

Praktikumsbericht

von Verena Hechinger

6.Semester
Umweltsicherung

Fachhochschule
Weihenstephan Triesdorf

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft

2. Das Wildschwein Projekt

2.1 Allgemeine Informationen zum Wildschwein

2.2 Fragestellung

2.3 Projektinformationen

2.4 CO₂-Messung, Feuchtigkeit- und Temperaturmessung

2.5 Mikrobielle Zusammensetzung der Bodenproben

2.6 Mikrobielle Zusammensetzung der Bodenproben

2.6.1 DNA Extraktion

2.6.2 BSA Pretreatment

2.6.3 PCR Polymerase-Kettenreaktion

2.6.4 Verdau

2.6.5 Verdau aufreinigen

2.6.6 Genescan

3. Schweizer Nationalpark

3.1. Allgemeine Informationen

3.2. Ober- und unterirdische Biomasse, Bodenaktivität, Nährstoff- und Kohlenstoffpools in Zäunungen

4. Quellenverzeichnis

Einleitung

Mein zweites Praxissemester habe ich an der eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft absolviert.

Ich habe dort vom 01. April – 18. August 2009 gearbeitet.

In dieser Zeit hatte ich die Möglichkeit in der Genetik sowie in der Ökologie Erfahrungen zu machen.

Vom 01. April bis Anfang Juli habe ich in dem Projekt von Sven Wirthner mitgearbeitet. Er schreitet unter der Leitung von Anita Risch seine Doktorarbeit. In seiner Arbeit befasst sich Sven Wirthner mit dem Effekt der Wildschweine im Ökosystem Wald.

Meine Aufgabe war es die DNA aus den bereits aufgenommenen Bodenproben zu extrahieren. Außerdem hatte ich die Möglichkeit mit ihm zusammen auf den Versuchsfeldern rund um Zürich die notwendige Feldarbeit durchzuführen.

Ab Anfang Juli ging es in den Nationalpark nach Graubünden. Dort wurde seit diesem Sommer das Projekt von Dr. Martin Schütz und Dr. Anita Risch in die Tat umgesetzt. Hierbei habe ich mit vielen anderen Helfern anfangs bei dem Anlegen der nötigen Versuchsfelder mitgewirkt und später zusammen mit anderen Praktikanten verschiedene Messungen durchgeführt.

1. Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft

Die Eidgenössische Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL befasst sich mit der Nutzung und dem Schutz von Landschaften und Lebensräumen.

Sie ist Teil der ETH Zürich und dient als Forschungsanstalt wie eine Verbindung zwischen wissenschaftlichem Arbeiten und der Umsetzung in die Praxis.

Der erste Baustein der WSL wurde 1885 gelegt.

Damals trug es noch den Namen „Schweizerischen Zentralanstalt für das forstliche Versuchswesen“. 1933 wurde es dann zu einer „Eidgenössischen Anstalt für forstliche Versuchswesen“.

Die heutigen Ziele der WSL sind Landschaften und Wälder mit hoher Lebensqualität sowie ein verantwortungsvoller Umgang mit Naturgefahren, wie sie in Gebirgsländern auftreten.

Hierfür entwickelt sie Lösungswege die mit ständig neuen Projekten und Arbeitsmethoden verbessert und zu einem sicheren und hilfreichen Ergebnis führen.

2. Das Wildschwein Projekt

2.1 Allgemeine Informationen zum Wildschwein

Das Wildschwein ist ein in ganz Eurasien sowie in Japan und in Teilen der südasiatischen Inselwelt in etwa 20 Unterarten ein verbreitetes Wildtier. Zusammen mit dem [Rothirsch](#) gehört das Wildschwein zu den größten Tieren, die in Mitteleuropa noch wild vorkommen.

In den letzten Jahrhunderten hat sich die Verbreitung des Wildschweins vor allem aufgrund menschlicher Eingriffe verändert. Mit der Ausdehnung und Intensivierung der Landwirtschaft nahm auch die Bejagung des Wildschweins zu. Bis 1900 gab es keine Wildschweine mehr in Deutschland sowie in Österreich, Italien und der Schweiz waren weite Teile wildschweinfrei. Zu den deutschen Regionen, in denen bis in die 1940er Jahre Wildschweine nicht mehr vertreten waren, zählen beispielsweise Thüringen, Sachsen, Schleswig-Holstein und Baden-Württemberg.

Im 20. Jahrhundert haben sich Wildschweine weite Teile ihres ursprünglichen Verbreitungsgebiets wieder zurückerobert. So sind beispielsweise in die italienische Toskana, die lange Zeit aufgrund der intensiven landwirtschaftlichen Bewirtschaftung wildschweinfrei war, in den 1990er Jahren wieder Wildschweine eingewandert.

Schwarzwild ist sehr vermehrungsfreudig. Die weiblichen Tiere, die Bachen, bringen durchschnittlich vier oder fünf Frischlinge zur Welt. In den Jahren, in denen viele Bucheckern und Eicheln vorhanden sind, vom Forstmann Mastjahre genannt, bringen die Bachen oft doppelt so viele Junge zur Welt. Manchmal bekommen sie dann auch im Herbst noch einmal Frischlinge. So können sich die Wildschweine rasch ausbreiten und Gebiete besiedeln, in denen sie vorher nicht gelebt haben.

Die Populationsentwicklung der letzten Jahrzehnte wird auch an den Jagdstrecken deutlich. So wurden in Deutschland in den Jahren 2000 bis 2003 erstmals jeweils mehr als 500.000 Wildschweine erlegt. In den 1960er Jahren lag die jährliche Jagdstrecke noch bei unter 30.000 Tieren.

Wildschweine sind sehr anpassungsfähig, dies zeigt sich deutlich in Berlin. Wildschweine

haben sich dort die stadtnahen Wälder als Lebensraum erobert und dringen heute auch in die Vorstädte ein. Der Bestand an Wildschweinen rund um Berlin wird mittlerweile auf 10.000 Tiere geschätzt. Die intelligenten Tiere registrieren sehr schnell, dass ihnen in Wohngebieten keine Bejagung droht und werden gelegentlich sogar tagaktiv.

Im klimatisch gemäßigten Mitteleuropa entwickeln Wildschweine die höchste Bestandsdichte in Laub- und Mischwäldern, die einen hohen Anteil an Eichen und Buchen haben und in denen es sumpfige Regionen sowie wiesenähnliche Lichtungen gibt.

Das Wildschwein durchwühlt bei der Nahrungssuche den Boden nach essbaren Wurzeln, Würmer, Engerlingen Mäusen, Schnecken und Pilzen. Wildschweine fressen neben Wasserpflanzen wie beispielsweise dem Kalmus auch Blätter, Triebe und Früchte zahlreicher Holzgewächse, Kräuter und Gräser. Als Allesfresser nehmen sie auch Aas und Abfälle an.

Eine besondere Rolle im europäischen Verbreitungsgebiet spielen in der Nahrung von Wildschweinen die Früchte von Eichen und Buchen. In Jahren, in denen diese Bäume besonders gut tragen (so genannte Mastjahre), leben Wildschweine monatelang überwiegend von diesen Früchten. Bleiben diese Früchte aus so erhöht sich auch der Schaden auf landwirtschaftlichen Flächen.

Dies ist der Hauptgrund, warum Wildschweine so stark bejagt wurden, dass sie in Teilen Europas über Jahrhunderte hinweg fehlten. Es wird vermutet, dass die schon in der Bronzezeit nachweisbaren Einzäunungen von Feldern den Versuch darstellten, Wildschweine aus den Feldern fernzuhalten.

2.2 Fragestellung

Die Wildschwein Population in der Schweiz hat in den letzten zwei Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen. Mit der Zunahme der Population haben auch die Schäden durch graben und wühlen im Wald und auf den landwirtschaftlichen Flächen zugenommen. Dies führte zu enormen Diskussionen.

Doch wie genau beeinflussen diese Eingriffe die Ökosysteme, spezielle den Wald?

Das Graben im Waldboden bis in tiefere Horizonte beeinflussten den Boden physikalisch, hydrologisch und biologisch. Obwohl verschiedene Studien zeigten wie genau das Wühlen die verschiedenen Parameter verändert, ist noch nicht bekannt in welchem Umfang sich die dadurch entstehende Veränderung auswirkt. Hat es eine positive Wirkung und wenn ja welche und wie stark?

Im Voraus der Studie, ist die Vegetation und die Bodenparameter der gewühlten und der nicht gewühlten Flächen miteinander verglichen worden.

Schwerpunkte der Untersuchung ist die Veränderung des Kohlenstoffgehalts und der Nährstoffanteil so wie die Kohlenstoffdioxid Emission, welche Anteil an der Erderwärmung hätte. Ebenso soll erforscht werden welchen Effekt das Graben auf die physikalische und hydrologische Bodenbeschaffenheit hat. Dies ist interessant für den Waldboden hinsichtlich der Fruchtbarkeit des Bodens und damit dem Baumwachstum. Zudem soll erforscht werden in welcher Fülle und Reichtum Invertebrata (Wirbellose) vorkommen. Diese Untersuchungen wurden bei den bisherigen Studien vernachlässigt.

Für diese Untersuchungen wurden verschieden Flächen in der Schweiz ausgewählt.

2.3 Projektinformationen

Meine Aufgabe war es hauptsächlich aus bereits entnommenen Bodenproben eine mikrobielle Untersuchung durchzuführen um deren Zusammensetzung festzustellen. Die Bodenproben stammten aus dem Kanton Zürich, Schaffhausen, Tessin, Graubünden und Freiburg. Dort wurden die Versuchsflächen für die Studie errichtet. Die Versuchsflächen befinden sich in unterschiedlichen Höhenmetern und haben unterschiedliche Bodenbeschaffenheit.

Bei den entnommenen Bodenproben wurde gemessen:

- Körnung
- Dichte
- Feuchte
- pH-Wert
- Anteil an organischem Material
- Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt
- mikrobielle Biomasse

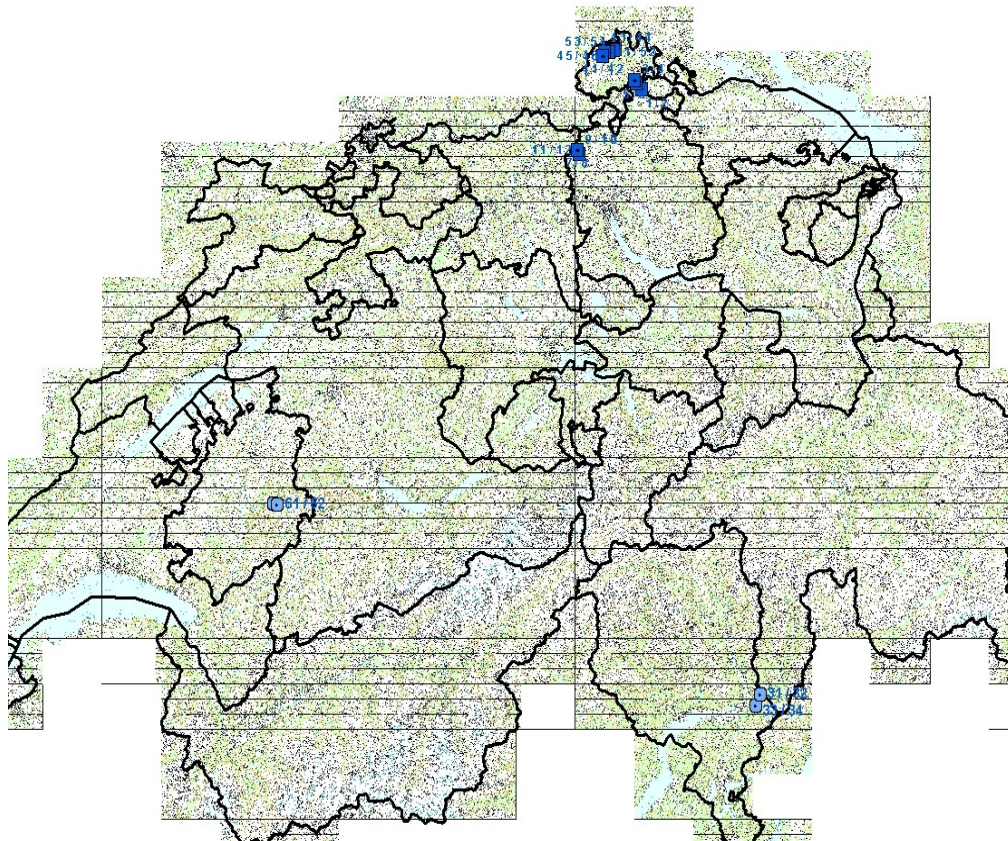
und meine Aufgabe das Bestimmen der mikrobiellen Zusammensetzung.

2.4 CO₂ -Messung, Feuchtigkeit- und Temperaturmessung

Die Bodenatmung, Feuchtigkeit- und Temperaturmessung findet auf dem Feld statt. Die Messungen werden bei den Probeflächen im Kanton Zürich und Schaffhausen durchgeführt. Die Zäune sind aufgrund ihren Standpunkten am einfachsten zugänglich, um die Messungen alle 6 Wochen zu wiederholen.

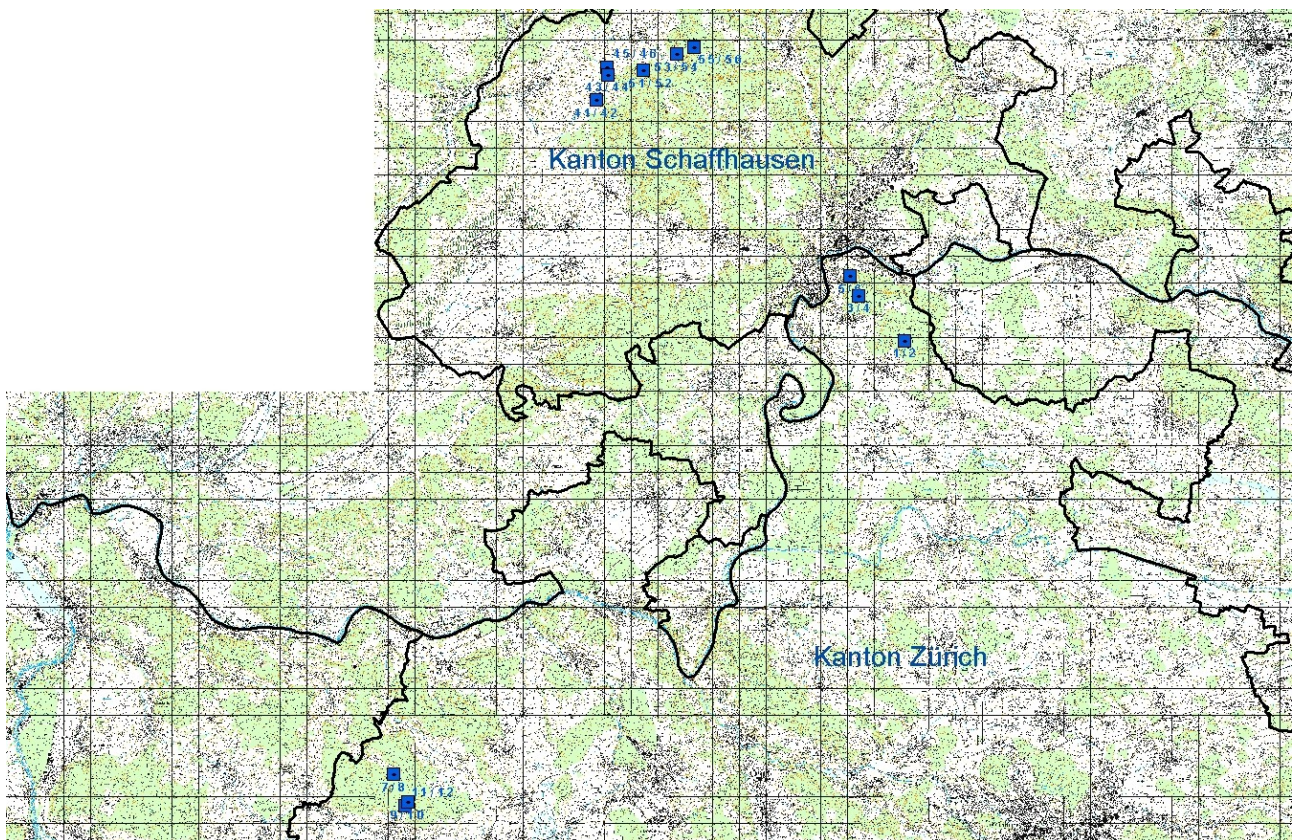
Die Flächen im Kanton Freiburg, Tessin und Graubünden werden wegen Ihrer hohen und schlecht zugänglichen Lage nicht regelmäßig besucht. Die Zäune die sich nahe Schaffhausen befinden, stehen auf kalkhaltigem Boden, durch das Jura, welches sich dort erstreckt. Die Zäune nahe Zürich befinden sich auf sauren Böden.

Hier eine Übersichtskarte mit gekennzeichneten Probeflächen der Schweiz:



Diese Karte zeigt die

Probeflächen im Kanton Schaffhausen und Zürich:



Bei den Probeflächen gibt es an jedem Standpunkt jeweils eine gestörte und eine ungestörte Fläche. Diese liegen nahe aneinander. Die Flächen wurden vor circa 2 Jahren errichtet. Mit Hilfe des dortigen Förster und den Jagdbesitzern wurden die Flächen gezielt ausgewählt.

Es handelt sich dabei, häufig um Reviere in denen Wildschweine des häufigeren ihre Spuren hinterlassen haben.

Dort wurden Zäune aufgebaut die circa eine Größe von 20m² besitzen.

Für die Messung der Bodenatmung wurden in jedem dieser Zäune 5 Ringe mit einem Durchmesser von 25 cm und einer Tiefe von 5 cm angelegt. Auf diese Ringe kann das CO₂ Messgerät (EGM 4) für die Messungen gesteckt werden. Somit ist es gut abgedichtet und senkrecht auf den Boden gerichtet.



Dieses freigesetzte

CO₂ entsteht durch die Bodenorganismen die für die Entwicklung, Wachstum und Vermehrung die notwendige Energie aus organischen Verbindungen oxidieren. Dabei werden Kohlenhydrate (Glucose) in der Regel aerob zu Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Wasser bei gleichzeitiger Freisetzung von Energie abgebaut. Die Menge des freigesetzten CO₂ gilt als Maß für die Intensität der Atmungs- und Lebensprozesse. Als Bodenatmung wird dementsprechend die Sauerstoff(O₂)-Aufnahme und/oder Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Abgabe der Bodenorganismen bezeichnet. Sie führt dazu, dass der CO₂-Gehalt der Bodenluft ansteigt und der O₂-Gehalt abnimmt.

Das bei Atmungsprozessen im Boden freigesetzte CO₂ entstammt zum überwiegenden Teil (etwa 70% bzw. 2/3 der Gesamtmenge) aus der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen und zu etwa 30% aus der Wurzelatmung. Der Mengenanteil der Bodentiere an der Bodenatmung ist dagegen nur sehr gering.

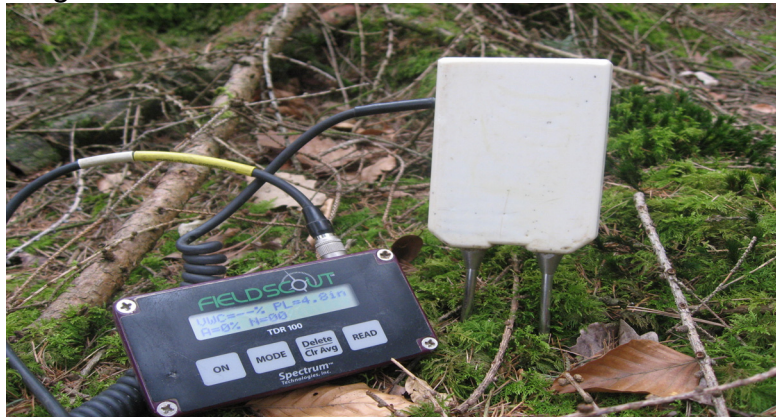
Um einen möglichst exakten Wert zu erhalten und nicht auch die Atmung der in den Ringen wachsenden Pflanzen zu messen, muss der Ring frei von Pflanzen und Blättern sein.

Ist das Gerät platziert, wird Luft angesaugt. Diese wird auf CO₂ gemessen und mit dem definierten Durchmesser auf m²/s bestimmt. Es findet eine Gasaustauschanalyse statt. Die Entstehung des CO₂ folgendermaßen statt:

Diese sowie die Feuchtigkeitsmessung und die Temperaturmessung werden an allen Zaunpaaren gemessen.

Bei der Feuchtigkeit werden die Messungen 6mal wiederholt. Daraus wird ein Mittelwert errechnet um den Feuchtigkeitsgradienten zu ermitteln. Für diese Messung verwenden wir ein Gerät mit zwei Fühlern das in den Boden gesteckt wird. Mit Hilfe der Spannung die

zwischen den zwei Fühlern entsteht ,wird der Feuchtegehalt bestimmt. Hierbei wird also die Weiterleitung des Stroms gemessen
Die gesamten Werte werde protokolliert.
Feuchtigkeitsmessung:



Die Temperaturmessung erfolgt einmal pro Zaun. Sie wird mit einem Thermometer das in den Boden gesteckt wird bestimmt und dann notiert.

In jedem Zaunpaar befinden sich vier Paare an PRS-Sticks die mit einer Harzmembran versehen sind. Diese Wurzelsymoloren werden alle 6 Wochen durch neue ersetzt. Die herausgenommenen Sticks werden mit ionisiertem Wasser gewaschen und nach Kanada zur Analyse geschickt. Dort werden sie gezielt auf Natrium und Ammonium untersucht.



Mit dieser Harzmembran wird eine Bodenanalyse durchgeführt bei der, der Fluss der energiegeladenen Ionen (Kationen/Anionen) bestimmt wird. In unserem Fall Ammonium und Natrium.

Die Harzmembran auch PRS genannt, kann somit durch kontinuierliches absorbieren aufgeladener Ionen das Nährstoffangebot im Boden messen.

2.6. Mikrobielle Zusammensetzung der Bodenproben

2.6.1 DNA Extraktion

Bodenproben von verschiedenen Standorten wurden nach der Aufnahme gesiebt und auf 500mg abgewogen. Zusammen mit 1,3 ml Extraktionspuffer und 750mg Quarzkügelchen wurden sie in Eppis bei -20°C eingefroren.

Der Extraktionspuffer nimmt die DNA auf, während die Quarzkügelchen den Boden und den Puffer zu einer homogenen Mixtur werden lassen.

Es handelt sich bei den 132 Proben um 66 gestörte und 66 ungestörte.

Gestört heißt, Flächen die von Wildschweinen durchwühlt wurden. Ungestört bedeutet somit, Flächen die von Wildschweinen nicht umgegraben wurden.

Die Bodenproben werden aus dem Gefrierschrank genommen und an der Luft aufgetaut, (ca. 30 min). Durch das längere Lagern haben sich verschiedene Schichten in den Eppis gebildet.

Die noch gefrorenen Bodenprobe:



Um wieder eine homogene

Mixtur zu erhalten, werden sie durch das Vortex sorgfältig durchmischt.

Danach in den ThermoSavant BioFastPrep für 40 sec. bei 5,5 Speed gegeben. Dies bewirkte eine weitere Vermischung. Nun werden die Eppis bei 13000rpm 5 Minuten in der 5414D Zentrifuge zentrifugiert. Dadurch hat sich ein Überstand gebildet der nun in 10ml PPCO Oak Ridge tube pipettiert wird. Hierfür verwendet man die milchig weißen Röhrrchen, welche Chloroform resistent sind.

Die Bodenprobe nach dem zentrifugieren:



Nun wird erneut 1ml Extraktionpuffer in die 2ml Eppis gegeben in denen sich nun noch die

Bodenrückstände befinden. Anschließend werden diese wieder sorgfältig mit dem Vortex geschüttelt und in den ThermoSavant BioFastPrep für 40 Sekunden bei 5,5 speet gegeben. Sowie bei 13000rpm 5 Minuten in der 5414D Zentrifuge zentrifugiert. Wie zuvor wird der Überstand in 10ml PPCO Oak Ridge tube pipettiert wo sich der Überstand des ersten Schrittes bereits befindet.

Nun ein letztes mal DNA Extraktionspuffer zufügen, vermischen und zentrifugieren bevor unter der Kapelle mit dem Chloroform gearbeitet wird.

Diese Schritte werden drei mal wiederholt, um möglichst viel DNA zu gewinnen. Bei dem ersten Schritt werden circa 80 % der DNA freigesetzt, bei den nachfolgenden sind es dann deutlich weniger.

Mit Hilfe eines Dispenser, wird zu jeder Probe, 2ml der Chloroform-Isoamylalkohol Lösung dazu gegeben.

Das Chloroform denaturiert Proteine und stabilisiert die Phasengrenze was die Trennung der wässrigen und organischen Phasen erleichtert.

Isoamylalkohol reduziert die Schaumbildung während der Extraktion.

Anschließend wird das ganze mit dem Vortex gut vermischen. In der High Speed Sorvall Zentrifuge für 5 Minuten bei 1300 zentrifugieren.

Nun den Überstand (Isoamylalkohol) vorsichtig mit der Pasteurpipette in ein neues PSF Oak Ridge tube überführt. Da nun kein Chloroform mehr enthalten ist werden die durchsichtigen und nicht Chloroform resistenten Röhrchen verwendet. Daher ist es wichtig kein Chloroform und keine Proteine mit zu überführen.

In das Röhrchen werden 3ml Isopropanol (2Propanol) mit Hilfe des Dispenser gegeben.

Nun das Röhrchen mit der Hand gut schütteln und für eine Stunde in ein 37°C heißes Wasserbad legen. Dabei wird das Isopropanol aktiv und es fällt die DNA.

Nach dieser Zeit, wird das Röhrchen in der High Speed Zentrifuge 15 Minuten bei 13000rpm zentrifugiert.

In der Zentrifuge bildet sich ein Überstand aus Isopropanol und Isoamylalkohol.

Der Überstand wird vorsichtig abgegossen. Nun ist ein kleines braunes Pellet ersichtlich, indem die DNA enthalten ist.

Mit dem Dispenser werden nun 1.5ml EtOH 70% in jedes Röhrchen gegeben.

Der Alkohol wäscht und reinigt die DNA. Ein letztes mal bei 10000rpm zentrifugiert bevor der Überstand (Ethanol) abgegossen wird.

Die Röhrchen werden Kopfüber getrocknet (ca. 20 min) und dann mit AE Puffer 8pH versehen.

Der AE Puffer speichert die DNA.

Die DNA ist nun isoliert und es wird die vorhandenen Konzentration der einzelnen Bodenproben mit dem Spectrophotometer gemessen.

Die erste Messung wird mit dem AE Puffer durchgeführt, ein sogenannter Blank . Danach folgen die Messungen der Bodenproben.

Es wird jeweils 2 ul AE Puffer in dem die gelösten DNA enthalten ist, auf die Messstelle gegeben. Damit erhält man den Konzentrationswert der im Boden vorhandenen DNA in ng/ul mit Hilfe des Nucleic Acid Programms. Diese Werte werden in einem Report festgehalten.

2.6.2 BSA Pretreatment

BSA: bovine serum albumin
zu deutsch RSA: Rinderserumalbumin

Die Konzentration der DNA bestimmt maßgeblich den weiteren Analysengang, vor allem in Bezug auf die eingesetzte Menge der DNA in die PCR, da die verschiedenen Systeme sowohl über eine Nachweisgrenze als auch über ein Reaktionsoptimum verfügen. Darüber hinaus beeinflusst eine zu hohe eingesetzte Menge an DNA die Effizienz einer PCR-Reaktion negativ.

Deshalb wurde mit Hilfe eines Programms die Mengenzugabe des AE Puffer und des BSA Stock (30ng/ul) zu der jeweiligen DNA berechnet.

Durch das Verdünnen der Proben wird nicht nur die DNA Konzentration verdünnt sondern auch die noch enthaltenen unerwünschten Substanzen. Dies ist wichtig, da diese auf die enzymbasierende PCR inhibierend wirken könnten.

Der Puffer stabilisiert die DNA während die Zugabe des BSA die inhibierenden Stoffe hemmt um dann anschließend ein brauchbares PCR Produkt zu erhalten.

Durch einen Probedurchlauf mit verschiedenen Verdünnungen wurde für unsere Bodenproben die richtige Verdünnung, mit 1:10, ermittelt.

Die Verdünnungen werden bis zum nächsten Schritt bei -20°C gelagert.

2.6.3 PCR Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion bildet das Kernstück der heute durchgeführten DNA-Analyse. Es handelt sich um ein Verfahren mit exponentieller Vermehrung von DNA-Abschnitten.

Ein kurzer Abschnitt eines DNA-Moleküls wird viele Male von einer DNA-Polymerase kopiert

Jeden Bereich einer DNA kann ausgewählt werden, vorausgesetzt, die Sequenzen an seinen Enden sind bekannt. Dies ist notwendig weil zu Beginn der PCR zwei kurze Oligonucleotide (*kurze einsträngige Nukleinsäure Moleküle, sind aus weniger als 100 Nucleotiden*) mit dem DNA-Molekül hybridisieren (*Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen komplementären Nukleobasen*) müssen.

Diese Oligonucleotide dienen als Primer für die DNA-Synthesereaktion und begrenzen den vervielfältigten Abschnitt. Der Primer heftet sich an die nachzuweisende DNA-Sequenz an und startet einen Kopiervorgang. Die zu suchende DNA-Sequenz wird anschließend so oft vervielfältigt, bis eine analytisch messbare Menge vorhanden ist. Der Primer spielt eine wichtige Rolle in der PCR.

Nur durch die richtige Auswahl an Primer kommt man zu dem richtigen Fragment und deren Vervielfältigung. Es sollen Nebenreaktionen verhindert werden, was sowohl die Amplifikation anderer Stellen auf dem Genom der untersuchten Spezies als auch auf dem anderer Arten betrifft. Zudem ist die Größe der Primer von Bedeutung. Sind sie zu kurz hybridisieren sie an falscher Stelle und es kommt zur Vermehrung der falschen Abschnitte. Für die PCR ist nicht nur der Primer von Bedeutung, sondern ein Gemisch aus weiteren vier Reagenzien.

Wie schon erwähnt der Primer und natürlich die DNA in ihrer Verdünnung als Matrize für die Kopie.

Der PCR Puffer, der als Medium für die Reaktion dient.

Zudem kommt Magnesiumchlorid in das Gemisch, es aktiviert das Enzym.

Als freie Bausteine für das Kopieren der DNA kommt dNTP mit dazu.

dNTP ist der Vorstufen Baustein der Nukleinsäure. Es sind Nucleoside die phosphoryliert sind.

Phosphorisiert, das heißt, reversibles Anhängen an ein org. Molekül, insbesondere von Enzymen.

Als Polymerase (Enzym) kommt Hot Star Taq hinzu, es baut, dNTP von den Primern ausgehend, entlang der Matrize, zu einem DNA-Strang neu auf.

Dieses Reaktionsgemisch wird zyklisch wiederkehrend drei verschiedenen Temperaturen für einige Minuten ausgesetzt. Dies läuft mit einem eigens dafür programmierten Programm ab.

Der erste Schritt ist bei 94°C, hierbei wird die Doppelstrang-DNA denaturiert, d.h. der Doppelstrang wird zu einem Einzelstrang. Es werden die Basen destabilisiert.

Als nächstes werden bei 50-65 °C die Primer angelegt.

Bei 72°C werden die Ketten verlängert, es wird eine Neusynthese der DNA hergestellt.

Diese Schritte werden mehrere Male wiederholt. Bei jedem dieser Zyklen findet eine Verdopplung des durch den Primer definierten DNA-Abschnittes statt. Da die im vorgegangenen Zyklus neu synthetisierten Abschnitte im folgenden Zyklus auch als Matrize dienen.

Die Vermehrungsreaktion wird durch die Gleichung $Y = A(1+F)^n$ beschrieben.

Y = Menge der applizierten DNA (ng DNA)

A = Ausgangskonzentration der eingesetzten Zielsequenz (ng DNA)

n = Anzahl der durchlaufenen Reaktionszyklen

F = Reaktionseffizienz, die im Idealfall 1 bzw. 100 % beträgt.

Die Effizienz der Reaktion kann aber stark vermindert sein, z. B. durch Inhibitoren.

Die mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion erzeugten DNA-Fragmente müssen nun aufgetrennt werden. Hierfür bietet sich die Gelelektrophorese an. Bei der

Gelelektrophorese wird die DNA auf ein 1 %iges Agrosegel aufgetragen, welches mit Ethidiumbromid die DNA sichtbar macht.

Das in einem ionisierten Puffer befindende Agrosegel, bildet ein engmaschiges Netz, das die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld behindert.

Da die DNA bei neutralem pH negativ geladen ist wandert sie im elektrischen Feld zu Anode. Dabei weisen kleine DNA-Fragmente eine höhere elektroosmotische Mobilität auf als große, d.h. sie bewegen sich schneller durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Da bei meiner Untersuchung nur gleich lange Fragmente vorhanden waren, gab es keine unterschiedlichen Größen und damit waren die Balken am Ende alle auf einer Ebene.

Um die entstehenden Balken später unter UV Licht deutlicher zu machen wird der DNA Loading Dye gegeben, welcher die DNA anfärbt zudem beschwert er durch Glycerin die DNA das nichts aus den Geltaschen läuft. Der Durchlauf wird zusammen mit einer Negativkontrolle (MasterMix+H₂O), falls vorhanden eine positiv Kontrolle (bereits erfolgreich durchgelaufene Probe) und ein Marker durchgeführt. Es können mehrere Proben parallel nebeneinander gleichzeitig durch das Gel laufen.

Der Marker dient als Vergleich, wie groß die vorhandenen Banden sind. Indirekt erfährt man dadurch die Größe der Basenpaare.

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel also unter UV Licht Bestrahlung

fotografiert man erhält ein Bild mit meisteutlich sichtbaren Balken die anzeigen wie viel DNA amplifiziert wurde (bei guter Amplifizierung, gut sichtbare Balken).

2.6.4 Verdau

Die PCR Produkte werden nun für den Verdau vorbereitet. Dafür wird erneut ein Master Mix gemischt. Dieser Master Mix besteht aus H₂O, Tango Buffer, dem Restriktionsenzym

MspI und dem PCR Produkt.

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die ursprünglich in Bakterien vorkommen. Sie beschützen den Mikroorganismus davor, dass fremdeingeschleuste DNA in das Genom des Bakteriums eingebaut wird, indem sie diese zerschneiden. Das Bakterium selbst schützt sich vor seinen eigenen Restriktionsenzymen durch Methylgruppen –CH an der eigenen DNA.

Da Restriktionsenzyme DNA schneiden, nennt man sie auch die „molekularen Scheren“ der Biotechnologie.

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen. Sie greifen die DNA mitten im Strang an. Dabei erkennen sie eine bestimmte Basensequenz, sogenannte Palindrome. Palindrome sind Sequenzen, die von vorne und von hinten gelesen das gleiche ergeben, z.B. GATTAG oder ATATA.

Nach einem Restriktionsverdau besitzt man ein Gemisch aus unterschiedlich langen linearisierten DNA Fragmenten. Es ist in der Regel bekannt, wie viel Units DNA ein Enzym schneiden kann.

Dieses zerschneiden findet bei 37°C für 3h statt anschließend erfährt es 20min eine Temperatur von 65°C bei der die Enzyme inaktiviert werden.

Um dieses entstandene Gemisch aufzutrennen, wird ein Gel verwendet. Das Gel besteht aus Puffer, in dem Agarose durch Erhitzen gelöst wird. Kühlt das Gemisch ab, so entsteht ein Netz auf molekularer Basis. Das Gel wird nun unter Spannung gesetzt. Dadurch laufen die negativ geladenen DNA-Fragmente (aufgrund der negativ geladenen Sauerstoffatome im Rückrad der DNA) zum positiven Pol der Kammer. Wie schon bei der PCR wandern auch hier kurze Fragmente schneller durch das Netz als größere.

Da das Gel sowie die DNA-Proben farblos sind, fügt man den Proben wie bei der PCR einen Ladepuffer (loading Dye) bei.

Auch hier muss dem Gel, um es später zur Auswertung sichtbar zu machen, Ethidiumbromid zugefügt werden.

Ebenfalls läuft ein Marker mit, um später eine Aussage über die Anzahl der Basenpaare, also die Länge eines DNA Fragments machen zu können. Er besteht aus einem Gemisch von DNA Fragmenten mit bekannter Größe.

Nun wird der Verdau aufgereinigt

2.6.5 Verdau aufreinigen

Diese Filtration trennt nun noch die groben Zelltrümmer und die denaturierten Proteine von der in Lösung bleibenden DNA. Dieser Schritt hängt von der Reinheit der Proben ab.

Ja nach Verdauergebnis ist es sinnvoll oder nicht notwendig die Aufreinigung durchzuführen.

2.6.6 Genescan

Mit Hilfe des Genescan werden die geschnittenen und markierten DNA- Sequenzen ermittelt und aufgetragen. Es laufen die Sequenzen durch den Leser der durch die Länge einer Sequenz die Art erkennt. Je nach Häufigkeit erscheint für diese Art ein höherer oder niedriger Peakhöhe auf dem herausgegebenen Diagramm. Die Daten werden anschließend auf eine Tabelle um einen besseren Überblick auf die Resultate zu bekommen. In einer Datenbank sind für die Peaknummern die Artnamen hinterlegt.

3. Schweizer Nationalpark

3.1. Allgemeine Informationen

Lageplan des Nationalparks:



Mit Zunahme der Industrialisierung, Ende des 19. Jahrhunderts kam es zu dem Bedürfnis der Schweizer Bevölkerung einen Nationalpark zu gründen.

Die Gründungspioniere waren hauptsächlich Schweizer Naturforscher.

1914 wurde der Schweizer Nationalpark, dann als erster Nationalpark der Alpen und Mitteleuropa, gegründet.

Heute hat er eine Größe von 170,3 km² und erstreckt sich zwischen einer Höhe von 1400 m. ü. M. -3174 m.ü.M.

An oberster Stelle steht der totale Naturschutz im Park. Doch auch für viele Forschungsprojekte gibt er einen Grundstein auf dem vieles basiert und interessante Entdeckungen gemacht wurden und werden. Nicht zu vergessen die vielen Besucher die Jährlichen in den Park kommen um ihre Ruhe finden oder ihren erträumten Hirsch, vielleicht sogar von der Nähe aus, betrachten können.

Im Sommer halten sich im Park zwischen 1800 und 2000 Hirsche auf.

Ihre Schattenplätze finden sie in den ca. 28% Wald, der sich im Nationalpark erstreckt. Hierbei wächst als Pionierbaum die Föhre und nun auch immer häufiger, durch den Tannenhäher verbreitet, die Arve. Auf den 21% alpinen Rasen können dann die Hirsche sehr schön beobachtet werden. Um die 51% sind Geröllflächen.

Doch es sind noch weitere Herbivoren zu sehen, so z.B. der Alpensteinbock und die Gämse

Seit 1991 wurde auch der Bartgeier wieder im Nationalpark angesiedelt.

3.2. Ober- und unterirdische Biomasse, Bodenaktivität, Nährstoff- und

Kohlenstoffpools in Zäunungen



Seit diesem Sommer ist das Projekt von Dr. Martin Schütz und Dr. Anita Risch am laufen. Dabei soll untersucht werden wie sich die Biomasse und -diversität verändert wenn verschiedene pflanzenfressende Tierarten ausbleiben

Es wurden 18 Zäune auf zwei Vegetationszonen (subalpin und alpin) aufgebaut. Die Zäune sind im gesamten Nationalpark verteilt wobei immer zwei Zäune beieinander stehen. Diese beiden Zäune unterscheiden sich in Ihrem Vegetationstyp. Es wurde ein Zaun im Hochgras (immergrüne Segge, Borstengras,...) und der andere in nähe, doch Kurzgras aufgestellt. Zu jedem Versuchszaun ist eine Referenzfläche außerhalb aber in möglichst ähnlicher Vegetation errichtet worden.

Die Zäune haben eine Größe von 9x7 Meter und sind innen in 4 Felder geteilt , die eine Größe von 3x2 Meter besitzen. Die inneren Felder dienen, wie auch der äußere mit Strom versehene Zaun, zur Abgrenzung der verschieden pflanzenfressenden Tieren.

Der äußerste hält die Hirsche, Gämse und Steinböcke fern. Die inneren einmal das Murmeltier, einmal die Mäuse und zum anderen mal die Insekten.



Weißes Elektroband mit 4000V Strom hält die Huftiere fern

Murmeltierzaun ←

Drahtzaun gegen die Mäuse →



Insektengitter

Die Plätze der Zäune wurden auf Dolomitgestein, wo auch Murmeltier vorzufinden sind, gewählt. Die inneren vier Flächen sind in 6 Plots geteilt. In einem der Plots finden die Messungen statt während die anderen 5 nicht betreten werden um die Vegetation nicht zu stören und zu beeinflussen.

Alle zwei Wochen wurde die Bodenatmung, die Temperatur und die Feuchtigkeit auf diesem einen Plot gemessen und protokolliert. Zudem wurde in jedem Plot mittels eines Sensors die Lichtmenge gemessen, unter anderem auch um heraus zu finden in wie weit die Zäune das Sonnenlicht zurückhalten.

In der anderen Woche wurden in zuvor errichtete Tarnsekte der darin abgefallene Kot und die in einer bestimmten Fläche vorgefundenen Heuschrecken gezählt und bestimmt.

Um die Ausgangssituation (Nullpunkt) zu erfassen wurden beim Zaunaufbau bereits Bodenproben genommen. Diese Bodenproben wurden innerhalb des gesamten Zaun und auf 1m² genommen. Die Bodenproben werden zum einen auf Ihre Wurzelbestandteile untersucht und zum anderen auf Mikroben sowie Phosphat, Stickstoff und Kalium.

Meine Aufgabe war es die Messungen durch zu führen. Neben unserem Team haben sich noch Praktikanten mit der Vegetation beschäftigt und diese aufgenommen.

Um effiziente Ergebnisse zu erhalten wird das Projekt noch zwei weitere Sommer laufen.

4. Quellenverzeichnis

Internet:

<http://www.westernag.ca/innov/prsprobe.php>

<http://www.nationalpark.ch>

<http://www.wsl.ch>

Literatur:

Mechthild Regenass-Klotz: Grundzüge der Gentechnik Theorie und Praxis