

Analyse von Chloroplasten-DNA

Ramona Ackermann, Raphael Appenzeller, Jasmin Jauch, Sara Looser

Einleitung

Wir haben DNA diverser Bäume und anderer Pflanzen in Finnland untersucht. Dazu haben wir einen bestimmten Bereich der Chloroplasten-DNA vervielfältigt und weiter verarbeitet, um Unterschiede zwischen verschiedenen Pflanzenarten sehen zu können.

Resultate

Es wurden 79 Pflanzenproben von 25 Arten genommen und 120 Proben in Gelen analysiert. In der Tabelle ist für die verschiedenen Arten dargestellt wie viele Proben einen Balken gezeigt haben. Bsp: Rottanne 20 / 24 nach Digestion heisst, dass 24 Proben nach allen drei Schritten im Gel analysiert wurden und dass 20 davon Balken zeigten, und bei vieren keine Balken sichtbar waren.

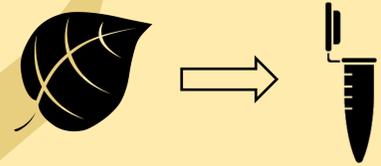
Pflanzenart	#	nach Extraktion	nach PCR	nach Digestion
Föhre - <i>Pinus sylvestris</i>	23			24 / 24
Rottanne - <i>Picea abies</i>	25	2 / 5	5 / 5	20 / 24
Grau-Erle - <i>Alnus incana</i>	10	2 / 2	1 / 2	3 / 12
Preiselbeere - <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	5	0 / 1	1 / 1	5 / 5
Heidelbeere - <i>Vaccinium myrtillus</i>	3	2 / 2	1 / 2	1 / 3
Trunkelbeere - <i>Vaccinium uliginosum</i>	1	0 / 1	0 / 1	0 / 3
Moosbeere - <i>Vaccinium oxycoccos</i>	1		0 / 1	0 / 3
Schwarze Krähenbeere - <i>Empetrum nigrum</i>	1			3 / 3
Himbeere - <i>Rubus idaeus</i>	1	0 / 1	0 / 1	0 / 3
Moor-Birke - <i>Betula pubescens</i>	1	1 / 1	0 / 1	0 / 3
Zwerg-Birke - <i>Betula nana</i>	1	1 / 1	0 / 1	0 / 2
Vogelbeere - <i>Sorbus aucuparia</i>	2			0 / 4
Espe - <i>Populus tremula</i>	1	1 / 1	0 / 1	0 / 3
Sal-Weide - <i>Salix caprea</i>	1			0 / 1
Lorbeer-Weide - <i>Salix pentandra</i>	3			0 / 1
Ohr-Weide - <i>Salix aurita</i>	1			0 / 1
Besenheide - <i>Calluna vulgaris</i>	1			1 / 3
Rosmarinheide - <i>Andromeda polifolia</i>	1			3 / 3
Sumpfporst - <i>Rhododendron tomentosum</i>	2			2 / 2
Gemeiner Wacholder - <i>Juniperus communis</i>	1			3 / 3
Gewöhnliche Thuja - <i>Thuja occidentalis</i>	1			1 / 1
Gewöhnlicher Dornfarn - <i>Dryopteris carthusiana</i>	1			0 / 3
Teichrosen - <i>Nuphar sp.</i>	1			0 / 3
Bartflechten - <i>Usnea sp.</i>	1	1 / 1	0 / 0	0 / 3

Methodik

Die Methodik besteht aus drei Schritten: Extraktion, PCR, Digestion. Nach jedem Schritt kann man die Proben in einen Gel geben, um zu sehen ob die Verarbeitung so weit geklappt hat.

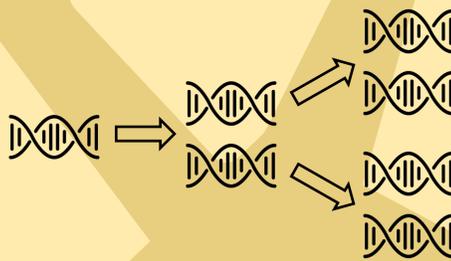
Extraktion

Um die DNA aus Pflanzenzellen zu gewinnen, werden Zellbestandteile wie die Zellwand aufgelöst und andere Komponenten durch Zentrifugieren und Filtern entfernt.



PCR

Mit spezifischen Abschnitten der DNA (sogenannte Primer) wurde gezielt ein Bereich der Chloroplasten-DNA vervielfacht.



Gelelektrophorese

Nach jedem der drei Schritte Extraktion, PCR und Digestion kann das Ergebnis sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Probe in eine Geltasche gegeben. Mit einer angelegten Spannung beginnen sich die DNA-Stücke nach oben zu bewegen, je kleiner, desto schneller. Als Vergleich dient ein Standard (MMR) aus DNA-Stücken verschiedener, aber bekannter Längen.

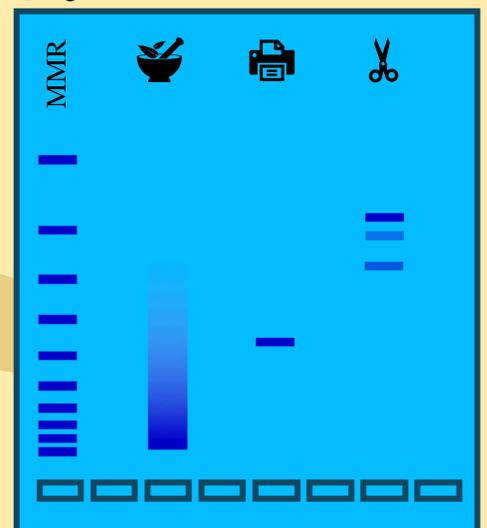


Abb. 2: Schematische Darstellung von Resultaten in einem Gel.

Digestion

Ein Enzym sucht gezielt nach der Basenabfolge GANTC (wobei N eine beliebige Base sein kann) und schneidet dort die DNA-Fragmente in kleinere Stücke. Die Anzahl und Längen der DNA-Stücke, die so entstehen, sind charakteristisch für die verschiedenen Pflanzenarten.

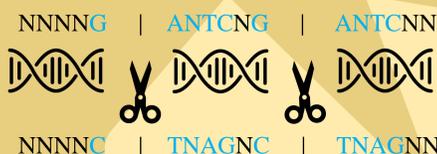


Abb. 1: Bei der Arbeit im Labor wurde viel gemörsert, mikropipettiert, gewogen, gevortext, zentrifugiert, erwärmt und abgekühlt.

Im Herbst nichts zu holen

Im Herbst beginnen Laubbäume die Nährstoffe in ihren Blättern abzubauen. Zuerst werden die Chloroplasten abgebaut, was wir experimentell bestätigen konnten. In den meisten Grau-Erlen-Proben konnte zwar DNA nach dem Extraktionsschritt festgestellt werden (vom Zellkern und den Mitochondrien), aber nach PCR und Digestion war meistens nichts mehr zu sehen. Das könnte daran liegen, dass die Chloroplasten-DNA weitgehend abgebaut war. In den Nadelbäumen (Föhre und Rottanne) und Immergrünen (Beeren) konnte dieser Effekt hingegen nicht festgestellt werden.

Artenbestimmung

Die Anzahl und Länge der Stücke nach der Digestion können im Prinzip zur Artenbestimmung verwendet werden. So ist zum Beispiel der dicke Strich zusammen mit den schwächeren Strichen in Spalte 3 charakteristisch für Rottanne. Es wurden je über zwanzig Föhren und Rottannen untersucht. Die Gel-Resultate zeigten innerhalb der Art immer das gleiche charakteristische Muster nach dem Digestion-Schritt auf. Das Muster bei der Föhre kann vom Muster der Rottanne unterschieden werden. Somit könnte sich diese Methode zur Artenbestimmung eignen. Unsere Resultate wurden mit einer Referenzdatenbank abgeglichen. Jedoch kamen in Finnland andere Pflanzenarten vor als in der Referenzdatenbank aus England. Daher konnten keine weiteren Schlüsse gezogen werden.



Abb. 4: Probenahme im Wald.

Gel-Resultat

Auf dem in Abb. 3 dargestellten Gel sind folgende Resultate sichtbar:
Spalte 1: MMR.
Spalte 2: Rottanne nach Extraktion,
Spalte 4: Rottanne nach PCR,
Spalte 6: Rottanne nach Digestion

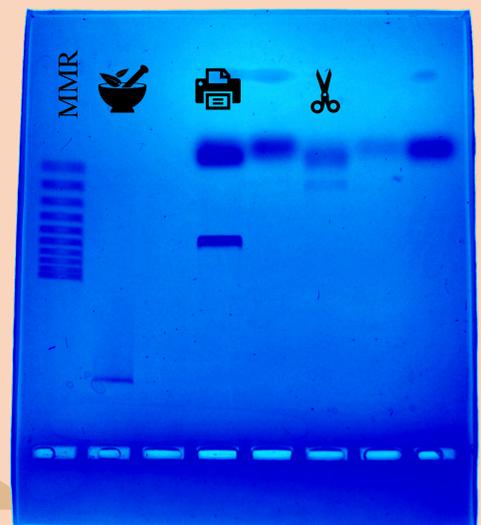


Abb. 3: Foto von einem Gel, der durchgeführt wurde.