

## Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung

### II. Genetische Kontrolle von Esterase- und Leucinaminopeptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen

FRITZ BERGMANN

Lehrstuhl für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen (BRD)

#### Genetic Studies in *Picea abies* with the Aid of Isoenzyme Identification

### II. Genetic Control of Esterase and Leucine Amino-peptidase Isoenzymes in Haploid Macrogametophytes of Dormant Seeds

**Summary.** Using techniques of starch gel zone electrophoresis, a considerable variation among esterase and leucine aminopeptidase isoenzyme patterns was found in the endosperm of dormant seeds of Norway spruce (*Picea abies*). Since the so-called primary endosperm of conifers is only a further developmental stage of the haploid female gametophyte, simple Mendelian segregations can be determined in seeds of individual open-pollinated trees. It was therefore possible to identify some esterase and leucine aminopeptidase loci only with regard to phenotypic frequency distributions without difficult crossing procedures.

#### Einleitung

Eines der Hauptprobleme der Forstgenetik, die Beschreibung und Erklärung der genetischen Variation innerhalb und zwischen natürlichen Waldbaum-Populationen, wurde bislang fast ausschließlich mit Methoden der quantitativen Genetik angegangen, die jedoch eine direkte Identifizierung von Allelen an einzelnen Genloci nicht zuließen.

Demgegenüber bietet die gerade in letzter Zeit vielfach angewandte Methode der gel-elektrophoretischen Analyse von Isoenzymen die Möglichkeit, anhand von polymorphen Systemen Gene und deren allele Variabilität in Einzelindividuen und Populationen zu identifizieren, wobei Serienanalysen und oftmals relativ einfache Spaltungsverhältnisse zu einer raschen Aufklärung beitragen.

Erste auf diesen Techniken basierende Untersuchungen zeigten, daß, wie nicht anders zu erwarten, auch bei Waldbaum- und hier speziell Koniferenarten zahlreiche genetische Polymorphismen existieren (Bartels 1971, Conkle 1971a, Feret u. Stairs 1971). In einigen Fällen ist es bereits gelungen, mit Hilfe von Isoenzym-Verteilungsmustern Hinweise auf die genetische Variation innerhalb und zwischen natürlichen Lokalpopulationen („Herkünften“) zu erarbeiten (Sakai et al. 1971, Sakai u. Park 1971, Sakai u. Miyazaki 1972), doch sind in diesen Versuchen die genetischen Mechanismen, die für die Isoenzym-Variation verantwortlich sind, unbekannt geblieben. Ihre Klärung setzt Kreuzungsversuche voraus, die jedoch bei Baumarten äußerst zeitraubend und kost-

spielig sind und darüber hinaus auch nicht in allen Fällen zu einfachen und schlüssigen Spaltungsverhältnissen führen (Feret 1971).

Aus diesem Grunde wurden Untersuchungen über Isoenzym-Vorkommen und -Variation speziell am Endosperm ruhender Koniferen-Samen, insbesondere von *Picea abies*, begonnen (Bergmann 1971), da dieses sog. primäre Endosperm, welches den Gymnospermen-Embryonen als Nähr- und Speichergewebe dient, sich direkt aus den haploiden Makrogametophyten entwickelt und somit jeweils einen einzelnen Gameten des Mutterbaumes repräsentiert. Es ist dadurch auch ohne komplizierte Kreuzungsexperimente möglich, an den Samenproben eines frei abgeblühten Baumes die Allel-Verteilung heterozygoter Loci in der Art einer einfachen Mendelspaltung nachzuweisen, vorausgesetzt, daß die zur Gametophyten-Bildung bestimmte Makrospore zufallsmäßig aus der durch Meiosis entstandenen Tetrade ausgewählt wird. Zwei bei einem Baumtyp alternativ und mit gleicher Häufigkeit (1:1-Verhältnis) auftretende Isoenzym-Phänotypen stellen damit eine relativ einfache Basis für die Identifizierung eines polymorphen Genlocus dar, zumal darüber hinaus einige in diploidem Material die Isoenzym-Analyse erschwerende Faktoren, wie z. B. Hybridband-Bildung bei multimeren Enzymen (Shaw 1969, Scandalios 1969) oder abnorme Allel-Interaktionen (Feret 1971, Feret u. Stairs 1971), fortfallen.

Schließlich soll auch nicht außer Betracht bleiben, daß das Endosperm ruhender Samen eine relativ

konstante, von Ontogenese-abhängiger Enzymdifferenzierung (siehe dazu Conkle 1971b) unbeeinflusste Entwicklungsphase darstellt, die eine hohe Reproduzierbarkeit vorhandener Isoenzym-Muster gewährleistet.

Durch vergleichende Analysen einer sowohl im haploiden Endosperm als auch in diploiden Nadeln vorkommenden Isoenzym-Gruppe ist es bereits in einem Fall gelungen, bei *Picea abies* einen Esterase-Locus nachzuweisen (Bartels 1971). Da jedoch im allgemeinen eine Identität der Isoenzym-Muster von Samen-Endosperm und somatischen Pflanzengewebe nicht vorausgesetzt werden darf (Conkle 1971b), soll mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, wie in geeigneten Fällen die genetische Kontrolle von Isoenzym-Mustern allein durch Endosperm-Analysen festgestellt werden kann. Im einzelnen wird die Identifizierung einiger Esterase- und Leucinaminopeptidase-Loci bei *Picea abies*-Einzelbaumsaatgut beschrieben.

#### Material und Methode

Das Einzelbaum-weise gesammelte Samen-Material (Ernte 1970) stammte von 50 gefälltten Bäumen eines Bestandes aus dem Staatl. Forstamt Westerhof (Herkunft Harzvorland-Westerhof).

Zur Herstellung der Enzym-Rohextrakte wurde jedes einzelne sorgfältig aus dem Samen herauspräparierte Endosperm mit 0,1 ml Puffer (Phosphatpuffer pH 7,5 mit Zusatz: 5 mM Ascorbinsäure, 5 mM Cystein, 10 mM Saccharose) homogenisiert. Die weitere Aufbereitung des Homogenats bis zur elektrophoretischen Applikation wird ausführlich an anderer Stelle beschrieben (Bergmann 1971).

Die Isoenzyme wurden mittels Stärkegel-Zonenelektrophorese aufgetrennt, wobei für Esterasen 12%iges und für Leucinaminopeptidasen 11%iges Gel benutzt wurde (teilhydrolysierte Torontostärke d. Fa. Macherey, Nagel & Co.). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem diskontinuierlichen Puffersystem, modifiziert nach Poulik (1957) (Gelpuffer: 0,07 m Tris-Citrat pH 8,7, Elektrodenpuffer: 0,3 m Na-Borat pH 8,2), über 2,5 bis 3 Std. bei einer Spannungsverteilung von 15 V/cm und einem durchschnittlichen Brückenabstand von 7 cm.

Zur Sichtbarmachung der Enzymaktivitäten im Gel wurden im allgemeinen die bei Scandalios (1969) näher beschriebenen Inkubationsmischungen verwendet; offensichtlich diente statt  $\alpha$ -Naphthylacetat  $\beta$ -Naphthylacetat oder eine Mischung aus beiden Naphtholestern als Esterase-Substrat. Die Auswertung der Isoenzym-Muster erfolgte visuell über einem Lichtkasten.

Die 1:1-Spaltungsverhältnisse bei heterozygoten Loci wurden im  $\chi^2$ -Test (1 FG) geprüft.

#### Ergebnisse und Diskussion

In den bisherigen Untersuchungen konnten im Fichten-Endosperm Isoenzyme der Esterase, sauren Phosphatase, Katalase und Leucinaminopeptidase nachgewiesen werden, wogegen Peroxydase- und Cytochromoxydase-Aktivität nicht feststellbar waren. Auf Grund der beträchtlichen Variabilität in natürlichen Populationen einerseits und ihrer relativ einfachen experimentellen Nachweisbarkeit andererseits wurden primär die Isoenzym-Muster der Esterasen

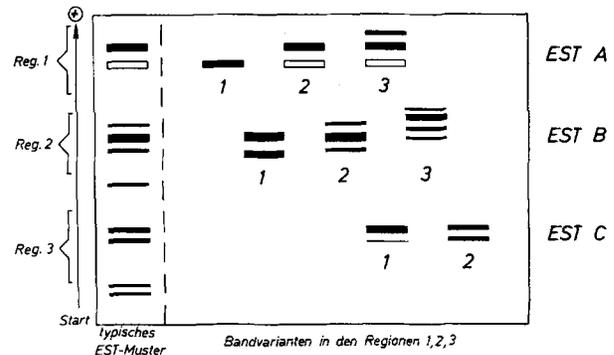


Abb. 1. Schematische Darstellung eines typischen EST-Musters und der in den Regionen 1, 2 und 3 auftretenden Bandvarianten (Phänotypen A 1-3, B 1-3, C 1-2). EST A, EST B und EST C (rechts) sind die Bezeichnungen der die jeweilige Region steuernden Esterase-Loci

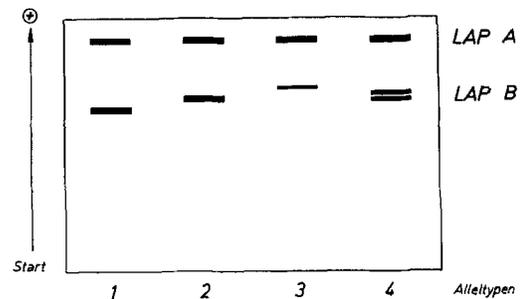


Abb. 2. Schematische Darstellung der verschiedenen LAP-Muster; elektrophoretische Varianten zeigt nur die langsamere wandernde Zone (B 1-4). LAP A und LAP B (rechts) sind die Bezeichnungen der die jeweilige Zone steuernden LAP-Loci

(EST) und Leucinaminopeptidasen (LAP) auf ihre genetische Kontrolle hin analysiert.

#### Genetische Kontrolle der EST-Isoenzyme

Ein typisches EST-Muster (Abb. 1, links) besteht aus einer Reihe verschieden stark ausgeprägter Isoenzymbänder, die aber ihrem Verhalten entsprechend zu spezifischen Bandkombinationen gekoppelt sind. Während einige nur schwach gefärbte und nicht konstant reproduzierbare EST-Bänder nicht weiter analysiert wurden, konnten in den drei mit Region bezeichneten Zymogramm-Abschnitten distinkte, durch Isoenzym-Anzahl, -Wanderungsgeschwindigkeit und -Aktivität deutlich differenzierte Bandkombinationen identifiziert werden. Diese Isoenzymband-Kombinationen, im folgenden einfach Bandvarianten genannt, erwiesen sich bei allen bisherigen Analysen als stabile Einheiten, die ohne irgendwelche intravariante Verschiebung bei den verschiedenen EST-Mustern in ihrer spezifischen Region jeweils nur alternativ auftraten.

Eine zusammenfassende Darstellung der bislang festgestellten EST-Bandvarianten zeigt Abb. 1. Die in Region 1 und Region 3 vorkommenden Varianten setzen sich aus 1-3, bzw. 1-2 Isoenzymbändern zusammen, während die Bandvarianten in Region 2

ausschließlich mehrbänderig sind. Die Häufigkeitsverteilungen jeweils zweier in den Samen eines heteromorphen Baumtyps alternativ auftretender *EST*-Bandvarianten sind in der Tab. 1 (*EST*-Phänotypen) aufgeführt. Wie die beobachteten Werte zeigen, erfolgte in allen Fällen mit relativ hoher statistischer Wahrscheinlichkeit eine 1:1-Aufspaltung der Isoenzym-Phänotypen in den Makrosporen. Ausgehend von diesen Befunden wird postuliert, daß die Bandvarianten jeder Region von jeweils einem Genlocus gesteuert werden, d. h. die Phänotypen in Region 1 von Locus *EST A* (*EST A-1*, *A-2*,

len differierende Cistrons in komplexen Loci (Supergene) für die verschiedenen Isoenzymbänder verantwortlich sind.

Einen Hinweis dafür mag die Beobachtung geben, daß einzelne Bänder einiger *EST*-Phänotypen sich in ihrer Substrat-Spezifität unterscheiden; das Anoden-nächste Band beim Phänotyp *EST A-3* z. B. setzt bevorzugt  $\beta$ -Naphthylacetat um (mit roter Farbreaktion), während alle anderen Bänder der Phänotypen *A-1*, *A-2* und *A-3* ausschließlich mit  $\alpha$ -Naphthylacetat reagieren (braunschwarze Farb-reaktion).

Tabelle 1. Häufigkeitsverteilungen in Absolutzahlen der *EST*- (oben) und *LAP*-Phänotypen (unten) im Endosperm von Samen heterozygoter Fichten (*Picea abies*)

Baum	Isoenzym-Phänotypen	Samen-Häufigkeit	Gesamt	X <sup>2</sup>	P
Nr. 19	<i>EST A-1:A-2</i>	52:58	110	0,33	0,60
Nr. 42	<i>EST A-2:A-3</i>	104:112	216	0,30	0,60
Nr. 33	<i>EST B-1:B-2</i>	70:74	144	0,11	>0,70
Nr. 32	<i>EST B-2:B-3</i>	68:65	133	0,07	>0,75
Nr. 8	<i>EST C-1:C-2</i>	70:80	150	0,67	>0,40
Nr. 2	<i>LAP B-1:B-2</i>	37:34	71	0,13	>0,70
Nr. 20	<i>LAP B-1:B-3</i>	58:55	113	0,08	>0,70
Nr. 26	<i>LAP B-1:B-4</i>	43:41	84	0,05	0,80
Nr. 13	<i>LAP B-2:B-4</i>	65:67	132	0,03	>0,80

*A-3*), in Region 2 von *EST B* (*B-1*, *B-2*, *B-3*) und in Region 3 von *EST C* (*C-1*, *C-2*) (Abb. 1).

Da ein Isoenzym-Phänotyp (hier *EST*-Bandvariante) im haploiden Endosperm unmittelbar ein einzelnes Allel repräsentiert, existieren somit in der Westerhöfer Population mindestens drei polymorphe Esterase-Loci, von denen *EST A* und *EST B* mit jeweils 3 codominanten Allelen ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ;  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ), der Locus *EST C* aber nur mit 2 codominanten Allelen ( $C_1$ ,  $C_2$ ) in den bisher untersuchten 50 Bäumen vertreten ist. Der von Bartels (1971) bereits identifizierte polymorphe *EST*-Genlocus (*EST-1 S* / *EST-1 F*) entspricht dem Locus *EST B* mit den Allelen  $B_1$  und  $B_2$ ; die vom Allel  $B_3$  gesteuerte Isoenzymvariante ist in seinem Material nicht beobachtet worden (Abb. 1).

Die Zuordnung mehrerer Isoenzymbänder zu einem einzelnen Allel wird durch irreversible Sekundär-Veränderung des nativen Proteins und einer daraus resultierenden Entstehung artifizieller Enzymbänder erklärt (Bartels 1971), wobei im Falle des Phänotyps *B-1* das schneller (zur Anode) wandernde Band, im Falle *B-2* die beiden schneller wandernden Bänder Sekundär-Enzyme darstellen sollen (Analyse und Klassifizierung bei Shaw 1969). Inwieweit jedoch nun alle überzähligen Einzelbänder der verschiedenen *EST*-Phänotypen auf Sekundäreffekte zurückzuführen sind, muß vorerst offen bleiben, doch ist nicht völlig auszuschließen, daß zumindest in einigen Fäl-

### Genetische Kontrolle der *LAP*-Isoenzyme

Die *LAP*-Muster aus Endosperm bestehen aus nur 2 Isoenzym-Zonen, von denen die schneller zur Anode wandernde in dem bisher untersuchten Material keine Variation aufwies (Abb. 2). Der dieser Zone — bis jetzt noch willkürlich — zugeordnete *LAP*-Locus (*LAP A*) muß somit vorläufig als monomorph angesehen werden. Dagegen konnten in der im Zymogramm langsamer wandernden Zone bis jetzt vier verschiedene, alternativ auftretende Bandvarianten nachgewiesen werden, von denen eine (*B-4*) aus einem Doppelband besteht. Die anderen *LAP*-Varianten (*B-1*, *B-2*, *B-3*) unterscheiden sich allein durch Farbintensität und elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit (Abb. 2). Die Verteilung der Phänotypen-Häufigkeiten (Tab. 1, *LAP*-Phänotypen) in den Samen eines heterozygoten Baumes entspricht wiederum einem klaren 1:1-Verhältnis, so daß es berechtigt erscheint, dieser Isoenzym-Zone einen polymorphen *LAP*-Locus (*LAP B*) mit, bezogen auf das Untersuchungsmaterial, 4 codominanten Alleltypen (*LAP B*<sub>1</sub>, *B*<sub>2</sub>, *B*<sub>3</sub>, *B*<sub>4</sub>) zugrunde zu legen (Abb. 2).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für eine Sachbeihilfe, dem Staatl. Forstamt Westerhof für die Bereitstellung von Samen-Material gedankt.

### Literatur

1. Bartels, H.: Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta* (Berl.) 99, 283–289 (1971). — 2. Bergmann, F.:

- Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. Allg. Forst- u. J.-Ztg. **142**, 278–280 (1971). — 3. Conkle, M. T.: Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. Forest Sci. **17**, 190–194 (1971a). — 4. Conkle, M. T.: Isozyme specificity during germination and early growth of knobcone pine. Forest Sci. **17**, 494–498 (1971b). — 5. Feret, P. P.: Isoenzyme variation in *Picea glauca*. Silvae Genetica **20**, 46–50 (1971). — 6. Feret, P. P., Stairs, G. R.: Peroxidase inheritance in Siberian elm. Forest Sci. **17**, 472–475 (1971). — 7. Poulik, M. D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. Nature **180**, 1477 (1957). — 8. Sakai, K. I., Park, Y. G.: Genetic studies in natural populations of forest trees. III. Genetic differentiation within a forest of *Cryptomeria japonica*. Theoret. Appl. Genetics **41**, 13 to 17 (1971). — 9. Sakai, K. I., Miyazaki, Y., Matsuura, T.: Genetic studies in natural populations of forest trees. I. Genetic variability on the enzymatic level in natural forests of *Thujopsis dolabrata*. Silvae Genetica **20**, 168 to 173 (1971). — 10. Sakai, K. I., Miyazaki, Y.: Genetic studies in natural populations of forest trees. II. Family analysis: a new method for quantitative genetic studies. Silvae Genetica (1972, im Druck). — 11. Scandalios, J. G.: Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A Review. Biochem. Genet. **3**, 37–79 (1969). — 12. Shaw, Ch. R.: Isozymes: classification, frequency, and significance. Intern. Rev. Cytology **25**, 297–332 (1969).

Eingegangen am 23. Mai 1972

Angenommen durch G. Melchers

Dr. Fritz Bergmann  
Lehrstuhl für Forstgenetik  
und Forstpflanzenzüchtung der Universität  
Göttingen  
Büsgenweg 2  
34 Göttingen-Weende (Germany/BRD)