

## **Anleitung für Isoenzymuntersuchungen bei Stieleiche (*Quercus robur*) und Traubeneiche (*Quercus petraea*)**

- **Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -**

- **Monika Konnert, Martin Fromm, Thomas Wimmer**

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

Unter den Laubbäumen sind neben Buche, Stiel- und Traubeneiche die mit Abstand isoenzymatisch am häufigsten untersuchten Baumarten. Der Vererbungsmodus ist für zahlreiche Genorte bei Stiel- und Traubeneiche geklärt (FINKELDEY eingereicht, MÜLLER-STARCK et al. 1996, ZANETTO et al. 1996)

Die beiden Eichenarten besitzen keine sogenannten „privaten“ Allele, sind also auf der Ebene von Isoenzymen qualitativ nicht unterscheidbar. Aus diesem Grunde erfolgen genetische Interpretation und Nomenklatur der Zymogramme für beide Eichenarten einheitlich. Bei Isoenzymen scheint eine quantitative Unterscheidung über Häufigkeitsstrukturen an den Genorten ACP-C, GDH-A, IDH-B, NDH-A und PGM-A möglich (FINKELDEY 2001). Die Identifikation beider Eichenarten und deren Hybride über genetische Marker (auch bei Verwendung von DNA-Markern) in Kombination mit morphologischen Merkmalen beruht letztendlich auf Wahrscheinlichkeiten (z.B. ZANETTO et al. 1994, BODÉNÈS et al. 1997, DUMOLIN-LAPÈGUE et al. 1997). Einige Genorte sind bei den beiden Eichenarten nur bei der Verwendung von Knospenmaterial, optimaler Probenqualität und perfektionierter Methodik sicher auszuwerten.

Das vorliegende Handbuch hat nicht den Anspruch der Vollständigkeit. Es enthält nur die Systeme, die bei den beiden Eichenarten häufig als Genmarker eingesetzt werden. Neben den Untersuchungen am ASP Teisendorf sind bei der Zymogrammbeschreibung auch folgende Veröffentlichungen berücksichtigt worden: HERZOG 1996, GEHLE 1999, STREHLE 2001, TRAINER 2001 sowie persönliche Mitteilungen von S. LÖCHELT und Th. SANDER (ehemals FVA Freiburg) und H. HERTEL (BFH Waldsiedersdorf).

Trennsysteme und Trennbedingungen beziehen sich vor allem auf die derzeitige Arbeitsmethodik am ASP Teisendorf. Falls in anderen Laboren andere Systeme oder Trennbedingungen zum Einsatz kommen, bitten die Autoren um Benachrichtigung unter folgender eMail-Adresse: [Monika.Konnert@foasp-bgl.bayern.de](mailto:Monika.Konnert@foasp-bgl.bayern.de).

Das Handbuch wird dann entsprechend vervollständigt und überarbeitet.

## Literaturangaben

BODÉNÈS, C.; JOANDET, S.; LAIGRET, F. and KREMER, A. (1997): Detection of genomic regions differentiating two closely related oak species *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. *Heredity* 78: 433-444.

FINKELDEY, R. (2001): Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 2. Genetic structures in "Pure" and "Mixed" forests of pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica* 50: 22-30.

FINKELDEY, R. eingereicht: Genetic variation of oaks (*Quercus* spp.) in Switzerland. 1. Allelic diversity and differentiation at isozymes gene loci.

GEHLE, T. (1999): Reproduktionssystem und genetische Differenzierung von Stieleichenpopulationen (*Quercus robur*) in Nordrhein-Westfalen. Göttinger Forstgenetische Berichte 24. Göttingen.

HERZOG, S. (1996): Genetic inventory of European oak populations. *Ann. Sci. For.* 53: 783-783.

DUMOLIN-LAPÈGUE, S.; DEMESURE, B.; FINESCHI, S.; LE CORRE, V. and PETIT, R. (1997). Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.

MÜLLER-STARCK, G.; ZANETTO, A.; KREMER, A.; HERZOG, S. (1996): Inheritance of isozymes in the genus *Quercus*: II. Sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl) and offspring from interspecific crosses. *Forest Genetics* 3: 1-12.

STREHLE, U. (2000): Genetische Variation der Stieleiche (*Quercus robur* L.) in Bayern – Eine Studie auf der Basis von Isoenzym-Genmarkern. Doktorarbeit TU München, 120 S. + Anhang.

TRAINER, E. (2001): Reproduktion in Beständen der Traubeneiche (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). <http://TUMB1.Biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/allgemein.html>.

ZANETTO, A.; KREMER, A.; MÜLLER-STARCK, G. and HATTEMER, H. H. (1996): Inheritance of isozymes in pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Heredity* 87: 364-370.

ZANETTO, A.; ROUSSEL, G. and KREMER, A. (1994): Geographic variation of inter-specific Differentiation between *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Forest Genetics* 1: 111-123.

## Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

Tab. 1: Übersicht über bei Stiel- und Traubeneiche häufig untersuchte Enzymsysteme und deren

| <b>Enzym und Nomenklatur</b>                            | <b>Genort</b>                    | <b>Struktur</b> | <b>Häufige Allele</b>   | <b>Trenn-System</b> |
|---|----------------------------------|-----------------|---|---------------------|
| Alaninaminopeptidase (AAP)<br>E.C.3.4.11.1              | AAP-A<br>AAP-B                   | Monomer         | A <sub>2</sub> , A <sub>4</sub> , A <sub>5</sub><br>B <sub>3</sub> , B <sub>5</sub> | Ashton              |
| Aspartataminotransferase (AAT, GOT)<br>E.C.2.6.1.1      | AAT-A<br>AAT-B<br>AAT-C          | Dimer           | B <sub>3</sub><br>C <sub>4</sub>  | Ashton o.<br>Poulik |
| Fluoreszierende Esterase (FEST)<br>E.C.3.1.1.1          | FEST-A<br>FEST-B                 | Dimer           | B <sub>4</sub>  | Ashton              |
| Formiatdehydrogenase (FDH)<br>E.C.1.2.1.2               | FDH-A                            | Dimer           | A <sub>2</sub> , A <sub>3</sub>   | Poulik              |
| Isocitratdehydrogenase (IDH)<br>E.C.1.1.1.42            | IDH-A<br>IDH-B                   | Dimer           | A <sub>4</sub><br>B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub>                                   | Tris-Citrat         |
| Leucinaminopeptidase (AAP)<br>E.C.3.4.11.1              | LAP-A<br>LAP-B                   | Monomer         | B <sub>3</sub>  | Ashton              |
| Malatdehydrogenase (MDH)<br>E.C.1.1.1.37                | MDH-A<br>MDH-B<br>MDH-C<br>MDH-D | Dimer           | ?<br>B <sub>3</sub><br>?<br>?   | Tris-Citrat         |
| Menadionreduktase (MNR)<br>E.C.1.6.99.2                 | MNR-A                            | Tetramer        | A <sub>3</sub>  | Poulik              |
| 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH)<br>E.C.1.1.1.44 | 6-PGDH-A<br>6-PGDH-B             | Dimer           | B <sub>3</sub>  | Tris-Citrat         |
| Phosphoglucose-Isomerase (PGI)<br>E.C.5.3.1.9           | PGI-A<br>PGI-B                   | Dimer           | A <sub>2</sub><br>B <sub>6</sub>  | Ashton              |
| Phosphoglucomutase (PGM)<br>E.C.2.7.5.1                 | PGM-A<br>PGM-B                   | Monomer         | A <sub>3</sub><br>B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>                                   | Tris-Citrat         |
| Shikimatdehydrogenase (SKDH)<br>E.C.1.1.1.25            | SKDH-A                           | Monomer         | A <sub>3</sub>  | Tris-Citrat         |

**kontrollierende Genorte.**

## Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Bei Stiel- und Traubeneiche hat sich die Extraktion aus Knospen, Keimspitzen der Embryos (ca. 1 cm Samen), Wurzeln und bedingt Blattmaterial bewährt. Die Lagerung des Materials erfolgt bei  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , wobei die Eicheln nach der Ernte zuvor einige Wochen bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  nachreifen sollten.

Bei Verwendung von Blattmaterial erleichtert die Beigabe von gereinigtem Quarzsand den Aufschluss der Zellen. Die Zugabe einer Spatelspitze Polyclar wird empfohlen, da im Gewebe befindliche Schwermetalle und Phenole gebunden werden. Die mit dem Extrakt vollgesaugten Blättchen können entweder sofort zur Analyse herangezogen oder bei  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die Elektrophorese verwendet werden.

Als Extraktionspuffer hat sich für alle Gewebearten folgender Puffer nach HERTEL (pers. Mitteilung) bewährt.

| Extraktionspuffer <b>nach HERTEL</b> |  |
|--------------------------------------|--|
| Lösung I                             | 40 g Saccharose in 200 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen                         |
| Lösung II                            | 6 g TRIS in 100 ml H <sub>2</sub> O dest.<br>Mit HCl auf pH 8,0 titrieren      |
| Lösung III                           | 40 ml Lsg. I + 10 ml Lsg. II   |
| Zur Lösung III werden hinzugefügt:   | 500 mg PVP<br>500 mg Diethyldithiocarbamic acid<br>500 $\mu$ l 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 + Zusätze) kann im Kühlschrank 5 Tage aufbewahrt, dann muss er neu angesetzt werden. Lösungen I und II können mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

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

### Biomol-Stärke

| Trennsystem   |                          | Gelpuffer               | Gelzusammensetzung          | Stromstärke<br>(I = const.) | Laufzeit |
|---|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| *   | Ashton      pH 8,1       | 300 ml (GP mit 10 % EP) | 34,5 g Stärke, 6 g Sacch.   | 115 mA                      | 5 h      |
| **  | Poulik      pH 8,7       | 280 ml (GP mit 3 % EP)  | 31,0 g Stärke, 5,5 g Sacch. | 115 mA                      | 5 h      |
| **  | Tris-Citro    pH 7,5/8,0 | 250 ml                  | 28,7 g Stärke, 4,0 g Sacch. | 150 mA                      | 5,5 h    |
| * Glasplatte 27 * 11,5 cm      ** Glasplatte 27 * 10 cm |                          |                         |                             |                             |          |

### Gerbu-Stärke

| Trennsystem               |                          | Gelpuffer              | Gelzusammensetzung         | Stromstärke            | Laufzeit |
|---------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------|
| *                         | Ashton      pH 8,1       | 300 ml (10 % EP)       | 33,0 g Stärke 9,0 g Sacch. | 100 mA<br>(U = const.) | 4,5 h    |
| *                         | Tris-Citro    pH 7,5/8,0 | 300 ml                 | 34,0 g Stärke 2,6 g Sacch. | 110 mA<br>(I = const.) | 5,5 h    |
| *                         | Poulik      pH 8,7       | 300 ml (GP mit 3 % EP) | 33,0 g Stärke              | 90 mA<br>(I = const.)  | 4,5 h    |
| * Glasplatte 27 * 11,5 cm |                          |                        |                            |                        |          |

### Gelschnitte (*gel slabs*)

|   | unten           | mitte           | oben             |
|---|-----------------|-----------------|------------------|
| <b>Ashton</b>                             | o -<br>AAP, PGI | o<br>LAP        | o +<br>FEST, AAT |
| <b>Poulik</b>                             | o<br>MNR        | (AAT)           | +<br>FDH         |
| <b>Tris-Citro</b>                         | -<br>PGM (IDH)  | o<br>MDH (SKDH) | o<br>6-PGDH      |
| Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick |                 |                 |                  |

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

| <b>Ashton pH 8,1</b>  |  |           |
|---|--|-----------|
| <b>Elektrodenpuffer pH 8,1*</b>                                     |  |           |
| 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. |  |           |
| <b>Gelpuffer pH 8,1**</b>   |  |           |
| Tris  | 50 mmol/l  | 6,1 g/l   |
| Citronensäure H <sub>2</sub> O                                      | 8 mmol/l   | 1,7 g/l   |
| <b>WICHTIG:</b>   | ** Der zu verwendende Endpuffer besteht zu 90% aus obigem Gelpuffer und 10% des Elektrodenpuffers. |           |

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

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

## Visualisierung der Enzyme (*Enzyme vizualisation*)

### Puffer für Färbelösungen (*stain buffer recipes*)

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

30,27 g TRIS in 4500 ml dest. H<sub>2</sub>O 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. H<sub>2</sub>O 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. H<sub>2</sub>O 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. H<sub>2</sub>O 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 <sub>2</sub> -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 0,05 mol/l pH 5,4 | 70 ml |
| Alanin-B-naphtylamid-HCl      | 50 mg |
| Fast Black K                  | 40 mg |

### 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-Ketoglutarinsäure                         | 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-Ketoglutarinsäure, 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.



**Formiatdehydrogenase (FDH/E.C. 1.2.1.2)**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5 | 70 ml  |
| Na Formiat                        | 2 g    |
| NAD-Lösg.                         | 3 ml   |
| MTT-Lösg.                         | 3 ml   |
| PMS-Lösg.                         | 500 µl |

**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 <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)       | 2 ml   |
| NADP-Lösg.                            | 2 ml   |
| MTT-Lösg.                             | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                             | 300 µl |

**Leucinaminopeptidase (LAP/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-Puffer 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-Puffer 0,05 mol/l pH 7,0           | 70 ml |
| Menadione Na(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 30 mg |
| NADH  | 30 mg |
| NBT-Lösg.                                   | 10 ml |

### **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 <sub>2</sub> -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-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5 | 70 ml  |
| Fructose-6-phosphat-Lösg.         | 2 ml   |
| MgCl <sub>2</sub> -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)**

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5 | 70 ml  |
| D-Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz   | 90 mg  |
| MgCl <sub>2</sub> -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-Puffer 0,05 mol/l pH 8,5 | 70 ml  |
| Shikimisäure                      | 75 mg  |
| MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)   | 2 ml   |
| NADP-Lösg.                        | 1 ml   |
| MTT-Lösg.                         | 2 ml   |
| PMS-Lösg.                         | 300 µl |

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

### **Aminopeptidasen (AAP, LAP) E.C.3.4.11.1**

Das System der Aminopeptidasen ist bei Eiche nicht leicht zu interpretieren, bietet aber aufgrund der hohen Variation einen großen genetischen Informationsgehalt. Deshalb sollte man auf seine Auswertung nicht verzichten. Empfohlen wird auf zwei verschiedenen Schnitten desselben Gels auf AAP und LAP anzufärben.

#### ***AAP-Färbung:***

In der schneller wandernden Zone zeigen sich Muster mit Einfach- und Doppelbanden. Die genetische Analyse bestätigte die angenommene Kontrolle dieser Zone durch einen Genort, der als AAP-A bezeichnet wird. Homozygote erscheinen als Einfachbanden, Heterozygote als Doppelbanden. Die Angaben über die Anzahl der Allelvarianten variieren zwischen fünf (MÜLLER-STARCK et al. 1996, ZANETTO et al. 1996) und acht (HERZOG 1996) und dementsprechend variiert auch die Bezeichnung der Allele. Ein Vergleich der verschiedenen Nomenklaturen wird durch den ausgeprägten Majorpolymorphismus an diesem Genort erschwert.

In dem Untersuchungsmaterial des ASP Teisendorf wurden bislang 5 Allele identifiziert, wobei A2, A4, A5 etwa gleichhäufig, A3 etwas seltener ist. Sehr selten wurde A1 nachgewiesen.

In der Zone B ist sowohl der Genort AAP-B, als auch der Genort LAP-B angefärbt. Die beiden Genorte sind aber untereinander gut zu trennen. Für AAP-B werden in der Literatur fünf Allele beschrieben, wobei die Allele 3 und 5 dominieren. Mit dem von uns angewandten Verfahren ist es nur gelungen, zwei Varianten aufzutrennen. Diese wurden mit B3 und B5 bezeichnet und sind in etwa gleich häufig.

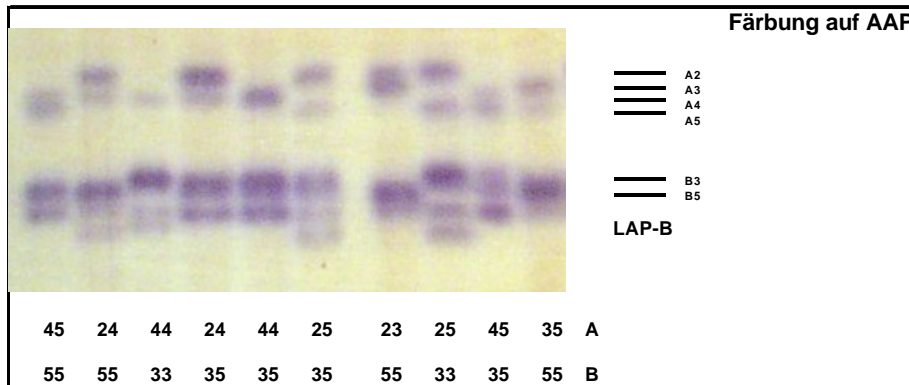
#### ***LAP-Färbung:***

Bei Anfärbung auf LAP überlappen in der A-Zone die Allele von zwei Genorten: LAP-A und AAP-A. Eine sichere Zuordnung zu LAP-A oder AAP-A ist selbst bei dem Vergleich mit Gelen, die auf AAP angefärbt wurden, nicht immer möglich. Für den Vergleich von Referenzproben könnten aber die Muster der Zwei-Locus-Genotypen eingesetzt werden.

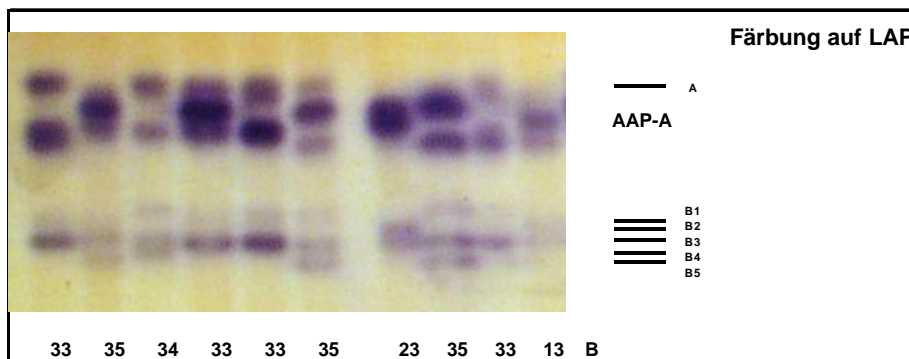
In der B-Zone färbt der Genort LAP-B an und zeigt klar interpretierbare Muster. Zwar färbt auch noch AAP-B ganz schwach mit an, was aber die Auswertung der LAP-B Zone nicht stört.

Bei LAP-B wurden fünf Genvarianten gefunden, wobei die häufigste Variante von uns mit B3 bezeichnet wurde. Der Genort zeigt einen klaren Minorpolymorphismus.

**Zymogramm der Aminopeptidase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*) – Substrat AAP**



**Zymogramm der Aminopeptidase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur*; *Q. petraea*) – Substrat LAP**



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

Nach MÜLLER-STARCK et al. (1996) und ZANETTO et al. (1996) wird das dimere Enzymsystem AAT bei Stiel- und Traubeneiche von drei Genorten kontrolliert. Bei bisherigen Untersuchungen wurde der Genort AAT-A nicht ausgewertet und es liegt keine Vererbungsanalyse vor.

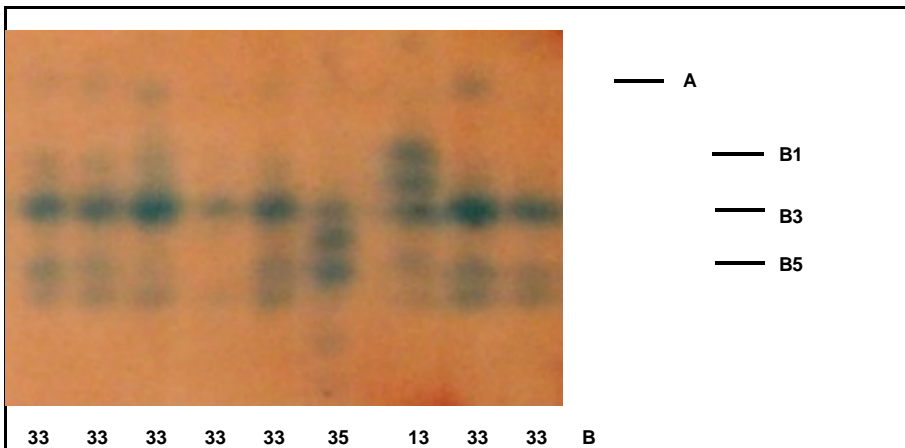
Ausgiebige Datensätze und eine Vererbungsanalyse liegen für den Genort AAT-B vor. Dieser ist durch einen konstanten Minorpolymorphismus gekennzeichnet, bei dem nur selten eine Häufigkeit des Allels B3 von unter 90 % beobachtet wurde. In der Literatur ist die Bezeichnung der Allele nicht einheitlich. In einigen Arbeiten wird die häufigste Variante auch als B2 (z.B. MÜLLER-STARCK ET al. 1996, ZANETTO et al. 1996) bzw. B4 (STREHLE 2000) benannt. Während

MÜLLER-STARCK et al. (1996) und ZANETTO et al. (1996) für den Genort AAT-B vier Allele zählten, geben HERZOG (1996) und GEHLE (1999) die absolute Anzahl der Allelvarianten mit fünf an: STREHLE (2000) konnte sogar sechs Varianten unterscheiden.

An dem ASP wurde die Nomenklatur von HERZOG (1996) und GEHLE (1999) übernommen. Die häufigste Variante wurde mit B3 bezeichnet, B1 und B5 fanden sich in der Regel in fast allen Populationen, auch bei kleineren Probenumfängen, die Varianten B2 und B4 traten nur äußerst selten auf.

Eine Vererbungsanalyse für den Genort AAT-C wurden von MÜLLER-STARCK et al. (1996) durchgeführt. Laut Literatur wurden bislang fünf Enzymvarianten gefunden, wobei das Allel C4 sehr häufig ist, während alle anderen Allele selten in Erscheinung treten. Eine Auswertung dieses Genortes in unserem Probenmaterial war nicht möglich. Auch konnte aufgrund der Muster nicht jeder Zweifel beseitigt werden, dass dieser Genort eigentlich eine Duplikation des Genortes AAT-B ist.

**Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur*; *Q. petraea*)**

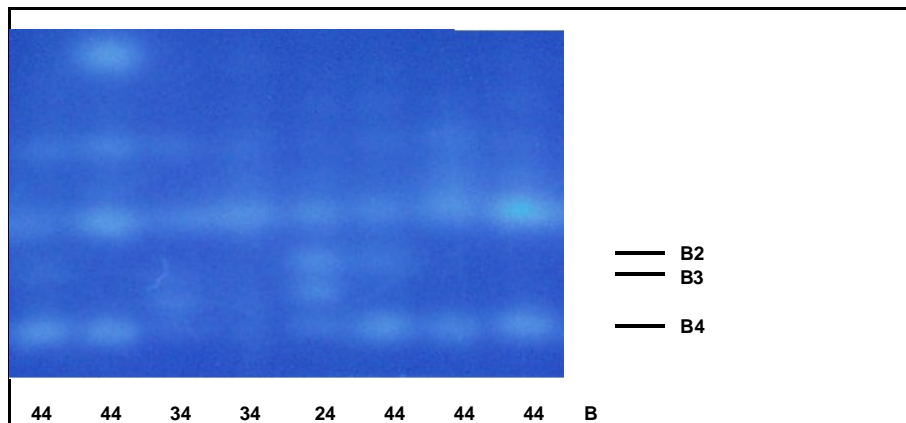


**Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1**

Für das Enzymsystem FEST liegt bei Eiche noch keine Vererbungsanalyse vor. Ausgehend von dem dimeren Charakter dieses Enzyms kann für die beobachteten Muster eine Kontrolle durch zwei Genorte (FEST-A und FEST-B) angenommen werden. Die Variation bei FEST-A ist aufgrund der Vielzahl der Banden und der nicht immer deutlichen Anfärbung genetisch nicht sicher zu interpretieren. Am Genort FEST-B konnten bislang vier Allelvarianten beobachtet werden, wobei die Variante B4 mit 90 % die mit Abstand häufigste ist. B2 und B3 erreichen zusammen ca. 9-10 %, B1 ist sehr selten. Je nach Güte und Trennung des Probenmaterials sind die

Allelvarianten B2 und B3 mehr oder weniger gut voneinander zu unterscheiden. Zu ihrer sicheren Identifizierung wird die Verwendung von Standards empfohlen.

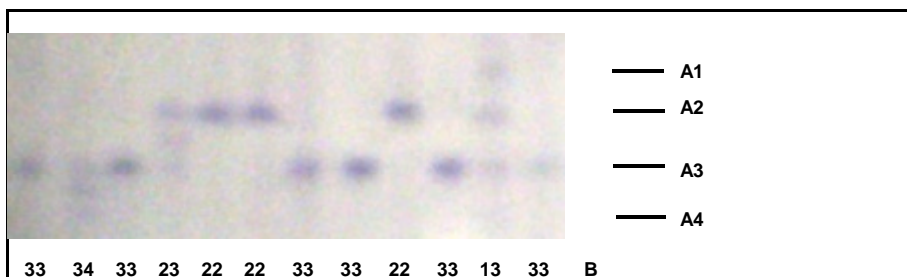
**Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)**



**Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2**

Für das dimere Enzymsystem FDH liegt bei Eiche noch keine Vererbungsanalyse vor. Die Untersuchungen des ASP Teisendorf zeigten gute Enzymaktivität bei Verwendung von Knospen und Keimspitzen der Eicheln. Bei Verwendung von Wurzelspitzen ist keine Enzymaktivität feststellbar. Das System zeigt klare Muster in einer Zone. Es wird angenommen, dass diese Zone durch einen Genort kontrolliert wird (FDH-A), wobei bei homozygoten Genotypen Einfachbanden, bei heterozygoten Dreifachbanden auftreten. An diesem Genort wurden bislang vier Allele nachgewiesen. Das Allel A3 tritt mit Häufigkeiten von ca. 60 %, das Allel A2 mit ca. 37 % auf. A1 und A4 sind selten (0 – 5 %).

**Zymogramm der Formiatdehydrogenase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)**

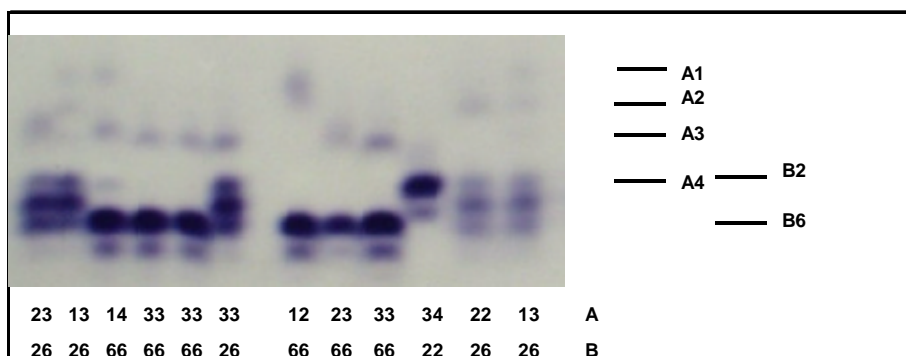


### Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42

IDH wird bei Eiche von zwei Genorten kontrolliert. Gute Ergebnisse werden sowohl in der A-, als auch in der B-Zone mit Knospenmaterial erzielt. Werden Samen untersucht (Keim- oder Wurzelspitzen), ist die A-Zone für eine Interpretation zu schwach angefärbt. Die B-Zone zeigt eine gute Enzymaktivität, wobei die Banden, je nach Frische des Samenmaterials mehr oder weniger weniger scharf sind. Sowohl in der A-, als auch in der B-Zone bilden homozygote Genotypen Einfachbanden, heterozygote Dreifachbanden (dimeres System).

In der A-Zone ist ein Majorpolymorphismus mit fünf Allelen zu beobachten, wobei das Allel A4 am häufigsten ist. Für die B-Zone sind sechs Enzymvarianten beschrieben. Auch hier wird ein Majorpolymorphismus beobachtet, wobei zwei Allele dominieren. Diese wurden von uns mit B2 und B6 bezeichnet. Die Nomenklatur dieser häufigsten Allele ist aber je nach Literaturquelle unterschiedlich. Alle anderen Varianten treten in weitaus geringeren Häufigkeiten auf.

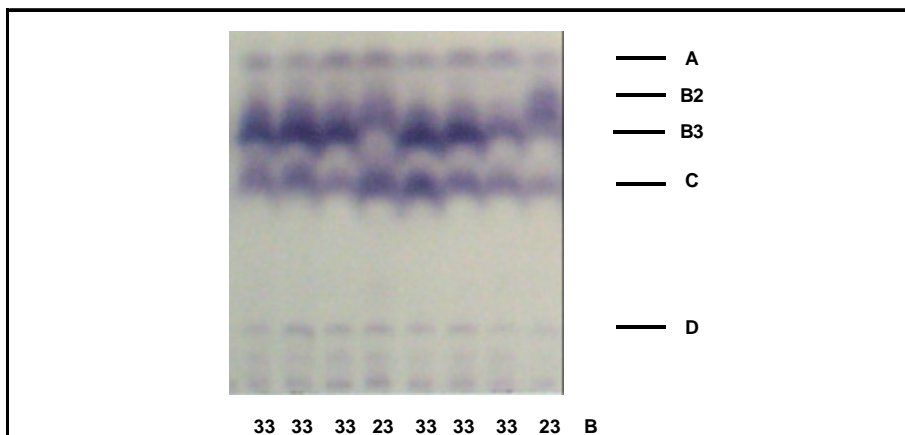
### Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)



### Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37

Das Enzymsystem MDH wird bei Eiche von vier Genorten kontrolliert. An allen Genorten wurde vergleichsweise wenig Variation beobachtet. Die Muster waren bei unseren Untersuchungen nur bei Knospenmaterial deutlich und ohne Schwierigkeiten zu interpretieren. Variation wurde ausschliesslich bei MDH-B beobachtet, wobei B3 sehr häufig war (> 90 %). Bei Samen (Keimspitzen oder Wurzelspitzen) war die Trennqualität nicht zufriedenstellend.

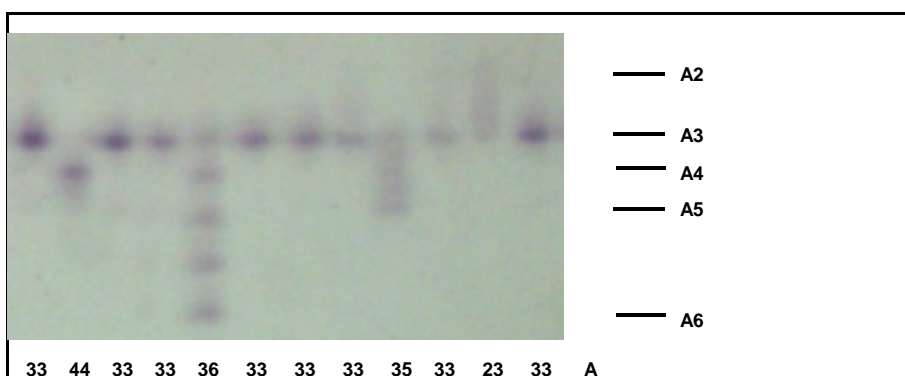
### Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)



### Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2

Das tetramere Enzymsystem MNR wird von einem Genort mit 7 Allelen kontrolliert. Mit Abstand am häufigsten ist das von uns als A3 bezeichnete Allel zu finden (80 – 90 %) (in anderen Literaturquellen auch als A4 bezeichnet). In deutlich geringeren Häufigkeiten treten A4, A5 und A6 auf (bis ca. 10 %), während A1 und A2 noch seltener sind. Bei heterozygoten Genotypen erhält man die typischen Bandenmuster eines tetrameren Enzymsystems.

### Zymogramm der Menadionreduktase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)



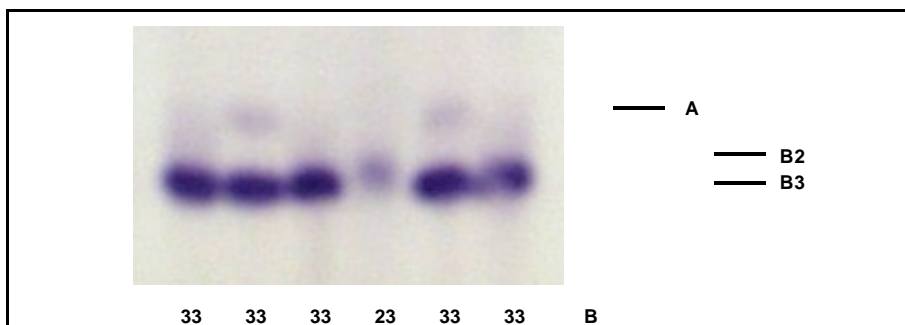


### 6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44

Das dimere System 6-PGDH wird von zwei Genorten kontrolliert, von denen nur der Genort 6-PGDH-B zur Auswertung kommt. In der A-Zone ist die Anfärbung fast immer viel zu schwach und diffus.

Laut Literatur wurden an dem Genort 6-PGDH-B bislang 6 Allele nachgewiesen. Das Allel B3 kommt mit Abstand am häufigsten vor. Viele Populationen sind auf dieses Allel fixiert. In dem von uns bearbeiteten Probenmaterial wurde neben B3 nur noch das Allel B2 gefunden, allerdings sehr selten.

### Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)

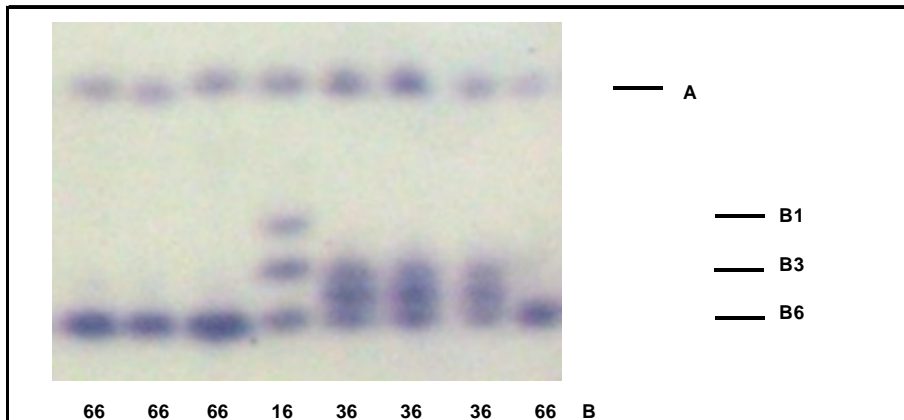


### Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Von den beiden Genorten, die das dimere Enzymsystem PGI kontrollieren, zeigt PGI-A keine sicher auswertbare Variation (unzureichende Trennung und Schärfe der Banden). Dafür zeigt PGI-B einen hochvariablen Polymorphismus, an welchem nach Literaturangaben bislang acht Allelvarianten nachgewiesen wurden.

Am häufigsten ist das Allel B6, welches in bestimmten Populationen sogar Anteile von über 90 % erreicht. Schwierig ist die Unterscheidung der Allele B2 und B3 bzw. B7 und B8. Diese Allele liegen sehr nahe beieinander und eine sichere Bestimmung ist nur bei optimaler Methode und entsprechendem Standard ausreichend sicher. Im Zweifelsfall sollten diese Varianten zusammengefasst werden.

**Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)**

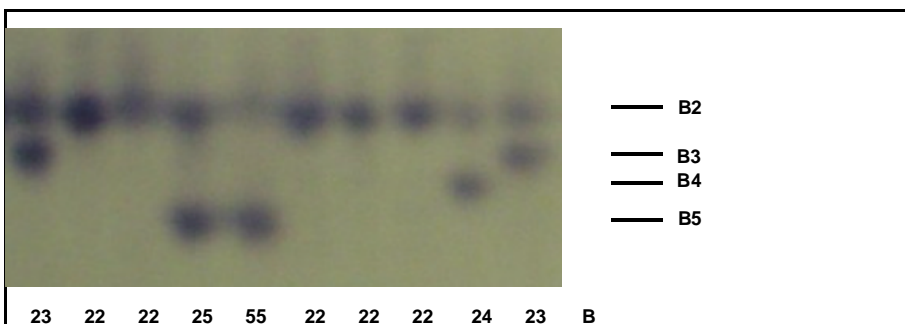


**Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1**

Das monomere Enzymsystem PGM wird bei Eiche von zwei Genorten kontrolliert. Die Anfärbung bei PGM-A ist meist schwach, die Banden diffus. Deshalb wurde dieser Genort von uns nicht ausgewertet. Die Variation bei PGM-B ist deutlich und zeigt Einfachbanden bei homozygoten und Doppelbanden bei heterozygoten Genotypen. Laut unseren Untersuchungen ist von den fünf Allelen nur das Allel B1 als sehr selten zu bezeichnen. Alle anderen Allele kommen mit Häufigkeiten von mindestens 5 % vor. Die Allele B2 und B3 erreichen Häufigkeiten von ca. 30 bis 60 %. Es kann somit von einem Majorpolymorphismus gesprochen werden.

In einigen Arbeiten wird nur der Genort PGM-A erwähnt bzw. ausgewertet. Gemeint ist dabei fast immer der Genort PGM-B. Die Variation entspricht genau der von uns bei PGM-B festgestellten.

**Zymogramm der Phosphoglucomutase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)**



### Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25

Bei diesem monomeren System wird bei den beiden Eichenarten ein Genort ausgewertet. An dem als SKDH-A bezeichneten Genort wurde ein deutlicher Minorpolymorphismus beobachtet. Die als A3 bezeichnete Variante ist in allen Populationen sehr häufig, u. U. bis zur Fixierung auf diesem Allel. Mit Anteilen unter 5 % traten in unserem Probenmaterial noch die Allele A2 und A4 auf.

Wie bei vielen anderen Baumarten wird auch bei Stiel- und Traubeneiche die Interpretation der Muster von störenden Nebenbanden erschwert, die in Abhängigkeit vom ontogenetischem Stadium des Probenmaterials und dem Frischezustand mehr oder weniger stark ausgeprägt sein können

### Zymogramm der Shikimatdehydrogenase bei Stiel- und Traubeneiche (*Q. robur* ; *Q. petraea*)

