

ブドウにおけるPGI, PGMアイソザイムの遺伝的変異と その有用性

大見, 千枝

比良松, 道一
九州大学大学院農学研究科

若菜, 章
九州大学農学部

白石, 眞一
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/12680>

出版情報 : 九州大学農学部農場研究資料. 12, pp.43-52, 1990-03. 九州大学農学部附属農場
バージョン :
権利関係 :

ブドウにおけるPGI, PGMアイソザイムの 遺伝的変異とその有用性

大見 千枝・比良松道一・若菜 章・白石 眞一

1. 目 的

ブドウは交雑と栄養繁殖により品種が多様化しているために、類縁関係が明確ではない点も多く、またマーカーとなる遺伝子についての知見も少ない。そこで、ブドウ属植物の種間あるいは品種間の類縁関係や、品種同定、雑種実生同定、倍数性レベルの確認の一助として、アイソザイムによるブドウ遺伝子型の分析を試み、PGI, PGMアイソザイム遺伝子型を決定した。

2. 材料及び方法

実験 1

PGI, PGMアイソザイムのメンデル遺伝の法則に対する適合性検定を行うために、交配して作出したF₁実生を用いた。

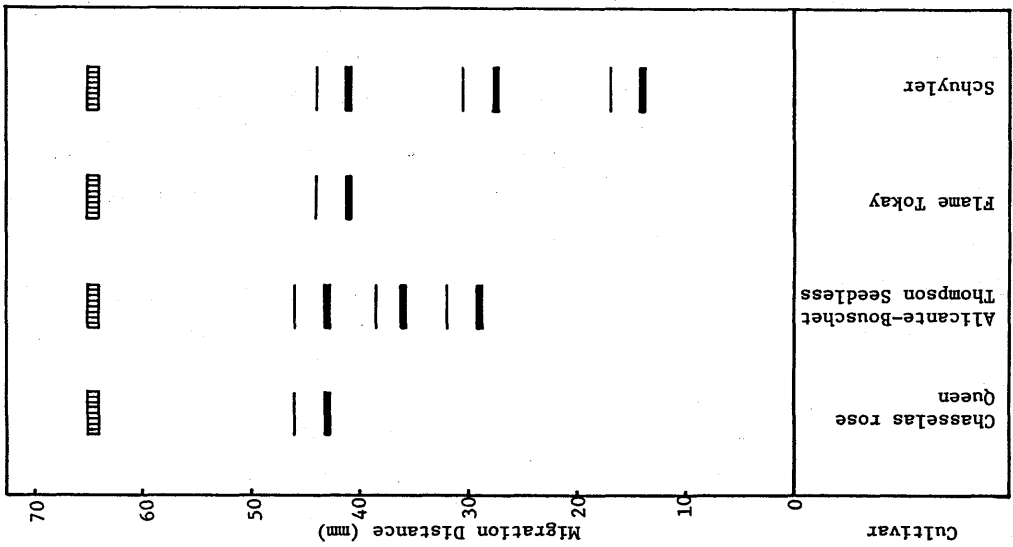
1986年に交配し、1987年3月に播種したF₁実生を1988年4月から6月にかけて調査した。交配に用いたのは、‘アリカントブスケ’、‘シャスラーローズ’、‘フレームトーカー’、‘クイーン’、‘シャイラー’、‘トムソンシードレス’の6品種で、五つの組合せを設けて交配した。

アイソザイム調査は、それぞれの組合せについて、親品種とF₁を同時に行った。親品種、F₁とも、展葉後間もない若い葉を供試した。実験当日早朝にサンプリングをし、採取した葉は、酵素が失活しないよう酵素抽出直前まで保湿し、4℃で保存した。

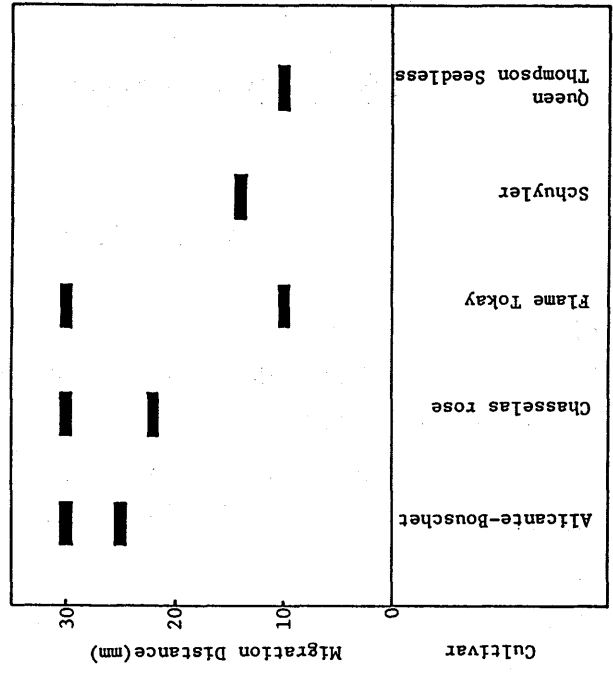
生葉を細かくちぎって乳鉢にいれ、抽出用緩衝液とPVPPを適宜加えて磨碎し、粗抽出液とした。電気泳動のための緩衝液系は、トリス・クエン酸系 (pH 7.0) を用いた。6時間泳動を行い、原点より陽極側のゲルをスライスして活性染色を行った。

それぞれのアイソザイムバンドの泳動距離を測定・記録したのち、親品種とF₁のバンディングパターンを比較し、対立遺伝子を推定して、F₁の分離についてX₂検定を行った。

第1図 交配に用いた親品種のPGIバンディングパターン



第2図 交配に用いた親品種のPgm-2遺伝子座におけるバンディングパターン



第1表 Pgi-2 遺伝子座における表現型の分離と χ^2 値

Parentage	Parental phenotype*	Offspring phenotype* (no. of seedling)	Expected ratio	Chi-square	Probability
Alicante-Bouschet × Flame Tokay	43/29×41/41	43/41 : 41/29 (24) (34)	1 : 1	1.72	0.200-0.100
Alicante-Bouschet × Queen	43/29×43/43	43/43 : 43/29 (20) (9)	1 : 1	4.17	0.050-0.020
Alicante-Bouschet × Schuyler	43/29×41/15	43/41 : 43/15 : 41/29 : 29/15 (10) (11) (11) (17)	1:1:1:1	2.51	0.500-0.300
Chasselas rose × Schuyler	43/43×41/15	43/41 : 43/15 (24) (34)	1 : 1	1.72	0.200-0.100
Queen × Thompson Seedless	43/43×43/29	43/43 : 43/29 (25) (28)	1 : 1	0.17	0.700-0.500

* 数字は原点からの泳動距離が最長のバンドと最短のバンドの泳動距離 (mm) を示す。

第2表 Pgm-2 遺伝子座における表現型の分離と χ^2 値

Parentage	Parental phenotype*	Offspring phenotype* (no. of seedling)	Expected ratio	Chi-square	Probability
Alicante-Bouschet × Flame Tokay	30/25×30/10	30/30 : 30/25 : 30/10 : 25/10 (14) (16) (18) (10)	1:1:1:1	2.41	0.500-0.300
Alicante-Bouschet × Queen	30/25×10/10	30/10 : 25/10 (13) (16)	1 : 1	0.31	0.700-0.500
Alicante-Bouschet × Schuyler	30/25×14/14	30/14 : 25/14 (22) (27)	1 : 1	0.51	0.500-0.300
Chasselas rose × Schuyler	30/22×14/14	30/14 : 22/14 (29) (29)	1 : 1	0.00	> 0.990
Queen × Thompson Seedless	10/10×10/10	10/10 (53)	1 : 0	0.00	> 0.990

* 数字は原点からの泳動距離が最長のバンドと最短のバンドの泳動距離 (mm) を示す。

実験 2

実験1で得られた結果に基づき、それぞれの品種の遺伝子型の決定を試みた。二倍体85品種と四倍体8品種を供試した。数品種を用いて幼葉と熟枝のアイソザイムパターンに変異のないことを確認したのち、落葉期に熟枝を、生育期には展開後間もない若い葉を用いて実験を行った。熟枝は、粗皮を取り除いて細断し、抽出用緩衝液とPVP Pを加えて磨砕した。その他の酵素抽出、電気泳動法は実験1に準じた。

実験 3

四倍体品種と二倍体品種を交配して得られた交雑実生について、倍数性および雑種確認のためにアイソザイム調査を行った。四倍体品種として、'由布'、'レッド パール'、'巨峰'、二倍体品種として、'マスカット ベリー-A'、'マスカット オブ アレキサンドリア'、'ネオ マスカット'を供試した。また、四倍体と二倍体との交雑実生であるBR-4 ('マスカット ベリー-A' × 'レッド パール')、RN-1 ('レッド パール' × 'ネオ マスカット')、AR-6 ('マスカット オブ アレキサンドリア' × 'レッド パール')、AK-6、AK-9 (ともに'マスカット オブ アレキサンドリア' × '巨峰')の5個体を供試した。全ての個体で茎頂部を採取し、'由布'についてはさらに倍数性の確認のために花粉を採取した。酵素抽出、電気泳動法は実験1に準じた。

3. 結果および考察

実験 1

PGI: PGIアイソザイムの発現を支配する2つの遺伝子座が確認された。泳動距離の長い*Pgi-1*は不明瞭な1本のバンドを示し、供試した全ての親品種、F₁実生で同じであった。泳動距離の短い*Pgi-2*においては、1本または等間隔に3本の濃いバンドが現れた。これらのバンドから3 mmほど泳動距離の長い位置に薄く染まったバンドがみられたが、その発現のしかたは、親品種、F₁のすべてで同じであり、F₁において分離しなかったことから、これらは遺伝子の直接の産物ではなく、濃いバンドを示すアイソザイムのバイプロダクトによるものと考えられる。

第1図に交配に用いた親品種のバンディングパターンを示した。PGIをダイマー酵素と仮定し、それぞれの交配組合せについてF₁実生の分離の検定を行ったが、全ての組合せで期待値との有意な差はみられなかった(第1表)。

以上の結果から、PGIはダイマー酵素で、*Pgi-2*遺伝子座におけるPGIアイソザイムの遺伝はメンデルの法則に符号することを確認した。

PGM: PGMではより泳動距離の長いバンド群を支配する*Pgm-1*とより泳動距離の短いバンド群を支配する*Pgm-2*の2つの遺伝子座を確認した。*Pgm-1*は数本のバンド群をコードする対

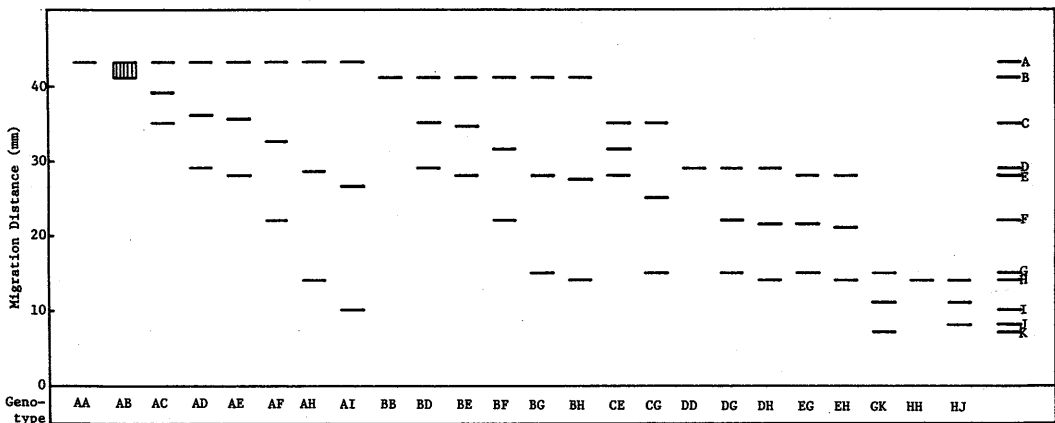
立遺伝子をもつ遺伝子座であるとみられるが、このバンドの発現はかなり不安定であり、現在それらの遺伝の詳細については不明である。*Pgm-2*では、1本または2本の明瞭なバンディングパターンがみられた。交配に用いた6品種の*Pgm-2*のバンディングパターンを第2図に示す。PGMをモノマー酵素であると仮定し、それぞれの交配組合せについてF₁実生の分離を調査してX₂検定を行ったところ、メンデルの法則によく一致した(第2表)。

以上の結果からPGMはモノマー酵素で、メンデル遺伝をすることを確認した。

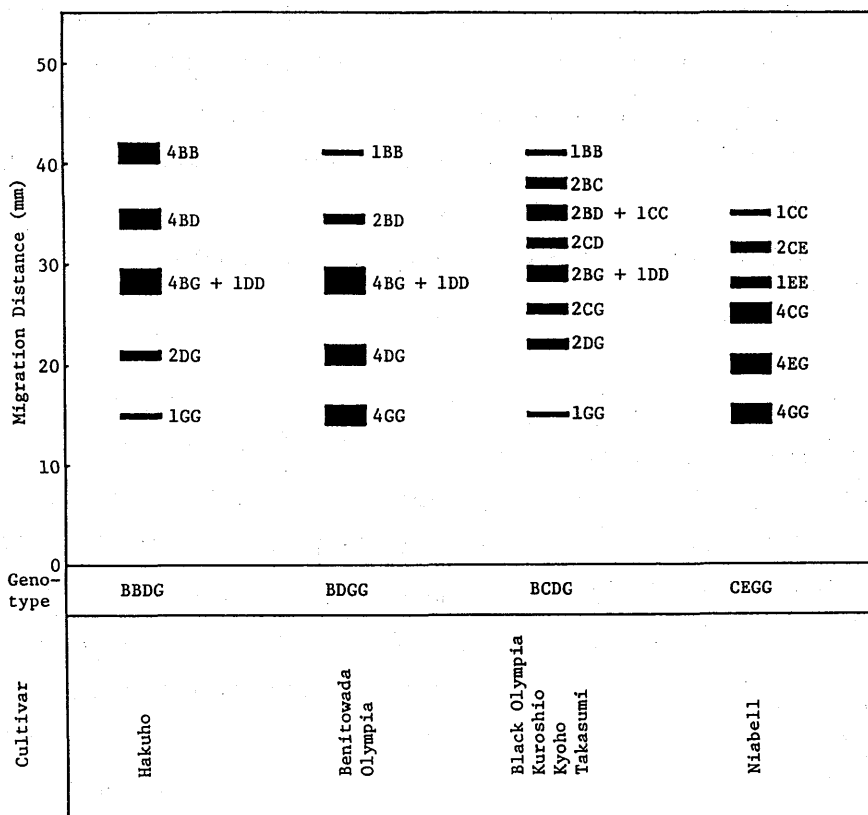
実験 2

PGI : 第3図に、二倍体品種で得られた24のバンディングパターンを示した。ホモ(バンドが1本)が4、ヘテロ型(バンドが3本)が20現れた。それぞれのホモダイマーバンドにA, B...と記号をつけ、AからKまでの11本のバンドを得た(第3図)。すなわち、調査した品種の*Pgi-2*遺伝子座には、AからKまでの11の対立遺伝子が存在する。二倍体85品種について、24の遺伝子型を決定した(第3図)。調査した四倍体品種では、明らかに二倍体品種とは異なる複雑なバンディングパターンが現れた(第4図)。この場合は、バンドの染色程度と重なりを考慮して遺伝子型を決定した。

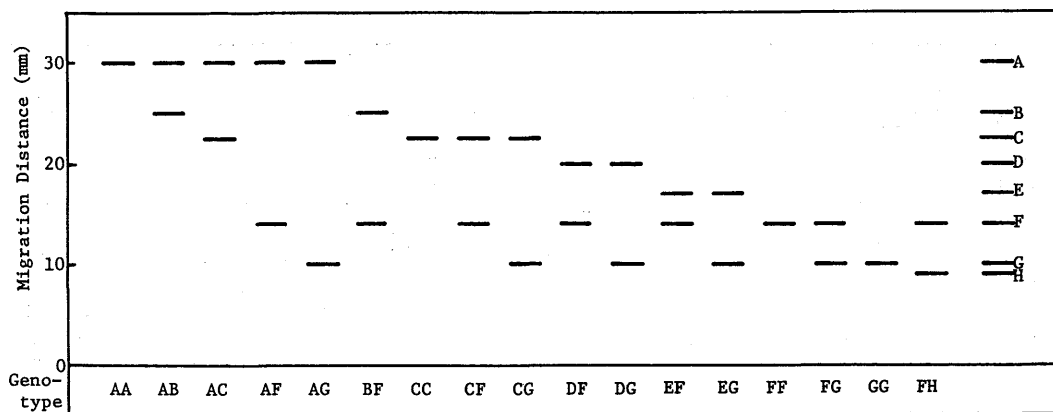
PGM : *Pgm-2*遺伝子座が支配するバンド群において、二倍体品種では、ホモ型のバンディングパターン(バンドが1本)が4、ヘテロ型のバンディングパターン(バンドが2本)が13現れた(第5図)。PGIと同様に記号をつけ、AからHまでの8本のバンドを得た(第5図)。すなわち、調査した品種の*Pgm-2*遺伝子座には8個の対立遺伝子が存在するといえる。二倍体品種について17のバンディングパターンが得られ、それにもなって17の遺伝子型が決定された(第5図)。調査した四倍体品種は、二倍体と同様なバンド数を示し、すべてがAとFの2本のバンドをもっていた。2本



第3図 *Pgi-2*遺伝子座におけるバンディングパターンとその遺伝子型



第4図 四倍体品種の *Pgi-2* 遺伝子座におけるバインディングパターンとその遺伝子型. アルファベットと数字は、ダイマーのサブユニット記号とバンドの理論的濃度比を示す



第5図 *Pgm-2* 遺伝子座におけるバインディングパターンとその遺伝子型

第3表 Pgi-2, Pgm-2 遺伝子座における遺伝子型とその組合せをもつブドウ品種

Locus			Locus		
Gpi-2 Pgm-2		Gultivar	Gpi-2 Pgm-2		Gultivar
AA	AA	French Golombard	BE	AG	Mills
AA	AC	Chasselas rose	BF	BF	Russzkij Concord
AA	AF	Seneca	BF	FG	Black Damascus
AA	CC	Avasirhva	BC	AF	Wayne
AA	CG	Scarlet	BG	FF	Schuyler
AA	GG	Queen	BG	FG	New York Muscat, Super Hamburg
AB	AA	Neo Muscat	BH	AA	Portland
AB	AG	July Muscat, Soiaki,	CE	EF	Fredonia
AB		Muscat Hamburg	CG	EF	Star Red
AB	GG	Emperor	CG	FF	Campbell Early
AC	CF	Jessica	DD	AC	Kali Sahbi, Ryuga
AC	FF	Adirondac			Pannoniakincse
AD	AB	Alicante-Bouschet	DD	AG	Ruby Cabernet
AD	AC	Kizliarskij cernyj,	DD	CG	Gibrid 375
		Puhljakovskij	DG	AF	Steuben
AD	AF	Patricia	DG	DF	Dr. Collier
AD	AG	Nehelescol	DG	FG	Glenora
AD	CG	Monuka	DG	FF	Sheridan
AD	FG	Italia	DH	FG	Bronx Seedless
AD	GG	Thompson Seedless, Pusa Seedless	EG	FG	Yates
AE	AF	Benisanjaku, Pierce,	EH	AF	Diana, Iona
		Seibien, Telegraph	GK	FF	Empire State, Etta
AE	GG	Fuefuki	HH	AG	Summit
AF	AA	Chenin blanc	HH	FF	Concord, Seibel 13051, Concord Seedless
AF	AC	LN-33, Maldec, Mission Madeleine Angevine	HJ	FH	Salt Creek
AH	DG	Muscat Bailey A	AAHH	DDGG	Yufu
AI	CF	Delaware, Settsu	BBDG	AAFF	Hakuho
AI	FF	Headlight	BCDG	AAFF	Black Olympia, Kyoho, Kuroshio, Takasumi
BB	AA	Kaiji, Sekirei	BDGG	AAFF	Benitowada, Olympia
BB	AC	Tagobi	CEGG	AFFF	Niabell
BB	AG	Flame Tokay Royal, Muscat Alexandria			
BB	CG	Aleksandrouli			
BD	AA	Galbina			
BD	AC	Ana-be-shahi			
BD	AF	Buffalo, Citronelle Mario,			
BD	AG	Morgen schön Nimrang, Tavriz			
BD	CC	Rose d'Italia			
BD	EG	Canadice			
BD	GG	Ruby Seedless			

のバンドが同程度に染まったものの遺伝子型をAAFF, Fのバンドが明らかに濃く染まったものの遺伝子型をAFFFとした。第3表に *Pgi-2*, *Pgm-2* 遺伝子座における遺伝子型と, それを持つ品種を示した。

実験 3

PGI: ‘マスカット ベリーA’の *Pgi-2* 遺伝子座における遺伝子型はAHであり, 茎頂部では3本のバンドが現れたが, 花粉ではホモダイマーAA及びHHの2本のバンドのみが現れた。一方, ‘由布’の茎頂部では同様に3本のバンドが現れたが, 花粉ではAA, AH, HHの3本のアイソザイムバンドが現れたことから, 二倍体花粉であるとみなされる。このように, 二量体酵素の対立遺伝子がヘテロである二倍体品種の芽条変異個体が倍化しているかどうかは, 花粉アイソザイムバンディングパターンによっても推定が可能となる。なお, 花粉母細胞および根端細胞から, ‘由布’は四倍体(正確には2X-4X-4Xの周縁キメラ)であることを確認している。

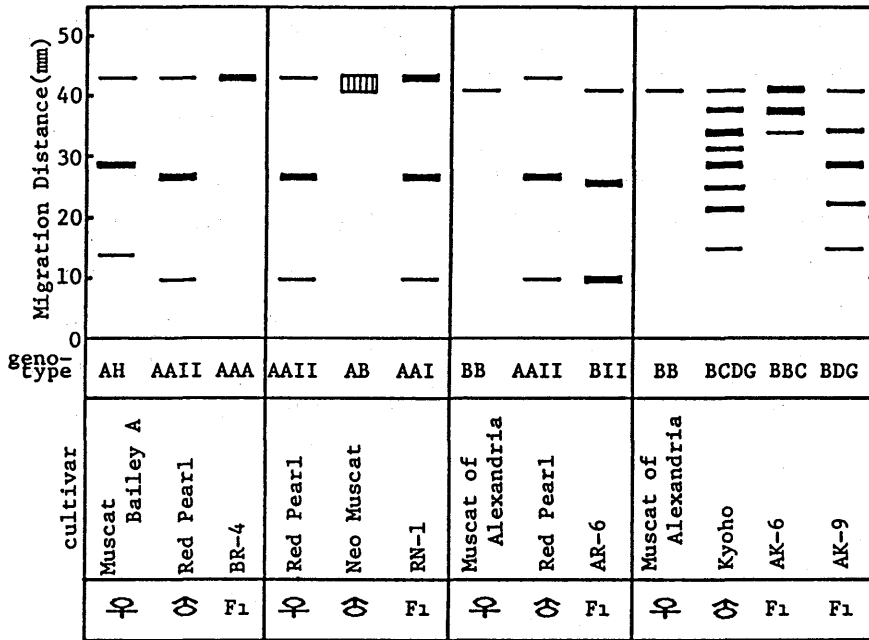
交配親に用いた‘レッドパール’は‘デラウェア’(遺伝子型AI)の芽条突然変異によって生じた染色体キメラ(2-4-4)の四倍体と考えられ, LIを除けば遺伝子型はAAIIである。‘巨峰’の遺伝子型はBCDG, ‘マスカット ベリーA’, ‘ネオ マスカット’, ‘マスカット オブアレキサンドリア’の遺伝子型はそれぞれAH, AB, BBである。第6図に交配した両親とその雑種とみられる個体の *Pgi-2* 遺伝子座におけるバンディングパターンを示した。これらから, RN-1, AR-6, AK-6, AK-9は四倍体品種と二倍体品種の雑種であることが確認された。また, バンドの染色程度の違いから, 遺伝子型がそれぞれAAI, BII, BBC, BDGの三倍体であるとみなされる。

PGM: ‘レッドパール’と‘巨峰’の *Pgm-2* 遺伝子座における遺伝子型はそれぞれCCFF, AAFF, ‘マスカット ベリーA’, ‘ネオ マスカット’, ‘マスカット オブアレキサンドリア’はそれぞれDG, AA, AGである。第7図にこれらの品種とその雑種個体の *Pgm-2* 遺伝子座におけるバンディングパターンを示した。BR-4, RN-1, AK-6では同程度に染まった3本のバンドがみられたことから, それぞれ遺伝子型がCFG, ACF, AFGの雑種三倍体であることがさらに確認された。またAR-6とAK-9では2本のバンドが現れたが, その染色程度が異なることから, 遺伝子型がそれぞれFFG, AFFの雑種三倍体であるとみなされる。

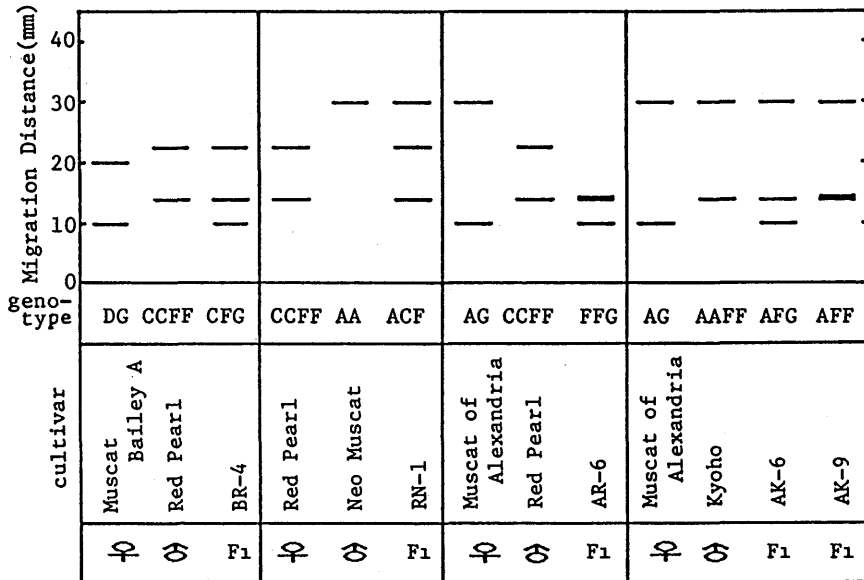
以上のように, PGI, PGMアイソザイムの調査によっても, ブドウの雑種確認や倍数性の推定が容易に行え, 酵素数を増やすことにより, その応用範囲はさらに広まるものと思われる。

4. 結論

Pgi-2, *Pgm-2* 遺伝子座における遺伝子型を組み合わせると, 二倍体85品種は61の遺伝子型に



第6図 四倍体および二倍体品種とその雑種 F₁ の *Pgi-2* 遺伝子座における
 バインディングパターンと遺伝子型



第7図 四倍体および二倍体品種とその雑種 F₁ の *Pgm-2* 遺伝子座における
 バインディングパターンと遺伝子型

わけられ、そのうち45品種はそれぞれ他の品種と異なる遺伝子型を有していた（第3表）。このことから、二つの酵素のみでもかなりの品種の同定が可能になると思われる。また、*Pgi-2*, *Pgm-2* 遺伝子座に支配されるPGI, PGMアイソザイム遺伝子型を組み合わせることにより、多くの交配実生の検定に活用できる。さらに、実験3で示したように、*Pgi-2* 遺伝子座の支配するバンド群で4本以上、*Pgm-2* 遺伝子座の支配するバンド群で3本以上のバンドが見られる場合、その個体は三倍体以上の倍数体である可能性が高く、倍数性の推定にも有効である。PGI, PGMアイソザイム対立遺伝子は、無作為にサンプルを抽出したにもかかわらず、その出現頻度にかかなりの差があった。このことは、過去にこれらの頻度の高い対立遺伝子を持っていた一部の品種が現在の栽培品種成立に深く関係していたことを示唆している。すなわち、これらの対立遺伝子をもつ遺伝子座は、有用形質の発現を支配する遺伝子と密接に連鎖している可能性があり、標識遺伝子としてアイソザイムの育種場面への利用の可能性はある。