

カンキツ類のアイソザイム解析による分類学的研究 ： 1. カンキツ花粉のAAT酵素のアイソザイム分析

白石, 眞一
九州大学農学部附属農場

<https://doi.org/10.15017/23371>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 46 (3/4), pp.109-112, 1992-02. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

カンキツ類のアイソザイム解析による分類学的研究

1. カンキツ花粉の AAT 酵素のアイソザイム分析

白石 眞一

九州大学農学部附属農場
(1991年9月9日受理)

Taxonomic Studies on *Citrus*, *Fortunella* and *Poncirus* Using Isozyme Analysis.

1. Isozyme Analysis of Aspartate Aminotransferase in *Citrus* Pollen.

Shin-ichi SHIRAISHI

University Farm, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Harumachi,
Kasuya-machi Kasuya-gun, Fukuoka 811-23

緒 言

カンキツ類と呼ばれる植物の一群は、植物分類学上ミカン亜科のカンキツ属、キンカン属、カラタチ属に含まれ、これらの植物の多くはアジア大陸東南部とその周辺の島嶼部に分布している。カンキツ属の原生中樞はインド東部のヒマラヤ山麓からアッサムにかけての地域であるとされている(田中, 1954)。

カンキツ属の分類ならびに類縁関係の研究は、多くの研究者によって行われた。Swingle (1943) はカンキツ属に野性種 6, 栽培種 10 の 16 種に分類し、一方、田中 (1969) は初生カンキツと後生カンキツの 2 亜属に分け、前者を 5 区、後者を 3 区に分類し 159 種に、Barret *et al.* (1976) はカンキツ亜属として *Citrus grandis* Osbeck, *C. medica* L. 及び *C. reticulata* Blanco の 3 種に分類することを提唱している。半田ら (1985) も多変量解析を行い同様な提唱を行っている。このように世界的に重要な経済作物であるカンキツ類についても、分類学的には意見の一致をみていない。植物分類は形態形質を基礎に行なわれてきたが、近年生化学的研究も多々行われており (Furr, 1946; 西浦, 1957; 上野, 1976; 平井, 1982, 1986 b; Torres *et al.*, 1978; Soost *et al.*, 1982), アイソザイム等の研究の成果によって多種類を含むカンキツ属の分類学的研究が展開されつつある。

本研究は、わが国において自生していたものや遠い過去に導入されたものを含めて、現在遺伝資源として保存中のカンキツ品種を整理分類するためにアイソザ

イム分析を行い、検討を加えたものである。なお本研究は、農学部園芸学講座における研究に続いて、附属農場で行ったもので、若菜章助手をはじめ、緒方達志、古沢誠一、玉井健二、一色司郎君等歴代学生諸氏の研究協力を得た。

カンキツの系統発生について考察する際に重要な知見であり、交雑育種研究においても重要なマーカーとなると評価されているアスパラギン酸アミノ転移酵素 (Aspartate aminotransferase, AAT) は、Torres *et al.* (1978), Hirai *et al.* (1986) によれば、AAT は二量体のアイソザイムであるが未だ不明の点もあり、Torres らは遺伝子座 *Aat-2* が一量体の可能性があることを指摘しており、平井らはそれが二つの遺伝子座の可能性を指摘している。そこでこの AAT アイソザイム、特に遺伝子座 *Aat-2* に支配されているアイソザイムが二量体であるのか、遺伝子座 *Aat-2* が二つの遺伝子座で構成されているのか、またさらに *Aat-2* では遺伝子重複が起こっているのかという点について明らかにするために、花粉による AAT アイソザイム分析を行った。

材料及び方法

実験 1. '日向夏', なつだいだい, カラタチ。

材料: '日向夏' (*C. tamurana*), '川野なつだいだい' (*C. natsudaidai*), '飛龍' (*Poncirus trifoliata* L.) の各品種の花粉と成葉をそれぞれ約 1 g 集め、供試した。

方法: 抽出用緩衝液を 2.5 ml, PVPP を 0.2 g をそれ

それ加えて磨碎して粗抽出液 0.2 ml を Sephadex G-25 でゲル濾過して精製後泳動用試料とした。電気泳動は平板ポリアクリルアミドゲル垂直電気泳動法（二連式）により、5.4%T 分離ゲル (pH 8.9)、4.2%T 濃縮ゲル (pH 6.9) を用いて行った。泳動用試料は 20 μ l、低温状態で、最初 30 分間 100 V、その後泳動終了まで 250 V の定電圧にして電気泳動を行った。

実験 2. 'パーソンブラウン', 'トロピタ', 'オーランド', 'アンコール', '土佐文旦', '黄金柑'.

材料：カンキツ 6 品種 (パーソンブラウン・オレンジ,

トロピタ・オレンジ, オーランド・タンジェロ, アンコール・マンダリン, 土佐文旦, 黄金柑) の花粉を供試した。

方法：前項に準じた。

結果及び考察

実験 1. 第 1 図に三つのカンキツ品種の成葉と花粉の AAT 酵素のザイモグラムを比較して示した。'日向夏' の場合 *Aat-2* において、葉の場合に出現した BF のバンドが花粉においては認められず、'川野なつだいだい'

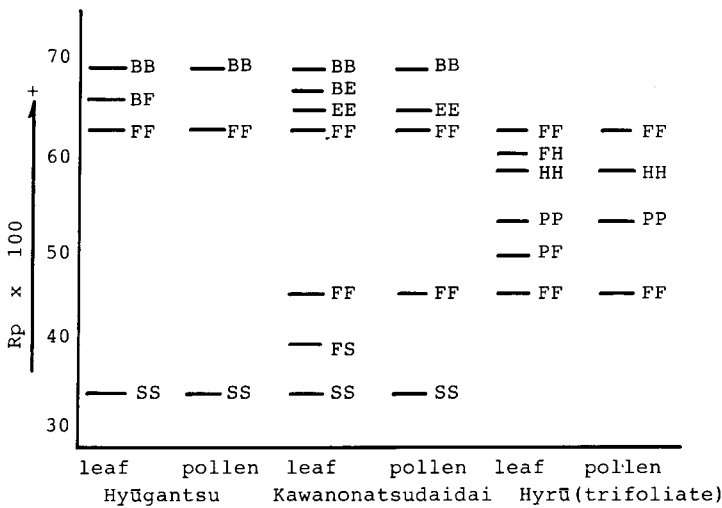


Fig. 1. Electrophoretic patterns of AAT isozymes in pollen and leaf from three cultivars of *Citrus* and *Poncirus*.

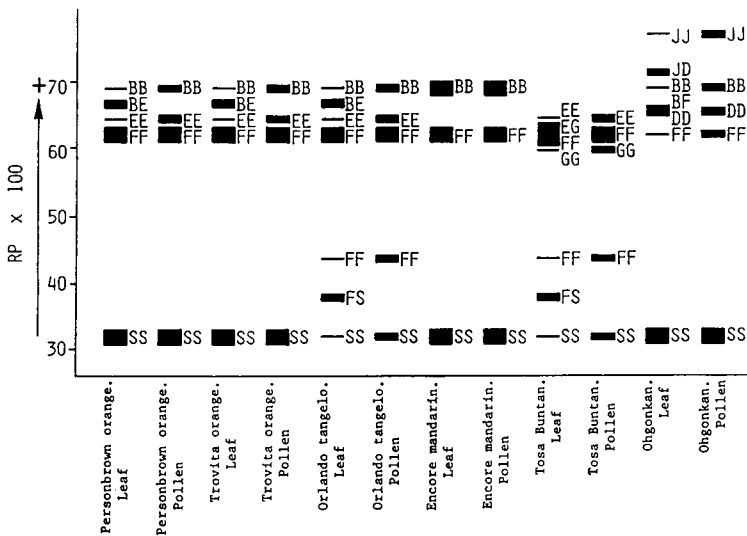


Fig. 2. Electrophoretic patterns of AAT isozymes in pollen and leaf from six cultivars of *Citrus*.

の場合も同様に *Aat-2* において BE のバンド, *Aat-1* において FS のバンドが認められなかった。'飛龍'の場合も *Aat-2* で PF, *Aat-2* では FH のバンドを認めなかった。これら三種類のカンキツ品種において、いずれの遺伝子座においてもヘテロバンドが消失することを認めた。

実験 2. カンキツ 6 品種花粉の AAT アイソザイムの分析結果を第 2 図に示した。 *Aat-2* 遺伝子座においては、'オーランド'、'土佐文旦'の場合葉において出現した FS バンドが花粉では認められなかった。同様に、'パーソンブラウン'、'トロピタ'、'オーランド'の *Aat-2* では BE のバンドが、'黄金柑'の *Aat-2* では JD のバンドがそれぞれ出現しなかった。これに対し、アンコールの場合葉のバンドと花粉のバンドとの間に差異は見られなかった。いずれの遺伝子座においても、ヘテロバンドが花粉のアイソザイムにおいて消失することから、AAT アイソザイムは二量体であると認められた。なお'パーソンブラウン'、'トロピタ'、'オーランド'、'土佐文旦'、'黄金柑'の花粉の *Aat-2* において 3 本以上のバンドが出現し、また'アンコール'は葉、花粉ともに同じ二本のバンドが出現していることから、*Aat-2* が二つの遺伝子座から構成されている可能性も示唆された。

摘 要

カンキツ類の AAT アイソザイムについて二量体の検証を行い、九種類のカンキツ品種において葉と花粉の比較を行った結果、いずれの遺伝子座においてもヘテロバンドを消失することから二量体であることを確認した。

文 献

- Barret, H. C. and A. M. Rhodes 1976 A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany*, **1** : 105-136
- Furr, J. R. and Reece, P. C. 1946 Identification of hybrid and nucellar citrus seedlings by a modification of the rootstock color test. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **48** : 141-146
- Handa, T. and C. Oogaki, 1985 Numerical taxonomic study of *Citrus L.* and *Fortunella Swingle* using morphological characters. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **54** : 145-154
- Hirai, M. and I. Kozaki, 1982 a Isozymes of citrus leaves. *1981 Proc. Int. Soc. Citriculture*, **1** : 10-13
- Hirai, M., I. Kozaki and I. Kajiura 1986 b Characteristics of spontaneously inbred seedlings of trifoliolate orange. *Japan. J. Breed.*, **36** : 138-146
- 西浦昌男, 松島二良, 奥代直巳, 1957 柑橘の種類並びに有性胚実生と無性胚実生の識別に関する研究, 第 1 報, 葉粉末浸出液の定色反応による識別. 東近農試研報園芸部, **4** : 19-26
- Swingle, W. T. 1943 The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (family Rutaceae, subfamily Aurantioideae). In "The Citrus Industry", Vol. 1, ed. by H. J. Webber and L. D. Batchelor, Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 129-474
- Tanaka, T. 1954a Species problem in *Citrus*. Jpn. Soc. for the Promotion of Science, Tokyo, p. 152
- Tanaka, T. 1969b Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B*, **21** : 139-145
- Torres, A. M., R. K. Soost and U. Diedenhofen 1978 Isozymes as genetic markers in citrus. *Amer. J. Bot.*, **65** : 861-881
- 上野勇, 西浦昌男 1976 ザイモグラフィのカンキツ育種への応用, 果試報 B, **3** : 1-32
- Wendel, J. F. and C. R. Parks. 1982 Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica L.*, *J. Heredity*. **73** : 197-204

Summary

Citrus species and their hybrids have been classified and identified on the basis of fruit shape, flower, leaf and tree characteristics. Recently, the zymogram method has been used on some plants as an easy, reliable method to distinguish species or cultivars. Genetics of isozyme in *Citrus* leaves was widely used for the taxonomic investigation and breeding. Many native cultivars were grown in Japan. Analysis of *Citrus* groups may have a botanical significance and may provide valuable information on the *Citrus* breeding. Analyzing the two isozyme loci of aspartate aminotransferase (AAT; E. C. 2. 6. 1. 10), they detected that well recognized groups of *Citrus* cultivars.

The zymograms were compared with the pollen and leaves on the heteroband of *Aat-2* of AAT, and showed the disappearance of the hetero-band *Aat-2*. This paper described to clarify the dimeric nature of *Aat-2*.