

**Isoenzymuntersuchungen bei Esche (*Fraxinus excelsior* L.)**  
**- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -**

**zusammengestellt von**

**MONIKA KONNERT**

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

unter Mitwirkung von

**J. Schmidt\*\*, M. Fromm\*, E. Hussendörfer\*\*, A. Dounavi \*\*, R. Haas\*\*, Ch.  
Lehrmann\*\*, Th. Wimmer\*,**

\*ASP Teisendorf, \*\* FVA Freiburg

Die folgende Zusammenfassung der Labormethoden für biochemisch-genetische Untersuchungen an Esche (*Fraxinus excelsior* L.) basiert auf den Arbeiten, die am Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht in Teisendorf und an der Forstlichen Versuchsanstalt Baden-Württemberg in Freiburg durchgeführt wurden.

Soweit uns bekannt, sind bislang bei Esche noch keine Vererbungsanalysen durchgeführt worden. Die Ergebnisse in dieser Arbeitsanleitung stützen sich auf die Untersuchung von ca. 300 Einzelbäumen (darunter 3 Klonsammlungen in Samenplantagen), die Untersuchung von 300 Embryonen von 10 verschiedenen Mutterbäumen sowie von Embryonen aus ca. 1000 Samen. Die Untersuchungen der Embryonen von den 10 Einzelbäumen bestätigten die von uns aufgestellten Hypothesen zur genetischen Interpretation der Zymogramme, wenngleich darauf hingewiesen werden muss, dass das Untersuchungsmaterial relativ gering war (ca. 20-25 Samen je Baum) und nur einen geringen Teil der angeführten Genvarianten enthielt. Somit können die Allel- und Genortbezeichnungen nur vorläufigen Charakter haben. Die Häufigkeitsangaben beziehen sich ausschliesslich auf das an der FVA bzw. dem ASP untersuchte Probenmaterial. Da bei der Untersuchung von weiteren Populationen wahrscheinlich noch andere Allele auftreten werden, wurden die Allelbezeichnungen so gewählt, dass eine Umbenennung möglichst vermieden werden kann.

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 an Esche untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende Genorte.

<i>Enzym und Nomenklatur</i>	<i>Genort</i>	<i>Struktur</i>	<i>Häufige Allele</i>	<i>Trenn-System</i>
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	A <sub>1</sub> B <sub>3</sub> C <sub>2</sub> ,C <sub>4</sub>	Poulik
Alkoholdehydrogenase (ADH) E.C.1.1.1.1	ADH-A ADH-B	Dimer	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> ,B <sub>5</sub>	Ashton
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-A FEST-B	Dimer	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	Ashton
Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2	FDH-A	Dimer	A <sub>3</sub>	Ashton
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A	Dimer	A <sub>2</sub>	Tris-Citro
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	A <sub>2</sub> ,A <sub>5</sub> B <sub>2</sub>	Ashton
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C	Dimer	A <sub>3</sub>	Tris-Citro
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MNR-A	Tetramer	A <sub>2</sub>	Poulik
NADH-dehydrogenase (NADH) E.C.1.6.99.3	NADH-A NADH-B	Monomer	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub>	Tris-Citro
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PDGH-A	Dimer	A <sub>3</sub>	Tris-Citro
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-A	Dimer	A <sub>3</sub>	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B	Monomer	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> ,B <sub>4</sub>	Poulik o. Tris-Citro

## Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Im Vorfeld wurden verschiedene Gewebe der Esche auf ihre Eignung für die Analyse von Isoenzymen getestet. Es stellte sich heraus, dass **Kambium** am besten geeignet ist. Ebenfalls problemlos lassen sich die Enzymextrakte aus Embryogewebe extrahieren. Knospen sind dagegen nicht für Isoenzymuntersuchungen geeignet.

Für die Isolierung von **Kambium** werden die Endstückchen von ein- oder zweijährigen Zweigen ungefähr 0,5 cm unterhalb der Endknospe abgeschnitten. Die Endknospe wird abgeschnitten und von dem übriggebliebenen ca. 0,5 cm großen Zweigstück wird die Borke

mit einem Skalpell abgeschält. (**Anmerkung:** Einfacher ist es, wenn man ein ca. 5 cm langes Zweigende abschneidet, die Endknospe entfernt und die letzten 0,5 cm des Zweiges schält.) Anschließend werden 6-8 Gewebestückchen (Größe ca. 3 x 3 mm) möglichst dünn von dem direkt unter der Borke liegenden Gewebe (Teile der Rinde und des Kambiums) abgeschält und sofort in den vorbereiteten Homogenatpuffer pH 7,5 (ca. 85 µl) gegeben. Mit einem Glasstab werden die Gewebestückchen so gut wie möglich mit mäßigem Druck und kreisenden Bewegungen zerkleinert.

Der Embryo kann aus frischen oder stratifizierten Samen untersucht werden. Bei stratifizierten Samen ist der Embryo größer und ergibt so mehr Probenmaterial. Zur Stratifikation werden die Samen 8–12 Wochen in einer Sandmischung eingelagert, die ständig feucht gehalten wird. Die Temperatur muss bei +15 °C liegen. In dieser Phase wächst der Embryo weiter und reift aus. Danach können die Samen untersucht oder bei –30 °C eingelagert werden. Es können aber auch frisch geerntete Samen oder Samen, die ohne Stratifikation eingelagert wurden, untersucht werden. Vor der Entnahme der Eschenembryonen sollten die Samen 24 h in Wasser eingeweicht werden.

Für die Präparation des **Embryos** wird der stratifizierte Same in Längsrichtung mit einem Skalpell aufgeschnitten. Der sich weiß absetzende Embryo kann mit einer Pinzette aus dem umgebenden Nährgewebe herauspräpariert werden. Um eine Austrocknung des Gewebes und eine Oxidation der Enzyme zu vermeiden, wird der Embryo sofort in 70–75 µl vorbereiteten Homogenatpuffer homogenisiert.

### **Zusammensetzung des Homogenatpuffers (*Extraction buffers*)**

***Puffer I: Tris/HCl pH 8,0*** (nach HERTEL Waldsieversdorf, pers. Mitteilung)

Lösung I      40 g Saccharose in 200 ml H<sub>2</sub>O dest.

Lösung II     6 g TRIS in 100 ml H<sub>2</sub>O 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 nur 4 Tage lang verwendet und muss dann 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 (0,07 M) 30 µl  
eine Spatelspitze Poyclar AT je Probe

Dieser Puffer sollte nur bei sehr frischem Material verwendet werden.

***Puffer 3: Tris/HCl 0,1 M pH 7,5***

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

β-Mercaptoethanol	(0,7 %)	0,7 ml (zum Schluss zugeben)
Ascorbinsäure	(6mM)	0,106 g
Saccharose	(0,5M)	17,165 g
Cystein-HCl	(6mM)	0,105g
Tween 80	(1 %)	1ml
PVP	(8 %)	8 g
NAD	(0,4mM)	0,029 g
Bovine Albumin	(0,1 %)	0,1 g
Dithiothreidol DTT	(1 mM)	0,015 g
EDTA	(0,5 mM)	0,015 g
Tergitol 15-S-9	(1 %)	1 m

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

### a) Rezepturen ASP Teisendorf

#### Biomol-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer			Gelzusammensetzung			Spannung	Laufzeit
*								
<b>Ashton</b>	pH 8,1	300 ml	(10 % EP)	35,0 g Stärke	5,0 g Sacch.		100 mA	5 h
**								
<b>Poulik</b>	pH 8,1	300 ml	(3 % EP)	33,0 g Stärke	11,0 g Sacch.		125 mA	5 h
**								
<b>Tris-Citro</b>	pH 7,5	300 ml	(1:6,5 dest. H <sub>2</sub> O)	33,0 g Stärke	4,0 g Sacch.		130 mA	5 h
				6,0 g Urea	200,0 mg EDTA			
*Glasplatte 27x11,5 cm								
**Glasplatte 27x10 cm								

#### Gerbu-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer			Gelzusammensetzung			Spannung	Laufzeit
*								
<b>Ashton</b>	pH 8,1	300 ml	(10 % EP)	27,0 g Stärke	3,0 g Sacch.		110 mA	4 h
**								
<b>Poulik</b>	pH 8,1	300 ml	(3 % EP)	27,0 g Stärke	3,0 g Sacch.		110 mA	4 h
**								
<b>Tris-Citro</b>	pH 7,5	300 ml	(1:6,5 dest. H <sub>2</sub> O)	30,0 g Stärke			150 mA	4 h
*Glasplatte 27x11,5 cm								
**Glasplatte 27x10 cm								

### Gelschnitte (*gel slabs*) (ASP Teisendorf)

	unten	mitte	oben	
	o	o	o	
<b>Ashton</b>	LAP	PGM	FEST	
	+	-	+	
<b>Poulik</b>	AAT	PGI	FDH	
	o	o	o	o
<b>Tris-Citro</b>	IDH	6-P	MDH	ADH
		MNR		
Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick				

## b) Rezepturen FVA Freiburg (Biomol-Stärke)

<u>Puffersystem und Gelkonzentration</u>	<u>Einwaage</u>	<u>untere Schicht</u>	<u>mittlere Schicht</u>	<u>obere Schicht</u>	<u>Stromstärke [mA]</u>	<u>Zeit [h]</u>
T.C. pH 7,5; 11,5%	25.3g Stärke 1.9g Harnstoff 220ml Puffer		DIA	PGM	190 mA	5,5h
T.C. Histidin; 11,5%	25.3g Stärke 4.4g Zucker 220ml Puffer	1	IDH	ADH	210 mA	6,5 h
T.C. Histidin; 11,5% (dreischichtiges Gel in zwei Schichten schneiden)	25.3g Stärke 4.4g Zucker 220ml Puffer	6 PGDH	NDH dicke Schicht		210 mA	6,5 h
T.C. pH 7,8; 12,5%	30.0g Stärke 2.3g Harnstoff 0.04g EDTA 240ml Puffer		LAP dicke Schicht		170 mA	6,0-6,5h
großes Ashton-Gel; 12,5% (dreischichtiges Gel in zwei Schichten schneiden)	52.5g Stärke 8.4g Zucker 420 ml Puffer	PGI	AAT dicke Schicht		90 mA	6,0 h

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

### a) Rezepturen ASP Teisendorf

<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		

## **b) Rezepturen FVA Freiburg**

### **2.1 Puffersystem Tris-Citro pH 7,5**

#### *a) Elektrodenpuffer pH 7,5*

Tris	(140 mmol)	17.0 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	(43 mmol)	9.0 g/l

#### *b) Gelpuffer pH 7,5*

Tris	(40 mmol)	4,9 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	(12,3 mmol)	2,6 g/l

## 2.2 Puffersystem Tris-Citro-Histidin

### a) Elektrodenpuffer pH 7,5

Tris	(140 mmol)	17.0 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	(43 mmol)	9.0 g/l

### b) Gelpuffer pH 6,7

L-Histidin	(50 mmol)	10.5 g/l
Titriplex II	(1.4 mmol)	0.4 g/l
Tris	(510 mmol)	2.0 g/l

## 2.3 Puffersystem Tris-Citro pH 7,8 (nach LEINEMANN 1998)

### a) Elektrodenpuffer pH 7,8

Tris	(148 mmol)	18.0 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	(47 mmol)	mit ca. 10.0 g/l auf den gewünschten pH titrieren.

### b) Gelpuffer pH 7,8

Der Gelpuffer wird durch die Verdünnung des Elektrodenpuffers erhalten. 240 ml Gelpuffer setzen sich aus 70 ml Elektrodenpuffer und 170 ml destilliertem H<sub>2</sub>O zusammen.

## 2.4. Puffersystem Ashton pH 8,1

### a) Elektrodenpuffer pH 8,1

Borsäure	(190 mmol)	11.8 g/l
Lithiumhydroxid	(50 mmol)	1.1 g/l

### b) Gelpuffer pH 8,1

Tris	(50 mmol)	6.1 g/l
Citronensäure * H <sub>2</sub> O	(0.8 mmol)	1.7 g/l

Der zu verwendende Endpuffer besteht zu 90 % aus dem obigen Gelpuffer und zu 10 % aus dem obigen Elektrodenpuffer.

## 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)

Mengenangaben für 27 cm breite Gele (ca. 50 Proben).

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

#### **Substratlösung:**

Tris-HCl 0,2mol/l pH 8,0	1000 ml
L-Asparaginsäure	5,30 g
alpha-Ketoglutarinsäure	0,70 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

### **Alkoholdehydrogenase (ADH / E.C. 1.1.1.1)**

Tris-HCl 0,2 mol/l pH 8,0	70 ml
NAD-Lösg.	2,5 ml
MTT-Lösg.	2,5 ml
PMS-Lösg.	400 µl
Ethanol	2,5 ml*

\* erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

### **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.1.2.1.1)**

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 7,0	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 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
DL-Isocitronensäure-tri-Na-Salz-Lösg.	4 ml
MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2,5 ml
MTT-Lösg.	2,5 ml
PMS-Lösg.	400 µl

**Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)**

Tris-Maleat 0,05 mol/l pH 5,4	70 ml
Leucin-B-naphthylamid-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-Lös.	4 ml
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2,5 ml
PMS-Lösg.	400 µl

**Menadionreduktase (MNR/E.C.1.6.99.2)**

Tris-HCl 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.	5 ml

**NADH-Dehydrogenase (NADH, E.C. 1.6.99.3)**

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,0	70 ml
MTT-Lösg.	4 ml
NADH	75 mg

**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-Lösg.	3 ml
MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)	2,5 ml
NADP-Lösg.	2,5 ml
MTT-Lösg.	3 ml
PMS-Lösg.	4d0 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.	3 ml
MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)	2,5 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2,5 ml
PMS-Lösg.	400 µl
Glucose-6-phosphat-dehydrogenase	20 µl*

\* erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

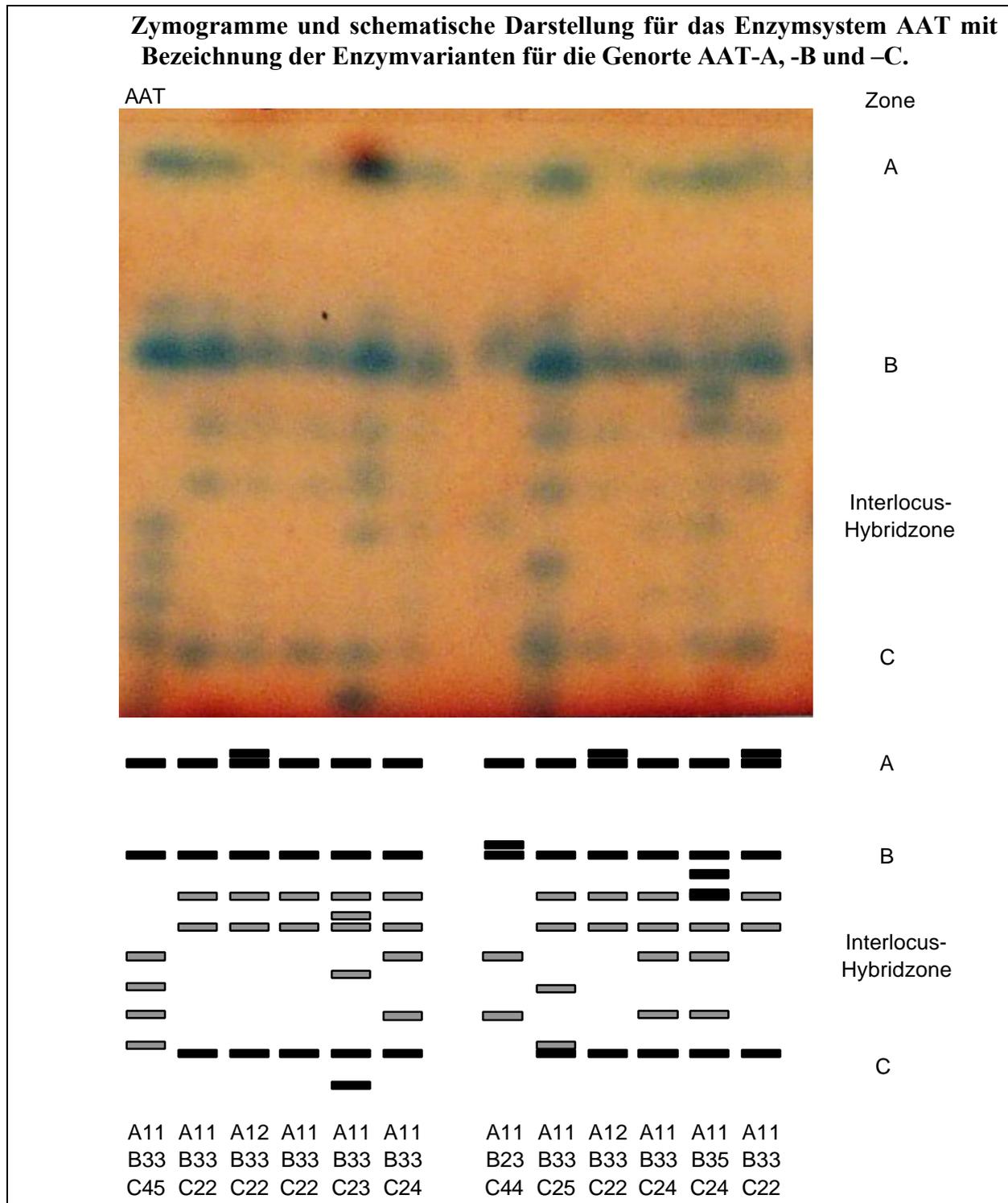
**Phosphoglucomutase (PGM / E.C. 2.7.5.1)**

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
D-Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz	100 mg
MgCl <sub>2</sub> -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2,5 ml
MTT-Lösg.	2,5 ml
PMS-Lösg.	400 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

\* erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

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

Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C. 2.6.1.1



Das System AAT (GOT) wird bei Esche von drei Genorten kontrolliert, wobei die A-Zone in den Samen meist nur sehr schwach anfärbt und nicht regelmäßig ausgewertet werden konnte.

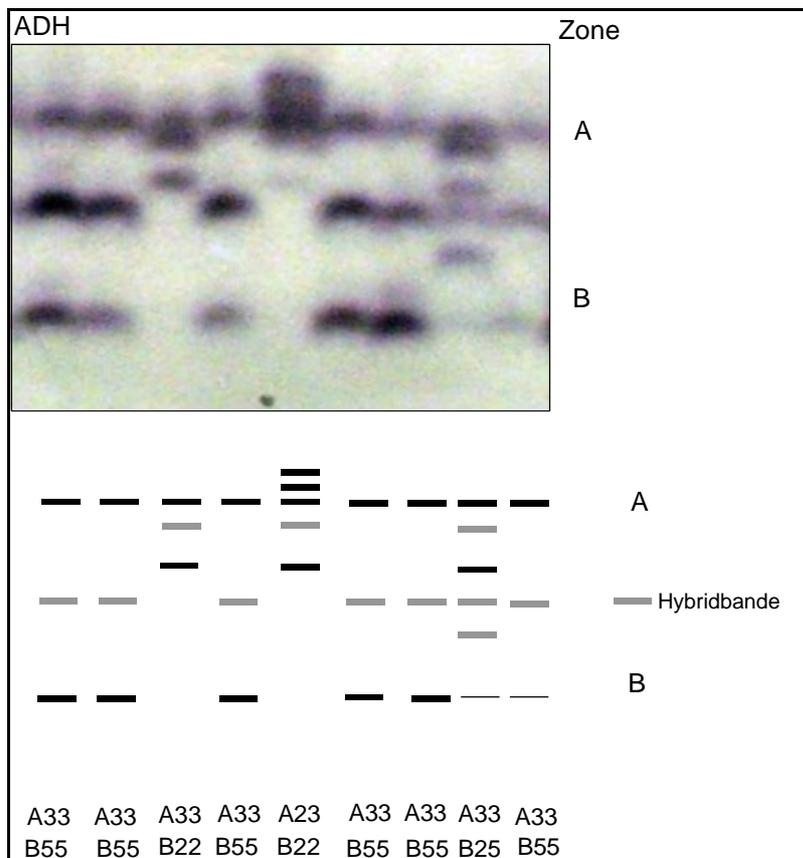
Die Interpretation der Allele der C-Zone wird teilweise erst durch Interlocus- bzw. Intralocushybridbanden (zwischen B- und C-Zone) möglich, da die Varianten C3, C4 und C5 positive Ladungen aufweisen und zum Minuspol migrieren. Während bei der Variante C3 in Kombination mit C2 noch ein Intralocushybridband zu sehen ist, sind die Varianten C4 und C5 nur über Interlocushybridbanden zu erkennen.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

AAT-B2 – 2 – 6 %	AAT-C2 – 60-75 %
AAT-B3 – 90-97 %	AAT-C3 – ca. 19 %
AAT-B5 – 1 – 3 %	AAT-C4 – 30-35 %
	AAT-C5 – 2 – 4 %

### Alkoholdehydrogenase (ADH) E.C. 1.1.1.1

**Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem ADH mit Bezeichnung der Enzymvarianten für die Genorte ADH-A und ADH-B**

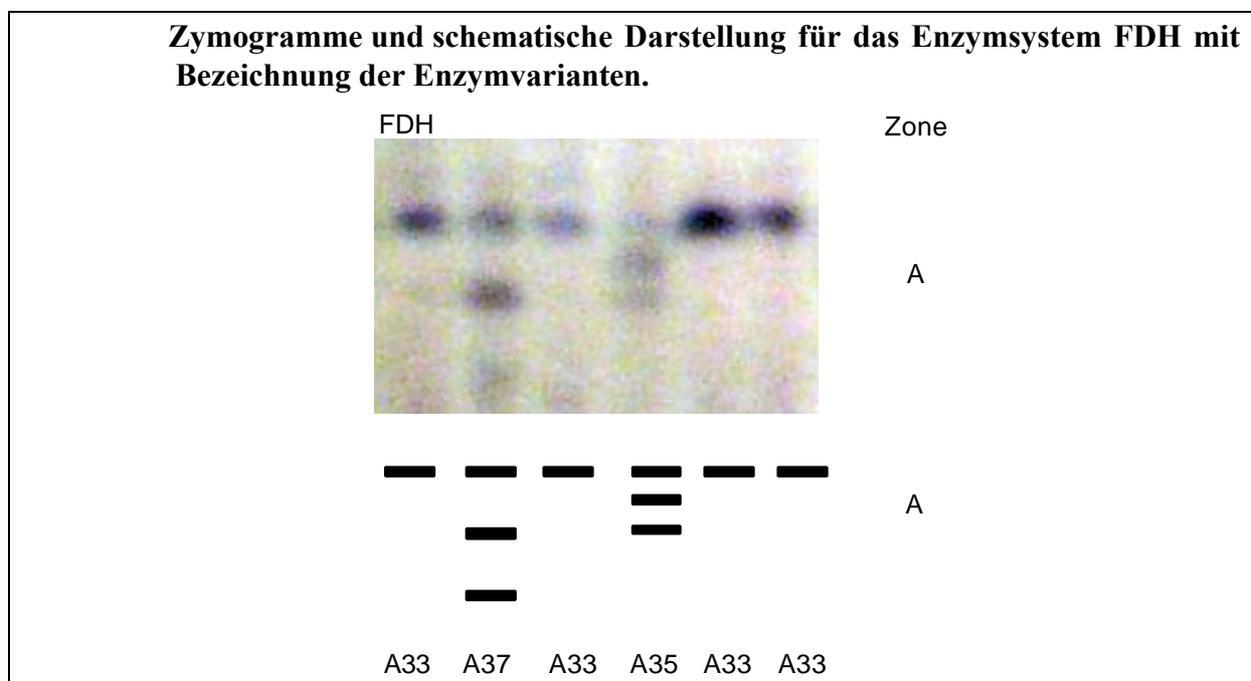


Das dimere Enzymsystem ADH wird von zwei Genorten kontrolliert, deren Genvarianten teilweise überlappen. In der A-Zone wurden bislang drei Varianten gefunden, die häufigste

wurde mit A3 bezeichnet. In der B-Zone gibt es vier Varianten. Hier wurde die häufigste mit B5 bezeichnet. Die relativ seltene Variante B1 liegt auf der Höhe von A3, so dass der Genotyp A33/B55 von A33/B15 nur an der Intensität der B5 entsprechenden Bande zu erkennen ist. Die Untersuchungen zeigten aber, dass dies problemlos möglich ist.

Am Genort B wurden bislang vier Varianten gefunden. Das System bildet Inter- und Intralocushybride, über deren Lage die einzelnen Genvarianten noch sicherer nachgewiesen werden können.

### Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.1



Die Anfärbung der Gele auf das dimere Enzymsystem FDH zeigt eine relativ schwache Intensität, die Zymogramme sind aber ohne Probleme auswertbar. Variation wurde nur in einer Zone festgestellt, für die bislang drei Enzymvarianten gefunden wurden.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

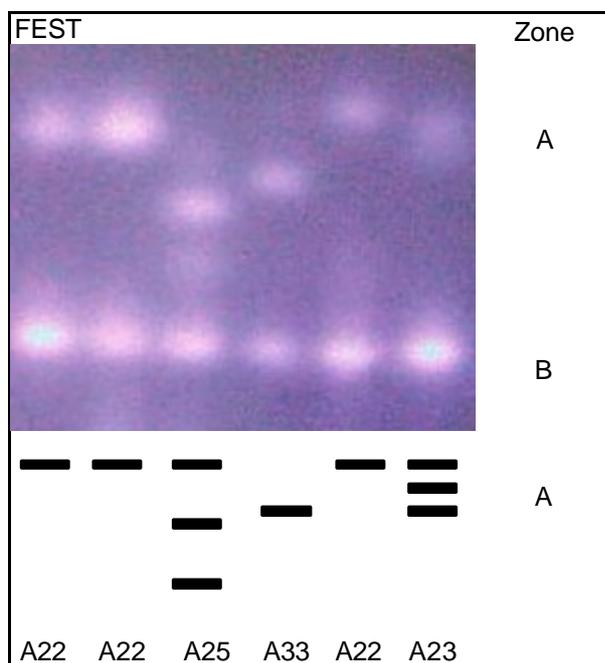
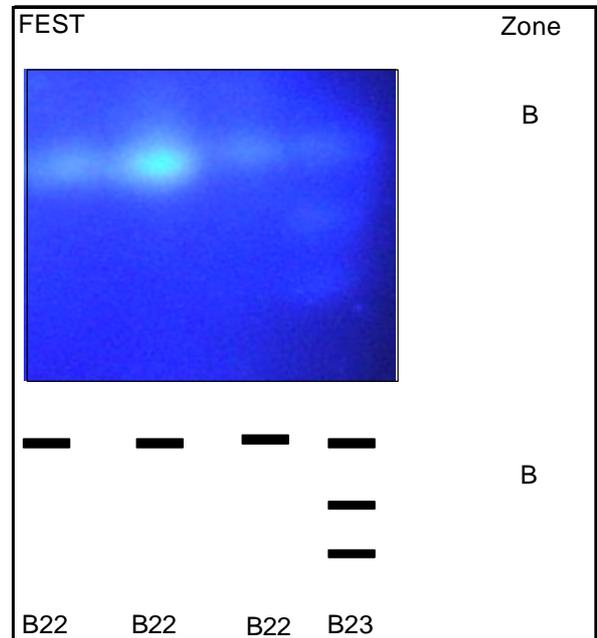
FDH-A3 – 89 – 93 %

FDH-A5 – 0,5 – 10 %

FDH-A7 – 0,5 – 7 %

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

Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem FEST mit Bezeichnung der Enzymvarianten für die Genorte FEST-A und FEST-B



Bei FEST wurde in zwei Zonen voneinander unabhängige Variation beobachtet. Davon ausgehend wurde angenommen, dass mindestens zwei Genorte dieses System kontrollieren. Die A-Zone ist hochvariabel, allerdings sind die Muster oft nicht so deutlich und klar interpretierbar, wie in der Abbildung. Deshalb wurde auf die Auswertung dieser Zone im Rahmen der Identitätssicherung verzichtet. Die B-Zone zeigt wenig Variation; Neben dem

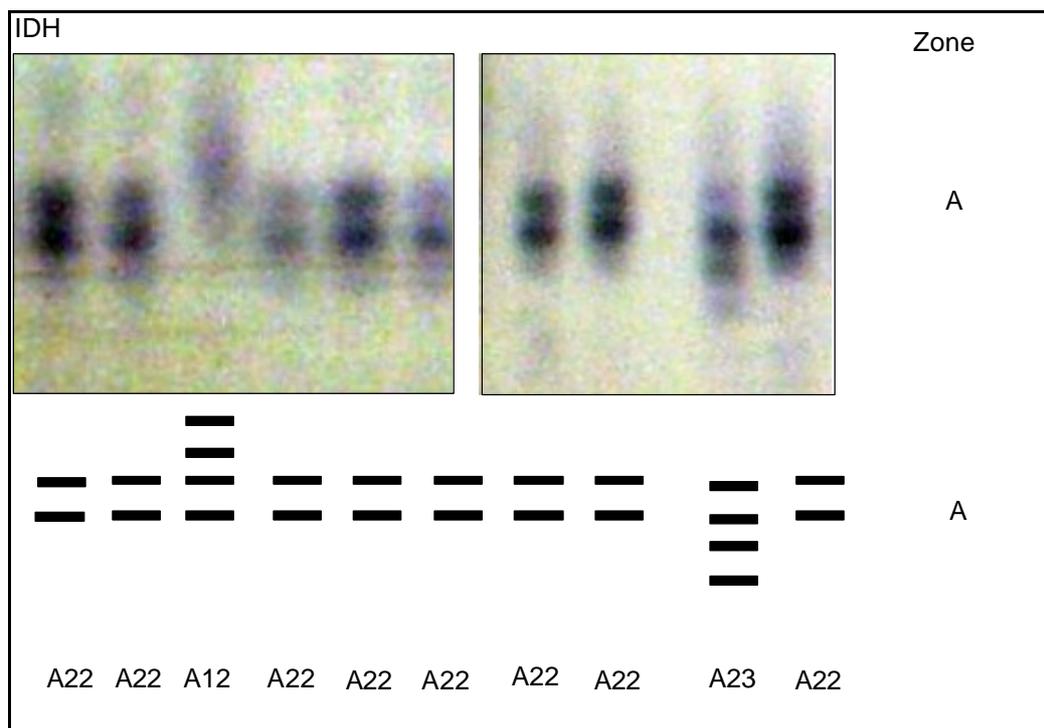
häufigen Allel B2 wurde noch eine schneller wandernde Variante (B1) und eine langsamer wandernde Variante (B3) gefunden, beide aber nur in Häufigkeiten von bis zu 1 %.

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

Bei dem dimeren Enzymsystem IDH färbt bei der Esche ein Genort mit drei Allelvarianten an. Bei homozygoten Genotypen liegt vor und hinter der intensiv gefärbten Hauptbande jeweils eine weitere, weniger intensiv gefärbte Begleitbande. Bei heterozygoten Genotypen sind Mehrfachbanden zu sehen (meist 4 Banden).

Insgesamt konnten in dem Untersuchungsmaterial vier Varianten nachgewiesen werden, wobei die Varianten A3 und A4 nur schwer auseinander zuhalten sind. A4 scheint sehr selten zu sein. Bei den über 1500 untersuchten Proben ist es nur einmal aufgetreten.

### Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem IDH mit Bezeichnung der Enzymvarianten für den Genort IDH-A



Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

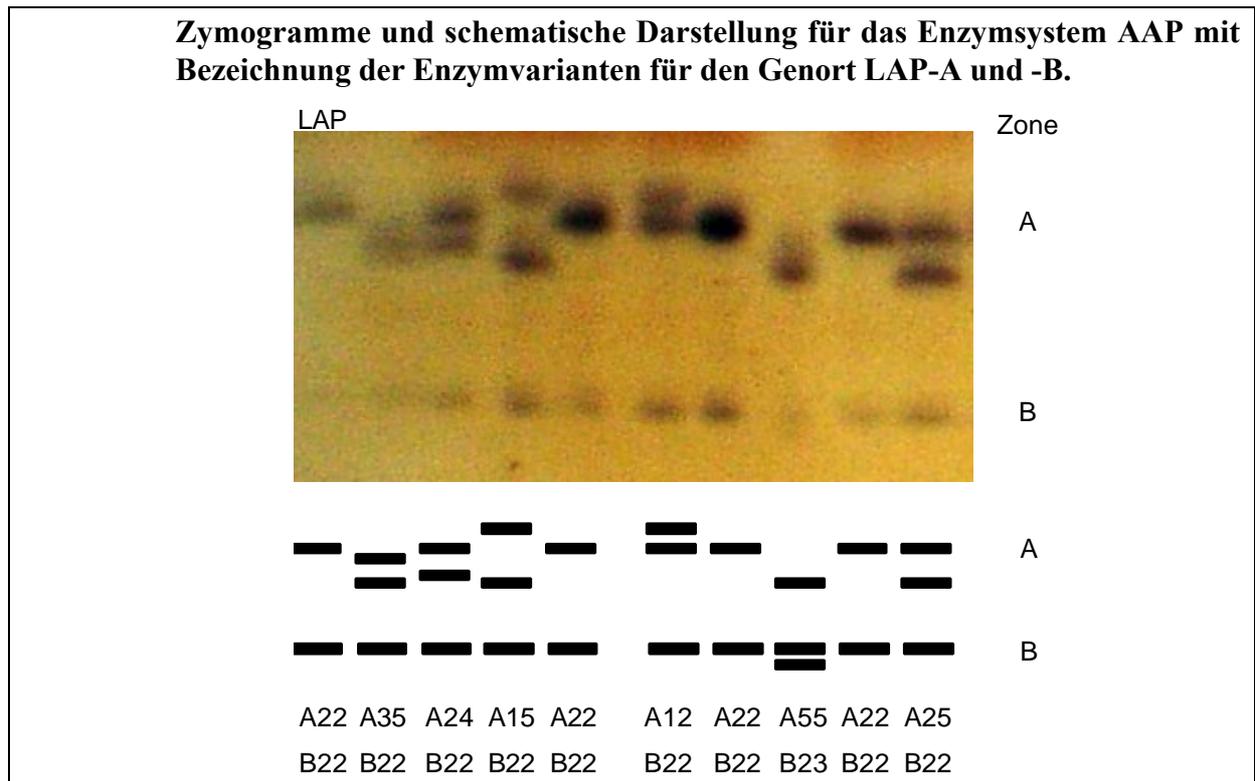
IDH-A1 – 1 – 2 %

IDH-A2 – 95-98 %

IDH-A3 – 2 – 3 %



## Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1



Das monomere Enzymsystem LAP zeigt bei Esche zwei Aktivitätszonen, von denen die Zone B schwächer anfärbt und wenig Variation zeigt. Bei älteren Proben ist die Auswertung dieser Zone aufgrund zu schwacher Anfärbung nicht konsistent möglich. Dort wo Auswertung möglich war, lag die als B2 bezeichnete Genvariante bei über 95 %.

In der A-Zone wurden 5 Genvarianten beobachtet, deren Auswertung keine Schwierigkeiten bereitet.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten in der A-Zone.:

AAP-A1 – 2 – 5 %

AAP-A2 – 54-65 %

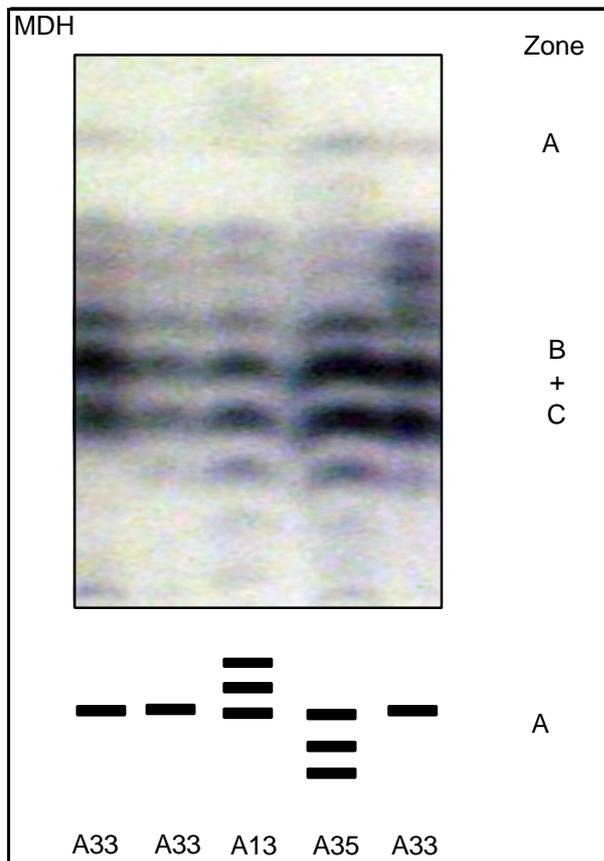
AAP-A3 – 1 – 2 %

AAP-A4 – 5 – 8 %

AAP-A5 – 25 – 35 %

## Malatdehydrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37

Bei dem dimeren Enzym MDH erscheinen sehr komplexe Muster, deren Interpretation weitere genetische Analysen erfordert. Dabei sind zwei klar voneinander getrennte Zonen zu erkennen: die Zone A, die schwächer anfärbt, deren Muster aber als Einfachbanden bei



**Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem MDH mit Bezeichnung der Enzymvarianten für den Genort MDH-A**

homozygoten und Dreifachbanden bei Heterozygoten leicht interpretierbar sind. In dieser Zone wurden bislang 4 Varianten gefunden.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten in der A-Zone.:

MDH-A1	1 – 2 %
MDH-A2	2 – 4 %
MDH-A3	94 – 96 %
MDH-A4	0 – 2 %

In der zweiten Zone, die wahrscheinlich von 2 oder sogar 3 Genorten kontrolliert wird, zeigen die Zymogramme eine Vielzahl von Banden. Es wird angenommen, dass diese auf die Bildung von Inter- und Intralocushybriden zurückgehen, wie dies bei MDH auch bei anderen

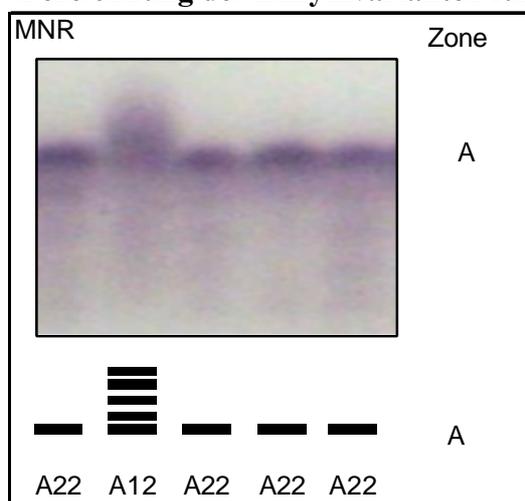
Baumarten der Fall ist. Eine genetische Interpretation steht aber noch aus. Versucht wurde lediglich ein Vergleich der Muster bei Saatgut- bzw. Pflanzgutproben aus derselben Erntepartie, indem jedem Muster ein bestimmter Code zugeordnet wurde.

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

Nach Anfärbung auf das tetramere Enzymsystem MNR wird eine Zone sichtbar, für die bislang nur sehr geringe Variation gefunden wurde. Neben dem häufigen Allel A2 wurde in drei Fällen noch ein schneller wanderndes Allel, A1, gefunden. Der heterozygote Genotyp A12 zeigt sich als eine breit angefärbte Zone. Die fünf Banden, die man bei einem tetrameren Enzym wie der MNR erwartet, sind nicht klar zu trennen.

**Vorsicht:** Sind die Proben nicht ganz frisch, so zeigen sich oft unscharfe, schlierige Bandenmuster, die denen des Genotyps A12 sehr ähnlich sind, was zu Falschinterpretationen führen kann (vgl. auch 6-PGDH und PGI).

### **Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem MNR mit Bezeichnung der Enzymvarianten für den Genort MNR-A**

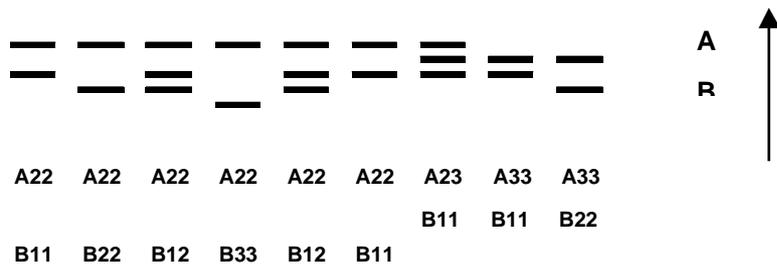


### NADH-Dehydrogenase (NADH) E.C. 1.6.99.3

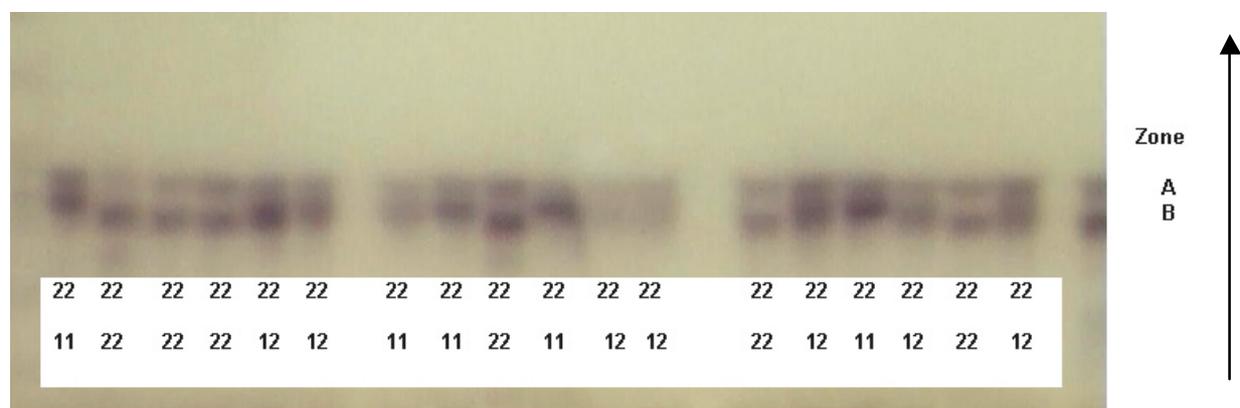
NADH zeigt bei der Esche zwei Aktivitätszonen. Diese beiden Aktivitätszonen liegen so dicht beieinander, dass sie sich zum Teil überlagern. Heterozygote Individuen zeigen Mehrfachbanden. Wegen der geringen Auftrennung erwecken diese oft den Eindruck von Doppelbanden oder von einer diffus gefärbten Zone. Sie sind aber deutlich breiter als Einzelbanden.

In der A-Zone waren 2 Varianten zu beobachten, die Allele 2 und 3, wobei das Allel 3 nur sehr selten war. In der B-Zone waren drei Varianten zu beobachten, die Allele 1, 2 und 3. Die Allele 1 und 2 zeigten Häufigkeiten über 40%, das Allel 3 trat hingegen nur sehr selten auf.

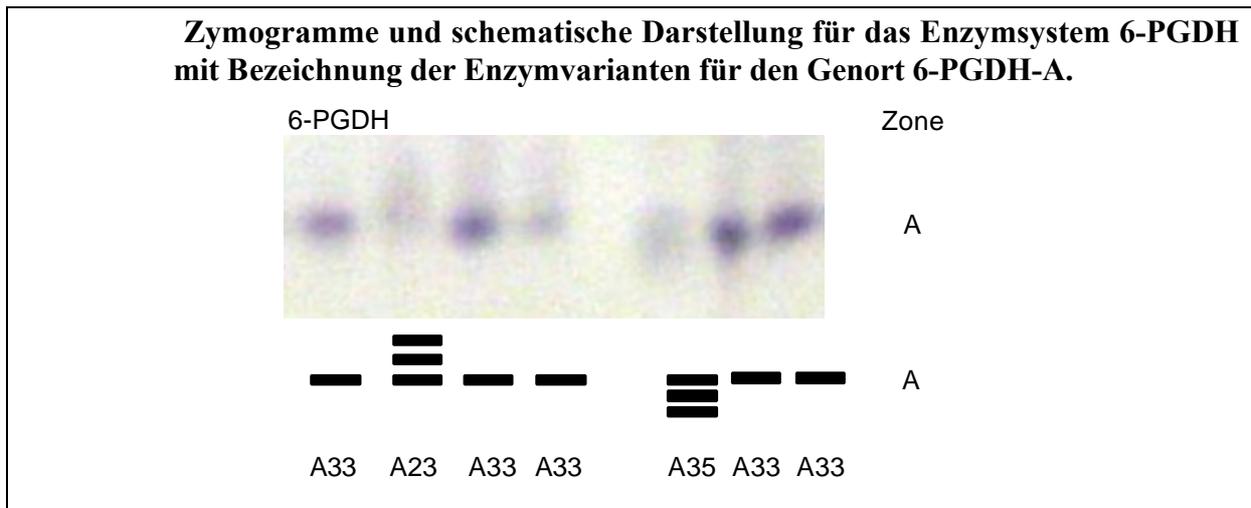
**Schemazeichnung eines Zymogramms des Enzymsystems NADH-Dehydrogenase. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an.**



### Zymogramme des Enzymsystems NADH-Dehydrogenase bei Esche



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



Bei Anfärbung auf das dimere Enzym 6-PGDH zeigt sich bei der Esche nur eine variable Zone. Homozygote Individuen zeigen Einfachbanden, heterozygote Dreifachbanden, wie es bei einem dimeren Enzym zu erwarten ist. Am Genort 6-PGDH-A wurden bislang 4 Varianten beobachtet. Die Allele 4 (nicht abgebildet) und A5 sind nur schwer auseinander zu halten, vor allem wenn die Genotypen 34 bzw. 35 nicht auf demselben Gel sind. Falls keine geeigneten Standards zur Verfügung stehen, wird empfohlen die beiden Genvarianten zusammenzufassen.

**Vorsicht:** Sind die Proben nicht ganz frisch, so zeigen sich oft unscharfe, schmierige Bandenmuster, die denen des Genotyps A23 sehr ähneln, was zu Falschinterpretationen führen kann.

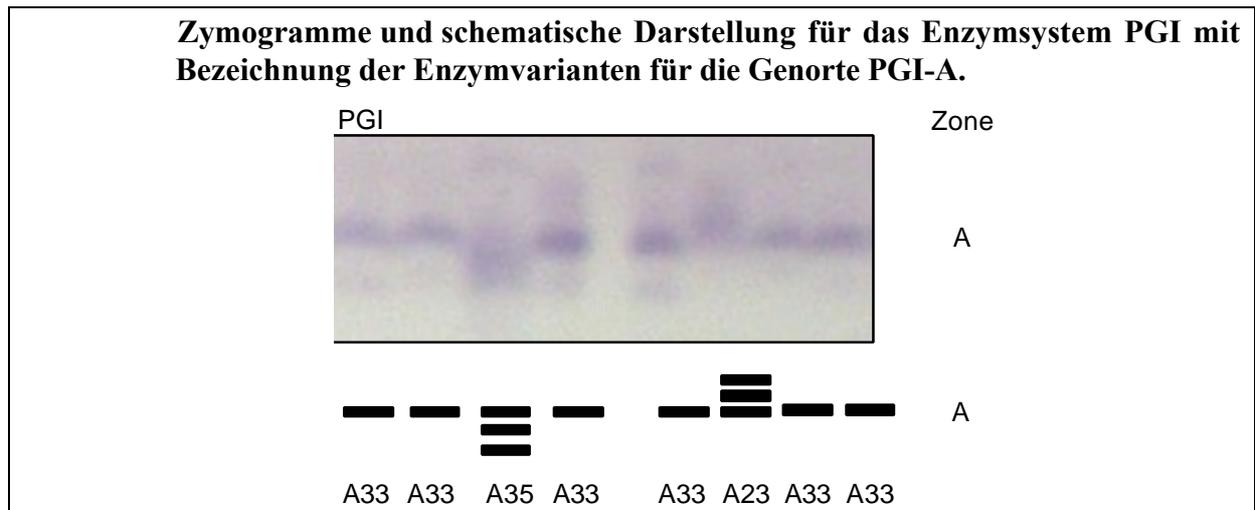
Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

6-PGDH-A2 – 0 – 3 %

6-PGDH-A3 – 93 – 99 %

6-PGDH-A5 – 0 – 4 %

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



Bei der Esche wird das dimere Enzymsystem PGI durch einen Genort kontrolliert. An diesem Genort wurden in dem Untersuchungsmaterial fünf Varianten nachgewiesen. Die Variante A4 (nicht in der Abbildung) befindet sich nur knapp unter der Variante A3 und ist von dieser schwer zu unterscheiden.

**Vorsicht:** Sind die Proben nicht ganz frisch, so zeigen sich oft unscharfe, schlierige Bandenmuster, die denen des Genotyps A23 sehr ähneln, was zu Falschinterpretationen führen kann (ähnlich wie bei 6-PGDH).

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGI-A1 – ca. 1 %

PGI-A2 – 7 – 10 %

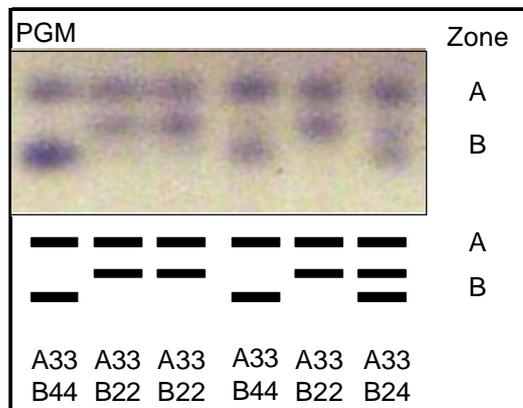
PGI-A3 – 89 – 90 %

PGI-A4 – ca. 1 %

PGI-A5 – ca. 1%

## Phosphoglucomutase (PGM) E.C. 2.7.5.1

### Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem PGM mit Bezeichnung der Enzymvarianten für die Genorte PGM-A und PGM-B



Für die Esche werden nach Anfärbung auf das monomere Enzymsystem PGM zwei Genorte sichtbar: der wenig variable Genort PGM-A und der Genort PGM-B, mit zwei häufigen Varianten. Die beiden Aktivitätszonen liegen so dicht beieinander, dass sie sich teilweise überlappen. Deshalb sind in der A-Zone nur die häufigste Variante und die schneller wandernden Varianten klar erkennbar. Bei den schneller wandernden wurde bislang nur eine Variante sicher nachgewiesen, die Anwesenheit einer zweiten Variante, die unmittelbar oberhalb der häufigen liegt, wird vermutet, ist aber noch nicht abgesichert.

In der B-Zone wurden zwei häufige Genvarianten gefunden, mit B2 und B4 bezeichnet, und drei sehr seltene: B1, B5 und B6. Auf der Höhe von B1 liegt möglicherweise auch das Allel A4. Demnach wäre A34/B22 (bzw. A34/B44) nicht von A33/B12 bzw. A33/B14 nicht zu trennen. Einem Identitätsnachweis kann der Vergleich der Häufigkeiten von PGM-B2 und PGM-B4 zugrunde liegen.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGI-B2 – 60 –90 %

PGI-B4 – 10 - 40 %