

Isoenzymuntersuchungen bei Winterlinde (*Tilia cordata* Mill.)

- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme –

- Martin Fromm, Monika Konnert, Thomas Wimmer

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

Die folgende Arbeitsanleitung zu biochemisch-genetischen Untersuchungen an Winterlinde (*Tilia cordata* Mill.) basiert auf Arbeiten, die im Rahmen einer Doktorarbeit (Fromm 2001) an der Universität Göttingen und im Rahmen eines durch das BMBF geförderten Projektes (FKZ 0339766) am Bayerischen Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht in Teisendorf durchgeführt wurden.

Bis auf die Genorte ADH-A und AAT-A sind für die Winterlinde alle in der Tabelle 1 aufgeführten Genorte durch Vererbungsanalysen als Markergenorte etabliert (FROMM 2001). Die Enzymsysteme ADH und AAT zeigen eindeutige dimere Bandenmuster. Obwohl eine Vererbungsanalyse noch aussteht, wurde eine genetische Interpretation versucht, ausgehend von den Erfahrungen bei anderen Baumarten. Die Muster sind eindeutig und reproduzierbar. Wo Winter- und Sommerlinde sympatrisch vorkommen, ist eine spontane Hybridisierung der beiden Arten nicht selten. Daher werden im Folgenden auch, soweit entdeckt, für die Sommerlinde spezifische Allele miteinbezogen, die eine Artunterscheidung und die Bestimmung von Hybriden ermöglichen (FROMM 1999). In den Abbildungen sind Zymogramme von Sommerlinden mit **S** und von Hybriden mit **H** gekennzeichnet. Winterlindenzymogramme sind nicht gesondert beschriftet.

FROMM, M. (1999): Artbestimmung von Winterlinde, Sommerlinde und der Arthybride. AFZ-Der Wald 54, 244-246.

FROMM, M. (2001): *Reproduktion einer entomophilen Baumart in geringer Populationsdichte – Das Beispiel der Winterlinde (Tilia cordata Mill.)* – Phd thesis, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen: pp. 238, <http://webdoc.sub.gwdg.de/diss/2001/fromm/index.html>.

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

Untersuchte Enzymsysteme (*Enzyme systems investigated*)

Tab. 1: Übersicht auf die bei der Winterlinde untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende Genorte.

Enzym und Nomenklatur	Genort	Struktur	Anzahl Allele	Häufige Allele	Trenn-System
Aspartataminotransferase (AAT) E.C.2.6.1.1	AAT-A	Dimer	2	A ₂ , A ₄	Poulik
Alkoholdehydrogenase (ADH) E.C.1.1.1.1	ADH-A	Dimer	2	A ₂ , A ₃	Ashton
FormiatDehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2	FDH-A	Dimer	6	A ₃	Ashton
Aminopeptidase (AP) E.C.3.4.11.1	AP-B AP-D	Monomer	4 2	B D ₂	Poulik Histidin-citrat
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-B MDH-C MDH-D	Dimer	2 2 2	B ₁ , B ₂ C ₁ D ₂	Histidin-citrat
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MNR-A	Tetramer	2	A ₃ , A ₄	Histidin-citrat
Phosphoglucose-isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-B PGI-C	Dimer	3 2	B ₂ , B ₃ C ₁	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B PGM-C PGM-D	Monomer	3 3 3 3	A ₂ B ₂ C ₁ , C ₃ D ₂ , D ₃	Poulik
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-B	Monomer	4	B ₃ , B ₄	Histidin-citrat

Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Bei Winterlinde hat sich die Extraktion aus jungen Blättern angetriebener oder frisch entfalteter Knospen, Samen (frisch oder bei -20 °C bis -30 °C gelagert) und Kambium bewährt. Samen werden bei -20 °C bis -30 °C gelagert. Blattmaterial sollte am besten frisch verwendet werden. Ist dies nicht möglich, so muss das Material mit Stickstoff schockgefroren und bei -60 °C eingefroren werden.

Zusammensetzung des Homogenatpuffers (*Extraction buffers*)

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

Extraktionspuffer nach HERTEL	
Lösung I	40 g Saccharose in 200 ml H ₂ O dest. lösen
Lösung II	6 g TRIS in 100 ml H ₂ O dest. 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 500 mg Diethyldithiocarbamic acid 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 + Zusätze) kann im Kühlschrank 5 Tage aufbewahrt, dann muss er neu angesetzt werden. Lösungen I und II können mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Ebenfalls gute Ergebnisse werden mit dem Puffer nach FROMM (2001) erzielt, wobei hier, je nach Qualität des Probenmaterials, auf den Einsatz von Mercaptoethanol verzichtet werden kann:

Extraktionspuffer nach FROMM	
H ₂ O bidest	10 ml
Tris	97 mg
Saccharose	1 g
PVP 15	300 mg
EDTA	15 mg
BSA	10 mg
DTT	30 mg
Mit HCl auf pH 7,5 titrieren	

Der Extraktionspuffer nach Fromm bleibt im Kühlschrank ca. 2 Wochen verwendbar.

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

Biomol-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer	Gelzusammensetzung	Stromstärke	Laufzeit
* Ashton	pH 8,1 300 ml (10 % EP)	31,0 g Stärke, 8,0 g Urea. 100 mg EDTA	100 mA (U = const.)	5 h
Poulik	pH 8,7 280 ml (3 % EP)	31,0 g Stärke 10,0 g Sacch.	120 mA (I = const.)	5 h
^ Histidin-Citrat	pH 6,2 300 ml (1:3 dest. H ₂ O)	31,0 g Stärke, 12,0 g Sacch 6,0 g Urea 200 mg EDTA	90 mA max. 250 V	5 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gerbu-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer	Gelzusammensetzung	Stromstärke	Laufzeit
* Ashton	pH 8,1 300 ml (10 % EP)	30,0 g Stärke, 6,0 g Sacch.	130 mA (U = const.)	4 h
* Poulik	pH 8,7 280 ml (GP mit 3 % EP)	28,0 g Stärke, 6,0 g Sacch.	110 mA (I = const.)	4 h
.. Histidin-Citrat	pH 6,2 300 ml (1:3 dest. H ₂ O)	33,0 g Stärke	110 mA max.280 V	4 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gelschnitte (*gel slabs*)

	unten	mitte	oben	
	o	-	+	
Ashton	ADH	PGI	FDH	
	-	o	o	
Poulik	LAP	PGM	GOT	
	o	o	o	o
Histidin-Citrat	LAP	MDH	SDH	MNR

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.	

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, 8,0 oder 8,5

30,27 g TRIS in 4500 ml dest. H₂O lösen und mit HCl (ca. 10 %) auf gewünschten pH-Wert bringen, danach auf 5000 ml auffüllen.

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

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

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

Trennsystem Histidin-Citrat pH 6,2

Elektrodenpuffer pH 6,2

Histidin-Base	10 g / l	50g / 5 l
Citronensäure H ₂ O	~ 1,9 g / l	~ 9,5 g / 5 l

Gelpuffer pH 6,2

Histidin-Base	10 g / l	50 g / 5 l
Maleinsäure	~ 1,6 g / l	~ 8 g / 5 l

Gelpuffer 1:3 mit H₂O bidest. verdünnen

PMS-Lösg.	6 mg/ml	
NBT-Lösg.	3 mg/ml	
Fructose-6-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.		20 mg/ml (PGI)

Glucose-1-phosphat-di-Na-Salz-Lösg.
8 g Apfelsäure/50 ml TRIS pH 8,0

40 mg/ml (PGM)
(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)

dest. H ₂ O	500 ml
Asparaginsäure	2,5 g
α-Ketoglutarinsäure	1,2 g
PVP	2 g
Na-EDTA	100 mg
mit NaOH auf pH 5,4 titrieren	
Fast Blue BB	75 mg
Pyridoxal	10 mg

Alkoholdehydrogenase (ADH / E.C. 1.1.1.1)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,0	70 ml
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Ethanol	1,5 ml*

*erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

Formiatdehydrogenase (FDH/E.C.1.2.1.1)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 7,0	70 ml
Na-Formiat	1 g
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

Aminopeptidasen (AP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat 0,05 mol/l pH 5,4	70 ml
L-Leucin-β-naphtylamid-HCl oder Alanin β-naphtylamid-HCl	75 mg
Fast Black K	25 mg

Malatdehydrogenase (MDH/E.C. 1.1.1.37)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
L-Apfelsäure-Na-Salz-Lösg.	3 ml
NAD-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

Menadionreduktase (MNR/E.C.1.6.99.2)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 7,0	70 ml
Menadione Na(SO ₄) ₂	75 mg
NADH	30 mg
NBT-Lösg. (10 mg/ml)	3 ml

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

Tris-HCl 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-phosphat-dehydrogenase	30 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	90 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	30 µl*

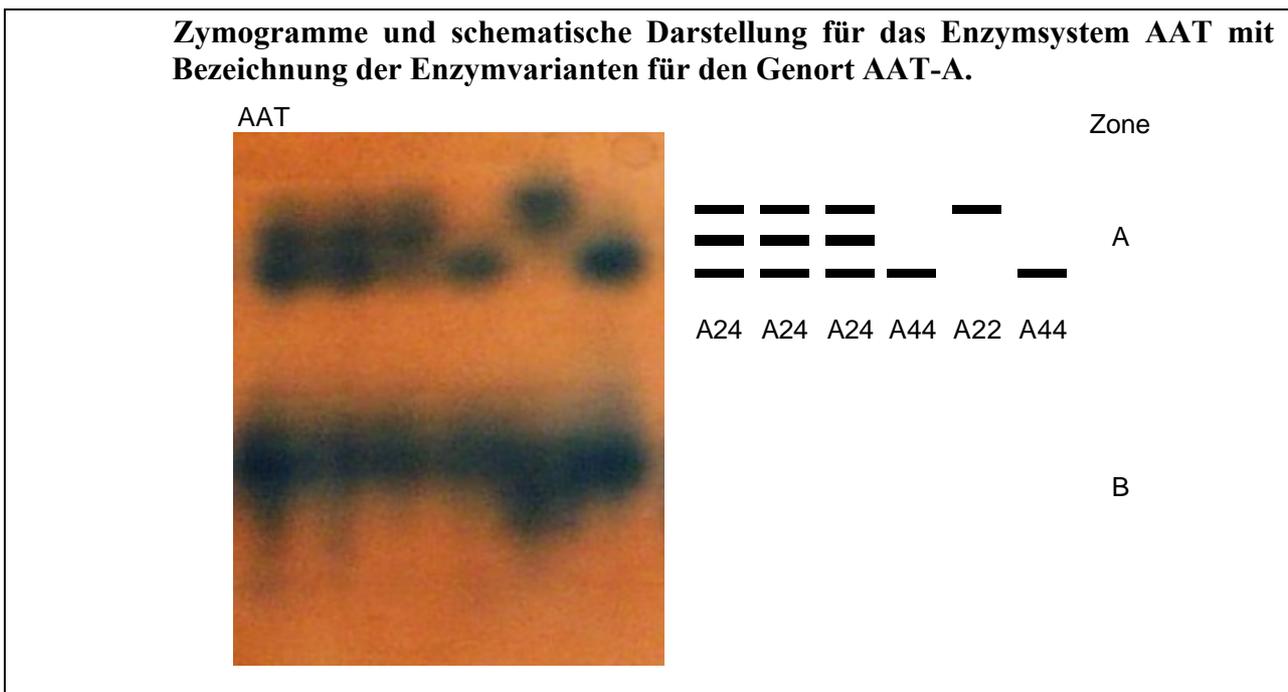
* erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

Tris-HCl 0,05mol/l pH 8,5	70 ml
Shikimisäure-Lösg.	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*)

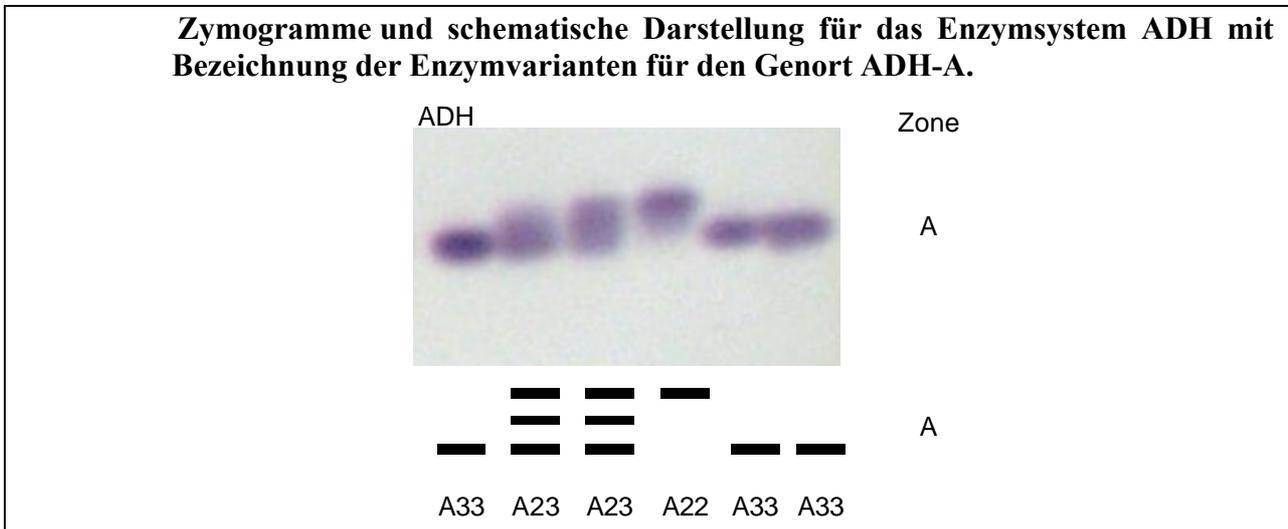
Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1



Das System AAT (GOT) wird bei Winterlinde von zwei Genorten kontrolliert, wobei nur die A-Zone in die Auswertung mit einbezogen wurde, da die Variation in der B-Zone nicht in allen Gewebearten eindeutig nachvollziehbar war. In der A-Zone wurden bei diesem dimeren Enzymsystem bislang zwei Allelvarianten gefunden, die vorläufig als A2 und A4 bezeichnet wurden: A2 tritt mit Allelhäufigkeiten von ca.15-30 % auf, die Variante A4 mit 70-85 %. Allerdings stützen sich diese Angaben auf die Untersuchung von nur 6 Populationen aus Süddeutschland.

Im kambialen Gewebe ist die Enzymaktivität für eine befriedigende Anfärbung bzw. Auswertung zu schwach.

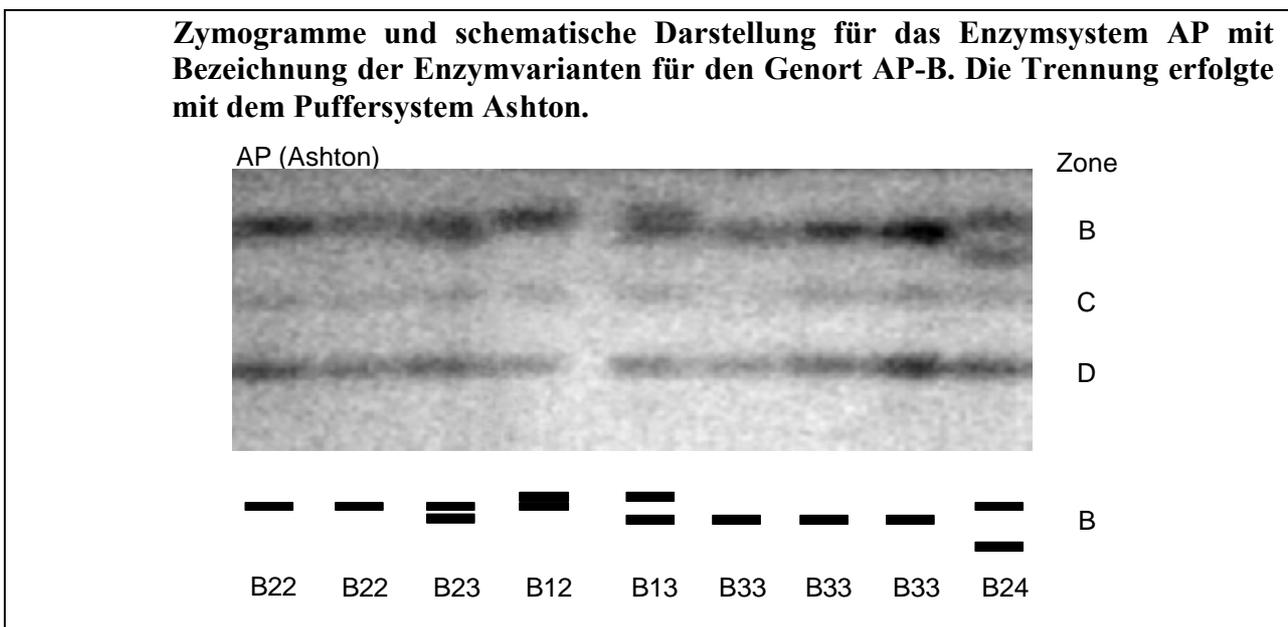
Alkoholdehydrogenase (ADH) E.C. 1.1.1.1



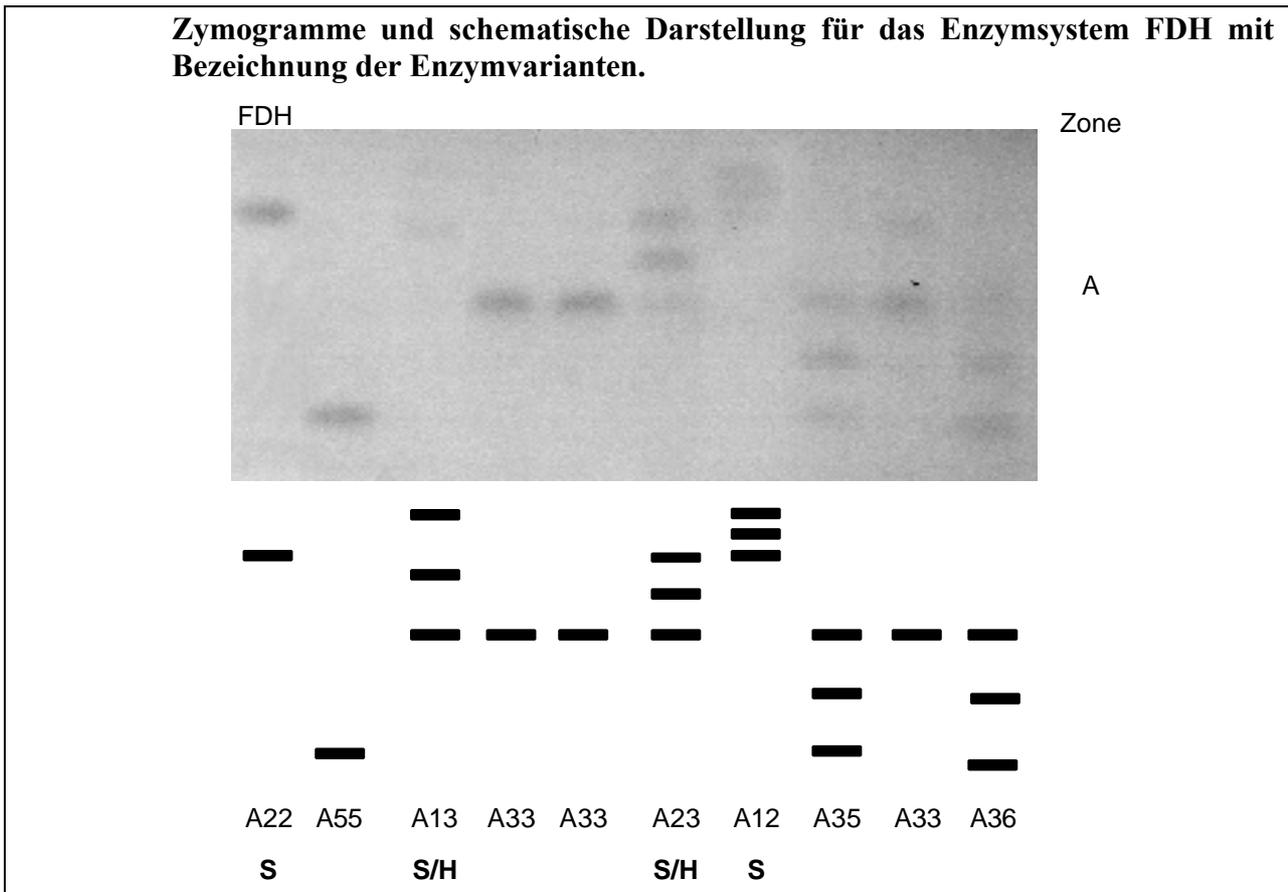
Das dimere Enzymsystem ADH wird von einem Genort kontrolliert, für welchen bislang zwei Allelvarianten mit den vorläufigen Bezeichnungen A2 und A3 beobachtet wurden. Ebenso wie beim Enzymsystem AAT wurde noch keine genetische Vererbungsanalyse durchgeführt. Die bisher untersuchten Kollektive zeigten für die Variante A2 Allelhäufigkeiten von ca. 5-15%, dementsprechend für die Variante A3 von 85-95%.

Aminopeptidase (LAP, AAP) E.C.3.4.11.1

Trennsystem Ashton/Poulik



Formiatdehydrogenase (FDH) E.C.1.2.1.2



Eine Anfärbung der Gele auf FDH zeigt generell eine schwache Intensität. Sicht- und auswertbar ist lediglich eine Zone, für die sechs Enzymvarianten gefunden wurden. Die Varianten FDH-A5 und A6 liegen nah beieinander und sollten zusammengefasst werden, wenn eine Unterscheidung nicht einwandfrei möglich ist.

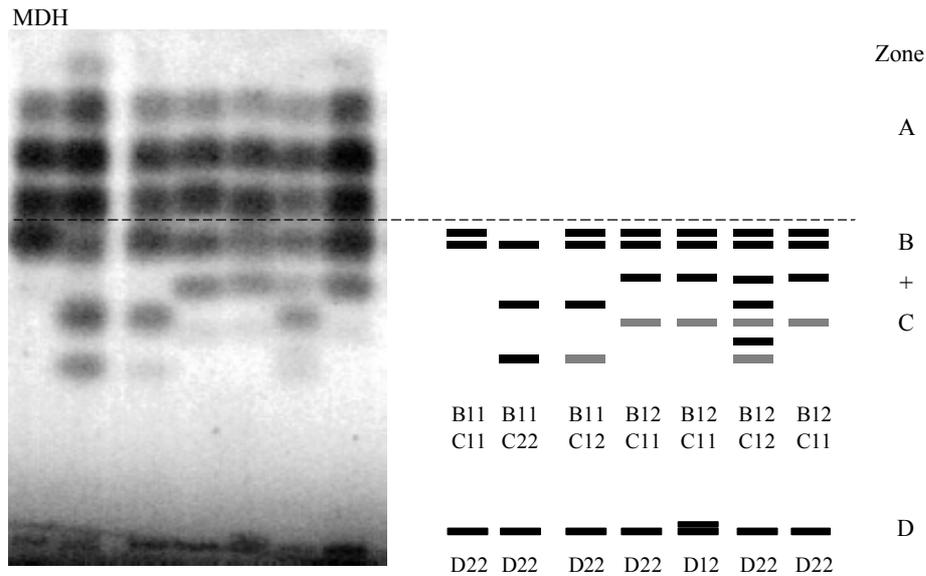
Die Enzymvarianten FDH-A5 und A6 sind artspezifisch für die Winterlinde, die Varianten FDH-A1, A2 und A4 für Sommerlinde, während FDH-A3 in beiden Arten vorkommt.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

FDH-A3 – 77 %

FDH-A5+A6 – 23 %

Zymogramme und schematische Darstellung für das Enzymsystem MDH mit Bezeichnung der Enzymvarianten für die Genorte MDH-B, -C und -D.



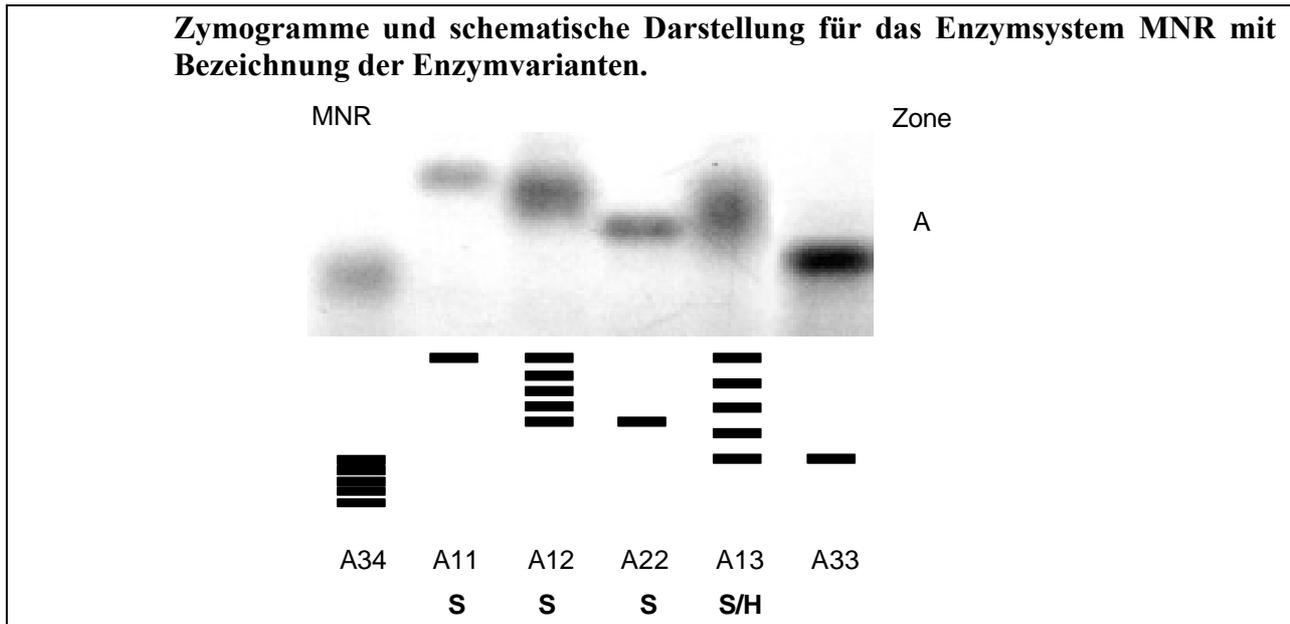
Das dimere Enzymsystem MDH besitzt bei der Linde mindestens vier Genorte. Die Zone(n) oberhalb der gestrichelten Linie in der Abbildung zeigen keine auswertbare Variation. Obwohl es sich vermutlich um mindestens zwei Genorte handelt, die Interlocushybridbänder bilden, wird dieser Bereich als A-Zone definiert. Die variablen Genorte MDH-B und -C bilden Interlocushybridbänder: Eine Identifizierung der Genotypen B12 und B22 bzw. C12 und C22 ist nur anhand von Intensitätsunterschieden möglich. Wenn aus Blatt- oder Knospengewebe Enzyme extrahiert wurden, ist eine Unterscheidung unproblematisch und die Enzymmuster in den Nachkommen der betreffenden Linden bestätigten die korrekte Interpretation der Zymogramme. Bei Samen sind diese Intensitätsunterschiede dagegen weniger stark ausgeprägt.

Alle drei Genorte weisen jeweils zwei Enzymvarianten und keine artspezifischen Allele auf.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

MDH-B1 – 50 %	MDH-C1 – 90 %	MDH-D1 – 10 %
MDH-B2 – 50 %	MDH-C2 – 10 %	MDH-D2 – 90 %

Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2



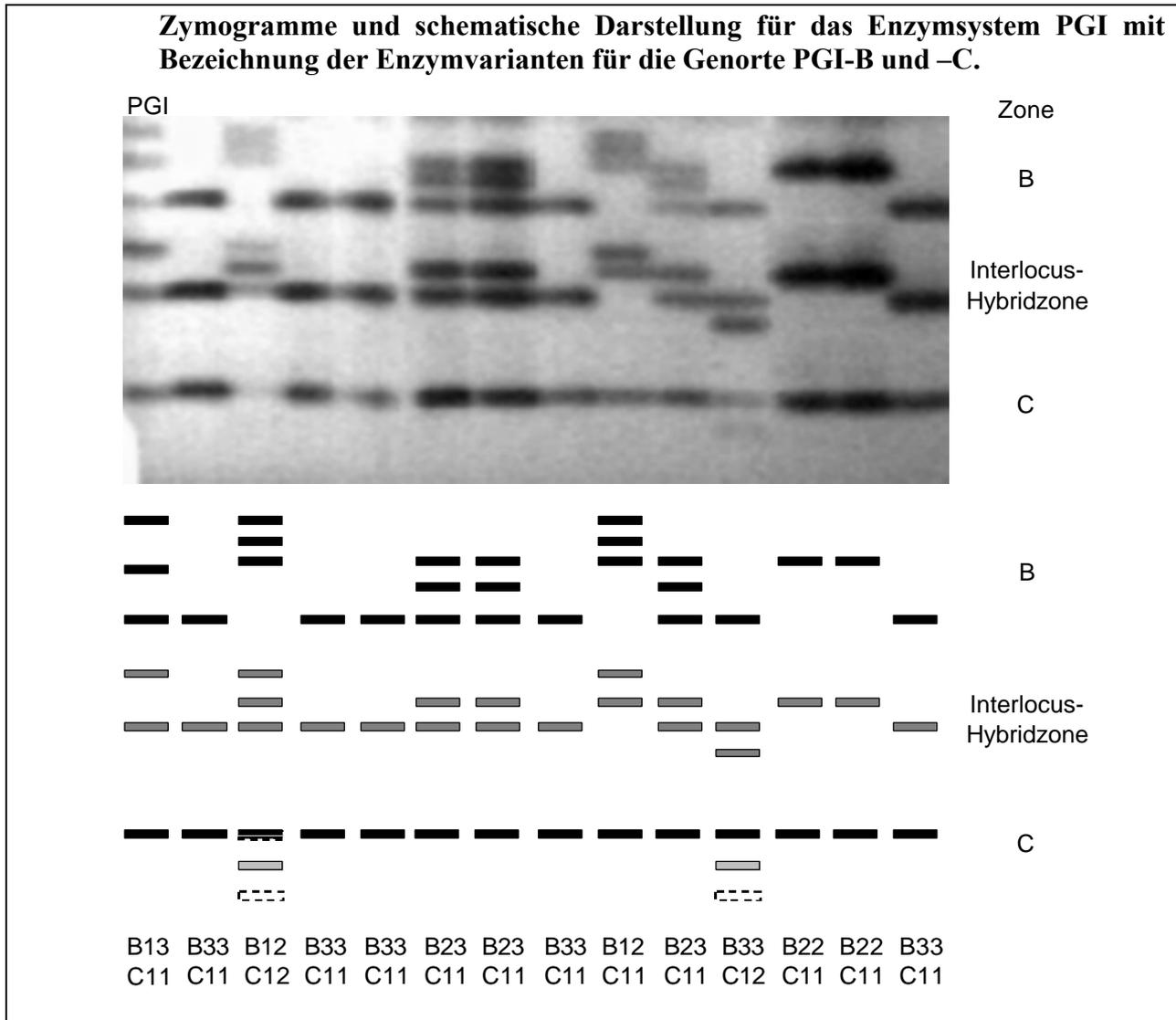
Nach Anfärbung auf das tetramere Enzymsystem MNR wird eine Zone mit vier Enzymvarianten sichtbar. Dabei sind die Enzymvarianten MNR-A3 und A4 artspezifisch für Winterlinde und die Varianten MNR-A1 und A2 für Sommerlinde. Zymogramm Nr. 1 und 3 stellen Winterlinden, Nr. 2-5 Sommerlinden und Zymogramm Nr. 5 stellt eine Hybride dar.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

MNR-A3 – 65-90%

MNR-A4 – 10-35 %

Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9



Die A-Zone des Enzymsystems PGI (in der Abbildung nicht wiedergegeben) deutet eine Variation der Enzyme an, die jedoch aufgrund der Unschärfe der Muster in der Regel nicht ausgewertet werden kann. Dagegen sind die Muster der Genorte PGI-B und –C klar und sehr gut auszuwerten. Zu beachten ist, dass sich zwischen den Genorten PGI-B und –C Interlocushybridbänder bilden. Das als C2 bezeichnete Enzym lässt sich phänotypisch nur über Intra- und Interlocushybridbänder auf dem Zymogramm nachweisen. Für die Winterlinde wurden bislang für den Genort PGI-B drei und für PGI-C zwei Enzymvarianten nachgewiesen. Die Sommerlinde zeigt bei diesem System gänzlich andere Muster (ohne Abbildung).

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGI-B1 – 0-10%

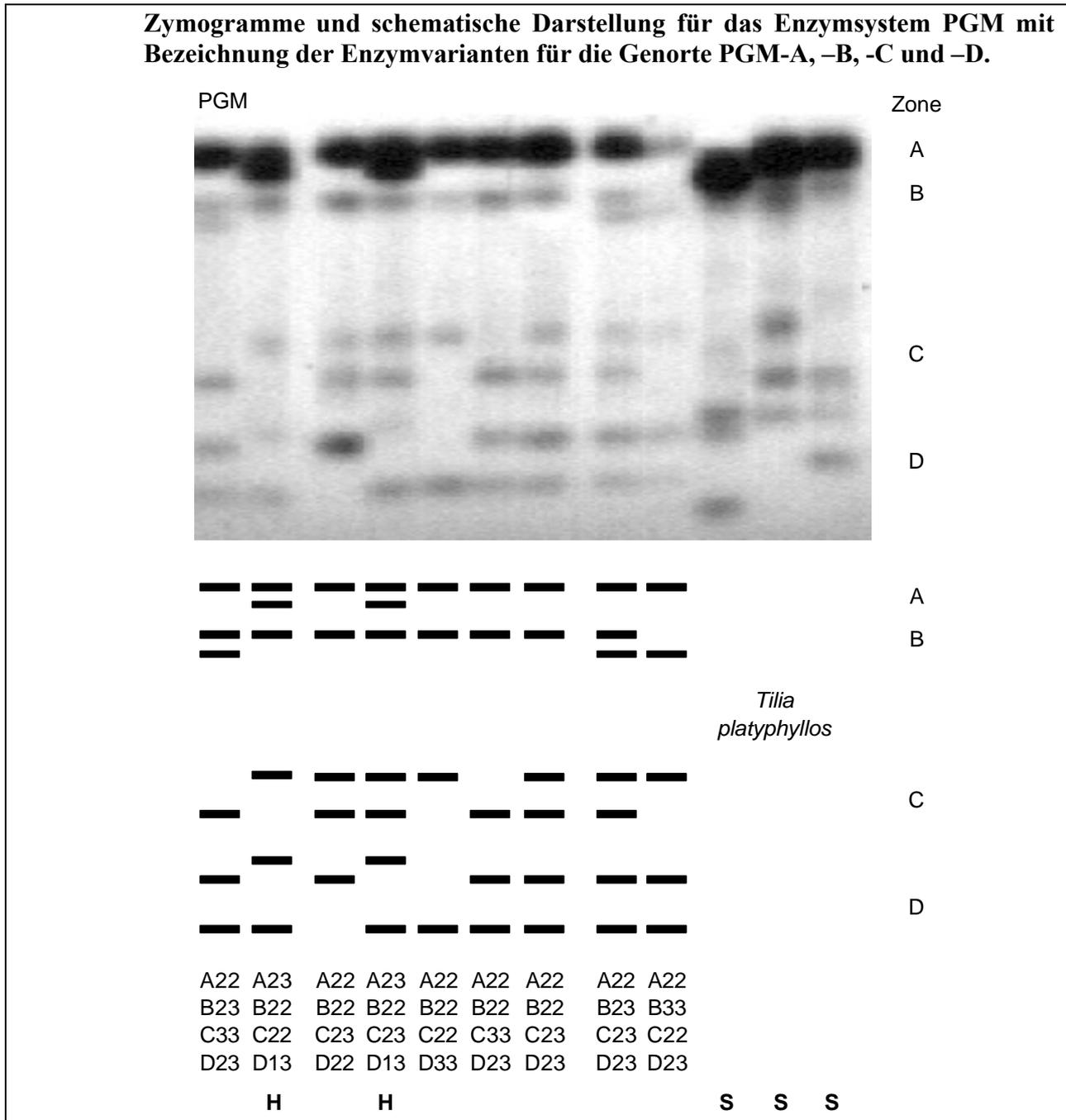
PGI-C1 – 95%

PGI-B2 – 20-40%

PGI-C2 – 5%

PGI-B3 – 60-80%

Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1



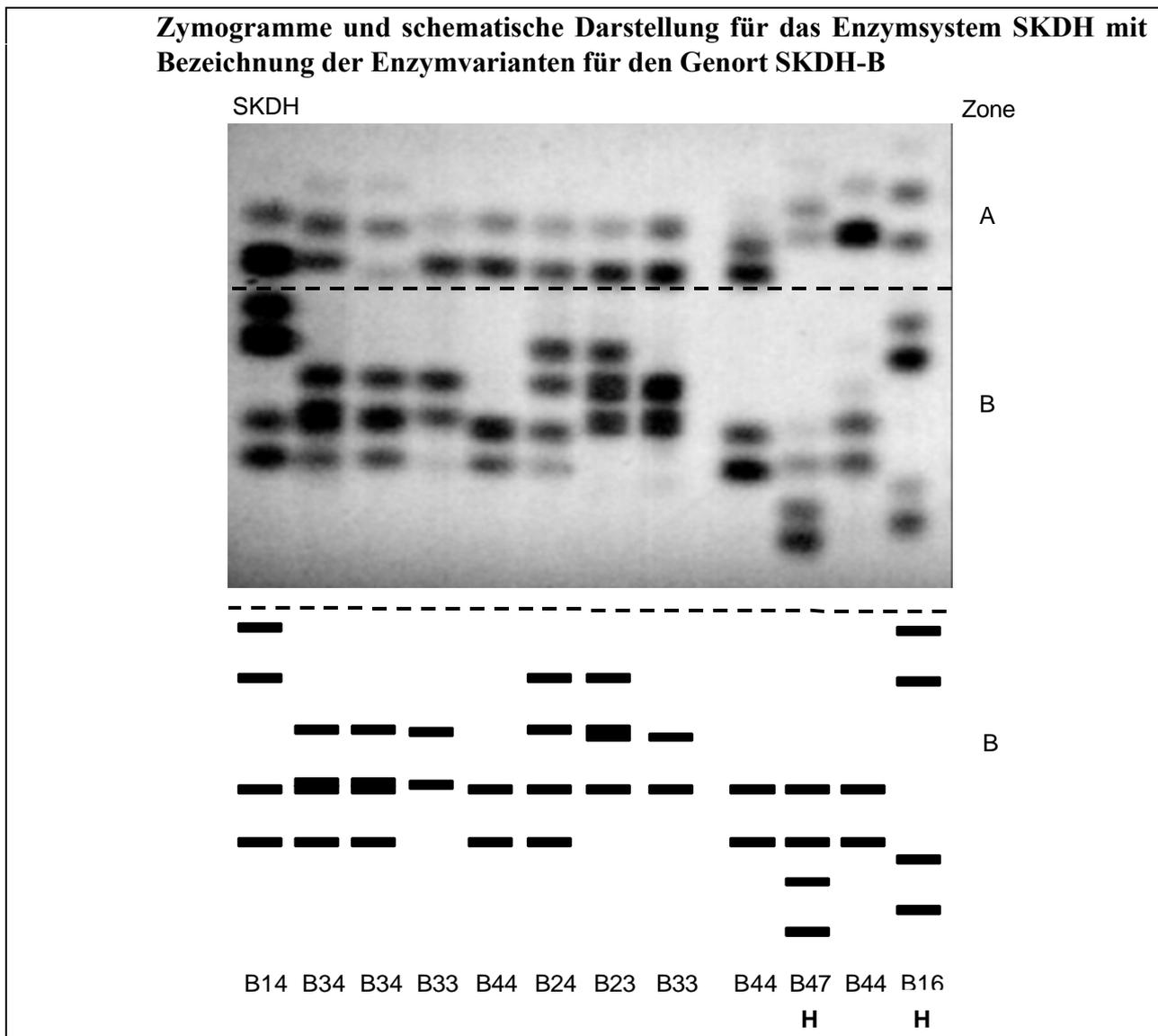
Für die Winterlinde können bei dem monomeren Enzymsystem PGM vier Genorte ausgewertet werden. Dabei zeigen sich für alle vier Zonen je drei Enzymvarianten, (Allel PGM-A1 und C1 sind in der Abbildung nicht abgebildet). Die Enzymvariante PGM-D1 ist ein für die Sommerlinden artspezifisches Enzym. Die drei in der Abbildung ganz rechts zu sehenden Muster sind Enzymvarianten der Sommerlinde, welche teilweise mit denen der Winterlinde identisch, zum Teil artspezifisch sind. Das zweite und vierte Zymogramm von links sind Hybriden. Neben typischen Enzymvarianten der Winterlinde besitzt es auch die Variante D1, welche artspezifisch für die Sommerlinden ist. Für die meisten artspezifischen Enzyme der Sommerlinde erfolgte

noch keine Benennung. Dazu bedarf es einer speziell auf die Vererbungsanalyse der Sommerlinde abgestimmten Untersuchung.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

PGM-A1 – <3%	PGM-B1 – 1-4%
PGM-A2 – >95%	PGM-B2 – 80-95%
PGM-A3 – <3%	PGM-B3 – 80-95%
PGM-C1 – <5%	PGM-D2 – 40-60%
PGM-C2 – 35%	PGM-D3 – 40-60%
PGM-C3 – 65%	

Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25



Das System SKDH färbt in zwei Zonen an. Auf die Auswertung der A-Zone des monomeren Enzymsystems sollte verzichtet werden, da Unstimmigkeiten bei Vererbungsanalyse auftraten, die bis dato ungeklärt sind. Der Genort SKDH-B entschädigt dafür mit einer großen Variation von sieben Enzymen, von denen die Varianten B1 bis B4 artspezifische Enzyme der Winterlinde und die Varianten B5 bis B7 artspezifisch für Sommerlinde sind. Es ist zu beachten, dass beim Genort SKDH-B ein homozygot vorliegendes Enzym als Doppelbande erscheint und dass bei Heterozygoten, je nach Wandergeschwindigkeit der Enzyme, Dreifach- oder Vierfachbänder zu sehen sind.

Zusätzlich erschwert wird die Interpretation der Zymogramme durch die entgegengesetzte Intensität der Doppelbänder: Bei Verwendung von Blatt- oder Knospengewebe stellt sich bei den Enzymen das untere Band als Hauptband und das obere als Nebenband dar; bei den Samen verhält es sich genau umgekehrt.

Orientierende Angaben über die Häufigkeiten der Varianten:

SKDH-B1 – 10%

SKDH-B2 – 10%

SKDH-B3 – 40%

SKDH-B4 – 40%