Pilzsporen verwendet.

Der AnDNA-Puffer besteht aus 400 mM EDTA sowie 0.5 mg/ml Proteinase K und destilliertem Wasser. Die Zusammensetzung des TNES-Puffers ist wie folgt: 10 mM Tris HCl, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.6 % SDS, 0.5 mg/ml Proteinase K und destilliertem Wasser. Genaue Bezeichnungen sowie Funktion der Substanzen im Puffer sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2 Substanzen und Funktion der einzelnen Pufferbestandteile

Substanz	Funktion
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Detergenz, inhibiert durch Komplexbildung mit Metallionen DNAsen und Proteinasen
Proteinase K	Abbau von Proteinen und Freisetzung von Nukleinsäuren
Tris HCl	pH Puffer, Stabilisierung der DNA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Denaturierungsmittel für Proteine

Die benötigten Chemikalien wurden von unterschiedlichen Laborbedarfslieferanten bezogen (Fermentas, Merck, Sigma, Roth, AppliChem).

Für den direkten Vergleich der vier Methoden musste das Ausgangsmaterial aliquotiert und in einer Zentrifuge vakuumgetrocknet werden. Das Gewicht jeder Probe wurde vor und nach der Trocknung ermittelt. Die Trockengewichte der aliquotierten Proben sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3 Gewicht der Proben in mg nach Aliquotierung und Trocknung für die Extraktion mit AnDNA Extraktionspuffer, TNES Extraktionspuffer, INVITEK PSP® Spin Stool DNA Kit und MO BIO Ultra Clean™ Fecal DNA Sample Kit

Probennummer	1	2	3	4	5	6	7
AnDNA	8	4	1	2	16	15	6
TNES	6	3	1	13	14	14	12
INVITEK Kit	6	2	1	9	8	22	11
MO BIO Kit	6	3	1	9	4	18	15

Extraktionsprotokoll (AnDNA, TNES)

Zu jedem getrockneten Aliquot der Probe, aufbewahrt in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen, wurden 600 µl des entsprechenden Extraktionspuffers zupipettiert und diese so gut wie möglich darin gelöst. Für den mechanischen Aufschluss wurden 2-3 Spatelspitzen Quarzsand (SIGMA) und fünf Glasperlen (~ 2mm Durchmesser) in jedes Reaktionsgefäß gegeben und mit Parafilm zusätzlich abgedichtet und verschlossen. Vorhergehende Tests zeigten, dass die Kombination von Sand und Glasperlen die effektivste Methode war, den vollständigen mechanischen Aufschluss der Pilzsporen zu gewährleisten. Die Reaktionsgefäße wurden in einer Kugelmühle (Retsch, MM301, Düsseldorf, Germany) platziert und bei einer Frequenz von 30 Vibrationen/Sekunde für 20 Minuten gerüttelt. Im Anschluss erfolgte eine mikroskopische Kontrolle.

Zur Denaturierung der Proteine und anderer inhibierender Substanzen wurden die Proben über Nacht in einem Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 55°C und 800 rpm inkubiert.

Alle Zentrifugenschritte wurden, wenn nicht angeführt, bei maximaler Geschwindigkeit mit dem Model Eppendorf Zentrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Nach 1 Minute in der Zentrifuge konnte der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben werden. Anschließend wurden die Proben kurz geschüttelt und erneut 10 Minuten zentrifugiert. Von den zwei Phasen wurde die obere der beiden Phasen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Durch Zugabe von 1/10 des Volumens Natriumacetat und 2/3 des Volumens Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur sowie weiteren 30 Minuten in der Zentrifuge formte sich ein DNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes. Der Überstand wurde entsorgt und das Pellet zweimal mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran bei 55 °C bis zur vollständigen Verdampfung des Ethanols getrocknet und danach in 50 µl 10mM Tris-HCl bei 55 °C und 1000 rpm in einem Eppendorf Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mithilfe des Invisorb® Spin PCRapid Kit (Invitex Gesellschaft für Biotechnik & Biodesign mbH, Berlin, Deutschland). Die Zentrifugenzeiten in Schritt zwei und vier wurden auf 1,5 Minuten und 10 Minuten ausgedehnt. Das Volumen des Elution Buffers in Schritt fünf auf 40 µl erhöht, die Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem Elution Buffer auf 10 Minuten verlängert. Bis auf diese, vom Hersteller empfohlenen Modifikationen wurde die Aufreinigung nach Anleitung durchgeführt.

Laut Hersteller eignet sich der auf Membran-Adsorption basierte Kit für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit einer Fragmentlänge von 80 bp – 30 kb. Abhängig von der Fragmentlänge liegt die Aufreinigungsrate bei 60 – 85 %.

Die DNA-Konzentration der Extrakte wurde mit einem Photometer (Nanodrop; spectral photometer ND 1000, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland) gemessen

und mit je 2 µl des Extraktes plus 1 µl des Ladefarbstoffes auf einem 1 % TAE (Tris Acetat EDTA) –Agarose Gel kontrolliert und dokumentiert.

PCR Analyse

Im Anschluss an die Extraktionsvarianten wurden alle Proben bei – 20 °C aufbewahrt. Um Pilz-DNA mittels PCR nachzuweisen, wurden die beiden pilzspezifischen Primer ITSF1 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTTA) und TW14 (GCTATCCGAGGGAACTTC) für die Amplifikation eines DNA-Fragmentes verwendet. ITSF1 bindet an die ITS-Region (internal transcribed spacer) (Gardes & Bruns, 1993), TW 14 an einen Abschnitt der großen nuklearen 28S rDNA (entworfen von T. Bruns, <http://plantbio.berkeley.edu/~bruns/tour/primers.html>).

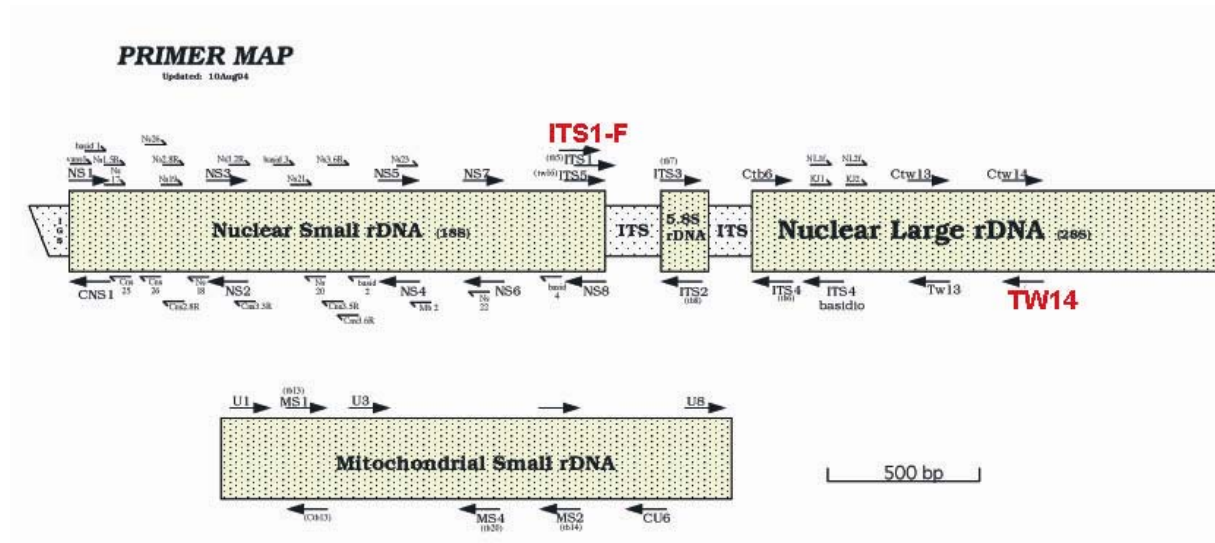


Abb. 7 Primerkarte, verwendete Primer sind rot gekennzeichnet

Unter Verwendung unserer Extrakte als DNA-Vorlage wurden Fragmente der Pilz-DNA in der Größe von 1200 bis 1500 bp amplifiziert. Aufgrund der Größenvariabilität der amplifizierten DNA-Fragmente (Carriconde *et al.*, 2008; Farmer & Sylvia 1998; Horton & Bruns, 2001; Horton 2002; Ranjard *et al.*, 2001; Tedersoo *et al.*, 2006) kam als Leiter der GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) zum Einsatz. Die PCR Reagenzienmischung sowie

das PCR Programm sind in Tabellen 4 und 5 beschrieben.

Tabelle 4 PCR Reagenzienmischung der Proben nach Extraktion

Inhalt	Menge
dest. Wasser	
Taq Buffer + NN3SO4	1 x (Fermentas)
MgCl2	25 mM (Fermentas)
BSA (Bovines Serumalbumin)	0,8 µg/ µl
DMSO	1 %
Primer 1	0,5 µM
Primer 2	0,5 µM
dNTP's	200 µM
Taq DNA Polymerase	1 u/ µl (Fermentas)
DNA	1 u/ µl (~ 50 ng)

Tabelle 5 PCR Programm

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Initialisierung	1	95	2
Denaturierung	40	95	0,5
Primerhybridisierung	40	54	0,5
Elongation	40	72	1,5
letzte Elongation	1	72	10
Abkühlung	1	8	1
Kühlung	~	4	~

Klonierung

Die Auswahl der Proben für die Klonierung wurde aufgrund der besten PCR Resultate nach der Extraktion getroffen. 11 Proben konnten im Rahmen der Diplomarbeit erfolgreich kloniert werden. Die Klonierung erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing pCR 4 TOPO vector von Invitrogen und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Vor jedem Klonierungsansatz wurde neues LB (lysogeny broth)–Medium zum Befüllen der Petrischalen aus 10 g Pepton, 5 g Hefe, 5 g NaCl sowie 15 g Agar pro 1l destilliertem

Wasser hergestellt. Dieses mussten autoklaviert und mit 25 mg/ 500 ml Antibiotikum Ampicillin (Ampicillin–Natriumsalz, AppliChem) angereichert werden. Um ein optimales Wachstum der Kolonien zu gewährleisten wurden die Petrischalen mit dem Nährmedium vor dem Ausstreichen auf 37 °C im Wärmeschrank erhitzt. Vier unterschiedlichen Verdünnungsstufen (30µl, 60µl, 90µl und dem Rest) der kompetenten Zellen beim Auftragen auf das Nährmedium erleichterten im weiteren Verlauf die Auswahl der gewachsenen Kolonien. Über Nacht bei 37 °C inkubiert konnten am nächsten Tag von jeder klonierten Probe maximal 96 positive *E. coli* Kolonien auf eine neue LB-Platte überimpft und gleichzeitig in 70 µl 10 mM TrisHCl-Puffer zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Zehnminütiges Erhitzen der Pufferlösung auf 96 °C zerstörte die kompetenten Zellen und setzte die klonierte DNA frei.

PCR und RFLP Analyse

(RestriktionsFragmentLängenPolymorphismus)

Für die Amplifizierung der Vektor-DNA wurde das gleiche PCR-Proramm wie auch schon für die Amplifikation der Extrakte verwendet. Nur der PCR-Reaktionsmix änderte sich, die PCR wurde mit dem REDTaq®ReadyMix™ durchgeführt, und ist in Tabelle 6 angeführt. Weiters kamen statt der pilzspezifischen Primern zwei im Klonierungskit enthaltene Primer, M13f und M13r, zum Einsatz. Die genaue Lage und Sequenz der Primer ist in der pCR®II-TOPO® Abbildung in der Herstelleranleitung enthalten.

Tabelle 6 PCR Reagenzienmischung für die Amplifikation der Vektor-DNA

Inhalt	Menge
dest. Wasser	
Puffer	1 x (Fermentas)
DMSO	1 %
Primer 1	1 µM
Primer 2	1 µM
dNTP's	200 µM
REDtaque	1 u/ µl (Fermentas)
DNA	1 u/ µl (~ 50 ng)

Direkt im Anschluss an die PCR fand der Enzymverdau der RFLP-Analyse statt. Diese Analyse ermöglichte eine Auswahl der unterschiedlichen Sporentypen. Die klonierten und amplifizierten DNA Fragmente wurden mithilfe der Restriktionsendonuklease BSU RI (Fermentas) enzymatisch geschnitten. Das Enzym BSU RI schneidet die DNA an verschiedenen Erkennungssequenzen (Kiss *et al.* 1985), wodurch DNA Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Zu 10 µl wurden 0,5 µl BsuRI (10u/ µl, 3000u; Fermentas) und 0,5 µl Buffer R (10x mit BSA; Fermentas) gegeben und der Verdau mit folgendem Programm durchgeführt (Tabelle 7).

Tabelle 7 Programm für den Enzymverdau der RFLP-Analyse

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Aktivierung	1	37°C	60
Inaktivierung	1	85°C	15
Wartezeit	1	15	~

Die Kontrolle der gebildeten Restriktionsfragmentmuster erfolgte auf einem 1 %-igem TAE-Gel. Für die Detektion der Banden wurden 2 µl des PCR-Produktes in die Geltaschen geladen und 45 min bei 100 Volt laufen gelassen. Im Anschluss daran erfolgte mittels visueller Fragmentmusteranalyse die Auswahl der einzeln vorkommenden Typen und die Kennzeichnung der Klonierungsprodukte für die nachfolgende Sequenzierung.

PCR und Sequenzierung

Das Entschlüsseln der DNA-Sequenz war der letzte Schritt der Arbeit, nur mit diesem konnten die extrahierten und amplifizierten Fragmente eindeutig einer Pilzart zugewiesen werden.

Durch eine weitere PCR wurde die DNA der Einzeltypen nochmals amplifiziert. Reaktionsmix und Programm waren bis auf die Verwendung der Primer ITSF1 und TW14 ident mit denen der RFLP-Analyse. Es folgte ein Enzymverdau, EXO I (Exonuklease I) entfernt alle noch in dem Reaktionsmix vorkommenden DNA-Einzelstränge, baut übrig gebliebene Primer und schneidet die Phosphate von den dNTP's um diese zu inaktivieren. Der Mastermix pro 25 µl PCR Produkt für den Enzymverdau enthielt 0,5 µl EXOI sowie 2,0 µl CIAP (SIGMA), und fand nach folgendem Programm im TGradient Whatman Biometra statt. (Tabelle 8)

Tabelle 8 Programm für den Enzymverdau vor der Sequenzierung

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Aktivierung	1	37°C	45
Inaktivierung	1	85°C	15

Anschließend mussten die Produkte für die Sequenzierung vorbereitet werden. Ein Mastermix aus 1,0 µl Big Dye (Fermentas) 0,5 µl Primer (ITSF1 oder TW14) sowie 8,5 µl DNA-Vorlage wurde hergestellt. Das verwendete Programm für diesen Schritt ist Tabelle 9 zu entnehmen, durchgeführt wurde auch dies mit dem TGradient Whatman Biometra.

Tabelle 9 Programm für das Cycle Sequencing

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
Initialisierung	1	96	1
Denaturierung	35	96	10s
Primerhybridisierung	35	50	5s
Elongation	35	60	3
Kühlung		4	Pause

Die weiteren Schritte der Sequenzierung, die Sephadex-Aufreinigung zur Entfernung der ungebrauchten Big Dye Inhalte (fluoreszenzmarkierte ddNTP's) sowie niedermolekulare Produkte und die automatische Sequenzierung im 16-Capillary Sequencer ABI 3130xl Genetic Analyser wurden von den zuständigen Mitarbeitern des Departments für Botanische Systematik und Evolutionsforschung am Fakultätszentrum für Biodiversität (ehemals Institut für Botanik) durchgeführt.

Blasting

Mit dem Programm FinchTV, einem frei erhältlichen Programm zur Darstellung der Chromatogramme ist eine rasche Kontrolle der Sequenzen und eine schnelle und eindeutige Identifikation möglich. Mithilfe der BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) -Funktion wird die Sequenz direkt in die Datenbank exportiert und dort nach einstellen weniger Suchparameter mit den zur Verfügung stehenden Sequenzen auf ihre Ähnlichkeit verglichen.

Ergebnisse

Kleinsäugerfang

Insgesamt konnten in beiden Gebieten mehr als 1300 Tiere gefangen werden. Bei 851 Fängen handelte es sich um neue Individuen von denen Kotproben genommen wurde.

Im Wildnisgebiet Dürrenstein wurden auf sechs Untersuchungsflächen 398 Neufänge gezählt, die Verteilung der Fangzahlen zwischen den Typen ist relativ homogen (Windwurf: 118 Fänge; Wirtschaftswald: 134 Fänge; Urwald: 146 Fänge).

453 Neufänge waren das Resultat der Fänge im Lehrforstzentrum Heuberg. Dass diese etwas mehr als die Hälfte der Gesamtfänge ausmachen, kann dadurch erklärt werden, dass in diesem Gebiet neben den Frühjahr-, Sommer- und Herbstfängen auch noch Winterfänge im Februar 2007, 2008 und ein Erstfang im April 2006 stattfanden.

Zehn Arten aus den Familien der Echten Mäuse (*Muridae*), Wühlmäuse (*Arvicolidae*), Schläfer (*Gliridae*) Spitzmäuse (*Soricidae*), und eine Art der Marderartigen (*Mustelidae*) konnten mithilfe der Lebendfallen nachgewiesen werden.

Die Artenzusammensetzung der Kleinsäugergemeinschaft in den beiden Untersuchungsgebieten ist bis auf wenige Ausnahmen ident. In beiden Gebieten konnten die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), Rötelmaus (*Myodes glareolus*), Erdmaus (*Microtus agrestis*), Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) und der Zwergspitzmaus (*Sorex minutus*) gefangen werden. Neben diesen Arten finden sich im Wildnisgebiet noch die Alpenspitzmaus (*Sorex alpinus*), die Kurzohrmaus oder Kleinäugige Wühlmaus (*Microtus subterraneus*) sowie der Siebenschläfer (*Glis glis*). Die Arten Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und Zwergmaus (*Micromys minutus*) konnten nur im Lehrforst nachgewiesen werden. Neben diesen fand sich auch ein Mauswiesel (*Mustela nivalis*) in einer Falle. Nomenklatur der Kleinsäuger folgt Wilson & Reeder (2005).

Da der Kleinsäugerfang mit zwei unterschiedlichen Fallentypen durchgeführt wurde, lassen sich neben der Arteninventur der beiden Gebiete auch noch Aussagen bezüglich der beiden

getesteten Fallentypen machen. Die Anzahl der Fänge war mit den FTT etwa doppelt so hoch als mit der HKF (FTT: 372; HKF: 178). Neben dieser Verschiedenheit gab es noch deutlichere Unterschiede in der Artenzusammensetzung, bei beiden Fallentypen. Dies gilt besonders für die Familie der *Soricidae*. Im Vergleich wurden 51:13 Waldspitzmäuse und 83:1 Zwergspitzmäuse in der FTT im Gegensatz zu der HKF gefangen. Die Zwergspitzmaus löste mit ihrem durchschnittlichen Gewicht von 3,5 g den Mechanismus der HKF während der gesamten Fangsaison nur ein einziges Mal aus.

Auch die Erdmäuse waren mit 11 Individuen häufiger in der FTT gefangen als mit vier Individuen in der HKF. Bei der Rötelmaus und der Alpenspitzmaus wurden keine großen Unterschiede in der Fangeffizienz der Fallentypen festgestellt.

Die Wiederfangrate der HKF war deutlich höher, etwa jedes dritte Tier wurde davor bereits schon einmal gefangen, bei der FTT war es hingegen nur jedes fünfte.

Bezüglich der Mortalitätsrate muss erneut auf das Artniveau eingegangen werden. Auf diesem zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Fallentypen, besonders für die Familie der Spitzmäuse. Die Mortalitätsrate für die Spitzmäuse betrug in der HKF etwa 90 %, in der FTT konnte dieser Wert auf 50 % für die Alpenspitzmaus, 24 % für die Zwergspitzmaus und 41 % für die Waldspitzmaus gesenkt werden. Bis auf die Gelbhalsmaus mit einer 6-mal höheren Mortalität in den HKF zeigten alle anderen Arten eine sehr geringe Sterberate (Rötelmaus insgesamt 2 Totfänge in der FTT, einer in der HKF) bzw. wurden gar keine Individuen tot in den Fallen aufgefunden.

Extraktionsvergleich

Es gibt deutliche Unterschiede in der Extraktionseffizienz der vier angewendeten Methoden, diese sind sowohl in den photometrischen Analysen (siehe Tabelle 10) als auch in den Agarosegelelektrophoresebildern (siehe Abb. 8) zu erkennen.

Tabelle 10 DNA-Konzentrationen der Extrakte nach allen Extraktionsprotokollen gemessen mit dem Nanodrop-Photometer in ng/ µl

Probennummer	Absorptionslevel in ng/ µl			
	AnDNA	TNES	INVITEK	MO BIO
1	17,4	211,1	44,7	273,7
2	29,7	55,6	13,1	nicht extrahiert
3	65,2	104,5	20,1	151,4
4	40,3	358,5	45,5	242,4
5	15,0	16,2	8	133,6
6	18,0	317,4	40,4	nicht extrahiert
7	15,3	18,8	11,6	nicht extrahiert
Mittelwert	28,7	154,6	26,2	200,3

Unter alleiniger Berücksichtigung der photometrischen Analyse mit dem Nanodrop Photometer würde man annehmen, dass der MO BIO Kit gefolgt vom TNES Extraktionspuffer den anderen zwei Extraktionsmethoden überlegen ist. Beide zeigten bei der Messung des DNA-Gehaltes einen fünf bis achtmal höheren Mittelwert als nach Extraktion mit dem AnDNA-Puffer und Invitek Kit.

Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 8, die Gelelektrophorese völlig andere Ergebnisse, die hellsten DNA-Banden erzielt der TNES-Puffer, gefolgt vom AnDNA-Puffer. Weder beim INVITEK, noch beim MoBIO-Kit sind Banden zu erkennen. Wie man weiters in Abbildung 8 sehen kann, zeigen die Banden der Extraktion mit dem AnDNA-Puffer zwar relativ schwache Intensitäten mit hoher Variabilität in der Größe, aber viel weniger kurze Fragmente als mit der Extraktion des TNES-Puffers. Die Banden des TNES-Puffers sind zwar generell heller als die des AnDNA-Puffers, dafür kann bei diesem eine Mischung aus kurzen und langen Fragmenten beobachtet werden. Vor allem die Menge der kurzen Fragmente ist auffällig hoch.

Obwohl die photometrischen Messungen des DNA-Gehaltes der Extrakte vom INVITEK ähnliche Absorptionsbanden wie die des AnDNA-Puffers aufweisen, konnte auf dem Gelelektrophoresebild und einer Anfärbung mit Ethidiumbromid keinerlei DNA nachgewiesen werden. Ein ähnliches Ergebnis liefert das Bild für den Vergleich mit dem MO BIO Kit,

obwohl dieser im Unterschied zum INVITEK Kit viel höhere DNA Messwerte aufweist. Auch beim MO BIO Kit konnten keinerlei DNA Banden der Extrakte auf dem Gelbild detektiert werden.

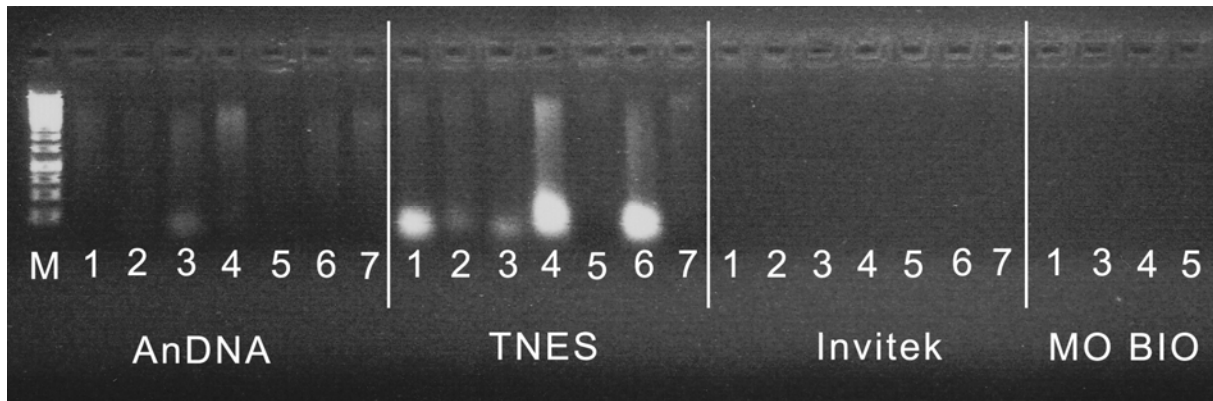


Abb. 8 Agarosegelbild aller Extrakte; Spur 1: M – DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp Plus, Fermentas), Spur 2-8: Probe 1-7 extrahiert mit dem AnDNA-Puffer; Spur 9-15: Probe 1-7 extrahiert mit dem TNES-Puffer; Spur 16- 22: Probe 1-7 extrahiert mit dem Invitek Kit; Spur 23-26: Probe 1, 3, 4 und 5 extrahiert mit dem MO BIO Kit

Um herauszufinden ob zwischen den Beobachtungen und Messungen Übereinstimmungen bestehen wurde eine Ranganalyse zwischen der eingesetzten Probenmenge, der beobachteten Sporenmenge, dem gemessenen DNA-Gehalt und der Intensität des Agarose-Gelelektrophoresebildes durchgeführt. Die Reihung der Probennummern (1-7, bzw. 1, 3, 4 und 5) erfolgte nach absteigender Probenmenge, Sporenmenge, gemessenem DNA-Gehalt sowie optisch beobachtbarer Intensität der Banden. Alle gefundenen Übereinstimmungen sind in Tabelle 11 grau hervorgehoben. Der Vergleich der Bandenintensität des Gelbildes mit den drei anderen Kategorien erfolgte nur für die beiden Puffer AnDNA und TNES, da bei den kommerziellen Kits leider keine Banden erkennbar waren.

Tabelle 11 Ranganalyse der eingesetzten Probenmenge, beobachteter Sporenmenge, gemessenem DNA-Gehalt und Intensität des Agarose-Gelelektrophoresebildes nach der Extraktion, Korrelationen grau hervorgehoben

Kategorie/ Extrakte	Rangreihenfolge der Probennummer						
Eingesetzte Probenmenge/AnDNA	5	6	1	7	2	4	3
Beobachtete Sporenmenge/AnDNA	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/AnDNA	3	4	2	6	1	7	5
Intensität Gelelektrophorese/AnDNA	4	3	7	6	1	2	5
Eingesetzte Probenmenge/TNES	5	6	4	7	1	2	3
Beobachtete Sporenmenge/TNES	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/TNES	4	6	1	3	2	7	5
Intensität Gelelektrophorese/TNES	4	6	1	3	2	7	5
Eingesetzte Probenmenge/INVITEK	6	7	4	5	1	2	3
Beobachtete Sporenmenge/INVITEK	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/INVITEK	4	1	6	3	2	7	5
Eingesetzte Probenmenge/MO BIO	4	1	5	3			
Beobachtete Sporenmenge/MO BIO	4	3	1	5			
Gemessener DNA Gehalt/MO BIO	4	1	3	5			

Die eingesetzte Kotprobenmenge für die Extraktion scheint die geringste Rolle zu spielen, im Falle des MO BIO Kits korrelieren zwei der vier Proben zwischen Probenmenge und gemessenem DNA-Gehalt. Beim TNES-Puffer trifft dies auf die Probe Nummer 6 auf Rang 2 zu. Die meisten Zusammenhänge finden sich zwischen beobachteter Sporenmenge, gemessenem DNA-Gehalt und im Fall der beiden „in house“-Puffer, Intensität der Banden auf dem Gelbild. Besonders bei der Extraktion des TNES-Puffers entsprechen die mit dem Nanodrop-Photometer gemessenen DNA-Gehalte in allen Fällen der Bandenintensität des Gelbildes. Das Bild verdeutlicht jedoch sehr schön, dass für die hohen Meßwerte vor allem kurze Fragmente eine Rolle spielen, ihre Intensität ist am größten. Auch das Gelbild der mit dem AnDNA extrahierten Proben zeigt mit der Reihenfolge der gemessenen DNA-Gehalte eine Übereinstimmung in drei von sieben Fällen.

PCR

Noch deutlicher als die Ergebnisse der Extrakte lassen die der PCR erkennen, dass die beiden modifizierten Puffer nach unserem Protokoll den beiden kommerziellen Kits überlegen sind. Dies resultiert nach beiden Methoden in den höchsten Absorptionswerten gemessen mit dem Nanodrop-Photometer (Tabelle 12) sowie den hellsten erkennbaren Banden am Agarose-Gelbild (Abb. 9). Obwohl die photometrischen Messungen der PCR-Produkte des INVITEK-Kits ähnlich hohe DNA-Gehaltswerte erzielen waren auch in diesem Fall keine Banden auf dem Agarose Gelbild detektierbar. Im Gegensatz dazu waren die Messwerte des MO BIO Kits verhältnismäßig gering, trotzdem konnten in drei von vier Fällen Banden abgebildet werden. Nur die Probe Nummer 5, mit dem geringsten Sporengehalt zeigte kein Bild. Auffällig ist jedoch, dass die Intensitäten der Banden des MO BIO-Kits generell schwächer sind als die des AnDNA- und des TNES-Puffers.

Tabelle 12 DNA-Konzentrationen der PCR-Produkte nach allen Extraktionsprotokollen gemessen mit dem Nanodrop-Photometer in ng/ μ l

Probennummer	Absorptionslevel in ng/ μ l			
	AnDNA	TNES	INVITEK	MO BIO
1	171,7	131,3	175,2	111,0
2	177,7	183,0	111,4	nicht extrahiert
3	172,1	172,2	168,8	148,6
4	159,3	201,6	160,7	142,6
5	178,7	163,2	118,4	112,9
6	178,9	nicht gemessen	163,9	nicht extrahiert
7	169,5	180,1	163,1	nicht extrahiert
Mittelwert	172,5	171,9	151,6	128,8

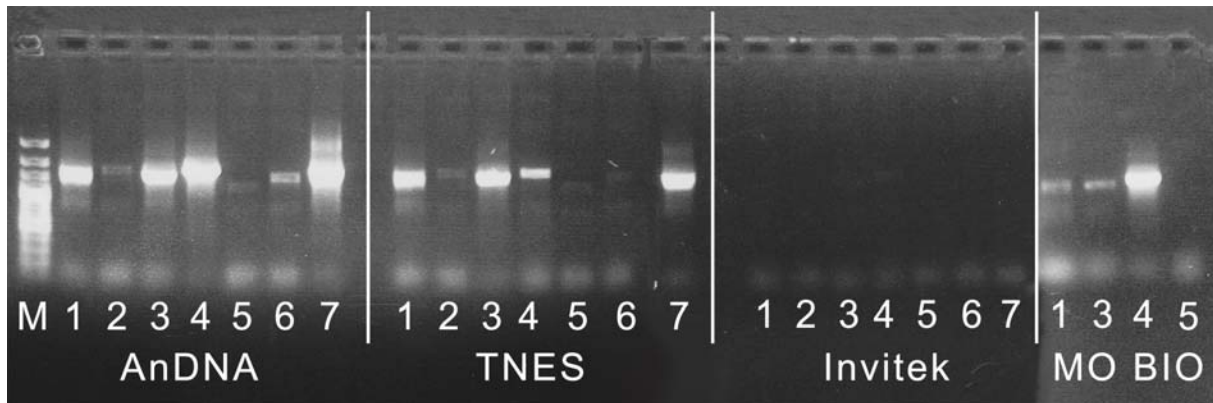


Abb. 9 Agarosegelbild aller PCR-Produkte; Spur 1: M – DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp Plus, Fermentas), Spur 2-8: Probe 1-7 extrahiert mit dem AnDNA-Puffer; Spur 10-16: Probe 1-7 extrahiert mit dem TNES-Puffer; Spur 18- 24: Probe 1-7 extrahiert mit dem Invitek Kit; Spur 25-28: Probe 1, 3, 4 und 5 extrahiert mit dem MO BIO Kit

Um eine Übersicht der Übereinstimmungen zu bekommen wurden wieder Ranganalysen, mit der absteigenden Reihenfolge der eingesetzten Probenmenge, der gezählten Sporenanzahl, der Nanodrop-Photometer-Messung sowie der Intensität der Banden der Agarosegelelektrophorese (Tabelle 13) durchgeführt.

Tabelle 13 Ranganalyse der eingesetzten Probenmenge, beobachteter Sporenmenge, gemessenem DNA-Gehalt und Intensität des Agarose-Gelelektrophoresebildes nach der PCR, Korrelationen grau hervorgehoben

Kategorie/PCR	Rangreihenfolge der Probennummer						
Eingesetzte Probenmenge/AnDNA	5	6	1	7	2	4	3
Beobachtete Sporenmenge/AnDNA	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/AnDNA	6	5	2	3	1	7	4
Intensität Gelelektrophorese/AnDNA	7	4	3	1	6	2	5
Eingesetzte Probenmenge/TNES	5	6	4	7	1	2	3
Beobachtete Sporenmenge/TNES	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/TNES	4	2	7	3	5	1	
Intensität Gelelektrophorese/TNES	3	7	1	4	2	6	5
Eingesetzte Probenmenge/INVITEK	6	7	4	5	1	2	3
Beobachtete Sporenmenge/INVITEK	4	7	2	3	1	6	5
Gemessener DNA Gehalt/INVITEK	1	3	6	7	4	5	2
Intensität Gelelektrophorese/INVITEK	keine sichtbaren Banden am Agarose-Gelbild						
Eingesetzte Probenmenge/MO BIO	4	1	5	3			
Beobachtete Sporenmenge/MO BIO	4	3	1	5			
Gemessener DNA Gehalt/MO BIO	3	4	5	1			
Intensität Gelelektrophorese/MO BIO	4	1	3	5			

Ähnlich wie bei der Ranganalyse der Extrakte finden sich auch bei der PCR die wenigsten Zusammenhänge bei eingesetzter Probenmenge und DNA-Gehalt bzw. Intensität der Banden am Gelbild. Wieder nur in zwei der vier Fälle des MO BIO-Kits ist eine Übereinstimmung zu finden, die Korrelation bei Probe Nummer 6 nach dem TNES-Extraktionsprotokoll ist nicht mehr vorhanden. Beim Invitek-Kit konnte in keiner der sieben Proben eine Übereinstimmung der Reihenfolge gefunden werden. Bei der Extraktion mit dem AnDNA-Puffer stimmen bei Probe Nummer 2,3 und 1 die beobachtete Sporenmenge mit dem gemessenen DNA-Gehalt überein. Dies gilt für die TNES-Extraktion für Probe 4 und 3. Nach diesem Protokoll ergeben sich die meisten Zusammenhänge zwischen Sporenmenge und Intensität der Banden, nämlich bei Probennummer 7, 6 und 5. Die Korrelationen

zwischen Sporenmenge und gemessenem DNA-Gehalt bzw. Bandenintensität ist auf den Einsatz pilzspezifischer Primer zurückzuführen, die für die Amplifikation verwendet wurden. Es war zu erwarten, dass dies sich in den Ergebnissen positiv abzeichnet. Im Großen und Ganzen ist bei der Reihenfolge der absteigenden Ränge sowohl bei der Extraktion als auch bei der PCR-Analyse eine homogenere Verteilung bei den modifizierten Puffern nach dem neuen Protokoll erkennbar. Diese lassen einen Rückschluss der extrahierten DNA auf die Menge der eingesetzten Sporen, vor allem im Bereich der geringeren Sporenanzahlen zu. Die Probe Nummer 5 mit einer durchschnittlichen Sporenmenge von 1,26 Sporen pro Gesichtsfeld bei 400x Vergrößerung ist bei beiden Extraktionsvarianten beim Vergleich zwischen beobachtbarer Sporenmenge und Intensität der Banden immer auf dem letzten Rang zu finden.

Klonierung, RFLP und Sequenzierung

Neben der erfolgreichen Extraktion war ein weiteres Ziel der Arbeit die häufigsten der in den Kleinsäugerkotproben vorhandenen Pilzsporen eindeutig identifizieren zu können und die Ergebnisse mit den mikroskopisch gewonnenen Informationen zu vergleichen. Aus Zeitgründen wurde die Klonierung nur mit 20 Proben durchgeführt, neun Ansätze führten zu keinen Resultaten. Das Endergebnis waren ca. 140 Sequenzen die eine Identifikation über das BLAST-Programm zuließen. DNA-Sequenzen aus unterschiedlichen Gattungen der Ascomycota und Basidiomycota wurden gefunden. Neben zahlreichen Hefen, saprotrophen, saproparasitischen und pflanzenpathogenen Pilzen konnten auch einige Hypogäen nachgewiesen werden.

Die RFLP-Analyse war in unserem Fall nur Mittel zum Zweck und diente der Auswahl der unterschiedlichen Sporentypen für die Sequenzierung. Nach der PCR und dem RFLP-Verdau wurden alle Produkte auf ein großes TAE-Agarosegel aufgetragen und durch Visualisierung unter UV-Licht ausgewertet. Nachfolgend ein Bild der RFLP Analyse zweier unterschiedlicher Proben (Abbildung 10).

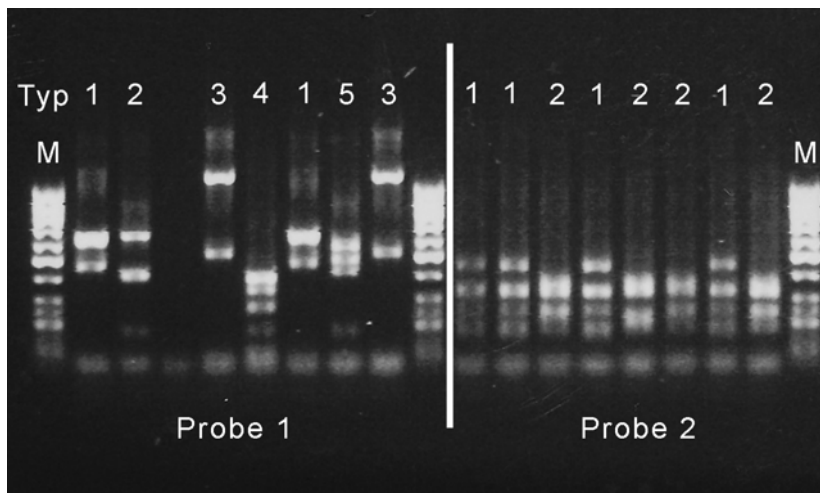


Abb. 10 RFLP Fragmente zweier unterschiedlicher Proben; Spur 1: M – DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp Plus, Fermentas); Spur 2-8: Schnittmuster der ersten Probe; Spur 9: M – DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp Plus, Fermentas); Spur 10-17: Schnittmuster der zweiten Probe; Spur 18: M – DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp Plus, Fermentas)

Deutlich sind die Unterschiede der Fragmente zwischen den beiden Proben erkennbar. Die ersten acht zeigen die Schnittmuster der ersten Probe, alle anderen stammen von der zweiten Probe.

Nach der getroffenen Auswahl der Typen wurden diese für die Sequenzierung vorbereitet. Details zu den ausgewählten Proben sind in Tabelle 14 dokumentiert. Die Probenkürzel A und T geben an nach welcher Methode die Probe extrahiert wurde. Alle weiteren Details stammen aus der mikroskopischen Analyse, wie Anzahl der Sporentypen, gesamte Anzahl der Sporen und durchschnittliche Anzahl der Sporen pro Gesichtsfeld (DS/ GF) bei 400facher Vergrößerung und 50 ausgezählten Gesichtsfeldern pro Probe.

Die Ergebnisse der Klonierung sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Anzahl der gefundenen Sequenzen, das BLAST-Ergebnis sowie die Zuordnung zu einer trophischen Gruppe. Neben der Erstellung der Tabelle wurde auch versucht die Ergebnisse des BLAST's mit den Ergebnissen der mikroskopischen Analyse zu vergleichen um eine eindeutige Zuordnung zu den definierten Sporentypen zu machen. Vor allem die Gattung *Melanogaster* konnte in allen bis auf zwei Proben (A26, T12) mit sehr geringer Sporenanzahl nachgewiesen werden in denen auch eine mikroskopische Zuordnung gemacht wurde. Weiters fanden wir Sequenzen von *Hysterangium stoloniferum*, *Chamonixia caespitosa*, *Geastrum sp.*, welche auch einzelnen Sporentypen zugeordnet werden konnten.

Interessant ist, dass bei der Extraktion mit dem AnDNA Puffer weniger Hefen und Schimmelpilze in den Ergebnissen aufscheinen und die Mehrheit ECM Pilze sind.

Tabelle 14 Probenkürzel, Kleinsäugerart, Anzahl der Sporentypen, Sporenanzahl und durchschnittliche Anzahl der Sporen pro Gesichtsfeld (bei 400facher Vergrößerung und 50 ausgezählten Gesichtsfeldern)

Probennummer	Art	Sporentypen	Sporenanzahl	DS/GF
A21/ 2323-32	<i>A.flav.</i>	3	1500	30
A23/ 3312-10	<i>C.glar</i>	8	2000	40
A26/ 3322-15	<i>C.glar</i>	9	548	10,96
A28/ 3322-8	<i>C.glar</i>	10	272	5,44
T2/ 4313-3	<i>S.min</i>	3	23	0,64
T3/ 4312-7	<i>A.flav</i>	6	25	0,5
T4/ 4312-10	<i>S.min</i>	5	29	0,58
T6/ 4312-16	<i>C.glar</i>	4	45	52
T7/ 4321-11	<i>C.glar</i>	8	1300	26
T9/ 4313-21	<i>C.glar</i>	7	2000	40
T12/ 4312-1	<i>S.min</i>	4	95	1,9

Tabelle 15 Klonierte Proben (extrahiert mit A-AnDNA, oder T-TNES), Anzahl der Sequenzen, BLAST-Ergebnis und Zuordnung zu einer trophischen Gruppe

Probennummer	Anzahl Sequenzen	BLAST-Ergebnis	Gruppe
A21/ 2323-32	1	<i>Melanogaster sp.</i>	ECM
A23/ 3312-10	2	<i>Melanogaster sp.</i> <i>Hysterangium stoloniferum</i>	ECM ECM
A26/ 3322-15	2	<i>Pholiota aurivella</i> <i>Geastrum sp.</i>	Saprotroph Saprotroph
A28/ 3322-8	5	<i>Balsamia sp.</i> <i>Rhodotorula sp.</i> <i>Chamonixia caespitosa</i> <i>Cryptococcus sp.</i> <i>Melanogaster sp.</i>	ECM Saprotroph ECM Saprotroph ECM

T2/ 4313-3	3	<i>Phoma</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Lycoperdum</i> sp.	Schimmelpilz Schimmelpilz Saprotroph
T3/ 4312-7	7	<i>Phoma</i> sp. <i>Cortinarius</i> sp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Microdiplodia</i> sp. <i>Didymella</i> sp. <i>Kodamaea ohmeri</i> <i>Rhodotorula</i> sp.	Schimmelpilz ECM Saprotroph Saproparasitisch Pflanzenpathogen Saprotroph Saprotroph
T4/ 4312-10	5	<i>Cryptococcus</i> sp. <i>Cortinarius</i> sp. <i>Cladosporium</i> sp. <i>Cryptococcus</i> sp. <i>Ophiostoma piceae</i>	Saprotroph ECM Schimmelpilz Saprotroph Saproparasitisch
T6/ 4312-16	5	<i>Cryptococcus</i> sp. <i>Chamonixia caespitosa</i> <i>Hyphodiscus</i> <i>hymeniophilus</i> <i>Cortinarius</i> sp.	Saprotroph ECM Saprotroph ECM
T7/ 4321-11	3	<i>Hysterangium stoloniferum</i> <i>Melanogaster</i> sp. <i>Cortinarius</i> sp.	ECM ECM ECM
T9/ 4313-21	6	<i>Cryptococcus</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Cryptococcus liquefaciens</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Melanogaster</i> sp. <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Saprotroph Saprotroph Saprotroph Schimmelpilz ECM Saprotroph
T12/ 4312-1	2	<i>Cortinarius fulvo-ochraceus</i> <i>Cortinarius infractus</i>	ECM ECM

Diskussion

Aufgrund der Fragestellung nach dem Einfluss von Kleinsäugetieren auf die Mykorrhizagesellschaft, ihrer Rolle bei der Ausbreitung der Pilzsporen sowie die Neuetablierung von Symbiosen in Waldverjüngungs- und Wiederaufforstungsgebieten, erschien der Lebendfang die beste Möglichkeit um einerseits einen Überblick der Artenzusammensetzung und andererseits an die Proben, den Kleinsäugerkot der gefangenen Tiere, zu kommen. Im Wildnisgebiet wurden zwei unterschiedliche Fallentypen aufgestellt, deren Vor- und Nachteile hier noch kurz erläutert werden sollen. Neben unterschiedlicher Fangeffizienz betreffend die Arten konnten auch große Unterschiede in der Mortalitätsrate sowie Wiederfangrate festgestellt werden. In unserem Fall war jeder Wiederfang als Probe nicht mehr verwertbar, da dieser mit großer Sicherheit die von uns zu Verfügung gestellte Nahrung, enthielt. Die geringe Wiederfangrate der FTT lässt sich durch die Materialien erklären, aus denen die Falle besteht. Das Plastik ist nicht saugfähig, kann sehr gründlich gereinigt werden und wurde mit Nestmaterial gefüllt um etwaige Feuchtigkeit besser aufzunehmen. Das Nestmaterial wurde nach jedem Fang gereinigt und gegebenenfalls ausgetauscht. Nur wenig „Mäusegeruch“ kann daran haften bleiben und über die vorhandenen Luftlöcher nach außen gelangen. Im Gegensatz dazu bestehen die HKF aus unbehandeltem Holz und sind oben mit einem Maschengitter verschlossen. Gerüche konnten dementsprechend gut aufgesogen und auch verbreitet werden. Ein Grund, der vermutlich dazu geführt hat, dass die Wiederfangrate bei 65% lag, und demnach jedes dritte gefangene Individuum bereits mindestens einmal in eine Falle geraten war. Neben dieser Eigenschaft sprechen vor allem die Breite des nachgewiesenen Artenspektrums für die FTT, in der allein xxx Arten nachgewiesen werden konnten. Nicht nur, dass die Zwergspitzmaus durch ihr geringes Gewicht kein einziges Mal den Mechanismus der HKF ausgelöst hat, auch die Mortalitätsrate dieser Insektivoren lag bei etwa 90 % weit über dem Durchschnitt der FTT. Neben diesen limitierenden Eigenschaften ist sowohl die Handhabung der Fallen, der Transport im Gelände wie auch die Reinigung ein deutlicher Nachteil der HKF. Allerdings

besteht ein großer Vorteil darin, dass selbst größere Nagetiere kaum Schäden an der Falle anrichten können und ein Eindringen mehrerer Individuen durch das heruntergefallene Metallplättchen nicht möglich ist.

Die FTT kann vor allem im Falle eines Kleinsäugermonitorings oder des Fanges in Schutzgebieten mit größeren Kontrollintervallen empfohlen werden, da bei der Ausstattung der Boxen mit Nestmaterial und Nahrung möglich ist.

Die Mykophagie von Kleinsäufern ist besonders in Australien und Nordamerika sehr gut dokumentiert (Claridge et al. 1993; Hayes 1986; Maser & Maser 1988; Vernes & Dunn 2009) und zählt zu einer häufigen und weit verbreiteten Ernährungsgewohnheit unter den dort lebenden bodenbewohnenden Säugetieren. Vor allem Mitglieder der Familie *Potoroidae* weisen einen hohen Anteil pilzlicher Überreste in den untersuchten Kotproben auf. Aus Aufzeichnungen über die Diäten des Tasmanischen Bettongs (Taylor 1992) geht hervor, dass dieser sich durch Fruchtkörper von bis zu 49 verschiedenen Basidiomyceten, vorallem Hypogäen und Subhypogäen, ernährt. Als ganzjährig verfügbar scheinen diese eine stetige und sichere Nahrungsressource darzustellen. Eine Analyse der Pilzsporen wurde in all diesen Studien mikroskopisch durchgeführt, jedoch wird auch erwähnt, dass bis zu 40 % der Sporen mikroskopisch nicht bestimmbar waren (Claridge et al. 1993) und dadurch aus der Studie herausgenommen werden mussten. Die Analyse der Pilzsporen auf molekularer Ebene direkt aus den Kotproben wurde nicht durchgeführt.

Die Analyse von Kleinsäugerkot wird dadurch erschwert, da man mit einer sehr geringen Probenmenge auskommen muss. Kommerzielle Extraktionskits empfehlen für die Gewinnung von DNA aus Kotproben eine Menge von etwa 200-400 mg. Das Trockengewicht unserer Proben schwankte zwischen 1-22 mg. Ein Zusammenlegen mehrerer Proben war für unsere Untersuchungen nicht zielführend, da damit die detaillierten Informationen, die bereits mikroskopisch gewonnen wurden, unbrauchbar gewesen wären.

Jede Probe ist durch einen Zahlencode in Gebiet, Saison, Fläche, Kontrollzeitpunkt und Fallenpunkt charakterisiert und lässt Rückschlüsse auf Kleinsäugerart, Geschlecht, ungefähres Alter und sexuelle Aktivität zu.

Neben den geringen Probenmengen war die Quantität und die Zusammensetzung der Ziel-DNA in den Proben durch eine sehr hohe Varianz gekennzeichnet. Nur drei der über 600 mikroskopierten Proben enthielten gar keine Sporen. Die restlichen wiesen eine Bandbreite von 3-7000 Sporen in 50 ausgezählten Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung, mit ein bis vierzehn Sporentypen pro Probe auf.

Im Verlauf der DNA-Extraktion aus Umweltproben sind zwei große Schwierigkeiten zu überwinden: Einerseits befindet sich neben der Ziel-DNA noch DNA anderer Herkunft in der Probe, andererseits auch eine Reihe von inhibierender Komponenten wie DNasen verschiedenster Herkunft (Mikroben, Enzyme des Verdauungstraktes, andere Nahrungsquellen) oder Chemikalien, die eine erfolgreiche DNA-Extraktion und weiterführende Untersuchungen erschweren oder verhindern.

Die optimale Methode sollte die Extraktion von Ziel-DNA selbst aus geringen Probenmengen ermöglichen, die DNA vor Denaturierung schützen und dabei die Koextraktion inhibierender Substanzen vermeiden. Der Einsatz toxischer, schädlicher und teurer Chemikalien sollte wenn möglich vermieden werden und zuverlässige Ergebnisse sollten auch aus heterogenen Proben möglich sein. Die Entwicklung einer günstigen, schnellen und verlässlichen Methode für die Extraktion von DNA aus Kleinsäugerkotproben verschiedener Arten war Ziel des Methodenvergleichs.

Wie schon erwähnt, sind Methoden für die DNA Extraktion aus Umweltproben zahlreich vorhanden (Cubero *et al.* 1999; Cullings 1992; Grubisha *et al.* 2005; Kretzer *et al.* 2003; Miller *et al.* 1999; Miller *et al.* 1988; Palomares *et al.* 2002; Taberlet *et al.* 2006) Keine davon eignet sich für die Extraktion von Pilzsporen, da die meisten Protokolle über Aufreinigung der Proben über Verdünnungsreihen, funktionieren. Informationen zu Lysis-Konditionen und Puffern sind immer noch nur spärlich verfügbar. Durch die verschiedenen Sporengrößen war eine Aufreinigung der Pilzsporen in eine Fraktion über Siebe nicht möglich, da dies eine gravierende Änderung der Pilzartenkomposition zu Folge gehabt hätte und unsere Fragestellung nach den vorhandenen Pilzarten nicht mehr zu beantworten gewesen wäre.

Ein sehr weit verbreiteter Ansatz ist die DNA-Extraktion mit CTAB (Izzo *et al.* 2004), der bereits für die Extraktion von Pilz-DNA aus anderen Quellen verwendet wurde, vorangegangene Versuche mit diesem häufig verwendeten Puffer lieferten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse (Daten nicht inkludiert).

Die Wahl fiel schlussendlich auf zwei Puffer, der eine war bekannt für seine Effizienz der DNA und RNA Extraktion aus verschiedenen Quellen (TNES) (Manian *et al.* 2001; Paolocci *et al.* 1999), der andere musste mit sehr altem Probenmaterial zurechtkommen (AnDNA) (Rohland & Hofreiter, 2007).

Kommerzielle Kits gibt es von diversen Herstellern, nach unterschiedlichsten Ansätzen und verbunden mit Kosten. Direkte Vergleiche zwischen den Herstellern sind aufgrund der fehlenden Information zur Zusammensetzung der Puffer der einzelnen Kits leider nicht möglich. Zwei davon, für die Extraktion von DNA aus Kotproben entwickelte Kits, der INVITEK PSP® Spin Stool DNA Kit und der MO BIO Ultra Clean™ Fecal DNA Sample Kit wurden mit den beiden oben genannten selbst herstellbaren Extraktionspuffern und Protokollen verglichen.

Gestützt durch visuelle (Bandenintensität der Agarosegele) und photometrische Daten kann gesagt werden, dass zwischen den vier Extraktionsprotokollen deutliche Unterschiede bestehen.

Die Kombination aus Lyse des Probenmaterials, Bindung der DNA an eine Membran, und optimierte Puffer für eine schnelle, effiziente, qualitativ hochwertige DNA Isolation durch den INVITEK PSP® Spin Stool DNA Kit lieferte in unserem Fall keine befriedigenden Resultate. Obwohl die Handhabung und der Zeitaufwand der Arbeitsschritte exzellent waren und im Vorfeld die mechanische Zerstörung der Pilzsporen, wie auch bei den beiden selbsthergestellten Puffern durchgeführt wurde, erzielte diese Methode zumindest beim Visualisieren über das Gel keinen Erfolg in der Extraktion von Pilzsporen aus Kleinsäugerkotproben.

Das Ergebnis hängt möglicherweise damit zusammen, dass die Probenmenge zu gering war. Aber unsere Forschungsobjekte, kleine bodenbewohnende Säugetiere werden nie das gewünschte Probengewicht von 200 bis 400 mg pro Individuum bewerkstelligen können.

Der Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse der photometrischen Analyse und der Gelelektrophorese bleibt vorerst ungeklärt, als Verursacher könnten mitextrahierte Substanzen mit dem gleichen Absorptionsspektrum wie DNA (260-280 nm) verantwortlich sein, die zu den positiven photometrischen Ergebnissen geführt haben.

Generell scheint jedoch das eingesetzte Probengewicht keinen Effekt auf die Effizienz der Extraktion zu haben. Im Fall der Extraktion mit dem AnDNA Puffer hatten die Proben mit der Nummer drei und vier das geringste Trockengewicht, zeigten aber die höchsten Bandenintensitäten im Anschluss an die Extraktion und verglichen mit den Proben mit höherem Trockengewicht nach der PCR. Vielmehr scheint die tatsächliche Sporenmenge der Probe die Effizienz und die Bandenintensität zu beeinflussen.

Obwohl auch die Angaben für die benötigten Probenmengen beim MO BIO-Kit bei 250 mg liegen, funktionierte die Extraktion mit Ausnahme der Probe Nummer fünf mit einer sehr geringen durchschnittlichen Sporenmenge von 1,26 Sporen/Gesichtsfeld.

Klare Korrelationen zwischen photometrischen Messungen und visuellen Gelbildern der DNA-Inhalte konnten nur für das Extraktionsprotokoll mit den beiden Puffern TNES und AnDNA gefunden werden. Diese beiden scheinen für die Extraktion aus sehr kleinen Probenmengen am zuverlässigsten und geeignetsten.

Um die Reinheit und Qualität der DNA zu kontrollieren wurde eine PCR mit pilzspezifischen Primern für die Amplifikation eines DNA-Fragmentes mit einer ungefähren Länge von 1,2 kb durchgeführt. Nach der Vervielfältigung der Pilz-DNA besteht eine eindeutige und erwartete Korrelation zwischen beobachteter Sporenmenge und/ oder Bandenintensität am Agarosegelbild (mit Ausnahme des INVITEK Kits).

Trotz der ähnlich guten Extraktionserfolge der beiden Puffer AnDNA und TNES fiel unsere Wahl für die Weiterverarbeitung der zahlreichen Proben auf den AnDNA Puffer. Dieser besticht durch eine einfache Zusammensetzung, gute Extraktionseffizienz und hohen Ertrag

an extrahierter DNA, während der TNES-Puffer womöglich durch die Extraktionseffizienz sowohl für DNA als auch für RNA eine Reihe von kurzen Fragmenten mitextrahiert. Er scheint auch für die Weiterverarbeitung der Proben am besten geeignet. Der Puffer besteht aus EDTA pH 8 Lösung und einem hohen Anteil an Proteinase K, die Herstellung ist rasch und unkompliziert.

Zusätzlichen Wirkstoffe des TNES-Puffers wie Salze (NaCl) und Detergenzien (CTAB, SDS) verbessern möglicherweise insgesamt die Extraktion der DNA-Moleküle, scheinen aber auch die Koextraktion potentiell inhibierender Substanzen zu steigern.

Weiters bietet die Zusammensetzung des Puffers einen guten Schutz der DNA vor Denaturierung, die Phosphodiesterverbindungen der DNA sind unter Abwesenheit von degradierenden Enzymen sehr stabil, EDTA und Proteinase K sind für die inhibierenden Eigenschaften der Aktivität der DNasen durch Konkurrenz um die Metallionen bekannt.

Als kleinerer Nachteil der vorliegenden Methode ist jedoch der etwas höhere Zeitaufwand zu sehen, der aber für die ausreichende Zerstörung der Sporen unabdingbar ist. Man benötigt ein wenig Geduld und Genauigkeit bei diesem Schritt, er ist aber bei guter Planung durch parallel verlaufende Extraktionen leicht zu kompensieren.

Im Fall einer sehr großen Probenmenge darf der finanzielle Aspekt nicht unbeachtet bleiben, unsere Kalkulationen ergaben für jede nach dem neuen Protokoll extrahierte Probe (Invisorb Column Purification inkludiert) einen Preis von unter 2 Euro, für jede mit dem INVITEK-Kit extrahierte Probe etwa 4 Euro und für den MO BIO-Kit 3,50 Euro pro Probe. Daraus resultiert mindestens ein Unterschied von 1,50 Euro pro extrahierter Probe, in unserem Fall wären das bei einem Probendurchsatz von 600 Stück eine Differenz von mehr als 900 Euro.

Weiters von Vorteil ist, dass alle Komponenten für die Herstellung des AnDNA-Puffers in einem mit DNA arbeitenden Labor verfügbar sind.

Der Hauptgrund für die Wahl der selbsthergestellten Puffer und des modifizierten Extraktionsprotokolles war jedoch nicht der finanzielle Hintergrund, sondern die Überlegenheit der Effizienz der Extraktion im Vergleich zu den kommerziellen Kits.

Anhang

Poster: 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Säugetierkunde e. V. 2008 in Wien

Small mammal mycophagy in mountainous forests in Austria

Katharina Krätzler^{1,2}, Susanne Schickmann¹,
Alexander Urban², Ursula Nopp-Mayr¹
Klaus Hackländer¹, Irmgard Krisai-Grölhuber²

¹ Institute of Wildlife Biology and Game Management, University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Austria
² Mycology Research Group, University of Vienna, Austria

FWF This study was supported by FWF - Austrian Science Fund



University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna
Department of Integrative Biology and Biodiversity Research

Introduction and Questions

Mycorrhizae, the symbiosis of mycorrhizal fungi and plants can be found in about 90% of all vascular plants, at least at a facultative level. In mountainous forests the most common tree species are spruce, fir and beech, which all are hosts to ectomycorrhizal fungi. ECM-fungi can form fruiting bodies above or below ground, and those fruiting hypogaeously rely on endozoochory (e.g. by mammals or invertebrates) for dispersal of spores. The evolutionary trend to hypogeous fruiting is found repeatedly in all major groups of ECM-fungi suggesting that endozoochory is a successful way of spore dispersal.

The degree of mycophagy of small mammals in European mountainous forests is hardly investigated, even though they may play a major role in dispersal of fungal spores. Therefore we started to investigate following questions in the Dürrenstein Wilderness Area in Lower Austria:

- Which small mammal species occurring in the area are mycophagous?
- Are there differences between species concerning the degree of mycophagy and the fungal species consumed?
- Does the type of habitat (managed forest, primeval forest, disturbed habitat - windthrow) have an impact on species composition and mycophagy?



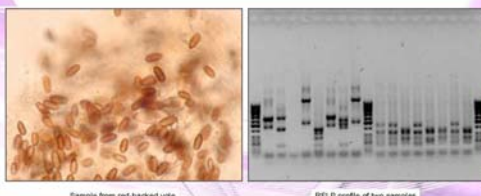
Methods

To obtain faecal samples small mammals were life trapped at three grids in the Dürrenstein Wilderness Area (primeval forest, wind throw, managed forest) in summer and autumn 2006 and in spring, summer and autumn 2007.

Faecal samples are analysed via light microscopy (numbers and types of fungal spores), as well as via molecular analyses (DNA sequencing).

For microscopic analyses spore types and numbers per type are counted in 50 fields of view (400x magnification) per sample.

For molecular analyses DNA of faecal samples is extracted, fungi specific regions are amplified via PCR. DNA is cloned and cut with restriction enzymes to establish reference RFLP profiles. Sequencing of the clones is then performed to identify the species of fungi for each RFLP profile. All other samples will be compared to the collection of reference RFLP profiles.



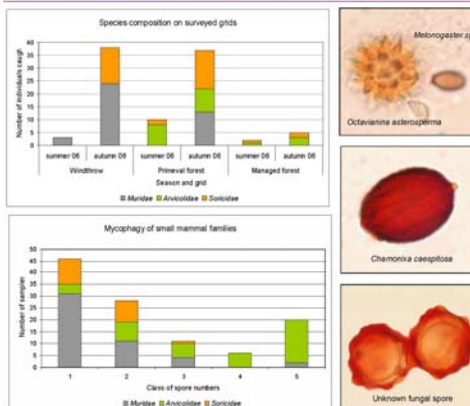
Results

In a two year trapping survey with five trapping periods more than 300 faecal samples have been obtained on the three established trapping grids. The small mammal community differs considerably between managed forest, primeval forest and disturbed area, as well as between seasons and years.

All 2006 samples have been examined microscopically and more than 80 different fungal spore types have been found. Differences between small mammal families considering the amount of spores in the faecal pellets have been observed. Because of the high variability five classes of spore numbers have been used to simplify results (1: 0-1 spores/fov; 2: 1,01-5; 3: 5,01-10; 4: 10,01-20; 5: >20).

Both microscopic and DNA analysis has already shown that the truffle species *Melanogaster sp.* is the most numerous spore type found.

Almost every sample contained at least some fungal spores. So, except for *Sorex alpinus*, all investigated species can be said to be mycophagous in some extent. *Myodes glareolus* (the Red-backed vole) is the species with the highest degree of mycophagy.



Discussion

For the majority of European small mammals no information on mycophagy is available so far, therefore one aim of our investigation was to shed light onto this feeding habit.

With the exception of *Sorex alpinus*, all investigated species consumed fungi at least in some extent. Paralleling results from North America, *Myodes glareolus* (the red-backed vole) shows the highest degree of mycophagy. But even the samples from the insectivorous shrews contain fungal spores.

As illustrated by the first diagram small mammal communities differ both between seasons and investigated habitats.

First microscopical results indicate differences in the level of mycophagy of the studied small mammal species in each habitat as well.

Further Investigations

Microscopical analysis of 2007 samples still needs to be completed as well as molecular work. As a final step microscopic and molecular results need to be compared and summarized.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Katharina Kräutler
Staatsangehörigkeit	Österreich
Geburtsdaten	18. Oktober 1982, Wien

Schulische Ausbildung/Studium

1988 – 1993	Vorschule und Volksschule, Volksschule Köhlergasse
1993 – 2001	Realgymnasium mit ergänzendem Unterricht in Biologie, Physik und Chemie, Bundesrealgymnasium Schopenhauerstrasse
2001 – 2009	Studium Biologie, Studienrichtung Ökologie, Universität Wien

Berufliche Erfahrungen

01.11.2001 – 30.09.2003	Raumpflegerin der Ordination von Dr. Andrea Schiesbühl und Dr. Susanne Milla
06.01.2003 – 31.03.2006	Kaufmännische Angestellte bei Intersport Eybl, Sport Service GmbH
01.02.2006 – 30.06.2007	Geringfügig beschäftigte Mitarbeiterin in der Zoopädagogischen Abteilung, Schönbrunner Tiergarten GmbH
seit 02.06.2007	Geringfügig beschäftigte Mitarbeiterin bei Fressnapf Handels GmbH

Sonstige Tätigkeiten

Sommer 2006	Stationsmitarbeiterin beim Verein Auring (Vogelberingung)
seit Dezember 2007	Mitbegründerin und Betreuerin des Großraumes Wien des Vereins Special Animals
seit Mai 2008	Freiwillige Mitarbeiterin in der Suchhundestaffel beim Wiener Roten Kreuz

Literatur

- Bellemain E, Swenson JE, Tallmon D, Brunberg S, Taberlet P (2005) Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter-Collected Feces: Four Methods for Brown Bears. *Conservation Biology* 19, 150-161.
- Carriconde F, Gardes M, Jargeat P, et al. (2008) Population Evidence of Cryptic Species and Geographical Structure in the Cosmopolitan Ectomycorrhizal Fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microbial Ecology* 56, 513-524.
- Churchfield S, (1990) *The Natural History of Shrews*, Comstock Publishing, Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Claridge AW, May TW (1994) Mycophagy among Australian mammals. *Austral Ecology* 19, 3, 251-275.
- Claridge AW, Tanton MT, Cunningham RB (1993) Hypogeal Fungi in the Diet of the Long-nosed Pototoo (*Potorous tridactylus*) in Mixed-species and Regrowth Eucalypt Forest Stands in South-eastern Australia. *Wildlife Research* 20, 321-37.
- Cubero OF, Crespo A, Fatehi J, Bridge PD (1999) DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216, 243-249.
- Cullings KW (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecol* 1, 233–240.
- Farmer DJ, Sylvia DM (1998) Variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of a diverse collection of ectomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 102, 859-865.
- Grubisha LC, Kretzer AM, Bruns TD (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from the truffle-like ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon occidentalis* and *Rhizopogon vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* 5, 608-610.
- Hayes JP, Cross SP, McIntire PW (1986) Seasonal Variation in Mycophagy by the Western Red-backed vole, *Clethrionomys californicus*, in Southwestern Oregon. *Northwest Science*, Vol. 60, No. 4, 250-257.

- Horton TR (2002) Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* 244, 29-39.
- Horton TR, Bruns TD (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10, 1855-1871.
- Izzo AD, Meyer M, Trappe JM, North M, Bruns TD (2004) Hypogeous ectomycorrhizal fungal species on roots and in small mammal diet in a mixed-conifer forest. *Forest Science* 51, 243.
- Johnson CN (1996) Interactions between mammals and ectomycorrhizal fungi. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 503.
- Kiss A, Posfai G, Keller CC, Venetianer P, Roberts RJ (1985) Nucleotide sequence of the BsuRI restriction-modification system. *Nucleic Acids Research*, 13, 18.
- Kirkland Jr., GL, (1998) Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy*, 79 (4), 1416-1431.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2003) Microsatellite markers reveal the below ground distribution of genets in two species of *Rhizopogon* forming tuberculate ectomycorrhizas on Douglas fir. *New Phytologist* 161, 313-320.
- Kuske CR, Banton KL, Adorada DL, et al. (1998) Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2463-2472.
- Manian S, Sreenivasaprasad S, Mills PR (2001) DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Letters in Applied Microbiology* 33, 307-310.
- Maser C, Maser Z (1988) Mycophagy of red-backed voles, *Clethrionomys californicus* and *C. gapperi*. *Great Basin Naturalist* 48, No.2, 269-273.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 12-15.

- Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC (1999), Evaluation and Optimization of DNA Extraction and Purification Procedures for Soil and Sediment Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, No. 11, 4715-4724.
- Palomares F, Godoy JA, Piriz A, O'Brien SJ, Johnson WE (2002) Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* 11, 2171-2182.
- Paolocci F, Rubini A, Granetti B, Arcioni S (1999) Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 23-30.
- Paxinos E, McIntosh C, Ralls K, Fleischer R (1997) A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular ecology* 6, 483-486.
- Powell RA, Proulx G, (2003) Trapping and marking terrestrial mammals for research: Integrating ethics, performance criteria, techniques, and common sense. *ILAR Journal* 44 (4), 259-276.
- Ranjard L, Poly F, Lata JC, et al. (2001) Characterisation of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: Biological and methodological variability. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4479-4487.
- Rohland N, Hofreiter M (2007) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *BioTechniques* 42, 1-7.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. (2006) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research* 35, 1-8.
- Taylor RJ, (1992) Seasonal Changes in the Diet of the Tasmanian Bettong (*Bettongia gaimardi*), a Mycophagous Marsupial. *Journal of Mammalogy* 73, 408-14.
- Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjoller R (2006) Molecular and morphological diversity of peizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* 170, 581-596.

- Trappe JM, Maser C, (1976) Germination of Spores of *Glomus macrocarpus* (Endogonaceae) after Passage through a Rodent Digestive Tract. *Mycologia* Vol. 68, No. 2, 433-436.
- Ure DC, Maser C (1982) Mycophagy of red-backed voles in Oregon and Washington. *Canadian Journal of Zoology* 60(12), 3307–3315.
- Vernes K, Dunn L (2009) Mammal mycophagy and fungal spore dispersal across a steep environmental gradient in eastern Australia. *Austral Ecology* 34, 69-76
- Wilson, D. E., and D. M. Reeder (eds). 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed). Johns Hopkins University Press, 2,142 pp.
- Zukrigl K (1961) Pflanzensoziologisch-standortkundliche Untersuchungen in den Urwaldresten der niederösterreichischen Kalkalpen. Dissertation BOKU Wien.