

カンキツ類のアイソザイム解析による分類学的研究 ： 4. アスパラギン酸アミノ転移酵素 (Aspartate aminotransferase, AAT) アイソザイム分析によるカン キツ亜科の種, 品種の遺伝子型の推定

白石, 眞一
九州大学農学部附属農場

<https://doi.org/10.15017/23374>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 46 (3/4), pp.127-136, 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

4. アスパラギン酸アミノ転移酵素 (Aspartate aminotransferase, AAT) アイソザイム分析によるカンキツ亜科の種、品種の遺伝子型の推定

白石 真一
 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.

4. Estimating the Genotypes on the Species and Cultivars of Aurantiodeae Using Aspartate Aminotransferase Isozyme Analysis.

Shin-ichi SHIRAISHI

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

結 論

カンキツ類はミカン亜科に属し、多数の種や栽培品種群を構成している。カンキツ属、キンカン属、カラタチ属に分けられているが食用になるものも多い。カンキツ属が多数の種と栽培品種を持っているが、多くの植物学者の努力によって科学的な分類が提唱されてきた。Swingle (1943) による16種、田中 (1969) の159種と種の定義に疑点を残した分類となっている。本研究は、AATに関する二つの遺伝子座を対象に、分類の一助とする遺伝子型の推定を試みたもので、分類の基礎形質である形態形質による評価基準に貢献できれば幸いである。

材料及び方法

実験1. 1986年の調査

材料：遺伝資源品種のカンキツ種類約150種類と数種のカラタチ、キンカンを供試した。

方法：新鮮カンキツ成葉約1gに、抽出用緩衝液2.5mlと少量の石英砂とPVPPを0.2gを加え低温条件下で磨碎し、10,000 rpm, 0°Cで10分間遠心分離し、上澄液を得てその0.2mlをSephadex G-25でゲル濾過して泳動用試料とした。

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20μlを用い、低温状態で最初30分間100V、その後泳動終了まで250Vの定電圧で行った。

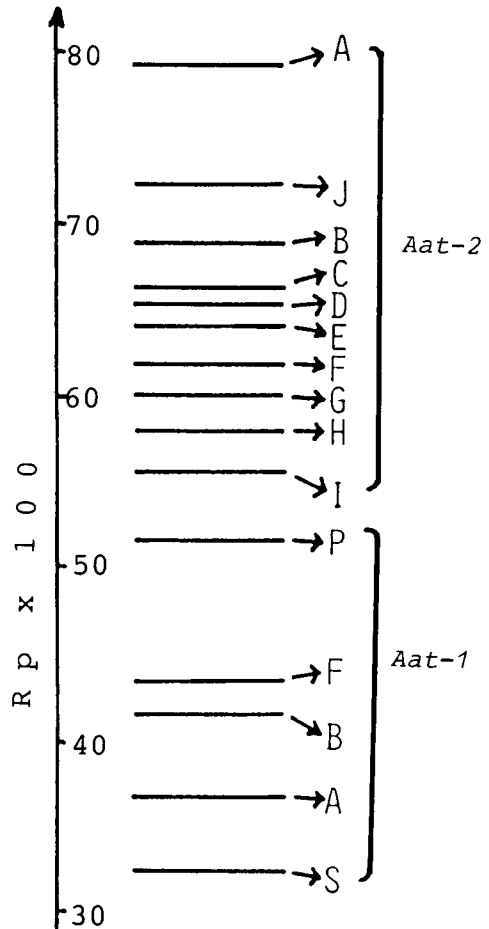


Fig.1. Band location for alleles identified for the 2 loci, *Aat-1* and *Aat-2*.

泳動後ゲルを暗黒下 37°Cで1時間の染色を行い、その後一昼夜水洗してザイモグラムを得た。

実験2. 1987年の調査

材料：カラタチ品種5種、カラタチ台に接木されたカンキツ品種227種及びキンカン品種2種、合計234種を供試した。

方法：AAT酵素のアイソザイム分析は前項の抽出、精製、電気泳動の各方法に準じた。

結 果

1. 1986年の調査結果

供試品種全てのAAT酵素のアイソザイムにおける対立遺伝子を第1図に纏めた。また第2図から第6図にカンキツ類のザイモグラムとその遺伝子型を示した。遺伝子座 *Aat-1* においては、Torres *et al.* (1978) や Hirai *et al.* (1986) の報告に従い、また遺伝子座 *Aat-2* については陽極側からアルファベット順に記号を

付け、*Aat-1* は五つ、*Aat-2* では10個の対立遺伝子を確認した。これまで分析を行ったカンキツ類231点の遺伝子を、第1表と第2表に系統別に取り纏めて示した。

2. 1987年の調査結果

カンキツ葉のAAT酵素のザイモグラムによる遺伝子型の推定は、バンドの濃度差、泳動距離、及び Hirai *et al.* (1981), Soost *et al.* (1981), Torres *et al.* (1978) に準じて行った。ザイモグラムの位置関係は第1図に示すように *Aat-1* と *Aat-2* に分けた。*Aat-1* においてカブヤオパベダに見られた新しいバンドにBBとした。

第2図から第6図に分析を行ったカンキツ品種をこれまでの分類(田中1969)に従ってザイモグラムとその遺伝子型を纏めて表示した。この表現型を表す複対立遺伝子を種類別に第3表に纏めた。

Table 1. Alleles of *Aat-1* isozyme in *Citrus*, and *Poncirus*.

Type or common name	alleles () *					
Papeda	(2)	F(1)				B(1)
Lime	(8)	F(8)	S(4)	A(3)		
Citron	(15)	F(2)				
Lemon	(15)	F(15)	S(15)			
Lemon relatives	(5)	F(5)	S(2)	A(2)		
Pumelo	(14)	F(14)	S(7)	A(2)		
Grapefruit	(2)	F(2)	S(2)			
Natsudaidai	(2)	F(2)	S(2)			
Pumelo relatives	(32)	F(25)	S(30)			
Sour oranges	(6)		S(6)	A(5)		
Sweet oranges	(29)	F(1)	S(29)			B(1)
Sweet orange relatives	(4)	F(1)	S(4)			
Yuzu and related hybrids	(12)	F(1)	S(10)	A(1)		
Satsuma mandarin	(12)		S(12)			
Mandarins	(54)	F(2)	S(54)	A(1)		
Ponkan mandarin	(2)		S(2)			
Tangelo-tangol	(15)	F(2)	S(15)			
Unknown hybrids	(6)	F(2)	S(6)			
Kumquat	(2)	F(1)	S(1)		P(1)	B(1)
Trifoliolate orange	(4)	F(4)		P(4)		
Graft chimera etc.	(3)	F(3)	S(3)			
Total allele	(231)	F(91)	S(202)	A(14)	P(5)	B(3)

* Number of cultivars observed.

Table 2. Alleles of *Aat-2* isozyme in *Citrus*, *Fortunella* and *Poncirus*.

Type or common name	alleles () *									
Popeda (2)							F(2)			I(2)
Lime (8)							F(8)	G(5)		I(8)
Citron (2)							F(2)			I(2)
Lemon (15)			B(6)				F(12)	G(1)		I(13)
Lemon relatives (5)			B(3)				F(2)	G(2)		I(5)
Pumelo (14)						E(9)	F(14)	G(5)		
Grapefruit (2)							F(2)			
Natsudaidai (2)			B(2)			E(2)	F(2)			
Pumelo relatives (32)	A(1)	J(2)	B(26)	C(1)	D(2)	E(15)	F(32)	G(2)		I(1)
Sour oranges (6)			B(6)			E(4)	F(2)			
Sweet oranges (29)			B(27)			E(24)	F(29)			
Sweet orange relatives (4)			B(4)			E(1)	F(4)			
Yuzu and related hybrids (2)			B(8)	C(7)	D(1)	E(2)	F(10)	G(1)		
Satsuma mandarin (12)			B(12)				F(12)			
Mandarins (54)			B(54)			E(3)	F(54)			
Ponkan mandarin (2)			B(2)				F(2)			
Tangelo-tangoi (15)			B(15)			E(7)	F(13)	G(2)		
Unknown hybrids (6)			B(3)				F(6)	G(1)		I(1)
Kumquat (2)			B(1)				F(1)		H(1)	I(1)
Trifoliolate orange (4)							F(4)		H(3)	
Graft chimera etc. (3)			B(2)			E(1)	F(3)			
Total allele (231)	A(1)	J(2)	B(173)	C(8)	D(3)	E(68)	F(216)	G(19)	H(4)	I(33)

* Number of cultivars observed.

Table 3. Difference of alleles AAT isozyme in *Citrus*, *Fortunella* and *Poncirus*.

Type	<i>Aat-1</i>					<i>Aat-2</i>								
Lime	F	S	A							F	G		I	
Citron	F									F			I	
Lemon	F	S						B		F	G		I	
Citrophorum	F	S	A					B		F	G		I	
Shaddock	F	S	A							E	F	G		
Pumelos	F	S				A	B	C		E	F			
Grapefruit	F	S								F				
Sour orange		S	A					B		E	F	G		
Sweet orange		S						B		E	F			
Navel orange		S						B		E	F			
Aurantium	F	S						B		E	F			
Osmocitrus		S						B	C	D	F			
Satsuma mandarine		S						B		F				
Tangerines		S						B		F				
Papada	F				B					F			I	
Kumquats	F			P						F		H		
Trifoliolate	F			P						F		H		
Hybrids citrus	F	S						B		E	F			
Total alleles	F	S	A	P	B	A	B	C	D	E	F	G	H	I

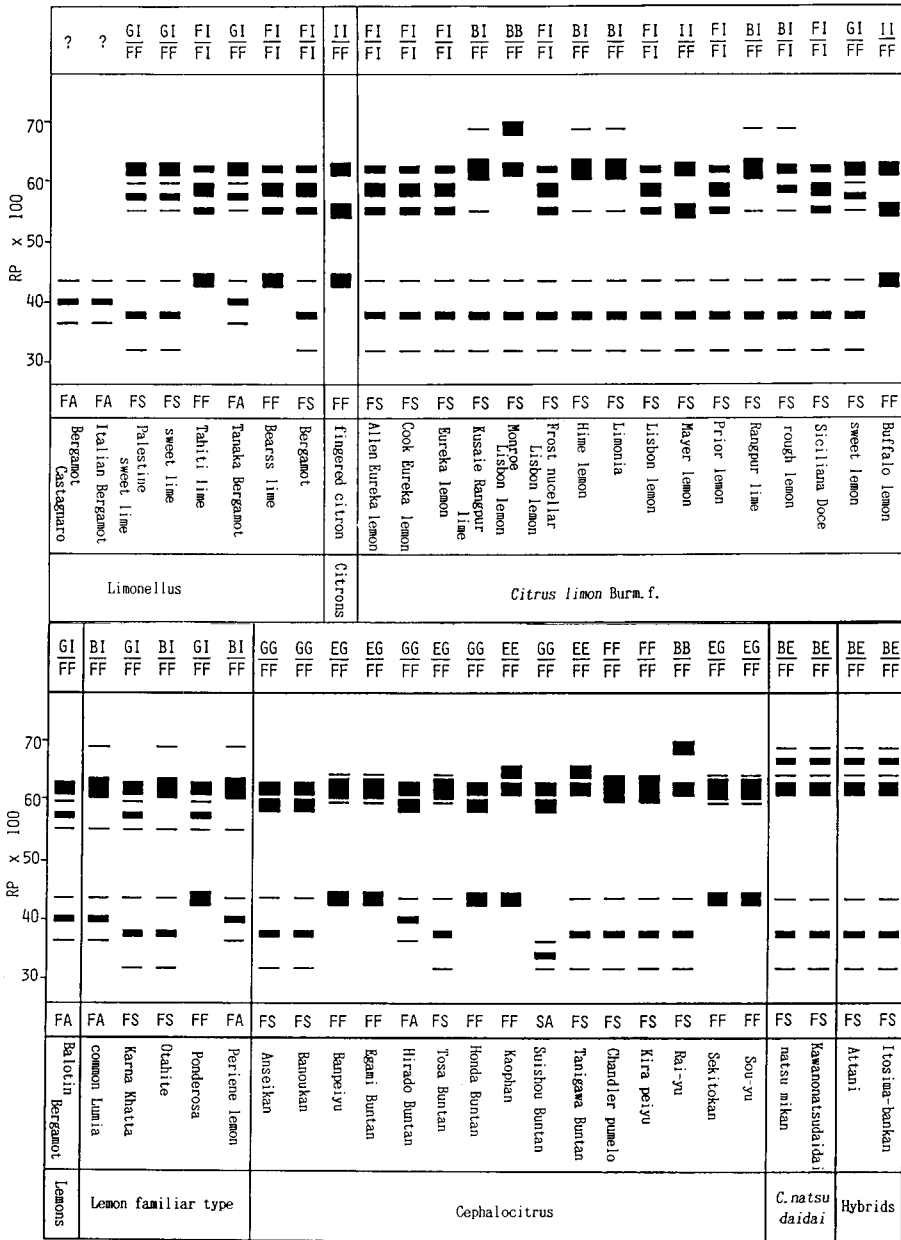


Fig. 2. Schematic illustration of electrophoretic patterns of AAT isozymes and their genotypes in limes, citrons, lemons, pummelos and sour oranges.

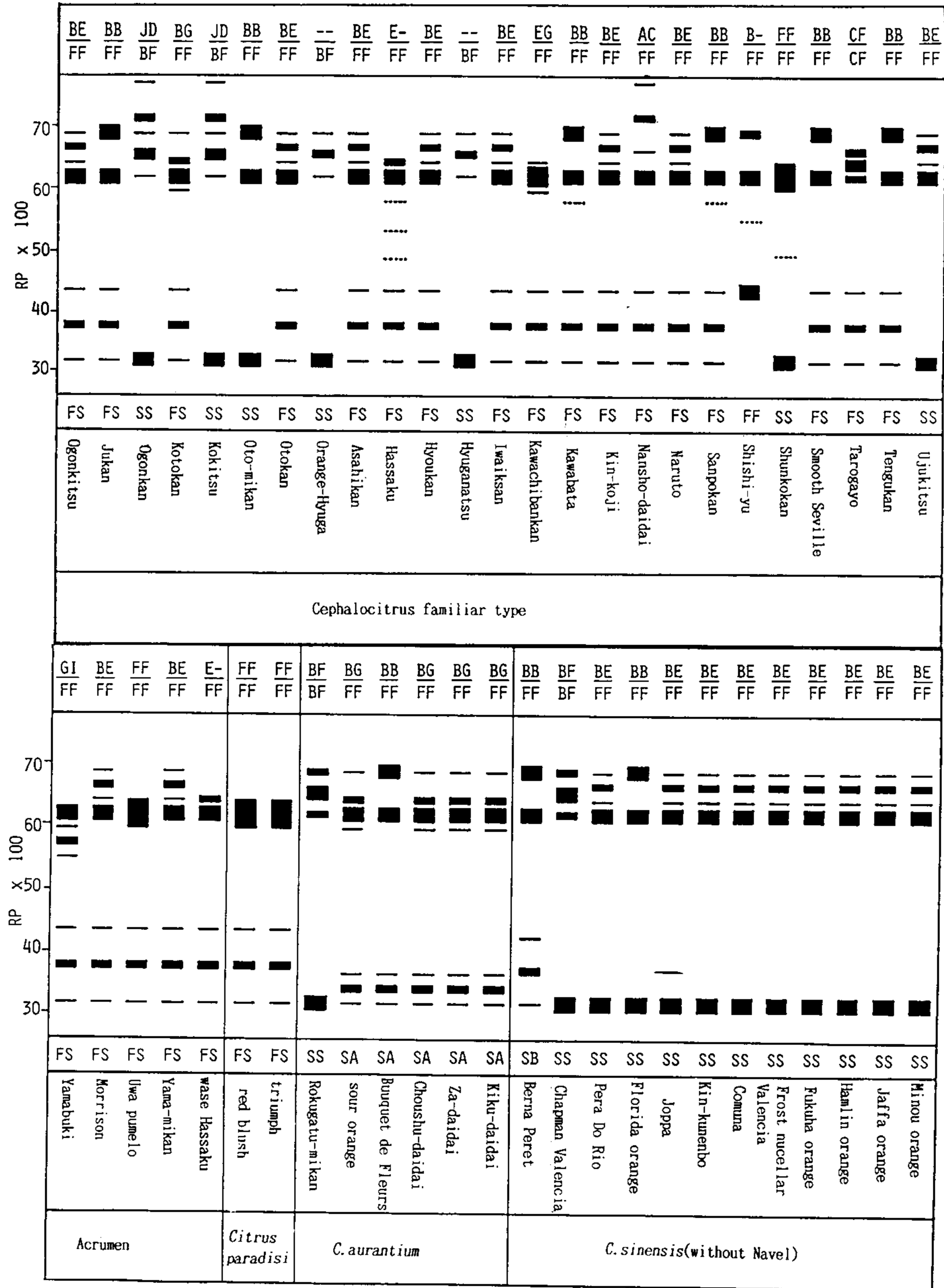


Fig. 3. Schematic illustration of electrophoretic patterns of AAT isozymes and their genotypes in the hybrids of pummelos and oranges.

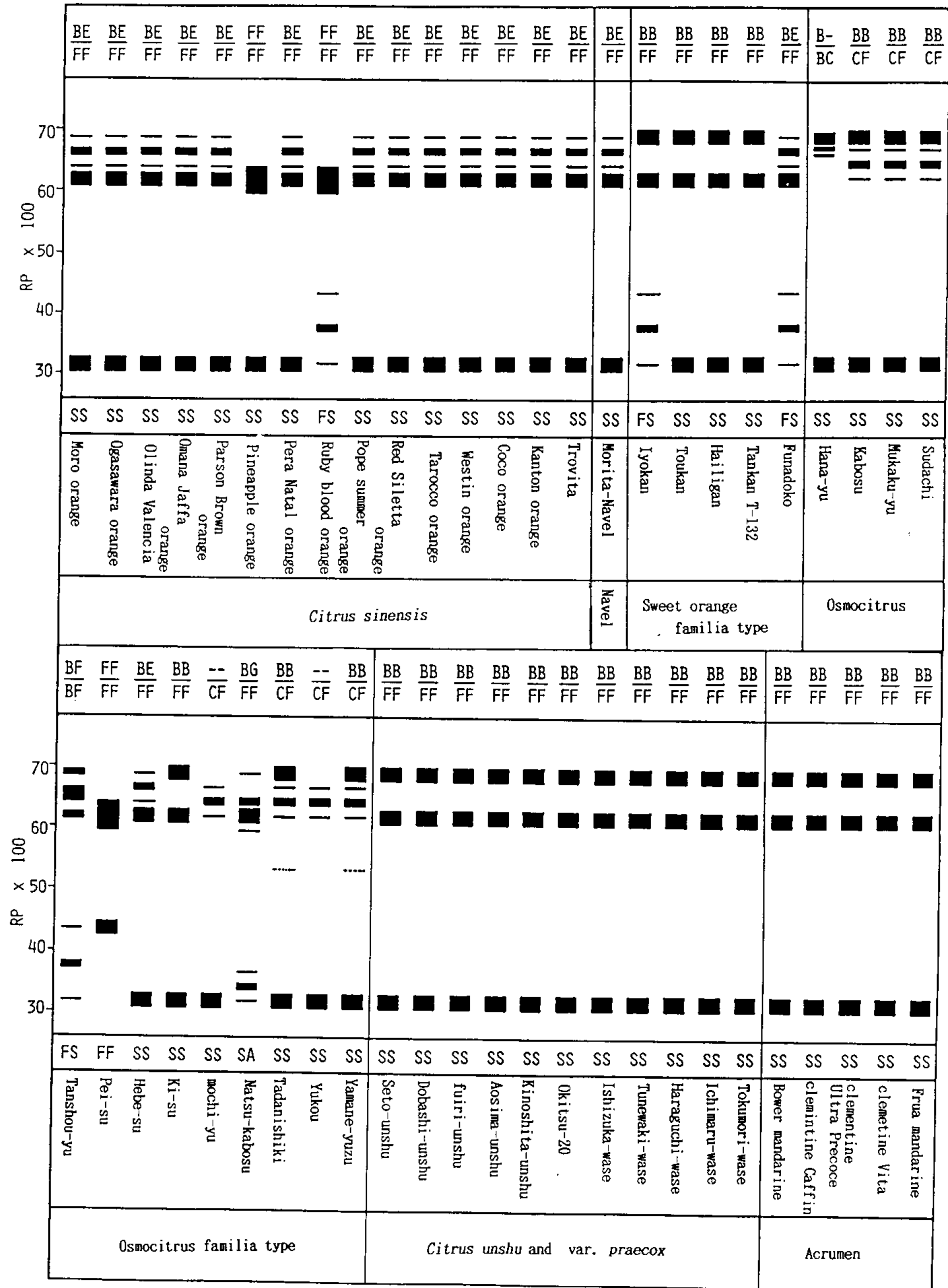


Fig. 4. Schematic illustration of electrophoretic patterns of AAT isozymes and their genotypes in oranges and mandarins.

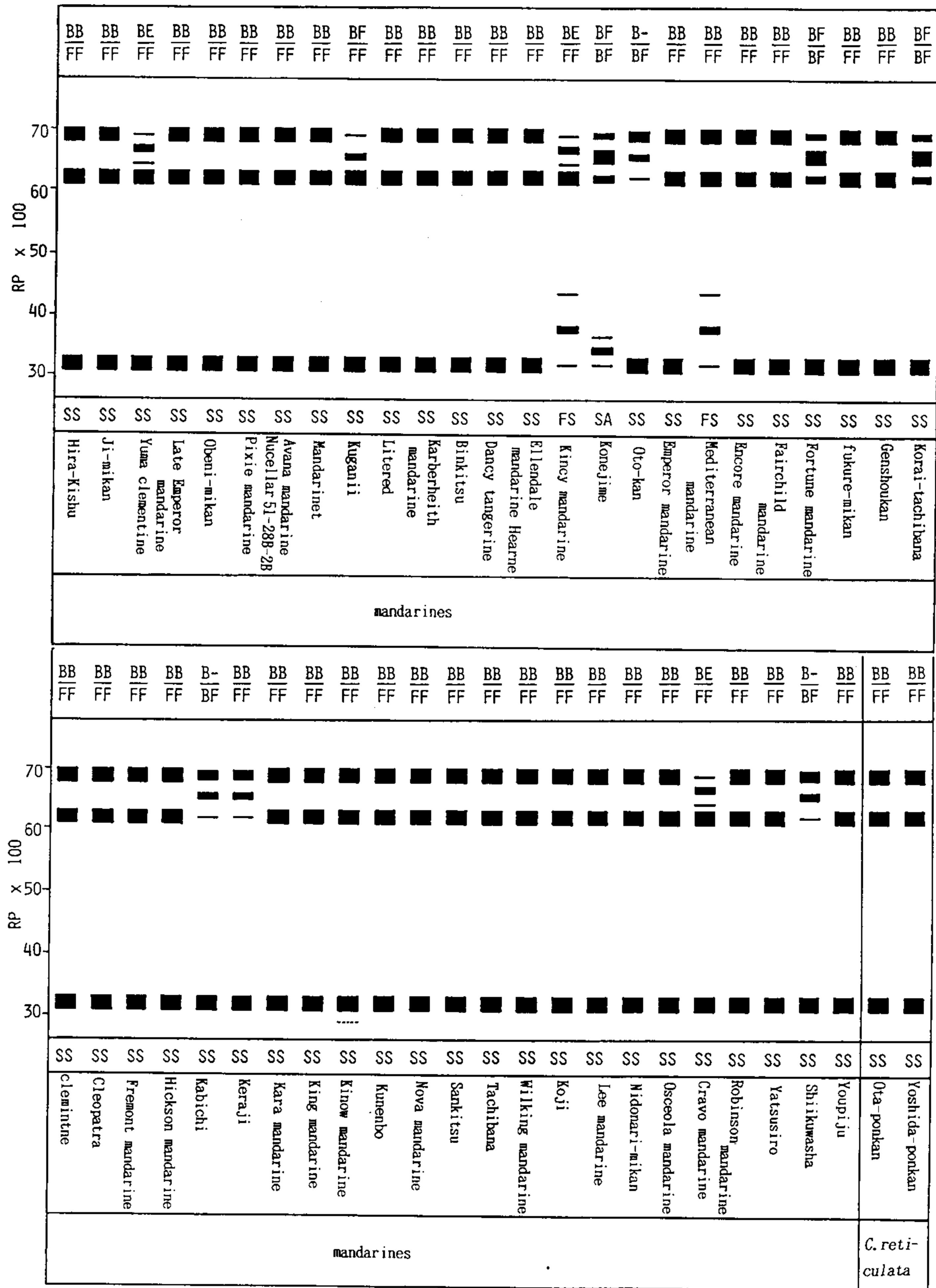


Fig. 5. Schematic illustration of electrophoretic patterns of AAT isozymes and their genotypes in mandarins and Ponkans.

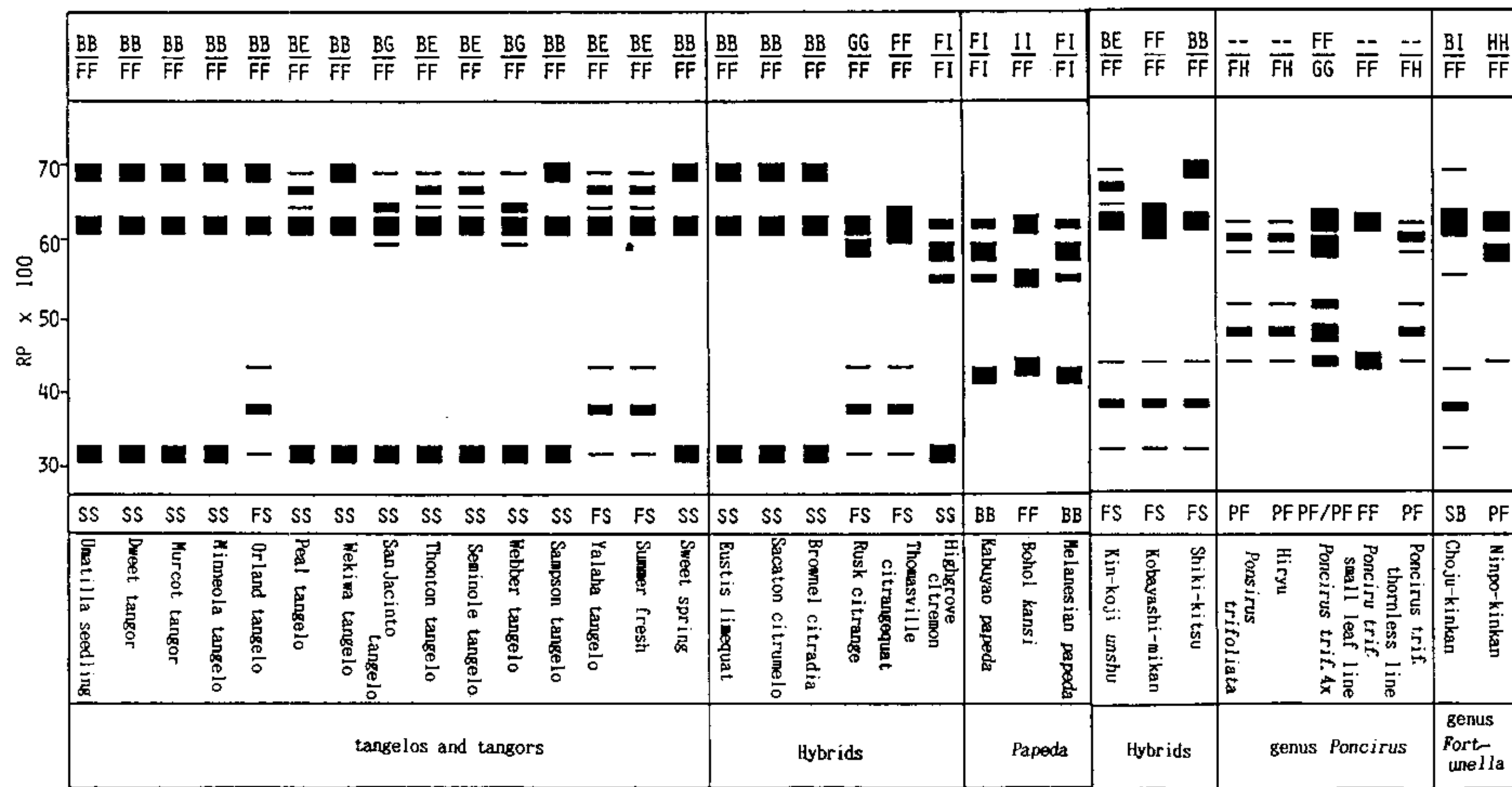


Fig. 6. Schematic illustration of electrophoretic pattern of AAT isozymes and their genotypes in tangelos, tangors, trifoliate and kumquats.

考 察

1985年度から1987年度にわたる3年間に行ったカンキツ類の種および品種のアスパラギン酸アミノ転移酵素(AAT)アイソザイム分析による遺伝子型を全て纏めて第2図から第6図に示した。

1. *Aat-1*: S遺伝子が202種類に最大頻度で認められ、次いでF遺伝子が91種類に出現した。F遺伝子はサワーオレンジ、スイートオレンジ、ミカン類には殆ど見られなかった。S遺伝子はカラタチ、パペダ、シトロンで全く見られず、ライム、ブンタンに約半分の種類に見られた。F遺伝子はパペダ、ライム、シトロン、レモン、ブンタン、カラタチの殆どに見られ、S遺伝子はレモン、ブンタン、サワーオレンジ、スイートオレンジ、ユズ、ミカン類の殆どに見られた。A遺伝子はサワーオレンジの殆どに見られ、ライム、レモン類似品種に散見された。しかし、その数は少なかった。P遺伝子はカラタチの全ての品種に見られ、キンカンにも1品種見られた。B遺伝子はパペダ、スイートオレンジ、キンカンのそれぞれ1品種に見られた。

これらのことから、カンキツはS遺伝子を祖先に持つものと、F遺伝子を祖先に持つものがあると考えられる。FとS遺伝子から考察すると、サワーオレンジ、スイートオレンジ、ユズ、ミカン類はS遺伝子を持つ同一グループを構成し、ブンタン、レモン、ライムがFSのグループを構成する。A遺伝子を検討材料に加味すると、サワーオレンジとスイートオレンジ、ユズ、ミカンはさらに細分される。カラタチはS遺伝子の代

わりにP遺伝子を持ち、明らかにキンカン、カンキツとは別のグループに分けられる。一方、同時多発的に同一の遺伝子が突然変異によって出現する可能性が殆どないとすれば、カンキツにおいて何れの遺伝子(F, S, A, B)とも色々な分類区分に出現していることから、カンキツ類内においてかなり広い範囲に交雑が進行しているものと考えられる。

2. *Aat-2*: F遺伝子はカンキツ、キンカン、カラタチ属の種・品種全てに高い割合で認められることから、資源的な対立遺伝子であると考えられる。B遺伝子はサワーオレンジ、スイートオレンジ、ユズ、ミカン及びそれらとの雑種群に非常に高い割合で見られ、パペダ、ライム、シトロン、ブンタンには全く見られなかった。また、B遺伝子はブンタン、サワーオレンジ、スイートオレンジ及びそれらの雑種に高い割合で、一方ユズ、ミカンには低頻度で、そしてパペダ、ライム、シトロン、レモン及びキンカン属、カラタチ属には全く見られない。I遺伝子はパペダ、ライム、シトロン、レモンで高頻度に出現したが、その他の区分では雑種の3品種のみに見られた。G遺伝子はライム、レモンおよびその雑種に多く見られ、ブンタン及びその雑種、その他の雑種に数例見られた。C遺伝子はユズ、及び近縁種に特異的に見られ、ブンタン系雑種に1例見られた。H遺伝子はカラタチ、キンカン属に見られ、A, J, D遺伝子はブンタン系雑柑に少数見られた。

このように*Aat-2*では、対立遺伝子の分化が進んでおり、しかも分類学上非常に興味ある関係が明らかになった。*Aat-1*遺伝子を含め両者の主要な遺伝子の

出現を第3表に要約した。

Aat-1, *Aat-2* におけるアイソザイム対立遺伝子変異に基づき系統発生を考えると、カンキツ類は大きくシトロン群とマンダリン群の2群に別れ、平井(1986)の *Got-3* のそれを考慮に入れると、さらにシトロン群、ブンタン群およびマンダリン群の3群に分けられる。このことからカンキツはまず原始シトロンと原始マンダリンが分派し、これから原始ブンタンが出現したものと推察される。パペダ、ライム、レモン類は原始シトロンから派生した雑種群と考えられ、その成立には原始ブンタンおよび原始マンダリンの関わりが考えられる。サワーオレンジ類はブンタン類の一つとマンダリン類の一つとの雑種起源と思われる。また、スイートオレンジ類はブンタン類の一つとマンダリン類の一つとの雑種起源と思われる。ユズ類はパペダ類の一つとマンダリン類の一つとの雑種起源と言われているが、特異な対立遺伝子 *C* (*Aat-2*) を持つために原始マンダリンから派生した祖先の関与も考えられる。雑柑には以上の9種類には見られない対立遺伝子 *A*, *J*, *C* が認められ、遺伝的変異が拡大しつつあるものと思われる。なお欠失は特にユズ類、レモン類に多く見られたが、系統発生との関係は不明である。またサワーオレンジ類、ユズ類、マンダリン類および雑柑類に存在する対立遺伝子 *B* (*Aat-2*) は、日本在来カンキツに特異的なものであり、古来から日本に自生するタチバナとの関連が考えられる。また、以上の知見を取り纏め系統図を第7図に示した。ただし、ブンタンとレモンには、ユズ、ミカン、スイートオレンジ及びサワーオレンジの遺伝子 (*Aat-1* の *S*, *A*; *Aat-2* の *B*, *E*) がかなり入っていることを示しており、特にブンタンの分類については今回検討した AAT 酵素以外のアイソザイム分析による追求が必要になる。

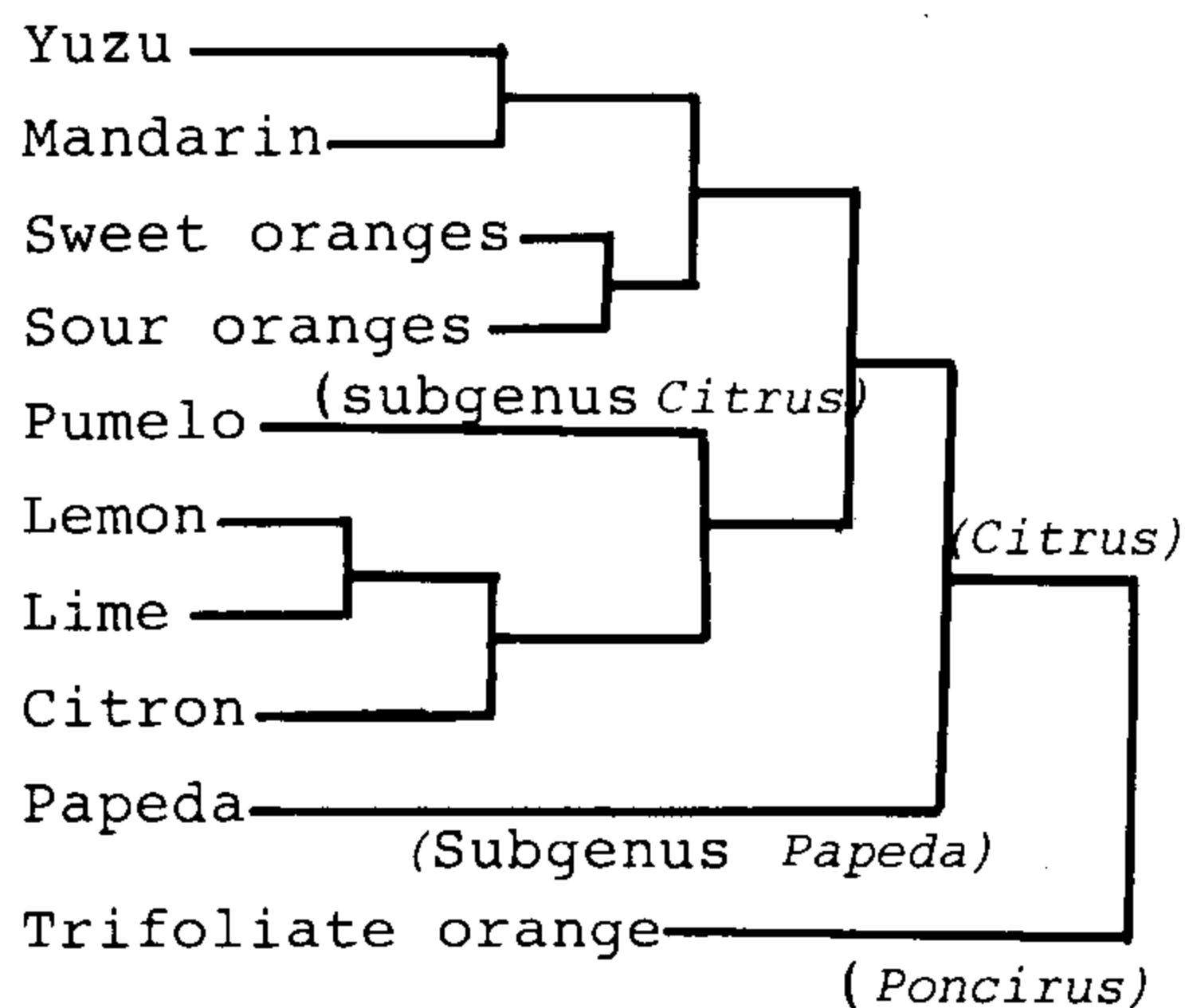


Fig. 7. Relationships within a genus *Citrus*.

AAT 酵素アイソザイムによる遺伝子分析は、カンキツの種類によって明らかな違いが認められ、種・品種の同定に必要なマーカー遺伝子としても重要であると考えられる。今後さらにその他多数の酵素においても、遺伝子分析を行うことによって分類、育種母本の選定などに有効な補助的手段として期待される。

摘 要

植物遺伝資源として収集・保存・評価およびその情報管理を進めているカンキツ類の AAT 酵素アイソザイムにおける遺伝子型の解析を行った。

Aat-1 遺伝子座に関する遺伝子は五つの遺伝子 (*F*, *S*, *A*, *B*) であり、カンキツは *S* 遺伝子を祖先に持つものと *F* 遺伝子を持つものになる。カラタチは *P* 遺伝子を持ち、カンキツ、キンカンとは異なる。

Aat-2 遺伝子座に関する遺伝子は 10 個 (*F*, *B*, *E*, *I*, *G*, *C*, *H*, *A*, *J*, *D*) 認められ、カラタチを除いて遺伝子の重複が考えられた。これらの遺伝子は種類によって異なり、マーカー遺伝子として重要である。

文 献

- Hirai, M. and I. Kozaki 1981 Isozymes of citrus leaves. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Vol. 1 : 10-13
- Hirai, M., I. Kozaki and I. Kajiura 1986 b Isozyme analysis and phylogenetic relationship of *Citrus*. *Japan. J. Breed.*, 36 : 377-389
- Soost, R. K. and A. M Toores 1981 Leaf isozymes as genetic markers in citrus. *Proc. Int. Soc. Citriculture* Vol. 1 : 7-10
- Swingle, W. T. 1948 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. Weber and L. D. Batchelor, Univ. Calif. Press, Berkeley, pp. 129-474
- Tanaka, T. 1969 Taxonomic problem of *Citrus* fruits in the Orient. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B*, 21 : 133-138
- Toores, A. M., R. K. Soost and U. Diedenhofen 1978 Isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer. J. Bot.*, 65 : 861-881

Summary

The collection, conservation, evaluation and the information management for the genetic resources of *Citrus* and its relatives were performed and the genotypes of AAT isozyme were analyzed.

The genes at *Aat-1* locus were *F*, *S*, *A*, and *B*, alleles, and there results analyzed the alleles in *Citrus* and its relatives assumed to have originated from *S* or *F* genes. *Poncirus* have *P* allele, and is different from the ancestors of *Citrus* and *Fortunella*. The genes at *Aat-2* locus were *F*, *B*, *E*, *I*, *G*, *C*, *H*, *A*, *J*, and *D* alleles, these results suggested gene duplication in *Citrus* and its relatives except for *Poncirus*.