©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen
Band 33/34, S. 133 – 145, 2008

Die Etablierung eines DNA-Bank-Netzwerkes in Deutschland

Holger Zetzsche, Gabriele Dröge und Birgit Gemeinholzer

Kurzfassung: DNA-Banken sind technisch optimierte Serviceeinrichtungen zur dauerhaften Lagerung gut dokumentierter DNA. Sie ermöglichen einen allgemeinen Zugang zur DNA und ihrer gesamten Dokumentation zur Verifikation von Forschungsergebnissen oder um weiterführende Untersuchungen am gleichen Ausgangsmaterial durchführen zu können. Vier deutsche Sammlungsinstitutionen mit sich ergänzender Fachexpertise haben sich mit Hilfe der DFG zusammengeschlossen, um ein DNA-Bank-Netzwerk als Serviceeinrichtung für die naturwissenschaftliche Forschung zu etablieren. Bisher gibt es keine allgemein akzeptierten Standards für den Betrieb von biologischen DNA-Banken. Aus diesem Grunde wird hier der momentane Stand des Wissens bezüglich der i) Empfehlung für die Aufsammlung von Pflanzenmaterial, ii) DNA-Extraktion und Aufreinigung, iii) Ermittlung der DNA-Qualität,- Reinheit und -Konzentration, iv) der Langzeitlagerung sowie v) der Dokumentation und Datenbankstrukturen zusammengefasst. Im Rahmen der praktischen Umsetzung wird die Homepage des DNA-Bank-Netzwerkes (www.dnabank-network.org) sowie die Möglichkeiten der Bestellung und Einlagerung von DNA-Proben vorgestellt und es wird auf die Ziele des Projektes eingegangen.

Abstract: DNA banks are technically optimized service facilities for the long term storage of well documented DNA. They allow for universal accessibility to DNA with its full documentation for verification of scientific analysis or to undertake complementary or corroborative studies on the source material. Four German natural history institutions with complementary scientific expertise are supported by the DFG to establish a DNA Bank Network as service facility for the life sciences. Up to now, no common standards for the management of DNA banks have been developed. Therefore, the state of the art is presented here concerning i) collection of plant material, ii) DNA extraction and purification iii) DNA quality, purity and concentration, iv) long term storage and v) documentation and database structures. As part of the public perfomance the homepage of the DNA Bank Network (www.dnabank-network.org) as well as the possibilities to order or donate DNA are presented and future goals are envisaged.

Key words: DNA bank, DNA long term storage, laboratory standardization, documentation, wrapper, ABCD.

Autoren:
Holger Zetzsche, Gabriele Dröge und Birgit Gemeinholzer, Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Straße 6-8, D-14195 Berlin,
E-Mail: h.zetzsche@BGBM.org g.droege@BGBM.org B.Gemeinholzer@BGBM.org

1 Einleitung

DNA-Banken stellen eine neue Form naturhistorischer Sammlungen dar. Die Etablierung solcher neuen Sammlungen ist aus folgenden Gründen notwendig: 1) die Bedeutung von Sammlungen per se und die dadurch mögliche zentrale Hinterlegung von Ausgangsmaterial sowie ihrer allgemeinen Verfügbarkeit und 2) die ständig wachsende Bedeutung von DNA-basierten Methoden für die biologische Forschung mit der fortlaufenden Methodenentwicklung, die es ermöglicht, weiterführende Untersuchungen auf bestehende Forschungsergebnisse aufzubauen.

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

2 Über die Bedeutung naturhistorischer Sammlungen

Naturhistorische Sammlungen sind die wichtigste Grundlage der systematisch-taxonomischen Forschung. Sie ermöglichen einen langfristigen Vergleich verschiedener Organismen miteinander auf ganz unterschiedlicher Ebene, sei es morphologisch-anatomisch bei Herbarbelegen und Objekten aus Alkoholsammlungen, mikromorphologisch aufgrund der Analyse von Oberflächenstrukturen, biogeographisch durch die Auswertung der Herkunftsangaben oder biochemisch durch die Untersuchung von Inhaltsstoffen. Biologische Sammlungen werden seit vielen Jahrhunderten in der Ausbildung an Universitäten und Schulen eingesetzt. Des weiteren spielen sie eine wertvolle Rolle, um auch dem interessierten Laien die organismische Vielfalt nahe zu bringen und ihn z.B. gegenüber deren Gefährdung zu sensibilisieren. Der weltweite Zugang und die Nutzbarkeit der Sammlungsbelege und Präparate durch den Verleih an andere Institutionen bilden eine enorme Ressource für viele Forscher wie Taxonomen, Floristen, Systematiker und Genetiker. Die Sammlungen ermöglichen einen direkten Vergleich von Organismen, der sonst nur unter großem Zeit- und Kostenaufwand möglich wäre. Immer mehr naturhistorische Sammlungseinrichtungen stellen ihre Dokumentationsdaten - zunehmend sogar digitalisierte Bilder ihrer Belege - online zur Verfügung. Diese Information ist damit einem großen Nutzerkreis weltweit zugänglich, so dass die Belege häufig gar nicht mehr verschickt werden müssen, um bearbeitet werden zu können. Alles in allem bilden die in den naturkundlichen Sammlungen bereit gehaltenen Objekte eine wesentliche Grundlage aller biologischen Forschung, wobei hierzu selbstverständlich auch die Lebendsammlungen der Botanischen Gärten und ihre Herbarien zählen.

3 Die Bedeutung der DNA-Analyse für die biologische Forschung

In den großen naturhistorischen Institutionen weltweit findet nicht nur eine Sammlungsverwaltung aus kuratorischer Sicht statt sondern es wird auch Forschung an den Sammlungen betrieben. Hierfür stehen in der Regel Labore zur Verfügung. Mit Hilfe von Licht- und Rasterelektronenmikroskopen können Oberflächen- und Mikrostrukturen analysiert werden, und traditionell werden neben morphologischen Merkmalen anatomische, karyologische und biochemische Analysen zur Beantwortung von Forschungsfragen herangezogen. In den letzten Jahrzehnten wurden in vielen Institutionen auch Molekularlabore aufgebaut, da sich die organismische Forschung durch die DNA-Analyse stark verändert hat. Bisherige Annahmen bezüglich der Verwandtschaft von Organismen und der evolutionären Entwicklung ihrer Merkmale konnten teilweise aufgrund von neuen molekularbiologischen Erkenntnissen widerlegt oder durch neue Hypothesen ersetzt werden. Mit Hilfe DNA-basierter Analysen können heute z.B. auch komplexe Fragen der Biodiversitätsforschung untersucht werden, was früher nicht möglich war. Das Interesse der Forschung gilt dabei zum einen der Aufklärung genetischer Diversität von Arten und ihrer räumlichen Dynamik, des weiteren dem Auffinden genetischer Hotspots in Populationen, Arten und auf höherer systematischer Ebene sowie der Identifikation und Analyse von ökologisch relevanten Genen. DNA-basierte Informationen zur Biodiversität können in Zukunft für die Entwicklung von Schutzstrategien und das Monitoring von gefährdeten Ökosystemen eingesetzt werden, um zu untersuchen, ob der Genfluss zwischen naturräumlich getrennten Populationen unterbrochen ist, bzw. wieder aktiviert werden kann und ob ergriffene Schutz- und Managementmaßnahmen die genetische Diversität beeinflussen und erhalten können.

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Auch Sammlungen können von molekularbiologischen Untersuchungen profitieren, z.B. um zu bestimmen, ob in Erhaltungskulturen in Botanischen Gärten die größtmögliche genetische Vielfalt kultiviert wird oder ob die Kulturen genetischer Drift oder Inzuchtdepression unterliegen, so dass sie der Konkurrenz in ihrem natürlichen Lebensraum nicht mehr gewachsen wären.

Ergebnisse aus molekularbiologischen Analysen werden im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten statistisch verrechnet, analysiert und auf ihre wesentlichen Aussagen komprimiert und publiziert. Stammen die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Vergleich definierter Nukleotidabfolgen von unterschiedlichen Organismen (Sequenzen), werden diese in öffentlich zugänglichen online verfügbaren Sequenzdatenbanken (GenBank, EMBL/EBI, DNA Data Bank of Japan) hinterlegt so dass auf diese Ausgangsinformation zurückgegriffen werden kann.

Dabei wurde lange Zeit jedoch ignoriert, dass molekulare Daten bereits extrahierte Informationen aus der Komplexität des Ausgangsorganismus sind. Nur in der Gesamtheit des Ausgangsorganismus sind alle Primärinformationen verschlüsselt. Durch Extraktion von Teilinformationen gelangen wir zu Sekundärinformationen wie z.B. dem taxonomischen Namen, der durch charakteristische Merkmale definiert wird oder Gewebe- und DNA-Analysen. Für jegliche Detailanalysen eines Individuums ist die Rückkopplung zu den Primärinformationen absolut essenziell. Andernfalls sind die gewonnenen Sekundärinformationen wertlos. Dieses Problem ist jedoch in der Vergangenheit meist vollkommen vernachlässigt worden, so dass viele Untersuchungen nicht mehr nachgeprüft werden können.

Wie notwendig eine Überprüfung erhobener molekularer Daten jedoch ist, ergibt sich aus der Tatsache, dass nach einer Untersuchung von Bridge und Co-Autoren (2003) bis zu 20 % der Sequenzen in den großen Datenbanken fehlerhaft und falsch annotiert sind oder einen falschen wissenschaftlichen Namen tragen, was den Wert dieser Datenbanken erheblich vermindert. Mittlerweile ist die Bedeutung der Verifizierbarkeit von Ergebnissen mit dem Vergleich der Belegdaten jedoch erkannt worden und Wissenschaftler hinterlegen das biologische Ausgangsmaterial in Sammlungseinrichtungen damit es zur Nachbestimmung zur Verfügung steht. Obwohl der Zugriff auf die Referenzorganismen damit potenziell gewährleistet ist, ist ein großer Teil des Sortiments der Forschungssammlungen noch nicht vollständig katalogisiert, digitalisiert oder online verfügbar. Eine Verifizierung des wissenschaftlichen Namens der hinterlegten Organismen oder den daraus gewonnenen DNA-Sequenzen erfolgt deshalb nur selten oder mit großer Zeitverzögerung und hat somit kaum Einfluss auf die Korrektur von Forschungsergebnissen. Hier kann die Etablierung einer neuen Sammlungseinrichtung - der DNA-Banken - mit einer digitalen, online verfügbaren Dokumentation Abhilfe schaffen.

4 DNA-Banken

Dabei sind DNA-Banken technisch optimierte Serviceeinrichtungen zur dauerhaften Lagerung von gut dokumentiertem genetischen Material (Corthals & DeSalle 2005, Savolainen & Reeves 2003) und ermöglichen eine langfristige wissenschaftliche Nutzung des gelagerten genetischen Materials mit der für jede Probe entsprechenden Zusatzinformation. DNA-Banken bestehen im Kern aus zwei Elementen, einer DNA-Sammlung, die auch Gewebeproben mit einbezieht, und einer Datenbank für die Dokumentation aller relevanten Daten (z.B. Fundort, Funddatum, Standort, Sammler, Fixierung der Belege, digitalisierte Voucher, Extraktionsmethode, DNA-Qualität, -Konzentration, DNA-Sequenzdaten, Publikationen etc.). Der Vorteil von DNA-Banken gegenüber der Lagerung in den

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

jeweiligen Institutionen und Arbeitsgruppen, die das Ausgangsmaterial bearbeiten, besteht zum einen in den optimierten Lagerungsbedingungen und zum anderen im vereinfachten Zugang zur DNA, dem Referenzorganismus sowie der dazugehörenden Dokumentation. Ein weiterer Vorteil zentralisierter Sammlungseinrichtungen besteht in der Möglichkeit dort Standards zu entwickeln, die speziell für den Nutzer automatisierter Prozesse, wie die molekularbiologische Bearbeitung der DNA oder die Datenbankabfrage von Nutzen ist.

Während im medizinischen, forensischen und landwirtschaftlichen Bereich DNA-Banken bereits seit längerem etabliert sind, wurde eine zentrale Lagerung der DNA von Wildorganismen lange Zeit vernachlässigt. In einigen Ländern wurde der Missstand bereits erkannt und es wurden DNA-Banken aufgebaut. Die bekanntesten Institutionen für pflanzliche DNA sind die Royal Botanic Garden Kew DNA Bank in Großbritannien, die Plant DNA Bank Korea in Südkorea, die DNA Bank Brazilian Flora Species in Brasilien und die DNA Bank at Kirstenbosch in Südafrika (vgl. Hodkinson et al. 2007). Zahlreiche weitere DNA-Banken befinden sich derzeit weltweit im Aufbau.

In Deutschland gab es bis vor kurzem noch keine DNA-Banken, weshalb sich vier große naturhistorische Forschungseinrichtungen mit unterschiedlichen Sammlungsschwerpunkten zu einem DNA-Bank-Netzwerk zusammengeschlossen haben. Dieses Projekt wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell unterstützt. Die Forschungslandschaft und damit auch die Verteilung der naturhistorischen Forschungsmuseen in Deutschland ist vom Prinzip der Föderalität der Bundesländer geprägt. Der Aufbau eines Netzwerkes mit vorerst vier Partnern war demnach eine Kompromisslösung zwischen der dezentralen Verteilung der Forschungssammlungen und ihrer Fachexpertise und den erhöhten Kosten, die sich aus der mehrfachen technischen und personellen Ausstattung der DNA-Banken ergeben. Um die Langfristigkeit des Projektes zu gewährleisten, wurden Trägerinstitutionen als Netzwerkpartner gewählt, deren Aufgabe es bereits ist, Sammlungen bereitzustellen und dauerhaft zu bewahren. Wegen ihrer starken infrastrukturellen und personellen Fluktuation wurden Universitäten als Netzwerkpartner ausgeschlossen.

Dem Botanischen Garten und Botanischen Museum Berlin-Dahlem (BGBM) obliegt die Hauptkoordination des DNA-Bank-Netzwerkes. Hier befindet sich auch der DNA-Bank-Knoten Pflanzen, Algen und Protisten. In der Verantwortlichkeit des BGBM liegen zudem die Entwicklung bzw. Integration der Module der Datenbank, des Systems der Datenbankabfrage der Partnerdatenbanken und des Online-Portals. Die DNA-Bank für die Hinterlegung der Belege von Wirbellosen Tieren (Teil 1), niederen Deuterostomiern sowie Pilzen ist die Zoologische Staatssammlung München (ZSM). Das Forschungsmuseum König in Bonn (ZFMK) übernimmt die zentrale DNA-Lagerung weiterer Gruppen Wirbelloser Tiere (Teil 2) und von Wirbeltieren. Die vierte DNA-Bank ist an der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig angesiedelt. Die DSMZ ist ein etabliertes Zentrum für Erhaltungskulturen von Mikroorganismen, Zelllinien und Pflanzenviren und deren weltweiten Vertrieb, die Etablierung einer DNA-Bank ist jedoch auch hier ein neuer Sammlungsschwerpunkt.

5 Entwicklung von Standards für DNA-Banken

Sammlungen sind nur nutzbar, wenn sie einem System folgen, mit dessen Hilfe es möglich ist, die Objekte innerhalb der Sammlungen zu finden. Im Zeitalter der weltweiten Vernetzung ist es darüber hinaus unerlässlich, neben dem Ordnungssystem innerhalb einer

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Sammlung internationale Standards zu entwickeln, um den Zugang zu den Sammlungen und den globalen Austausches von Objekten zu erleichtern. So hat sich im botanischen Bereich z.B. der „International Code of Nomenclature" (Greuter et al. 2000) als äußerst nützlich erwiesen, um Individuen mit Namen zu verknüpfen und so das Wiederfinden zu vereinfachen.

Die Global Biodiversity Information Facility (GBIF, www.gbif.org) ist darum bemüht, eine Informatik-Infrastruktur zu entwickeln, um unterschiedliche Datenbanken und Datenbankformate weltweit vernetzen zu können, bzw. ihre Daten über ein Webportal online zugänglich und abrufbar zu machen. Derzeit sind über 120 Millionen Daten an das GBIF-Netzwerk angeschlossen. Die Daten werden von ca. 200 Instituten weltweit bereitgestellt. Deutsche Institute tragen beispielsweise mit über 5 Millionen Daten zum Netzwerk bei. Für Ende 2008 ist die Anbindung von insgesamt 1.000.000.000 Daten geplant (Yesson et al. 2007). Die Daten stammen vor allem aus den klassischen naturhistorischen Sammlungen. Es werden jedoch auch z.B. Observationsdaten mit angebunden.

Bisher gibt es keine allgemein akzeptierten Standards für den Betrieb von biologischen DNA-Banken. Das DNA-Bank-Netzwerk beteiligt sich im Rahmen von SYNTHESYS (Synthesis of Systematic Resources) an einem Projekt, in dem Standards für das Sammlungs- und Datenbank-Management an den großen Naturhistorischen Sammlungen in Europa erarbeitet werden sollen. Im Teilprojekt NA E "Developing storage and Retrieval systems for New Type Collections" wurde eine Vergleichsstudie entwickelt, mit der der aktuelle methodische Stand neuer Sammlungen (Gewebe- und DNA-Banken, genomische und EST-Bibliotheken) beurteilt werden kann. Das Ziel von SYNTHESYS NA E besteht darin, bis zum Jahr 2009 europäische DNA-Bank-Standards zu definieren. Diese betreffen Empfehlungen für die optimierte DNA-Gewinnung, Aufreinigung und -Lagerung, der Aufnahme der auf die DNA bezogenen Daten, der Vernetzung digitalisierter Belege sowie rechtliche Fragen zur Berücksichtigung internationaler Konventionen (CBD, CITES). Momentan wird evaluiert, welche Methoden und Verfahren in den neuen Sammlungen und besonders in den DNA-Banken bereits angewendet werden bzw. praktikabel sind, wobei die folgenden Abschnitte den momentanen Stand des Wissens bzw. die momentanen Empfehlungen aus unserer Sicht zusammenfassen:

Empfehlung für die Aufsammlung von Pflanzenmaterial

Bei Pflanzen eignen sich vor allem junge, gesunde Laubblätter zur DNA-Extraktion, seltener werden andere Pflanzenteile wie Blütenblätter, Knospen, Samen, oder Pollen verwendet; Wurzeln, Holz und Borke beinhalten häufig Sekundärstoffe die hemmend auf die DNA-Extraktion und anschließenden molekularbiologischen Analysen wirken. Für eine reine DNA-Extraktion ist es meistens ausreichend 2-4 cm^2 Pflanzengewebe zu entnehmen; für die dauerhafte Hinterlegung einer Gewebeprobe bedarf es jedoch zusätzlichen Materials. Das Pflanzengewebe sollte mit einer Pinzette abgenommen werden; dabei sollte darauf geachtet werden, dass es zu keiner Kontaminationen kommt. DNA-Proben sollten immer im Zusammenhang mit einem Referenzbeleg gesammelt werden, um jederzeit eine Nachbestimmung zu ermöglichen. Bei gefährdeten und geschützten Pflanzen kann als Referenzbeleg auch ein Foto vom Naturstandort dienen. Werden mehrere DNA-Proben von einer Population gesammelt, sollte mindestens ein Referenzbeleg pro Population entnommen werden, wobei darauf zu achten ist, dass eine DNA-Probe von diesem Belegindividuum selbst stammt und ihm eindeutig zugeordnet werden kann.

Die Menge und Qualität der extrahierten DNA ist größer, wenn frisches Gewebe sofort verarbeitet wird. Frisches Gewebe kann einige

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Tage bei -20°C und einige Monate bei -80°C ohne größeren Qualitätsverlust gelagert werden. Ferner bleibt die DNA in gefriergetrocknet und gefroren aufbewahrtem Gewebe sehr gut erhalten (Thompson 2002). Am langsamsten schreitet die DNA-Degradation in trockenem Zustand voran. Aus diesem Grunde ist die schnelle Trocknung in Silica-Gel unter Feldbedingungen bislang die beste Methode (Chase & Hills 1991; Adams & Adams 1992). Zur Trennung und Aufbewahrung der entnommenen Blattstücke eignen sich dabei z.B. luftdurchlässige Teebeutel oder Papiertütchen, die beschriftet werden können. Mehrere Tütchen können zusammen in einen luftdicht verschließbaren Zip-lock-Beutel mit darin enthaltenem Silica-Gel gegeben und so auch problemlos transportiert werden. Hodkinson und Co-Autoren (2007) empfehlen für die Trocknung ein Verhältnis von 50g Silica-Gel für 1g Frischmaterial. Die Zip-lock-Beutel sollten zunächst nach einem bis wenigen Tagen und später seltener auf einen Farbumschlag des Silica-Gel-Indikators geprüft werden. Das Silica-Gel muss unbedingt ersetzt werden, wenn der Indikator Wassersättigung anzeigt. Von Proben, die sofort nach der Ernte mit Silica-Gel getrocknet wurden, kann nach unserer Erfahrung noch nach einigen Jahren DNA guter Qualität extrahiert werden.

Die temporäre Aufbewahrung von Laubblattstücken in wäßriger NaCl-CTAB-Lösung ist eine Alternativlösung für die Lagerung von pflanzlichen Gewebeproben im Feld. Sie wurde bei schnell fermentierendem Blattmaterial, aus dem DNA schwer zu extrahieren ist, erfolgreich genutzt (Thompson 2002) und ist auch zur Anwendung in den Tropen geeignet.

Mit Gewebe von Pilzen und Flechten wird in der Praxis sehr ähnlich wie mit Laubblattmaterial verfahren. Neben der Trocknung mit Silica-Gel kann das gesammelte Material auch lyophilisiert oder an der Luft getrocknet werden. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Proben nicht schimmeln.

Ein bedeutender Teil von DNA-haltigem Material wird auch weiterhin aus dem reichhaltigen Sortiment der Forschungsherbarien stammen. Die Qualität der extrahierten DNA hängt hier wesentlich von der Geschwindigkeit der Trocknung und der Fixierung der Belege ab. Luftgetrocknetes Material kann auch nach 50 Jahren noch hochmolekulare DNA enthalten während sie bei 10 Jahre alten Belegen degradiert ist (Pyle & Adams 1989), z.B. wenn diese mit Naphthalin oder anderen Insektenvernichtungsmitteln behandelt oder mit Mikrowellen gegen Ungezieferbefall bestrahlten wurden bzw. wiederholt feucht geworden sind.

DNA-Extraktion und Aufreinigung

Eine allgemein anwendbare Empfehlung für die Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Belegen von Wildorganismen kann hier nicht gegeben werden. Das Ausgangsmaterial ist sowohl biochemisch, hinsichtlich der physikalischen Beschaffenheit als auch nach seiner Fixierung (unbehandelt, Silica-getrocknetes Material, DMSO- oder Ethanolpräparate, Herbar) zu heterogen. Bislang existiert kein systematischer Vergleich von Extraktions- und Aufreinigungsqualitäten bei unterschiedlichen Organismengruppen und verschiedenen Methoden (Zelllyse: chaotrope Salze, Enzyme, Detergenzien; DNA-Adsorption: Silica-Membran-Bindung, *magnetic beads*-Bindung, Salzpräzipitation, Phenol/Chloroform, Ionenaustauscher, Präzipitation mit Ethanol bzw. Matrixbindung der Sekundärstoffe) oder zwischen den angebotenen kommerziellen Silica-Membran-basierten Kits. Die Mehrzahl der etablierten Pflanzen-DNA-Banken favorisiert die DNA-Extraktion unter Verwendung von CTAB (Murray & Thompson 1980; Doyle & Doyle 1987) zusammen mit einer sekundären Aufreinigung durch Zentrifugation im LiCl oder CsCl-Gradienten. Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem in ihrer Skalierbarkeit, d.h. der Einsatz der Chemikalien pro Extraktion kann an die Menge des

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

vorhandenen Gewebes angepasst werden, die verwendeten Chemikalien sind jedoch toxisch. Die Qualität der extrahierten DNA ist abhängig von der systematischen Gruppe, der Menge des verfügbaren Materials und vom Alter bzw. der Fixierung der Proben (vgl. Colton & Clark 2001; Csaikl & al. 1998; Drabkowa & al. 2002; Visvikis & al.1998; Merk 2000; Anonymus 2000; Anonymus 2005).

Die Entscheidung über die optimale Extraktions- und Aufreinigungsmethode für die einzelnen Organismengruppen liegt im DNA-Bank-Netzwerk deshalb in der Verantwortlichkeit der DNA-Bank-Manager. Die oben genannten Methoden und verschiedenen Silica-Membran-Kits werden zurzeit in einer vergleichenden Studie auf ihre Verwendbarkeit für Routine-Extraktionen untersucht. Es ist aber momentan nicht zu erwarten, dass sie eine sippenspezifische Optimierung ersetzen kann.

Ermittlung der DNA-Qualität, -Reinheit und -Konzentration

Die Angabe der DNA-Qualität, -Reinheit und -Konzentration sind für den Nutzer von großem Interesse, da nicht jede DNA-Probe für alle molekularbiologischen Anwendungen geeignet ist. Als hochqualitativ kann eine Probe gelten, wenn sie langkettige, mehrerer Tausend Basenpaare lange DNA-Moleküle enthält, nahezu frei von z.B. Polysacchariden, phenolischen Verbindungen, Proteinen und RNA und eine für Downstream-Anwendungen ausreichende DNA-Konzentration enthält (meist 50 ng/µl). Die DNA-Konzentration kann durch spektrometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (= optische Dichte bei 260 nm = OD_{260}) gemessen werden. Die Quotienten der Messwerte für die optische Dichte bei 230, 260 und 280 nm OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} ermöglichen die Schätzung der Reinheit der Proben. Sehr saubere Extrakte haben einen OD_{260}/OD_{280} von 1,8 bis 2,0 (Sambrook & al. 1989) und einen OD_{260}/OD_{230} zwischen 1,8 bis 2,2. Ist der Quotient OD_{260}/OD_{230} wesentlich geringer als 1,8 kann das die Anwesenheit von schwer entfernbaren Sekundärstoffen anzeigen (Peqlab 2007). Fluoreszenzbasierte Messungen nutzen die lichtenergetische Anregung von Chemikalien wie Ethidiumbromid, SYBRGold® oder Picogreen®, die mit DNA-Molekülen interkalieren, sich also in den doppelten DNA-Strang einlagern. Eine einfache Methode besteht darin, eine DNA-Probe mit der Chemikalie zu versetzen und durch Agarosegel-Elektrophorese aufzutrennen, das Gel mit UV-Licht anzuregen und die Stärke des emittierten fluoreszierenden Lichts zu messen. Durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration kann die DNA-Menge der DNA-Probe quantifiziert werden. Diese Methode ist dem spektrometrischen Verfahren bei unsauberen Proben oder solchen mit niedriger DNA-Konzentration überlegen (Sambrook & al. 1989; Ausubel & al. 2002). Ferner ermöglicht dieser Ansatz auch eine Schätzung der mittleren Länge der DNA-Moleküle, was mit den spektrometrischen Methoden nicht möglich ist.

Als weiterer Qualitätsstandard innerhalb des Netzwerkes ist beabsichtigt, für jede DNA-Akkzession mindestens einen DNA-Bereich zu sequenzieren, was mit sogenannten DNA-Barcode-Marker erfolgen wird. Eine Barcode-Sequenz stellt einen dreifachen Qualitätsnachweis dar. Sie zeigt an, dass (i) eine PCR-Amplifikation mit der extrahierten DNA grundsätzlich möglich ist, (ii) die taxonomisch-systematische Identität der Probe der Dokumentation entspricht und, (iii) keine Kreuzkontamination mit anderen Organismen vorliegt.

Optimierte Bedingungen zur DNA-Langzeitlagerung

Bislang haben sich nur wenige wissenschaftliche Studien mit den Auswirkungen einer langfristigen DNA-Lagerung auf die DNA-Qualität beschäftigt. Zu berücksichtigen ist, dass die DNA wegen der Aktivität von Repa-

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

raturmechanismen innerhalb von Organismen und speziell in deren Verbreitungs- und Überdauerungseinheiten (Samen, Sporen, Bazillen, Kryptobiosestadium der Tardigraden, etc.) die geringste Schädigung aufweist (Poinar & Eglinton 2004). Soweit bisher bekannt ist, haben energiereiche Strahlung und hohe Temperatur, schützende Zusatzstoffe (DNA-Protektiva) sowie die Auftau- und Einfrierhäufigkeit Einfluss auf die DNA-Qualität. Die Erforschung von Verfahren mit denen die DNA-Degradierung vermindert werden kann, befindet sich noch in einem sehr frühen Stadium (Smith & Morin 2005; Morin 2000). Durch den Zusatz des nicht-reduzierenden Disaccharids Trehalose, das in hohen Konzentrationen in den Kryptobioseformen der Bärtierchen vorkommt und als DNA-Protektor wirkt (Crowe 2001), kann nach einer Untersuchung von Smith & Morin (2005) auch die Lagerungsstabilität von DNA erheblich verbessert werden. DNA in Pufferlösung und Trehalose kann nach Smith und Morin (2005) bei Temperaturen über 4°C ohne Degradation gelagert werden, für lyophilisierte DNA wird sogar eine Lagerung bei Raumtemperatur empfohlen. Weil Trehalose ferner als Enhancer wirkt, wird die Amplifikation bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) angeblich erleichtert, wobei die Autoren weitere Untersuchungen vor einer Routineanwendung für notwendig erachten. Dies gilt umso mehr, als keine Langzeiterfahrungen mit diesem Zusatzstoff vorliegen. Die Lagerung von lyophilisierter DNA bei -80°C ist auch ohne Trehalose möglich, weil sich die DNA-Moleküle dann gegenseitig stabilisieren.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist die Lagerung in flüssigem Stickstoff die technisch sicherste Form der langfristigen Aufbewahrung von DNA. Zum einen kommen die Molekülbewegungen und Scherungskräfte, die zum Bruch der DNA-Moleküle führen können, erst bei sehr tiefen Temperaturen vollständig zum Erliegen. Zum andern können Behälter mit flüssigem Stickstoff Stromausfälle längere Zeit kompensieren (Corthals & Desalle 2005). Die Ausstattung von entsprechenden Lagereinrichtungen sind jedoch mit erheblichem finanziellen Aufwand verbunden und vor allem die hohen laufenden Kosten überschreiten häufig die knappen Haushalte naturhistorischer Sammlungseinrichtungen.

Folgende technische Lösung des Lagerungsproblems wird in den DNA-Banken des Netzwerkes umgesetzt: Die extrahierte DNA wird in eine Stammprobe und einige bei Bedarf sofort auslieferbare Aliquots aufgeteilt, wobei Stammlösung und Aliquots in getrennten Kühleinrichtungen gelagert werden. Damit soll die mögliche DNA-Degradation der Stammprobe durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren weitgehend reduziert werden. Die Stammprobe wird außerdem lyophilisiert. Die Lagerung aller Proben erfolgt in Vakuum-isolierten Kühlgeräten bei -80°C. Back-up-Aliquots werden in Zukunft regelmäßig an die Umweltprobenbank in Trier abgegeben. Darüber hinaus wird an den DNA-Banken die Abhängigkeit der DNA-Degradierung von den Lagerungsbedingungen, der Auftauhäufigkeit und verschiedenen DNA-Protektiva, sowie die Optimierung der Rehydrierung von lyophilisierter DNA untersucht.

Dokumentation und Datenbanken

Neben der Qualität der DNA entscheidet vor allem die Dokumentation über den wissenschaftlichen Wert einer Probe. Notwendige Sammlungsinformationen lassen sich in drei Klassen zusammenfassen: Beleg- oder Specimen-Daten, Gewebe- und DNA-Daten sowie DNA-Analyse-Daten. Erstere umfassen alle Angaben, die für den gesammelten Referenzbeleg relevant sind. Dazu gehören der wissenschaftliche Name mit Autor, Fundort bzw. GPS-Daten, Funddatum, Standortangaben, Sammler, Sammelnummer, Bestimmer, Sammlungscode oder –name, Specimen-Barcode, Sammelerlaubnis, Standort des Referenzbeleges und/oder Verknüpfungen zu digitalisierten Voucher, Standortfotos, Karten, usw. Die zweite Klasse der Gewebe- und

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

DNA-Bank-Daten umfasst die DNA-Bank-Nummer, die Extraktionsmethode, die Person, die die Extraktion durchgeführt hat, die DNA-Qualität (OD-Werte und -Quotienten), DNA-Konzentration, Lagerort (Kühlgerät, Box, Ort der Back-up-Proben), DNA-Tube-Barcode, Amplifikation, DNA-Barcode- oder Kontroll-Sequenz, Herkunft von eingelagerter DNA, Zugangsbeschränkung, Person und Institution an die DNA versendet wurde, etc. Die dritte Klasse von Informationen, wie DNA-Sequenzen, Links zur Ablage der Sequenzdaten z.B. bei GenBank oder EMBL, Links zu externen Belegen sowie zu Publikationen, etc. betreffen vor allem die Analyse der DNA.

Mittlerweile ist es nicht mehr notwendig, all diese Informationen in einer Datenbank zu lagern, vor allem, wenn die einzelnen Datenbankteile auch anderen Bereichen der Sammlungsinstitution zugute kommen. Zu große Datenbanken werden unübersichtlich, vor allem, wenn für viele Datenbankfelder nur geringe, z.T. hoch spezialisierte Information vorliegen. Heutzutage ist es viel mehr möglich, über „Globally unique identifier (GUID)" jedes in den Datenbanken befindliche Objekt mit anderen Datenbanken zu vernetzen, um schnell, einfach und übersichtlich an alle relevanten Informationen zu gelangen.

Dies kann mit Hilfe eines sogenannten Wrappers erfolgen. Er dient als eine Art Übersetzer für die je nach Datenbank individuell benannten Tabellen und Spalten. Alle Datenbanken haben in der durch den Wrapper übersetzten Form einen identischen Aufbau, was die Suchabfragen wesentlich beschleunigt. Dadurch ist es auch möglich, viele Datenbanken zeitgleich abzufragen. Nach diesem System funktioniert bereits das GBIF Webportal (www.gbif.org), das es ermöglicht, in mehreren hundert Sammlungsdatenbanken weltweit organismenübergreifend binnen Sekunden zu suchen, wo sich Belege eines bestimmten Taxons befinden. Am DNA-Bank-Netzwerk erfolgt die Übersetzung durch die Installation sogenannter „PyWrapper" (Py steht für die Programmiersprache Python). Hierfür wird die BioCASe Provider Software benutzt (Biological Collection Access Services, www.biocase.org). BioCASe benutzt u.a. das sogenannte ABCD-Schema (Access to Biological Collections Data (www.bgbm.org/TDWG/CODATA/Schema/). Dieses Schema wurde von der Taxonomic Databases Working Group (TDWG, www.tdwg.org) als Standard akzeptiert und dient dazu, verschiedene Datenbanken auf einen gemeinsamen Nenner zu bringen und somit vergleichbar zu machen. Im übertragenen Sinn hat das ABCD-Schema die Funktion eines Wörterbuchs, dass der Wrapper zum Übersetzen benötigt.

Das Datenbanksystem des DNA-Bank-Netzwerkes ist in doppelter Hinsicht modulär aufgebaut, es besteht aus Datenklassenmodulen und Standortmodulen, die jeweils in sich und miteinander über Wrapper vernetzt sind, also übersetzt werden. Die Beleg- oder Specimen-Daten werden bei den vier DNA-Bank-Netzwerkpartnern separat in den bereits etablierten Datenbanken verwaltet. An der ZSM in München werden dazu z.B. „Specify" und „DiversityCollections" und am ZFMK in Bonn verschiedene „BioDAT"-Datenbanken genutzt. Am BGBM in Berlin gibt es für das Herbarium und die Lebendsammlung jeweils eine Sammlungs-Datenbank. Jeder der Netzwerkpartner betreibt ein eigenes DNA-Datenbank-Modul, das von dem jeweiligen Verantwortlichen vor Ort verwaltet wird. Bei der Abfrage der Beleginformationen für eine DNA-Probe, werden die relevanten Specimen-Daten in einem sogenannten „Cache" gespeichert. Damit ist es möglich die Suchanfragen insgesamt zu beschleunigen, sowie nach Belegen zu suchen, von denen bereits DNA extrahiert wurde. Auf diese DNA-Datenbanken wird ebenfalls jeweils ein Wrapper installiert über die die Suchabfrage im Webportal nach dem oben erläuterten Prinzip erfolgen kann. Abbildung 1 veranschaulicht den Datenfluss im DNA-Bank-Netzwerk.

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Alle Dokumentationsdaten (Beleginformationen, DNA- und Gewebedaten und DNA-Analyse-Daten) können über eine speziell entwickelte Eingabemaske eingegeben werden, die Teil des DNA-Datenbank-Moduls ist. Zusätzlich zu dieser Maske wird ein Verwaltungsmodul entwickelt, mit dem es z.B. möglich sein wird, Kundenanfragen zu bearbeiten und den Lagerbestand zu kontrollieren. Die Informationsverwaltung in Datenbanken und der Zugang zu ihnen sind ein kritisches Element für die Nutzbarkeit der DNA-Banken. Das Ziel kann nur darin bestehen, alle relevanten Daten schnell, einfach und übersichtlich online zur Verfügung zu stellen. Eine Erweiterung des Netzwerkes nach der Etablierungsphase wird grundsätzlich auf nationaler und/oder internationaler Ebene möglich sein.

7 Zur Nutzung der DNA-Bank

Der Webauftritt des DNA-Bank-Netzwerkes wurde unter www.dnabank-network.org online gestellt und berücksichtigt allgemeine Informationen und Ziele (*Home*), Publikationen und Presse (*Publications*), Ansprechpartner für die Organismengruppen, Informationen über die DNA-Qualität und –Dokumentation, Kosten und Rechtliches (*Order DNA*), Kriterien für die Einlagerung (*Donate DNA*), Hintergrundinformationen, Kontaktliste (*About us*) und Links zu DNA-Banken außerhalb des Netzwerkes (*Site Links*). Das Webportal befindet sich noch im Aufbau; voll funktionstüchtig wird es eine Suchfunktion zum Auffinden der eingelagerten DNA-Proben und ihrer Dokumentationsdaten enthalten. Damit wird es möglich sein, gezielt nach

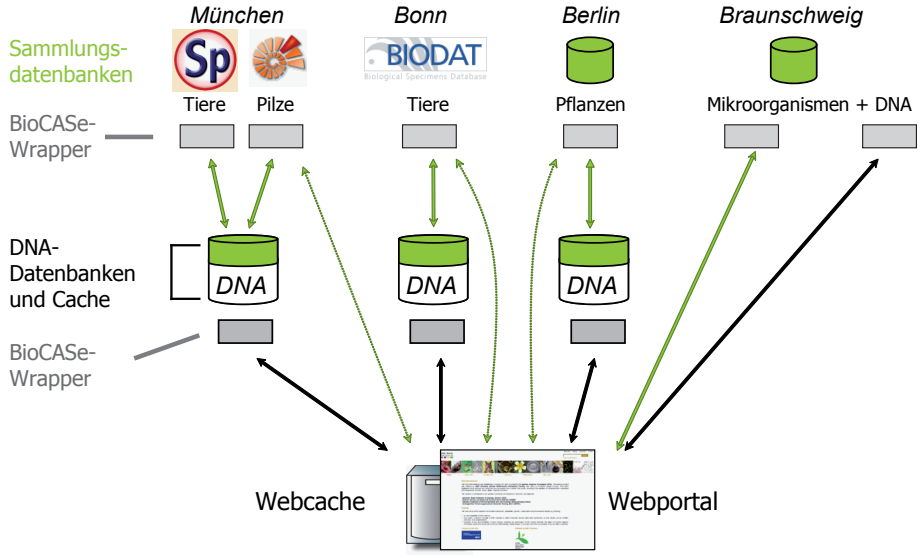


Abb. 1: Datenfluss im DNA-Bank-Netzwerk. Die Datenarchitektur basiert auf der Infrastruktur von GBIF. Beleginformationen (grüne Linien) werden über BioCASe-Wrapper (graue Boxen) an die DNA-Module und das Webportal übertragen. Die Wrapper für die Belegdaten sind dieselben, die auch GBIF benutzt. Über eine zusätzliche BioCASe-Wrapper-Installation auf den DNA-Modulen und der Datenbank in Braunschweig werden die DNA-Daten (schwarze Linien) an den Webcache und das Webportal übertragen. Das Webportal ist dadurch in der Lage, sowohl die Beleg- als auch die DNA-Daten „live" (Original-Daten aus den jeweiligen Datenbanken) anzuzeigen.

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

den Proben einer bestimmten Spezies, Gattung, Familie oder nach geographischen Koordinaten zu suchen oder verschiedene Parameter zu kombinieren (z.B. „hochmolekulare DNA" + „Asteraceae" + "Griechenland").

Bestellung von DNA-Proben

DNA-Proben können auf Anfrage über die DNA-Bank-Homepage bestellt werden. Die Abwicklung der Bestellung erfolgt in Verantwortung der Partner-Banken. Eine Übersicht über die Ansprechpartner für bestimmte Organismengruppen ist auf der Webseite angegeben (www.dnabank-network.org/ListGroups.htm). Auf Wunsch können spezielle DNA-Extraktionen und die Auslieferung der Aliquots aus den Forschungssammlungen erfolgen, sofern entsprechendes Ausgangsmaterial vorhanden ist oder wenn DNA-haltiges Material mit vollständiger Dokumentation zur Verfügung gestellt wird. Die ausgelieferte DNA weist nach Möglichkeit eine Konzentration von > 50 ng/µl auf und ist je nach Ausgangsmaterial von hoher bis mittlerer Qualität sowie grundsätzlich für PCR-basierte Analysemethoden geeignet. Regulär werden Aliquots mit einem Volumen von 25µl DNA-Lösung versendet, größere Mengen stehen auf Anfrage zur Verfügung. Qualitätsminderungen aufgrund degenerierter DNA des Ausgangsmaterials oder geringer DNA-Konzentration können auftreten, werden aber durch die Dokumentationsdaten angegeben. Die Eignung der versendeten DNA-Probe für spezielle Anwendungen kann deshalb nicht garantiert werden (degenerierte DNA ist z.B. ungeeignet für AFLP-Analysen). Für die Lieferung von DNA-Proben werden Gebühren erhoben, bestehend aus einer Schutzgebühr je bestellter DNA-Probe und einer Versandkostenpauschale pro Lieferung. Die Preise können zwischen den einzelnen DNA-Banken variieren. Die DNA-Proben werden vorrangig für wissenschaftliche und pädagogische Zwecke zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse aus der Analyse der Proben dürfen ohne vorherige schriftliche Genehmigung der DNA-Banken nicht für kommerzielle Zwecke benutzt werden. Die Erlaubnis wird nur erteilt, wenn eine gleichberechtigte Gewinnbeteiligung mit den Herkunftsländern im Wortlaut und im Sinne der internationalen Biodiversitäts-Konvention (CBD) (www.cbd.int) gesichert ist. DNA, die an Dritte weitergegeben werden soll, unterliegt diesen Bedingungen ebenso.

Einlagern von DNA-Proben

Es ist für Forscher aller Institutionen möglich, DNA wissenschaftlich bearbeiteter Organismen mit der dazugehörenden Referenzdokumentation in den DNA-Banken des Netzwerkes dauerhaft einzulagern. Die Hinterlegung ist ein Beitrag zur „Guten Wissenschaftlichen Praxis" und ermöglicht, dass weiterführende Untersuchungen am gleichen Ausgangsmaterial durchgeführt werden können. Für eine Probeneinlagerung werden alle zur DNA gehörenden Dokumentationsangaben benötigt. Dies umfasst die Sammeldaten, die Methode und das Datum der DNA-Entnahme, sowie bei Bedarf eine Kopie der Sammelerlaubnis für Belege von geschützten Arten oder von Belegen aus Schutzgebieten. Im Rahmen der DNA-Bank ist eine online-Verfügbarkeit der Referenzbelegdaten essenziell. Aus diesem Grunde wird um die Zusendung der Belegdaten sowie eines Vouchers zur Digitalisierung gebeten oder um die Angabe, wo evtl. bereits digitalisierte Bilder und Belegdaten online verfügbar sind, damit sie mit der Datenbank des DNA-Bank-Netzwerkes verlinkt werden können. Aus bioinformatischer Sicht bedeutet dies, die Übermittelung der Wrapper-Url des Providers, bei dem die Daten des Beleges liegen (z.B. http://ww3.bgbm.org/biocase/pywrapper.cgi?dsa=HerbariumImages), sowie die Catalogue Number (die hausintern eindeutige Nummer) des Beleges an die jeweilige DNA-Bank. Diese beiden Angaben zusammen sind Teil der oben erwähnten GUIDs.

Die einzulagernden DNA-Proben sollten nach Möglichkeit eine Mindestmenge von

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

500ng DNA enthalten. Es können sowohl eine Probe je Individuum und Fundort als auch mehrere Proben pro Populationen und Fundort eingelagert werden. Die DNA-Einlagerung ist kostenlos. Es ist möglich, die eingelagerte DNA für eine Dauer von maximal zwei Jahren zu sperren, das heißt, die Daten werden erfasst, doch weder die DNA noch die Dokumentationsdaten sind bis zum Stichtag öffentlich zugänglich. Die Spender von DNA-Proben werden auf Wunsch genannt, übertragen jedoch alle Rechte für die Verwertung der DNA an die Partnerinstitution der verantwortlichen DNA-Bank. Ihnen wird aber ein Vetorecht bei einer kommerziellen Nutzung ihrer Proben eingeräumt.

8 Ausblick

Momentan werden die Labor-, Lagerungs- und Datenbankbedingungen an den Institutionen der Netzwerkpartner für die neue Sammlungsinfrastruktur optimiert. DNA-Lagerungsversuche werden durchgeführt, deren Ergebnisse zum einen publiziert werden, zum anderen wird im Rahmen des DNA-Bank-Netzwerkes im Herbst 2008 ein DNA-Lagerungssymposium durchgeführt, zu dem Wissenschaftler der unterschiedlichsten Fachrichtungen eingeladen werden, um neue Erkenntnisse in Bezug auf die DNA-Langzeitlagerung und das DNA-Bank-Management auszutauschen.

Zur Zeit wird DNA und ihre Zusatzinformation aus hausinternen Forschungsprojekten in die DNA-Banken integriert und es wird bevorzugt auf die DNA-Einlagerung geschützter und gefährdeter Arten sowie die Flora und Fauna Deutschlands wert gelegt. In diesem Rahmen besteht z.B. am Botanischen Garten Berlin eine Zusammenarbeit mit dem Botanischen Verein Berlin-Brandenburg, um die regionale Flora bis zum Ende des Jahres 2008 zu ca. 80% zu besammeln und zu dokumentieren was annähernd 60% der Pflanzenvielfalt Deutschlands entspricht. Ferner werden Wissenschaftler der Institutionen beim Durchführen von Forschungsreisen dazu animiert auch DNA-Material mit der dazugehörenden Dokumentation zu sammeln. In Berlin konnten so bereits ca. 500 DNA-Pflanzenproben aus dem Altai und ca. 200 Proben aus den Alpen mit in die DNA-Bank integriert werden. Wissenschaftler aller Fachrichtungen und Institutionen werden eingeladen, DNA aus Forschungsprojekten mit der dazugehörenden Zusatzinformation in einer der DNA-Banken des Netzwerkes zu hinterlegen.

Darüber hinaus besteht eine vorrangige Anstrengung der Netzwerkpartner darin, die vorhandenen biologischen Sammlungen (Belegsammlungen, Lebendsammlungen, Samen- bzw. Stammzellbanken, Gewebebanken, DNA-Banken, etc.) und die Sammlungsdatenbanken örtlich und bioinformatisch zu integrieren, und dem wissenschaftlichen Nutzer sowohl die Belege als auch die Daten einfach und schnell zugänglich zu machen. Nur so kann die an den Forschungsmuseen konzentrierte und inzwischen begrenzte fachliche Expertise effektiv genutzt werden. Die optimale Nutzbarkeit aller in den Sammlungen vorhandenen Ressourcen – Belegsammlungen, Lebendsammlungen, Samenbanken, DNA-Banken, DNA-Sequenzdatenbanken – kann nur durch eine wenigstens informelle Integration der Sammlungen und Sammlungsdaten verbunden mit einem möglichst einfachen Zugang für den wissenschaftlichen Nutzer erreicht werden. In verschiedenen Projekten, z.B. Global Biodiversity Information Facility (GBIF), Biological Collection Access Service for Europe (BioCASE), Informationssystem zur Biodiversität terrestrischer Algen (AlgaTerra) und Consortium for the Barcode of Life (CBOL) wird genau das versucht. DNA-Banken können in diesem Rahmen ein ideales Bindeglied zwischen den traditionellen Belegsammlungen, der DNA als biologischem Informationsträger und den in Datenbanken hinterlegten DNA-Sequenzen werden.

©Naturwissenschaftlicher Verein Osnabrück e.V.

Dank. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sowie der Forschungskommission der FU-Berlin für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Literatur

Adams, R. P. & Adams, J. E. (1992): Conservation of plant genes: DNA banking and in vitro biotechnology. - Academic: San Diego.

Anonymus (2000): Plant nucleic acid purification. Technical hints and applications. QIAGEN. http://www1.qiagen.com/literature/brochures/plant_nap/1014067_BROS_DNYP_INT.pdf

Anonymus (2005): Kurz und schmerzlos. Produktübersicht DNA/RNA-Isolation.- Laborjournal 03: 17-24.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. D., Smith, J. A. & Struhl, K. (2002): Current Protocols in Molecular Biology.-Wiley Interscience: New York.

Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. & Panchal, G. (2003): On the unreliability of published DNA sequences. - New Phytologist 160: 43 - 48.

Chase, M. W. & Hills, H. H. (1991): Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies.- Taxon 40: 215-220.

Colton, L. & Clark, J. B. (2001): Comparison of DNA isolation methods and storage conditions for successful amplification of *Drosophila* genes using PCR.- Dros. Inf. Serv. 84: 180-182.

Corthals, A. & DeSalle, R. (2005): An application of tissue and DNA banking for genomics and conservation: The Ambrose Monell Cryo-Collection.- Syst. Biol. 54(5): 819 – 823.

Crowe, L. M. (2001): Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis.- Comp. Biochem. Physiol. A 131: 505–513.

Csaikl, U. M., Bastian, H., Brettschneider, R., Gauch, S., Meir, A., Schauerte, M., Scholz, F., Sperisen, C., Vornam, B. & Ziegenhagen, B. (1998): Comparative analysis of different DNA extraction protocols: A fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies.- Plant Mol. Biol. Report. 16: 69-86.

Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.- Phytochem Bull 19: 11-15.

Drabkowa, L., Kirschner, J. & Vlcek, C. (2002): Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimen of Juncaceae.- Plant Mol. Biol. Report 20: 161-175.

Greuter, W. McNeill, J., Barrie, F. R. Burdet, H.-M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H. Silva, P. C., Skog, J. E., Trehane, P. Turland, N. J. & Hawksworth, D. L. (2000): International Code of Botanical Nomenclature (St Louis Code). Regnum Vegetabile 138.- Koeltz Scientific Books: Königstein.

Hodkinson, T. R., Waldren, S., Parnell, J. A. N., Kelleher, C. T., Salamin, K. & Salamin, N. (2007): DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation.- J. Plant Res. 120: 17-29.

Merk, S. (2000): Einfluss von Probenaufbereitung und Probenmatrix auf die PCR-Diagnostik.- Dissertation Universität Hannover.

Morin, P.A. (2000): Preservation of DNA from endangered species.- Science 289: 725 – 727.

Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.- Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

Poinar, D. & Eglinton, G. (2004): E-letter to: Morin, P.A. (2000): Preservation of DNA from endangered species.- Science 289: 725 – 727.

Pyle, M. M. & Adams, R. P. (1989): In situ preservation of DNA in plant specimens.- Taxon 38(4): 576-581.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn.- Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Savolainen, V. & Reeves, G. (2003): A plea for DNA banking.- Science 304 (5676): 1445.

Smith, S. & Morin, P. A. (2005): Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent.- J. Forensic Sci. 50(5):1101-8.

Thompson, J. A. (2002): An improved non-cryogenic transport and storage preservative facilitating DNA extraction from difficult plants collected at remote sites.- Telopea 9: 755-760.

Visvikis, S., Schlenck, A. & Maurice, M. (1998): DNA extraction and stability for epidemiological studies.- Clin. Chem. Lab. Med. 36: 551-555.

Yesson, C., Brewer, P.W., Sutton, T., Caithness, N., Pahwa, J.S. , Burgess, M., Gray, A.W., White, R.J., Jones, A.C., Bisby, F.A. & Culham, A. (2007): How global is the Global Biodiversity Information Facility? PLoS ONE 2(11): e1124. doi: 10.1371/journal.pone.0001124.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen

Jahr/Year: 2008

Band/Volume: 33-34

Autor(en)/Author(s): Zetzsche Holger, Dröge Gabriele, Gemeinholzer Birgit

Artikel/Article: Die Etablierung eines DNA-Bank-Netzwerkes in Deutschland 133-145