

カンキツ類のアイソザイム解析による分類学的研究 : 3. カンキツの一代雑種におけるアスパラギン酸ア ミノ転移酵素(Aspartate aminotransferase, AAT)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/10.15017/23373>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 46 (3/4), pp.119-125, 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

3. カンキツの一代雑種におけるアスパラギン酸アミノ転移酵素 (Aspartate aminotransferase, AAT) 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.

3. Isozyme Analysis of Aspartate Aminotransferase on *Citrus* Zygotic Seedling.

Shin-ichi SHIRAISHI

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

緒 論

カンキツの AAT アイソザイム遺伝子の遺伝様式を確認することと、遺伝子座 *Aat-2* の構造を明らかにするために、カンキツ属品種間で交配試験を行い、得られた交雑実生のアイソザイム分析を行った。

材料及び方法

材料: カンキツ品種間の 11 組合せ (1. クレメンチン×ポンカン, 2. 早生八朔×日向夏, 3. 獅子柚×パロチンベルガモット, 4. 日向夏×ラフレモン, 5. 花柚×花柚, 6. 土佐文旦×川野なつだいだい, 7. 花柚×黄金柑, 8. 土佐文旦×座橙, 9. 日向夏×パロチンベルガモット, 10. クレメンチン×ラングプールライム, 11. 早生八朔×紀州ミカン) の交配を行い、播種後三カ月目の雑種実生を分析材料とした。交配母本とした品種の中で、多胚性の‘花柚’以外は全て単胚性であった。‘花柚’も平均胚数が 1.52 と非常に少なく、単胚種子も多く出現する (岩政 1976) ので、選別して単胚のみを実生育成に供試した。

材料: 前報に準じて抽出、精製、電気泳動を行った。

結果及び考察

第 1 図から第 13 図にカンキツ品種間の 11 交雑組合せのザイモグラムと観察した固体数を図示した。

Aat-1 について、第 1 図に代表的な遺伝子型の分離を示した。‘クレメンチン’×‘ポンカン’の実生では、‘ク

レメンチン’の S 遺伝子と‘ポンカン’の S 遺伝子で全て SS のバンドパターンを示した。‘早生八朔’×‘日向夏’の交雑実生では、‘早生八朔’の F 遺伝子と‘日向夏’の S 遺伝子で FS、‘早生八朔’の S 遺伝子と‘日向夏’の S 遺伝子で SS のバンドパターンを示した。以上のことから推定した遺伝子型が交雑実生に出現することが確認された。

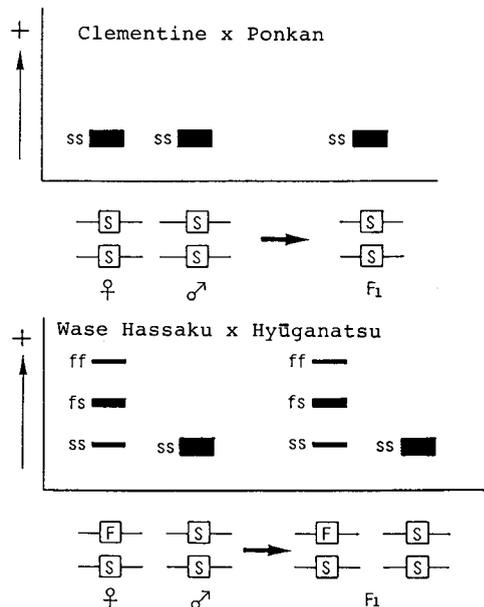


Fig. 1. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern in *Aat-1* region.

Table 1. Goodness-fit test for segregation patterns at *Aat-1*.

♀	♂	Parental genotypes	Offspring genotypes(N)*	Expected ratio	χ^2 **	P
Tosa Buntan	× Kawano Natsudaidai	FS×FS	FF : FS : SS (33) (53) (14)	1 : 2 : 1	6.78	0.050-0.020
Hyuganatsu	× Rough lemon	SS×FS	SS(71) : FS(29)	1 : 1	17.64	<0.005
Shishiyu	× Balotin Bergamot	FF×FA	FF(42) : FA(41)	1 : 1	0.01	>0.900
Hanayu	× Ohgonkan	SS×SS	SS(49)	1 : 0	0.00	1.000
Hyuganatsu	× Balotin Bergamot	SS×FA	FS(22) : SA(15)	1 : 1	1.32	0.300-0.200
Clementine	× Ponkan	SS×SS	SS(26)	1 : 0	0.00	1.000
Clementine	× Rangpur lime	SS×FS	SS(17) : FS(9)	1 : 1	2.46	0.200-0.100
Wase Hassaku	× Kisyu Mikan	FS×SS	FS(16) : SS(14)	1 : 1	0.13	>0.900
Wase Hassaku	× Hyuganatsu	FS×SS	FS(27) : SS(33)	1 : 1	0.60	0.900-0.800
Tosa Buntan	× Zadaidai	FS×SA	FS : FA : SA : SS (18) (34) (37) (11)	1 : 1 : 1 : 1	18.80	<0.005
Hanayu self-pollination		SS×SS	SS(18)	1 : 0	0.00	1.000

* Number of seedlings examined.

** Calculated with 1, 2, 3 degrees of freedom for 1:1, 1:2:1, 1:1:1:1 ratios respectively.

アイソザイムの表現型は単純なメンデル遺伝をすることが知られている。*Aat-1*について理論値と実験によって得られた観測値との間の χ^2 値を算出して、メンデルの遺伝の法則への適合性の検定を行った。検定の結果を第1表に示した。 χ^2 検定で有意性が認められたのは、'土佐文旦'×'川野なつだいだい'、'日向夏'×'ラブレモン'、'土佐文旦'×'座橙'のみで、その他の交配組合せには有意性を認めず、メンデルの遺伝法則に従うものと言える。しかし、有意性のあった三つの組合せについてもメンデルの期待値にやや外れたのは、供試数の不足も一因と考えられる。

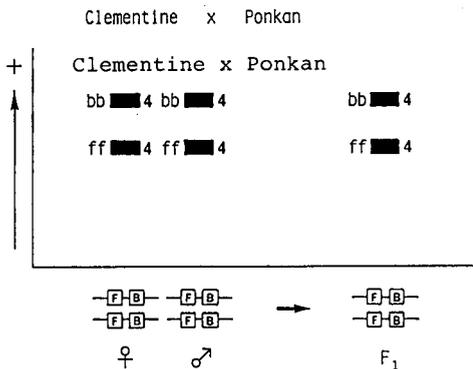


Fig. 2. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern in *Aat-2* region.

'クレメンティン'×'ポンカン'の *Aat-2* におけるバンドパターンを第2図に示した。もし *Aat-2* において遺伝子が重複しているならば、'クレメンティン'の相同染色体上にいずれも *F* 遺伝子と *B* 遺伝子が乗っており、*F* 遺伝子と *F* 遺伝子、*B* 遺伝子と *B* 遺伝子が対応しているものと考えられ、同様に'ポンカン'においても相同染色体上に *FF*, *BB* という形で遺伝子が乗っていると考えられる。両者の *F*₁ では'クレメンティン'の *FB* と'ポンカン'の *FB* で全ての実生で *FF/BB* の遺伝子型を示した。

この結果はカンキツの *Aat-2* において遺伝子座が重複しているか、あるいは二遺伝子座になっていることを示している。

第3図に'獅子柚'×'パロチンベルガモット'の *F*₁ 実

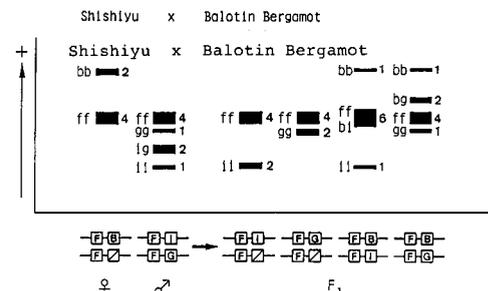


Fig. 3. Diagram of the segregation in ATT isozyme in *Aat-2* region.

生のバンドパターンを示した。‘獅子柚’では二本のバンドが出現しており、その中で特に陽極側のバンドがかなり薄くなっている。‘パロチンベルガモット’では陽極側からそれぞれ非常に濃い、薄い、やや濃い、薄い四本のバンドが出現している。これらを交配した F_1 において四つのバンドパターンに分離していることから、‘獅子柚’では相同染色体上に F と F 、 B と欠失が乗っているものと考えられる。‘パロチンベルガモット’では、相同染色体上に FF 、 IG という形で乗っていると考えられる。すなわち、両者の F_1 実生では‘獅子柚’の F -とパロチンベルガモットの FI と FF/I -、同様に F -と HG とで FF/G -、 FB と FI とで FF/I -、 FB と FG とで FF/BG という遺伝子型をそれぞれ示すものと考えられる。

第4図に‘日向夏’×‘ラフレモン’の F_1 実生のバンドパターンを図示した。‘日向夏’は淡い、やや濃い、淡い三本のバンドが、‘ラフレモン’では淡い、濃い、やや濃い、やや薄い四本のバンドが出現している。これらの交配による F_1 において、異なる8種類のバンドパターンに分離していることから、‘日向夏’では相同染色体上で B と F が対応し、重複部がないものと見做される。一方、‘ラフレモン’では相同染色体で F と I 、 I と B が対応していると考えられる。この場合、 F_1 では4種類の表現型にしか分離しないはずであるが、8種類の表現型に分離していることから‘ラフレモン’において乗り換えが起こっていると考えられる。両者の F_1 では、‘日向夏’の B -と‘ラフレモン’の FI と BF/I -、同様に B -と IB とで BI/B -、 F -と FI とで FF/I -、 F -と IB とで FI/B -という4種類のタイプに加え、乗り換えが起こったためにできた新たな4種類、すなわち‘日向夏’の B -とラフレモンの FB とで BF/B -、同様に B -と II とで BI/I -、 F -と FB とで FF/I -

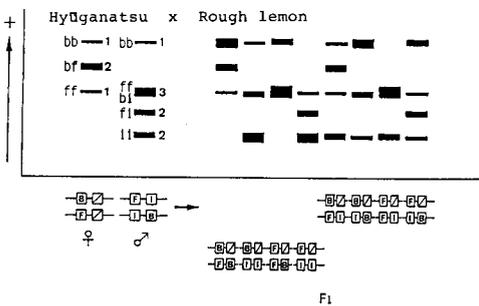


Fig. 4. Diagram of the segregation in ATT isozyme pattern in *Aat-2* region.

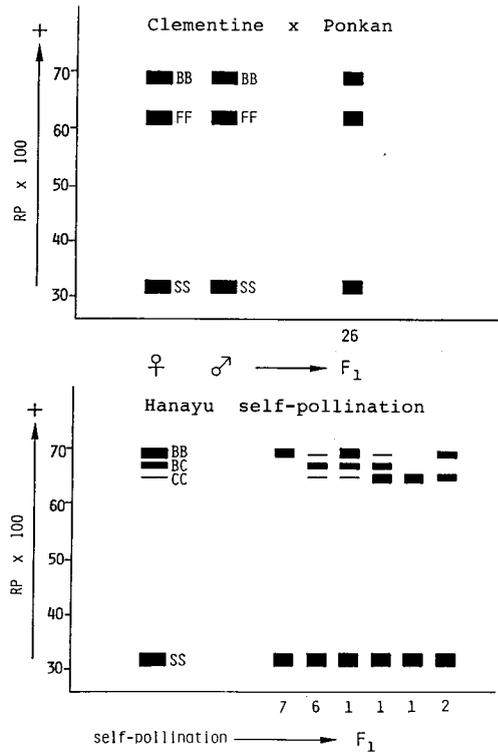


Fig. 5. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern.

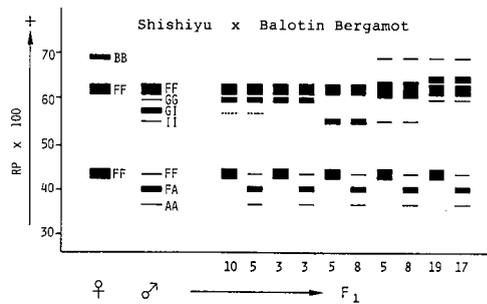


Fig. 6. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern.

B -、 F -と II とで FI/I -に分離しており、合計8種類の遺伝子型を示すものと考えられる。なお、この場合 F_1 実生における BF/I -、 BI/B -、 FF/I -、 FF/B -タイプと BF/B -、 BI/I -、 FF/B -、 FI/I -タイプの何れかが乗り換えについてさらに検討する必要がある。しかし、前者のタイプと後者のタイプとの比が 62 : 38

と分離したことから、後者のタイプを乗り換え型と今回は推定した。

以上のことから、カンキツ属の遺伝子座 *Aat-2* において、遺伝子の重複があることが確認された。また、比較的高頻度で乗り換えが起きることから、相同染色体に乗っている位置と重複の位置との距離がかなり離れているものと考えられる。Hirai *et al.* (1987) は遺伝子座 *Aat-2* によって支配されるバンド群の中で、比較的染色程度の弱い部分を分離濃縮して泳動したバンド群を遺伝子座 *Got-3* として報告している。本報告と平井らのものと比較すると類似点が多いことから、本報告での *Aat-2* の重複部が *Got-3* に相当するものと考えられる。本研究結果と平井らの結果を比べてみると、対立遺伝子の対応は次のようになっていると考えられる。本報告での対立遺伝子 *I, H, G, E, B* は、

平井らの対立遺伝子 *A, B, C, D, E* とそれぞれ対応している。両報告での相違点は、遺伝子座 *Aat-2* の重複部 (*Got-3*) において以下の少数品種にみられた。パペダ区では‘カーシーパペダ’, ‘カバヤオパペダ’, レモン区, ライム区およびその近縁種では‘タヒチライム’, プンタン区及びプンタン類似雑種では‘石頭柚’, ‘早柚’, ‘河内晩柑’, グレープフルーツ類では, ‘マーシュ’, ‘レッドブラッシュ’, ‘スタールビー’, ‘トライアンプ’, スイートオレンジ類では‘ルビーブラッド’, ユズ及びその近縁種では‘花柚’, ‘餅柚’, ‘柚柑’, マンダリン区では‘シークワッシャー’, ‘ケラジ’, ‘黄橙’。

これらの相違点が生じた原因は、泳動試料の抽出方法, 分離ゲルの分解能の差異およびバンディングパターンの解釈の相違によるものと考えられる。

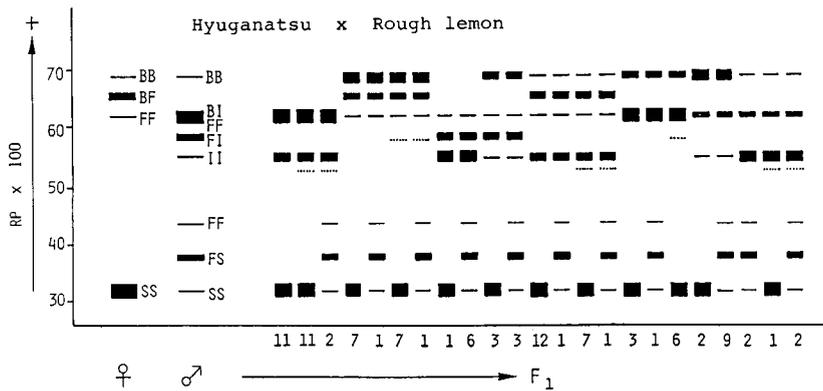


Fig. 7. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern.

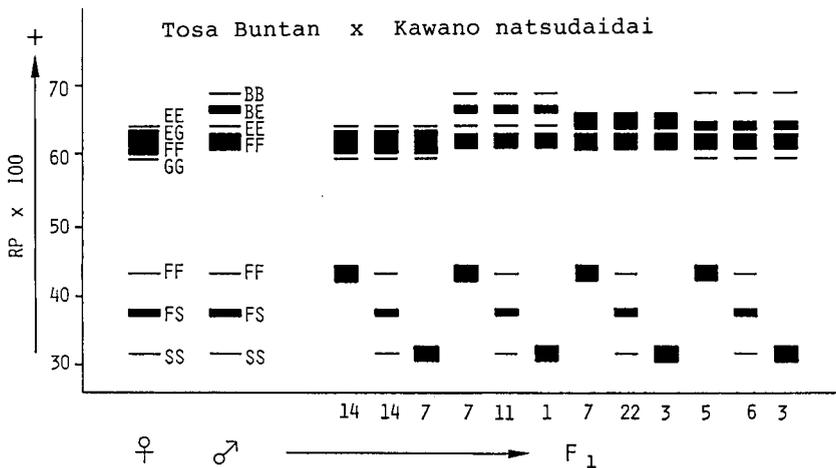


Fig. 8. Diagram of the segregation in ATT isozyme pattern.

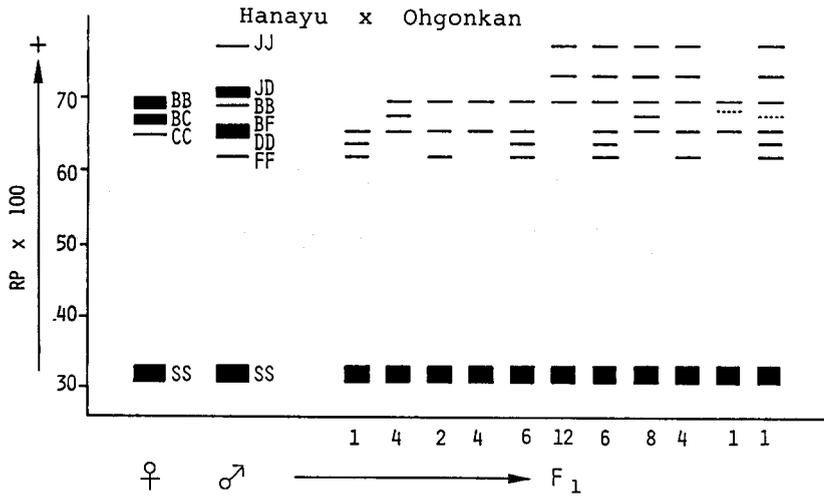


Fig. 9. Diagram of the segregation in ATT isozyme pattern.

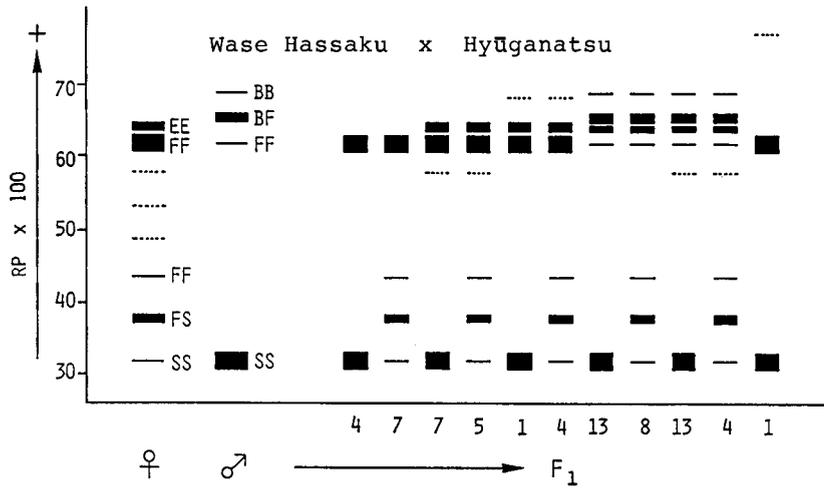


Fig. 10. Diagram of the segregation in ATT isozyme pattern.

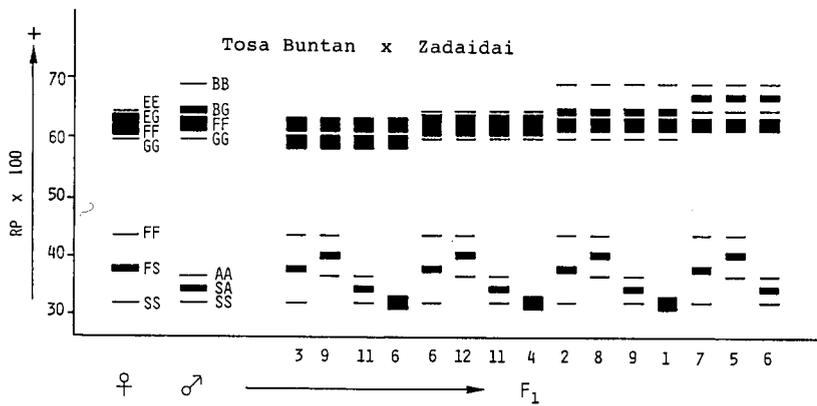


Fig. 11. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern.

次に *Aat-1* と同様に *Aat-2* についてもメンデル遺伝の法則への適合性の検定を行った。対立遺伝子の解析を行うことのできた交配組合せの中で、乗り換えを考慮に入れる必要のない六つの組合せについて検定した結果、‘土佐文旦’×‘川野なつだいだい’、‘獅子柚’×‘パロチンベルガモット’、‘早生八朔’×‘紀州みかん’においては5%水準で有意差がみられたが、その他の三つの組合せでは有意差を認めなかった(第2表)。このことから *Aat-2* においてもメンデル遺伝に従うものと考えられた。しかし、有意差が見られたものについては解析に必要な供試个体数が不足していた可能性もあり、今後再検討する必要がある。

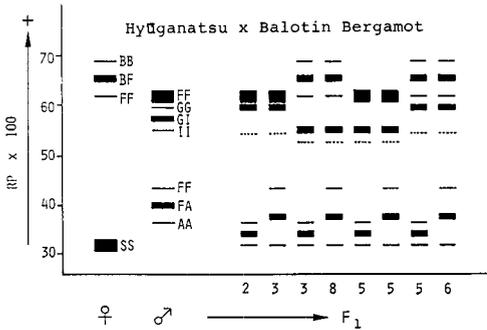


Fig. 12. Diagram of the segregation in AAT isozyme pattern.

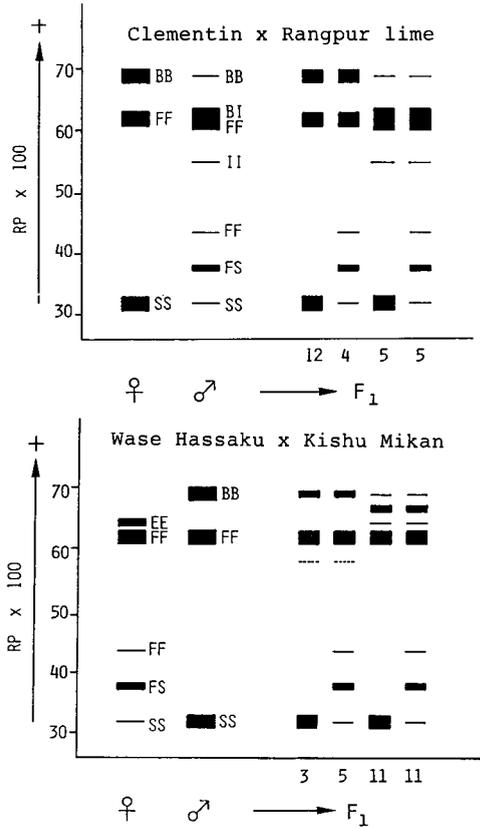


Fig. 13. Diagram of the segregation in ATT isozyme pattern.

Table 2. Goodness-fit test for segregation patterns at *Aat-2*.

♀	♂	Parental genotypes	Offspring genotypes(N)*	Expected ratio	χ^2 **	P
Tosa Bustan	Kawano Natsudaidai	$\frac{EG}{FF} \times \frac{BE}{FF}$	$\frac{EG}{FF} : \frac{BE}{FF} : \frac{EE}{FF} : \frac{BG}{FF}$ (35) (19) (32) (14)	1 : 1 : 1 : 1	12.28	0.010-0.001
Wase Hassaku	Hyuganatsu	$\frac{E-}{FF} \times \frac{-}{BF}$	$\frac{-}{FF} : \frac{E-}{FF} : \frac{BF}{BF} : \frac{-E}{BF}$ (12) (17) (21) (17)	1 : 1 : 1 : 1	2.42	0.500-0.300
Hyuganatsu	Balotin Bergamot	$\frac{-}{BF} \times \frac{IG}{FF}$	$\frac{G-}{FF} : \frac{I-}{BF} : \frac{I-}{FF} : \frac{-G}{BF}$ (5) (13) (10) (11)	1 : 1 : 1 : 1	3.86	0.300-0.200
Shishiyu	Balotin Bergamot	$\frac{B-}{FF} \times \frac{IG}{FF}$	$\frac{C-}{FF} : \frac{I-}{FF} : \frac{BI}{FF} : \frac{BG}{FF}$ (21) (13) (13) (36)	1 : 1 : 1 : 1	17.00	<0.001
Clementine	Rangpur lime	$\frac{BB}{FF} \times \frac{BI}{FF}$	$\frac{BB}{FF} : \frac{BI}{FF}$ (16) (10)	1 : 1	1.38	0.300-0.200
Wase Hassaku	Kishu Mikan	$\frac{E-}{FF} \times \frac{BB}{FF}$	$\frac{B-}{FF} : \frac{BE}{FF}$ (8) (22)	1 : 1	6.53	0.020-0.010

* Number of seedlings examined.

** Calculated with 1, 3 degrees of freedom for 1 : 1, 1 : 1 : 1 : 1 ratios respectively.

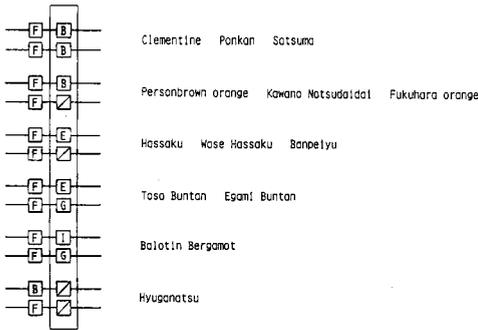


Fig. 14. Representative genotypes of *Aat-2* locus.

以上、11 組合せの交配結果及び両親のバンドパターンから、推測した遺伝子座 *Aat-2* の構造及びそれに対応する対立遺伝子の代表事例を第 14 図に示した。図の左の部分では、F 遺伝子が多く、一部に B 遺伝子もみられた。図の右の部分では、B, E, G, I, 欠失がみられた。このことから右の部分为重複部である可能性が強く示唆される。

分析結果を総括して、*Aat-2* アイソザイムをコードする遺伝子は重複していることが明らかとなり、最初の部位と重複部が独自に遺伝支配することから、*Aat-2* が二つの遺伝子座 (*Aat-2* と *Aat-3*) に進化していることを示唆している。またこの進化中の二つの遺伝子座が相同染色体上でかなり離れて存在しているということも示唆された。一方、重複した遺伝子座において、対立遺伝子がない品種もブンタン類を中心に見いだされた。これらのことは、カンキツの系統発生について考察する上で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になり得るものと考えられる。

摘 要

カンキツ類の AAT アイソザイム遺伝子の遺伝様式の確認、ならびに遺伝子座 *Aat-1*, *Aat-2* の構造解明と、推定した遺伝子型を確認するために F₁ の AAT アイソザイム分析を行った。

推定どおりの遺伝子型を確認し、対立遺伝子の遺伝子解析により、遺伝子座 *Aat-2* が相同染色体上において重複進化しており、二つ部分の遺伝子座から構成されていることと、それら二つの遺伝子座がかなり離れて存在している可能性を示唆した。

文 献

- Endo, T. 1973 Isozyme loci and a strategy of differentiation in plants. *Seiken Ziho.*, **24** : 89-104
- Esen, A., R. K. Scora and R. K. Soost 1975 A simple and rapid screening procedure for identification of zygotic *Citrus* seedlings among crosses of certain taxa. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **100** : 558-561
- 平井正志 1984 果樹におけるアイソザイム分析. 遺伝., **38** : 15-9
- Hirai, M. and I. Kajiura 1987 Genetic analysis of leaf isozymes in *Citrus*. *Japan. J. Breed.*, **37** : 377-388
- 岩成正男 1976 柑橘の品種. 静柑連.
- Iglrsias, L., H. Lima and L. P. Simon 1974 Isozyme identification of zygotic and nucellar seedlings in *Citrus*. *J. Herd.* **65** : 81-84
- Torres, A. M., R. K. Soost and U. Diedenhofen 1987 Isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer. J. Bot.*, **65** : 861-881
- Wendel, J. F. and C. R. Parks 1982 Genetic control of isozyme variation in *Camellia Japonica* L. *J. Herd.*, **73** : 197-204

Summary

The AAT isozymes of F₁ hybrids synthesized from inbred *Citrus* were analyzed, so that clarified the genetic system, and that made clear the structures of two loci, *Aat-1* and *Aat-2*, and that had confirmed the estimated genotypes. In addition, the analysis of the alleles have suggested that evolution by gene duplication in *Aat-2* locus on the homologous chromosome. The *Aat-2* locus was consisted of the two gene loci which was at a distance.