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

Phyton (Austria)	**Vol. 27**	Fasc. 1	165–170	17. 7. 1987

Institut für Chemie der Universität für Bodenkultur, Arbeitsgruppe für Lebensmittel-, Umwelt- und Naturstoffchemie

Unterscheidung heimischer Eichen (*Quercus* spp.) durch Elektrophorese der im Splintholz vorkommenden Amylase- und Peroxidase-Isoenzyme

Von

Eleonore LICKL *) und Robert EBERMANN

Mit 2 Abbildungen

Eingelangt am 19. September 1986

Key words: *Quercus* spp., oak, sapwood, wood enzymes, amylase, peroxidase, isoenzymes, PAGE, hybrids, taxonomy.

Summary

LICKL E. & EBERMANN R. 1987. Identification of certain species of oak *(Quercus)* by polyacrylamide gel electrophoresis of amylase and peroxidase isoenzymes in the sapwood. – Phyton (Austria) 27 (1): 165–170, with 2 figures. – German with English summary.

Amylase and peroxidase isoenzymes of the sapwood of oaks *(Quercus* spp.) were identified by polyacrylamide gel electrophoresis. A taxonomy of the four oaks indigenous in Central Europe has been achieved by comparison of the isoenzyme patterns. The isoenzymes isolated from wood are stable over several months after cutting down. The hybrids of oak can be separated inequivocally from the thoroughbred, but no taxonomy is possible.

Zusammenfassung

LICKL E. & EBERMANN R. 1987. Unterscheidung heimischer Eichen *(Quercus* spp.) durch Elektrophorese der im Splintholz vorkommenden Amylase- und Peroxidase-Isoenzyme. – Phyton (Austria) 27 (1): 165–170, mit 2 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

---

*) Prof. Dr. R. EBERMANN, Institut für Chemie an der Universität für Bodenkultur Wien, Gregor Mendel-Straße 33, A-1180 Wien (Austria). Dr. E. LICKL (gegenwärtige Adresse), Ludwig Boltzmann-Institut für klinische Onkologie, Wolkersbergenstraße 1, A-1130 Wien (Austria).

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

Mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese können Peroxidase- und Amylase-Isoenzyme in Eichenhölzern nachgewiesen werden. Vergleichende Untersuchungen dieser Isoenzyme an insgesamt 85 verschiedenen Individuen ermöglichen eine Zuordnung der gefundenen Bandenmuster zu den vier in Mitteleuropa heimischen Eichenarten. Die in Hölzern nachgewiesenen Isoenzyme sind chemisch recht beständig, denn sie können noch mehrere Monate nach dem Fällen des Baumes nachgewiesen werden. Die häufig anzutreffenden *Quercus*-Bastarde sind in den beschriebenen Isoenzymschemata eindeutig von den reinen Sorten zu unterscheiden, ohne daß jedoch eine Taxonomie der Bastarde möglich ist.

Einleitung

Die Einführung der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen (PAGE) als Arbeitsmethode zur Untersuchung der molekularen Vielfalt von Eiweiß- und auch Nukleinsäuremolekülen in Pflanzen und Tieren hat unter anderem auch die Möglichkeiten zur systematischen Zuordnung von Individuen zu Arten und Familien erweitert. Verschiedene Varietäten konnten durch elektrophoretische Charakterisierung von Enzymen unterschieden werden (etwa WEHNER, DUICH & WATSCHKE 1976; LARSEN 1967, NATARELLA & SINK 1975, KUHNS & FRETZ 1978, GRILL et al. 1982 a, b, KRISPER & PUFF 1976, PORTO et al. 1977, RENALDO, BAILEY & NAGEL 1981).

Über das Vorkommen von enzymatischen Aktivitäten im Holz berichteten etwa KONDO 1964 und HÖLL 1972. Peroxidase (E.C.1.11.1.7) wurde im Holz zuerst von WARDROP & CRONSHAW 1962 nachgewiesen. Isoenzyme der Amylase und Peroxidase fanden erstmals EBERMANN & STICH 1982 im Splint- und Kernholz verschiedener Bäume. Damit konnte bewiesen werden, daß die in anderen Pflanzenteilen zu beobachtende molekulare Vielfalt grundsätzlich auch im verholzten Gewebe zu finden ist. So ist das Auftreten genetisch bestimmter polymorpher und nicht-polymorpher Proteine resp. Enzyme zu erwarten.

In dieser Arbeit wird der Versuch unternommen, die für heimische Eichenarten charakteristischen Amylase- und Peroxidase-Isoenzymvarianten im Holz festzustellen und so zu einer leichteren Zuordnung des Holzes zu einer Species zu gelangen.

Material und Methodik

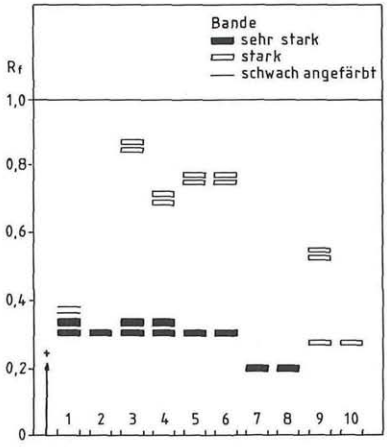
Im Mai und Juni wurden Aststücke von 85 Eichen unterschiedlichen Alters (mindestens 10 Jahre) im Großraum Wien gesammelt. Die Aststücke mit einem Durchmesser von größer als 5 cm wurden auf der Drehbank von der Rinde befreit, das Splintholz wird abgedreht und als Ausgangsmaterial verwendet. Die Extraktion und die Durchführung der PAGE ist früher beschrieben worden. (EBERMANN & STICH 1982), der Nachweis der Peroxidase erfolgte mit Benzidin und H_2O_2 (ORNSTEIN 1968), die Sichtbarmachung der Amylasen nach BARNA 1973; im Stärke enthaltenden Polyacrylamid-Gel

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

entstehen nach Inkubation bei 37° C (0,1 M Acetatpuffer pH 5,0, 1,47 g $CaCl_2$/l) an den Orten der Enzymaktivität Aufhellungen. Die Gele wurden durch visuellen Vergleich der R_f-Werte ausgewertet.

Ergebnisse

In den elektrophoretisch untersuchten Splintholzproben der Eichen konnten Bandenmuster für Peroxidase- und Amylase-Isoenzym-Aktivitäten nachgewiesen werden. Die Banden der Enzymmuster der anodisch wandernden Isoenzyme sind bei den untersuchten Individuen der vier bei uns heimischen Eichen auf einen jeweils typischen R_f-Bereich beschränkt. Durch die Betrachtung des Peroxidase- und des Amylaseisoenzymmusters ist eine eindeutige Zuordnung zu einer Eichenart möglich. In den Abbildungen 1 und 2 sind Peroxidase- und Amylase-Isoenzyme der Eichen dargestellt.



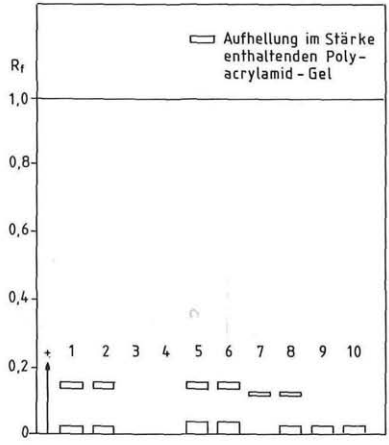


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Elektropherogramms von Peroxidaseisoenzymen.
1, 2 . . . *Q. petraea;* 3, 4 . . . *Q. pubescens;* 5, 6 . . . *Q. cerris;* 7, 8 . . . *Q. robur;* 9, 10 . . *Quercus* – Bastarde.

Abb. 2. Schematische Darstellung eines Elektropherogramms von Amylaseisoenzymen. (1–10 s. Abb. 1).

Quercus petraea LIEBL., Traubeneiche

Es wurden 24 Individuen untersucht. Die Hauptbande der Peroxidaseaktivität ist auf den Bereich von R_f = 0,31 beschränkt; diese Hauptaktivität kann aus einer Bande bestehen oder aus vier Isoenzymbanden, von denen diese mit geringerer Wanderungsstrecke stärker gefärbt sind als jene mit etwas größerer. Außer im angegebenen R_f-Bereich treten bei den untersuchten Individuen keine Peroxidaseaktivitätsbanden im Gel auf.

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

Die Amylasepherogramme zeigen eine diskrete Bande der Aufhellung im Stärke enthaltenden Polyacrylamidgel. Der R_f-Wert beträgt 0,13; gleichzeitig bleibt eine Isoenzym bei $R_f = 0{,}01$.

Quercus pubescens WILLD., Flaumeiche

Wie bei *Q. petraea* tritt die Peroxidase-Hauptaktivität bei $R_f = 0{,}31$ auf, aber nie solitär, sondern stets als Isoenzym von mindestens zwei Banden ähnlichen Molekulargewichtes. Zusätzlich finden sich immer Isoenzympaare im R_f-Bereich zwischen 0,68 und 0,86.

In den 18 untersuchten Flaumeichen-Holzproben konnte unter den angegebenen methodischen Bedingungen keine Amylaseaktivität erfaßt werden.

Quercus cerris L., Zerreiche

hat neben einer einzelnen Lokalisation der Peroxidaseaktivität (R_f = 0,31) ein Isoenzympaar bei $R_f = 0{,}76$. Im Unterschied zu

Q. pubescens tritt die Hauptaktivität als diskrete Bande auf.

Q. cerris kann am Start starke Amylaseaktivität zeigen, auf jeden Fall aber bei $R_f = 0{,}13$.

Es wurden 22 Individuen untersucht.

Quercus robur L., Stieleiche

weicht vom allgemeinen Schema der R_f-Bereiche etwas ab. Bei gleichen methodischen Bedingungen ist der R_f-Wert der Hauptaktivität der Peroxidase eindeutig kleiner, er beträgt 0,21. Bei den neun untersuchten Zerreichen konnten keine zusätzlichen Peroxidasebanden gefunden werden.

Auch das Amylasemuster zeigt veränderte R_f-Werte ($R_f = 0{,}11$); auch hier ist die Wanderungsstrecke des Amylaseenzyms kleiner, die Hauptbanden der Amylaseaktivität von *Q. petraea* und von *Q. cerris* haben größere Mobilität im angewendeten Polyacrylamidgel (10%, 1 : 100).

Quercus – Bastarde

Die Bastarde sind durch ihre Isoenzymmuster eindeutig abzugrenzen, der R_f-Wert der Peroxidase-Hauptaktivitätsbande beträgt 0,27, bei 22% der untersuchten Bastarde gibt es schwache Isoenzympaare bei $R_f = 0{,}51$.

Amylaseaktivität ist nur am Start nachzuweisen ($R_f = 0{,}01$).

Besprechung

Aus pflanzlichen Materialien isolierte Enzyme sind für genetische Untersuchungen gut geeignet, die Isolation ist leicht durchzuführen, die Präparationen sind stabil und elektrophoretisch gut trenn- und nachweisbar.

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

Die in Hölzern nachgewiesenen Peroxidase- und Amylaseenzyme sind auch recht beständig, sie sind noch Monate nach dem Fällen des Baumes ohne Veränderung des Bandenmusters aufzufinden.

Die Peroxidasen aus Eichensplintholz sind für die elektrophoretische Charakterisierung der Arten gut geeignet. Es treten Hauptbanden der Aktivität bei charakteristischen R_f-Werten auf. *Q. petraea, Q. cerris* und *Q. pubescens* haben eine Peroxidasebande bei $R_f = 0{,}31$. Nebenaktivitäten treten bei R_f-Werten zwischen 0,68 und 0,86 auf. Diese schnellwandernden Isoenzyme gestatten eine Zuordnung zu einer definierten Species. Die Flaumeiche hat immer Isoenzympaare der Peroxidase im Bereich $R_f = 0{,}68$ bis 0,86; die Zerreiche ein einzelnes Paar bei 0,76. Bei der Steineiche fehlt ein schnell wanderndes Peroxidaseisoenzym. Die Hauptaktivität kann bei der Steineiche als Einzelbande, als Doppelbande oder als Isoenzymgruppe aus vier Einzelbanden auftreten. Die Enzyme aus dem Splintholz von *Q. robur* haben andere Wanderungseigenschaften im Gel. Sie wandern generell weniger schnell als die von *Q. petraea, Q. cerris* oder *Q. pubescens.*

Eine statistische Auswertung der Peroxidasebanden resp. ihrer R_f-Werte ist wegen der geringen Anzahl der Aktivitätsbanden und deren geringer Variabilität nicht notwendig. Durch die Anwendung einer Flachgelapparatur ist die Homologie ähnlicher Banden leicht und eindeutig sicherzustellen. Aus der Bestimmung der R_f-Werte bei definierter Gelkonzentration und -vernetzung ist rein visuell eine eindeutige Zuordnung möglich.

Die Amylaseisoenzyme der Eichenhölzer sind wie die Peroxidaseisoenzyme zur Charakterisierung gut geeignet. Die Amylase von *Q. pubescens* zeigt unter den angewendeten methodischen Bedingungen keine Aktivität. Die Amylasen der anderen Eichenarten zeigen gewisse Charakteristika. Es gibt eine Hauptbande der Aktivität bei $R_f = 0{,}13$ (bei *Q. robur* bei 0,11). Das Bandenmuster ist einfacher als bei den Peroxidasen.

Die Enzyme der Bastarde zeigen wenig Variabilität, die Hauptaktivität der Peroxidase ist bei $R_f = 0{,}27$. Amylasen treten nur bei $R_f = 0{,}01$ auf.

Wie schon GRILL et al. 1982 b an Fichten festgestellt hat, gilt auch für die Eiche, daß jeder Baum ein für ihn typisches Enzymbandenmuster hat. Die Variabilität der multiplen Formen ist allerdings nicht sehr groß. Andere Enzyme, wie β-Glucosidase oder Esterase, sind für eine Charakterisierung der Eichen ungeeignet, da sie bei allen untersuchten Individuen als identische Banden auftreten (LICKL 1980). Eine Zuordnung zu einem Standort (Wienerwald, Lobau) ist durch Vergleich der Isoenzymvarianten nicht möglich. Die Aktivitäten der Peroxidase- und Amylaseenzyme der Laub- und Nadelhölzer sind zwar jahreszyklischen Schwankungen unterworfen (NELSON 1978, SHAIN & MACKAY 1973, EBERMANN & STICH 1985), aber die gewählte Methodik des Nachweises der Peroxidase mit Benzidin und Wasserstoffperoxid in 15%igen Polyacrylamidgelen gestattet den visuellen Vergleich der Aktivitäten einzelner Individuen auch in den Sommermonaten.

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

Literatur

BARNA J. 1973. Trennung von tierischen und pflanzlichen Proteinen durch Polyacrylamidgelelektrophorese. Untersuchungen und praktische Anwendungen. – Dissertation, Universität für Bodenkultur Wien.

EBERMANN R. & STICH K. 1982. Peroxidase and amylase isoenzymes in the sapwood and heartwood of trees. – Phytochemistry 21: 2401–2402.

– & – 1985. Distribution and seasonal variation of wood peroxidase activity in oak *(Quercus robur)*. – Wood and Fiber Science 17: 391–396.

GRILL D., ESTERBAUER H., BIRKNER M. & KLANSEK E. 1982 a. Peroxidase-Isoenzymmuster in vier *Pinus*-Species. – Phyton 22: 233–241.

– , – , – & – 1982 b. Die Peroxidase-Isoenzymmuster von *Picea abies, Abies alba* und *Larix decidua*. – Phyton 22: 201–211.

HÖLL W. 1972. Stärke und Stärkeenzyme im Holz von *Robinia pseudoacacia* L. – Holzforschung 26: 41–45.

KRISPER J. & PUFF C. 1976. Peroxidasemuster und Systematik von *Argyranthemum* und *Chrysanthemum* s. str. *(Asteraceae-Anthemideae)*. – Plant Syst. Evol. 124: 291–301.

KONDO T. 1964. On the wood enzyme. – J. Jap. Wood Res. Soc. 10: 43–47.

KUHNS L. J. & FRETZ T. A. 1978. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. I. Extraction and storage of protein and active enzymes from rose leaves. – J. Am. Soc. Hortic. Sci. 103: 503–508.

LARSEN A. L. 1967. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybeans *Glycine max*. L. „Merrill". – Crop. Sci. 7: 311–313.

LICKL E. 1980. Untersuchung von Peroxidase- und Amylaseenzymen in Hölzern (*Acer* sp., *Quercus* sp., *Loranthus europaeus)*, ihrer Veränderung bei Schädlingsbefall und ihrer Verwendbarkeit zur Systematik der Eichen. – Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur, Wien.

NATARELLA N. J. & SINK K. C. 1975. Electrophoretic analysis of proteins and peroxidases of selected *Petunia* species and cultivars. – Bot. Gaz. 136: 20–26.

NELSON N. D. 1978. Xylem ethylene, phenol-oxidizing enzymes, and nitrogen and heartwood formation in walnut and cherry. – Can. J. Bot. 56: 626–634.

ORNSTEIN L. 1968. in: MAURER H. R. (ed.) Diskelektrophorese. – Walter de Gruyter, S. 70.

PORTO M. L., MARIATH J. E. A., DETONI M. L., CAVALLI S. S., WINGE H. & EHRENDORFER F. 1977. New species of *Relbunium (Rubiaceae)* from Brazil, with notes on flavonoid and peroxidase patterns. – Plant Syst. Evol. 128: 177–193.

RENALDO A. F., BAILEY D. T. & NAGEL G. M. 1981. Multiple forms of peroxidase from *Narcissus pseudonarcissus*. – Phytochemistry 20: 591–595.

SHAIN L. & MACKAY J. F. G. 1973. Seasonal fluctuation in respiration of aging xylem in relation to heartwood formation in *Pinus radiata*. Can. J. Bot. 51: 737–741.

WARDROP A. B. & CRONSHAW J. 1962. Formation of phenolic substances in the ray parenchyma of angiosperms. – Nature 193: 90–92.

WEHNER D. J., DUICH J. M & WATSCHKE T. L. 1976. Separation of Kentucky bluegrass cultivars using peroxidase isoenzyme banding patterns. – Crop Sci. 16: 475–480.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1987

Band/Volume: 27_1

Autor(en)/Author(s): Lickl Eleonore, Ebermann Robert

Artikel/Article: Unterscheidung heimischer Eichen (Quercus ssp.) durch Elektrophorese der im Splintholz vorkommenden Amylase- und Peroxidase-Isoenzyme. 165-170