

**Isoenzymuntersuchungen bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)
- Anleitungen zur Trennmethode und Auswertung der Zymogramme -**

zusammengestellt von

MONIKA KONNERT

Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP), Teisendorf Monika

unter Mitwirkung von

Th. Wimmer, S. Nowak, E. Häusl, K. Mader

ASP Teisendorf

Die folgende Zusammenfassung der Labormethoden für biochemisch-genetische Untersuchungen an Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) basiert vorrangig auf den Arbeiten, die am Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht in Teisendorf durchgeführt wurden.

Bei der Beschreibung der Zymogramme, ihrer genetischen Interpretation und der Bezeichnung der Enzyme wurden zudem vor allem folgende Arbeiten berücksichtigt:

BOUSQUET, J.; CHELIAK, W. M.; LALONDE, M. (1987): Allozyme variability in natural populations of green alder (*Alnus crispa*) in Quebec. *Genome* 29, 345-352.

BOUSQUET, J.; CHELIAK, W. M.; LALONDE, M. (1987): Allozyme variation within and among mature populations of speckled alder (*Alnus rugosa*) and relationships with green alder (*A. crispa*). *Am.J.Bot.* 75, 1678-1686.

LINARES-BENSIMON, C. (1984): Versuche zur Viabilitätsselektion an Enzym-Genloci bei *Alnus glutinosa* (L.) GAERTN.): Göttingen Research Notes in Forest Genetics, 7, 137 S.

MURILLO, O.; HATTEMER H. H. (1996): Inheritance of Isozyme Variants of *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (SCHLECTENDAL) FURLOW. *Silvae Genetica* 46, 51-55.

Dort liegen auch Daten zur genetischen Kontrolle der Enzymsysteme vor.

Die Häufigkeitsangaben der Genvarianten beziehen sich nur auf die Untersuchungen, die am Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP) Teisendorf durchgeführt wurden. Diese umfassen neun Populationen aus Süddeutschland sowie Klone aus zwei Samenplantagen des ASP in Südbayern (Laufen und Untereichet).

Das vorliegende Handbuch wird von den Verfassern einmal jährlich überprüft und aktualisiert.

Die Erstellung dieses Laborhandbuches wurde durch das BMBF gefördert.

Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

Tab. 1: Übersicht über die bei Schwarzerle untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende Genorte.

Enzym und Nomenklatur	Genort	Struktur	Anzahl Allele	Häufige Allele	Trenn- System
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	2 2 4	A ₂ B ₂ C ₂	Ashton
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-B	Dimer	4	B ₂	Ashton
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A IDH-B	Dimer	2 4	A ₂ B ₃	Tris-Citro
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	3 3	A ₃ B ₂	Histidin-citrat
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C	Dimer	2 2 3	 B ₂ C ₃	Histidin-citrat
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MNR-A	Tetramer	2	A ₄	Tris-Citro
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PDGH-A 6-PGDH-B	Dimer	4 3	A ₃ B ₂	Tris-Citro
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-B PGI-C	Dimer	3 2	B ₂ C ₃	Ashton Tris-Citro
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B	Monomer	6 2	A ₃ B ₂	Histidin-citrat Tris-Citro
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-A	Monomer	3	A ₂ ,A ₃	Histidin-citrat

Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Die Enzyme wurden aus Knospengewebe (grünes meristematisches Gewebe), jungen Blättern (kurz nach Austrieb) sowie 2-3-tägigen Keimlinge (aus Keimtest) extrahiert. Dabei kamen folgende Homogenatpuffer zum Einsatz:

Puffer 1: Tris/HCl pH 8,0 (nach HERTEL Waldsiedersdorf, pers. Mitteilung)

- Lösung I 40 g Saccharose in 200 ml H₂O dest.
Lösung II 6 g TRIS in 100 ml H₂O dest. Mit HCl auf pH 8,0
Lösung III 40 ml Lsg. I + 10 ml Lsg. II

Zu Lösung III werden hinzugefügt:

- 500 mg PVP
- 500 mg Diethyldithiocarbamic acid (Sigma D3506)
- 500 µl Mercaptoethanol

Eine weitere Verbesserung wird in manchen Fällen (aber nicht grundsätzlich) erzielt durch Zugabe von:

- 10 mg NAD
- 10 mg NADP
- 10 mg NADH
- 5 mg Pyridoxal

Der Puffer (Lösung III) kann 4 Tage lang verwendet werden, dann sollte er neu angesetzt werden. Lösungen I und II können mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Puffer 2: Tris/HCl 0,1 M pH 7,5

100 ml Homogenatpuffer Tris/HCl 0,1 M pH 7,5 enthalten

- PVP (3 %) 3 g
- β-Mercaptoethanol (0,5 %) 500 µl
- eine Spatelspitze Poyclar AT je Probe

Anmerkung

Puffer 2 wurde nach der Testphase serienmäßig zur Extraktion bei allen Gewebearten eingesetzt, nachdem die Ergebnisse mit dem doch viel komplexeren Puffer I nicht wesentlich besser waren.

Trennsysteme, Gelzusammensetzung und Laufbedingungen (*Starch gel separation systems and separation conditions*)

Biomol- und Serva-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer		Gelzusammensetzung				Bedingungen	Laufzeit
							I = konst.	
*								
Ashton	pH 8,1	300 ml (10 % EP)	33,0 g Stärke	9,0 g Sacch.	90 mA	5 h		
*								
Poulik	pH 8,7	300 ml (3 % EP)	33,0 g Stärke	5,5 g Sacch.	90 mA	4,5-5 h		
**								
Histidin-Citrat	pH 6,2	270 ml (1:3 dest. H ₂ O)	28,0 g Stärke 3,2 g Urea	5,5 g Sacch. 150 mg EDTA	100 mA max. 280 V	6 h		
**								
Tris-Citro	pH 7,5	300 ml (1:6,5 dest. H ₂ O)	28,5 g Stärke	8,0 g Sacch.	120 mA	5,5 h		

*Glasplatte 27x11,5 cm
**Glasplatte 27x10 cm

Gelschnitte (*gel slabs*)

	unten	mitte	oben
Ashton	- PGI	+ AAT	o FEST
Poulik	+ AAT	o PGM	
Histidin-Citrat	o MDH	o LAP	o SDH oder PGM
Tris-Citro	o MNR	o IDH oder PGI	- o 6-PGDH

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

Zusammensetzung der Trennpuffer (*Gel and electrode buffer composition*)

Ashton pH 8,1		
Elektrodenpuffer pH 8,1*		
Borsäure	190 mmol/l	11,8 g/l
Lithiumhydroxid	~26 mmol/l	~ 1,3 g/l
* 190 mM Borsäure mit Lithiumhydroxid ~ 26mM auf pH 8,1 einstellen.		
Gelpuffer pH 8,1**		
Tris	50 mmol/l	6,1 g/l
Citronensäure H ₂ O	8 mmol/l	1,7 g/l
WICHTIG:	** Der zu verwendende Endpuffer besteht zu 90% aus obigem Gelpuffer und 10% des Elektrodenpuffers.	

Poulik pH 8,2		
Elektrodenpuffer pH 8,2		
Borsäure	300 mmol/l	18,5 g/l
Natriumhydroxid	~60 mmol/l	~ 2,4 g/l
Gelpuffer pH 8,7		
Tris	70 mmol/l	8,5 g/l
Citronensäure H ₂ O	35 mmol/l	~ 7,4 g/l
Bemerkungen:	Gel- bzw. E.-Puffer mit NaOH bzw. Citronensäure auf den jeweiligen pH-Wert einstellen	

Tris-Citro pH 7,5		
Elektrodenpuffer pH 7,5		
Tris	140 mmol/l	18,17 g/l
Citronensäure H ₂ O	41 mmol/l	~ 8,6 g/l
Gelpuffer pH 7,5		
Elektrodenpuffer im Verhältnis 1:6,5 mit H ₂ O dest. mischen		

Histidin-Citrat pH 6,2		
Elektrodenpuffer pH 6,2		
Histidin-Base	10 g / l	50g / 5 l
Citronensäure H ₂ O	~ 1,9 g / l	~ 9,5 g / 5 l
Gelpuffer pH 6,2		
Histidin-Base	10 g / l	50 g / 5 l
Maleinsäure	~ 1,6 g / l	~ 8 g / 5 l
Gelpuffer 1:3 mit H ₂ O bidest. verdünnen		

Visualisierung der Enzyme (*Enzyme vizualisation*)

Puffer für Färbelösungen (*stain buffer recipes*)

Tris-HCl 0,05 mol/l

30,27 g TRIS in 4500 ml dest. H₂O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 5000 ml auffüllen.

Tris-HCl 0,2 mol/l- pH = 8,0

48,44 g TRIS in 1800 ml dest. H₂O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 2000 ml auffüllen.

Acetatpuffer 0,2 mol/l pH=5,0

11,49 g Natriumacetat in 900 ml dest. H₂O lösen und mit Essigsäure auf pH 5,0 einstellen, danach auf 1000 ml auffüllen.

Tris-Maleat 0,05 mol/l pH 5,4

12,2 g TRIS in etwa 1200 ml und 11,13 g Maleinsäureanhydrid in etwa 400 ml dest. H₂O lösen; unter pH-Kontrolle beide Lösungen vermischen und auf 2000 ml auffüllen. Die Pufferlösungen sind bei Raumtemperatur mehrere Wochen verwendbar.

Stammlösungen (*Stock solutions*)

NADP-Lösg. 8 mg/ml

NAD-Lösg.	10 mg/ml	
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	50 g auf 500 ml	
MTT-Lösg.	6 mg/ml	
PMS-Lösg.	6 mg/ml	
6-Phosphogluconsäure-tri-Na-Salz-Lösg.	30 mg/ml	(6-P)
DL-Isocitronensäure-tri-Na-Salz-Lösg.	40 mg/ml	(IDH)
Fructose-6-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.	20 mg/ml	(PGI)
Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.	40 mg/ml	(PGM)
8 g Apfelsäure/50 ml TRIS pH 8,0		(MDH)

Zusammensetzung der einzelnen Färbelösungen (Staining mixtures for different enzymes)

Aspartataminotransferase (AAT, GOT / E.C. 2.6.1.1)

Substratlösung:

Tris-HCl 0,2 mol/l pH 8,0	200 ml
L-Asparaginsäure	1,06 g
alpha-Ketoglutarensäure	0,140 g
-auflösen und auf pH 8,0 mit 2M NaOH einstellen	

Färbung pro Schale:

Substratlösung	70 ml
Fast Blue BB Salt	70 mg
Pyridoxal-5-Phosphate	10 mg

Bemerkungen: Bei zu schwacher Anfärbung der C-Zone die Einwaage von L-Asparaginsäure, alpha-Ketoglutarensäure, Fast Blue BB Salt und Pyridoxal-5-Phosphate um das anderthalbfache erhöhen. Dickere Gelschicht für die Anfärbung verwenden (am besten oberste Schicht verwenden).

Fluoreszierende Esterase (FEST/E.C.3.1.1.1)

Acetatpuffer 0,2 mol/l pH 5,0	70 ml
Aceton	3 ml
4-Methylumbelliferyl	15 mg

Die Auswertung erfolgt nach 10-minütiger Inkubation bei 40°C unter der UV-Lampe bei 366 nm Wellenlänge.

Isocitratdehydrogenase (IDH/E.C. 1.1.1.42)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
DL-Isocitronensäure-tri-Na-Salz-Lösg.	3 ml
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

IDH und PGM können auf demselben Gelschnitt angefärbt werden. Dazu wird in die obige Lösung noch das Substrat für PGM sowie Glucose-6-phosphatdehydrogenase (15 µl) dazugegeben.

Leucinaminopeptidase (AAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat 0,05 mol/l pH 5,4	70 ml
Leucin-B-naphtylamid-HCl	50 mg
Fast Black K	40 mg

Malatdehydrogenase (MDH/E.C. 1.1.1.37)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
L-Apfelsäure-Na-Salz-Lösg.	3 ml
NAD-Lösg.	1,5 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

Menadionreduktase (MNR/E.C.1.6.99.2)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 7,0	70 ml
Menadione Na(SO ₄) ₂	75 mg
NADH	30 mg
NBT-Lösg.	10 ml

6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH / E.C. 1.1.1.44)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
----------------------------	-------

6-Phosphogluconsäure-tri-Na-Salz	2 ml
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

Phosphoglucose-Isomerase (PGI / E.C. 5.3.1.9)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
Fructose-6-phosphat-Lösg.	2 ml
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

Phosphoglucomutase (PGM / E.C. 2.7.5.1) (siehe auch IDH)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
D-Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz	90 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
Shikimisäure	75 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

Interpretation der Zymogramme (*Genetic interpretation of banding patterns*)

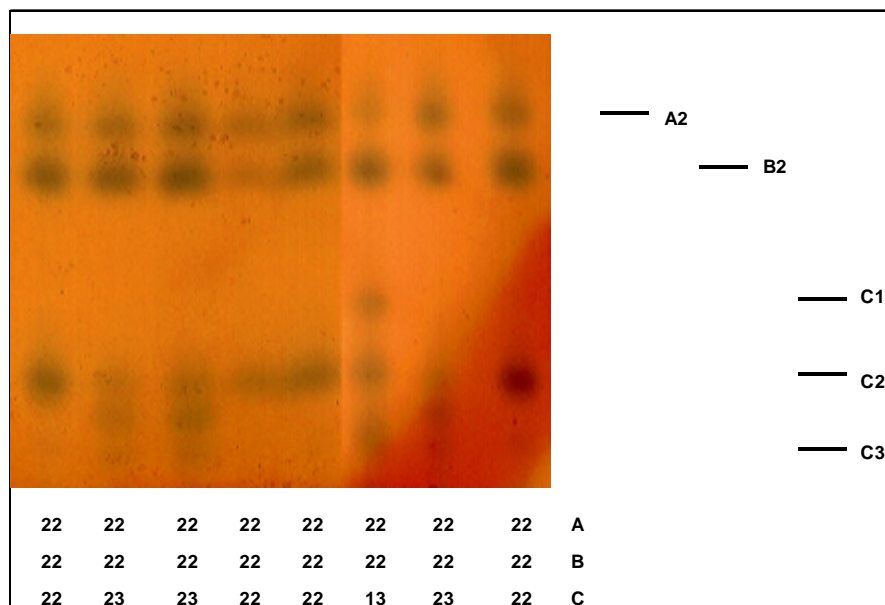
Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1

Bei dem dimeren Enzymsystem GOT lassen sich bei Erle drei anodisch wandernde Aktivitätszonen in den Zymogrammen feststellen. Die beiden schneller wandernden Zonen (A und B) zeigen nur wenig, aber voneinander unabhängige Variation, was auf die Kontrolle durch zwei Geneorte hinweist. Die Zonen sind im Poulik-System klar auftrennbar. Bei Verwendung des Ashton-Systems ist die A-Zone unklar. Die dritte Zone (C) hat eine deutlich geringere Wanderungsgeschwindigkeit. In dieser Zone wurden eine häufige (von uns mit C2 bezeichnet) und drei seltene Genvarianten gefunden.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

GOT-A1 - < 1 %	GOT-B1 - < 1 %	GOT-C1 – 0 – 5 %
GOT-A2 - > 99 %	GOT-B2 - > 99 %	GOT-C2 – 90 – 99 %
		GOT-C3 – 0,5 – 2 %
		GOT-C4 - <1 %

Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1

Das dimere System FEST färbt bei Schwarzerle in zwei Zonen an. Die schneller wandernde Zone A zeigte keine Variation und eine Vielzahl, oft auch sehr schwach angefärbter Banden. Auf ihre Auswertung wurde verzichtet. In der B-Zone waren die Banden deutlich angefärbt.

Homozygote zeigten sich als Einzelband, bei heterozygoten waren Dreifachbanden zu sehen. In dieser Zone wurden vier Genvarianten nachgewiesen. B2 war am häufigsten.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

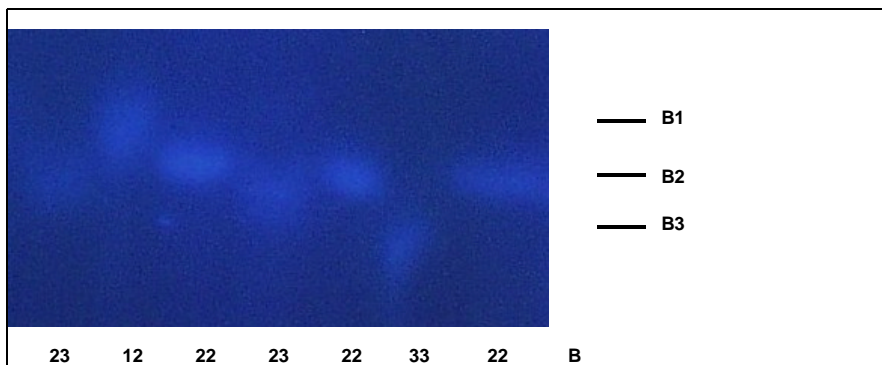
FEST-B1 – 14 – 20 %

FEST-B2 – 80 – 85 %

FEST-B3 – 0 – 5 %

FEST-B4 - < 0,5 %

Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C. 1.1.1.42

Gele die auf IDH angefärbt werden, zeigen bei Erle zwei Aktivitätszonen mit voneinander unabhängiger Variation. Die schneller wandernde Zone färbt nur sehr schwach an und zeigt nur selten Variation. Drei Genvarianten wurden festgestellt, wobei die Variante mit der mittleren Laufgeschwindigkeit, A2, Häufigkeiten von über 99 % erreicht. Wegen der schwachen Anfärbung kann es Schwierigkeiten bei der Auswertung dieser Zone geben. Die Zone B färbt deutlich. Heterozygote zeigen sich als Dreifachbanden, Homozygote als Einzelbande. Oft erscheinen noch Begleitbanden, die aber deutlich weniger stark anfärben und klar von der Hauptbande zu unterscheiden sind. Es wurde festgestellt, dass die Ausprägung von Begleitbanden mit höherer Sacharosekonzentration im Gel steigt. Vier Genvarianten wurden in dieser Zone nachgewiesen.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

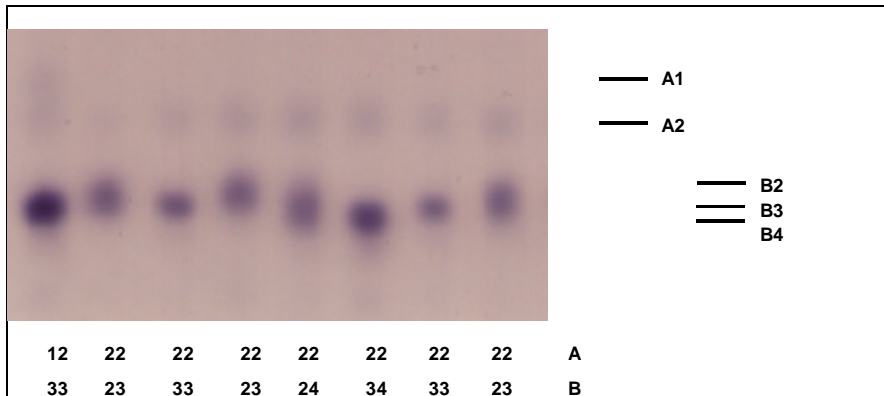
IDH-B1 – < 2 %

IDH-B2 – 10 – 30 %

IDH-B3 – 50 – 60 %

IDH-B4 – 15 – 40 %

Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



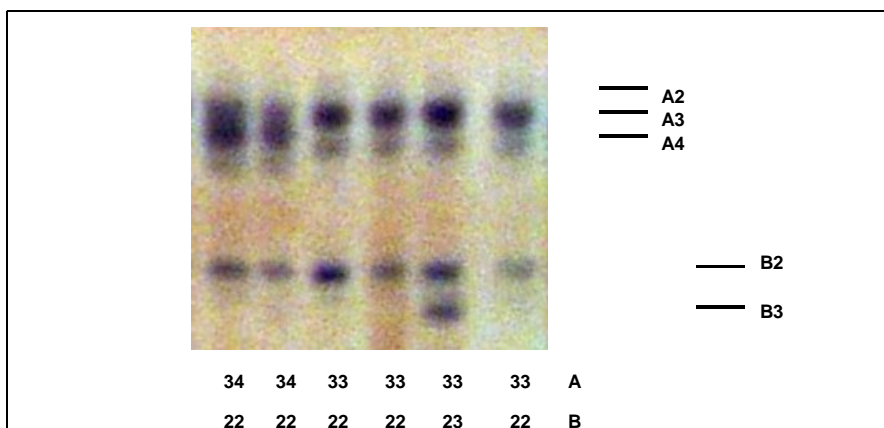
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1

Bei Anfärbung auf LAP erscheinen im Gel zwei klar voneinander getrennte Zonen mit unabhängiger Variation. Eine Kontrolle des Enzymsystems durch zwei Genorte wird somit angenommen. Die schneller wandernde A-Zone färbt stärker an und zeigt Muster aus Einzel- und Doppelbanden, wie bei monomeren Systemen erwartet. Insgesamt wurden vier Genvarianten identifiziert, unter denen die Variante A3 mit Abstand die häufigste ist. Die B-Zone färbt schwächer an und ist weit weniger variabel als die A-Zone.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

LAP – A1 – 0 – 2 %	LAP – B1 - < 1 %
LAP – A2 – 1 – 9 %	LAP – B2 – > 90 %
LAP – A3 – 75 – 95 %	LAP – B3 – 0 - 7 %
LAP – A4 – 0 – 25 %	

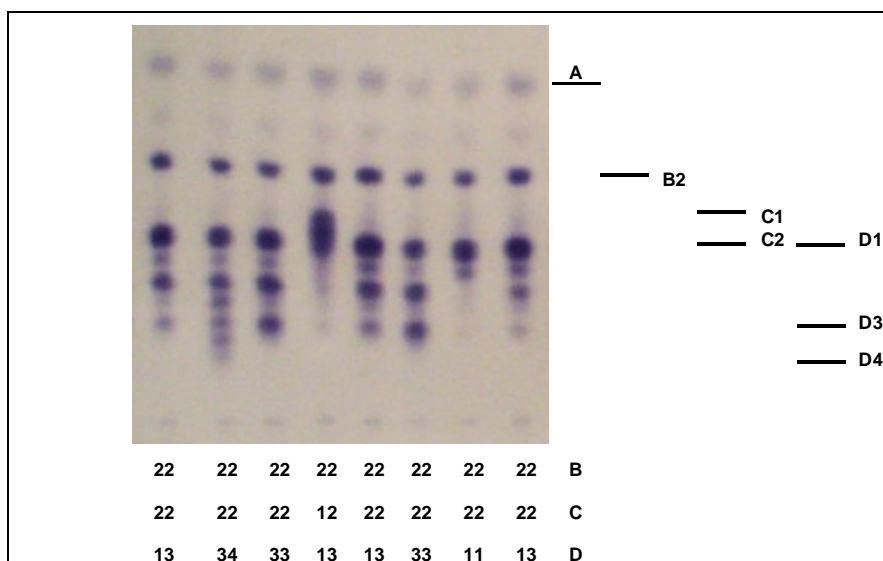
Zymogramm der Leucinaminopeptidase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37

Das System MDH färbt in vier klar voneinander getrennten Zonen, mit voneinander unabhängiger Variation an. Die am schnellsten wandernde Zone färbt vergleichsweise schwach und zeigte bislang keine Variation. Sie wurde dem Genort MDH-A zugeschrieben. Die nächste Zone (MDH-B), ausgehend von der Anode, ist deutlich gefärbt und zeigte bislang drei Varianten. Heterozygote zeigen sich als Doppelbanden. Die nächste Zone ist hochvariabel, die Muster zeigen meist drei bis fünf Banden, aber auch Einfachbanden wurden beobachtet. Trotz ihrer Komplexität sind die Muster eindeutig über die Kontrolle durch zwei Genorte, als MDH-C und MDH-D bezeichnet, und die Anwesenheit von Inter- und Intralocushybriden zu erklären. Die Allele der beiden Genorte überlappen teilweise. Bei Knospenmaterial ist MDH-D nicht zu erkennen. Eine ähnliche Ausprägung zeigt das System MDH in vielen Baumarten. Eine weiter ganz nahe der Kathode liegende, schwach angefärbte Zone wurde nicht weiter verfolgt, da sie nicht in allen Gewebearten eindeutig anfärbt.

Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



Menadionreduktase (MNR) E.C. 1.6.99.2

Nach Anfärbung auf MNR wird bei Schwarzerle eine Aktivitätszone sichtbar. In dieser zeigen sich Muster, die aus Einzelbanden bestehen (bei homozygoten Individuen) und solche, die aus fünf Banden bestehen (bei heterozygoten Individuen). Demnach ist die Variation, wie bei einem tetrameren Enzym zu erwarten. Insgesamt wurden 4 Genvarianten nachgewiesen, die häufigste war A4.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

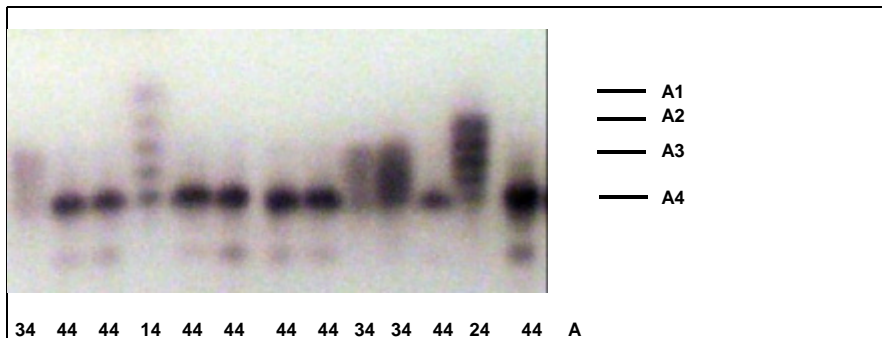
MNR-A1 - < 1 %

MNR-A2 – 1-5 %

MNR-A3 – ca. 10 %

MNR-A4 – > 90 %

Zymogramm der Menadionreduktase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44

Zwei klar voneinander getrennte Zonen mit unabhängiger Variation wurden bei Anfärbung auf das dimere System 6-PGDH beobachtet. Beide zeigen sowohl Einfachbanden (bei homozygoten Individuen), als auch Dreifachbanden (bei heterozygoten Individuen). Die schneller wandernde A-Zone ist variabler als die B-Zone. Bei 6-PGDH-A wurden vier Genvarianten beobachtet, darunter zwei häufige. In der B-Zone liegt ein ausgeprägter Minorpolymorphismus vor, mit B2 als sehr häufigem Allel.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

6-PGDH-A1 – 0 – 1 %

6-PGDH-B1 - < 1 %

6-PGDH-A2 – 50 – 80 %

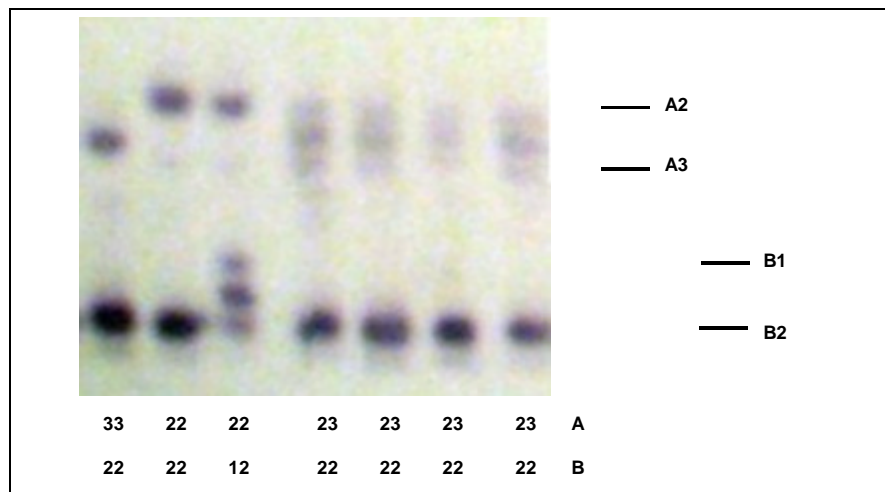
6-PGDH-B2 – ca. 99 %

6-PGDH-A3 – 20 – 50 %

6-PGDH-B3 - < 1 %

6-PGDH-A4 – < 1 %

Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Gele, die auf das dimere System PGI anfärbt werden zeigen bei Schwarzerle zwei Aktivitätszonen nach Auftrennung mit dem ASHTON-System und drei Aktivitätszonen bei Auftrennung in einem TRIS-Citrat-System (pH 7,5). Dabei sind die beiden schneller wandernden Zonen, PGI-A und PGI-B, in beiden Systemen identisch. Im TRIS-Citrat-System erscheint noch eine langsamer wandernde Zone, PGI-C, die allerdings nur sehr geringe Variation zeigt. Die Anfärbung in der A-Zone ist nach Auftrennung in Ashton deutlich, die Banden sind klar konturiert. Allerdings zeigte sich in unserem Untersuchungsmaterial keine Variation. Bei Auftrennung im TRIS-Citrat-System waren die Banden dieser Zone verschwommen.

Bei der Identitätssicherung wurde nur die Zone PGI-B herangezogen. Hier zeigten homozygote Individuen Muster mit Einfachbanden, heterozygote solche mit Dreifachbanden. Es wurden bislang drei Genvarianten nachgewiesen.

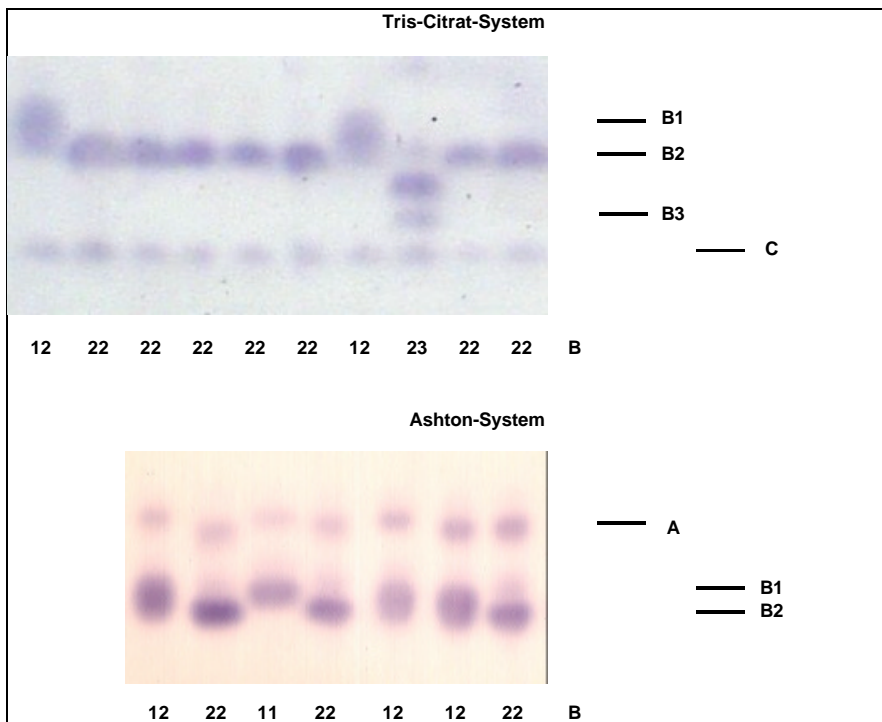
Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGI-B1 – 1 – 15 %

PGI-B2 – 85 – 97 %

PGI-B3 – 0,5 – 2 %

Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Schwarzerle (*Alnus glutinosa*)



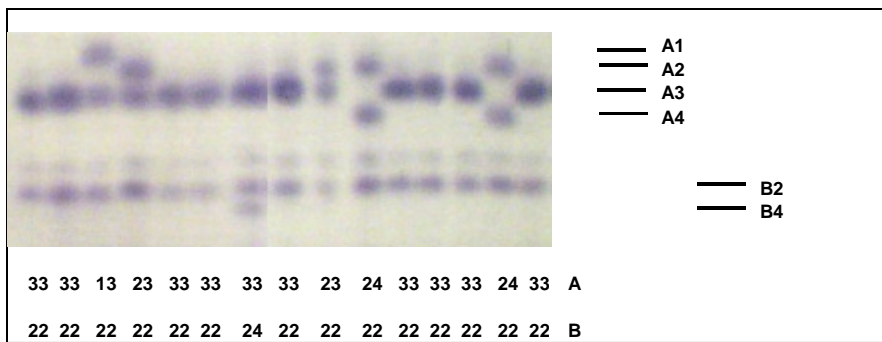
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1

Bei Anfärbung auf das monomere Enzym PGM wurden zwei Aktivitätszonen mit voneinander unabhängiger Variation beobachtet. Die schneller wandernde Zone, PGM-A, zeigt vier Genvarianten, davon zwei häufige und zwei seltene. Bei homozygoten Individuen bestanden die Enzymmuster aus Einzelbanden, bei heterozygoten aus Doppelbanden. Der Genort kann sowohl nach Auftrennung in einem TRIS-Citrat-System, als auch nach Auftrennung in einem Histidin-Citrat-System ausgewertet werden. Hingegen ist der Genort PGM-B, der einen deutlich Minorpolymorphismus zeigt, nur nach Auftrennung in einem Histidin-Citrat-System auswertbar. Das häufige Allel wurde vorläufig mit B2 bezeichnet.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGM-A1 – 0,5 – 2 %	PGM-B2 – ca. 90 %
PGM-A2 – 5 – 20 %	PGM-B4 – ca. 10 %
PGM-A3 – 70 – 90 %	
PGM-A4 – 0,5 – 5 %	

Zymogramm der Phosphoglucomutase bei Schwarzzerle (*Alnus glutinosa*)



Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25

Bei dem monomeren Enzym SKDH färbt bei Schwarzzerle nur eine Zone an. Es wird deshalb angenommen, dass das System von einem Genort kontrolliert wird. Bei homozygoten Individuen erscheint auf dem Gel ein Doppelband, bei heterozygoten ein Muster, das aus drei oder vier Bändern besteht. Trotz dieser Begleitbanden ist die Auswertung problemlos. In dem Untersuchungsmaterial wurden vier Genvarianten nachgewiesen, davon zwei häufige.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

SKDH-A1 – ca. 1 %

SKDH-A2 – 20 – 50 %

SKDH-A3 – 50 – 80 %

SKDH-A4 – 0 – 2 %

Zymogramm der Shikimatdehydrogenase bei Schwarzzerle (*Alnus glutinosa*)

