

# Vererbung von Isoenzymmarkern bei Eibe (*Taxus baccata* L.)

Von H. HERTEL

Bundeforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstpflanzenzüchtung,  
Eberswalder Chaussee 3, D-15377 Waldsiedersdorf

(Eingegangen am 28. Juni 1996)

## Zusammenfassung

Mit der Methode der Stärke- und Polyacrylamidgelelektrophorese wurden mit 11 Enzymsystemen 18 Markerloci, davon 14 polymorphe, in Endospermen der Eibe (*Taxus baccata* L.) untersucht. Die in bisherigen Publikationen von THOMA (1992) und LEWANDOWSKI et al. (1992) veröffentlichten Beschreibungen werden durch diese Arbeit ergänzt.

Das zur Verfügung stehende Untersuchungsmaterial erlaubt die Prüfung von 78 Zwei-Locus-Kombinationen auf unabhängige Vererbung. Neben 3 schon bekannten Kopplungsgruppen (PGM-A/PGI-B, Rekombinationsrate 0,21; IDH-B/SKDH-A, 0,26; ADH-A/LAP-B, 0,33) wurden weitere 10 Zwei-Locus-Kombinationen mit Rekombinationsraten zwischen 0,21 und 0,35 an jeweils einem der untersuchten Bäume gefunden.

Bei einigen Eibensamen konnte anhand der Isoenzymmuster der Endospermgewebe Polyembryonie nachgewiesen werden.

**Schlagwörter:** *Taxus baccata* L., Genetik, Isoenzymmarker, Kopplung, Polyembryonie.

**FDC:** 165; 165.3; 174.7 *Taxus baccata*.

## Abstract

*Inheritance of isozyme markers in English yew (Taxus baccata L.).*

Eleven enzyme systems encoding for 18 isozyme loci were analysed by horizontal starch gel and vertical polyacrylamide gel electrophoresis in female gametophytes of English yew (*Taxus baccata* L.). The descriptions from THOMA (1992) and LEWANDOWSKI et al. (1992) were completed with some additional isozyme markers. No deviations from the expected 1:1 segregation were found at the 14 polymorphic loci AAT-B, AAT-C, ADH-A, ADH-B, IDH-A, IDH-B, LAP-B, MDH-A, MR-A, NDH-B, PGDH-A, PGI-B, PGM-A and SKDH-A. The material allowed to examine 78 two-locus combinations for linkage relationships. The most remarkable linkage was detected between the loci PGM-A/PGI-B with a recombination frequency of 0.21 at all of the 6 trees tested. Further, the analysis resulted in the linkage groups IDH-B/SKDH-A (recombination frequency 0.26) and ADH-A/LAP-B (recombination frequency 0.33) at 2 resp. 3 individuals. Additionally, 10 two-locus combinations with recombination frequencies in the

Tabelle 1. – Übersicht über die untersuchten Enzymsysteme und Genloci bei Eibe.

Enzymsystem	Elektrophorese	Genlocus	Anzahl der Allele	Anzahl untersuchter Bäume	
				Knospen	Endosperme
Alkoholdehydrogenase (Dimer)	B	ADH-A ADH-B	3	*	18
			3	18	17
Aspartat-aminotransferase (Dimer)	PAGE	AAT-A AAT-B AAT-C	1	18	18
			2	18	18
			3	*	18
Isocitratdehydrogenase	A	IDH-A IDH-B	2	*	17
			4	***	18
Leucinaminopeptidase (Monomer)	B	LAP-A LAP-B	1	18	18
			2	18	18
Malatdehydrogenase	A	MDH-A	2	**	17
Menadionreduktase	C	MR	2	**	18
NADH-Dehydrogenase	C	NDH-A NDH-B	1	**	12
			3	**	12
6-Phosphogluconat-dehydrogenase (Dimer)	A	PGDH	2	18	18
Phosphoglucose-isomerase (Dimer)	B	PGI-A PGI-B	1	18	18
			4	18	18
Phosphoglucomutase (Monomer)	A	PGM-A	3	18	18
Shikimatdehydrogenase (Monomer)	A	SKDH-A	2	18	13

\*) keine oder zu geringe Enzymaktivität

\*\*) ungenügende Proteintrennung

\*\*\*) keine Interpretation möglich aufgrund von Doppelbandallelen

range of 0.21 to 0.35 were found in only one of the investigated trees.

Some polyembryonic seeds were revealed by their 2-allelic patterns in the gametophyte tissue of heterozygous mother trees.

### Einleitung

Der Eibe (*Taxus baccata* L.) als in Mitteleuropa selten gewordener Baumart wird unter dem Aspekt der Erhaltung genetischer Ressourcen und des Naturschutzes zunehmend große Aufmerksamkeit entgegengebracht (u. a. THOMA und KLEINSCHMIT, 1994; LEWANDOWSKI et al., 1995; SCHNECK et al., 1995). Diese Baumart findet aber auch wegen des wertvollen Holzes in der Ertragskunde und im Waldbau wieder Beachtung. Weiterhin werden seit einigen Jahren aus Eibennadeln und Zellkulturen extrahierte Bestandteile der Taxol-Gruppe zu Medikamenten für die Krebstherapie verarbeitet (u. a. HEINSTEIN und CHANG, 1994), so daß sich auch neue züchterische Aspekte für medizinische Zwecke ergeben.

An genetischen Inventuren bei der Eibe ist im Vergleich zu den schon gut untersuchten Hauptbaumarten in Europa noch relativ wenig gearbeitet worden (HATTEMER, 1995). Auf Isoenzymmarkern basierende genetische Untersuchungen können und sollen jedoch auch bei den selteneren Baumarten Erhaltungsprogramme sowie forstliche und züchterische Maßnahmen unterstützen.

Die bisher in den Publikationen von LEWANDOWSKI et al. (1992) und THOMA (1992) veröffentlichten Beschreibungen von Isoenzym-Genloci zur genetischen Charakterisierung dieser Baumart sowie die Untersuchungen zur Kopplung von Isoenzymmarkern sollen in dieser Arbeit ergänzt werden.

### Material und Methoden

Zur Prüfung der 1:1-Segregation von Isoenzymbanden der Eibe wurden von 18 weiblichen Bäumen, bei denen einzelbaumweise geerntetes Saatgut vorhanden war, jeweils diploides (Ruheknospen, Embryonen) und haploides Gewebe (Endosperme) untersucht. Das Probenmaterial wurde kühl gelagert (0°C...2°C), jedoch nicht eingefroren. Das Saatgut wurde ohne weitere Behandlung wie Stratifizierung oder Keimung zur Präparation der Embryonen und Endosperme verwendet.

Alle Proben wurden einzeln in 60 µl Extraktionspuffer (0,1 M Tris-Borat-Puffer pH 7,4 mit 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol, modifiziert nach LUNDKVIST, 1974) homogenisiert und unmittelbar zur Elektrophorese aufgetragen.

Die Proteintrennung für die einzelnen Enzymsysteme (Erklärung der Abkürzungen in Tab. 1) erfolgte in 3 verschiedenen Stärkegelelektrophoresen (A, B, C) und in einem Polyacrylamidsystem (PAGE):

(A) für IDH, MDH, PGDH, PGM und SKDH: 12,5% Toronto-Stärke in 0,02 M Tris-Citrat-Puffer pH 7,5 und 0,15 M Tris-Citrat-Elektrodenpuffer pH 7,5;

(B) für ADH, LAP und PGI: 12,5 % Stärke in 0,05 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,1 und 0,2 M Lithium-Borat-Elektrodenpuffer pH 8,1;

(C) für MR und NDH: 12,5 % Stärke in 0,075 M Tris-Citrat-Puffer pH 8,7 und 0,3 M Na-Borat-Elektrodenpuffer pH 8,3;

(PAGE) für AAT: 7,5 % Polyacrylamid in 0,375 M Tris-HCl-Puffer pH 8,9, und 0,005 M Tris-0,04 M Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,3 (MAURER, 1968).

Die enzyspezifischen Färbelösungen für AAT, PGDH und PGI wurden nach YEH und O'MALLEY (1980), die Lösungen für

Tabelle 2. – Zusammenstellung der Genotypen von 32 Endospermproben an 5 Isoenzymloci, die nicht haploid zu sein scheinen (\* = 2 Endosperme in einer Samenschale sichtbar, Hybr. = Hybridbande bei dimeren Enzymen).

Baum-Nr.	ADH-A	AAT-C	MR	PGM-A	PGI-B
1/11	13 ohne Hybr.	2	2	3	1
1/12	3	2	1	13	1
	3	12 ohne Hybr.	1	3	1
3/20	3	1	1	3	24 ohne Hybr.
	1	12 mit Hybr.	2	1	4
	1	12 mit Hybr.	2	1	2
	1	12 mit Hybr.	1	1	4
	3	12 mit Hybr.	2	1	4
5/29	3	1	2	1	12 mit Hybr.
	3	1	2	3	12 mit Hybr.
	1	1	2	3	12 mit Hybr.
	3	1	2	13	1
	1	1	2	13	2
	1	1	2	13	2
	1	1	2	13	2
5/39	3	2	12 mit Hybr.	3	4
7/43 *	13 ohne Hybr.	1	1	3	13 ohne Hybr.
	3		1	3	13 mit Hybr.
	3		1	3	13 mit Hybr.
	3		1	3	13 mit Hybr.
	3		1	3	13 mit Hybr.
7/45	3	12 ohne Hybr.	1	13	2
	3	12 ohne Hybr.	1	3	2
	2	2	1	3	24 ohne Hybr.
	2	2	1	1	24 ohne Hybr.
	3	12 mit Hybr.	1	1	4
	3	12 mit Hybr.	1	3	2
	3	12 mit Hybr.	1	3	2
	3	12 mit Hybr.	1	1	4
8/51 *	3	12 ohne Hybr.	2	3	2
8/52			1	13	2
			1	13	2

ADH, IDH, LAP, MDH, PGM und SKDH nach VALLEJOS (1983), für MR und NDH nach CHELIAK und PITEL (1984) hergestellt.

Für den Vergleich der beobachteten mit den zu erwartenden Verteilungen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

## Ergebnisse

### 1. Beobachtete Besonderheiten

Zunächst wurde versucht, neben dem Endospermgewebe eines Samens für die Analyse der Mendel-Spaltung auch den zugehörigen Embryo für weitere Aussagen über die genetische Struktur von Nachkommen in die genetische Analyse einzubeziehen. Die Enzymaktivitäten der Embryonen reichte für eine solche Untersuchung jedoch nicht aus.

Bei der Präparation des Untersuchungsmaterials (insgesamt 837 Samen von 18 Bäumen) konnte festgestellt werden, daß einige wenige Samen 2 Embryonen enthielten. Das Endospermgewebe solcher Samen wurde jedoch wie eine Probe behandelt, da bis auf 2 Ausnahmen keine sichtbare Abgrenzung der Endosperme gefunden wurde. Bei der Auswertung der Zymogramme zeigten sich bei insgesamt 32 der 837 Endospermproben nicht nur die im haploiden Zustand zu erwartenden Bandenmuster, sondern an ein oder 2 Enzymgenloci die Banden, die den im heterozygoten Mutterbaum vorkommenden Allelen entsprechen (Tab. 2).

Bei 9 Endospermproben traten keine Hybridbanden auf, wie sie im diploiden Zustand bei den dimeren Enzymen ADH, AAT und PGI zu erwarten gewesen wären. Bei 16 Endospermproben kamen bei den Enzymen AAT, MR und PGI die für den heterozygoten Zustand typischen Hybridbanden vor. In jedem

Fall besaßen diese Endosperme nur die auch im Mutterbaum vorhandenen Allele. Dies und die Verteilung der Enzymaktivität auf die 3 Banden, d. h. stärkere Aktivität der Hybridbande, deuten nicht auf Embryoreste im Endospermpräparat hin. Weitere 7 Fälle traten am Genort PGM-A auf, sie können jedoch aufgrund der monomeren Struktur dieses Enzyms nicht zugeordnet werden.

Da die Erscheinung nicht sicher zu interpretieren ist (siehe Diskussion), wurden diese 32 Endospermproben in den Berechnungen zur Segregation und zur Kopplung nicht berücksichtigt.

### 2. Beschreibung von Isoenzymmarkern

In der nachfolgenden Beschreibung der Isoenzymmuster der einzelnen Enzymsysteme (siehe auch Tab. 1) sind die am weitesten zur Anode wandernden Zonen mit A, die folgenden mit B bzw. C bezeichnet. In derselben Reihenfolge werden die Allele innerhalb jedes Locus mit 1, 2, 3 usw. benannt. Die Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der beschriebenen Genloci und Allele. Die in der Tabelle 3 zusammengefaßten beobachteten Verteilungen der beiden Allele in den Endospermen von Samen heterozygoter Bäume zeigen keine signifikanten Abweichungen von den entsprechend der MENDEL-Spaltung erwarteten 1:1-Verteilungen.

Das dimere Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) besitzt bei Eiben 2 dicht aufeinanderfolgende Aktivitätszonen in Endospermen, die 2 Genloci zugeordnet wurden. Dabei zeigte das als ADH-A3 bezeichnete Allel dieselbe Wanderungsstrecke wie ADH-B1. In diploidem Gewebe war nur die B-Zone aktiv. Bei den Genotypen B1B2 und B1B3 war deutlich eine Hybridbande zwischen den Banden der beiden Allele zu erkennen, beim Genotyp B2B3 dagegen aufgrund des geringen Abstandes zwischen den Allelen nur ein diffuses Band. Die jeweils häufigsten Allele sind A3 und B3. Das Enzym ADH wurde bisher nicht beschrieben.

Das ebenfalls dimere Enzym Aspartataminotransferase (AAT) besitzt 3 Aktivitätszonen, die 3 Genloci zugeordnet wurden. Der Genort AAT-A zeigte im hier untersuchten Material keine Variation. Am Genort AAT-B kam das Allel B2 häufiger vor als B1. Die Genloci AAT-A und AAT-B zeigten in Knospenmaterial hohe Enzymaktivitäten. In Endospermgewebe war zusätzlich der schwach gefärbte Genort AAT-C sichtbar. Neben den etwa gleich häufigen Allelen C1 und C2 konnte bei einem Baum ein Allel C3 nachgewiesen werden. Von THOMA (1992) wurde AAT-A als monomorpher Genort und AAT-B mit 2 Allelen beschrieben, bei LEWANDOWSKI et al. (1992) sind AAT-A und AAT-B monomorph, AAT-C wird als variabel, aber sehr schwach gefärbt erwähnt.

In den für Isocitratdehydrogenase (IDH) gefärbten Gelen konnten für Endospermgewebe 2 Aktivitätszonen festgestellt werden. Die dem Genort IDH-A zugeordnete Zone zeigte 2 Doppelbandallele, wobei A2 etwas häufiger als A1 war. Am Genort IDH-B konnten insgesamt 4 Varianten festgestellt werden, davon 3 Doppelbanden (Allele B1, B3 und B4) und eine Einfachbande (Allel B2), wobei die langsamer wandernde Bande von B1, das Allel B2 und die schneller wandernde Bande von B3 die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit haben. Das häufigste Allel war B3, die Allele B1 und B4 kamen jeweils nur einmal vor. Der Genort IDH-B ist auch in Knospen aktiv, kann jedoch in diploidem Gewebe aufgrund der Doppelbandallele nicht interpretiert werden. Eine ähnliche Beschreibung der IDH-Loci findet sich auch bei LEWANDOWSKI et al. (1992).

Das monomere Enzym Leucinaminopeptidase (LAP) besitzt sowohl in diploidem Knospengewebe als auch haploiden Endospermen 2 Aktivitätszonen. Die dem Genort LAP-A

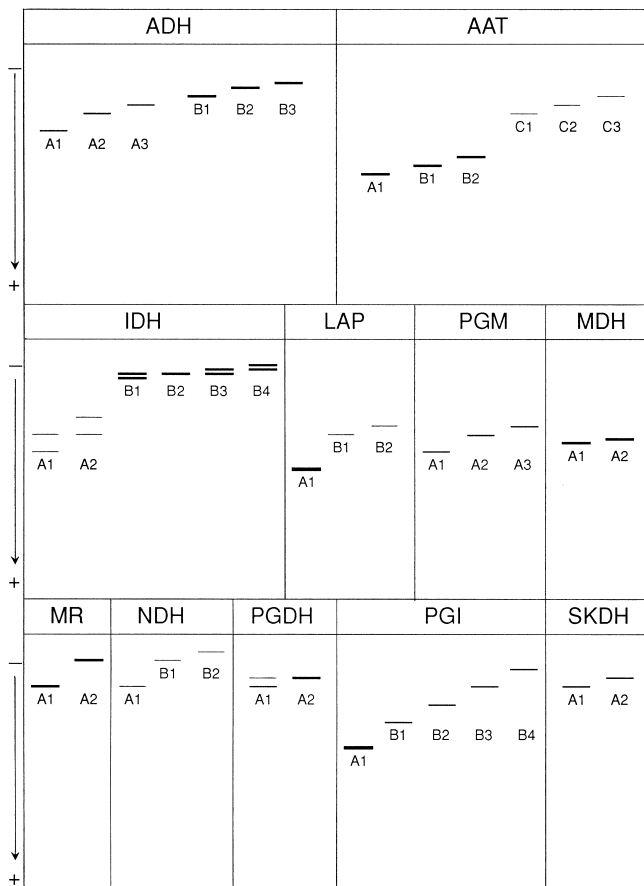


Abbildung 1. – Schematische Darstellung der Isoenzymmuster an 17 Genorten bei Eibe.

Tabelle 3. – Vergleich der beobachteten mit den erwarteten Verteilungen der Allele in Endospermen heterozygoter Bäume (keine signifikanten Unterschiede).

Genlocus	Allele	Spaltungs- verhältnis	FG	Chi-Quadrat (Homogenität)	Chi-Quadrat (Spaltung)
ADH-A	A1 - A3	94 : 93	3	2.508	0.005
	A2 - A3	8 : 14	-	-	1.636
ADH-B	A1 - A2	51 : 48	-	-	0.091
	A1 - A3	29 : 32	-	-	0.148
	A2 - A3	16 : 18	-	-	0.118
AAT-B	B1 - B2	30 : 35	-	-	0.385
AAT-C	C1 - C2	155 : 152	4	4.881	0.029
	C2 - C3	7 : 9	-	-	0.250
IDH-A	A1 - A2	54 : 62	2	1.716	0.552
IDH-B	B1 - B3	28 : 41	-	-	2.449
	B2 - B3	83 : 95	2	1.102	0.809
	B3 - B4	6 : 6	-	-	0
LAP-B	B1 - B2	123 : 122	4	5.256	0.004
MDH-A	A1 - A2	93 : 111	4	5.909	1.588
MR-A	A1 - A2	181 : 180	6	2.357	0.003
NDH-B	B1 - B2	50 : 43	2	4.427	0.529
PGDH-A	A1 - A2	223 : 203	7	3.514	0.939
PGI-B	B1 - B2	58 : 60	2	1.944	0.039
	B1 - B3	50 : 42	1	0.195	0.697
	B1 - B4	54 : 40	1	0.926	2.085
	B2 - B4	97 : 101	1	0.139	0.081
	B3 - B4	30 : 32	-	-	0.065
PGM-A	A1 - A3	250 : 243	8	3.368	0.099
	A2 - A3	52 : 43	1	0.668	0.853
SKDH-A	A1 - A2	24 : 32	1	0.721	1.143

zugeordnete stark gefärbte Zone war ohne Variation, der Genort LAP-B mit geringer Enzymaktivität zeigte 2 etwa gleich häufige Allele. Damit wurden die 1992 von LEWANDOWSKI et al. beschriebenen Ergebnisse bestätigt. THOMA (1992) konnte nur LAP-A als monomorphen Locus nachweisen.

Die Malatdehydrogenase (MDH) ist ein dimeres Enzym, das in den meisten bisher untersuchten Koniferenarten durch 4 Genorte kodiert wird. Sie bildet zwischen den Loci MDH-B und MDH-C Interlocushybridbanden aus (EL-KASSABY, 1981). Bei Isoenzymmustern von Eibenendospermen wird der Genort MDH-A durch eine stark gefärbte Bande sichtbar. Die nachfolgenden 1 bis 3 Banden ließen sich nicht einzelnen Loci zuordnen. Im bisher untersuchten Material wurden 2 Allele am Locus MDH-A gefunden, deren Wanderungstrecken sich nur geringfügig unterscheiden. Im diploiden Material ließen sich die Genotypen A1A2 und A2A2 nicht unterscheiden. Das Enzym MDH wurde bei Eiben bisher nicht beschrieben.

Die Isoenzymmuster der Menadionreduktase (MR) und Diaphorase sowie die ohne zusätzliche Substrate wie Menadion oder Dichlorphenolindophenol anfärbaren NADH-Dehydrogenasen (NDH) werden oft nicht voneinander unterschieden. Wahrscheinlich entspricht der in unseren Untersuchungen gefundene Genort MR-A mit 2 Allelen dem ebenfalls mit A bezeichneten Genort bei THOMA (1992) und LEWANDOWSKI et al. (1992), während die nachfolgenden Zonen B bzw. C wahrscheinlich NADH-Dehydrogenasen sind. Am putativen Locus NDH-A wurde keine Variation, bei NDH-B wurden 2 Allele

gefunden. In diploidem Material konnte bei einem Teil der Proben der Locus MR-A interpretiert werden, die NADH-Dehydrogenasen waren hier aufgrund ihrer ungenügenden Trennschärfe und geringen Aktivität nicht auswertbar.

Die Isoenzymmuster der 6-Phosphogluconatdehydrogenase (PGDH) zeigten bei Endospermen einen mit PGDH-A bezeichneten Locus mit 2 Allelen, wobei Endosperme mit dem Allel A1 eine 2. schwache Bande mit gleicher Wanderungstrecke wie die Bande des Allels A2 besaßen. Da für die Eibe wie für die meisten anderen Koniferenarten mindestens 2 Genloci angenommen werden können, handelt es sich möglicherweise um den im bisher untersuchten Material monomorphen Locus PGDH-B, dessen Bande vom Allel A2 überlagert wird. In diploidem Material ist der Genort PGDH-A im heterozygoten Zustand als breite diffuse Bande sichtbar. Für dieses Enzym wurde von LEWANDOWSKI et al. (1992) ein Genort mit 3 Doppelbandallelen beschrieben.

Das dimere Enzym Phosphoglucoseisomerase (PGI) besitzt in Knospen und Endospermen zwei stark gefärbte Aktivitätszonen. Der als PGI-A bezeichnete Genort zeigte in Knospen und Endospermgewebe keine Variation. Am Genort PGI-B konnten insgesamt 4 Allele nachgewiesen werden, die einen etwa gleichen Abstand in der Wanderungstrecke zueinander hatten. In diploidem Gewebe war bei heterozygoten Genotypen eine deutlich ausgeprägte Hybridbande sichtbar. Damit wurden die 1992 von THOMA und von LEWANDOWSKI et al. beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

Tabelle 4. – Anzahl der geprüften Kopplungen bei 2-Locus-Kombinationen (über der Diagonalen) und signifikante Kopplungen (Irrtumswahrscheinlichkeit < 0,05, unter der Diagonalen).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>1 AAT-B</b>	*	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1
<b>2 AAT-C</b>	n.s.	*	3	2	1	2	2	2	4	1	4	4	5	1
<b>3 ADH-A</b>	n.s.	1	*	0	1	1	3	2	3	1	3	2	3	1
<b>4 ADH-B</b>	-	n.s.	-	*	0	1	1	0	2	1	3	2	2	0
<b>5 IDH-A</b>	n.s.	n.s.	n.s.	-	*	2	1	3	0	0	2	3	3	1
<b>6 IDH-B</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	1	2	2	1	2	4	3	2
<b>7 LAP-B</b>	-	n.s.	2	n.s.	n.s.	n.s.	*	2	3	3	3	3	3	0
<b>8 MDH-A</b>	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	*	1	0	3	4	5	1
<b>9 MR</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	n.s.	*	4	3	3	6	1
<b>10 NDH-B</b>	-	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	-	1	*	1	2	2	0
<b>11 PGDH</b>	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	5	5	1
<b>12 PGI-B</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	6	2
<b>13 PGM-A</b>	n.s.	n.s.	n.s.	1	n.s.	1	n.s.	1	1	1	n.s.	6	*	2
<b>14 SKDH-A</b>	n.s.	n.s.	n.s.	-	n.s.	1	-	n.s.	n.s.	-	n.s.	n.s.	1	*

Das monomere Enzym Phosphoglucomutase (PGM) besitzt sowohl in Knospen- als auch Endospermmaterial eine als Genort PGM-A bezeichnete Aktivitätszone. Es konnten 3 Allele nachgewiesen werden, die Allele A1 und A3 waren etwa gleich häufig, das Allel A2 kam seltener vor. Bei einigen für PGM gefärbten Gelen war der Genort PGM-B mit geringer Aktivität und wahrscheinlich 2 Allelen sichtbar. LEWANDOWSKI et al. gaben 1992 eine ähnliche Beschreibung der beiden Loci, während THOMA (1992) nur den Genort PGM-A nachwies.

Die Isoenzymmuster der Shikimatdehydrogenase (SKDH) zeigten in einer stärker gefärbten Zone den Genort SKDH-A mit 2 Allelen, wobei das Allel A1 nur bei 2 Bäumen vorkam. Auch im diploiden Zustand war der Genort gut auswertbar. Eine weitere langsam wandernde Zone wurde nicht interpretiert. Bei THOMA (1992) wurde der Genort SKDH-A mit 3 Allelen beschrieben.

### 3. Kopplungsanalyse

Von den sich aus 14 polymorphen Genorten ergebenden 91 möglichen 2-Locus-Kombinationen konnten mit dem zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterial 78 Kombinationen auf unabhängige Vererbung geprüft werden. Davon kamen 48 Kombinationen 1- oder 2mal und 30 Kombinationen 3- bis 6mal vor (Tab. 4).

Alle 13 Zwei-Locus-Kombinationen, bei denen eine signifikante Abweichung der beobachteten Verteilung der 4 Haplotypen von der Zufallsverteilung 1:1:1:1 gefunden wurde, sind in der Tabelle 5 zusammengestellt. In 11 Fällen trat eine Kopplung nur bei einem von insgesamt 2 bis 6 untersuchten Bäumen auf.

Die Kombination ADH-A/LAP-B wies bei 2 von 3 untersuchten Bäumen signifikante Abweichungen von der erwarteten Spaltung auf. Die mittlere Rekombinationsfrequenz aus 3 Bäumen beträgt 0,33 und deutet auf eine schwache Kopplung hin. Bei dem Kombinationspaar PGM-A/PGI-B wurde eine hochsignifikante Kopplung an allen 6 untersuchten doppelt heterozygoten Bäumen gefunden. Die mittlere Rekombinationsfrequenz beträgt hier 0,21.

### Diskussion

Der hohe mittlere Anteil heterozygoter Loci von über 40% der 18 für die Analyse zur Verfügung stehenden weiblichen Bäume

erlaubte sowohl die Überprüfung der genetischen Kontrolle einzelner Isoenzymloci als auch in vielen Fällen eine Prüfung auf unabhängige Vererbung von 2-Locus-Kombinationen.

Für die teilweise vorkommenden geringfügigen Unterschiede bei der Beschreibung einzelner Loci zu den bisherigen Veröffentlichungen von LEWANDOWSKI et al. (1992) und THOMA (1992) sind wahrscheinlich sowohl die verwendeten Extraktions- und Trennverfahren als auch das jeweils untersuchte Material verantwortlich.

An Endospermmaterial ließen sich 14 polymorphe Genloci auswerten, bei denen keine signifikanten Abweichungen von der erwarteten 1:1-Verteilung gefunden wurden. Wenn jedoch männliche Bäume oder jüngere noch nicht blühende Individuen mit in Untersuchungen einbezogen werden sollen, stehen bei der Anwendung der beschriebenen Methode nur 7 polymorphe Genloci (ADH-B, AAT-B, LAP-B, PGDH, PGI-B, PGM-A, SKDH-A) zur Verfügung. Weitere 3 Loci (AAT-A, LAP-A, PGI-A) sind zwar sowohl in Endospermen als auch Knospengewebe gut sichtbar, sie wiesen aber nach den vorliegenden veröffentlichten und eigenen Ergebnissen keine Variation auf. Die übrigen hier beschriebenen Loci waren nur in Endospermgewebe analysierbar.

Die Familie der *Taxaceae* steht in der Systematik der Pflanzen etwas abseits von den bisher genetisch gut untersuchten Vertretern aus der Familie der *Pinaceae*. Wahrscheinlich aus diesem Grund wurden nur wenige bekannte Kopplungsgruppen gefunden.

Die Kopplung von PGM-A/PGI-B bei allen 6 untersuchten Bäumen mit einer Rekombinationsrate von 0,21 kann als gesichert angenommen werden. Sie wurde bei dieser Baumart auch von LEWANDOWSKI et al. (1992) bei 3 von 4 Bäumen mit der Rekombinationsfrequenz von 0,24 gefunden, war jedoch bei dem einen von THOMA (1992) untersuchten Baum nicht signifikant. Dieses Locuspaar ist in einer Arbeit von XIE et al. (1991) bei *Thuja orientalis* (*Cupressaceae*) als gekoppelt beschrieben, wird aber in zahlreichen Publikationen zu Arten der Gattungen *Pinus*, *Picea* und *Pseudotsuga* nicht erwähnt.

Die zwischen den Loci ADH-B/LAP-B vorhandene schwächere Kopplung mit einer Rekombinationsrate von 0,33 wurde bisher bei 6 Kiefernarten von CONKLE (1979) beschrieben. Eine nur für *Cunninghamia* (GEBUREK und WANG, 1990) gefundene Gruppe ist IDH-B/SKDH-A, die im hier untersuchten Material

Tabelle 5. – Kopplungsanalyse, Irrtumswahrscheinlichkeit 0,05 (\*), 0,01 (\*\*), 0,001 (\*\*\*)

Locus-Kombination	Baum Nr.	Genotypen (Xx - Yy)	Spaltungsverhältnis XY:Xy:xY:xy	Rekombinationsfrequenz	Chi-Quadrat		
					LocusX	LocusY	Kopplung
AAT-C / ADH-A	1/11	12 - 13	9:14: 8: 9	0.45	0.90	0.90	0.40
	3/20	12 - 13	25:12: 9:14	0.35	3.27	1.07	5.40 *
	8/54	12 - 13	7: 4: 8: 7	0.46	0.62	0.62	0.15
ADH-A / LAP-B	3/18	12 - 12	10: 7:14: 6	0.43	0.24	3.27	0.68
	3/20	12 - 12	22:16: 9:23	0.36	0.51	0.91	5.71 *
	8/54	12 - 12	3:10:10: 2	0.20	0.04	0.04	9.00 **
ADH-B / PGDH-A	3/21	23 - 12	10: 6:11: 6	0.48	0.03	2.45	0.03
	5/39	13 - 12	18:10:10:19	0.35	0.02	0.02	5.07 *
	7/45	12 - 12	30:21:27:21	0.48	0.09	2.27	0.09
ADH-B / PGM-A	3/21	23 - 13	11: 4: 6:12	0.30	0.27	0.03	5.12 *
	7/45	12 - 13	28:23:24:23	0.48	0.16	0.37	0.16
IDH-B / PGI-B	1/11	13 - 14	15:12:22:19	0.50	2.88	0.53	0.00
	1/12	23 - 13	22:15:18:17	0.46	0.06	0.89	0.50
	5/39	23 - 34	16:11:14:21	0.40	1.03	0.06	2.32
	8/52	23 - 12	4:15:15:10	0.32	0.82	0.82	5.82 *
IDH-B / PGM-A	1/11	13 - 23	15:12:20:21	0.47	2.88	0.06	0.24
	1/12	23 - 13	18:19:19:15	0.46	0.13	0.13	0.35
	8/52	23 - 13	5:12:16: 9	0.33	1.52	0.00	4.67 *
IDH-B / SKDH	1/11	13 - 12	3:10: 7: 7	0.37	0.04	1.81	1.81
	1/12	23 - 12	11: 1: 3:14	0.14	0.86	0.03	15.21 ***
MDH-A / PGM-A	1/11	12 - 23	16:21:19:12	0.41	0.53	0.06	2.12
	5/29	12 - 13	10: 5: 5:13	0.30	0.27	0.27	5.12 *
	8/52	12 - 13	11: 9:10:12	0.45	0.10	0.00	0.38
	8/54	12 - 13	7: 5: 7:10	0.41	0.86	0.03	0.86
	7/47	12 - 23	6: 1:10: 8	0.44	4.84 *	1.96	0.36
MR / NDH-B	3/17	12 - 12	4: 8:11: 1	0.21	0.00	1.50	8.17 **
	3/18	12 - 12	15: 7: 8: 6	0.42	1.78	2.78	1.00
	3/20	12 - 12	8: 3: 6: 7	0.37	0.17	0.67	1.50
	5/39	12 - 12	5:10: 8: 9	0.44	0.13	1.13	0.50
MR / PGM-A	1/12	12 - 13	14:20:23:14	0.39	0.13	0.13	3.17
	3/17	12 - 13	4: 8: 5: 7	0.46	0.00	1.50	0.17
	3/18	12 - 13	19:12:15:13	0.46	0.15	1.37	0.42
	3/20	12 - 13	21:20:18:19	0.49	0.21	0.00	0.05
	3/21	12 - 13	9:11: 9: 6	0.43	0.71	0.03	0.71
	8/54	12 - 13	4:12:10: 3	0.24	0.31	0.03	7.76 **
NDH-B / PGM-A	3/18	12 - 13	18: 3: 5: 8	0.23	1.88	4.24 *	9.53 **
	3/20	12 - 13	8: 6: 4: 6	0.42	0.67	0.00	0.67
PGM-A / PGI-B	1/11	23 - 14	30: 5: 7:26	0.18	0.06	0.53	28.47 ***
	1/12	13 - 13	12:25:27: 7	0.27	0.13	0.69	15.34 ***
	3/20	13 - 24	10:29:29: 9	0.25	0.01	0.01	19.75 ***
	5/29	13 - 12	4:10:15: 1	0.17	0.13	2.13	13.33 ***
	7/45	13 - 24	11:51:46:12	0.19	0.13	0.30	45.63 ***
PGM-A / SKDH-A	1/11	23 - 12	6: 7: 4: 9	0.42	0.00	1.38	0.62
	1/12	13 - 12	2: 9:11: 6	0.29	1.29	0.14	5.14 *

an 2 Bäumen mit relativ wenig Saatgut geprüft werden konnte (Rekombinationsrate 0,26).

Die 2-Locus-Kombinationen, die an nur einem von 2 bis 6 doppelt heterozygoten Bäumen eine von der Zufallsverteilung abweichende Verteilung der Endospermgenotypen zeigten, bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

Nach SCHEEDER (1994) besitzen weibliche Blüten der Eibe eine einzelne Samenanlage. Eine der sich differenzierenden Mutterzellen erzeugt dann 4 Megasporen, von denen sich meist eine, aber manchmal auch mehrere zu Gametophyten entwickeln. Die Erscheinung an 9 Endospermproben, die in unseren Untersuchungen beide Allele des heterozygoten Mutterbaums, jedoch keine Hybridbande bei dimeren Enzymen besaßen, lassen sich auf diese Weise erklären und müssen der polyzygotischen Polyembryonie zugeordnet werden.

Über die Ursache der Hybridbanden in Endospermgewebe bei dimeren Enzymen kann nur spekuliert werden. Es fällt auf, daß bis auf eine Ausnahme immer 3 oder 4 Endosperme desselben Baums am selben Genort „heterozygot“ sind. Vielleicht verbergen sich hinter diesem Phänomen Genduplikationen, die als

Chimären vorkommen, da die meisten Endosperme dieser Bäume nur eines der beiden Allele aufwiesen und keine Abweichungen von der erwarteten 1:1-Verteilung aufgetreten waren. Leider konnten die Isoenzymmuster von Embryogewebe der Samen nicht untersucht werden. Ergebnisse, die auf Polyembryonie hindeuten, wurden weder in den morphologischen Untersuchungen an Eibensaatgut (SUSZKA, 1985) noch im Zusammenhang mit Isoenzymanalysen (THOMA, 1992; LEWANDOWSKI et al., 1992) erwähnt.

Für weiterführende Untersuchungen zu Fragen der Bestäubungsverhältnisse in Eibenvorkommen wäre die Untersuchung der Embryonen des Saatgutes mit Isoenzymmarkern wünschenswert. Dies setzt jedoch ausreichende Enzymaktivitäten an den zu testenden Loci voraus. Wahrscheinlich waren die Embryonen, die wir unmittelbar nach der Saatguternte für die Analysen verwendeten, noch nicht ausgereift (HATTEMER, pers. Mitt.). Möglicherweise könnten durch das von SUSZKA (1985) beschriebene Stratifizierungsverfahren für Eibensamen die sehr kleinen und z. T. kaum sichtbaren Embryonen ausreifen und so der Isoenzymanalyse zugänglich gemacht werden.

## Dank

Herrn Dr. KÖHLER vom Landwirtschaftsministerium Mecklenburg-Vorpommerns sei für die Bereitstellung von Probenmaterial, die diese Untersuchungen ermöglicht haben, sowie den technischen Assistentinnen Frau E. EWALD und Frau M. SCHNECK für präzise Laborarbeiten bei der Isoenzymanalyse und insbesondere für ihre Aufmerksamkeit, durch die die „Zwillinge“ gefunden werden konnten, recht herzlich gedankt.

## Literatur

CHELIAK, W. M. and PITEL, J. A.: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42, Petawawa National Forestry Institute (1984). — CONKLE, M. T.: Isozyme variation and linkage in six conifer species. Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects. Berkeley, 1979, 11 to 17 (1979). — EL-KASSABY, Y. A.: Genetic interpretation of malate dehydrogenase isoenzymes in some conifer species. *J. Hered.* **72**, 451–452 (1981). — GEBUREK, T. and WANG, Q.: Inheritance of isoenzyme variants and their linkage relationships in Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* HOOK.). *Euphytica* **49**, 193–210 (1990). — HATTEMER, H.: Die Populationsgenetik der Eibe. *Der Eibenfreund – Informationsschrift für die Mitglieder der Eibenfreunde f. V.*, 26–33 (1995). — HEINSTEIN, P. F. and CHANG, C. J.: *Taxol*. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **45**, 663–674 (1994). — LEWANDOWSKI, A., BURCZYK, J. and MEJNARTOWICZ, L.: Inheritance and linkage of some allozymes in *Taxus baccata* L. *Silvae Genetica* **41**,

342–347 (1992). — LEWANDOWSKI, A., BURCZYK, L. and MEJNARTOWICZ, L.: Genetic structure of English yew (*Taxus baccata* L.) in the Wierzchlas Reserve: implications for genetic conservation. *Forest Ecology and Management* **73**, 221–227 (1995). — LUNDKVIST, K.: Inheritance of leucine aminopeptidase isoenzymes in *Picea abies* K.. *Hereditas* **76**, 91–96 (1974). — MAURER, R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968). — SCHEEDER, T.: Die Eibe – Hoffnung für ein fast verschwundenes Waldvolk. IHW-Verlag, Eching (1994). — SCHNECK, H., GRIMM, M. und SCHNECK, D.: Konzept zur Erhaltung und Vermehrung wichtiger, seltener heimischer Baumarten in Mecklenburg-Vorpommern. (1995). — SUSZKA, B.: Conditions for after-ripening and germination of seeds and for seedling emergence of English yew (*Taxus baccata* L.). *Arboretum Kornickie, Rocznik XXX*, 285–338 (1985). — THOMA, S.: Genetische Variation an Enzymgenloci in Reliktbeständen der Eibe (*Taxus baccata* L.). Diplomarbeit, Universität Göttingen. 87 S. (1992). — THOMA, S. und KLEINSCHMITT, J.: Grundlagen für die Erhaltung der Eibe (*Taxus baccata* L.). *Forst und Holz* **49**: 147–152 (1994). — VALLEJOS, C. E.: Enzyme activity staining. In: Isoenzymes in Plant Genetics and Breeding. (TANKSLEY, ORTON, eds). Elsevier Science, Amsterdam. 481–515 (1983). — XIE, C. Y., DANCIC, B. P. and YEH, F. C.: Inheritance and linkage of isozymes in *Thuja orientalis*. *J. Hered.* **82**, 329. (1991). — YEH, F. C. and O'MALLEY, D.: Enzyme variations in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) FRANCO, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genet* **29**, 83–92 (1980).

# Genetische Variation und geographische Struktur von Eibenvorkommen (*Taxus baccata* L.) in Mecklenburg-Vorpommern

Von H. HERTEL und N. KOHLSTOCK

Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstpflanzenzüchtung, Eberswalder Chaussee 3, D-15377 Waldsiedersdorf

(Eingegangen am 28. Juni 1996)

## Zusammenfassung

In Mecklenburg-Vorpommern, im Nordosten Deutschlands, kommt die Eibe (*Taxus baccata* L.) nur noch in Relikten vor. Von diesen Einzelbäumen oder kleinen Gruppen wurden aus 8 Forstämtern insgesamt 58 Individuen mit Isoenzymmarkern genetisch untersucht. Zur Analyse wurden Ruheknospen verwendet, so daß weibliche und männliche Bäume einbezogen werden konnten.

Eine Hauptkomponentenanalyse der Daten von 7 polymorphen Loci ergab, daß sich die Vorkommen an der Ostseeküste von denen des Inlands unterscheiden.

Aus den Ergebnissen werden Schlußfolgerungen für die Konkretisierung geplanter Generhaltungsmaßnahmen abgeleitet.

*Schlagwörter:* *Taxus baccata* L., Genetik, Isoenzymmarker, geographische Struktur.

*FDC:* 165.3; 165.52; 165.53; 174.7 *Taxus baccata*; (430).

## Abstract

*Genetic variation and geographic structure of English yew (Taxus baccata L.) in Mecklenburg-Vorpommern (Germany)*

In the state Mecklenburg-Vorpommern, in the north-eastern part of Germany, English yew (*Taxus baccata* L.) is found only in relics. Fifty eight individual trees were selected from single trees or small groups in 8 forest districts for genetic analyses by isozyme markers. Dormant buds were used to include

female and male trees into the investigation. A principal component analysis of the data of 7 polymorphic loci revealed a separation of occurrences at the coast of the Baltic sea and occurrences in the inland. The results are the basis for conclusions for more detailed measures to protect genetic resources.

## Einleitung

Erkenntnisse der Genetik können und müssen die praktische Tätigkeit der Erhaltung forstlicher Genressourcen und der Forstpflanzenzüchtung wirksam unterstützen. Während bei den forstlichen Hauptbaumarten in den vergangenen 2 Jahrzehnten genetische Inventuren, d. h. umfangreiche genetische Untersuchungen im Verbreitungsgebiet der Art, schon wesentliche Erkenntnisse über geographische Strukturen (u. a. auch zu Rückwanderungswegen nach der Eiszeit) erbracht haben, steht man mit vielen Nebenbaumarten, so auch mit der Eibe (*Taxus baccata* L.), noch am Anfang solcher Arbeiten.

Das zunehmende Interesse an der Eibe bezieht sich nicht nur auf die Erhaltung ihrer genetischen Ressourcen (THOMA und KLEINSCHMITT, 1994; LEWANDOWSKI et al., 1995; MEINHARDT und SCHWIMMER, 1995; SCHMITT, 1995) und ihre Wiedereinbringung in Forstwirtschaft und Waldbau (MATHE, 1996), sondern richtet sich auch auf den medizinisch bedeutsamen Inhaltsstoff *Taxol* (u. a. OSTHOFF, 1995), so daß Züchtungsmaßnahmen auch in dieser Richtung notwendig werden.