

Anleitung für Isoenzymuntersuchungen bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)

- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -

zusammengestellt von

Heike Hertel*, Monika Konnert, Werner Maurer*****

***Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung Waldsiedersdorf der BFH**

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

*****SGD Süd; Forschungsanstalt für Waldökologie & Forstwirtschaft Rheinland-Pfalz**

Das Laborhandbuch zu Isoenzymuntersuchungen bei Kiefer (*Pinus sylvestris*) wurde in seiner ersten Version bereits 1997 in deutscher (HERTEL 1997) und englischer Sprache (HERTEL and MAURER 1999) veröffentlicht.

HERTEL, H. (1995): Biochemisch-genetische Untersuchungen bei Kiefer (*Pinus sylvestris* L.)-Anleitung zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme. Mitteilungen der BFH Hamburg, Nr. 186, 59 Seiten.

HERTEL, H. and MAURER, W. (1999): Biochemical-genetic investigations on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation.

Herausgeber und Bezugsquelle: Sächsische Landesanstalt für Forsten (Saxonian State Institute for Forestry (LAF), Bonnewitzer Straße 34, D-01827 Graupa.

Die vorliegende, überarbeitete und aktualisierte Fassung enthält zusätzlich zu der ersten Fassung in Teilen veränderte oder zusätzliche Trennsysteme und neue Abbildungen der Zymogramme mit Angaben zu deren genetischer Interpretation. Daten zur genetischen Analyse sowie Angaben zur elektrophoretischen Trennung auf Polyacrylamide (PAGE) sind bei Bedarf der ersten Fassung zu entnehmen. Enzymsysteme, bei denen sich gegenüber der ersten Fassung keine Änderungen ergeben haben, bzw. die in den letzten Jahren sehr wenig als Genmarker eingesetzt wurden, werden nur kurz erwähnt.

Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

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

Enzym und Nomenklatur	Genort	Struktur	Häufige Allele	Trenn-System
Alaninaminopeptidase (AAP) E.C.3.4.11.1	AAP-A AAP-B AAP-C	Monomer	A ₃ B ₃ C ₃	Ashton
Alkoholdehydrogenase (ADH) E.C.3.4.11.2	ADH-A ADH-B	Dimer	A ₂ ,A ₃ B ₂	Ashton
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	A ₃ B ₄ ,B ₅ C ₂ ,C ₄	Poulik
Esterasen (EST) E.C.3.1.1.x	EST-A EST-B EST-C	Dimer	B ₂ C ₂	Ashton
Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2	FDH-A	Dimer	A ₂ ,A ₄	Tris-Citrat
Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2	GDH-A	Hexamer	A ₂ ,A ₃	Poulik o.Tris-Citrat
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A IDH-B	Dimer	A ₂ B ₂	Tris-Citrat
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	A ₃ B ₃	Ashton
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C MDH-D	Dimer	A ₃ B ₁ C ₃ ,C ₅ D ₂ ,D ₄	Tris-Citrat
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MR-A	Monomer	A ₂ ,A ₃	Poulik
NADH-dehydrogenase (NADH) E.C.1.6.99.3	NADH-A NADH-B	Monomer	A ₂ ,A ₃ B ₃	Tris-Citrat
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PGDH-A 6-PGDH-B	Dimer	A ₂ ,A ₃ B ₂ ,B ₄	Tris-Citrat
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-A PGI-B	Dimer	A ₁ B ₅	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A	Monomer	A ₃	Poulik o. Tris-Citrat
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-A SKDH-B	Monomer	A ₄ ,A ₆ B ₂	Tris-Citrat
Sorbitoldehydrogenase (SBDH) E.C. 1.1.1.14	SBDH-A	?	A ₁	Ashton

Probenmaterial und Enzymextraktion (*Sample materials and Enzyme extraction*)

Als Probenmaterial zur Isoenzymanalyse eignen sich geschlossene Knospen während der Vegetationsruhe, wobei laterale Knospen oft klarere Bandenmuster ergeben. Sie sind zwar etwas kleiner, jedoch wahrscheinlich aufgrund eines geringeren Anteils an störenden Sekundärstoffen für Isoenzymanalysen oft besser geeignet als große Terminalknospen von Zweigproben.

Die Lagerung von Zweigproben, die während der Vegetationsruhe entnommen werden, kann in Plastiktüten oder -säcken zum Schutz vor Austrocknung über mehrere Wochen bei Temperaturen von 0 °C bis 4 °C erfolgen. Das Einfrieren verlängert zwar die Lagerungsdauer, führt jedoch bei einigen Enzymen zu einer Abnahme der Enzymaktivität und Einbuße an Trennqualität.

Zur Analyse eignen sich weiterhin Endosperme und Embryonen von trockenen oder ein bis zwei Tage auf feuchtem Filterpapier angekeimten Samen sowie in manchen Fällen Kambiumgewebe. Nadeln können aufgrund ihres Harzgehaltes für Isoenzymanalysen nicht empfohlen werden, da die Reinigung der Extrakte sehr arbeitsaufwendig ist.

Das Probenmaterial wird im Extraktionspuffer homogenisiert und kann ohne weitere Aufarbeitungsschritte zur Auftragung auf Stärkegele oder Polyacrylamidgele verwendet werden. Eine Zentrifugation der Rohextrakte führt bei Polyacrylamidgelen zu einer besseren Auftrennung, sie kann jedoch meist ohne Beeinträchtigung der Auswertbarkeit der Bandenmuster aus Arbeitersparnisgründen weggelassen werden.

Zusammensetzung der Homogenatpuffer (*Extraction buffers*)

1. 0,1 M Tris/HCl pH 7,2 mit 3 % (w/v), Polyvinylpyrrolidon (PVP), 0,07 mM β -Mercaptoethanol (30 μ l auf 100 ml). Eine Spatelspitze Polyclar AT (unlöslich. PVP) je Probe zugeben unmittelbar vor Extraktion.

2. 0,1 M Tris-Borat pH 7,4 mit 5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP) und unmittelbar vor Gebrauch 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol .

3. 0,08 M Tris-HCl pH 7,3 mit 3 % (w/v) PVP und 0,02 % (v/v) 2-Mercaptoethanol.

Weitere Zusätze zu den Extraktionspuffern erbrachten keine wesentlichen Verbesserung der Proteintrennung.

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

Variante 1:

Toronto-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer		Gelzusammensetzung	Stromstärke (I = const.)	Laufzeit
*					
Ashton	pH 8,1	300 ml (10 % EP)	35,5 g Stärke, 3,5 g Sacch.	100 mA	5 h
*					
Poulik	pH 8,7	300 ml	35,5 g Stärke, 5,0 g Sacch.	90 mA	4 h
*					
Tris-Citro	pH 7,5	330 ml	38,5 g Stärke, 3,3 g Sacch.	130 mA	5 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gerbu-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer		Gelzusammensetzung	Stromstärke (U = const.)	Laufzeit
*					
Ashton	pH 8,1	300 ml (10 % EP) (1:0,5 dest. H ₂ O)	27,0 g Stärke, 5,0 g Sacch.	100 mA	4,5 h
*					
Poulik	pH 8,7	270 ml (3 % EP)	24,3 g Stärke, 3,6 g Sacch.	110 mA	5 h
*					
Tris-Citro	pH 7,5	330 ml	29,0 g Stärke, 3,0 g Sacch.	115 mA	6 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gelschnitte (*gel slabs*)

	unten		mitte	oben	
Ashton	-		o	o +	
	PGI		LAP	FEST	
Poulik	+		o	+	
	GOT		MNR	GDH	
Tris-Citro	o	o	o	o	o
	IDH	PGM	SDH	6-P	MDH
Tris-Citro	NADH	MNR	FDH	GDH	

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

Variante II

Bezeichnung des Trennsystems	Gelpuffer	Elektrodenpuffer	Enzymsysteme
SGE-A Tris-Citrat-System	0,02 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,2	0,15 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,5	GD, GDH, IDH, MDH, PGM, PGDH, SKDH
	0,021 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,5	0,149 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,5	ADH, GDH, IDH, MDH, PGDH, SKDH
SGE-B Ashton-System	0,05 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,1	0,2 M Lithium-Borat-Puffer pH 8,1	AAP, ADH, EST, LAP, PGI, SBDH
	0,048 M Tris-Citrat-Puffer und 0,032 M Lithium-Borat-Puffer pH 8,1	0,191 M Lithium-Borat-Puffer pH 8,1	AAT, LAP, PGM
SGE-C Poulik-System	0,075 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,7	0,3 M Na-Borat-Puffer pH 8,3	GDH, MR, NDH

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		

Visualisierung der Enzyme (*Enzyme vizualisation*)

Puffer für Färbelösungen (*stain buffer recipes*)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH = 7,0; 8,0 oder 8,5

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	
NBT-Lösg.	3 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)

Alaninaminopeptidase (AAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat Puffer Puffer 0,05 mol/l pH 5,4	75 ml
L-Alanin-2-naphtylamid-HCl	50 mg
Fast Black K	50mg

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

Substratlösung:

Tris-HCl (0,2M) 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	100 mg
Pyridoxal-5-Phosphate	20 mg

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

Esterase (EST)

100 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0	100 mg α - und/oder β -Naphthylacetat (vor der Zugabe in etwas Ethanol lösen) 100 mg Fast Blue RR
-------------------------------------	---

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 (vor der Zugabe in Aceton lösen)

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

Formiatdehydrogenase (FDH/E.C.1.2.1.2)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
Formic acid (Ameisensäure)	2 g
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	3 ml
PMS-Lösg.	300 μ l

Anstelle von Ameisensäure kann auch 1 g Na-Formiat verwendet werden.

Glutamatdehydrogenase (GDH/E.C. 1.4.1.2)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
L-Glutamic acid.	20 mg
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	3 ml
PMS-Lösg.	300 μ l

Anstelle von L-Glutamic acid kann auch 80 mg Na-L-Glutamat verwendet werden

Wichtig: FDH und GDH können zusammen in einem Gel gefärbt werden, da Puffer und Kosubstrate identisch sind und die Aktivitätszonen sich nicht überlagern

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.	200 µl

Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat Puffer Puffer 0,05 mol/l pH 5,4	75 ml
Leucin-B-naphtylamid-HCl	50 mg
Fast Black K	50 mg

Malatdehydrogenase (MDH/E.C. 1.1.1.37)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
L-Apfelsäure-Na-Salz-Lösg.	3 ml
NAD-Lösg.	2,0 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	200 µl

Menadionreduktase (MNR/E.C.1.6.99.2)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 7,0 (oder 8,0)	70 ml
Menadione Na(SO ₄) ₂	30 mg
NADH	30 mg
NBT- oder MTT- Lösg.	5 ml

NADH-Dehydrogenase (NADH/E.C.1.6.99.3)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,0	70 ml
NADH	60 mg
MTT-Lösg.	3ml

NADH erst kurz vor dem Anfärben dazu geben.

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

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
6-Phosphogluconsäure-tri-Na-Salz	2 ml
MgCl ₂ -Lösung. (10 %)	2 ml
NADP-Lösung.	2 ml
MTT-Lösung.	2 ml
PMS-Lösung.	200 µl

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

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
D-Fructose-6-phosphat-Lösung.	2 ml
MgCl ₂ -Lösung. (10 %)	2 ml
NADP-Lösung.	2 ml
MTT-Lösung.	2 ml
PMS-Lösung.	200 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

Phosphoglucomutase (PGM / E.C. 2.7.5.1)

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

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
Shikimisäure	30 mg
MgCl ₂ -Lösung. (10 %)	2 ml
NADP-Lösung.	2 ml
MTT-Lösung.	2 ml
PMS-Lösung.	200 µl

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

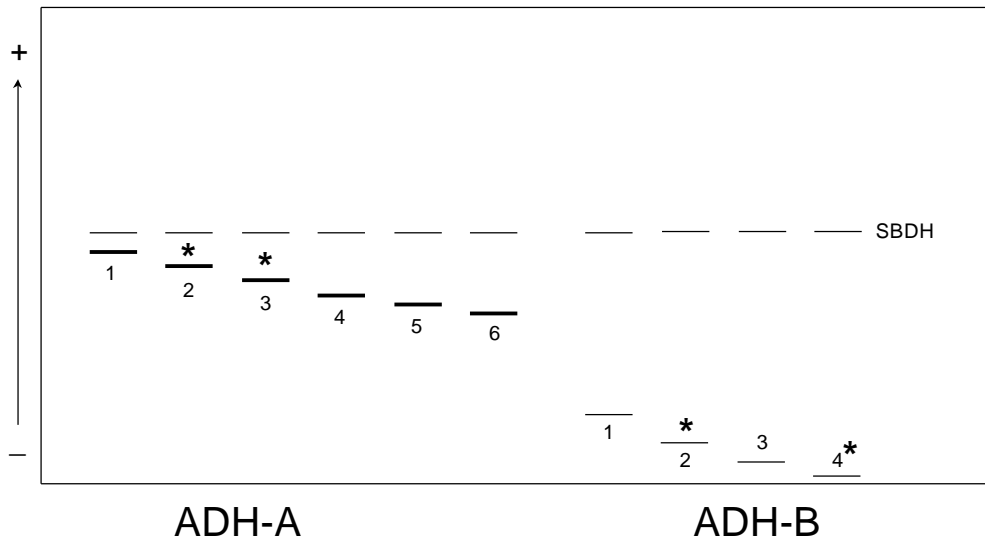
Alkoholdehydrogenase (ADH) und Sorbitoldehydrogenase (SBDH)

Proben von Kiefernknospen oder Endospermen prägen drei Aktivitätszonen aus. Die am weitesten zur Anode wandernde Zone ist vom Substrat Sorbitol abhängig, die beiden anderen färben mit Ethanol, Glycerin, Sorbitol und anderen Alkoholen an.

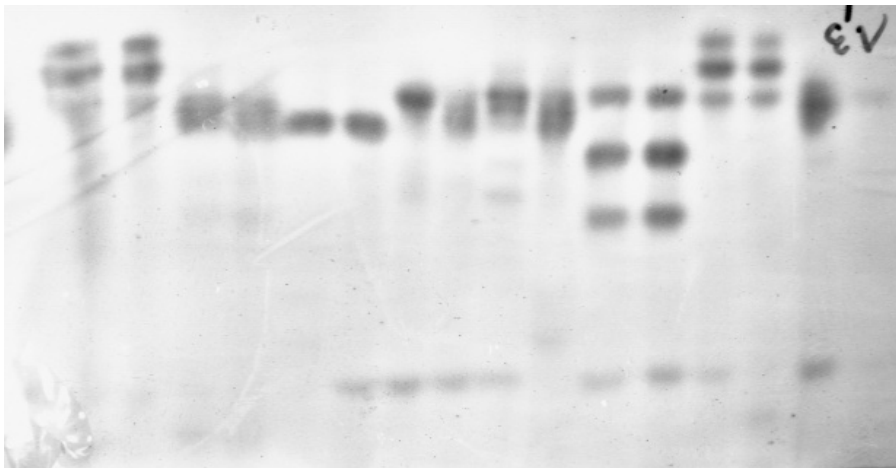
Für die SBDH wurde bisher bei der Baumart Kiefer keine Variation gefunden, der Zusatz von Sorbitol zur Färbelösung kann jedoch als Bezugslinie zur Interpretation des ADH-A -Locus vorteilhaft sein.

Der ADH-A-Locus (Dimer) mit hoher Enzymaktivität in Endospermen und Knospen besitzt 6 Allele, dabei kommen die Allele A2 und A3 häufig vor. Das Allel A1 wurde vorwiegend in Material aus dem Baltikum und aus Osteuropa gefunden. Bei dem relativ häufigen heterozygoten Genotyp A2A3 und beim Genotyp A3A4 ist die Hybridbande aufgrund des geringen Unterschiedes in der Wanderungsgeschwindigkeit der Allele nicht zu erkennen.

Am Genort ADH-B (Dimer) wurden 4 Allele nachgewiesen, davon B2 am häufigsten. Die Allele B1 und B4 kommen in jeder Population vor, während B3 sehr selten ist. Der Locus ADH-B ist aufgrund seiner schwächeren Aktivität manchmal nicht interpretierbar.



Zymogramm der Alkoholdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



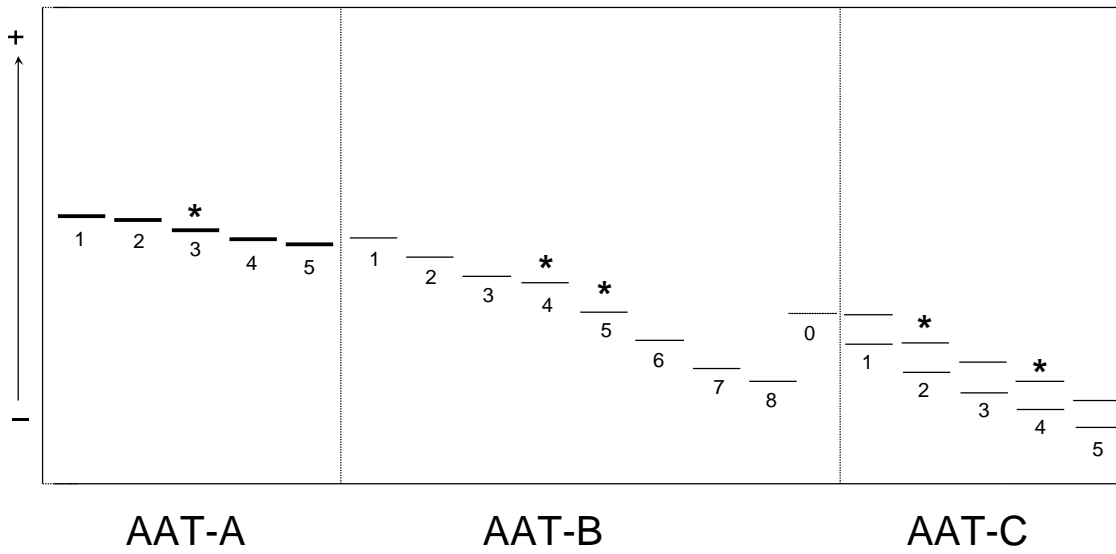
ADH-A	12	12	23	23	33	33	22	23	23	23	26	26	12	12	23	
ADH-B			22	24	24	12	22	22	22	22	12	22	22	22	24	22

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
SBDH	1	1
ADH-A	1	0.....0,07
	2	0,24...0,48
	3	0,50...0,74
	4	0.....0,02
	5	sehr selten
	6	sehr selten
ADH-B	1	0,01...0,14
	2	0,63...0,80
	3	0.....0,02
	4	0,13...0,27

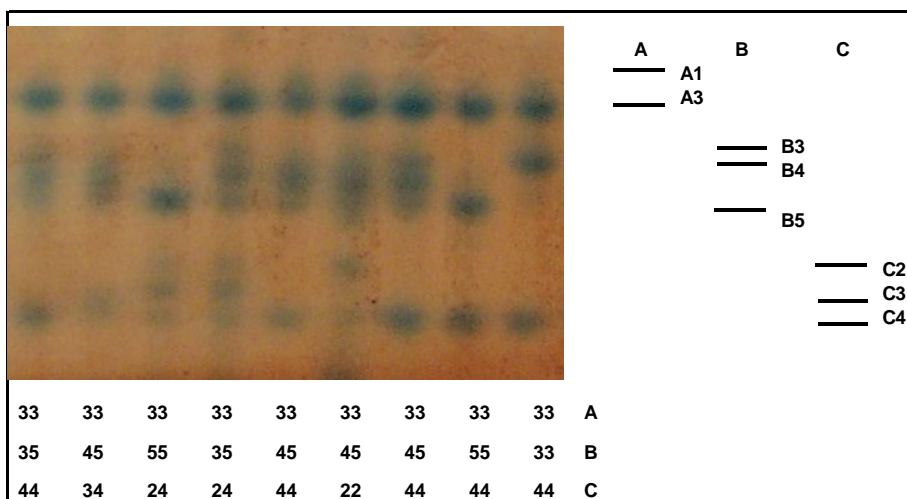
Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1

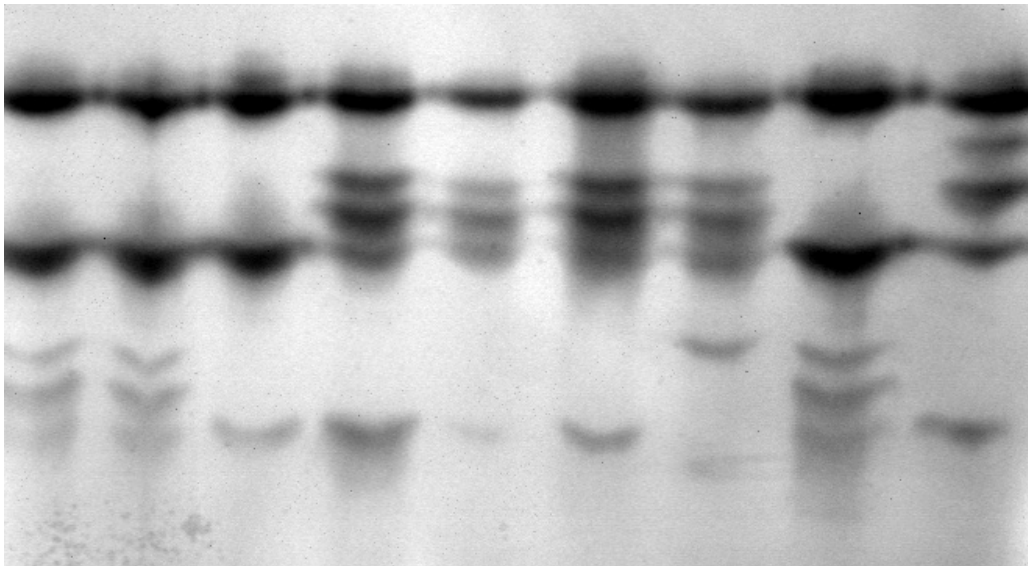
Das Enzym AAT (früher Glutamat-Oxalacetat-Transaminase=GOT) besitzt drei in Endospermen und Knospen gut auswertbare Genorte mit dimerer Struktur.

Der Locus AAT-A zeigt einen Minorpolymorphismus mit 5 Allelen, wobei A3 am häufigsten ist. Endosperme und Knospengewebe haben eine hohe Enzymaktivität. Am Locus AAT-B wurden 9 Allele einschließlich eines Nullallels gefunden, dabei kommen die Allele B5 und B4 am häufigsten vor. Das Enzym besitzt an diesem Locus in Endospermen eine geringe und in Knospengewebe hohe Aktivität. Die Interpretation von Heterozygoten mit den langsam wandernden seltenen Allele B6, B7 und B8 kann durch eine mögliche Überlagerung mit dem Locus AAT-C schwierig sein. Am Genort AAT-C sind 5 Allele bekannt, die in den Zymogrammen als Doppelbänder erscheinen. Häufige Allele sind C2 und C4. Die Enzymaktivität ist in Endospermen höher als in Knospen.



Zymogramme der Aspartataminotransferase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



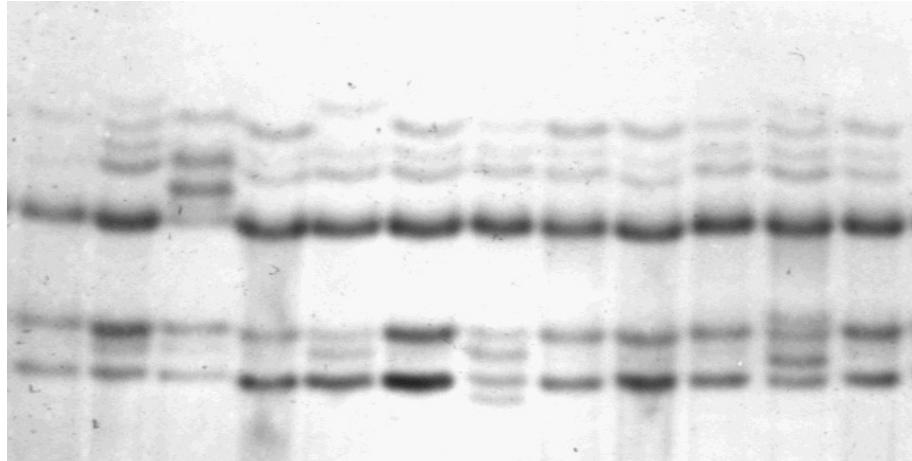


AAT-A	33	33	33	33	33	33	33	33
AAT-B	55	55	45	45	45	45	55	25
AAT-C	24	44	44	44	44	22	24	44

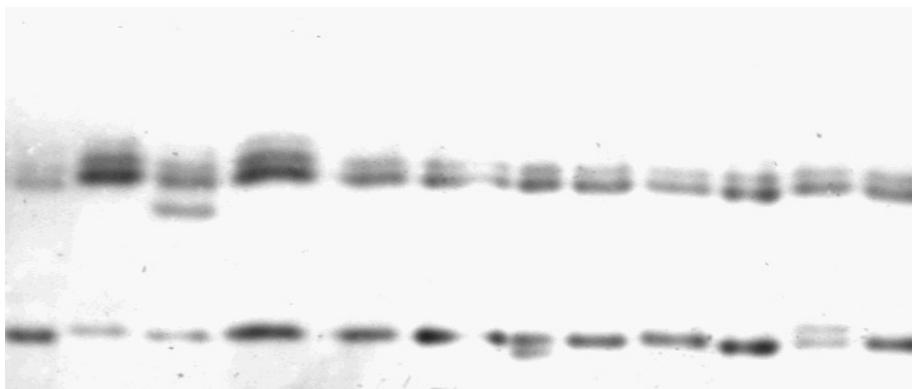
Genort	Allel	Relative Häufigkeit
AAT-A	1	0.....0,02
	2	0.....0,04
	3	0,94.....1
	4	0.....0,02
	5	sehr selten
AAT-B	0	sehr selten
	1	0.....0,03
	2	0.....0,10
	3	0,01...0,14
	4	0,18...0,46
	5	0,47...0,72
	6	sehr selten
	7	sehr selten
	8	sehr selten
AAT-C	1	0.....0,02
	2	0,20...0,59
	3	0.....0,02
	4	0,41...0,79
	5	0.....0,02

Aminopeptidasen

Aminopeptidasen haben bei der Kiefer wie auch bei anderen Baumarten z. T. eine geringe Substratspezifität, d. h. die Enzyme einiger Loci reagieren mit den Substraten Leucin-Naphthylamid und Alanin-Naphthylamid.



AAP-A	33	23	33	33	22	33	33	33	33	33	23	33
LAP-A	33	33	35	33	33	33	33	33	33	33	33	33
AAP-B	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
AAP-C	33	33	33	33	34	33	34	33	33	33	23	33
LAP-B	44	44	44	44	44	44	46	44	44	44	24	44



LAP-A	33	33	35	33	33	33	33	33	33	33	33	33
LAP-B	44	44	44	44	44	44	46	44	44	44	24	44

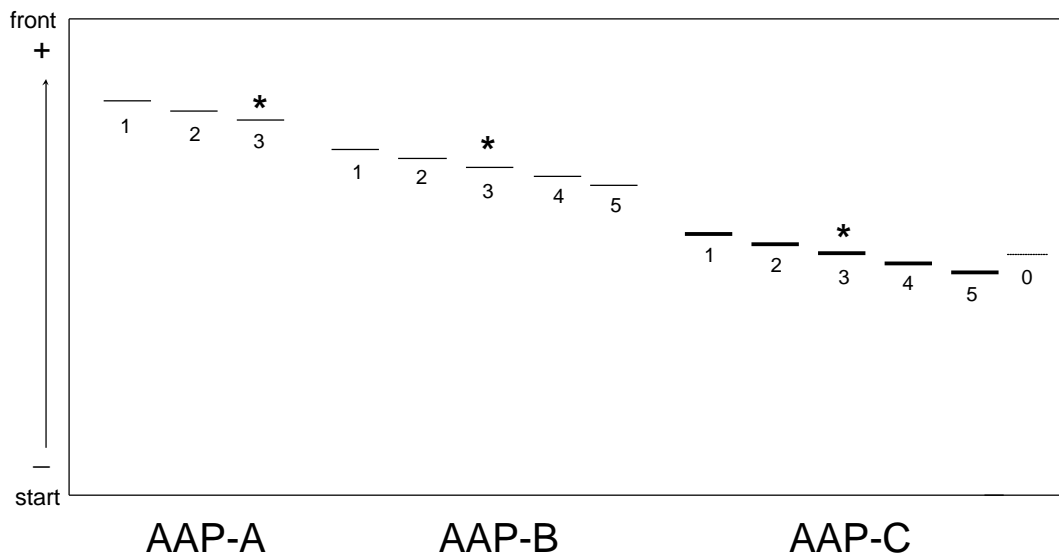
In der folgenden Übersicht sind die Aminopeptidase-Genorte mit ihrer jeweiligen Substratspezifität geordnet nach ihrer Wanderungsstrecke im Gel aufgelistet

Locus	Färbung für LAP	Färbung für AAP
AAP-A		sehr schwache Aktivität, nur mit PAGE nachweisbar
LAP-A	starke Aktivität, Allele liegen auf Stärkegelele sehr dicht zusammen	geringe Aktivität
AAP-B		mittlere Aktivität bei PAGE, auf Stärkegelele sehr geringe Aktivität
AAP-C		starke Aktivität, teilweise überlappend mit LAP-B
LAP-B	starke Aktivität	starke Aktivität

Alaninaminopeptidase (AAP)

Das Enzymsystem der AAP wird von 3 Genorten kontrolliert. Die Loci AAP-A und AAP-B haben oft eine geringe Enzymaktivität und sind deshalb nicht immer auswertbar. Bei allen 3 Genorten ist jeweils das Allel 3 am häufigsten.

Bei der alleinigen Verwendung von Stärkegelele und länger gelagerten Proben kann die Färbung für AAP weggelassen werden, da sie kaum zusätzliche Informationen bringt.



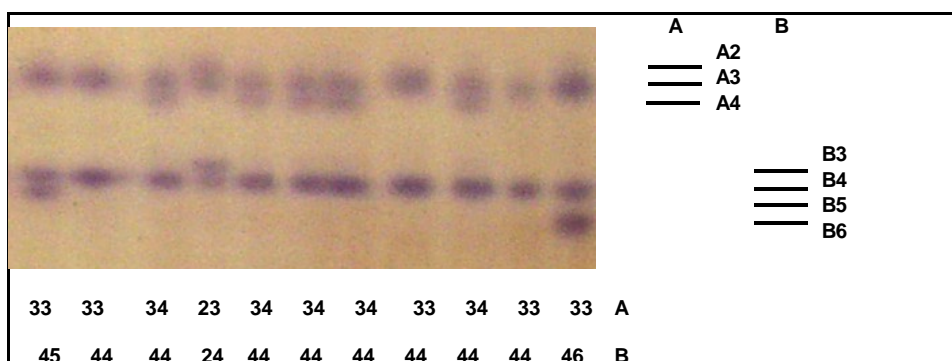
Locus	Allel	Relative Häufigkeit
AAP-A	1	sehr selten
	2	0,06...0,11
	3	0,89...0,94
AAP-B	1	sehr selten
	2	sehr selten
	3	0,96.....1
	4	0.....0,02
	5	sehr selten
AAP-C	0	0.....0,02
	1	sehr selten
	2	0,02...0,05
	3	0,72...0,84
	5	sehr selten

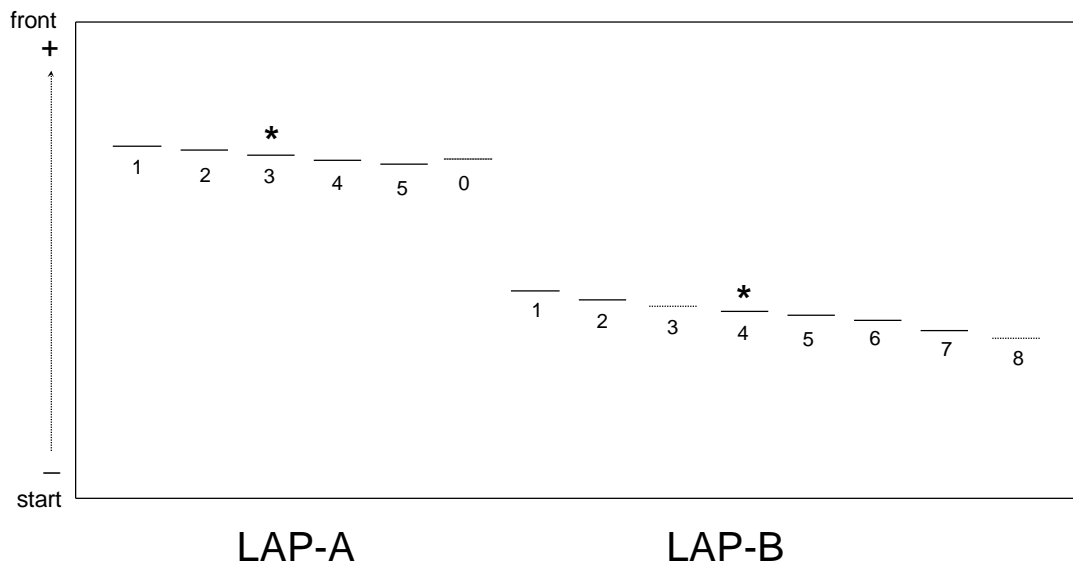
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1

Das Enzymsystem der LAP besitzt zwei in Endospermen und Knospen gut auswertbare Genorte mit monomerer Struktur.

Der Locus LAP-A zeigt einen Minorpolymorphismus mit insgesamt 6 Allelen und dem Allel A3 als häufigste Variante. Das Nullallel kommt sogar homozygot vor. Das Allel A1 erreichte in einer türkischen Herkunft die größten Häufigkeiten, ist aber nicht ausschließlich dort zu finden. Am Locus LAP-B wurden 8 Allele gefunden. B4 ist das häufigste Allel, aber auch B2, B5 und B6 können Häufigkeiten von 10% und darüber erreichen.

Zymogramm der Leucinaminopeptidase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)





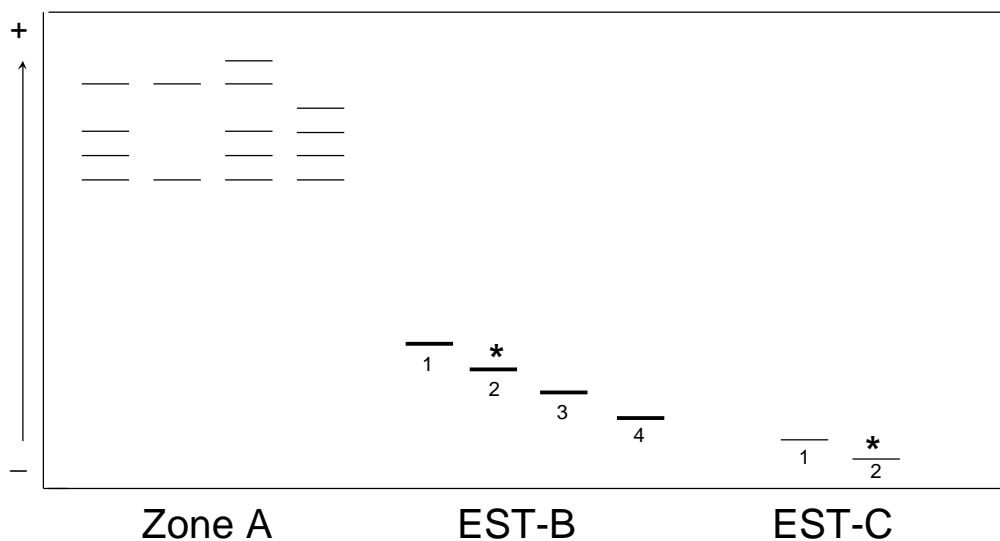
Genort	Allel	Relative Häufigkeiten
LAP-A	0	0.....0.02
	1	0.....0.06
	2	0.....0.04
	3	0.89.....1
	4	0.....0.05
	5	sehr selten
LAP-B	1	0.....0.02
	2	0.....0.15
	3	sehr selten
	4	0.74...0.98
	5	0.....0.11
	6	0.....0.10
	7	sehr selten
	8	sehr selten

Esterasen (EST) E.C.3.1.1.x (Fluoreszierende Esterase E.C. 3.1.1.1)

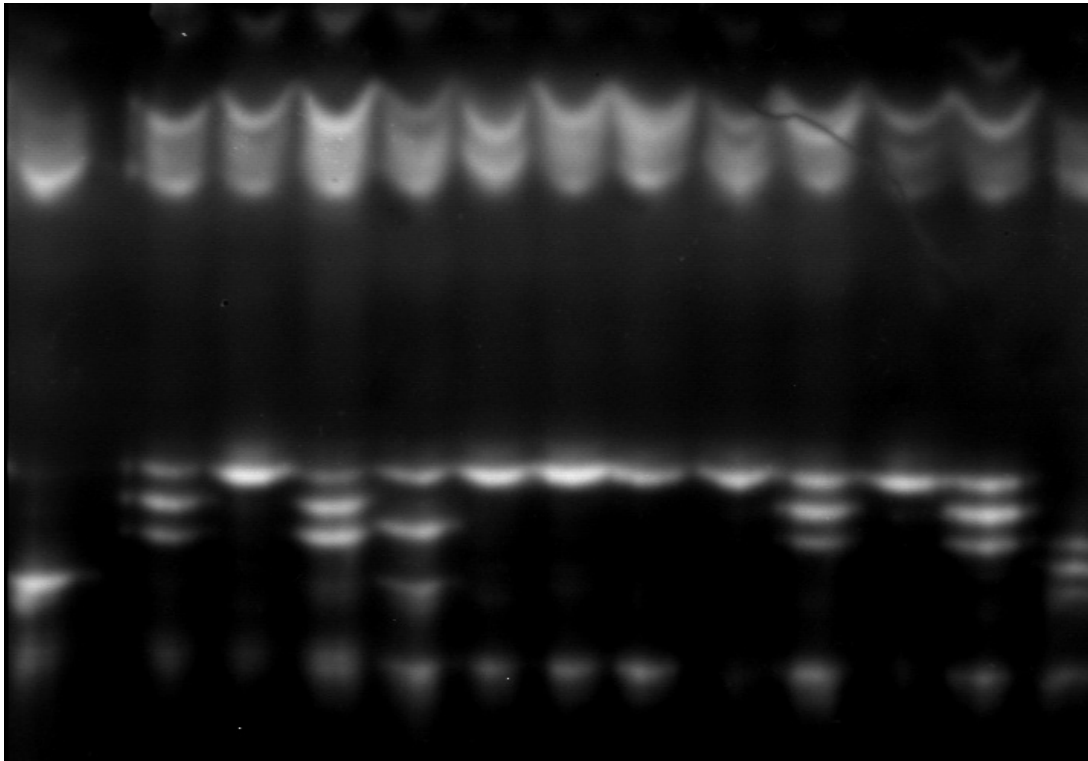
Esterasen, auch als unspezifische Esterasen bezeichnet, werden von mehreren Genorten kodiert, die mit α -Naphthylacetat und/oder mit β -Naphthylacetat und/oder mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4-Methylumbelliferylacetat reagieren.

Bei der Verwendung von 4-Methylumbelliferylacetat werden 3 Aktivitätszonen sichtbar, wobei sich die Zonen A und C auch mit β -Naphthylacetat färben lassen. Die Zonen B und C können 2 Genloci mit bisher 4 bzw. 2 Allelen (Majorpolymorphismus) und dimerer Proteinstruktur zugeordnet werden.

Esterasen sind für ihre gewebespezifische Genexpression bekannt und prägen jahresdynamische Aktivitätsänderungen aus. Es können deshalb nur solche Aktivitätszonen interpretiert werden, deren genetische Kontrolle abgesichert ist. Für den Genort B wurde von uns die genetische Kontrolle durch Analysen von Knospen von drei Mutterbäumen und Endospermen von Nachkommen dieser Bäume (30 Endosperme je Baum) abgeklärt. In der Zone erscheinen Muster die nur aus einem Band bestehen (homozygote Genotypen) und Muster die aus drei Banden bestehen (heterozygote Genotypen – System ist dimer). Insgesamt wurden an dem Genort vier Allele nachgewiesen, von denen B2 am häufigsten ist.

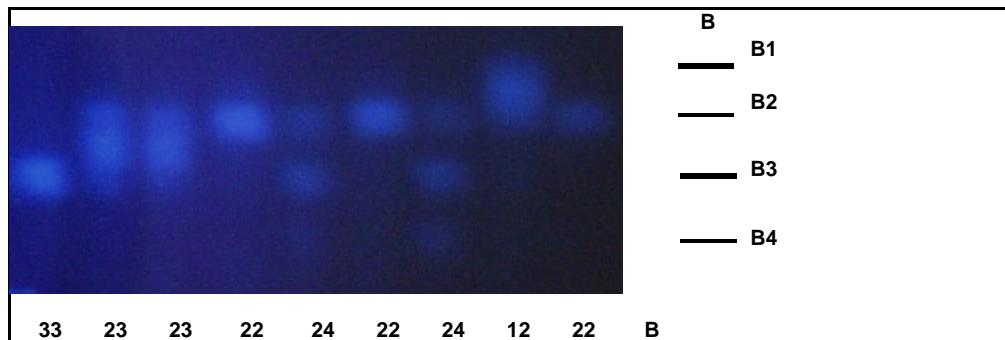


Zymogramm der Esterasen bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



EST-A nicht interpretiert

EST-B	44	23	22	23	24	22	22	22	22	23	22	23	34
EST-C	12	12	12	12	22	22	22	22	22	22	22	22	22



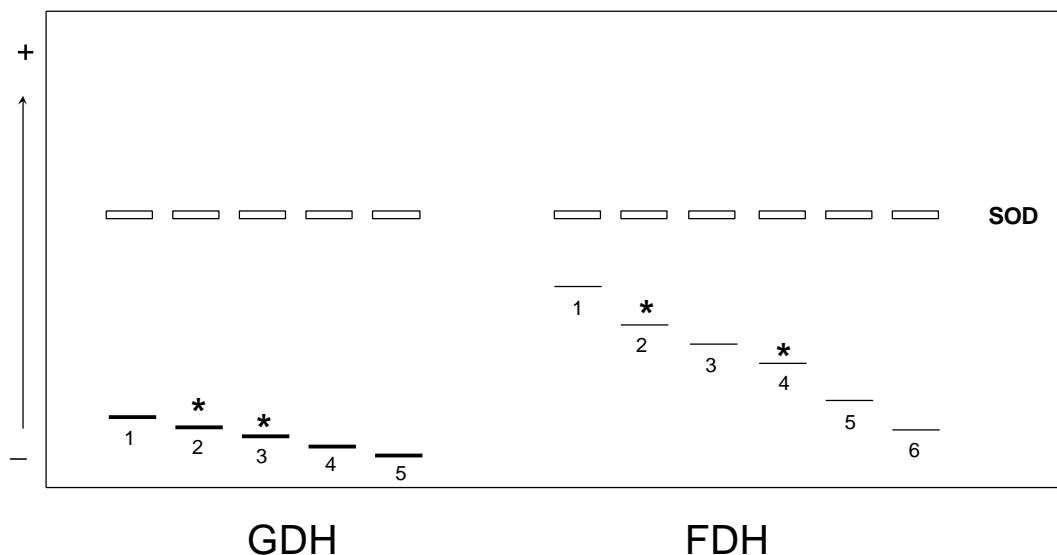
Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Locus	Allel	Relative Häufigkeit
EST-B	1	selten
	2	0,60...0,70
	3	0,15...0,20
	4	0,15...0,20
EST-C	1	ca. 0,20
	2	ca. 0,80

Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2 und Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2

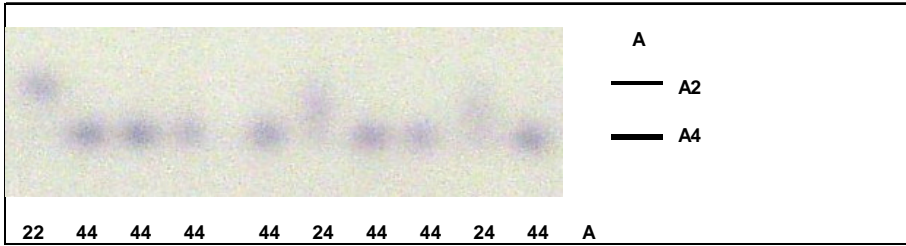
Diese beiden Enzymsysteme, die jeweils einen Genort kontrollieren, können für Kiefer in einem Gel angefärbt werden, da sich die Aktivitätszonen nicht überlagern. Aufgrund der geringen Aktivität des Enzyms FDH ist die Trennung mit PAGE zu empfehlen. Bei frischem Gewebe und bei Analyse von Keimlingen erhält man aber auch mit der Stärkegelelektrophorese noch auswertbare Zymogramme.

Bei dem schneller wandernden Genort FDH (Dimer) ist das Allel A4 am häufigsten, aber auch A2 kommt in allen Populationen vor. Die übrigen Allele sind selten. Das Allel A6 erreichte in einer türkischen Herkunft die größten Häufigkeiten, in anderen untersuchten Populationen im Verbreitungsgebiet der Kiefer kommt es nur sehr selten vor.

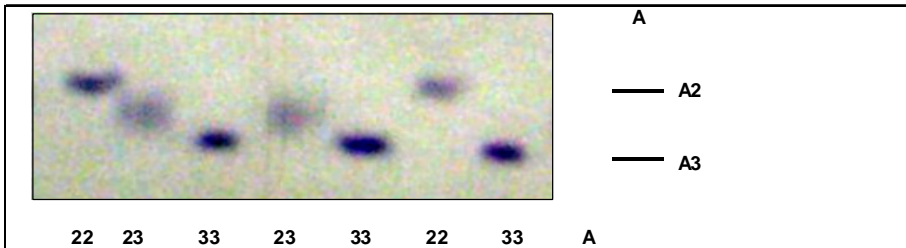


Der Genlocus GDH (Hexamer) kann mit den Methoden der SGE und PAGE gleichermaßen gut ausgewertet werden. Er besitzt in Endospermen und Knospen hohe Enzymaktivität. Von den 5 Allelen kommen A3 und A2 häufig vor, die übrigen Allele A1, A4 und A5 sind sehr selten. Bei diploidem Gewebe mit heterozygotem Genotyp sind die einzelnen Banden nur mit PAGE-Trennung bei den Genotypen A1A3 und A3A5 sichtbar, die Genotypen A2A3 und A3A4 erscheinen als diffuses Band.

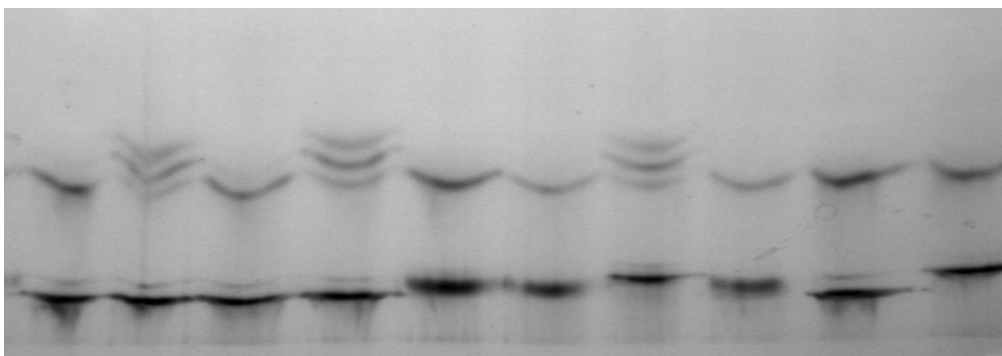
Zymogramm der Formiatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



Zymogramm der Glutamatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



Zymogramm der Formiatdehydrogenase und der Glutamatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



FDH 44 34 44 34 44 44 34 44 44 44
 GDH 33 33 33 33 23 23 22 23 33 22

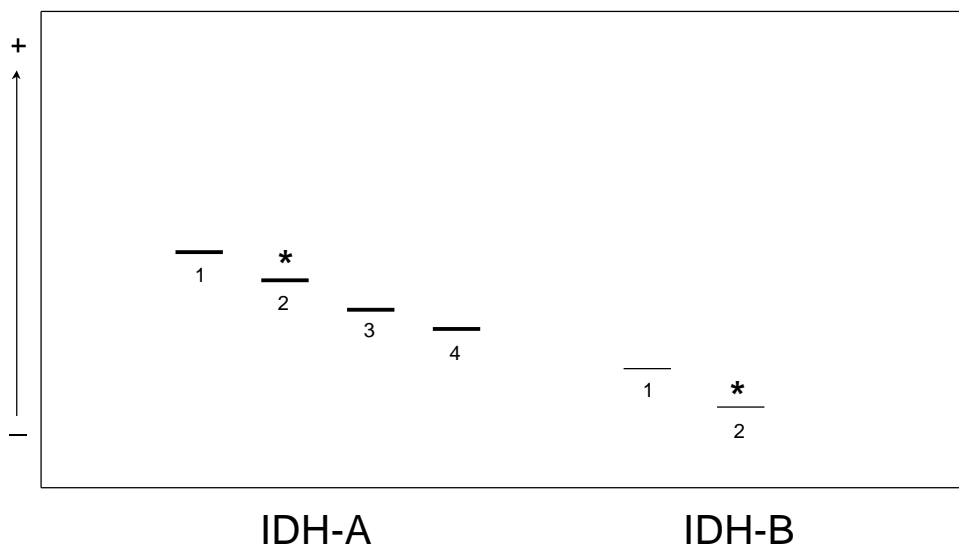
Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
FDH	1	0.....0,02
	2	0,02...0,21
	3	sehr selten
	4	0,71...0,96
	5	0.....0,06
	6	0.....0,09

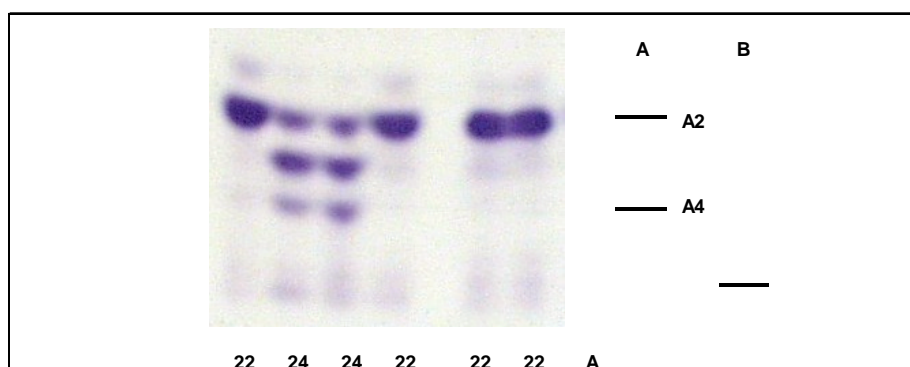
GDH	1	0.....0,03
	2	0,23...0,51
	3	0,49...0,77
	4	sehr selten
	5	sehr selten

Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42

Das Enzymsystem IDH (Dimer) wird bei Kiefer von zwei Genorten mit ausgeprägtem Minorpolymorphismus kontrolliert. Der Locus IDH-A mit hoher Enzymaktivität ist in vielen Populationen monomorph. Der Genort IDH-B ist aufgrund seiner sehr geringen Enzymaktivität oft nicht auswertbar.



Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
IDH-A	1	sehr selten
	2	0,99.....1
	3	sehr selten
	4	sehr selten
IDH-B	1	sehr selten
	2	häufig

Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37

Das Enzymsystem der MDH (Dimerstruktur) wird von vier Genorten kontrolliert, wobei als Besonderheit ein Interlocus-Heterodimer zwischen den Loci MDH-B und MDH-C auftritt (Literatur zur Interpretation: El-Kassaby 1981, Thormann und Stephan 1993).

Unabhängig vom Trennsystem überlagern sich die MDH-Alloenzyme verschiedener Loci, deshalb kann die Interpretation bei diploidem Material und beim Auftreten von Heterozygoten mit seltenen Allelen problematisch sein.

Bei Stärkegelelen können die häufigsten Allele von MDH-A (A3) und MDH-B (B2) eine fast gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben.

Der Genort MDH-A ist sehr stark gefärbt und besitzt 5 Allele, darunter 1 Nullallel. Das Allel A3 ist sehr häufig, aber auch A1 kommt in fast jeder Population vor. Das Allel A2 besitzt eine schwächere Aktivität im Vergleich zu den anderen Allelen und ist ebenso wie die Allele A4 und A0 sehr selten.

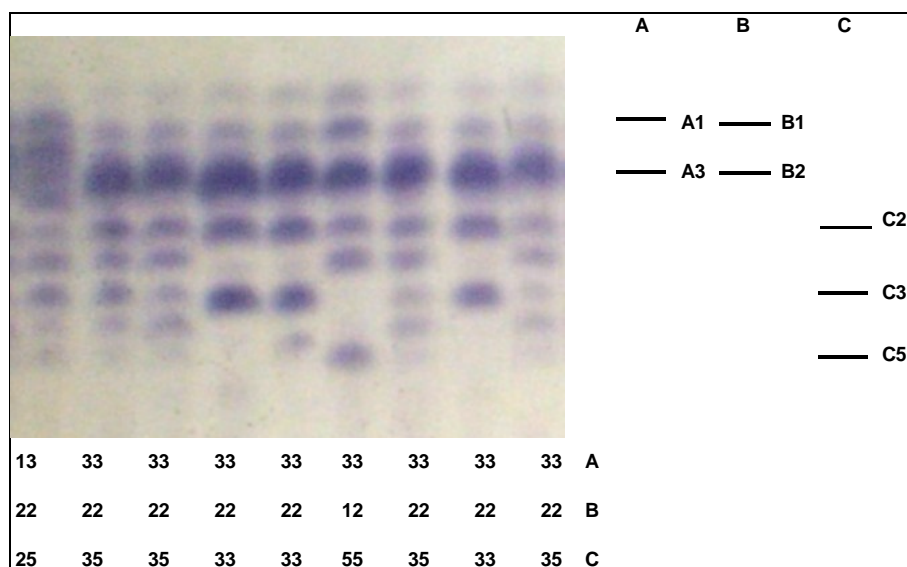
Am Genort MDH-B wurden 4 Allele nachgewiesen, davon B2 sehr häufig, B1 und B3 und B4 extrem selten. Zusätzlich kommt ein Nullallel vor, das ein Interlocus-Heterodimer mit MDH-C bildet.

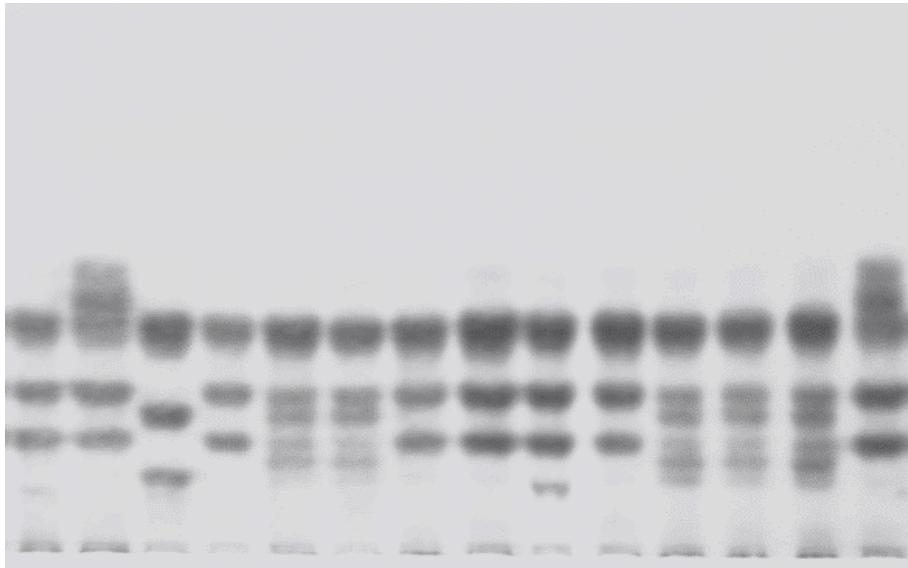
Der Locus MDH-C besitzt 7 Allele, darunter ein Nullallel. Die Allele C3 und C5 sind häufig. Das Nullallel dieses Locus bildet kein Heterodimer mit MDH-B.

Am Locus MDH-D mit 4 Allelen und einem Nullallel sind die Allele D2 und D4 am häufigsten, aber auch D1 kommt in fast allen Populationen vor. In diploidem Material sind die heterozygoten Genotypen D1D4 und D2D4 kaum voneinander zu unterscheiden. MDH-D kann mit PAGE nicht untersucht werden

Beim Vergleich von Isoenzymmustern aus diploidem Knospengewebe und haploiden Endospermen desselben Baumes gab es in wenigen Ausnahmefällen die Erscheinung, daß das Bandenmuster des diploiden Gewebes auf den homozygoten Genotyp C3C3 bzw. C5C5 schließen ließ, während ein Teil der Endosperme den Genotyp C3 (bzw. C5) und ein anderer Teil eine um ca. 1 mm weiter gewanderte Bande aufwies. In drei Fällen waren bei heterozygoten Bäumen der Genotyps C3C5 ähnliche Verschiebungen bei Endospermanalysen festgestellt worden, so daß jeweils 4 verschiedene Haplotypen auftraten.

Zymogramme der Malatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)





MDH-A 33 13 33 33 33 33 33 33 33 33 33 33 33 33
 MDH-B 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11
 MDH-C 33 33 55 33 35 35 33 33 33 33 35 35 35 33

Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
MDH-A	0	sehr selten
	1	0.....0,07
	2	sehr selten
	3	0,93.....1
	4	0.....0,05
MDH-B	0	sehr selten
	1	sehr selten
	2	0,98.....1
	3	0.....0,02
	4	sehr selten
MDH-C	0	0.....0,03
	1	sehr selten
	2	0.....0,04
	3	0,62...0,81
	4	0.....0,03
	5	0,18...0,37
6	0.....0,02	

Es kann vermutet werden, daß ein von Breitenbach-Dorfer und Geburek (1995) bei Fichte beschriebener zusätzlicher Locus, der die Wanderungsstrecke von MDH-B und MDH-C modifiziert, auch bei Kiefern vorkommt. Dieser Locus hat einen dominant-rezessiven Erbgang, wobei das rezessive Allel die Wanderungsstrecken der Genorte B und C etwas verlängert. Die Häufigkeit des rezessiven Allels bei Kiefer kann auf der Basis einer Untersuchung von ca. 130 Bäumen eines Bestandes aus Nordrhein-Westfalen (jeweils 6 bis 20 Endosperme) auf 3-4% geschätzt werden.

Literatur zu MDH:

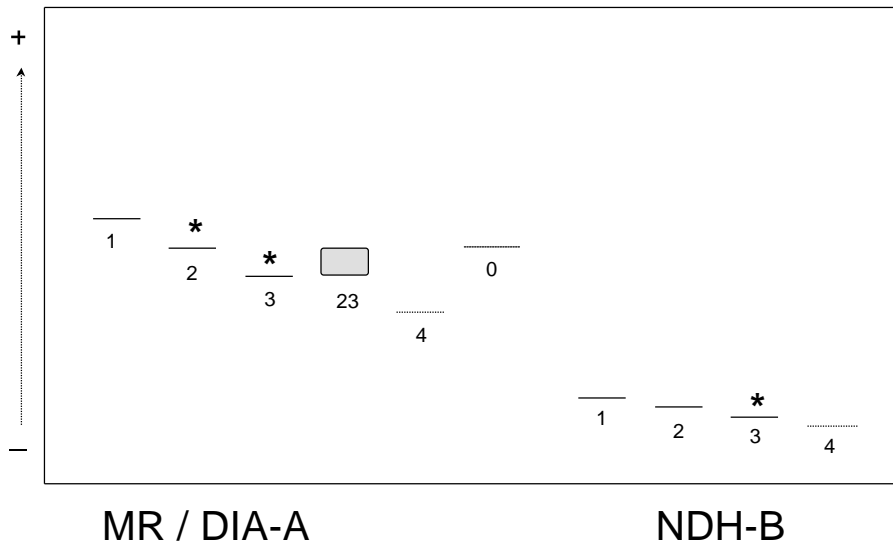
- BREITENBACH-DORFER, M.; GEBUREK, T. Gene modifies electrophoretic properties of malate dehydrogenase in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Hereditas* 122: 103-108; 1995.
- EL-KASSABY, Y. A. Genetic interpretation of malate dehydrogenase isoenzymes in some conifer species. *J. Hered.* 72, 451-452; 1981
- THORMANN, R.; STEPHAN, B. R. Interpretation of isozyme patterns of malate dehydrogenase in Scots pine using two different staining methods. *Silvae Genetica* 42: 5-8; 1993.

Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2

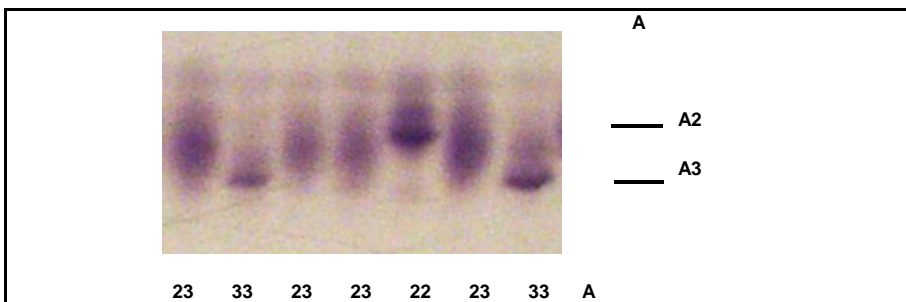
Sowohl bei der Färbung für Menadionreduktase als auch für Diaphorase erscheinen identische Bandenmuster. MR-gefärbte Gele lassen sich jedoch aufgrund der geringeren Hintergrundfärbung besser auswerten.

Ein stark gefärbter als MR oder MR-A bezeichneter Genort (Tetramer) besitzt 5 Allele, darunter 1 Nullallel. Die Allele A2 und A3 sind häufig. Das seltene Allel A23 (Duplikation?), das in Endospermen ein dem heterozygoten Genotyp A2A3 identisches Muster produziert, kann in diploidem Gewebe nicht identifiziert werden.

MR-Gele von Endospermproben sind immer gut auswertbar. Bei Knospenmaterial sollte das Gel nicht zu lange in der Färbelösung liegen, da NADH-abhängige Dehydrogenasen den MR-Locus zunehmend überlagern.



Zymogramm der Menadionreduktase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

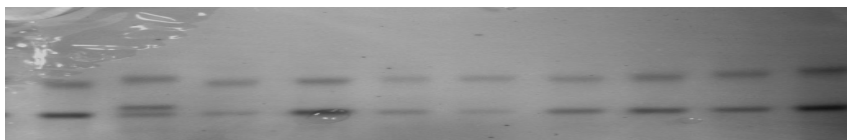
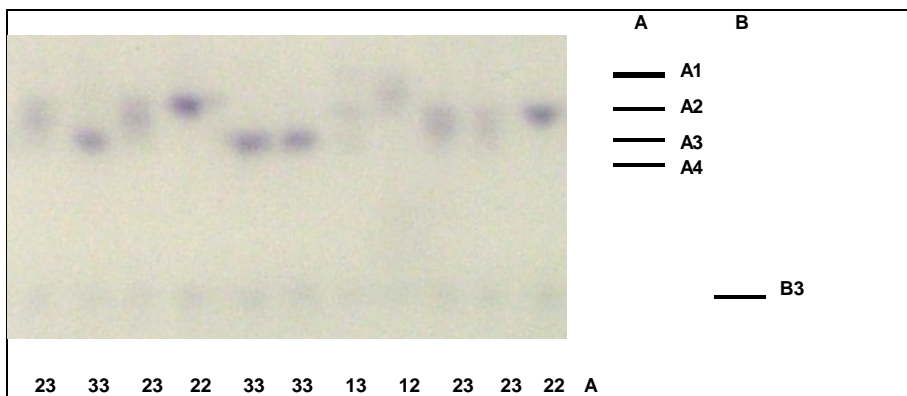
	Allel	Relative Häufigkeit
MR = DIA	0	0.....0,07
	1	0.....0,02
	2	0,68...0,90
	3	0,08...0,31
	23	selten
	4	sehr selten

NADH-Dehydrogenase (NADH) E.C.1.6.99.3

Als NADH-Dehydrogenasen werden jene Enzyme bezeichnet, die anfärben, wenn man neben MTT nur nach NADH zur Färbelösung gibt, aber keinen Elektronenakzeptor wie Menadione oder DCPIP. Bei einer solchen Anfärbung erscheinen auf dem Gel mehrere Aktivitätszonen. Ein als NDH-A bezeichneter Genort wandert mit annähernd gleicher Geschwindigkeit wie MR-A. Nach Optimierung der Trennmethode ist es uns gelungen, an diesem Genort vier Varianten nachzuweisen.

Ein weiterer als NDH-B bezeichneter Genort, der auch in für MR gefärbten Gelen gut auswertbar ist, besitzt 4 Allele, wobei das Allel B3 ist am häufigsten auftritt. Die monomere Struktur des Enzyms an diesem Genort ist in Proben von Knospengewebe des Genotyps B2B3 am Fehlen der Hybridbande deutlich zu erkennen.

Zymogramme der NADH-Dehydrogenasen bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



NDH-A nicht interpretiert

NDH-B 33 23 33 33 33 33 33 33 33 33 33

Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

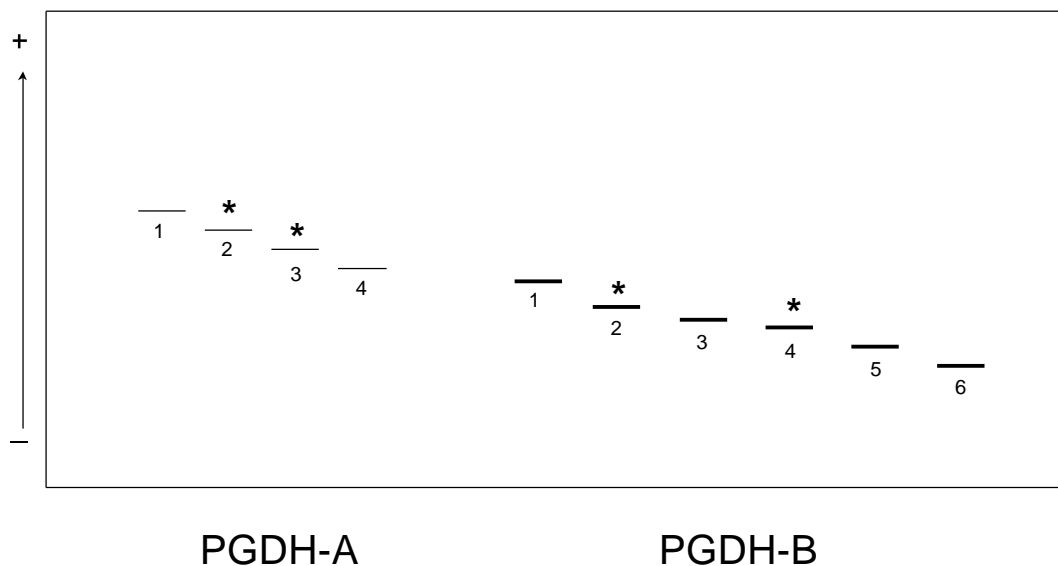
Genort	Allel	Relative Häufigkeit
NDH-A	1	0,10...0,20
	2	0,35...0,45
	3	0,40...0,50
	4	selten
NDH-B	1	sehr selten
	2	0.....0,10
	3	0,90.....1
	4	sehr selten

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

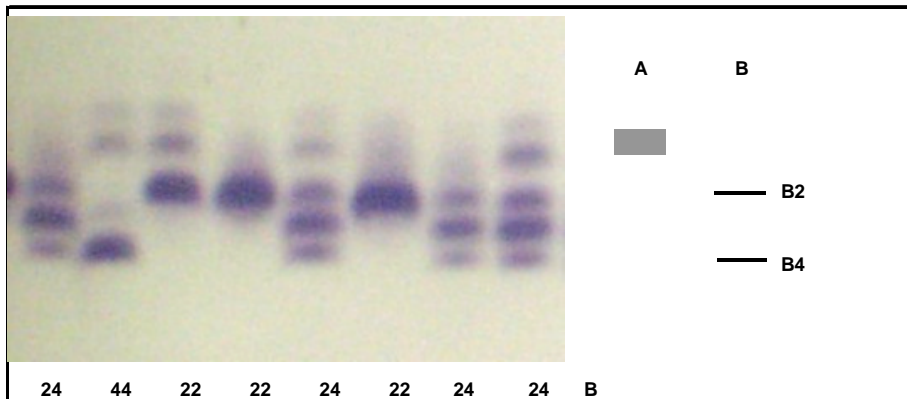
Das Enzymsystem PGDH (Dimer) besitzt zwei Genorte, deren Alloenzyme sich je nach Trennbedingungen überlagern können.

Am Locus PGDH-A sind 4 Allele bekannt, davon kommen A2 und A3 häufig vor. In Endospermmaterial ist dieser Locus gut auswertbar, er wird jedoch durch seine geringe Aktivität in Knospengewebe dort nur selten interpretiert.

Am Genort PGDH-B wurden 6 Allele gefunden, davon sind B2 und B4 häufig. Der Genort ist aufgrund der hohen Enzymaktivität in Knospen und Endospermen gut auswertbar.



Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)



Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
PGDH-A	1	0.....0,03
	2	0,43...0,77
	3	0,22...0,57
	4	0.....0,05
PGDH-B	1	0.....0,04
	2	0,59...0,77
	3	0.....0,03
	4	0,22...0,41
	5	0.....0,05
	6	0.....0,02

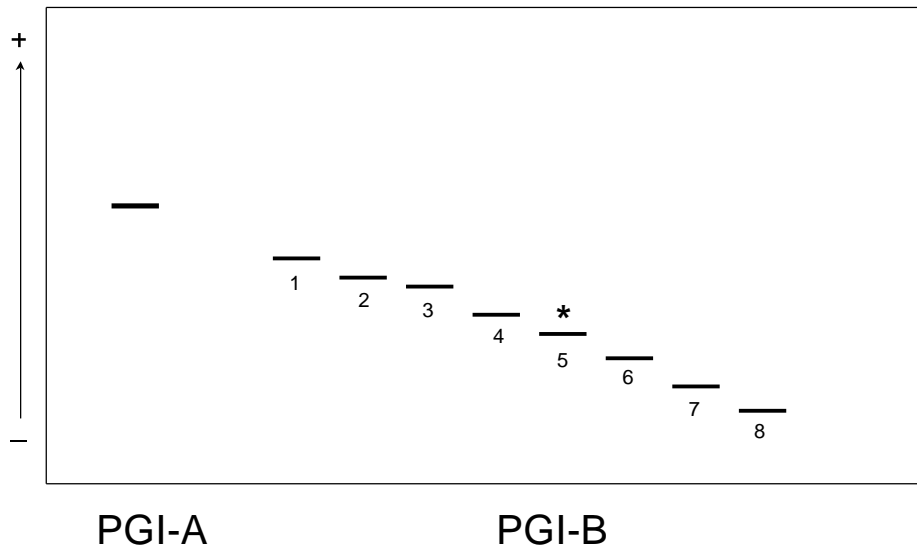
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Von den zwei Genorten mit hoher Aktivität ist PGI-A im bisher untersuchten Material monomorph.

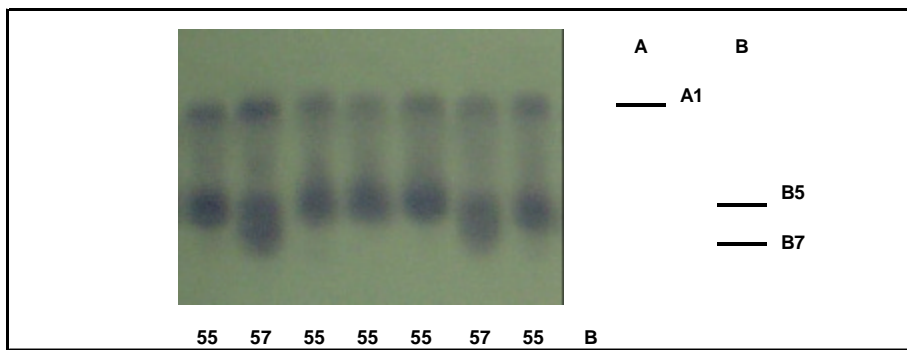
Der Locus PGI-B (Dimer) besitzt 8 Allele. Das Allel B5 kommt am häufigsten vor, danach folgen B2 und B7, und die übrigen Allele sind sehr selten. Das Allel B7 erreicht in Osteuropa und in der Türkei die größten Häufigkeiten.

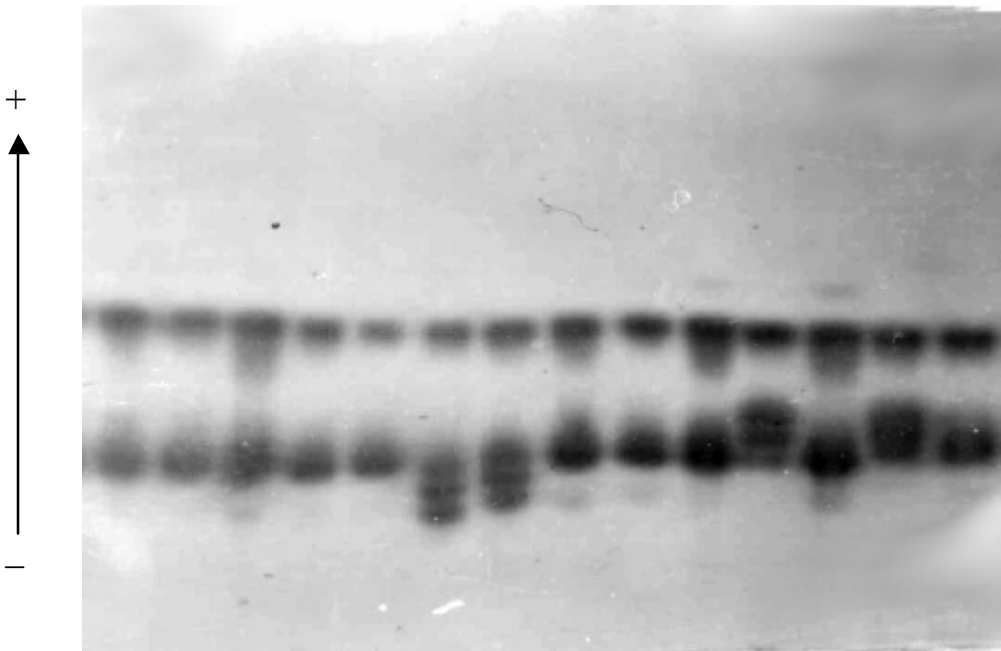
Die Allele A2 und A3 unterscheiden sich in ihrer Wanderungsstrecke nur geringfügig, für eine sichere Identifizierung dieser beiden Allele ist deshalb der unmittelbare Vergleich mit Referenzproben beider Genotypen zu empfehlen.

In Abhängigkeit vom verwendeten Extraktionspuffer und Trennsystem können mitunter bei homozygoten Genotypen drei Banden und bei Heterozygoten fünf Banden auftreten



Zymogramme der Phosphoglucose-Isomerase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)





PGI-A 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11

PGI-B 55 55 55 55 55 57 57 55 55 55 25 55 25 55

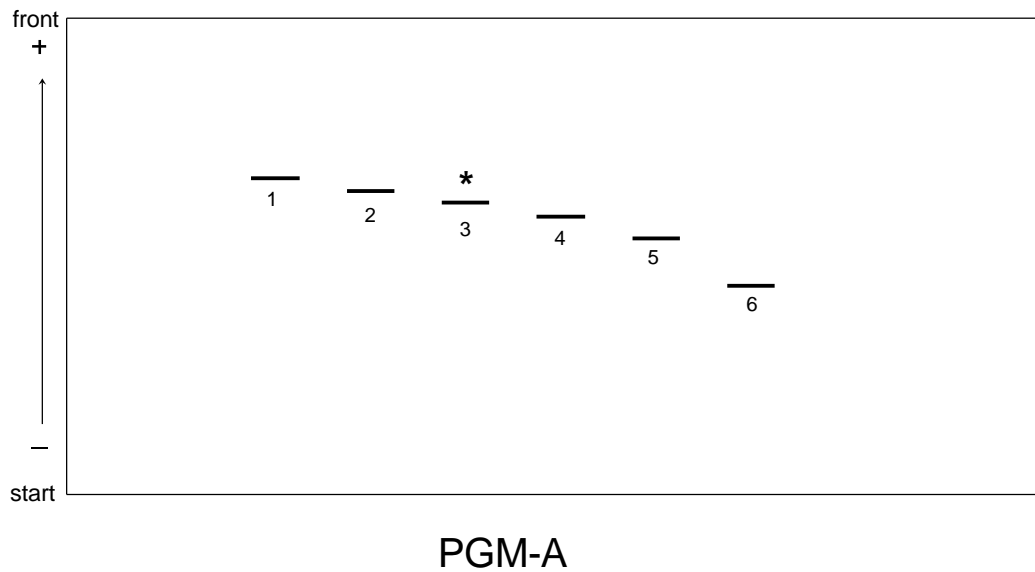
Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
PGI-A	1	1
PGI-B	1	sehr selten
	2	0.....0,05
	3	0.....0,02
	4	0.....0,02
	5	0,79...0,99
	6	0.....0,02
	7	0.....0,16
	8	0.....0,02

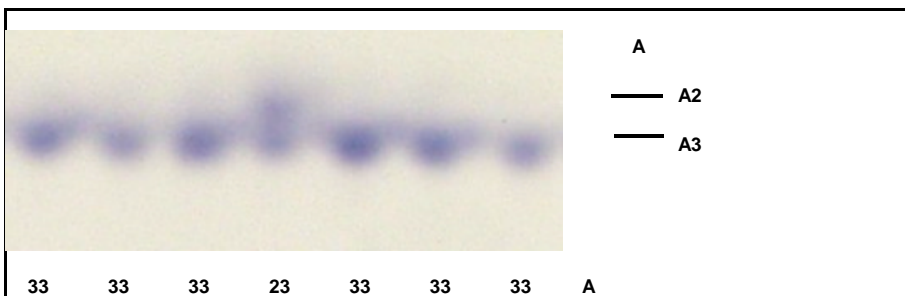
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1

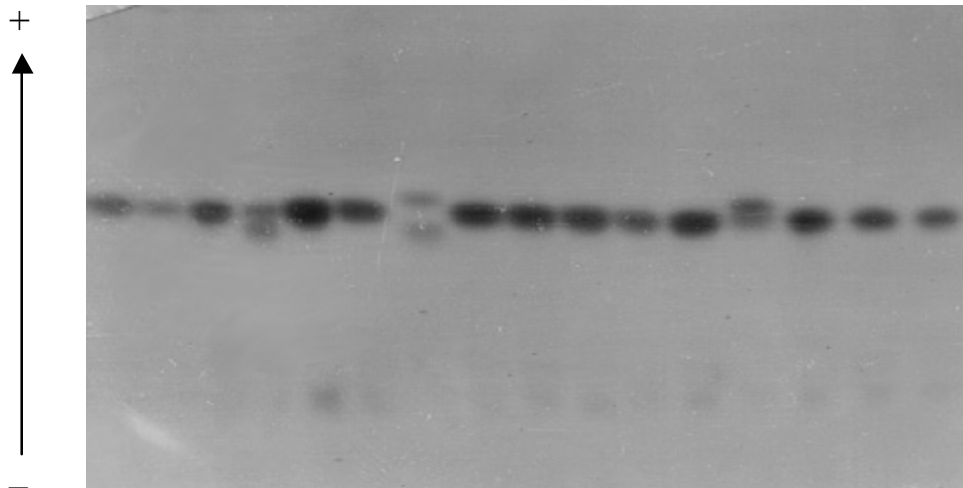
Das Enzymsystem PGM wird bei Kiefer von einem Genort mit monomerer Struktur kontrolliert. Eine zweite, wenn vorhanden, nur schwach gefärbte Aktivitätszone kann durch unspezifische Reaktionen entstehen.

Am Locus PGM-A, der stark gefärbt ist, wurden 6 Allele nachgewiesen, wobei A3 am häufigsten vorkommt und auch A2 in jeder Population vorhanden ist.



Zymogramme der Phosphoglucomutase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)





PGM-A 33 33 33 35 33 33 25 33 33 33 33 33 23 33 33 33

Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

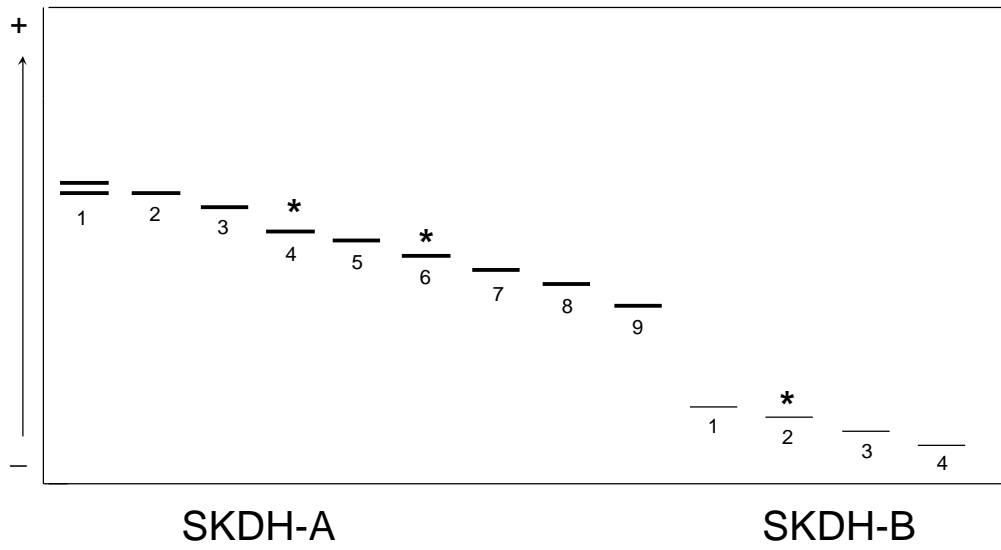
Genort	Allel	Relative Häufigkeit
PGM-A	1	0.....0,02
	2	0,01...0,07
	3	0,86...0,98
	4	0.....0,05
	5	0.....0,06
	6	sehr selten

Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25

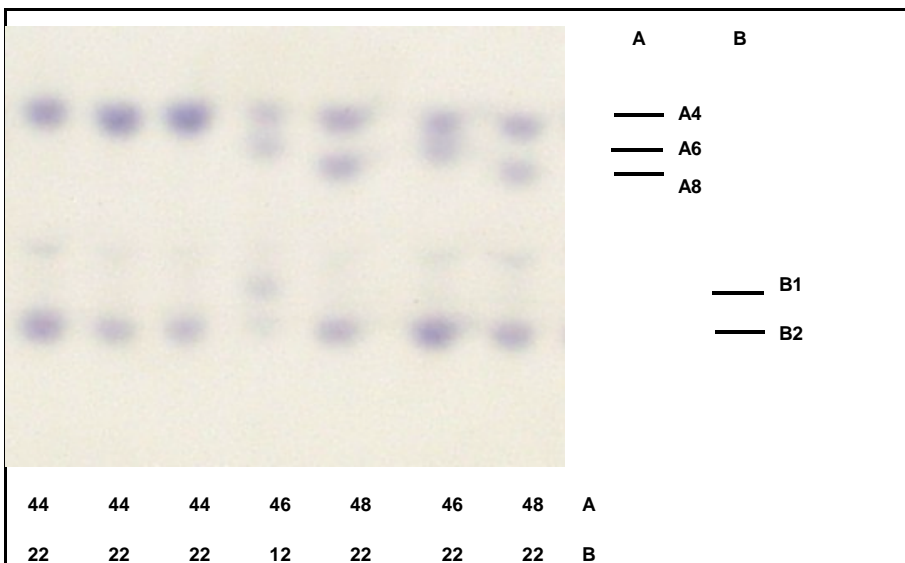
Das Enzymsystem der SKDH (Monomer) wird von zwei Genorten kontrolliert. Beide Genorte sind in Stärkegelelen für Knospengewebe gut auswertbar. Da die Enzymaktivität in Endospermen oft gering ist, ist hier die Trennung mit PAGE-Harnstoff zu empfehlen. Auch unter diesen Trennbedingungen ist die B-Zone bei Endospermanalyse oft zu schwach um ausgewertet werden zu können.

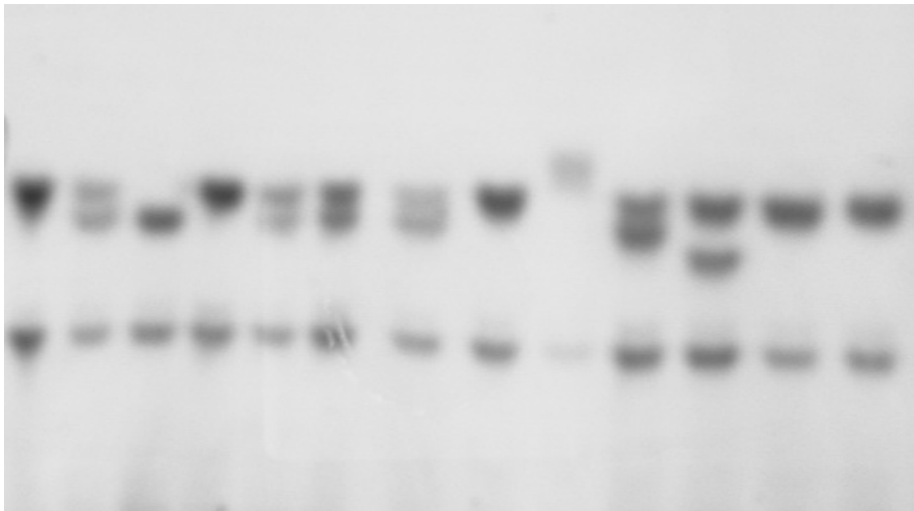
Der Locus SKDH-A besitzt 9 Allele. Davon ist A4 am häufigsten, aber auch A6 kommt in fast allen Populationen vor. Das Allel A1 hat zwei Banden, wobei die langsamere Bande dieselbe Wanderungsstrecke wie das Allel A2 zurücklegt.

Am Locus SKDH-B, der etwas schwächer gefärbt wird, wurden bisher 4 Allele nachgewiesen. B2 ist das häufigste Allel, aber auch B1 ist in allen Populationen vorhanden. Die höchsten Häufigkeitswerte wurden in osteuropäischen Populationen gefunden.



Zymogramme der Shikimatdehydrogenase bei Kiefer (*Pinus sylvestris*)





SKDH-A 44 46 66 44 46 46 46 44 34 46 48 44 44
 SKDH-B 22 22 22 22 22 22 22 22 22 22 22 22 22

Orientierende Angaben zu den Häufigkeiten der Allele

Genort	Allel	Relative Häufigkeit
SKDH-A	1	sehr selten
	2	0.....0,05
	3	0.....0,07
	4	0,72...0,97
	5	sehr selten
	6	0,01...0,24
	7	sehr selten
	8	0.....0,05
	9	sehr selten
SKDH-B	1	0,01...0,11
	2	0,86...0,99
	3	0.....0,06
	4	sehr selten