©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 22	Fasc. 2	233—241	30. 9. 1982

Aus dem Institut für Pflanzenphysiologie und dem Institut für Biochemie der Karl-Franzens-Universität Graz

Peroxidase-Isoenzymmuster in vier *Pinus*-Species

Von

Dieter GRILL *), Hermann ESTERBAUER **), Irmgard DOBERNIG und Erich KLANSEK

Mit 6 Abbildungen

Eingelangt am 12. Mai 1981

Key words: Peroxidase, isoenzyme, *Pinus*

Summary

GRILL D., ESTERBAUER H., DOBERNIG I. & KLANSEK E. 1982. Isoenzyme patterns of peroxidase in four *Pinus*-species. — Phyton 22 (2): 233—241, with 6 figures. — German with English summary.

Needles of pine species possess a number of elektrophoretically separabel peroxidases. A comparison was done between *Pinus cembra*, *P. mugo*, *P. nigra* and *P. sylvestris* with both the topics of the isoenzyme pattern variability within the four species and within the genus. The isoenzyme pattern of these pine species is centralized on migration index between 0.30—0.70. One can perceive the isoenzyme pattern being similar in the two-needles pines whereby *P. cembra* ownes two further slower migrating bands. The number of bands of the two-needles pines is in the mean 5—6 of especially 11 possible positions. The number of bands of *P. cembra* is 7. The differences in the isoenzyme pattern between the four trees are discussed.

Zusammenfassung

GRILL D., ESTERBAUER H., DOBERNIG I. & KLANSEK E. 1982. Peroxidase-Isoenzymmuster in vier *Pinus*-Species. — Phyton 22 (2): 233—241, mit 6 Abbildungen. — Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Die Nadeln der Pinaceen enthalten zahlreiche elektrophoretisch trennbare Peroxidasen. Hier wurde ein Vergleich an *Pinus cembra*, *P. mugo*, *P. nigra* und

*) Univ.-Doz. Dr. Dieter GRILL, Institut für Pflanzenphysiologie der Karl-Franzens-Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 51.

**) Univ.-Prof. Dr. Hermann ESTERBAUER, Institut für Biochemie der Karl-Franzens-Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 1.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

P. sylvestris angestellt, welcher einerseits die Variabilität des Isoenzymmusters dieser 4 Arten und die Gemeinsamkeiten im Peroxidasemuster innerhalb der Gattung andererseits zum Gegenstand hat. Das Isoenzymmuster der 4 *Pinus*-Arten ist recht einheitlich auf einen R_f-Bereich von 0,30 bis 0,70 verteilt, wobei die Muster der zweinadeligen Vertreter auffällig ähnlich sind. Die fünfnadelige Zirbe besitzt noch zusätzlich langsam wandernde Banden. Die Bandenzahl der zweinadeligen Arten beträgt durchschnittlich 5 bis 6, wobei 11 verschiedene R_f-Bereiche dafür besonders in Frage kommen. Die Bandenzahl der Zirbe beträgt 7. Artspezifische Unterschiede im Isoenzymmuster dieser 4 Bäume werden diskutiert.

Einleitung

Wie Untersuchungen von Grill *et al.* 1982 zeigen, enthalten Nadeln von Pinaceen zahlreiche elektrophoretisch trennbare Peroxidasen. Das Isoenzymmuster scheint genetisch fixiert und bildet sich erst im Laufe der Entwicklung voll aus (Esterbauer, Grill & Zotter 1978, Grill, Esterbauer & Birkner 1980). Die Bandenzahl sowie die Variabilität des Musters ist außerordentlich groß, wobei aber bei bestimmten Abschnitten bevorzugt Isoenzymbanden auftreten. Solche bevorzugte Bandenbereiche zeigen meist besonders breite und auch besonders intensiv gefärbte Peroxidasebanden. Trotz des für die einzelne Art recht markanten Bandenmusters lassen sich mit Hilfe der Peroxidase-Insoenzymbanden innerhalb der Art kaum Abgrenzungen, zum Beispiel von Rassen, durchführen.

In dieser Arbeit berichten wir über einen Vergleich an 4 verschiedenen *Pinus*-Species (*P. cembra* L., *P. mugo* Turra, *P. nigra* Arnold, *P. sylvestris* L.), welcher einerseits die Variabilität des Isoenzymmusters dieser 4 Arten und die Gemeinsamkeiten im Peroxidase-Isoenzymmuster innerhalb der Gattung andererseits zum Gegenstand hat.

Material und Methodik

Das Probematerial stammte von verschiedenen Individuen unterschiedlichen Alters (mindestens 8 Jahre) aus Gebieten der Steiermark und Kärntens. Dabei wurden bis zu 70 Bäume sowohl aus verschiedenen Höhenlagen (bis 1.800 m) als auch verschiedenem Untergrund in unsere Untersuchungen einbezogen. Das anodisch wandernde Peroxidase-Isoenzymmuster wurde mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese (Rundgele) untersucht (siehe Esterbauer, Grill & Zotter 1978). Dafür wurden Extrakte aus den Acetontrockenpulvern der Nadeln hergestellt, die Färbung erfolgte mit o-Dianisidin. Für die Berechnung der R_f-Werte dient die Bande von Bromphenolblau als innerer Standard.

Ergebnisse

Das Isoenzymmuster der *Pinus*-Species ist aus mehreren Banden zusammengesetzt, wobei bei bestimmten R_f-Bereichen artspezifisch viele ver-

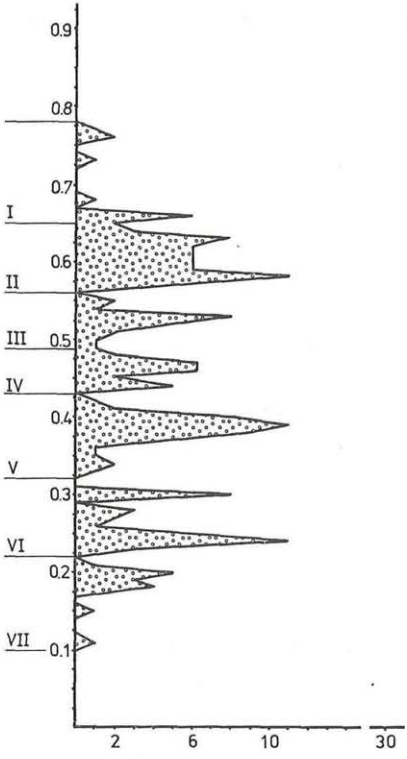
©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

schiedene Individuen gemeinsame Banden besitzen. Bei solchen bevorzugten R_f-Bereichen zeigen die Peroxidasen in der Regel auch eine größere Bandenbreite und Intensität.

a) *Pinus cembra*

Das Enzymogramm umfaßt einen weiten R_f-Bereich und Banden von 0,11 bis 0,76. Im Mittel besitzen die Zirben 7 Banden, eine Zahl, die bei 37% aller untersuchten Individuen zu finden ist. Die größte Anzahl von Banden, die bei einem Baum gefunden wurde, war 9, die geringste 4.

Um die Muster beschreiben zu können, wurde zunächst ein Häufigkeitsdiagramm angefertigt (Abb. 1) und das Isoenzymmuster in einige Abschnitte gegliedert. Die Auswahl der Abschnitte erfolgte derart, daß einerseits in der Regel voneinander abgesetzte Bandenmaxima Abschnitte bilden, andererseits nach Aussehen der Banden in Breite und Farbintensität bzw. Bandenhäufigkeit (vgl. GRILL *et al.* 1982). Bei *Pinus cembra* fällt vor allem der



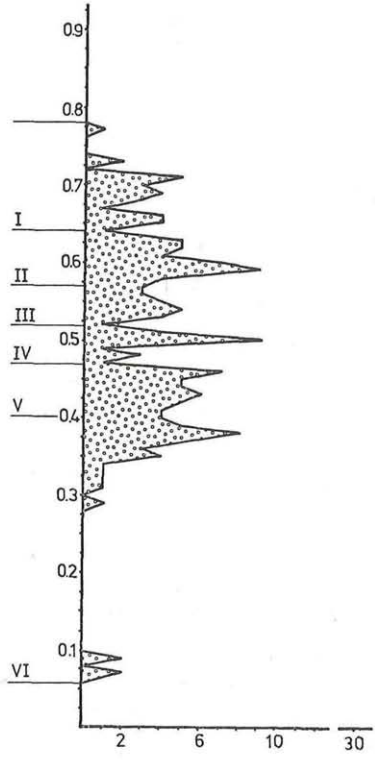


Abb. 1. Häufigkeitsdiagramm der Isoenzymbanden bei *Pinus cembra*
Abb. 2. desgl. bei *Pinus mugo*. Abszisse: Häufigkeit des Auftretens unter 30 untersuchten Proben, Ordinate: R_f-Werte

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

R_f-Bereich von 0,37 bis 0,40 auf, wo jeder Baum mindestens eine breite und intensiv gefärbte Bande besitzt. Zwischen 0,57 und 0,60 findet sich ebenfalls bei nahezu allen Bäumen (95%) bzw. zwischen 0,61 bis 0,65 bei 97% der Individuen ein Isoenzym, das allerdings schwächer ausgebildet ist als beim vorhin genannten R_f-Bereich. Alle anderen Bandenbereiche sind durch mehr oder weniger schwach ausgebildete Isoenzyme gekennzeichnet (Abb. 5).

Tabelle 1

In Gruppen gegliedertes Isoenzymmuster von *Pinus cembra*

Gruppe	R_f-Bereich	mögliche	häufigste Bandenzahl	mittlere
I	0,65—0,77	0—2	0	0,42±0,69
II	0,56—0,64	1—3	2	1,73±0,65
III	0,49—0,55	0—1	1	0,68±0,48
IV	0,43—0,48	0—1	1	0,68±0,47
V	0,32—0,42	1—3	1	1,42±0,60
VI	0,22—0,31	0—2	1	1,10±0,74
VII	0,11—0,21	0—2	0	0,58±0,69

b) *Pinus mugo*

Bei der Latsche sind die Isoenzyme im R_f-Bereich von 0,29—0,71 recht gleichmäßig verteilt. Darüber hinaus sind noch einige sehr langsam (0,07—0,09), aber auch schnell wandernde Banden (bis 0,77) vorhanden. Im Mittel besitzen diese Bäume 6 Banden, wobei jedoch die am häufigsten aufgetretene Bandenzahl 5 war; die maximale Bandenzahl betrug 9, die geringste 3. Auffällig ist bei diesem Isoenzymmuster vor allem der R_f-Bereich von 0,53—0,66, wo durchwegs intensiv gefärbte und stark ausgebildete Banden auftraten. Insbesondere das Maximum von R_f 0,57—0,60 war bei 74% aller Individuen zu finden (Abb. 2). Einen Überblick über die in Gruppen geordneten Isoenzyme gibt Tabelle 2 und das daraus experimentell gefundene Bandenmuster Abb. 5.

Tabelle 2

In Gruppen gegliedertes Isoenzymmuster von *Pinus mugo*

Gruppe	R_f-Bereich	mögliche	häufigste Bandenzahl	mittlere
I	0,64—0,77	0—3	0; 1	0,96±0,88
II	0,57—0,63	0—2	1	1,21±0,60
III	0,52—0,56	0—2	0; 1	0,56±0,59
IV	0,47—0,51	0—2	0	0,56±0,66
V	0,41—0,46	0—2	1	1,13±0,76
VI	0,07—0,40	0—3	1	1,13±0,92

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

c) *Pinus nigra*

Auch bei der Schwarzföhre setzt sich das Isoenzymmuster aus mehreren Banden zusammen. So besitzen sie im Durchschnitt 6 Banden, wobei die häufigste Bandenzahl 6 (35% der Fälle) und 5 (22% der Fälle) vorkommt. Die größte bzw. kleinste Bandenzahl war 8 bzw. 3. Das Isoenzymmuster erstreckt sich hauptsächlich auf einen R_f-Bereich von 0,29—0,73, darüber hinaus konnten vereinzelt schneller (0,78—0,85) bzw. langsam wandernde (R_f 0,2) Banden festgestellt werden (Abb. 3). Besonders intensiv gefärbt und breit ausgebildet sind sie zwischen $R_f = 0{,}40-0{,}48$. Hier besitzt jeder Baum auch 2 Banden (Abb. 5). Auch zwischen 0,53—0,60 finden sich häufig Banden, wenn auch weniger deutlich anfärbbar und schmäler als bei dem vorhin genannten R_f-Bereich. Auffälligerweise ist dies besonders ausgeprägt bei Bäumen, welche aus dem Steinfeld, Niederösterreich, stammen. Bäume Südkärntens besitzen auch derartige Banden, jedoch weniger stark entwickelt. Besonders schwach entwickelt, ja sogar fehlend, waren Banden dieses R_f-Bereichs bei kultivierten Schwarzkiefern aus Graz. Im R_f-Bereich 0,34—0,37 sind die Banden schwach entwickelt, einzig bei einigen Kulturformen aus Graz sind auch hier deutlich anfärbbare und zum Teil auch breite Banden vorhanden.

Tabelle 3

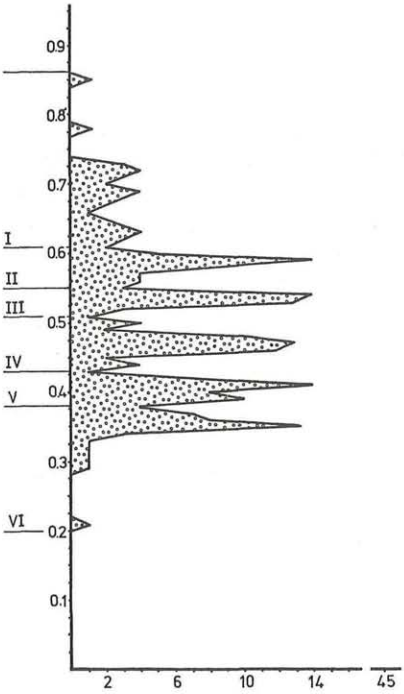
In Gruppen gegliedertes Isoenzymmuster von *Pinus nigra*

Gruppe	R_f-Bereich	mögliche	häufigste Bandenzahl	mittlere
I	0,61—0,85	0—4	0	1,03±1,04
II	0,55—0,60	0—2	1	0,84±0,45
III	0,51—0,54	0—1	1	0,78±0,42
IV	0,43—0,50	0—2	1	1,09±0,39
V	0,38—0,42	0—2	1	1,00±0,36
VI	0,21—0,37	0—2	1	0,84±0,57

d) *Pinus sylvestris*

Das Peroxidaseisoenzymmuster der Rotföhren ist im wesentlichen auf den gleichen R_f-Bereich verteilt wie bei Latschen und Schwarzföhren, nämlich von 0,30—0,73 (Abb. 4). Im Mittel besitzen die Rotföhren 5 Banden und zugleich auch eine häufigste Bandenzahl von 5, welche bei 25% aller Bäume anzutreffen ist; 6 Bande sind nur bei 14% zu finden. Die größte gefundene Zahl war 10, die geringste 3. Das häufigste Auftreten von Banden auch in Beziehung auf Breite und Intensität ist im Bereich $R_f = 0{,}34-0{,}38$ bzw. 0,55—0,59 zu erwarten. Über 90% aller Bäume besitzen auch hier eine Bande. Die anderen R_f-Bereiche besitzen zum überwiegenden Teil nur schmälere und schwächer gefärbte Banden. Schnell (bis $R_f = 0{,}93$) und

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at



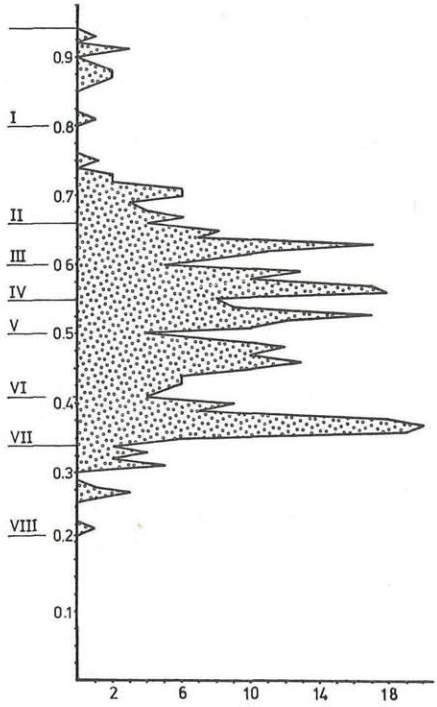


Abb. 3. Häufigkeitsdiagramm der Isoenzymbanden bei *Pinus nigra*
Abb. 4. desgl. bei *Pinus sylvestris*. Abszisse: Häufigkeit des Auftretens unter 45 (Abb. 3) bzw. 70 (Abb. 4) untersuchten Proben, Ordinate: R_f-Werte

langsam (unter 0,30) wandernde Banden sind nur vereinzelt vorhanden. Ein experimentell gefundenes Isoenzymmuster ist in Abbildung 5 dargestellt.

Tabelle 4

In Gruppen gegliedertes Isoenzymmuster von *Pinus sylvestris*

Gruppe	R_f-Bereich	mögliche	häufigste Bandenzahl	mittlere
I	0,81—0,93	0—1	0	0,16±0,37
II	0,66—0,75	0—2	0	0,46±0,60
III	0,60—0,65	0—2	1	0,74±0,52
IV	0,55—0,59	0—2	1	0,91±0,47
V	0,50—0,54	0—2	1	0,72±0,51
VI	0,41—0,49	0—3	1	1,07±0,78
VII	0,39—0,40	0—2	1	1,11±0,39
VIII	0,22—0,38	0—2	0	0,22±0,48

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Besprechung

Das Isoenzymmuster der 4 *Pinus*-Species ist recht einheitlich auf einen R_f-Bereich von 0,30—0,70 verteilt. Besonders ähnlich sind die Muster der zweinadeligen Vertreter, wogegen die fünfnadelige Zirbe noch zusätzliche langsam wandernde Bande zwischen R_f = 0,18—0,30 besitzen. Vergleicht man hiezu Vertreter anderer Pinaceen-Gattungen wie Fichte, Tanne oder Lärche (GRILL *et al.* 1982), zeigen die Muster dieser Bäume ein völlig anderes

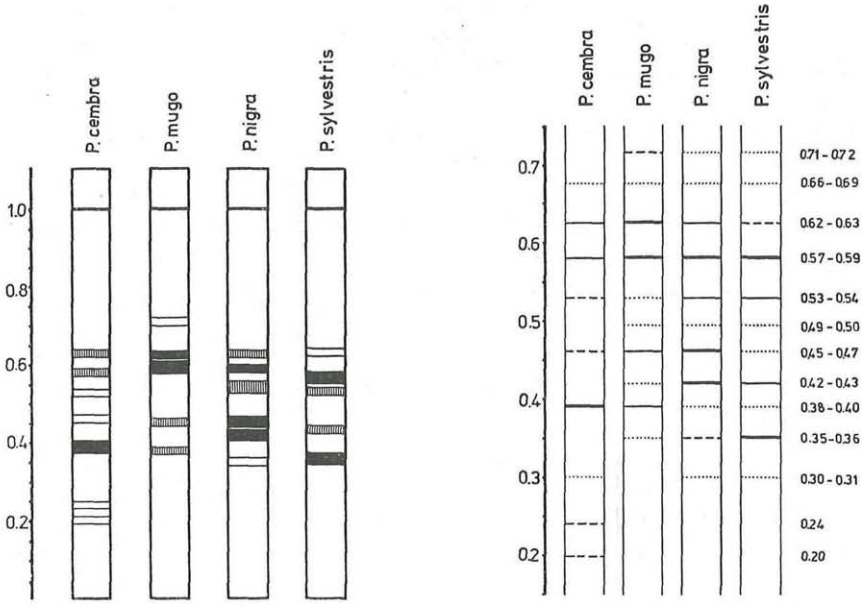


Abb. 5. Peroxidase-Isoenzymmuster in vier *Pinus*-Arten (nähere Erklärung siehe Text)

Abb. 6. Vergleich über das Vorkommen von Isoenzymbanden bei 4 *Pinus*-Arten ..... = selten, ----- = mäßig, ——— = häufig, ▬▬▬ = sehr häufig vorhanden

Bild: So besitzt *Abies* über einen R_f-Bereich von 0,20—0,90 Banden, die Lärche hingegen von 0,10—0,50 und die Fichte fällt durch ihr zweigeteiltes Isoenzymmuster von 0,10—0,50 und 0,70 bis 0,80 auf. Außerdem besitzen diese Bäume durchschnittlich mehr Isoenzymbanden (*Abies* 9, *Picea* und *Larix* 7) als die zweinadeligen *Pinus*-Arten mit 5—6; ausgenommen allerdings *Pinus cembra* mit durchschnittlich ebenfalls 7 Banden.

Neben diesen gattungsspezifischen Unterschieden treten bei den Pinusarten, trotz scheinbar einheitlichen Enzymmusters, auch artspezifische Unterschiede auf. Abgesehen natürlich von den auffallenden langsam

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

wandernden Isoenzymbanden von *Pinus cembra*. Beim Vergleich sämtlicher auftretender Bandemaxima und unter Einbeziehung des methodischen Fehlers von $\pm 0{,}01$ R_f-Einheiten kommt man bei einer Auflistung dieses Bandenmusters zu folgendem Ergebnis (Abb. 6): In der Regel finden sich bevorzugte Rf-Bereiche bei allen zweinadeligen Kiefern und zum Großteil auch bei der Zirbe, die jeweilige Bandenintensität ist aber unterschiedlich stark. So ist z. B. bei *Pinus nigra* bei $R_f = 0{,}42$ und 0,47 eine starke Bande ausgebildet, welche bei *Pinus mugo* sowie *Pinus sylvestris* mehr oder weniger schwach ausgebildet ist. Bei *Pinus sylvestris* hingegen ist die Bande von $R_f = 0{,}36$ deutlich, bei *Pinus mugo* die von 0,62. Bei allen 3 zweinadeligen *Pinus*-Arten ist eine Bande um $R_f = 0{,}58$ stark ausgebildet, diese Bande ist auch bei der Zirbe deutlich ausgeprägt. Insgesamt gibt es durchschnittlich 11 Banden, die in allen 3 zweinadeligen Kiefern mehr oder weniger deutlich ausgebildet gefunden werden können. Von 11 verschiedenen Peroxidaseisoenzymmustern berichten auch Snyder & Hamaker 1978 bei *Pinus palustris* und *Pinus taeda*, wobei nur 9 Banden gemeinsam sein sollen. In diesem Zusammenhang soll aber auch darauf hingewiesen werden, daß die Zahl der visuell erkennbaren Peroxidasebanden von der aufgetragenen Probemenge abhängt. So ist es durchaus möglich, daß man bei ein- und derselben Probe nach Auftrag eines größeren Probevolumens weitere sehr schwache Banden erkennen kann. Bei zu großer Probemenge geht jedoch üblicherweise die Trennschärfe verloren und intensive Banden überlagern sich teilweise mit den Nachbarbanden.

Koniferen haben trotz der genetischen Fixierung doch eine gewisse Variabilität im Peroxidasemuster, was dazu führt, daß auch außerhalb der bevorzugten R_f-Bereiche immer wieder Banden auftreten. Was für *Pinus* gesagt wurde, ist sicher auch für andere Koniferen wie *Picea*-, *Abies*- und *Larix*-Arten gültig. Die starke Variabilität und die große mögliche Zahl der Isoenzyme läßt somit die Peroxidase bei Koniferen nach unseren Erfahrungen nur schwer für genetische Studien innerhalb der Art heranziehen, wie etwa für Untersuchungen von Hochland- und Tieflandformen. Geeigneter scheint dafür die Verwendung von z. B. Esterasen (vgl. Bartels 1971, Tigerstedt 1973, Rudin *et al.* 1974, Kelley & Adams 1978 u. a.). Nur bei *Pinus nigra* konnten wir feststellen, daß eine Herkunft aus dem Steinfeld (Niederösterreich) ein relativ einheitliches Muster zeigt, zu welchem sich auch die Schwarzföhren aus Südkärnten mehr oder weniger zuordnen lassen. Die Kulturformen in den Parkanlagen von Graz zeigen sich jedoch als z. T. überaus abweichend. Dies ist vermutlich damit zu erklären, daß die Schwarzföhren stark in Unterarten gegliedert sind, die sich oft deutlich voneinander unterscheiden (Bonnet-Masimbert & Bikay-Bikay 1978) und bei Kulturformen die Herkunft nie eruierbar ist.

Diese Arbeit wurde durch eine Subvention des Fonds zur Förderung wissenschaftlicher Forschung unterstützt.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

BARTELS H. 1971. Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. — Planta 99: 283—289.

BONNET-MASIMBERT M. & BIKAY-BIKAY V. 1978. Variabilité intraspécifique des isoenzymes de la glutamate-oxaloacetate-transaminase chez *Pinus nigra* ARNOLD intérêt pour la taxonomie des sous espèces. — Silvae Genet. 27: 49—84.

ESTERBAUER H., GRILL D. & ZOTTER M. 1978. Peroxydase in Nadeln von *Picea abies* (L.) KARST. — Biochem. Physiol. Pflanzen 172: 155—159.

GRILL D., ESTERBAUER H. & BIRKNER M. 1980. Untersuchungen über die Peroxidaseaktivität in Lärchennadeln. — Beitr. Biol. Pflanzen 55: 67—76.

— — — & KLANSEK E. 1982. Das Peroxidaseisoenzymmuster von *Picea abies* (L.) KARST., *Abies alba* MILL. und *Larix decidua* MILL. — Phyton (im Druck).

KELLEY W. A. & ADAMS R. P. 1978. Analysis of isoenzyme variation in natural populations of *Juniperus ashei*. — Rhodora 80: 107—134.

RUDIN D., ERIKSON G., EKBERG I. & RASMUSON M. 1974. Studies of allele frequencies and inbreeding in Scots Pine populations by the aid of the isozyme technique. — Silvae Genet. 23: 10—13.

SNYDER E. B. & HAMAKER J. M. 1978. Inheritance of peroxidase isozymes in needles of Loblolly and Longleaf Pines. — Silvae Genet. 27: 125—129.

TIGERSTEDT P. M. A. 1973. Studies on isozyme variations in marginal and central populations of *Picea abies*. — Hereditas 75: 47—60.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1982

Band/Volume: 22_2

Autor(en)/Author(s): Grill Dieter, Esterbauer Hermann, Dobernig Irmgard, Klansek Klaus

Artikel/Article: Peroxidase-Isoenzymmuster in vier Pinus-Species. 233-241