

## **Anleitung für Isoenzymuntersuchungen bei Weißtanne (*Abies alba*)**

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

**zusammengestellt von**

**MONIKA KONNERT\*, WERNER MAURER\*\*, ERWIN HUSSENDÖRFER\*\*\***

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

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

**\*\*\*Fachhochschule Weihenstephan, FB Wald und Forstwirtschaft**

unter Mitwirkung von

**Eva Cremer\*, Aikaterini Dounavi\*, Thomas Wimmer\*\*, Susanne Nowak\*\***

**\* FVA Freiburg, \*\* ASP Teisendorf**

Das Laborhandbuch zu Isoenzymuntersuchungen bei Weißtanne (*Abies alba*) wurde in seiner ersten Version bereits 1995 in deutscher (KONNERT 1995) und englischer Sprache (KONNERT and MAURER 1995) veröffentlicht.

KONNERT, M. (1995): Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und Weißtanne (*Abies alba* Mill.)- Anleitung zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme. 74 Seiten.

KONNERT, M. and MAURER, W. (1995): Isozymic investigations on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and European Silver fir (*Abies alba* Mill.). A Practical Guide to Separation Methods and Zymogram Evaluation.

**Herausgeber und Bezugsquelle:** Bayerisches Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht, Forstamtsplatz 1, 83317 Teisendorf.

Weiterhin finden sich methodische Angaben zur Isoenzymanalyse bei Weißtanne, eine Beschreibung der Enzymsysteme sowie Daten zur genetischen Analysen bei Hussendörfer et al. (1995).

HUSSENDÖRFER, E.; KONNERT, M. und BERGMANN, F. (1995): Inheritance and linkage of isozyme variants of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Forest Genetics* 2 (1), S. 29-40.

Die vorliegende, überarbeitete und aktualisierte Fassung enthält zusätzlich zu der ersten Fassung des Handbuches in Teilen veränderte Trennsysteme und neue Abbildungen der Zymogramme mit Angaben zu deren genetischer Interpretation. 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.

Das Handbuch wird von den Verfassern einmal jährlich überprüft und aktualisiert

## Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

**Tab. 1:** Übersicht über die bei Tanne häufig untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende Genorte

<b>Enzym und Nomenklatur</b>	<b>Genort</b>	<b>Struktur</b>	<b>Häufige Allele</b>	<b>Trenn-System</b>
Aminopeptidase (AAP+LAP) E.C.3.4.11.1	AP-A AP-B AP-C AP-D	Monomer	A <sub>3</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub> ,C <sub>3</sub> ,C <sub>4</sub> D <sub>2</sub>	Ashton
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> C <sub>2</sub>	Poulik
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-A FEST-B	Dimer	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	Ashton
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A IDH-B	Dimer	A <sub>1</sub> ,A <sub>3</sub> ,A <sub>4</sub> B <sub>3</sub> ,B <sub>5</sub>	Tris-Citrat
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B	Dimer	A <sub>2</sub> B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub>	Tris-Citrat
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MNR-B	Tetramer	B <sub>3</sub>	Poulik
NADH-dehydrogenase (NADH) E.C.1.6.99.3	NADH-A	dimer	A <sub>2</sub>	Tris-Citrat
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PDGH-A 6-PGDH-B	Dimer	A <sub>2</sub> ,A <sub>3</sub> B <sub>2</sub>	Tris-Citrat
Phosphoglucose-isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-A PGI-B	Dimer	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B	Monomer	A <sub>2</sub> B <sub>2</sub>	Poulik o. Tris-Citrat
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-A	Monomer	A <sub>1</sub>	Tris-Citrat

## Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Proben von Knospengewebe (grünes meristematisches Gewebe), Samengewebe (kompletter Embryo oder Teile des Endosperms) sowie 2-3tägige Keimlinge (z.B. aus Keimtest) werden in einem Tris-HCl-Puffer homogenisiert. Folgende Extraktionspuffer wurden verwendet:

### a) Homogenatpuffer (*Extraction buffers*) pH 7,2

#### Zusammensetzung:

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

PVP (3 %) 3 g

β- Mercaptoethanol (0,07 mM) 30 µl

eine Spatelspitze Polyclar AT (unlös. PVP) je Probe zugeben unmittelbar vor Extraktion

### b) Homogenatpuffers (*Extraction buffers*) pH 7,3

#### Zusammensetzung:

Homogenatpuffer pH 7,3	
Tris	1,5g/100ml
Titriplex II	0,12g/100ml
Lösliches PVP	4,0g/100ml
HCL 1N	10ml/100ml
Mercaptoethanol	1ml/100ml
pH auf 7,3 einstellen	
<b>Zusätze bei schlechten Knospen und Samen:</b>	
Cystein	0,001g/100ml
Sodium ascorbate	1,0g/100ml
Sodium bisulfite	0,5g/100ml

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

### a) Rezepturen ASP Teisendorf

#### Biomol-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer	Gelzusammensetzung	Stromstärke	Laufzeit
*				
Ashton	pH 8,1 300 ml (10 % EP) (1:0,5 dest H <sub>2</sub> O)	33,0 g Stärke, 5,0 g Sacch.	85 mA (I = const.)	5 h
*				
Poulik	pH 8,7 270 ml (3 % EP)	30,0 g Stärke	90 mA (U = const.)	5 h
*				
Tris-Citro	pH 7,5 300 ml (1:6,5 dest. H <sub>2</sub> O)	34,0 g Stärke, 7,0 g Sacch.	110 mA (U = const.)	6 h

\* Glasplatte 27 \* 11,5 cm

#### Gerbu-Stärke

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

\* Glasplatte 27 \* 11,5 cm

#### Gelschnitte (*gel slabs*)

	unten	mitte	oben	
<b>Ashton</b>	o LAP (AAP)	- PGI	o FEST	
<b>Poulik</b>	+ GOT	o MNR (NADH)	- o PGM	
<b>Tris-Citro</b>	o IDH	o 6-P	o MDH	o SDH

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

## b) Rezepturen FVA Freiburg

<u>Puffersystem und Gelkonzentration</u>	<u>Einwaage</u>	<u>untere Schicht</u>	<u>mittlere Schicht</u>	<u>obere Schicht</u>	<u>Zeit [h]</u>	<u>Stromstärke [mA]</u>
Tris-Citronensäure pH 7,5; 12%	26,4g Stärke; 1,9g Harnstoff; 220ml Gelpuffer	MNR	6-PGDH	MDH	6,0	180
Tris-Citronensäure pH 8,5; 12%	26,4g Stärke; 1,9g Harnstoff; 220ml Gelpuffer	AAT			6,0	170
Tris-Citro-Histidin pH 6,2; 12%	26,4g Stärke; 4,4g Zucker; 220ml Gelpuffer	IDH		PGM	6,5	210
Ashton pH 8,1; 11,5%	25,3g Stärke; 4,4g Zucker; 220 ml Gelpuffer		LAP		5,5	60

## Gelschnitte (*gel slabs*)

<b>Puffer- (Trenn) System</b>	<b>Farbreaktion des Enzymsystems</b>
<b><u>Tris-Citro pH 7,5 - Gel</u></b> obere Schicht mittlere Schicht untere Schicht	MDH 6-PGDH MNR
<b><u>Tris-Citro pH 8,5 - Gel</u></b> obere Schicht mittlere Schicht untere Schicht	- - AAT
<b><u>Tris-Citro-Histidin - Gel</u></b> obere Schicht mittlere Schicht untere Schicht	PGM - IDH
<b><u>Ashton - Gel</u></b> obere Schicht mittlere Schicht untere Schicht	- LAP -

## 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**

<b>Tris-Citro pH 7,5</b>	
Elektrodenpuffer	Gelpuffer pH 7,5
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H <sub>2</sub> O (43 mmol/l) 9 g/l	Tris (40 mmol/l) 24,29 g/ 5l Citronensäure H <sub>2</sub> O (12,28 mmol/l) 12,86 g/ 5l
<b>Tris-Citro pH 8,5</b>	
Elektrodenpuffer	Gelpuffer pH 8,5
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H <sub>2</sub> O (17 mmol/l) 3,5 g/l	Tris (40,1 mmol/l) 4,86 g/l Citronensäure H <sub>2</sub> O (4,8 mmol/l) 1 g/l
<b>Tris-Citro-Histidin pH 6,2</b>	
Elektrodenpuffer T.C. pH 7,5	Gelpuffer pH ~ 6,7
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H <sub>2</sub> O (43 mmol/l) 9 g/l	L-Histidin (50 mmol/l) 10,5 g/l Titriplex II (1,4 mmol/l) 0,4 g/l Tris (510 mmol/l) 6,0 g/l
<b>Ashton pH 8,1</b>	
Elektrodenpuffer	Gelpuffer pH 8,1
Borsäure (190 mmol/l) 11,8 g/l Lithiumhydroxid (50 mmol/l) 1,1 g/l	Tris (50 mmol/l) 6,1 g/l Citronensäure (0,8 mmol/l) 1,7 g/l Borsäure (19 mmol/l) 1,2 g/l Lithiumhydroxid (5 mmol/l) 0,11 g/l

## 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*)

### Aminopeptidasen (AP/E.C. 3.4.11.1)

#### a) Alaninaminopeptidase (AAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat pH 5,4	70 ml
Alanin- $\beta$ -naphtylamid-HCl	50 mg
Fast Black K	40 mg

#### b) Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat pH 5,4	70 ml
Leucin- $\beta$ -naphtylamid-HCl	50 mg
Fast Black K	40 mg

### 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	70 mg
Pyridoxal-5-Phosphate	10 mg

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

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

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

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

**Isocitratdehydrogenase (IDH/E.C. 1.1.1.42)**

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

**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.	5 ml

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

Tris-HCl-Puffer (0,2 mol/l pH 8,0)	70 ml
NADH	40 mg
MTT-Lösg.	1,5 ml
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 <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	30 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*)

### Aminopeptidase (AAP) E.C.3.4.11.1

Färbt man auf zwei Schnitten desselben Gels auf LAP und AAP an, so erhält man in manchen Zonen dasselbe Muster. Deshalb werden hier die Systeme LAP und AAP als eine Enzymgruppe (Aminopeptidasen) betrachtet und die Genorte als „AP“ bezeichnet. Insgesamt werden die Aminopeptidasen (AAP und LAP) bei Weißtanne von vier Genorten kontrolliert, die als AP-A, AP-B, AP-C und AP-D bezeichnet werden

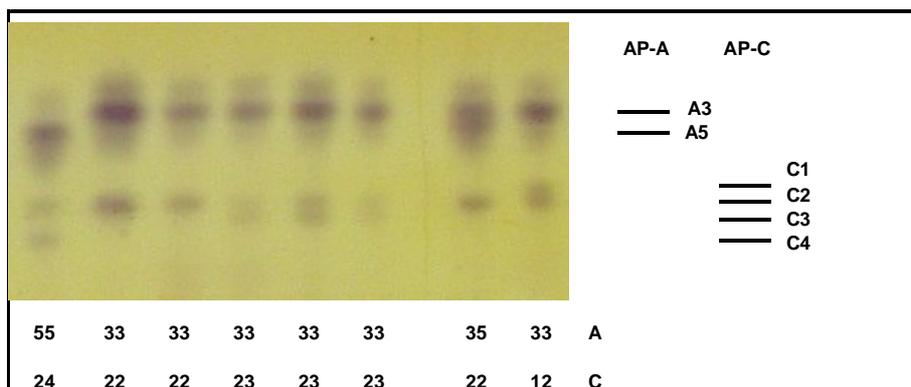
Bei Einsatz von LAP als Substrat färben nur die Genorte AP-A und AP-C an. Bei AP-A wurden sechs Genvarianten nachgewiesen. Die entsprechenden Enzyme unterscheiden sich nur wenig in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, so dass ihre eindeutige Zuordnung schwierig ist. Es empfiehlt sich das Mitlaufen von Standards. Das mit Abstand häufigste und in allen Tannenpopulationen auftretende Allel ist AP-A3 (meist über 80 %). AP-A4 und AP-A5 finden sich in mittel- und westeuropäischen Herkünften häufiger als in Osteuropa. Hier findet sich hingegen das Allel AP-A1 viel häufiger. AP-A2 ist sehr selten. Neben IDH-B ist AP-A ein Genort, an dem bei Weißtanne klinale geographische Variation nachgewiesen wurde.

Die vier bei AP-C nachgewiesenen Varianten sind in fast allen Tannenpopulationen zu finden, wobei AP-C2 und AP-C3 meist häufiger sind als AP-C1 und AP-C4.

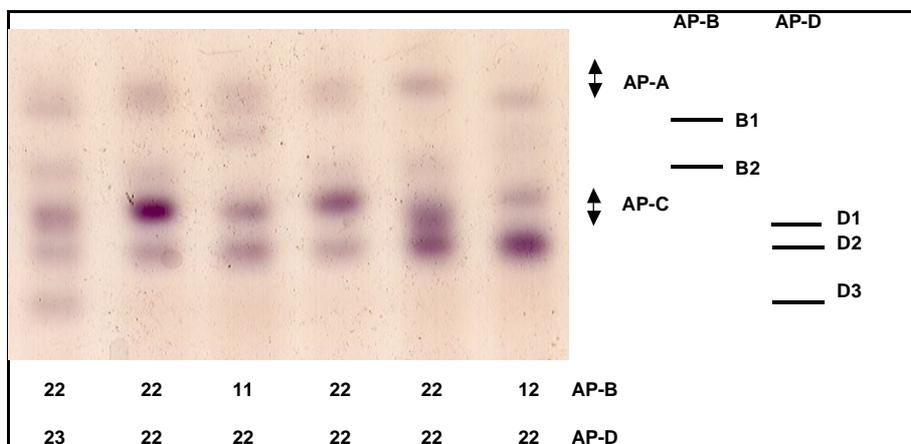
Bei Einsatz von AAP als Substrat färben neben AP-A und AP-C auch die Genorte AP-B und AP-D an. Bei AP-B wurden zwei Genvarianten nachgewiesen, wobei AP-B2 häufiger ist (60 % bis 80 %), B1 entsprechend seltener.

Bei AP-D wurden bisher drei Genvarianten nachgewiesen. Wegen der teilweisen Überlappung mit AP-C ist die sichere Zuordnung der Muster zu Genotypen nicht immer möglich. AP-D2 ist die häufigste Variante.

### Zymogramm der Aminopeptidase bei Weißtanne (*Abies alba*) – Substrat LAP



## Zymogramm der Aminopeptidase bei Weißtanne (*Abies alba*) – Substrat AAP



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

Das dimere System AAT (syn. GOT) wird bei Tanne von drei Genorten kontrolliert.

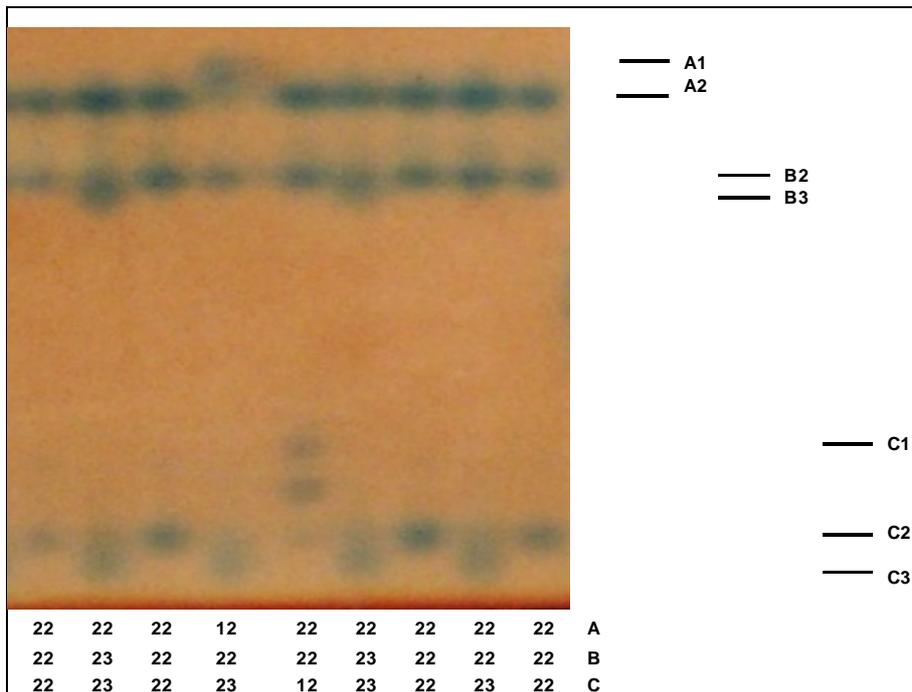
An den Loci AAT-A und AAT-B wurden jeweils drei Genvarianten identifiziert. Ein ausgeprägter Minorpolymorphismus mit A2 und B2 als sehr häufig auftretenden Varianten ist für diese beiden Genorte charakteristisch.

Während die von AAT-A und AAT-B kontrollierten Isoenzyme eine relativ große und wenig unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit haben, wandern die von AAT-C (GOT-C) kontrollierten viel langsamer und liegen im Zymogramm nahe der Kathode. Für AAT-C wurden vier Genvarianten identifiziert. Die entsprechenden Isoenzymphänotypen präsentieren sich im Zymogramm meist als Doppelbande, deren relative Position zueinander unverändert bleibt. C2 ist in allen Tannenpopulationen das häufigste Allel (meist über 75 %). Die Häufigkeiten von C3 liegen bei etwa 5 bis 25 %, C1 und C4 sind viel seltener bzw. fehlen in vielen Populationen. C4 ist nur auszuwerten, wenn auch der zur Kathode gerichtete Gelbereich angefärbt wird.

Mejnartowicz und Bergmann (2002) berichteten von einem vierten Genort, der das System GOT bei Weißtanne kontrolliert und der zwischen den Genorten B und C liegt. Die Enzyme dieses Genortes sind aber nur in Endospermgewebe nachweisbar und färben sehr schwach an. Zusätzlich erschwert wird die Auswertung durch die Tatsache, dass die Varianten dieses Genorte teilweise mit anderen Genorten überlappen, u. zw. die schneller wandernden mit Allelen des Genortes AAT-B, die langsamer wandernden mit denen des Genortes AAT-C.

MEJNARTOWICZ, L., BERGMANN, F. (2003): Mode of Inheritance of Aspartate Aminotransferase in Silver-Fir (*Abies alba* Mill). *Silvae Genetica* 52, 15-17.

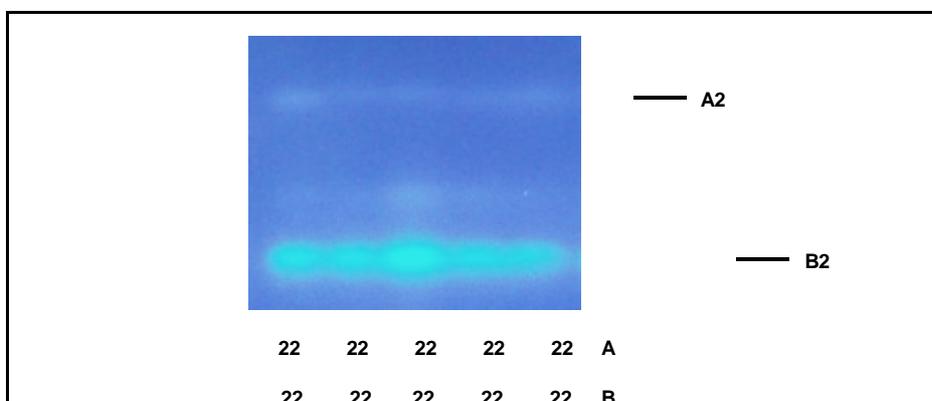
### Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Weißtanne (*Abies alba*)



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

Bei Anfärbung auf Fluoreszierende Esterase werden im Gel mehrere Zonen sichtbar. In zwei Zonen sind die Banden klar konturiert und reproduzierbar in allen Gewebearten. Es wurde deshalb von einer genetischen Kontrolle dieses Systems durch mindestens zwei Genorten ausgegangen. An dem vorläufig als FEST-A bezeichneten Genort ist die Anfärbung viel schwächer als bei FEST-B. Bei FEST-A wurde bislang noch keine Variation gefunden, bei FEST-B findet sich äußerst selten (Häufigkeiten unter 1 %) eine zweite schneller wandernde Genvariante. Heterozygote Genotypen zeigen Dreifachbanden.

### Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Weißtanne (*Abies alba*)

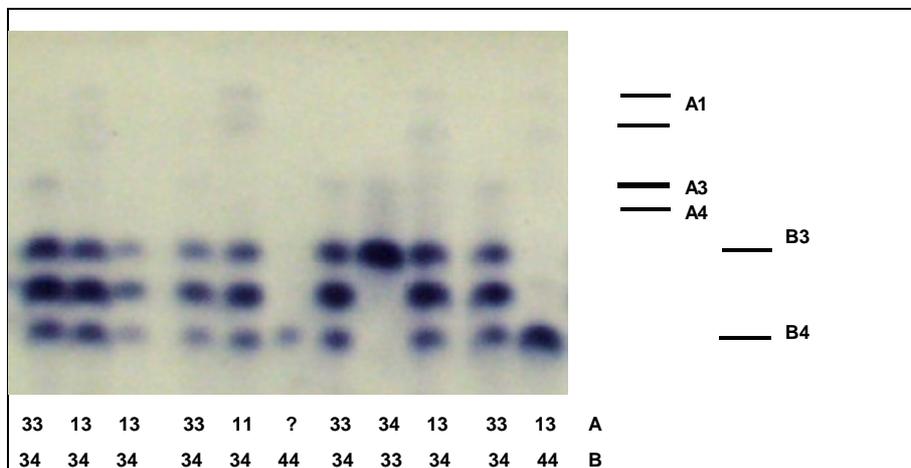


### Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42

Das dimere System IDH wird von zwei Genorten kontrolliert, die beide hochpolymorph sind. Bei IDH-A wurden in Tannenpopulationen vier Allele gefunden. Die dem Allel A1 entsprechenden Isoenzyme präsentieren sich im Zymogramm als Doppelbanden, die restlichen als Einzelbanden. A1, A3 und A4 finden sich in fast allen Tannenpopulationen, wobei A3 meist das häufigste Allel ist. A2 ist äußerst selten.

Von den fünf Allelen, die bei IDH-B nachgewiesen wurden, sind B3 und B4 (in früheren Veröffentlichungen B2 und B3) häufig; die restlichen drei treten nur selten auf. B1 und B5 wurden nur in jeweils einem Probebaum aus der Schweiz gefunden. Bei IDH-B wurde eine geographische klinale Variation beobachtet. Die Häufigkeit des Allels B3 nimmt von Norden nach Süden zu, die von B4 in gleicher Richtung ab. Gleichzeitig ist B3 in östlichen Herkünften das häufigste Allel, während in West- und Mitteleuropa B4 häufiger ist.

### Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)



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

Bei der Anfärbung auf MDH mit der üblichen Tetrazoliummethode (das durch die Enzymkatalyse gebildete NADH reagiert am Ort der Bildung über den Elektronenträger PMS mit einem Tetrazoliumsalz unter Bildung von unlöslichem, blauem Formazan) erhaltenen Zymogramme zeigen eine Vielzahl von Banden, deren Auswertung und genetische Interpretation schwierig bzw. nicht möglich ist. Dies deshalb, weil bei dieser Färbemethode sowohl die nicht decarboxylierende als auch die decarboxylierende MDH sichtbar wird.

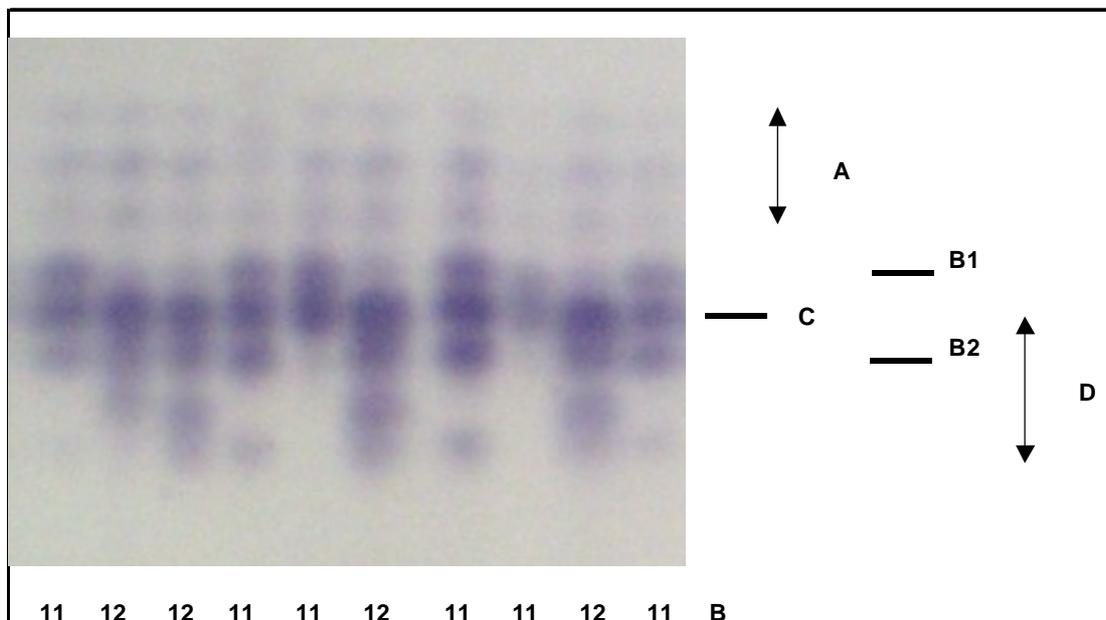
Um aus diesem komplexen System nur die nicht decarboxylierende MDH (nd-MDH) zu isolieren und so die Muster zu vereinfachen (vgl. HUSSENDÖRFER et al. 1995) kann man eine Färbung unter Zugabe von Fast Blue BB (ein Diazoniumsalz, das mit Oxalacetat, dem Endprodukt der von nd-MDH katalysierten Reaktion, reagiert) vornehmen. Unter Anwendung dieser Färbemethode lassen sich im Zymogramm zwei Zonen mit voneinander unabhängiger Variation erkennen, zwischen denen sich Hybridbanden bilden. Die Isoenzyme der schneller wandernden Zone sind viel kräftiger gefärbt als die der langsamer wandernden. Färbt man auf einem weiteren Gel-Schnitt mit der Tetrazoliummethode an, so wird zwischen den beiden erwähnten Zonen, und diese teilweise überdeckend, eine weitere breite Zone ohne Variation sichtbar.

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das System von vier Genorten kontrolliert wird. Bei Anfärbung mit Tetrazolium werden alle vier Genorte sichtbar. Bei Anfärbung mit Fast Blue zeigen sich nur die Genorte MDH-B und MDH-D.

MDH-A färbt vergleichsweise schwach an und zeigt sich oft als Dreifachband. Variation an diesem Genort wurde in osteuropäischen Tannenpopulationen beobachtet. Wir konnten sie aber (auch aufgrund fehlender genetischer Analysen) nicht sicher bestimmten Allelen oder Genotypen zuordnen. MDH-C zeigt keine Variation. Bei der Färbung mit Tetrazolium ist auch MDH-B noch sicher auszuwerten. An dem Genort konnten wir bislang zwei Allele nachweisen, wobei B1 meist über 80 % liegt.

Da wir bei der Fast Blue-Verwendung sehr oft keine richtige Anfärbung erzielten, konnten wir den Genort GOT-C nicht weiter verfolgen. Es wird von drei Allelen an diesem Genort berichtet (HUSSENDÖRFER et al. 1995).

### Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)- Färbung: Tetrazoliummethode



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

Bei Anfärbung auf MNR erscheinen auf dem Gel fünf voneinander getrennte Zonen mit unabhängiger Variation. Die drei am langsamsten wandernden konnten nach vergleichenden Studien dem Enzym NDH zugeordnet werden und werden deshalb hier nicht weiter behandelt.

Nach Durchführung der genetischen Analyse wurde postuliert, dass die beiden schneller wandernden Zonen von zwei Genorten, MNR-A und MNR-B kontrolliert werden.

Färbt man die Gele auf Diaphorase an, so erscheinen in der MNR-B zugeordneten Zone die gleichen Muster wie bei Anfärbung auf MNR, die Zone A ist schwach und diffus gefärbt bzw. fehlt ganz. Von dieser Feststellung ausgehend wurde angenommen, dass der hier als MNR-B bezeichnete Genort identisch ist mit DIA-A.

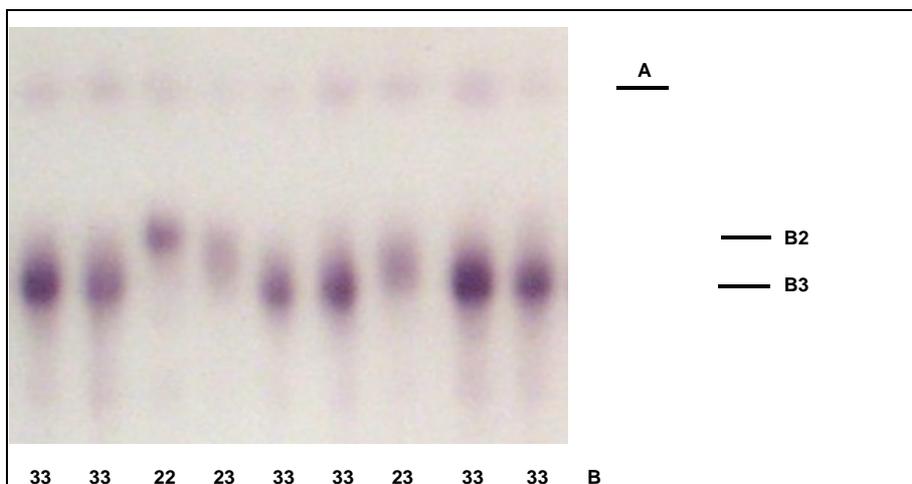
In der von MNR-A kontrollierten Zone wurde keine Variation beobachtet.

MNR-B bzw. DIA-A weist vier Allele auf. Der Genort zeigt Minorpolymorphismus mit B3 als häufigstem Allel. Das Allel B1 gilt als arealspezifisch. Es findet sich vorrangig im westlichen Teil des natürlichen Tannenverbreitungsgebietes. Hier erreicht es Häufigkeiten von bis zu 20 %. In Süditalien und Kalabrien wurde neben B1 noch das Allel B2 gefunden (Häufigkeiten bis etwa 5 %). Ein langsamer als B3 wanderndes Allel wurde in sehr kleinen Häufigkeiten im östlichen Teil des Tannenverbreitungsgebietes gefunden (Longauer 1992)

LONGAUER, R. (1992): Genetic differentiation and diversity of the European Silver Fir in the Eastern Part of its Natural Range. Proceedings 7. IUFRO-Tannensymposium, Altensteig, S. 155-164

Das Enzym ist tetramer.

### Zymogramm der Menadionreduktase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)

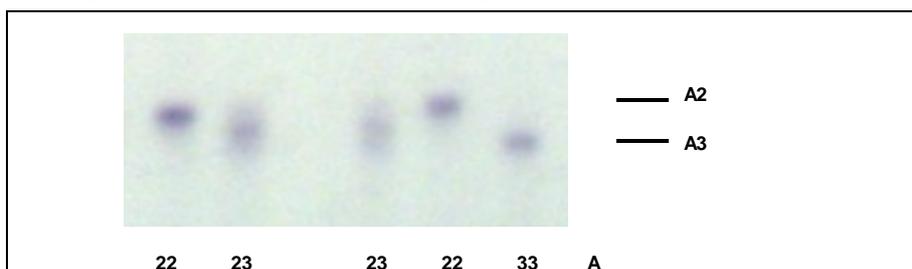


### NADH-Dehydrogenase (NADH) E.C.1.6.99.3

NADH färbt in drei deutlich voneinander getrennten Zonen an. Die Zonen erscheinen auf dem Gel auch bei Anfärbung auf MNR bzw. DIA.

Während in den Zonen B und C nur jeweils ein Einzelbandmuster gefunden wurde, traten in der Zone A in einigen wenigen Fällen weitere Muster auf, die aus drei Bändern bestanden. Diese Feststellung führte zu der Annahme, dass diese Zone von einem Genort mit drei Allelen kontrolliert wird. Das Allel A2 ist häufig, A1 und A3 sind äußerst selten. Demnach wird von einer Kontrolle des Systems NADH durch drei Genorte ausgegangen, von denen NADH-A polymorph mit drei Allelen, NADH-B und NADH-C aber monomorph sind.

### Zymogramm der NADH-Dehydrogenase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)



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

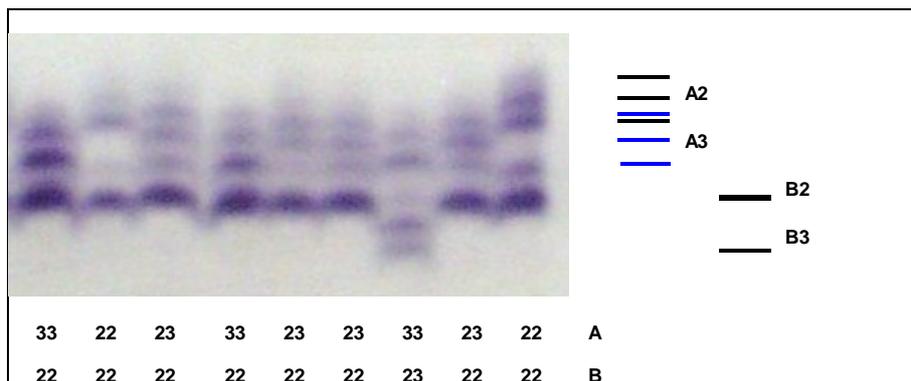
Das dimere System 6-PGDH wird bei Weißtanne von zwei Genorten kontrolliert.

Die von dem Genort 6-PGDH-A kodierten Isoenzyme erscheinen im Zymogramm als Dreifach-Banden (stabile Einheit) mit abnehmender Intensität zur Anode hin. An dem Genort wurden vier Genvarianten identifiziert. A2 und A3 sind in Tannenpopulationen des gesamten Verbreitungsgebietes häufig (in vielen Populationen etwa 50 % : 50 %), A1 und A4 sind selten. A4 findet sich etwas häufiger in Herkünften aus Osteuropa.

Am Genort 6-PGDH-B wurden drei Genvarianten gefunden. In Tannenpopulationen aus West- und Mitteleuropa ist der Genort häufig monomorph; es findet sich nur das Allel B2. In östlicher und vor allem in südöstlicher gelegenen Herkünften tritt das Allel B3 in Häufigkeiten von bis zu 10 % auf. B1 findet sich sporadisch im gesamten Verbreitungsgebiet, erreicht aber nur Häufigkeiten bis etwa 5 %.

Wegen der Vielzahl der Banden und der teilweisen Überlappung der Loci A und B (A4 liegt etwa auf der Höhe von B1) kann bei Analyse von diploidem Material in einigen Fällen die Auswertung unsicher sein.

### Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)

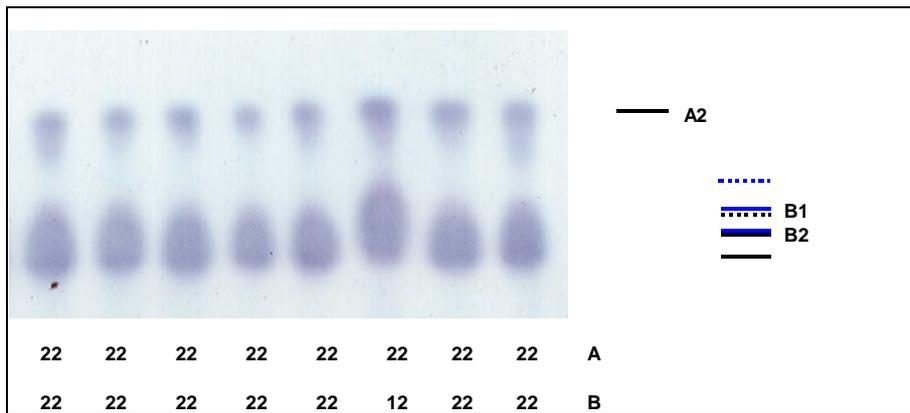


## Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Das dimere System PGI wird bei Weißtanne von zwei Genorten kontrolliert. Die von PGI-A kodierten Isoenzyme präsentieren sich im Zymogramm als Einfachbanden, die von PGI-B kodierten als Dreifachbanden, wobei die am langsamsten wandernde Bande stärker anfärbt.

Für PGI-A wurden zwei, für PGI-B drei Genvarianten nachgewiesen. Beide Genloci sind in mittel- und westeuropäischen Tannenpopulationen fast immer monomorph (A2 bzw. B2); in Tannenpopulationen aus Südosteuropa zeigt sich an diesem Genort ein Minorpolymorphismus, mit A2 bzw. B2 über 90 %.

### Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)

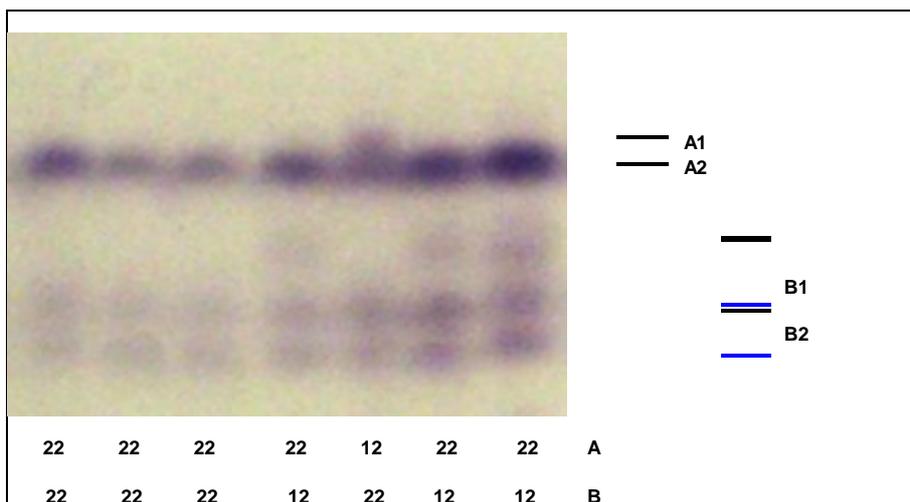


### Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1

Das monomere System PGM wird bei Weißtanne von zwei Genorten kontrolliert. Beide zeigen einen ausgeprägten Minorpolymorphismus mit jeweils zwei Allelen, wobei A2 und B2 sehr häufig sind. Das Allel A1 wurde nur in einigen Probestämmen aus der Schweiz gefunden. Der überwiegende Teil der Tannenpopulationen ist an diesem Genort monomorph.

Der Genort PGM-B ist in west- und mitteleuropäischen Tannenpopulationen monomorph (nur B2). Demgegenüber findet sich in Populationen aus Ost- bzw. Südosteuropa sowie in Kalabrien und Süditalien neben B2 auch das Allel B1. Die von PGM-B kodierten Enzyme erscheinen im Zymogramm als Doppelbanden.

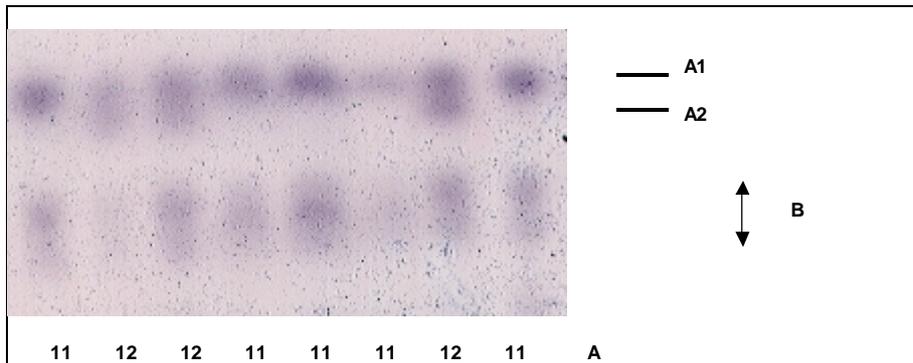
### Zymogramm der Phosphoglucomutase bei Weißtanne (*Abies alba* Mill.)



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

SKDH färbt in einer nahe der Kathode liegenden Zone an. Das System wird wahrscheinlich von zwei Genorten kontrolliert, von denen aber nur der Genort SKDH-A ausgewertet werden kann. Bei

mitteleuropäischen Tannenpopulationen ist mit ganz wenigen Ausnahmen nur das Allel A1 zu finden. Bei Tannenproben aus Kalabrien tritt auch ein zweites, langsamer wanderndes Allel auf.



**Kurzbeschreibung weiterer Systeme, die bei Weißtanne bereits als Genmarker eingesetzt wurden:**

*Aconitase (ACO) E.C.4.2.1.3*

LONGAUER (1992) berichtet von 5 Allelen bei Aconitase, wobei B3 bei über 85 % liegen.

*Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2*

Das System hat zwei Allele und zeigt nur äusserst selten Variation

*Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPCA) E.C.4.1.1.31*

Bislang wurde bei dem System noch keine Variation gefunden