

Isoenzymuntersuchungen bei Lärche (*Larix decidua*)

- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -

zusammengestellt von

MONIKA KONNERT

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

unter Mitwirkung von

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

ASP Teisendorf

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

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

BEHRNDT, M. (1981): Genetische Untersuchungen bei Europäischer Lärche (*Larix Decidua* MILL.) und Japanischer Lärche (*Larix leptolepis* G.). Diplomarbeit der Georg-August-Universität Göttingen. 72 S.

BELETTI, P.; LANTERI, S.; LEOPARDI, S. (1997): Genetic variability among European Larch (*Larix decidua* Mill.) populations in Piemont, North-Western Italy. *Forest Genetics* 4:113 – 121.

LEWANDOWSKI, A.; MEJNARTOWICZ, L. (1990): Inheritance of allozymes in *Larix decidua* Mill. *Silvae Genetica* 39, 5-6, 184-188.

LEWANDOWSKI, A.; MEJNARTOWICZ, L. (1990): Genetic control of Polish Larch (*Larix decidua* subsp. *Polonica* (Racib.) DOMIN) Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37). *Genetica Polonica*, 31, 3-4, 217-221.

LEWANDOWSKI, A.; MEJNARTOWICZ, L. (1991): Linkage analysis of allozyme loci in Polish larch (*Larix decidua* subsp. *Polonica* (Racib.) DOMIN). *Hereditas* 114:107-109.

YING, L.; MORGENSTERN, E.K. (1990): Inheritance and linkage relationships of some isozymes of *Larix laricina* in New Brunswick, Canada. *Silvae Genetica* 39, 245-251.

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

Die Erstellung dieses Laborhandbuches wurde durch das BMBF gefördert.

Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

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

Enzym und Nomenklatur	Genort	Struktur	Anzahl Allele	Häufige Allele	Trenn-System
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	3 3 3	A ₂ B ₂ C ₂	Ashton
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-A* FEST-B	Dimer	? 3	? B ₂	Ashton
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	3 4	A ₂ B ₃	Tris-Citro
Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2	GDH-A	Hexamer	1	A ₂	Poulik
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A	Dimer	4**	A ₃	Tris-Citro
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C MDH-D	Dimer	3 3 3 2	A ₂ B ₂ C ₁ D ₁	Tris-Citro
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PGDH-A 6-PGDH-B	Dimer	2 3	A ₂ B ₂	Tris-Citro
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-A PGI-B	Dimer	2 3	A ₁ B ₂	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A	Monomer	6	A ₃ ,A ₅ ,A ₆	Tris-Citro
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-A* SKDH-B	Monomer	? 5	? B ₂ ,B ₄	Tris-Citro

* Genorte nicht eindeutig auswertbar; ** aus Literaturangaben

Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Proben von Knospengewebe (grünes meristematisches Gewebe), Proben von Samengewebe (kompletter Embryo oder Teile des Endosperms) sowie 2-3-tägige Keimlinge (aus Keimtest) werden in Homogenatpuffer Tris-HCl-Puffer pH 7,2 homogenisiert.

Zusammensetzung des Homogenatpuffers pH 7,2

100 ml Homogenatpuffer Tris/HCl 0,1 M pH 7,2 enthalten:

PVP	(3 %)	3 g
β- Mercaptoethanol	(0,07 mM)	30 µl

Anmerkung: weitere Zusätze im Homogenatpuffer bringen keine wesentliche Verbesserung der Trennungen.

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

Biomol-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer	Gelzusammensetzung	Stromstärke (U = const.)	Laufzeit
*				
Ashton	pH 8,1 300 ml (10 % EP)	35,5 g Stärke, 3,5 g Sacch.	95 mA	5 h
*				
Poulik	pH 8,7 270 ml (3 % EP)	30,0 g Stärke, 5,0 g Sacch.	90 mA	5 h
*				
Tris-Citro	pH 7,5 330 ml (1:6,5 dest. H ₂ O)	38,5 g Stärke, 3,3 g Sacch.	130 mA	6 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gerbu-Stärke

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

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gelschnitte (*gel slabs*)

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

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

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

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

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		

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	

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. H₂O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 5000 ml auffüllen.

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

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

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

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

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

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

Stammlösungen (Stock solutions)

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

Zusammensetzung der einzelnen Färbelösungen (Staining mixtures for different enzymes)

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

Substratlösung:

Tris-HCl 0,2mol/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.

Glutamatdehydrogenase (GDH/E.C. 1.4.1.2)

Tris-HCl-Puffer 0,05 mol/l H 8,5	70 ml
L-Glutamic acid.	20 mg
NAD-Lösg.	1,5 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 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 ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

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

Leucinaminopeptidase (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

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 -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 ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

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

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

* erst kurz vor Beginn der Färbung hinzugeben

Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

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

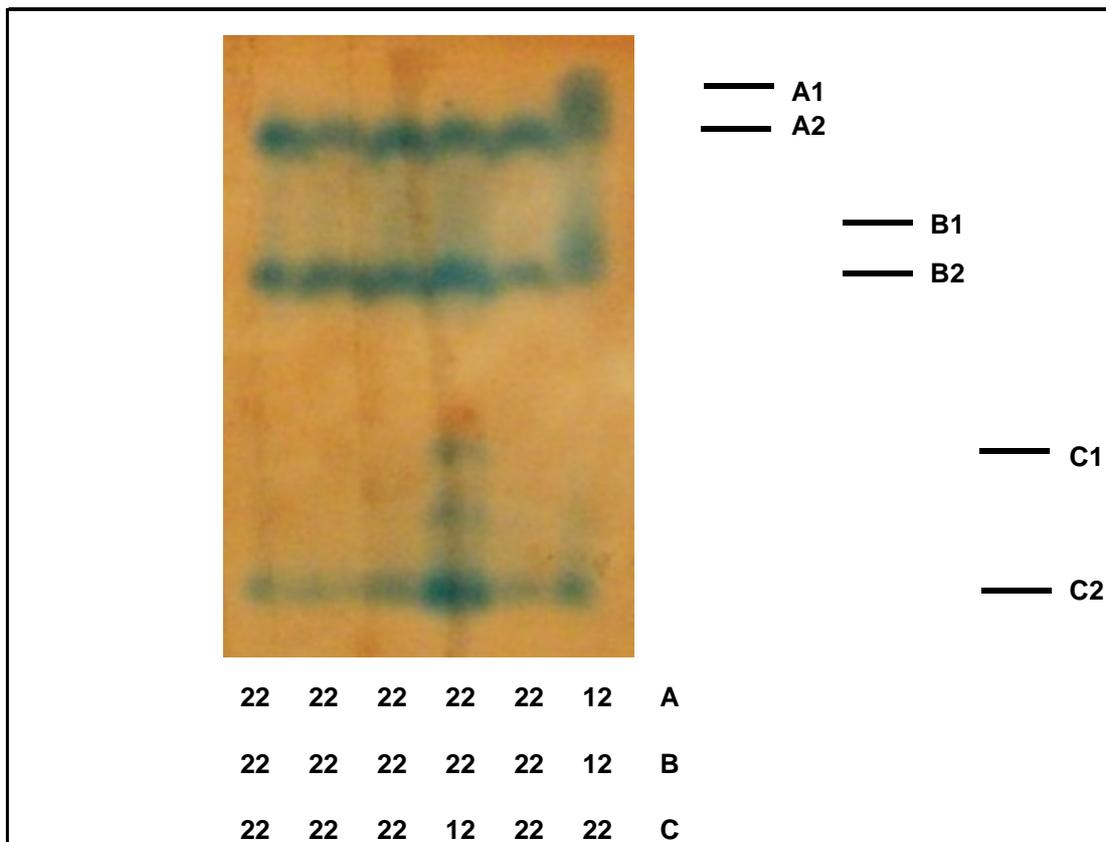
Interpretation der Zymogramme (*Genetic interpretation of banding patterns*)

Im folgenden sind für jedes System eine kurze Beschreibung und Abbildungen der Zymogramme als Orientierungshilfe zur Auswertung angegeben. Detailliertere Angaben und Daten zur genetischen Kontrolle der Enzymsysteme finden sich in den eingangs zitierten Veröffentlichungen. Grundsätzlich ist die Isoenzym-Variation bei Lärche im Vergleich zu anderen Nadelbaumarten gering.

Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1

AAT zeigt bei Lärche drei Aktivitätszonen mit voneinander unabhängiger Variation. Es wird deshalb von einer genetischen Kontrolle durch drei Genorte, AAT-A, AAT-B und AAT-C, ausgegangen. Die Zonen sind deutlich getrennt. Heterozygote Individuen zeigen bei allen drei Genorten Dreifachbanden mit einem meist stärker gefärbten Hybridband in der Mitte, was auf eine dimere Quartärstruktur des Enzyms schließen läßt. An allen drei Genorten wurden drei Varianten nachgewiesen, wobei die Variante mit mittlerer relativer Wandergeschwindigkeit, „Allel 2“, jeweils am häufigsten ist.

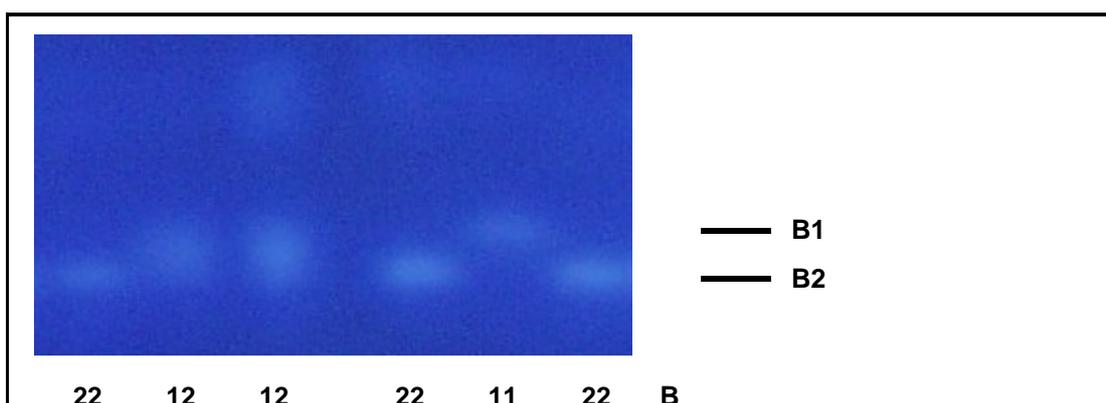
Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Lärche (*Larix decidua*)



Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1

Das dimere System FEST wird bei Lärche von mindestens zwei Genorten kontrolliert. An dem schneller wandernden Genort FEST-A sind die Muster nicht eindeutig auswertbar wegen teils geringer Intensität und unklarere Banden. Der Genort FEST-B ist zwar viel weniger variabel, die Muster sind aber deutlich und klar nachvollziehbar. Bislang wurden bei FEST-B drei Varianten gefunden, von denen die mittlere Variante B2 die häufigste ist.

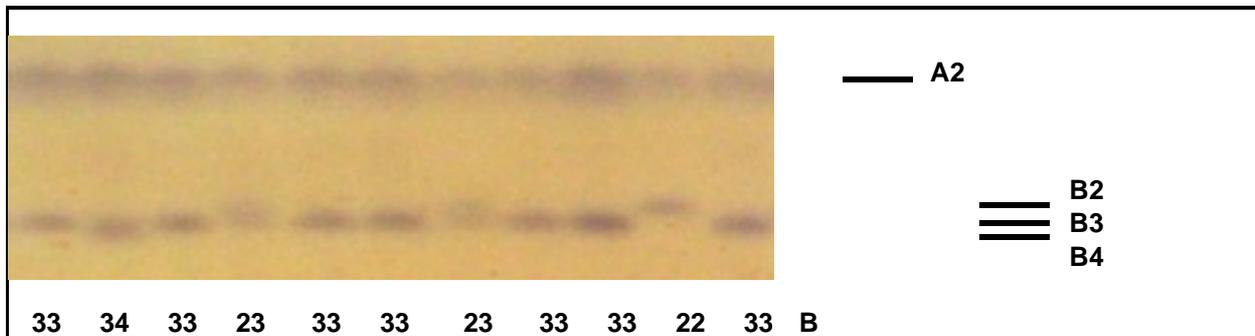
Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Lärche (*Larix decidua*)



Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1

Bei Anfärbung auf LAP erscheinen Muster in zwei gut voneinander getrennten Zonen. In der A-Zone wurden drei, in der B-Zone vier Varianten gefunden. A2 und B3 sind die häufigsten Allele. Die Variation in der A-Zone ist sehr gering.

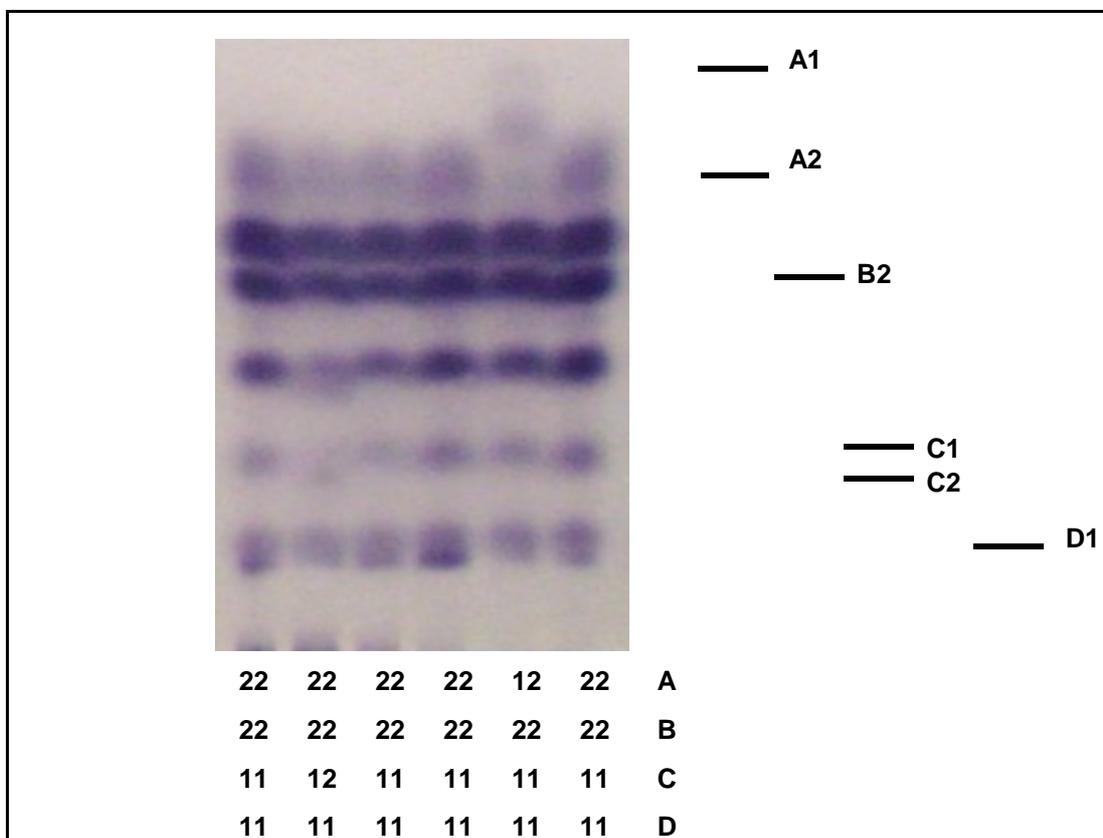
Zymogramm der Leucinaminopeptidase bei Lärche (*Larix decidua*)



Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37

Bei MDH können vier gut auswertbare Zonen beobachtet werden (MDH-A, MDH-B, MDH-C)

Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Lärche (*Larix decidua*)



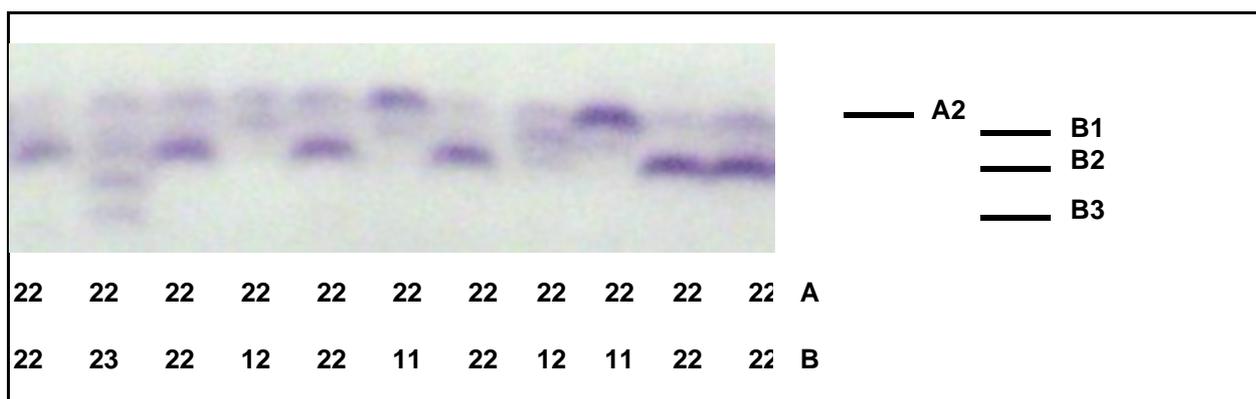
und MDH-D). Zusätzlich erscheinen noch Hybridbanden (dimere Struktur) innerhalb der Zonen und zwischen den Zonen B und C.

Demnach wird von einer Kontrolle dieses Systems durch vier Genorte ausgegangen. Für die Genorte A, B und C wurden jeweils drei Varianten nachgewiesen, am Genort D bislang nur zwei. An allen vier Genorten ist die Variation gering (ausgeprägter Minorpolymorphismus).

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

6-PGDH zeigt Anfärbung in einer Zone. Durch genetische Analyse konnte geklärt werden, dass sich in dieser Zone zwei Genorte teilweise überlappen; das Allel A2 liegt auf derselben Höhe wie das Allel B1. Variation zeigt vor allem die B-Zone, mit B2 als häufigstem Allel; das System hat dimere Struktur. Bei heterozygoten Genotypen erscheint ein aus drei Banden gebildetes Muster mit einer etwas stärkeren Färbung der Hybridbande.

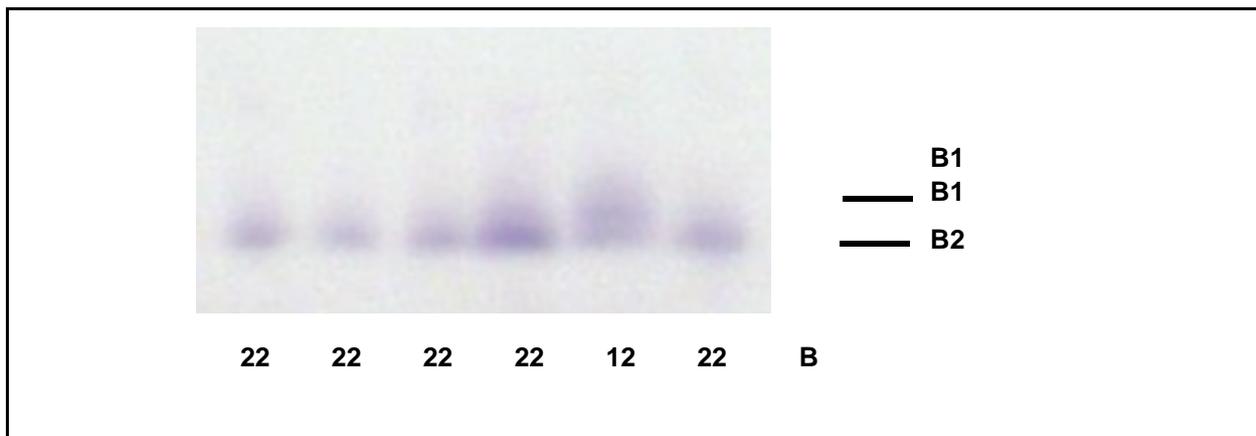
Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Lärche (*Larix decidua*)



Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Bei dem dimeren Enzymsystem PGI sind zwei Aktivitätszonen erkennbar (PGI-A und PGI-B), von denen i.d.R. nur die langsamer migrierende B-Zone ausgewertet wird, weil die schneller wandernde meist sehr schwach anfärbt. Bei heterozygoten Genotypen treten drei Banden auf, bei homozygoten meist eine stark ausgeprägte Bande und eine schwächere Begleitbande. Die B-Zone zeigt 3 Varianten (B1, B2, B3), von denen Variante B2 sehr häufig ist, die anderen beiden sehr selten (Minorpolymorphismus).

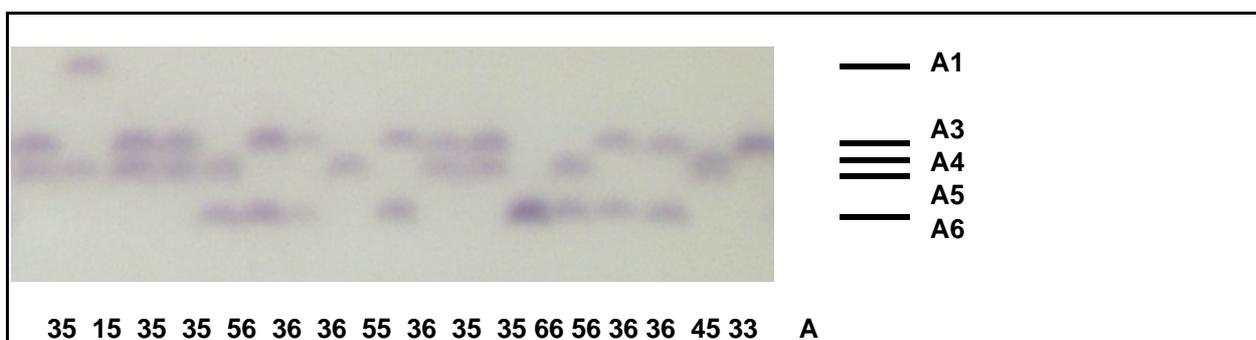
Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Lärche (*Larix decidua*)



Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1

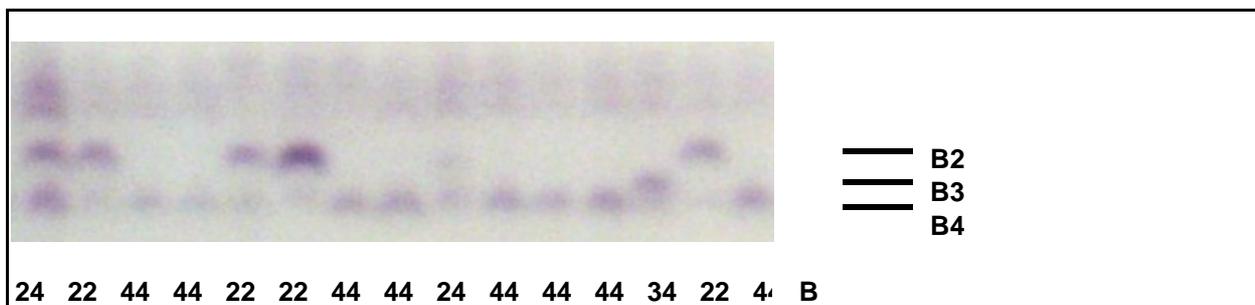
Das monomere Enzymsystem PGM wird auf dem gleichen Gel wie IDH angefärbt. Die nahe der Anode liegende Zone mit sehr hoher Variabilität ist dem Genort PGM-A zuzuordnen. In dieser Zone wurden insgesamt sechs Varianten beobachtet, von denen A3, A5 und A6 häufig sind. Als monomeres System zeigen sich bei homozygoten Genotypen ein Band, bei heterozygoten zwei Banden.

Zymogramm der Phosphoglucomutase bei Lärche (*Larix decidua*)



Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25

SKDH ist ein monomeres System mit Variation in zwei nahe bei der Kathode liegenden Zonen. In der schneller wandernden Zone konnten wir zwar Anfärbung, aber keine auswertbaren Muster erhalten. In der B-Zone (durch den Genort SKDH-B kontrolliert), zeigten sich 5 Varianten, wobei B4 die häufigste war.



Anmerkung:

Die Systeme **Glutamatdehydrogenase (GDH)** und **Isocitratdehydrogenase (IDH)** färbten jeweils in einer Zone an und waren in unserem Untersuchungsmaterial monomorph. Deshalb sind hier keine Photos angegeben.