

Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies*)
- Anleitungen zur Trennmethodik und Auswertung der Zymogramme -

zusammengestellt von

MONIKA KONNERT* und WERNER MAURER**

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

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

unter Mitwirkung von

Thomas Wimmer, Susanne Nowak und Evelyn Häußl

ASP Teisendorf

Das Laborhandbuch zu Isoenzymuntersuchungen bei Fichte (*Picea abies*) 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.

Die vorliegende, überarbeitete und aktualisierte Fassung enthält zusätzlich zu der ersten Fassung in Teilen veränderte Trennsysteme und neue Abbildungen der Zymogramme mit Angaben zu deren genetischer Interpretation. Daten zur genetischen Analyse sowie Angaben zur elektrophoretischen Trennung auf Polyacrylamid (PAGE) sind bei Bedarf der ersten Fassung zu entnehmen. 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 Fichte häufig 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>
Aconitase (ACO) E.C.4.2.1.3	ACO-A	Monomer	A ₂	Tris-Citro
Aspartataminotransferase (AAT,GOT) E.C.2.6.1.1	AAT-A AAT-B AAT-C	Dimer	A ₃ B ₂ C ₂ ,C ₄	Poulik
Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1	FEST-A FEST-B	? Dimer	? B ₂	Ashton
Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2	GDH-A	Hexamer	A ₂	Poulik
Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42	IDH-A IDH-B	Dimer	A ₃ B ₃	Tris-Citro
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1	LAP-A LAP-B	Monomer	A ₃ ,A ₄ B ₃ ,B ₄ ,B ₆	Ashton
Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37	MDH-A MDH-B MDH-C	Dimer	A ₂ B ₂ C ₂ ,C ₄	Tris-Citro
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2	MNR-A MNR-B MNR-C	Tetramer	A ₂ ,A ₄ B ₃ C ₂	Poulik
6-Phosphogluconatdehydrogenase (6-PGDH) E.C.1.1.1.44	6-PGDH-A 6-PDGH-B 6-PGDH-C	Dimer	A ₂ B ₂ ,B ₅ C ₂ ,C ₅	Tris-Citro
Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPCA) E.C.4.1.1.31	PEPCA-A	Monomer	A ₂	Tris-Citro
Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9	PGI-A PGI-B	Dimer	A ₂ B ₂ ,B ₃	Ashton
Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1	PGM-A PGM-B	Monomer	A ₂ B ₂	Poulik o. Tris-Citro
Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25	SKDH-A SKDH-B	Monomer	A ₃ B ₂	Tris-Citro

Enzymextraktion (*Enzyme extraction*)

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

Zusammensetzung des Homogenatpuffers (*Extraction buffers*) 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

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 7,5 300 ml (1:6,5 dest. H ₂ O)	33,0 g Stärke, 8,8 g Sacch.	105 mA	6 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gerbu-Stärke

Trennsystem	Gelpuffer	Gelzusammensetzung	Stromstärke	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 8,7 300 ml (3 % EP)	27,0 g Stärke, 3,0 g Sacch.	100 mA (I = const.)	3,5 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 (U = const.)	5,5 h

* Glasplatte 27 * 11,5 cm

Gelschnitte (*gel slabs*)

	unten	mitte	oben	
Ashton	o LAP	- PGI	o + FEST	
Poulik	+ GOT	o MNR	o GDH oder PGM	
Tris-Citro	o 6-P	o MDH	o ACO	
Tris-Citro	o IDH	o SDH	o PGM	o PEPCA

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	

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		

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	
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)

Aconitase (ACO/E.C. 4.2.1.3)

Tris-HCl-Puffer (0,2M) pH 8,0	70 ml
Cis-Aconitsäure	100 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	2 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl
Isocitratdehydrogenase	500 µl

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.

Glutamatdehydrogenase (GDH/E.C. 1.4.1.2)

Tris-HCl-Puffer (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-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

Leucinaminopeptidase (LAP/E.C.3.4.11.1)

Tris-Maleat 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

Menadionreduktase (MNR/E.C.1.6.99.2)

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

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

Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPCA/E.C. 4.1.1.31)

Lösung A:

Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l pH 8,5)	60 ml
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	225 mg
Phosphoenolpyruvat	120 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	3 ml

Lösung B:

Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l pH 8,5)	10 ml
Fast Blue BB	210 mg

Das Gel wird in Lösung A 15 Minuten im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wird Lösung B dazugegeben. Nach etwa 20 Minuten muss das Gel ausgewertet werden.

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)

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)

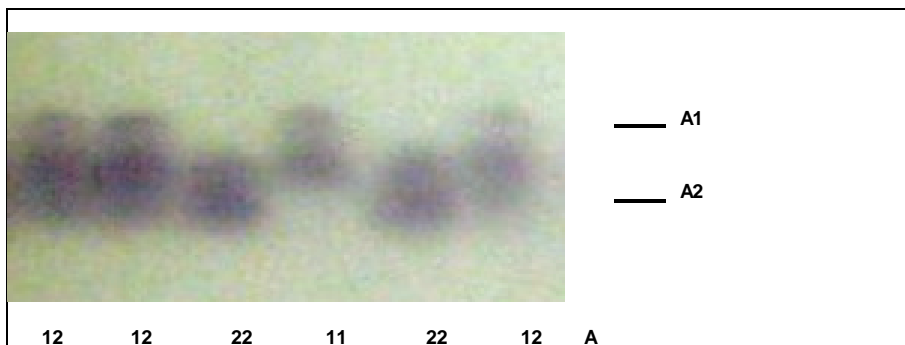
Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l pH 8,5)	70 ml
Shikimisäure	75 mg
MgCl ₂ -Lösg. (10 %)	2 ml
NADP-Lösg.	1 ml
MTT-Lösg.	2 ml
PMS-Lösg.	300 µl

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

Aconitase (ACO) E.C.4.2.1.3

Das monomere System der Aconitase wird bei Fichte von einem Genort kontrolliert, an dem drei Allele nachgewiesen wurden. Am häufigsten ist das Allel mit der mittleren Wandergeschwindigkeit, als A2 bezeichnet. Es liegt meist zwischen 60 % und 80 %.

Zymogramm der Aconitase bei Fichte (*Picea abies*)

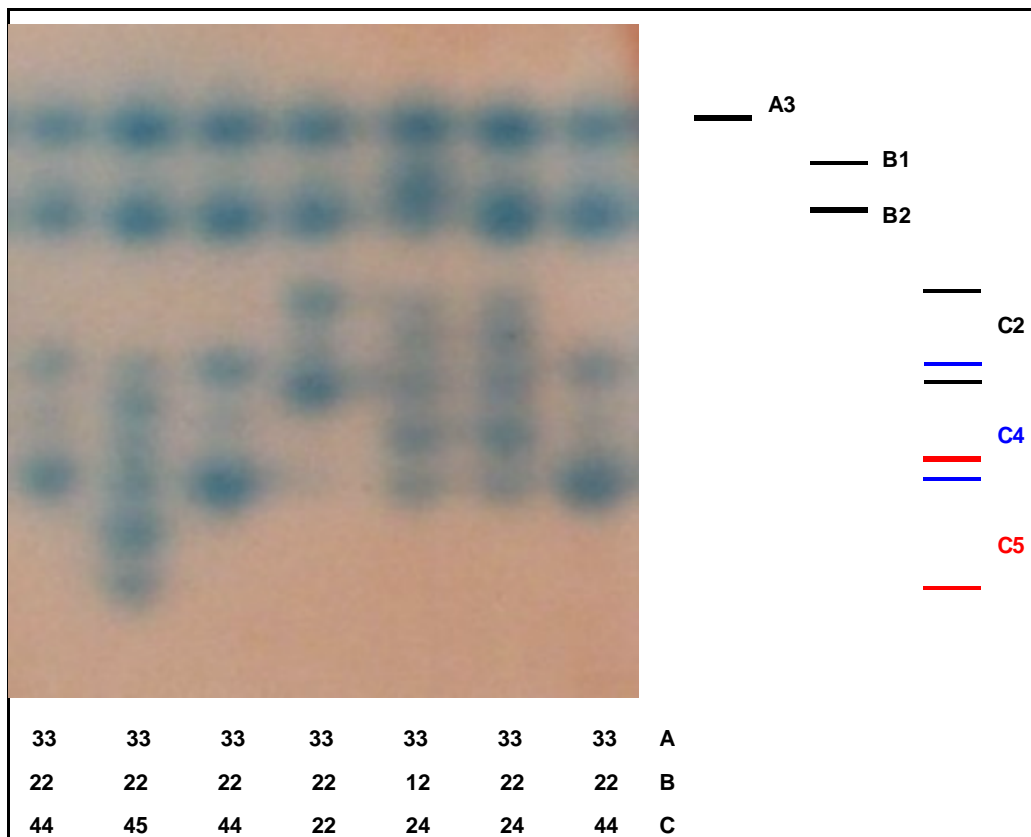


Aspartataminotransferase (AAT, GOT) E.C.2.6.1.1

Das System AAT wird bei Fichte von drei Genorten kontrolliert. An den Loci AAT-A und AAT-B wurden jeweils vier Allele nachgewiesen, wobei nur A3 und B2 häufig auftreten (Häufigkeiten über 90 %). Bei zwei Bäumen wurde im Genort AAT-B ein Nullallel gefunden. Am Genort AAT-C sind bislang sechs verschiedenen Mustertypen aufgetreten. Fünf davon sind Doppelbände deren relative Position zueinander sich nicht verändert, das sechste ist ein Einzelband. Wir nehmen an, dass diese Zone von zwei eng gekoppelten Genorten (entstanden durch Genduplikation) kontrolliert wird. Dafür spricht auch, dass an einem Probebaum gefundene Einzelbandmuster.

Nach der genetischen Analyse wurden für diesen Genort vier Varianten identifiziert C2 und C4 sind in Fichtenpopulationen Mitteleuropas häufig (in Mittel etwa 40 – 60 %), C5 erreicht Häufigkeiten bis etwa 10 %, C1 und C3 sind äußerst selten.

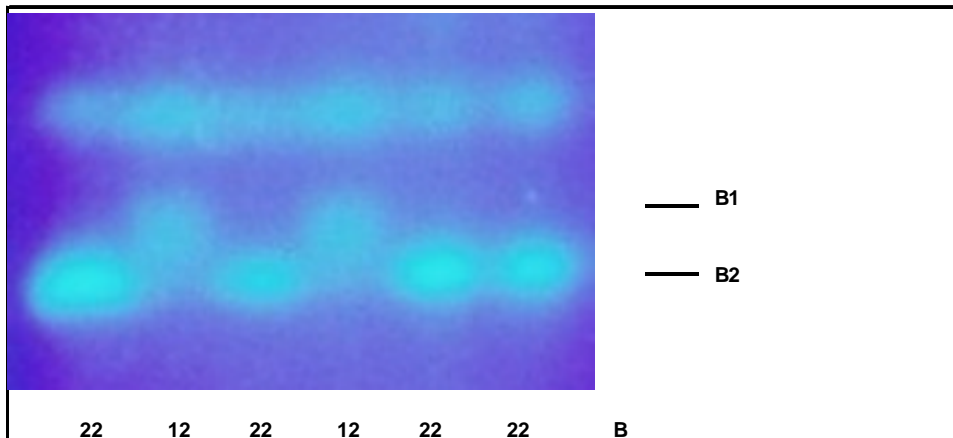
Zymogramm der Aspartataminotransferase bei Fichte (*Picea abies*)



Fluoreszierende Esterase (FEST) E.C.3.1.1.1

Bei Anfärbung auf fluoreszierende Esterase werden im Gel zwei Zonen sichtbar. Die näher der Anode liegende färbt nicht immer deutlich an. Variation wurde von uns in dieser Zone noch nicht beobachtet. Es ist anzunehmen, dass sie wahrscheinlich von einem anderen Genort kontrolliert wird, als die näher der Kathode liegende Zone, mit deutlichen Ein- bzw. Dreifachband-Mustern. Für letztere haben wir die Kontrolle durch einen Genort FEST-B angenommen. Bisher konnten hier vier Allele nachgewiesen werden, von denen B2 das häufige ist (meist über 80 %).

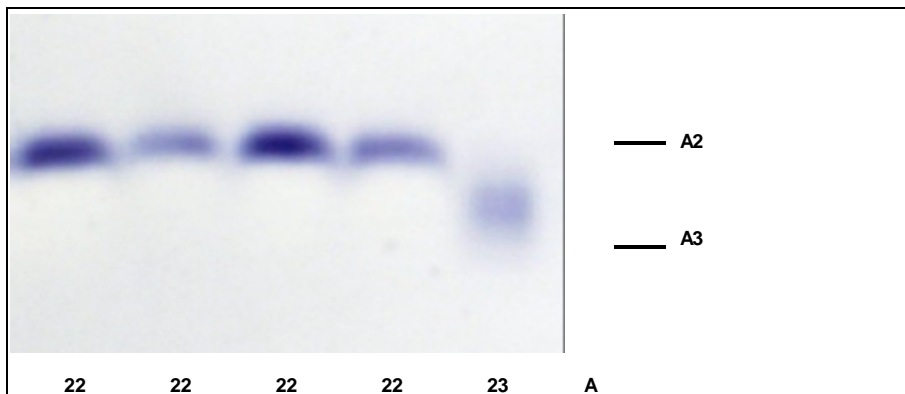
Zymogramm der Fluoreszierenden Esterase bei Fichte (*Picea abies*)



Glutamatdehydrogenase (GDH) E.C.1.4.1.2

Das hexamere System GDH wird von einem Genort mit drei Genvarianten kontrolliert. In der überwiegenden Mehrzahl mitteleuropäischer Fichtenpopulationen zeigt GDH keine Variation (nur Allel A2). Bei Polymorphismus erreichen A1 und/oder A3 kaum Häufigkeiten über 3 %. GDH-A3 gilt als arealspezifisch. In nordosteuropäischen Fichtenbeständen erreicht es Häufigkeiten bis 50 %.

Zymogramm der Glutamatdehydrogenase bei Fichte (*Picea abies*)



Isocitratdehydrogenase (IDH) E.C.1.1.1.42

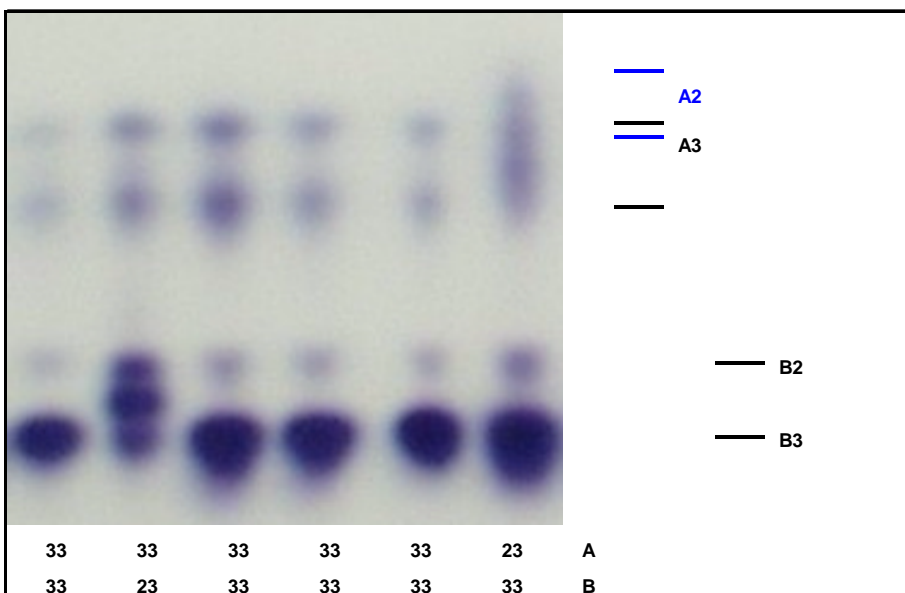
Das dimere System IDH wird bei Fichte von zwei Genorten mit ausgeprägtem Minorpolymorphismus kontrolliert.

IDH-A hat sieben Allele, darunter ein Nullallel. A3 ist das mit Abstand häufigste Allel mit über 90 % in fast allen mitteleuropäischen Fichtenpopulationen. Von den weiteren sechs Allelen kommen A1, A4 und das Nullallel öfter vor, erreichen aber kaum Häufigkeiten von über 5 %. Die

restlichen Genvarianten sind äußerst selten. Die Isoenzyme von IDH-A färben fast immer als Doppelbanden gleicher Intensität an. Bei einigen Probebäumen wurde bei Endospermanalysen auch eine Einfachbandvariante gefunden, deren Wanderungsgeschwindigkeit der der schneller wandernden Bande von A3 gleichkommt. Das Verhältnis Doppelbandvariante (hier entsprechend A3) : Einfachbandvariante war in etwa 1:1. Diese Feststellung führte zu der Vermutung, dass diese Zone, ähnlich wie GOT-C, eigentlich von zwei eng gekoppelten Genorten kontrolliert wird. Die Einfachbandvariante entspräche dann dem häufigsten Allel A3 (am hypothetischen Genort „A1“). Sie wurde deshalb auch nicht als ein weiteres Allel ausgewertet.

Noch weniger Variation (Minorpolymorphismus mit vier Allelen) zeigt IDH-B. Ist eine Population nicht auf B3 fixiert, so erreicht dieses Allel doch Häufigkeiten von über 95 %. Es treten Begleitbanden auf, die aber immer viel schwächer gefärbt sind, als die eigentlich Enzymbande.

Zymogramm der Isocitratdehydrogenase bei Fichte (*Picea abies*)



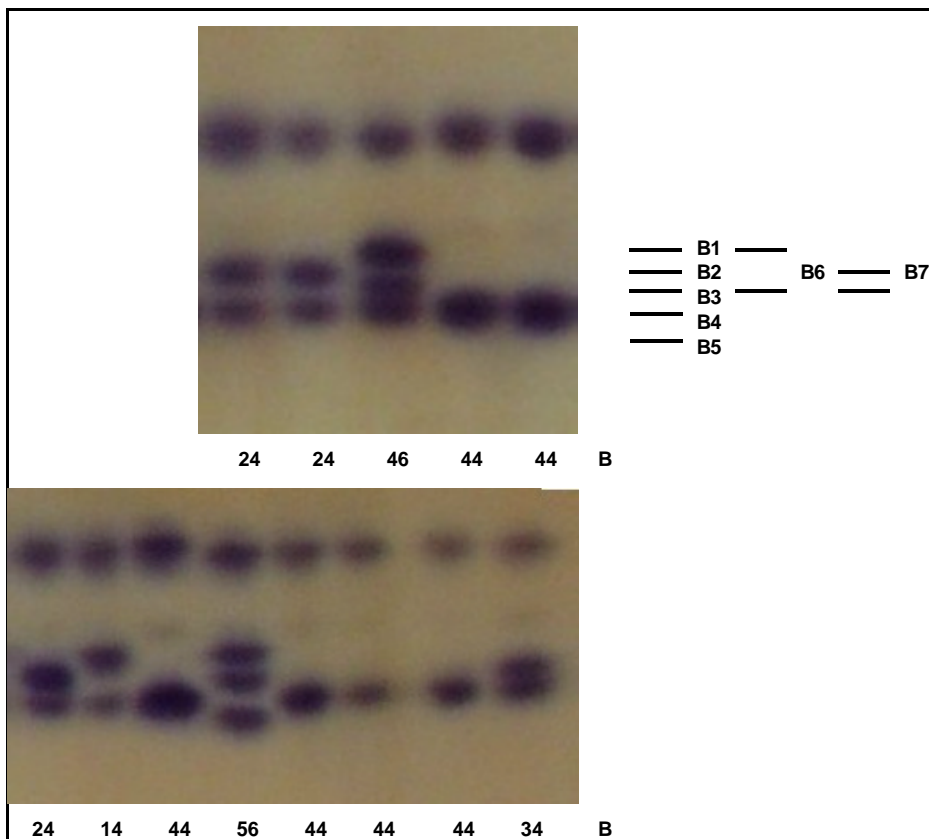
Leucinaminopeptidase (LAP) E.C.3.4.11.1

Zwei Genorte mit voneinander unabhängiger Variation kontrollieren das monomere Enzymsystem LAP. Bei LAP-A wurden sieben Genvarianten, darunter ein Nullallel, gefunden. Die entsprechenden Isoenzyme unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Laufgeschwindigkeit, was ihre Trennung und eindeutige Zuordnung zu Allelen erschwert. Fünf Isoenzymvarianten erscheinen im Zymogramm als Einfachbanden, eine weiter als Doppelbande. A3 und A4 sind in mitteleuropäischen Fichtenpopulationen häufig. In einigen Fichtenpopulationen tritt das Nullallel

in Häufigkeiten von bis zu 10 % auf; (deshalb Vorsicht bei der Auswertung dieses Locus bei Knospenanalysen). Die restlichen Genvarianten sind selten.

Am Genort LAP-B wurden elf Allele, darunter ein Nullallel, identifiziert. Fünf davon präsentieren sich als Einfachbanden mit deutlich unterschiedlicher Laufgeschwindigkeit, fünf als Doppelbanden, die jeweils auf der Höhe zweier Einzelbanden (entsprechend B1 bis B5) liegen. Die mit Abstand häufigste Genvariante ist B4 gefolgt von B3. Relativ häufig findet sich auch B6. Die restlichen Genvarianten sind deutlich seltener.

Zymogramm der Leucinaminopeptidase bei Fichte (*Picea abies*)



Malatdehydrogenase (MDH) E.C.1.1.1.37

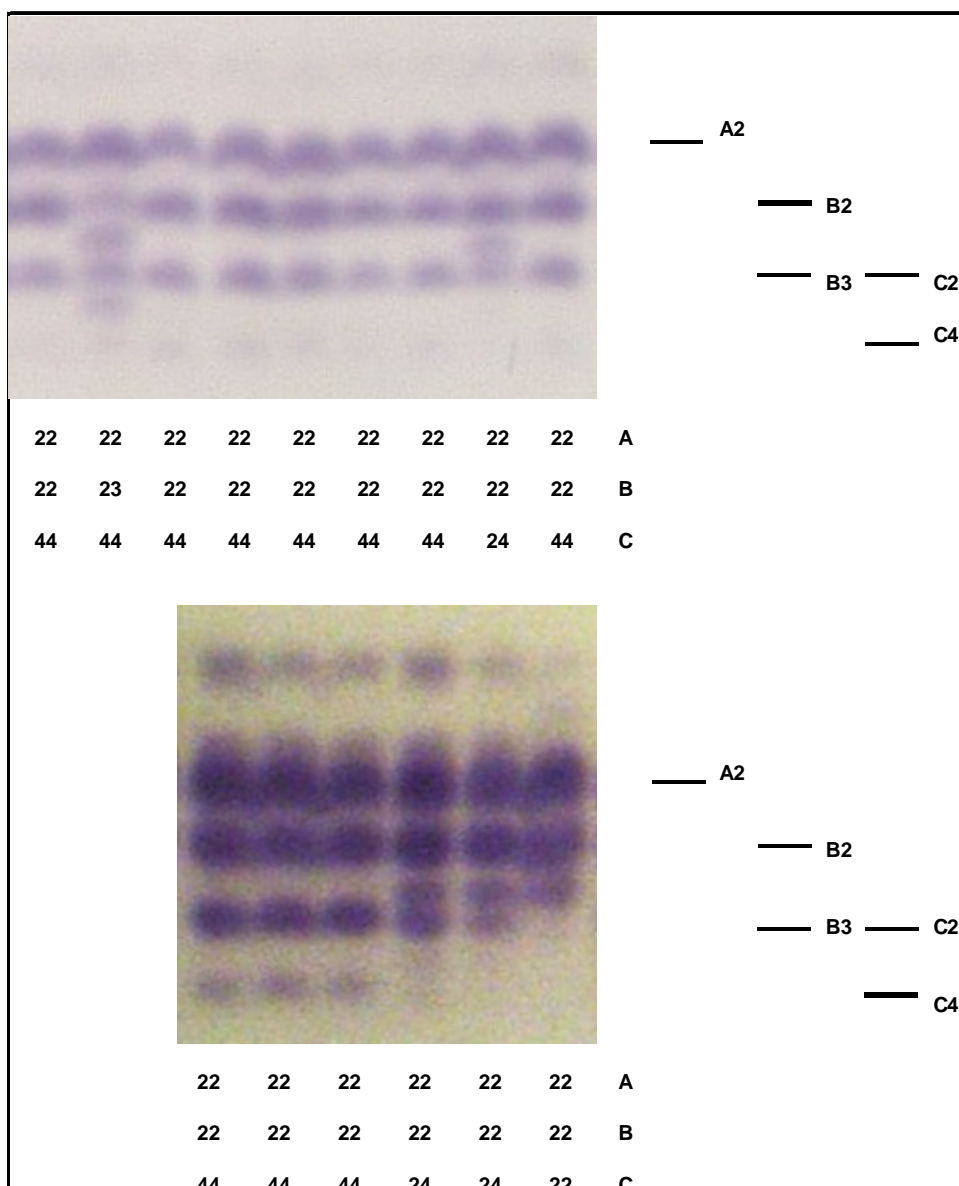
Das dimere System MDH wird von vier Genorten kontrolliert. Der Genort MDH-A zeigt drei Genvarianten von denen aber nur das Allel mit mittlerer Laufgeschwindigkeit, A2, sehr häufig auftritt. Die meisten mitteleuropäischen Fichtenpopulationen sind auf dieses Allel fixiert.

Am Genort MDH-B wurden drei Genvarianten identifiziert, wobei B2 sehr häufig, B1 und B3 selten (unter 5 %) sind. Das dem Allel B1 entsprechende Isoenzym wandert geringfügig schneller als das von A2 und ist von diesem kaum zu unterscheiden. Viele Fichtenpopulationen sind auf B2 fixiert.

Sechs verschiedene Allele, darunter ein Nullallel, treten am Genort MDH-C auf. C4 ist das mit Abstand häufigste Allel, gefolgt von C2 und C3. C1 und C0 sind viel seltener. Ähnlich wie bei den Loci A und B überlappen sich auch die Isoenzyme der Loci B und C. Außerdem bilden sich zwischen B und C Interlocus-Hybride (dimere Struktur).

Nahe der Kathode liegen die zwei von dem Genort MDH-D kontrollierten Isoenzyme. Sie sind nur in Endospermen gut nachweisbar. Die Häufigkeitsverteilung D1 : D2 liegt bei etwa 5 % : 95 %.

Zymogramm der Malatdehydrogenase bei Fichte (*Picea abies*)



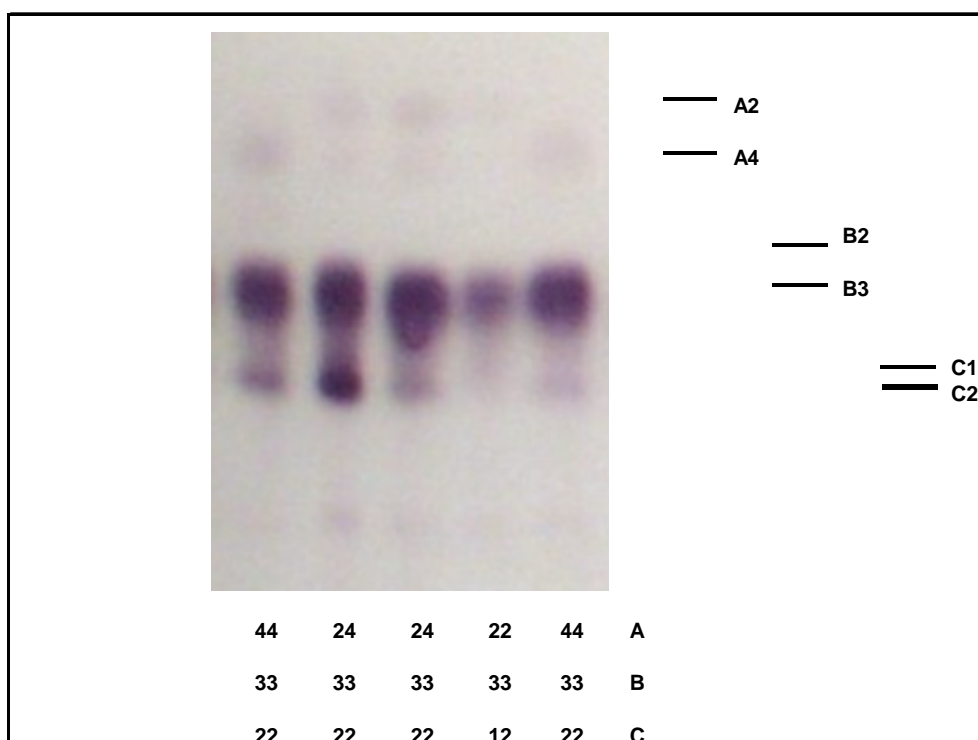
Menadionreduktase (MNR) E.C.1.6.99.2

Bei Anfärbung auf MNR erscheinen auf dem Gel mehrere voneinander getrennte Zonen mit unabhängiger Variation. Die drei am schnellsten wandernden sind reproduzierbar. Nach Durchführung der genetischen Analyse wurde postuliert, dass sie von drei Genorten, MNR-A, MNR-B und MNRC kontrolliert werden. Färbt man die Gele auf Diaphorase an, so erscheinen in den Zonen B und C identische und deckungsgleiche Muster wie bei Anfärbung auf MNR, die A-Zone ist sehr schwach und diffus. Deshalb wurde angenommen, dass der hier als MNR-B bezeichnete Locus identisch ist mit DIA-A bzw. MNR-C mit DIA-B.

MNR-A weist fünf Allele auf. Die Isoenzymmuster heterozygoter Bäume lassen auf eine monomere Struktur des Enzyms schließen. A2 und A4 sind in allen untersuchten Populationen häufig (etwa 30 – 50 %) während A3 und A5 nur Häufigkeiten bis etwa 10 % erreichen. Äußerst selten wurde das Allel A1 gefunden. Bei Analyse von Embryonen war die Anfärbung dieser Zone sehr schwach.

Vier Genvarianten, darunter ein Nullallel, wurden am Genort MNR-B (bzw. DIA-A) nachgewiesen. Der Genort zeigt einen ausgeprägten Minorpolymorphismus mit B3 als häufigstem Allel. Bei MNR-C wurden bisher drei Allele gefunden. C2 ist sehr häufig, C1 und C3 sind selten.

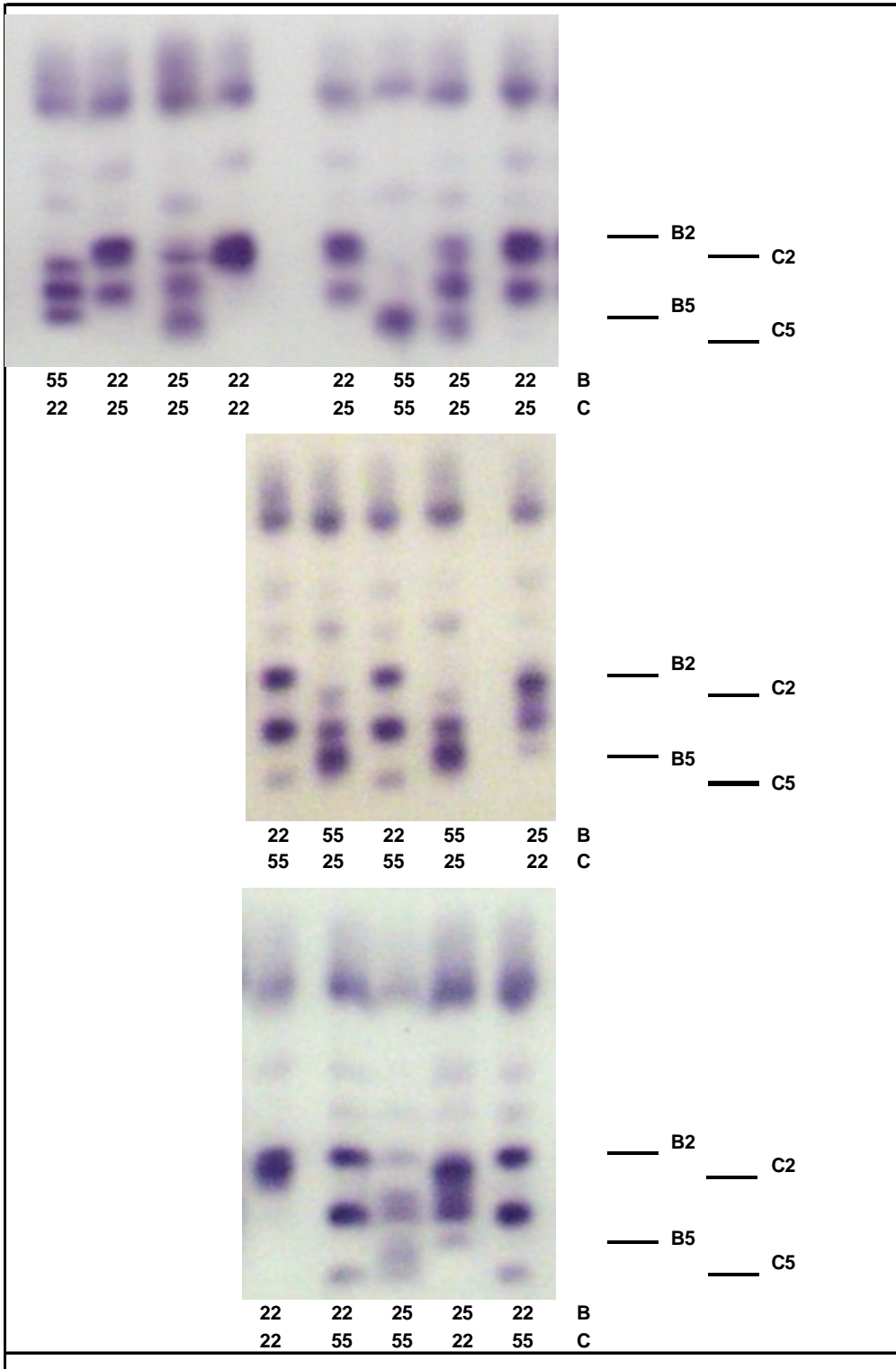
Zymogramm der Menadionreduktase bei Fichte (*Picea abies*)



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

Das dimere System 6-PGDH wird bei Fichte von drei Genorten kontrolliert.

Zymogramm der Menadionreduktase bei Fichte (*Picea abies*)



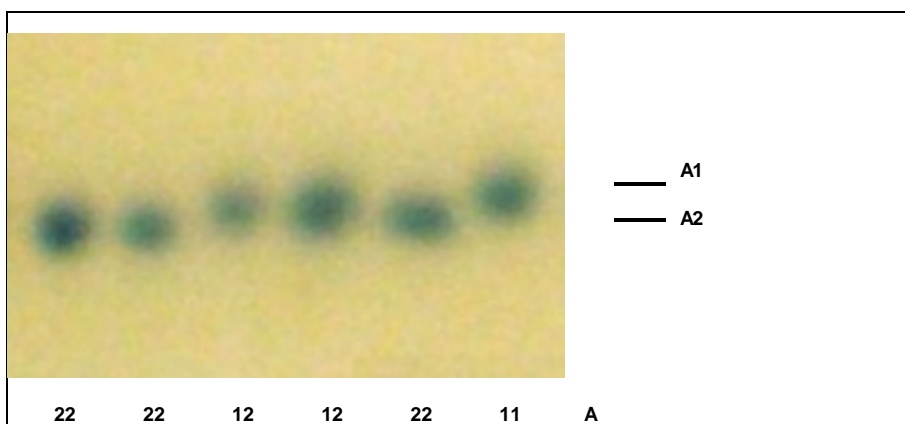
Die drei von 6-PGDH-A kodierte Allele präsentieren sich im Zymogramm als Dreifachbanden. Der Genort ist wenig variabel. A2 ist sehr häufig, A1 und A3 treten selten auf.

Jeweils sieben Genvarianten, darunter ein Nullallel, wurden bei 6-PGDH-B und 6-PGDH-C nachgewiesen. Beide Genorte zeigen Majorpolymorphismus mit B2 und B5 bzw. C2 und C5 als häufigen Allelen. Die von 6-PGDH-C kodierte Genvarianten färben schwächer an. Die Isoenzyme von 6-PGDH-B und 6-PGDH-C überlappen sich größtenteils im Zymogramm und bilden sowohl Inter- als auch Intralocus-Hybride. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Auswertung der Muster aus diploidem Gewebe.

Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPCA) E.C.4.1.1.31

Das monomere System PEPCA wird bei Fichte von einem Genort kontrolliert. Von den zwei Allelen dieses Genortes liegen die Häufigkeiten von A2 in mitteleuropäischen Fichtenpopulationen über 80 %.

Zymogramm der Phosphoenolpyruvatcarboxylase bei Fichte (*Picea abies*)

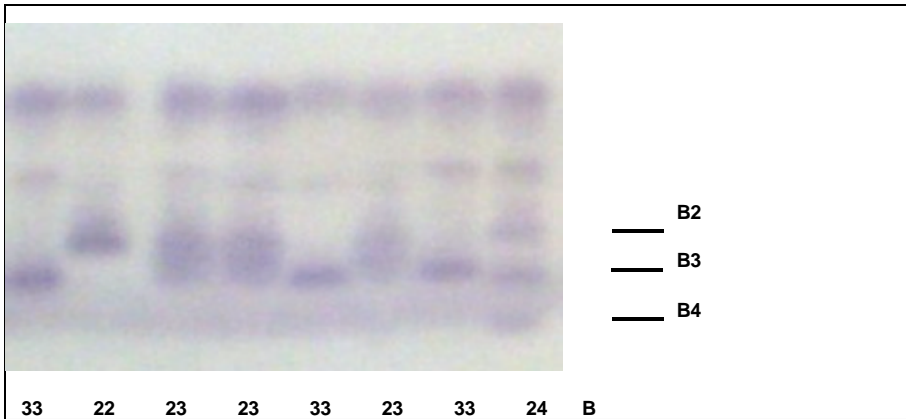


Phosphoglucose-Isomerase (PGI) E.C.5.3.1.9

Das dimere System PGI wird bei Fichte von zwei Genorten kontrolliert. PGI-A hat drei Allele, darunter ein Nullallel. A2 ist sehr häufig, A1 und A0 äußerst selten. Der Genort kann in manchen Proben wegen verschwommener Banden nicht sicher ausgewertet werden.

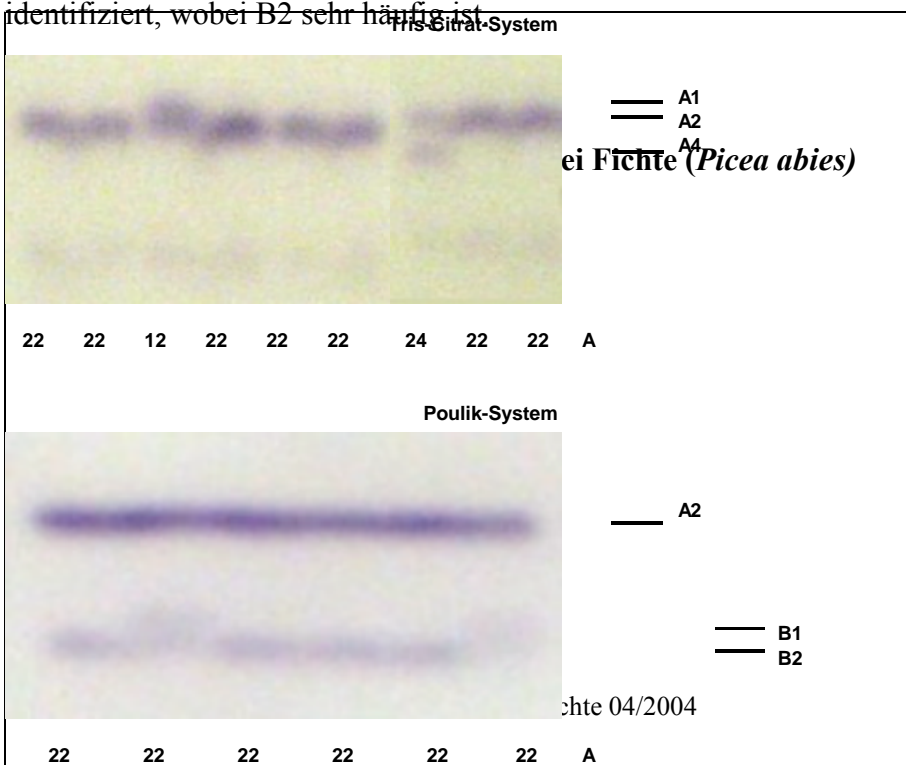
Am Genort PGI-B wurden bislang fünf Allele gefunden, die sich als Dreifachbanden im Zymogramm zeigen. Heterozygote Genotypen äußern sich als Fünffachbanden. B2 und B3 sind in Fichtenpopulationen Mitteleuropas häufig, die anderen Allele liegen meist unter 5 %.

Zymogramm der Phosphoglucose-Isomerase bei Fichte (*Picea abies*)



Phosphoglucomutase (PGM) E.C.2.7.5.1

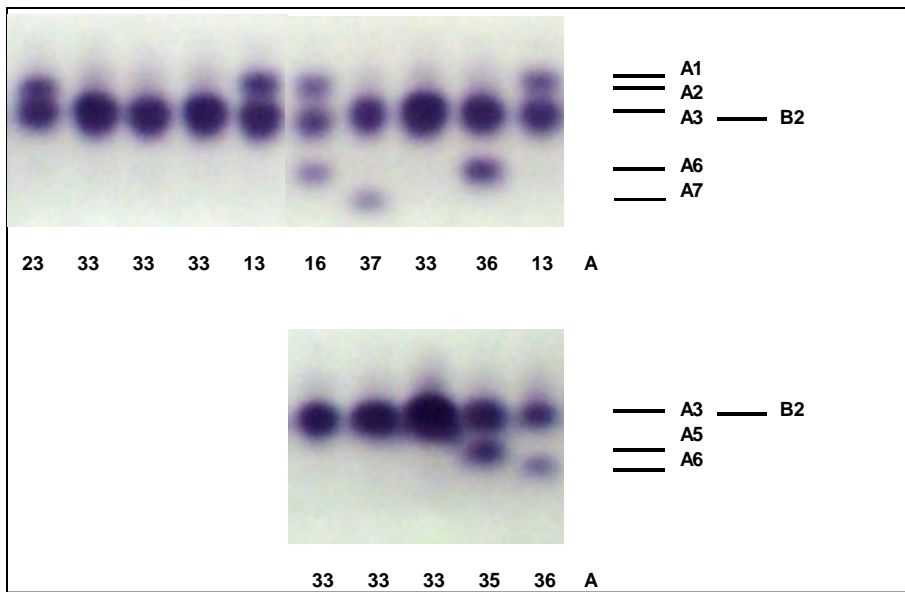
Das monomere System PGM wird bei Fichte von zwei Genorten kontrolliert. Bei Auftrennung mit dem Tris-Citrat-System zeigen sich in der nahe der Anode liegenden Zone A bis zu vier Genvarianten. A2 ist sehr häufig (über 80 %). A3 und A4 liegen sehr nahe beieinander, kommen aber in fast allen Populationen gleichzeitig vor. Deshalb ist es angebracht, Standards mitlaufen zu lassen, um A3 und A4 richtig zuzuordnen. Bei Auftrennung im Poulik-System kann man die Varianten der A-Zonen nicht trennen, hingegen wird die B-Zone eindeutig klarer und auswertbar (im Tris-Citrat-System meist nicht möglich). In der B-Zone wurden bisher drei Varianten identifiziert, wobei B2 sehr häufig ist.



Shikimatdehydrogenase (SKDH) E.C.1.1.1.25

Das monomere System SKDH wird von zwei Genorten kontrolliert, die sehr nahe beieinander liegen und sich teilweise überlappen. Der Genort SKDH-B wird deshalb meist nicht ausgewertet. SKDH-A weist sieben Allele auf. In allen Fichtenpopulationen ist A3 am häufigsten. A4 liegt auf der Höhe von B2, was die sichere Trennung der Genotypen A3A4 von A3A3 sehr erschwert. Meist wird in solchen Situationen der Genotyp als A3A3 angenommen. Es wird empfohlen Standards mitlaufen zu lassen, um eine sichere Zuordnung der Allele vornehmen zu können.

Zymogramm der Shikimatdehydrogenase bei Fichte (*Picea abies*)



Kurzbeschreibung weiterer Systeme, die bei Fichte bereits als Genmarker eingesetzt wurden (aus Konnert 1995):

Amylase (AMY- E.C. 3.2.1.1)

2 Genorte – AMY-A = 3 Genvarianten

AMY-B = 7 Genvarianten

Die Auswertung ist nur bei Endospermen problemlos; in diploidem Material erscheinen viele zusätzliche Banden.

Formiatdehydrogenase (FDH - E.C.1.2.1.2)

1 Genort – 2 Genvarianten

Es kann nur auf PA-Gelen gut getrennt und angefärbt werden. Auf Stärkegelen ist die Anfärbung zu schwach.

Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH – E.C. 1.1.1.49)

1 Genort – 62 Genvarianten

Bildet Mehrfachbande auch bei homozygoten Genotypen. Trennung oft schwierig wegen undeutlicher Banden.

Malic Enzym (ME-E.C. 1.1.1.40)

1 Genort – 2 Genvarianten

Die Enzyme dieses Systems wandern in allen Trennsystemen extrem langsam. Das System ist nur in Samen aktiv. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen an Endosperm vor.

NADH-Dehydrogenase (NDH – E.C.1.6.99.3)

2 Genorte. NDH-A - zwei Genvarianten
 NDH-B – vier Genvarianten

NDH-A ist in Samen wenig aktiv. Bei Knospen erhält man gute Ergebnisse. NDH-B ist in allen Gewebearten besser auswertbar.

Sorbitol-dehydrogenase (SBDH – E.C. 1.1.1.14)

1 Genort – 2 Genvarianten

Zu dem System liegen nur ganz wenige Ergebnisse vor.

Saure Phosphatase (SAP – E.C. 3.1.3.2)

2 Genorte. SAP-A -vier Genvarianten
 SAP-B –vier Genvarianten

Bei Anfärbung auf SAP erhält man eine Vielzahl von Banden, deren eindeutige Auswertung Schwierigkeiten bereiten kann. Das System kann in Knospenproben nicht analysiert werden (schwache diffuse Anfärbung über das ganze Gel).