

**Isoenzymuntersuchungen bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)
- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -**

**zusammengestellt von
MONIKA KONNERT**

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

unter Mitwirkung von

Eva Cremer*, Erwin Hussendörfer*, Aikaterini Dounavi*, Thomas Wimmer,**

*** FVA Freiburg, **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 und an der Forstlichen Versuchsanstalt Baden-Württemberg in Freiburg durchgeführt wurden.

Bei der Beschreibung der Zymogramme, ihrer genetischen Interpretation und der Bezeichnung der Enzyme wurden schwerpunktmäßig folgende Arbeiten von LEINEMANN (1998) und KLUMPP (2001) berücksichtigt:

LEINEMANN; L. (1998): Genetische Untersuchungen an Rassen der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.] Franco) am Beispiel gesunder und geschädigter Bestände, Dissertation an der Universität Göttingen.

KLUMPP. R. (1999): Untersuchungen zur Genökologie der Douglasie (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) FRANCO). Dissertation an der Universität Göttingen.

Beide Studien enthalten auch umfangreiche Literaturangaben zu genetischen Aspekten bei Douglasie, inklusiv weiterer methodischer Details.

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 Douglasie untersuchten Enzymsysteme und deren kontrollierende Genloci

Enzym und Nomenklatur	Genort	Struktur	Häufige Allele	Trenn-System
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	A ₂ B ₃ C ₂	Poulik
Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) -E.C.1.1.1.49	G-6-PGDH-A	Dimer	A ₁ ,A ₃	T.-C.
Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2	GDH-A	Hexamer	A ₂	Poulik
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A	Dimer	A ₂ ,A ₄	T.-C.
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	A ₂ ,A ₄ ,A ₅ B ₃	Ashton
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C	Dimer	A ₃ B ₂ C ₂	T.-C.
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PDGH-A	Dimer	A ₃ ,A ₆	T.-C.
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-B	Dimer	B ₂	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B	Monomer	A ₄ B ₄	T.-C. Poulik
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-B	Dimer	B ₂	Ashton
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-B	Monomer	B ₂	T.-C.

Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

Proben von Knospengewebe (grünes meristematisches Gewebe ohne Hüllblätter), Samengewebe (kompletter Embryo oder Teile des Endosperms) oder 2-3-tägigen Keimlingen (z.B. aus Keimtests) wurden in einer Tris-HCl-Pufferlösung pH 7,2 oder 7,5 zur Extraktion der Enzyme homogenisiert.

Zusammensetzung des Homogenatpuffers (*Extraction buffers*)

Puffer 1: 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

Puffer 2: 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
Dithiothreitol DTT	(1 mM)	0,015 g
EDTA	(0,5 mM)	0,015 g
Tergitol 15-S-9	(1 %)	1 ml

Anmerkung: Gute Ergebnisse werden bereits mit Puffer 1 erhalten. Weitere Zusätze bringen keine wesentliche Verbesserung der Trennungen.

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

a) Rezepturen ASP Teisendorf

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.	110 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	300 ml (1:6,5 dest. H ₂ O)	33,0 g Stärke, 8,8 g Sacch.	110 mA	5,5 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gerbu-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer		Gelzusammensetzung	Stromstärke (U = const.)	Laufzeit
*					
Ashton	pH 8,1	300 ml (10 % EP) (1:0,5 dest. H ₂ O)	27,0 g Stärke, 5,0 g Sacch.	100 mA	4,5 h
*					
Poulik	pH 8,7	300 ml (3 % EP)	27,0 g Stärke, 2,0 g Sacch.	115 mA	5,5 h
*					
Tris-Citro	pH 7,5	300 ml (1:6,5 dest. H ₂ O)	27,0 g Stärke, 3,0 g Sacch.	110 mA	5,5 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

b) Rezepturen FVA Freiburg (Biomol-Stärke)

Trennsystem	Stärke (in g)	Zucker (in g)	Harnstoff (in g)	Puffer (in ml)	Stärke- konzentration
Tris-Citro pH 7,5 (1 Gel / 3 Schichten)	26,4		1,9	220	12%
Tris-Citro pH 8,5 (1 Gel / 3 Schichten)	26,4		1,9	220	12%
Tris-Citro-Histidin pH 6,2 (1 Gel / 3 Schichten)	26,4	4,4		220	12%
Ashton pH 8,1 (1 Gel / 3 Schichten)	25,3	4,4		220	11,5%

Gelschnitte (*gel slabs*)

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

Gelschnitte: - = dünn o = mittel + = dick

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

a) Rezepturen ASP Teisendorf

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

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 H₂O dest. mischen

b) Rezepturen FVA Freiburg

Tris-Citro pH 7,5	
Elektrodenpuffer	Gelpuffer pH 7,5
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H ₂ O (43 mmol/l) 9 g/l	Tris (40 mmol/l) 24,29 g/ 5l Citronensäure H ₂ O (12,28 mmol/l) 12,86 g/ 5l
Tris-Citro pH 8,5	
Elektrodenpuffer	Gelpuffer pH 8,5
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H ₂ O (17 mmol/l) 3,5 g/l	Tris (40,1 mmol/l) 4,86 g/l Citronensäure H ₂ O (4,8 mmol/l) 1 g/l
Tris-Citro-Histidin pH 6,2	
Elektrodenpuffer T.C. pH 7,5	Gelpuffer pH ~ 6,7
Tris (140 mmol/l) 17,0 g/l Citronensäure H ₂ 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
Ashton pH 8,1	
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= 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

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	
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*)

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

Substratlösung:

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

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH / E.C. 1.1.1.49)

Tris-HCl-Puffer 0,2 mol/l pH 8,0	70 ml
D-Glucose-6-Phosphat	28 mg
NADP-Lösg.	3 ml
MTT-Lösg.	4 ml
MgCl ₂ -Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	2 ml

Glutamatdehydrogenase (GDH/E.C. 1.4.1.2)

Tris-HCl 0,05 mol/l pH 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 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

Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat pH 5,4	75 ml
Leucin-B-naphtylamid-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-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-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 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	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	90 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Glucose-6-phosphatdehydrogenase	15 µl*

* erst zum Schluss vor Beginn der Färbung hinzugeben

Shikimatdehydrogenase (SKDH/E.C. 1.1.1.25)

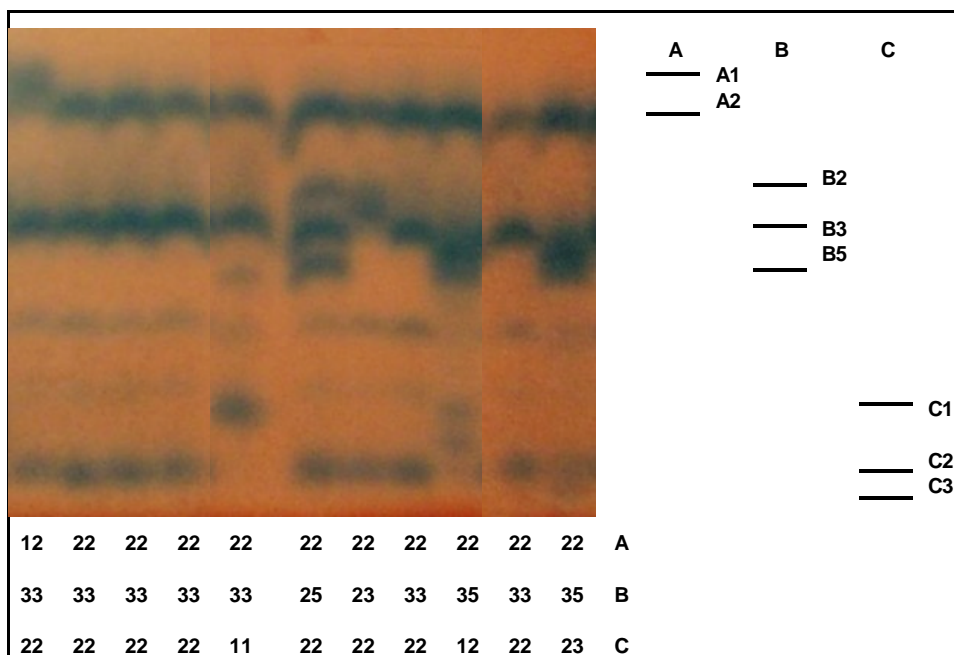
Tris-HCl 0,05 mol/l pH 8,5	70 ml
Shikimisäure	75 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

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

Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C. 2.6.1.1

AAT zeigt 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 C-Zone färbt manchmal relativ schwach an, was zu Schwierigkeiten bei der Auswertung führen kann. Die Zonen sind deutlich getrennt. Heterozygote Individuen zeigen Dreifachbanden mit einem deutlich stärker gefärbten Hybridband in der Mitte, was auf eine dimere Quartärstruktur des Enzyms schließen läßt. Die B- und C-Zone zeigen jeweils drei Varianten.

Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) E.C. 1.1.1.49

G-6-PDH zeigt nur eine Aktivitätszone (G-6-PDH-A). Das Enzym ist dimer, heterozygote Genotypen zeigen daher Dreifachbanden, wobei die unteren beiden Banden häufig intensiver gefärbt sind, als die obere Bande. In dieser Zone lassen sich fünf Varianten unterscheiden (A⁰, A1, A2, A3 und A4), wobei mehrmals eine Variante aufgetaucht ist, die weiter zur Anode wandert als Variante A1. Bei der Interpretation der Zymogramme ist außerdem zu beachten, dass der Abstand zwischen den Varianten A1 und A3 genauso groß ist, wie der Abstand zwischen den Varianten A3 und A4. Zudem gibt es eine Variante, die sich aufgrund ihrer Migrationstrecke genau zwischen den Varianten A3 und A4 befindet.

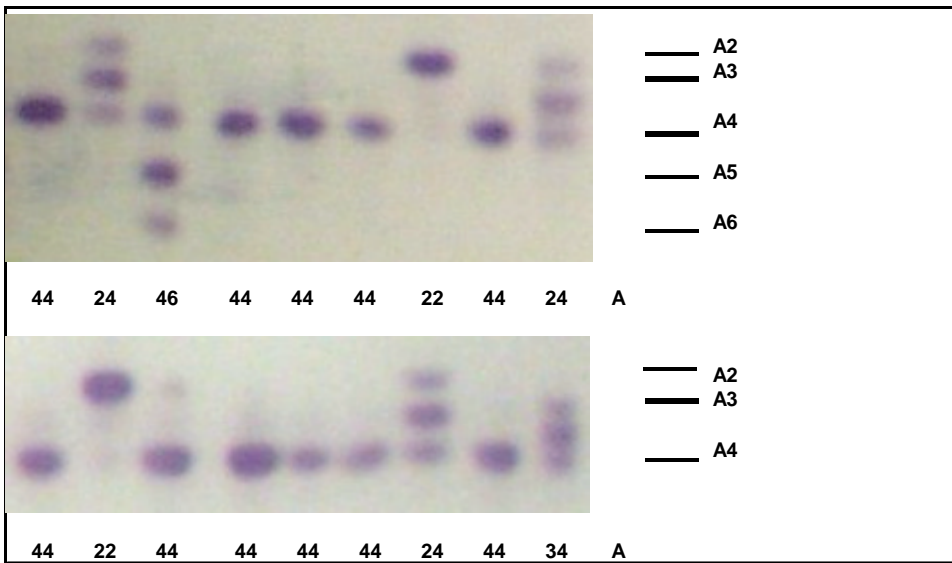
Zymogramm der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C. 1.1.1.42

IDH zeigt nur eine Aktivitätszone (IDH-A), bei der bis zu sechs Varianten unterschieden werden können (A1, A2, A3, A4, A5, A6), von denen die Varianten A2 und A4 als häufig zu bezeichnen sind. Gewöhnlich tritt ein Nebenband auf, das in einem bestimmten Abstand zur Hauptbande migriert. In diploiden Gewebe heterozygoter Individuen können bei IDH deutliche Dreifachbanden beobachtet werden, wie es bei dimeren Enzymsystemen zu erwarten ist. Bei der Interpretation der Zymogramme ist außerdem zu beachten, dass der Abstand zwischen den Varianten A2 und A4 genauso groß ist, wie der Abstand zwischen den Varianten A4 und A5.

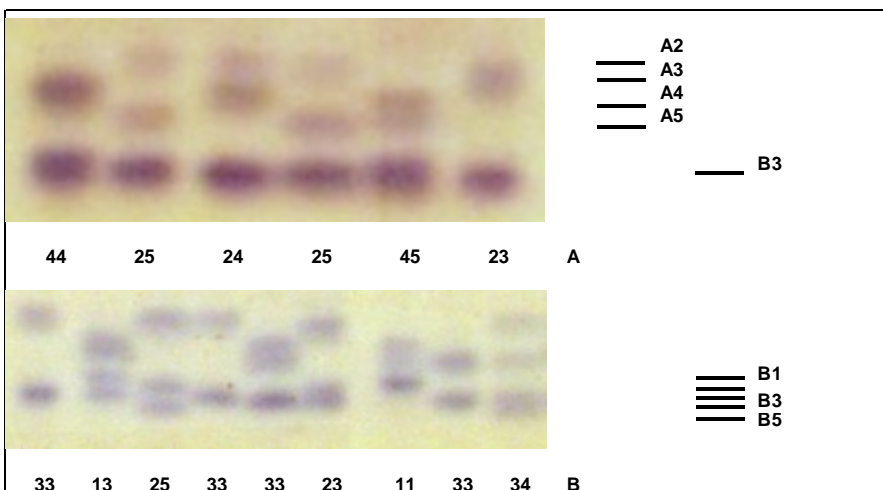
Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Leucinaminopeptidase (LAP) E.C. 3.4.11.1

LAP besitzt zwei gut auswertbare Aktivitätszonen mit monomerer Enzymstruktur (LAP-A und LAP-B), die dicht beieinander liegen. Überschneidungen einzelner Varianten dieser beiden Zonen wurden nicht beobachtet. In der A-Zone lassen sich fünf Varianten beobachten (A1, A2, A3, A4, A5), wobei die Variante A1 nur sehr selten auftritt. In dieser Zone erscheinen homozygot vorliegende Enzyme teilweise als Doppelbanden. Die B-Zone zeigt ebenfalls fünf Varianten (B1, B2, B3, B4 und B5), wobei sich die Varianten in ihrer Wanderungsstrecke nur geringfügig voneinander unterscheiden.

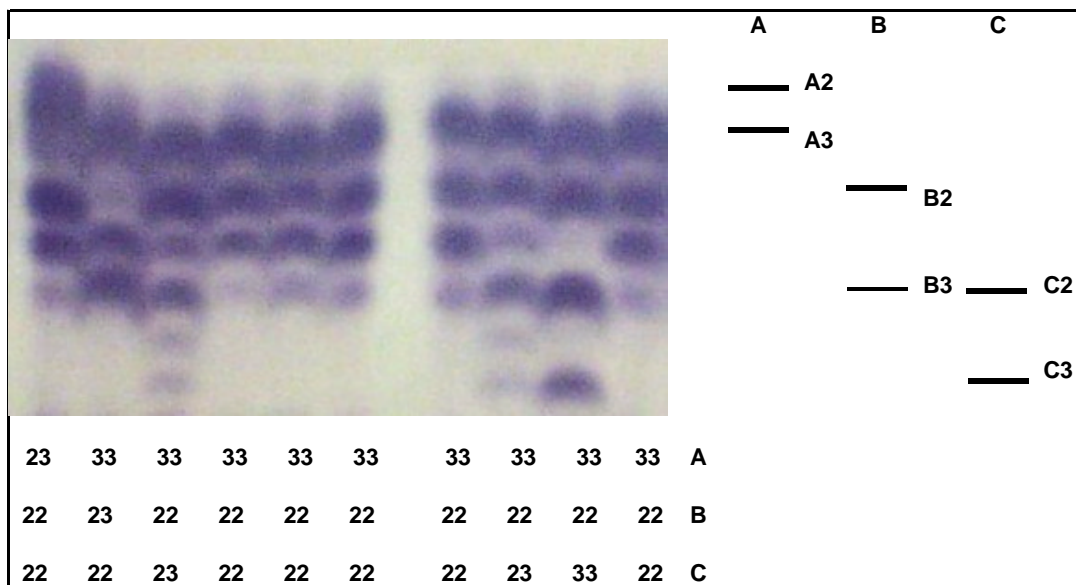
Zymogramm des Enzymsystems Leucinaminopeptidase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Malatdehydrogenase (MDH) E.C. 1.1.1.37

Bei MDH können vier Zonen beobachtet werden (MDH-A, MDH-B, MDH-C und MDH-D), von denen die D-Zone i.d.R. nicht ausgewertet wird, da die Aktivität zu schwach ist. Die Zonen A, B und C liegen dicht beieinander, so dass es zu Überschneidungen einzelner Varianten der B- und C-Zone kommen kann. Zwischen den Zonen B und C zeigt sich zudem immer ein Hybridband, das seine Lage entsprechend den Varianten in B und C verändert. Aufgrund der dimeren Struktur von MDH sind in heterozygotem Gewebe Dreifachbanden zu erkennen. Die Zone MDH-A zeigt vier Varianten (A1, A2, A3, A4), wobei die Variante A3 als häufigste erscheint. In den Zonen B und C wurden jeweils drei Varianten nachgewiesen (Varianten B1, B2, B3 und Varianten C1, C2, C3), von denen B2 bzw. C2 am häufigsten auftreten.

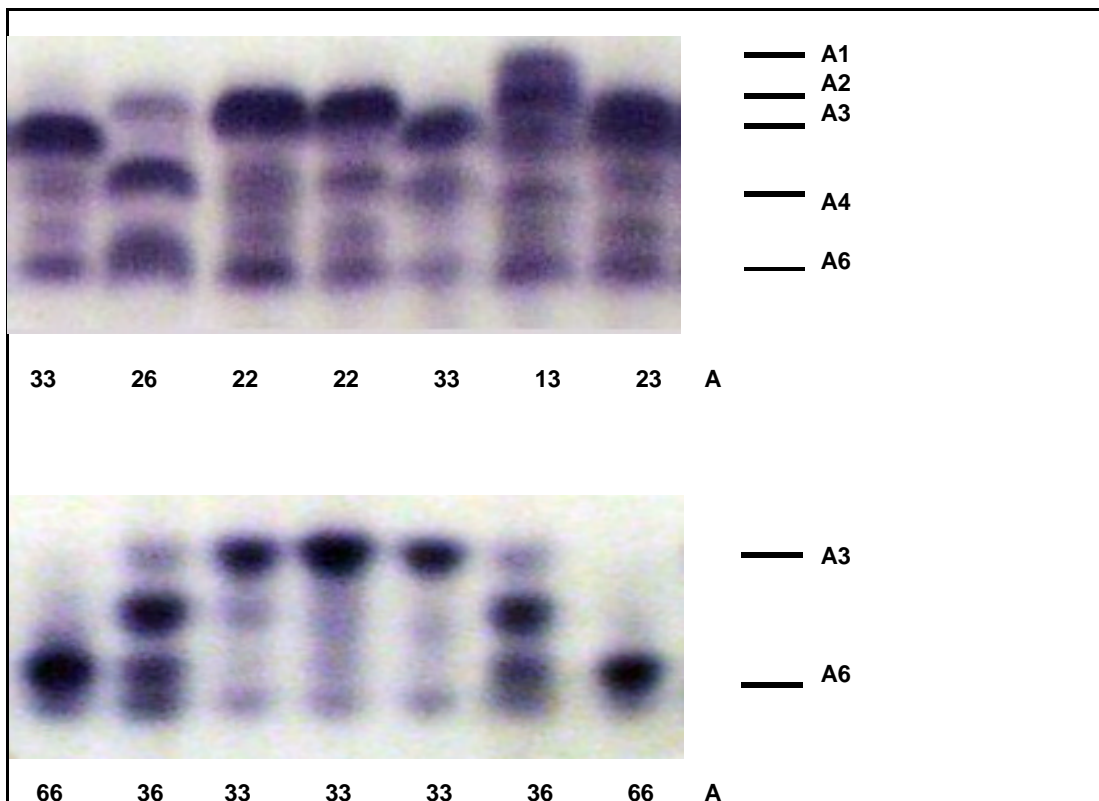
Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



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

6-PGDH zeigt eine Zone (6-PGDH-A), bei der insgesamt acht Varianten unterschieden werden können (A1 - A8). Allerdings kommen nur die Varianten A1, A3 und A6 häufiger vor. Als dimeres Enzymsystem zeigt 6-PGDH im heterozygoten Zustand immer Dreifachbanden mit einem deutlich intensiver gefärbten Hybridband. Neben den Banden, die eindeutig Genotypen zugeordnet werden können, gibt es noch zahlreiche Begleitbanden, die die Auswertung erschweren. Wahrscheinlich ist noch ein zweiter Genort (6-PGDH-B) an der Ausprägung der Muster beteiligt, der aber nicht sicher ausgewertet werden kann.

Zymogramm der 6-Phosphogluconatdehydrogenase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)

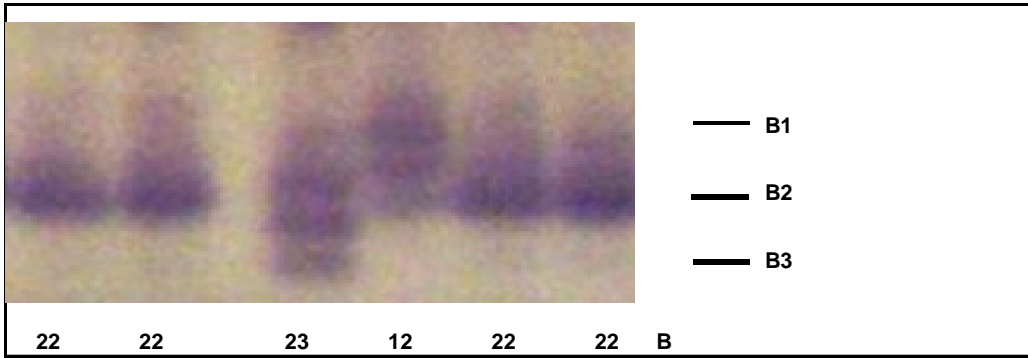


Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C. 5.3.1.9

Es lassen sich bei dem dimeren Enzymsystem PGI zwei Aktivitätszonen erkennen (PGI-A und PGI-B), von denen i.d.R. nur die langsamer migrierende B-Zone ausgewertet wird. In Abhängigkeit von den angewendeten Extraktions- und Trennbedingungen können mitunter bei

homozygoten Genotypen drei Banden und bei Heterozygoten fünf Banden auftreten. Die B-Zone zeigt vier Varianten (B1, B2, B3 und B4), von denen Variante B2 am häufigsten zu beobachten ist.

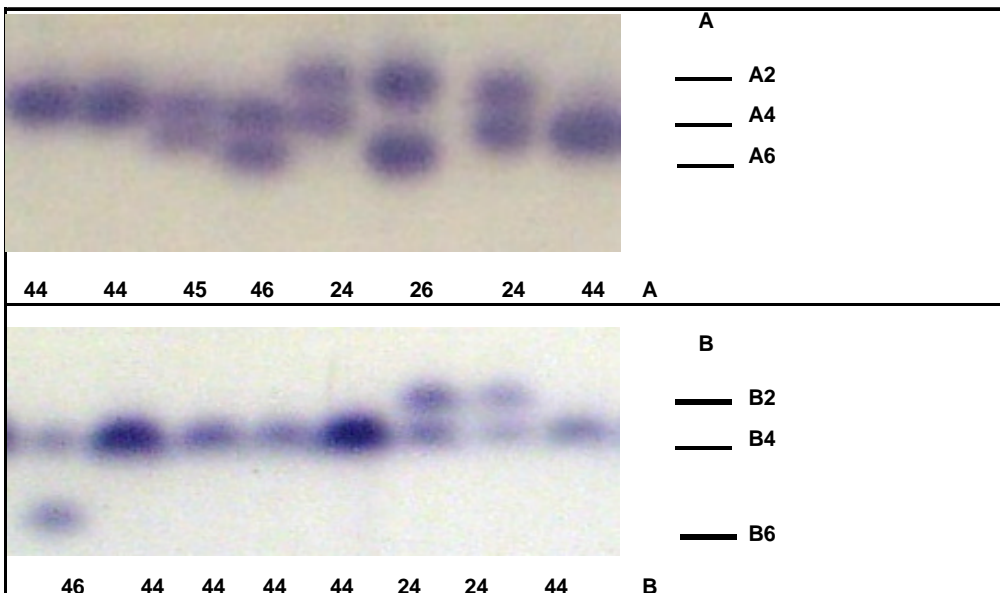
Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Phosphoglucomutase (PGM) E.C. 2.7.5.1

Das monomere Enzymsystem PGM zeigt bei der Douglasie zwei Aktivitätszonen (PGM-A und PGM-B). Die Bandenmuster in der A-Zone zeichnen sich durch eine sehr intensive Färbung aus und sind im Tris-Citrat-System gut aufgetrennt. Die Zone wird auf dem gleichen Gel wie IDH angefärbt. In der A-Zone können insgesamt sechs Varianten beobachtet werden, von denen A2, A4 und A6 häufig sind. Die Färbung der B-Zone ist meist von geringerer Intensität. Diese Zone trennt sich im Poulik-System am besten auf. Auch hier wurden bis zu 6 Varianten beobachtet. Die häufigste wurde von uns mit B4 bezeichnet.

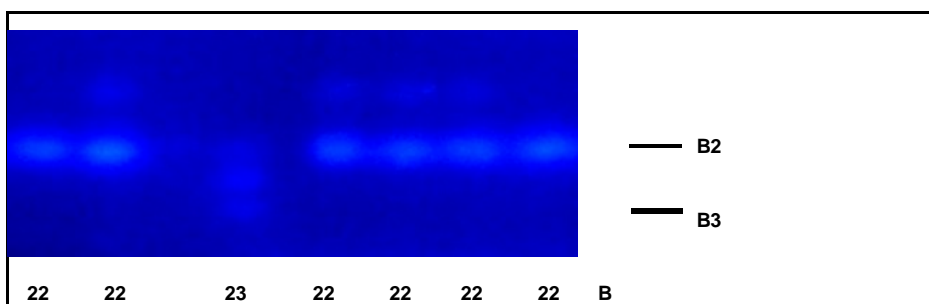
Zymogramm der Phosphoglucomutase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C. 3.1.1.1

Das dimere System FEST wird bei Douglasie von zwei Genorten kontrolliert. Der schneller wandernde Genort FEST-A zeigt hohe Variation, ist aber wegen der Vielzahl der Banden und der geringen Laufunterschiede nicht sicher auswertbar. 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 meist Häufigkeiten von über 95 % erreicht.

Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)



Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C. 1.1.1.25

SKDH ist ein monomeres System mit Variation in einer nahe bei der Kathode liegenden Zone. Obwohl vermutlich von zwei Genorten kontrolliert, kann nur einer davon als SKDH-B bezeichnet, ausgewertet werden. Es zeigen sich hier vier Varianten. Die häufigste ist B2. B3 ist schwierig zu identifizieren, da sie sehr nahe bei B2 liegt. Erschwert wird die Auswertung durch eine Begleitbande, die z.B. beim homozygoten B2B2 auf der Höhe von B1 erscheinen kann.

Zymogramm der Shikimatdehydrogenase bei Douglasie (*Pseudotsuga menziesii*)

