

スギ針葉のパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝子分析

津 村 義 彦*・大 庭 喜八郎**

Genetic analysis of peroxidase isozyme in needles
of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don)

Yoshihiko Tsumura and Kihachiro Ohba

論 文 目 次

I はじめに	32	(1) S' と F' の 2 本のバンドと 胚致死遺伝子について	45
II 材料および方法	33	(2) S' と F' の 2 本のバンドを 支配するアイソザイム遺伝 子とヨレ遺伝子との独立性 の検討	49
1. 材 料	33	N 結 論	52
2. 実験方法	34	摘 要	53
III 結果および考察	37	謝 辞	53
1. 3 世代材料による遺伝子分析	37	引用文献	54
(1) S と F の 2 本のバンドにつ いて	37	Summary	56
(2) A バンドについて	39		
(3) 2 つのアイソザイム遺伝子 座の独立性の検討	41		
2. 交配および自殖家系を用いた 遺伝子分析	45		

* : 筑波大学大学院農学研究科

** : 筑波大学農林学系

I は じ め に

植物系酵素タンパクのアイソザイムを初めてゲル電気泳動法によって分離したのは、DIXON & SMITHES⁵⁾であった。しかし、酵素染色はなされていない。その後、組織化学で高度の発展を遂げた酵素染色法とゲル電気泳動法を結びつけたのは、HUNTER & MARKERT⁷⁾であり、アイソザイムという名称も1959年、MARKERT & MOLLER¹¹⁾によって与えられた。植物酵素アイソザイムの本格的な研究が始まったのは、その翌年からで、遺伝学者のSCHWARTZがトウモロコシで精力的な研究²⁶⁾を行い、アイソザイムについての遺伝学的基礎をほぼつくりあげた。

1960年代にはいり、林木の分野でもアイソザイムの研究が行われ始めた。我が国では、スギのクローン鑑定¹⁵⁾がアイソザイムを利用した最初であった。その後、天然林の家系分析²⁴⁾、クローンの同定^{8,14)}、遺伝子分析^{10,16,27,30,31)}などに利用されるようになった。特に遺伝子分析での利用は近年、益々注目されるようになってきた。それは、アイソザイム遺伝子は自然淘汰に対して中立といわれており、一旦生じたアイソザイム遺伝子は消滅する危険性が少なく、また、ほとんどのアイソザイム遺伝子座では、その対立遺伝子間に優劣関係がない(共優性)ため、表現型から遺伝子型の推定が容易であるなどの優れた点を有しているからである。

このようにアイソザイムの遺伝子分析によって検出されるアイソザイム遺伝子は、形態、色素等の形質の遺伝子と同様に標識遺伝子としての役目を果たし得る。現在までにアイソザイムを利用した遺伝子分析では、パーオキシダーゼ^{10,16,30,31)}をはじめ、複数の酵素^{1,3,4,6,13,23,27)}でアイソザイム遺伝子が報告されている。分析の対象とされた樹種は、我が国ではスギ^{10,16,31)}、ヒノキ³⁰⁾、クロマツ²⁷⁾など数種である。

また、アイソザイムは同じ個体内でも器官によって、そのパターンが異なるという器官特異性がある。そのため材料として、葉、種子(胚、胚乳)、花粉、形成層などを用いて研究が行われている。材料として葉を用いる場合は、種子を材料とする場合にくらべて、他の遺伝形質との連鎖関係までも検討できる利点がある。また、花粉や形成層を材料とする場合より、採取時期が比較的自由であり、多くの個体からサンプリングできる利点がある。これらの理由から葉のアイソザイムは遺伝子分析を行う上で有効な研究対象と考えられる。

アイソザイムを十分に活用し、遺伝育種の研究を進めていくためには、多くのアイソザイム遺伝子を検出、同定する必要がある。さらに、アイソザイム遺伝子どうしの連鎖を調べ、現在までに報告されている色素異常^{17,19)}や形態変異²²⁾などの形質遺伝子との連鎖関係を明らかにし、多くの標識遺伝子を開発して行かなければならない。

標識遺伝子を利用することにより集団の遺伝構造や集団間の遺伝的分化や伝播の経緯を明らかにすることができる。また、これらの遺伝子間の連鎖や集団内での交配様式等の解明ができ、遺伝・育種に関する多くの情報を得ることができる。

本研究はスギ(*Cryptomeria japonica* D. DON)についてパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝、

それらの遺伝子間あるいは既知の標識遺伝子との連鎖，また，それらの期待分離比の乱れから胚致死遺伝子の存在の有無等を明らかにすることを目的として実施した。

Ⅱ 材料および方法

1. 材 料

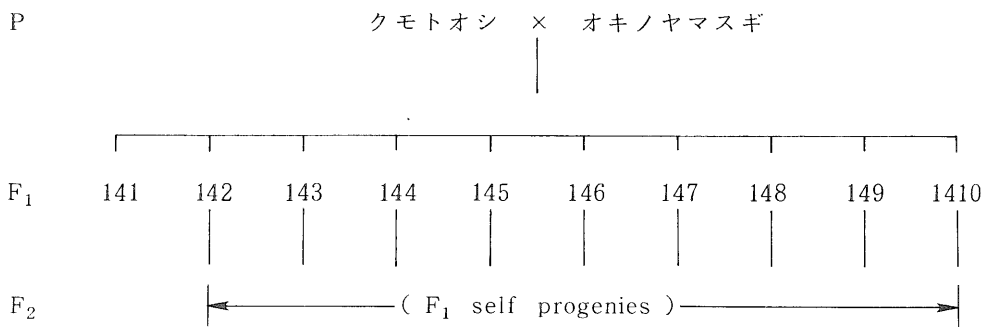
材料として，クモトオシ×オキノヤマスギの3世代材料（材料Ⅰ）およびスギ精英樹九林産42，肝付2，黄金ヨレスギ間の F_1 と自殖家系（材料Ⅱ）の二つのものを用いた。これら二つの材料は農林水産省林業試験場で別々に育成されたものであり，親木の系統が明らかで，個体数が比較的多い，などの理由でアイソザイム分析に適している。また，サンプリングは生長休止期（9月～3月）に行い，一年生の針葉を採取した。

(1) 材料Ⅰ：クモトオシ×オキノヤマスギの3世代材料

クモトオシ，オキノヤマスギとそれらの交配によって得られた F_1 10個体（さし木クローン）および F_1 の個体別自殖家系（ F_2 ）の3世代にわたる材料を用いた（図－1）。これらは農林水産省林業試験場において心材の色，樹形等の各種形質の遺伝調査を目的として育成されたものである。なお，クモトオシ，オキノヤマスギおよび F_1 はさし木の2年生苗で， F_2 は実生の2年生苗である。

(2) 材料Ⅱ：スギ精英樹九林産42，肝付2，黄金ヨレスギ間の F_1 および自殖家系

農林水産省林業試験場で遺伝調査用に育成された九林産42×黄金ヨレスギ，肝付2×黄金ヨレスギの F_1 家系および九林産42と肝付2の自殖家系（ S_1 ）である（表－1）。なお F_1 および S_1 は，いずれも実生の2年生苗である。



図－1 クモトオシ×オキノヤマスギを両親とする3世代家系図
（数字はクローン番号を示す）

Fig.－1 F_1 and F_2 families with parantages of Kumotooshi
× Okinoyama-sugi.
(Figures indicate clone numbers)

表-1 供試家系および個体数

Table-1 Investigated families and these individual number.

家	系	個体数
九林産 42 × 黄金ヨレスギ	F ₁	100
肝付 2 × 黄金ヨレスギ	F ₁	5
九林産 42 自殖家系	S ₁	149
肝付 2 自殖家系	S ₁	54

2. 実験方法

(1) 電気泳動法

アイソザイムに関する研究は、近年、著しい進歩がみられる。それは、アイソザイムを検出する手段として、ゲル電気泳動法が急速に発展したためである。ゲル電気泳動では、支持体としてデンブengel、ポリアクリルアミドゲルなどを使用した例が多い。

従来、林木の分野ではデンブengel法による研究が多く行われてきた。それは、実験操作が簡単に粗抽出液を前処理なしに泳動できるためであった。しかし、ポリアクリルアミドゲルはデンブengelより次の点で優れている。(1) 機械的強度が大で弾力性があるため取扱いが容易である、(2) 同じ処方で作られたゲルは常に同じ電気泳動性能をもつ、すなわちデンブengelのように加水分解のたびごとに最適のゲル濃度を調べる必要がない、(3) ゲルが透明で分画像がシャープである²⁾。そこで本研究ではポリアクリルアミドゲルを支持体とした平板垂直電気泳動法を用いた。

現在、植物でザイモグラム化されたアイソザイムは約40種に及んでいる。これらのアイソザイムの検出は実験に使用する材料および目的によって異なる。林木の分野ではパーオキシダーゼの研究が最も多い。それは、パーオキシダーゼが安定した酵素であり、検出が容易であるなどの理由からである。そこで本研究でもパーオキシダーゼの検出を行った。

(2) ゲルの調製

本研究の電気泳動では濃度の異なる二種類のゲルを積み重ねて使用した²⁾。上層の希薄なゲル(粗孔ゲル)は試料の濃縮に使われ、下層の濃厚なゲル(細孔ゲル)はアイソザイムの分離のために使われる。

1) 細孔ゲル(濃度7.5%, pH8.9)の調製

- 調製用原液A, B(表-2)を1:1の割合にビーカー内で混合する。
- 調製用原液C(表-2)を別のビーカーにとる。
- この(a),(b)二種類の溶液を減圧下でそれぞれ十分に脱気を行い、気泡をぬく。
- (a),(b)二種類の溶液を1:1の割合で混合する。この際、気泡が入らないように注意して

表-2 ゲル原液の調製

Table-2 Preparation of gel stock solution.

A	1N-HCl 120ml, Tris* 90.5 g, TEMED*** 0.6ml, H ₂ O to 500ml
B	Acrylamide 150g, Bis*** 4.0 g, H ₂ O to 500ml
C	Ammonium persulphate 140mg, H ₂ O to 100ml
D	Tris* 14.95 g, 1N-HCl 120ml, TEMED 1.15ml, H ₂ O to 500ml
E	Acrylamide 37.5 g, Bis*** 6.25 g, H ₂ O to 500ml
F	Riboflavin 20mg, H ₂ O to 1000ml

* : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

** : N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine

*** : N, N' - Methylene-bis(acrylamide)

行う。その後、ゲル容器(ゲル厚1mm)の上端から30mmの位置まで、この溶液を静かに注ぐ。

(e) この溶液は空気との接触を絶たないとゲル化しないため、溶液の上層に蒸留水を少量加える。この状態で約1時間放置する。

2) 粗孔ゲル(濃度3.75%, pH 6.7)の調製

(a) 調製用原液D, E, F(表-2)をそれぞれ1:2:1の割合で混合し、減圧下で脱気を行う。

(b) 細孔ゲルが完全にゲル化したのを確認したあと、加えた蒸留水を取り除き、(a)で調合した溶液で2回洗浄する。

(c) その後、(a)で調合した溶液をゲル容器の上端まで静かに注ぎ、試料溝をつくるために、サンプルコウムをさし込み、蛍光灯の光をあてて重合させる。この状態で約15分放置すると白濁し、ゲル化する。

(d) ゲル化したら、サンプルコウムをとり、試料溝の2/3までマーカーとしてのB. P. B. 溶液(表-3)を注ぐ。

(3) 試料の調製

(a) 試料として用いる針葉は生長休止期(9月~3月)のものを採取して、サンプルビンに密閉し、-25℃の冷凍庫内に保存しておく。

(b) 抽出用溶液としてEXT. 1, EXT. 2, EXT. 3, EXT. 4(表-4)をそれぞれ10:7:1

: 1の割合に混合する。

- (c) 試料の針葉を直示天秤で100mgとり、あらかじめ4℃に冷やしておいた乳鉢に入れる。さらに、(b)で調合したEXT. 1～4の混合抽出用溶液0.75mlとポリクラーラルAT 100mgを加え、すりつぶす。
- (d) すりつぶした抽出用溶液をマイクロチューブにとり、 $11752 \times g$ で5分間遠心分離を行う。
- (e) 遠心分離後、マイクロシリンジを用い、上澄液10 μ lを取り、試料溝に注入する。
- (4) 泳動操作
- (a) ゲル作製が終ったゲル容器を泳動槽にセットし、背面に4℃の冷却水が循環する冷却板を取りつける。
- (b) 泳動はゲル断面積1.38cm²当たり、18mAで約140分間行う。
- (c) B. P. B. マーカーが陽極側より5mmの位置に達したら泳動を終了する。

表-3 緩衝液の調製

Table-3 Preparation of buffer solution

(1) Buffer	Glycine 144g, Tris* 30g, H ₂ O to 5000ml
(2) B. P. B.**-Buffer	Glycine 2.88g, Tris* 0.6g, B. P. B.** 20mg, H ₂ O to 1100ml

* : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

** : Bromophenol Blue

表-4 抽出用溶液の調製

Table-4 Preparation of extraction buffer solution

EXT. 1	0.2M Tris-HCl (pH 7.5) 100ml, Glycerin 100ml, H ₂ O to 250ml
EXT. 2	Tween 80 6ml, H ₂ O to 200ml
EXT. 3	DTT* 771mg, H ₂ O to 50ml
EXT. 4	Na ₂ -EDTA*** 838mg, H ₂ O to 50ml

* : Dithiothreitol

** : Ethylenediaminetetraacetic Acid

(5) 染色

- (a) 泳動終了後、ゲルをバット(カード判サイズ)に移し、染色液(表-5)を注ぎ、60分間染色する。
- (b) 染色後、定着液として50%エタノール溶液を50ml注ぎ、約24時間放置する。この操作によりパターンは鮮明になる。

表-5 パーオキシダーゼ染色用の染色液の調製
Table-5 Preparation of peroxidase staining solution

試 薬	分 量	
(1) A. E. C. *	42 mg	Reagents are mixed in order of (1)-(4) and added 3% H ₂ O lastly.
(2) β -naphthol	29 mg	
(3) Acetone	20 ml	
(4) Tris-HCl buffer (1.25mM, pH4.0)	80 ml	
(5) 3% H ₂ O ₂	1 ml	

* : 3-Amino-9-ethylcarbazole

Ⅲ 結果および考察

1. 3世代材料による遺伝子分析

クモトオシ、オキノヤマスギおよびこれらの交配によって得られたF₁のパーオキシダーゼアイソザイムパターンを模式的に図-2に示した。分析の対象としたバンドは移動速度の遅いS(Rf: 35)と速いF(Rf: 37)の対をなす2本のバンドとA(Rf: 39)の1本のバンドである。これらのバンドはアイソザイムバンドの中で比較的、活性が高く肉眼で容易にその違いを識別できるもので、これらを写真-1に例示した。

(1) SとFの2本のバンドについて(図-2)

クモトオシはSバンドだけを保有(以下、S型と呼ぶ)していた。一方、オキノヤマスギはSとFの2本のバンドを保有(以下、SF型)していた。また、F₁10個体はS型、SF型のいずれかであった。F₁でS型であったものは、クローン番号143, 144, 145, 1410の4個体で、SF型のものは141, 142, 146, 147, 148, 149の6個体であった。

そこでF₁の中からS型、SF型それぞれ任意に3個体ずつえらび、F₂でSとFの2本のバン

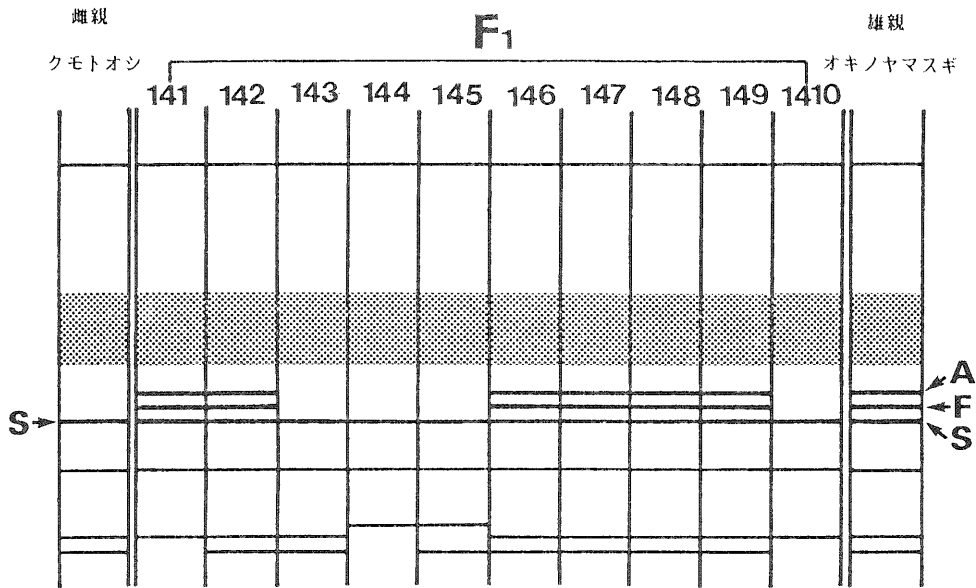


図-2 クモトオシ, オキノヤマスギおよび F_1 のパーオキシダーゼアイソザイムパターンノの模式図(数字はクローン番号を示す)

Fig. -2 Peroxidase isozyme patterns of Kumotooshi, Okinoyama-sugi and these F_1 individuals.
(Figures indicate clone numbers)

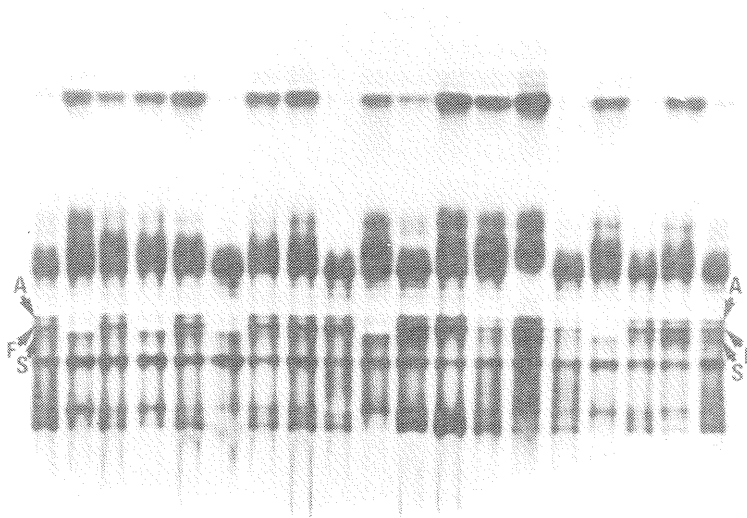


写真-1 S, FおよびAバンドの位置(例, 147 自殖家系 F_2)

Photo-1 Location of S, F and A band(ex. S_1 family of 147)

ドがどのように分離しているかを調べた。 F_1 でS型であった143, 144, 145の3個体は F_2 での分離はみられず、すべてS型であった。また、 F_1 でS F型であった142, 146, 147の3個体は F_2 でS型, S F型, F型(Fバンドだけを保有, 以下同じ)の3種のタイプに分離した(表-6)。

これらの結果から, SとFの2本のバンドは1遺伝子座の1対の対立遺伝子に支配されているとすれば, S型はホモ接合, S F型はヘテロ接合で遺伝子型はそれぞれS / S, S / Fとなる。この仮説が正しければ, F_1 でS型であった143, 144, 145の3個体の F_2 では, すべてS型で分離はしないはずであり, 観察値はすべてS型であった。また, F_1 でS F型であった142, 146, 147の3個体の F_2 では, S型:S F型:F型が1:2:1に分離するはずである。観察値は表-6のとおりで, 142, 146, 147の3個体の F_2 での期待値に対する χ^2 値はそれぞれ0.60($P=0.74$), 0.22($P=0.89$), 0.07($P=0.97$)となり, よく適合した。

以上の結果, SとFの2本のバンドは同一遺伝子座の1対の対立遺伝子に支配され, 遺伝様式はモノマー型であると推定される。また, クモトオシ, オキノヤマスギの遺伝子型はそれぞれ, S / S, S / Fと考えられる。 F_1 10 個体の遺伝子型は143, 144, 145, 1410の4個体がS/Sで, 141, 142, 146, 147, 148, 149の6個体がS / Fと考えられる(図-3)。

(2) Aバンドについて(図-2)

オキノヤマスギはAバンドを保有(以下, A型)していた。一方, クモトオシはAバンドを保有していなかった(以下, a型:nullバンド)。また, F_1 10 個体でA型のものは, 141, 142, 146, 147, 148, 149の6個体で, a型のものは, 143, 144, 145, 1410の4個体であった。

表-6 F_1 自殖家系(F_2)におけるS, Fバンドの分離

Table-6 Segregation of S and F bands in F_2 families.

家 系	F_1 の 遺伝子型	観察値			期待値			χ^2	P
		S/S	S/F	F/F	S/S	S/F	F/F		
142self	(S/F)	9	15	6	7.5	15	7.5	0.60	0.74
146self	(S/F)	13	26	15	13.5	27	13.5	0.22	0.89
147self	(S/F)	7	15	8	7.5	15	7.5	0.07	0.97

143self	(S/S)	6	0	0	6	0	0	---	---
144self	(S/S)	6	0	0	6	0	0	---	---
145self	(S/S)	6	0	0	6	0	0	---	---

S と F の二本のバンドの解析と同様に F₁ で A 型であった 142, 146, 147, a 型であった 143, 144, 145 の合計 6 個体の自殖家系 (F₂) での分離を調べた。F₁ で A 型であった 142, 146, 147 の 3 個体の F₂ では A 型 : a 型が, それぞれ 21 : 9, 42 : 12, 26 : 4 に分離した。また, F₁ で a 型であった 143, 144, 145 の 3 個体の F₂ では分離がみられず, すべて a 型であった (表-7)。

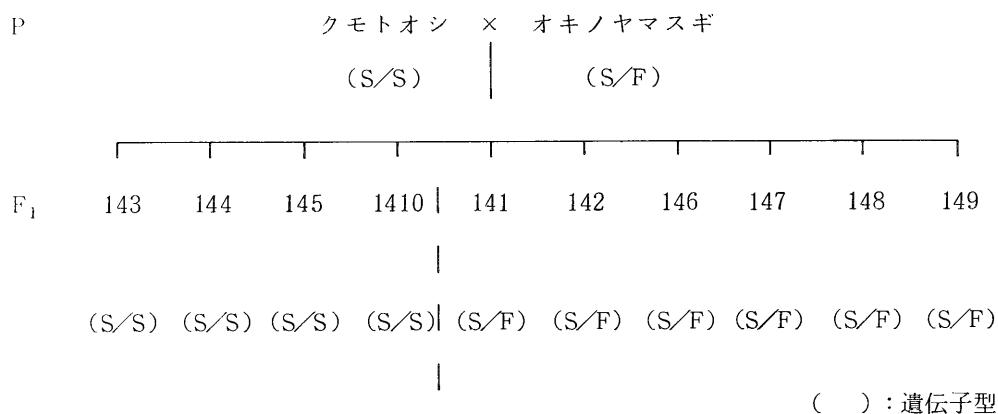


図-3 クモトオシ, オキノヤマスギおよび F₁ の遺伝子型
(数字はクローン番号を示す)

Fig. -3 Genotype of Kumotooshi, Okinoyama-sugi and these F_1 (Figures indicate clone numbers)

表-7 F_1 自殖家系 (F_2) におけるAバンドの分離
Table-7 Segregation of active band A and non-active band a in F_2 families.

家 系	F ₁ の 遺伝子型	観察値		期待値		χ^2	P
		A型	a型	A型	a型		
142self	(A/a)	21	9	22.5	7.5	0.40	0.5-0.7
146self	(A/a)	42	12	40.5	13.5	0.25	0.5-0.7
147self	(A/a)	26	4	22.5	7.5	2.18	0.1-0.2

143self	(a/a)	0	6	0	6	---	---
144self	(a/a)	0	6	0	6	---	---
145self	(a/a)	0	6	0	6	---	---

これらの結果から、Aバンドの有無は1遺伝座の1対の対立遺伝子に支配されていると仮定した。すなわち F_1 でA型であった個体の遺伝子型はヘテロ接合の A/a 、 F_1 でa型であった個体の遺伝子型はホモ接合の a/a と考えられる。この仮説が正しければ、 F_1 でA型であった個体の F_2 では、遺伝子型が $A/A : A/a : a/a$ が、それぞれ1:2:1に分離し、表現型の期待分離比はA型(A/A , A/a):a型(a/a)が3:1となるはずである。観察値は表-7のとおりで、142, 146, 147の3個体の F_2 での期待値に対する χ^2 値は、それぞれ0.40 ($P=0.5 \sim 0.7$)、0.25 ($P=0.5 \sim 0.7$)、2.18 ($P=0.1 \sim 0.2$) となり、仮説は棄却されなかった。また、 F_1 でa型であった個体の F_2 では分離がみられず、すべてa型となるはずである。 F_1 でa型であった143, 144, 145の F_2 3家系とも分離はみられず、すべてa型であった。

これら F_1 10個体の遺伝子型頻度、 F_2 における分離から、Aバンドの有無は1遺伝子座の1対の対立遺伝子によって支配されていると推定される。また、オキノヤマスギ、クモトオシの遺伝子型は、それぞれ A/a 、 a/a 、 F_1 10個体の遺伝子型は143, 144, 145, 1410の4個体が a/a で、141, 142, 146, 147, 148, 149の6個体が A/a であると考えられる(図-4)。

(3) 2つのアイソザイム遺伝子座の独立性の検討

S, F, Aの3本のバンドの有無の組合わせをみると、オキノヤマスギはS, F, A3本のバンドを保有(以下, SFA型)し、クモトオシはSバンドだけを保有(以下, Sa型)した。 F_1 6個体では、143, 144, 145がSa型で、142, 146, 147がSFA型であった(図-4)。Sa型3個体の F_2 は、すべてSa型で分離はみられなかった。一方、SFA型3個体の F_2 は、表-8のように分離した。

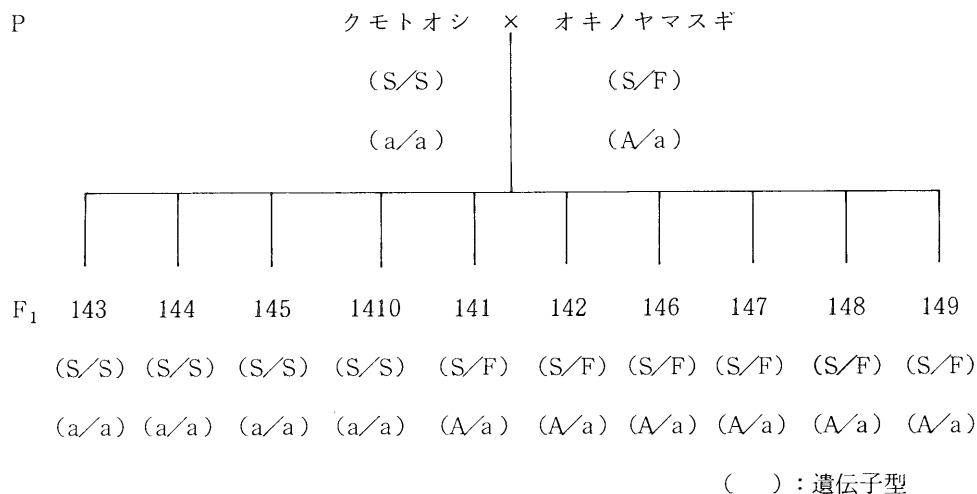


図-4 クモトオシ、オキノヤマスギおよび F_1 の遺伝子型
(数字はクローン番号を示す)

Fig. -4 Genotype of Kumotooshi, Okinoyama-sugi and these F_1 . (Figures indicate clone numbers)

もし、S、F 2本のバンドを支配する遺伝子とAバンドを支配する遺伝子が独立しているならば、142, 146, 147のF₂では、遺伝子型が表-9のように分離し、表現型の期待分離比はSA型 : Sa型 : SFA型 : SFa型 : FA型 : Fa型がそれぞれ3 : 1 : 6 : 2 : 3 : 1となるはずである。しかし、観察値ではSFa型、Fa型はあらわれなかった。 χ^2 検定の結果、142, 146, 147のF₂で、それぞれ39.60(P<0.01), 44.42(P<0.01), 12.76(P<0.05)となり、3家系とも有意であった(表-8)。

 表-8 F₂でのS、FおよびAバンドの分離

 Table-8 Segregation of S, F and A bands in F₂ families.

家系	遺伝子型	SA型	Sa型	SFA型	SFa型	FA型	Fa型	χ^2	P
142self	SFAa	0	9	15	0	6	0	39.60	<0.01
146self	SFAa	1	12	26	0	15	0	44.42	<0.01
147self	SFAa	3	4	15	0	8	0	12.76	<0.05
143self	SSaa	0	6	0	0	0	0	---	---
144self	SSaa	0	6	0	0	0	0	---	---
145self	SSaa	0	6	0	0	0	0	---	---

表-9 両遺伝子座が独立の場合の遺伝子型および表現型の分離

 Table-9 Segregation of genotypes and phenotypes in F₂ family, in case of both loci are independent each other.

♀ \ ♂	SA	Sa	FA	Fa
SA	SSAA	SSAa	SFAA	SFAa
Sa	SSAa	SSaa	SFAa	Sfaa
FA	SFAA	SFAa	FFAA	FFAa
Fa	SFAa	Sfaa	FFAa	Ffaa

SA型 Sa型 SFA型 SFa型 FA型 Fa型
3 : 1 : 6 : 2 : 3 : 1

以上のことから、両遺伝子座は独立ではなく、連鎖していると考えられる。連鎖している場合の遺伝子の配列を図-5に示した。また、完全連鎖ならば F_1 で S F A 型であった 142, 146, 147 の3個体の F_2 では、S a 型、S F A 型、F A 型だけであらわれるはずである。しかし、146, 147 の F_2 では、S A 型の個体が、それぞれ1個体と3個体認められた。S A 型のAバンドは濃度が極めて低く、判読しにくいと判読を誤った可能性もあるが、もし判読の誤りでなければ、両遺伝子座間で組換えが起こっていることになる。組換えが起こっている場合の組換え価は142, 146, 147 の F_2 3家系を合計して、連鎖の強度計算法¹²⁾をもとにして求めてみた。

まず、遺伝子FとAとの組換え価を p_1 (花粉), p_2 (卵) として、組換え価と交配モデルとの関係を表-10に示した。これをもとに F_2 の表現型の期待確率を求めた(表-11)。ただし、ここでは $P = (1 - p_1)(1 - p_2)$ とする。

表-11のような F_2 の期待確率と組換え価のモデルが設定できれば、最尤法により P の推定値を得るための方程式が得られる²¹⁾。すなわち、対数尤度方程式を L とすると、

$$L = a_1 \log [(1-P)/4] + a_2 \log (P/4) + a_3 \log [(1-\sqrt{P}+P)/2] \\ + a_4 \log [(\sqrt{P}-P)/2] + a_5 \log [(2\sqrt{P}-P)/4] + a_6 \log [(1-2\sqrt{P}+P)/4]$$

となる。これを最大にする P は $dL/dP = 0$ によって得られる。実際に、これを計算して得られた方程式を表-11中に示した。ここで組換え価 p は、花粉、卵での組換え価 p_1, p_2 に差がない

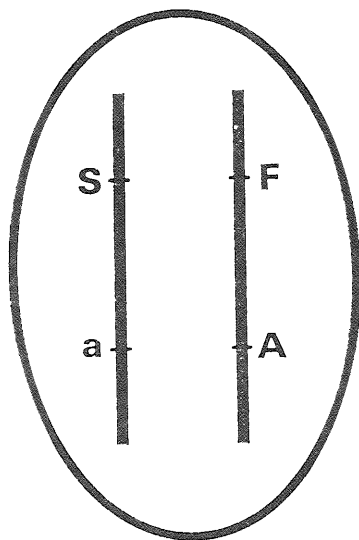


図-5 二対の対立遺伝子が連鎖している場合の遺伝子の配列

Fig. -5 Gene arrangement of two alleles supposed to be linked.

ものとして、得られた方程式を用いて実際の組換え価を算出したところ、 $p = 0.039$ という結果であった。

表-10 遺伝子型 SFAa の自殖家系 F_2 における組換え面と各遺伝子型の期待頻度

Table-10 Expected recombination values and frequency of each genotype in a selfed family of genotype SFAa.

♀ \ ♂	SA (1/2) p_1	Sa (1- p_1)	FA (1- p_1)	Fa p_1
SA(1/2) p_2	(1/4) SSAA $p_1 p_2$	SSAa $p_2(1-p_1)$	SFAA $p_2(1-p_1)$	SFAa $p_1 p_2$
Sa (1- p_2)	SSAa $p_1(1-p_2)$	SSaa (1- p_1)(1- p_2)	SFAa (1- p_1)(1- p_2)	SFa a $p_1(1-p_2)$
FA (1- p_2)	SFAA $p_1(1-p_2)$	SFAa (1- p_1)(1- p_2)	FFAA (1- p_1)(1- p_2)	FFAa $p_1(1-p_2)$
Fa p_2	SFAa $p_1 p_2$	SFa a $p_2(1-p_1)$	FFAa $p_2(1-p_1)$	FFa a $p_1 p_2$

p_1 : 花粉における組換え価
 p_2 : 卵における組換え価

表-11 遺伝子型 SFAa の自殖家系 F_2 における表現型とその期待確率

Table-11 Phenotypes and these expected probability in a selfed family of genotype SFAa.

遺伝子型	表現型	表現型の期待確率	実頻度
SSAA } SSAa }	SA型	$(1-P)/4$	a_1
SSaa	Sa型	$P/4$	a_2
SFAA } SFAa }	SFA型	$2(1-\sqrt{P}+P)/4$	a_3
SFaa	SFa型	$(\sqrt{P}-P)/2$	a_4
FFAA } FFAa }	FA型	$(2\sqrt{P}-P)/4$	a_5
FFaa	Fa型	$(1-2\sqrt{P}+P)/4$	a_6
合 計		1	

P の推定値を得るための方程式

$$B_0Q^5+B_1Q^4+B_2Q^3+B_3Q^2+B_4Q+B_5=0$$

$$Q=\sqrt{P}$$

$$B_0=-2a_1-2a_2-2a_3-2a_4+2a_5-2a_6$$

$$B_1=4a_1+4a_2+5a_3+5a_4-6a_5+6a_6$$

$$B_2=-2a_1-2a_4+6a_5-4a_6$$

$$B_3=-2a_1-2a_2-5a_3-2a_4-4a_5-2a_6$$

$$B_4=4a_1+4a_2+2a_3+5a_4+6a_6$$

$$B_5=-2a_1-2a_4-4a_6$$

2. 交配および自殖家系を用いた遺伝子分析

(1) S' と F' の 2 本のバンドと胚致死遺伝子について

九林産 42 × 黄金ヨレスギの F_1 家系および肝付 2 × 黄金ヨレスギの F_1 家系のアイソザイムパターンを模式的に図-6 に示した。分析の対象としたアイソザイムバンドは図-6, 写真-2 中に示した S' (Rf: 25) と F' (Rf: 27) の 2 本のバンドである。

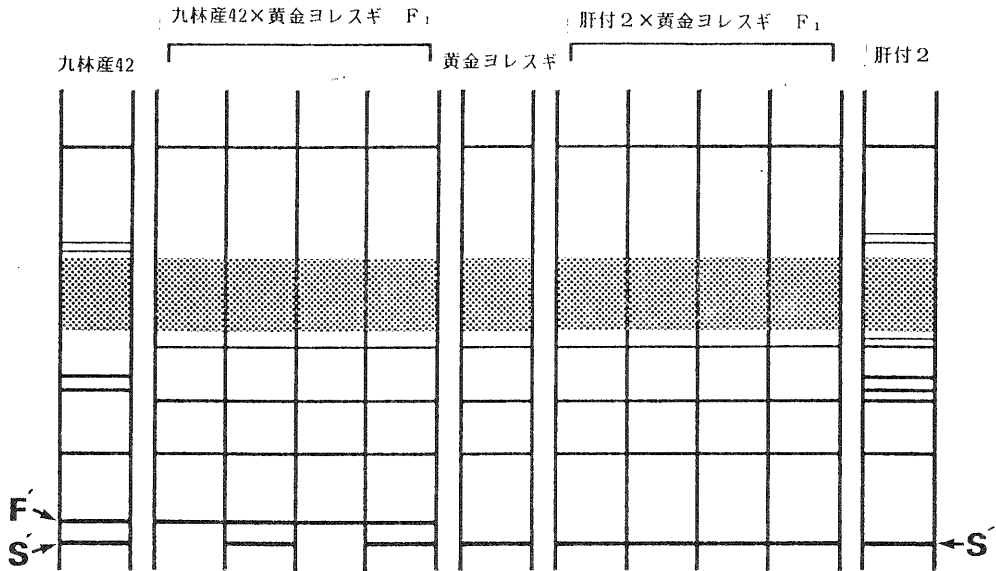


図-6 九林産 42, 肝付 2, 黄金ヨレスギ, および F_1 の
パーオキシダーゼアイソザイムパターンノ模式図

Fig. -6 Peroxidase isozyme patterns of Kyurinsan 42,
Kimotsuki 2, Oogonyore-sugi and these F_1 .

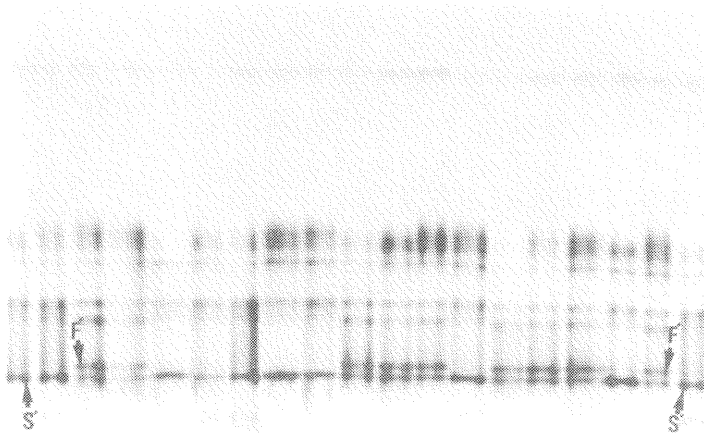


写真-2 S' および F' バンドノ位置(例, 九林産 42 の
自殖家系 S_1)

Photo-2 Location of S' and F' bands (ex. S_1 family of
Kyurinsan 42)

九林産 42 は S'F' 型, 肝付 2 および黄金ヨレスギは S' 型であった。また, 九林産 42 × 黄金ヨレスギの F₁ 家系では S'F' 型と S' 型に分離し, その分離比は約 1 : 1 であった。肝付 2 × 黄金ヨレスギの F₁ 家系では, すべて S' 型で分離はみられなかった(表-12)。これらの結果から, S' と F' の 2 本のバンドは 1 遺伝子座の 1 対の対立遺伝子に支配されていると仮定した。すなわち九林産 42 は, ヘテロ接合の S'/F', 肝付 2, 黄金ヨレスギの遺伝子型は, ホモ接合の S'/S' と考えられる。この仮説が正しければ, 九林産 42 × 黄金ヨレスギの F₁ の遺伝子型は S'/F' : S'/S' が 1 : 1 に分離し, 表現型の期待分離比も S'F' 型 : S' 型が 1 : 1 になるはずである。観察値を期待値にもとづいて χ^2 検定を行うと, 0.64 (P = 0.42) となり, 棄却されなかった。また, 肝付 2 × 黄金ヨレスギの F₁ 家系では, 分離がおこらず, すべて S'/S' の遺伝子型となり, 表現型もすべて S' 型となるはずである。F₁ 家系の観察値は期待値と一致した(表-12)。

また, 肝付 2 の遺伝子型が S'/S' であるならば, 自殖家系では, すべて S' 型となり分離しないことになる。観察値は期待値どおりの結果で仮説を裏づけるものであった。次に九林産 42 の遺伝子型が S'/F' であるならば, その自殖家系では S' 型 : S'F' 型 : F' 型がそれぞれ 1 : 2 : 1 に分離するはずである。しかし, 観察値は S' 型 : S'F' 型 : F' 型が 0 : 105 : 44 に分離し, 期待値に合わない結果であった(表-12)。そこで, 九林産 42 の S' 遺伝子の近傍に胚致死遺伝子(ℓ)が連鎖していると仮定した。樹木の胚致死遺伝子に関する報告は, SORENSEN^{28,29)} のものや, スギでは大庭ら^{9,18,20)} のものがある。そこで, もし胚致死遺伝子が関与しているならば, 九林産 42 での S', F' 遺伝子と胚致死遺伝子(ℓ)の配列は S' ℓ /F'L (図-7) と考えられる。九林産 42 の自殖家系での遺伝子型の期待分離比は S'S' $\ell\ell$: S'F'L ℓ : F'F'LL が, それぞれ 1 : 2 : 1 となるはずである。ただし, 胚致死遺伝子(ℓ)が S' 遺伝子のごく近くにあれば, ホモ接合型で致死であるから, 遺伝子型 S'S' $\ell\ell$ の個体は現れず, S'F'L ℓ と F'F'LL の個体が 2 : 1 の比で現れることになる。観察値をこの 2 : 1 の期待値に基づいて χ^2 検定を行ったところ, 0.97 (P = 0.3 ~ 0.5) となり, 棄却されなかった。

表-12 S', F' バンドの分離

Table-12 Segregation of S' and F' bands.

家	系	観 察 値			期 待 値			χ^2	P
		S'S'	S'F'	F'F'	S'S'	S'F'	F'F'		
九林産 42 × 黄金ヨレスギ (F ₁)		46	54	0	50	50	0	0.64	0.42
肝 付 2 × 黄金ヨレスギ (F ₁)		5	0	0	5	0	0	—	—
九林産 42 self (S ₁)		0	105	44	37.25	74.5	37.25	50.79	0.01 >
肝 付 2 self (S ₁)		54	0	0	54	0	0	—	—

しかし、 $S'F'$ 型： F' 型が 2.39 : 1 に分離したのは、本来 2 : 1 に分離するはずのものが実験誤差によって、ずれが生じたのか、あるいは、本来、他の分離比になるのか明白ではない。そこで、このことについてさらに検討を加えてみた。

このずれを検討するために AIC (Akaike Information Criterion)²⁵⁾ による検定を行った (表-13)。この検定方法を用いた報告は、林木育種の分野では、河崎・大庭⁹⁾ によってなさ

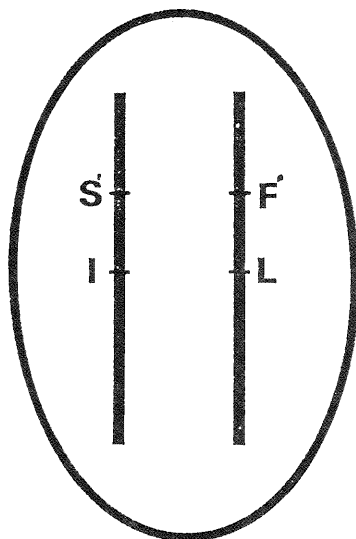


図-7 致死遺伝子を想定した場合の遺伝子配列

l : 劣性胚致死遺伝子 (ホモ型で致死)
 L : l の対立遺伝子 (正常)

Fig. -7 Gene arrangement when embryonic lethals are supposed to be linked.

l : recessive embryonic lethal gene
 L : normal gene

表-13 致死遺伝子を想定した3種類の期待分離比に対する χ^2 値及び AIC の値

Table-13 χ^2 and AIC vales for three expected when a lethal gene is supposed.

家 系	$S'S'^*$	$S'F'$	$F'F'$	(1) $\chi^2_{2:1}$	(2) $\chi^2_{3:1}$	(3) $AIC_{2:1}$	(4) $AIC_{3:1}$	(5) AIC_0
九林産42 S ₁	0	105	44	0.97	1.46	181.826	182.407	182.836

(1), (3) $SS':SF':FF'=0:2:1$ の場合
 (5) 制約のないモデルの場合

(2), (4) $SS':SF':FF'=0:3:1$ の場合
 * : 致死個体

れ、棄却検定である χ^2 検定より、積極的により適切なモデルを抽出できるものとして、有効であるといわれている。AIC は、その値が最小となるモデルが最適のモデルとして支持される。

S' F' 型の個体数： a_1 ，F' 型の個体数： a_2 ， $n = a_1 + a_2$ ， $a_1 = 105$ ， $a_2 = 44$ ， $n = 149$

(a) 2 : 1 を想定したモデルにおける AIC

$$L_{2:1} = a_1 \log 2/3 + a_2 \log 1/3$$

$$AIC_{2:1} = -2 L_{2:1} = 181.826$$

(b) 3 : 1 を想定したモデルにおける AIC

$$L_{3:1} = a_1 \log 3/4 + a_2 \log 1/4$$

$$AIC_{3:1} = -2 L_{3:1} = 182.407$$

(c) 制約のないモデルにおける AIC

$$L_0 = a_1 \log a_1/n + a_2 \log a_2/n$$

$$AIC_0 = -2 L_0 + 2 = 182.836$$

その結果、3つのモデルの中で(a)の2 : 1のモデルが最適モデルとして支持された。

また、九林産 42 の自殖家系で S' 型が現れなかったのは、調査に用いた個体数が少なかったためとも考えられる。そこで、前述のⅢ章(3)と同様に組換え価を考慮してモデルを設定した。

まず、遺伝子 S' と 1 の組換え価を p_1 (花粉)， p_2 (卵) として組換え価と交配モデルとの関係を表－14 に示した。これをもとに表現型とその期待確率を求めた (表－15)。ただし、ここでは $P = p_1 p_2$ とする。

表－15 のように九林産 42 の自殖家系の期待確率と組換え価のモデルが設定されれば、最尤法により P の値を得るための方程式が得られる²¹⁾。すなわち対数尤度方程式を L とすると、

$$L = a_1 \log [\sqrt{P} (2 - \sqrt{P}) / 3] + a_2 \log [2 (1 - \sqrt{P} + P) / 3] + a_3 \log [(1 - P) / 3]$$

となる。これを最大にする P は $dL/dP = 0$ によって得られる。実際に計算して得られた方程式を表－15 中に示した。ここで、組換え価 p は、花粉、卵での組換え価 p_1 ， p_2 に差がないものとして、実際の組換え価を算出した。その結果、組換え価 $p = 0$ と推定され、S' 遺伝子の極めて近くに胚致死遺伝子が存在すると考えられる。従って、さらに個体数を増やしても、S' 型が出現する可能性が極めて低いと考えられる。

以上のことから S' と F' 2 本のバンドを支配する対立遺伝子が存在するものと考えられ、九林産 42 では S' 遺伝子と密接に連鎖した胚致死遺伝子の存在を推定できた。

(2) S' と F' の 2 本のバンドを支配するアイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子との独立性の検討

九林産 42 × 黄金ヨレスギの F_1 家系を用いて、アイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子との独立性を検討した。九林産 42 は胚致死遺伝子を想定して検出したアイソザイム遺伝子をヘテロ接合型の S'/F' で保有している。また、黄金ヨレスギは、このアイソザイム遺伝子をホモ接合型の S'/S' でもっている。さらに、この黄金ヨレスギは、針葉がねじれるヨレ優性遺伝子(T)²²⁾をヘテロ

接合型の Tt で保有している。そこで、九林産 42 と黄金ヨレスギの遺伝子型は、それぞれ $ttS'F'$ 、 $TtS'S'$ と表すことができる。

F_1 家系でのヨレ型、正常型、 S' 型、 $S'F'$ 型の分離を表-16 に示した。アイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子が独立であるならば、 F_1 家系ではヨレ・ S' 型 ($TtS'S'$) : ヨレ・ $S'F'$ 型 ($TtS'F'$) : 正常・ S' 型 ($ttS'S'$) : 正常・ $S'F'$ 型 ($ttS'F'$) が $1:1:1:1$ に分離するはずである。観察値を期待値に基づいて χ^2 検定したところ、棄却されなかった。この結果並びに AIC による検定の結果 (表-17) から、アイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子は独立であることが明らかになった。

表-14 九林産 42 の自殖家系における組換え面と各遺伝子型の期待頻度

Table-14 Recombination vales and expected frequency of each genotype in S_1 family of Kyurinsan 42.

δ ♀	$S'\ell$ (1/2)(1-p ₁)	$S'L$ p ₁	$F'\ell$ p ₁	$F'L$ (1-p ₁)
$S'\ell(1/2)$ (1-p ₂)	(1/4) $S'S'\ell\ell$ (1-p ₁)(1-p ₂)	$S'S'L\ell$ p ₁ (1-p ₂)	$S'F'\ell\ell$ p ₁ (1-p ₂)	$S'F'L\ell$ (1-p ₁)(1-p ₂)
$S'L$ p ₂	$S'S'L\ell$ p ₂ (1-p ₁)	$S'S'LL$ p ₁ p ₂	$S'F'L\ell$ p ₁ p ₂	$S'F'LL$ p ₂ (1-p ₁)
$F'\ell$ p ₂	$S'F'\ell\ell$ p ₂ (1-p ₁)	$S'F'L\ell$ p ₁ p ₂	$F'F'\ell\ell$ p ₁ p ₂	$F'F'L\ell$ p ₂ (1-p ₁)
$F'L$ (1-p ₂)	$S'F'L\ell$ (1-p ₁)(1-p ₂)	$S'F'LL$ p ₁ (1-p ₂)	$F'F'L\ell$ p ₁ (1-p ₂)	$F'F'LL$ (1-p ₁)(1-p ₂)

p₁ : 花粉における組換え価

p₂ : 卵における組換え価

表-15 九林産42の自殖家系 S_1 における表現型とその期待確率

Table-15 Phenotypes and these expected probability in S_1 family of Kyurinsan 42.

遺 伝 子 型	表 現 型	表現型の期待確率	致死個体を除いた 場合の期待確率	実 頻 度
$S'S'LL$] $S'S'L\ell$]	S' 型	$(2\sqrt{P}-P)/4$	$(2\sqrt{P}-P)/3$	a_1
$S'F'LL$] $S'F'L\ell$]	S'F'型	$2(1-\sqrt{P}+P)/4$	$2(1-\sqrt{P}+P)/3$	a_2
$F'F'LL$] $F'F'L\ell$]	F' 型	$(1-P)/4$	$(1-P)/3$	a_3
小 計		3/4	1	
$S'S'\ell\ell$] $S'F'\ell\ell$] $F'F'\ell\ell$]	致 死	1/4	Pの推定値を得るための方程式 $B_0Q^5+B_1Q^4+B_2Q^3+B_3Q^2+B_4Q+B_5=0$ $Q=\sqrt{P}$ $B_0=a_1+a_2+a_3$ $B_1=-2a_1-3a_2-3a_3$ $B_2=a_1+a_2+3a_3$ $B_3=a_1+3a_2-2a_3$ $B_4=-2a_1-2a_2$ $B_5=a_1$	
合 計		1		

表-16 ヨレ, 正常型, S' 型および S' F' 型の分離

Table-16 Segregation of needle phenotypes (twist of normal) and isozyme phenotypes

家系	観 察 値				期 待 値				χ^2	P
	ヨレ型		正常型		ヨレ型		正常型			
	$S'S'$	$S'F'$	$S'S'$	$S'F'$	$S'S'$	$S'F'$	$S'S'$	$S'F'$		
九林産42×黄金 ヨレスギ(F ₁)	20	32	26	22	25	25	25	25	3.36	0.34

表-17 アイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子との独立性
の検討 (AICによる検定)

 Table-17 Linkage analysis of isozyme locus and a
dominant gene which resulted in a pheno-
type of twisted needles used by AIC.

<u>ヨレS'型</u>	<u>ヨレS'F'型</u>	<u>正常S'型</u>	<u>正常S'F'型</u>		
a_1	a_2	a_3	a_4	AIC_L	AIC_0
20	32	26	22	277.259	279.971
$n = a_1 + a_2 + a_3 + a_4 = 100$					
(1) 独立を想定したモデルにおけるAIC					
$L_L = a_1 \log 1/4 + a_2 \log 1/4 + a_3 \log 1/4 + a_4 \log 1/4$					
$AIC_L = -2L_L = 277.259$					
(2) 制約のないモデルにおけるAIC					
$L_0 = a_1 \log(a_1/n) + a_2 \log(a_2/n) + a_3 \log(a_3/n) + a_4 \log(a_4/n)$					
$AIC_0 = -2L_0 + 6 = 279.971$					

IV 結 論

3世代材料を用いた調査では、S(Rf:35)とF(Rf:37)の2本のバンドを支配するモノマー型の1対の対立遺伝子と、Aバンド(Rf:39)の有無を支配する1対の対立遺伝子の存在が明らかになった。また、これらの2つの遺伝子座が連鎖していることもわかった。交配、自殖家系を用いた調査では、胚致死遺伝子を想定して新たに遺伝子を検出することができた。九林産42の自殖家系での分離比がメンデルの法則に従わなかったのは、胚致死遺伝子が原因であると考えられる。今後、九林産42の自殖家系でS'F'型であったものをさらに自殖し調査を続ければ、胚致死遺伝子の影響でS'型が現れず、分離比が乱れるものかどうかが明白になるはずである。また、胚致死遺伝子を想定して検出されたアイソザイム遺伝子とヨレ遺伝子とが独立であることが明らかとなった。

本研究で明らかになった3対の対立遺伝子は現在までに報告されている色素異常、形態変異およびアイソザイムなどの標識遺伝子と同様に標識遺伝子としての役目を果たせるものと考えられる。今後、これらを利用することで、自然集団の遺伝的構造や在来品種の交配様式などの解明に役立つものと考えられる。

摘 要

スギのパーオキシダーゼアイソザイム遺伝子の検出を目的として、クモトオシとオキノヤマスギの3世代材料及びスギ精英樹九林産42，肝付2と黄金ヨレスギ間の交配 F_1 家系と九林産42，肝付2の自殖家系を供試し研究を行った。3世代材料は両親，その F_1 家系， F_1 の個体別自殖による F_2 家系をまとめた呼び名であり，樹形，心材の色等の遺伝調査を目的として，林業試験場において養成したものである。また，黄金ヨレスギはヨレスギと黄金スギを交配したものである。ヨレスギは針葉がよれる性質があり，それは主働遺伝子に支配されている。黄金スギは春に芽が白化または黄白化する性質があり，この遺伝様式は父性遺伝である。

パーオキシダーゼアイソザイムの検出はポリアクリルアミドゲルを支持体とした平板垂直電気泳動法により行い，7.5%分離ゲル，3.75%濃縮ゲルを用いた。分析に用いた針葉は -25°C の冷凍庫内で保存し，随時，実験に供試した。電気泳動は 4°C ， $18\text{ mA} / 1.38\text{ cm}^2$ で140分間行った。

3世代材料を用いた遺伝子分析では， $S(Rf:35)$ 及び $F(Rf:37)$ (Rf 値の異なるバンドの記号表示)の2本のバンドを支配するモノマー型の1対の対立遺伝子と， A バンド($Rf:39$)の有無を支配する1対の対立遺伝子を検出した。また，これら2つの遺伝子座は連鎖していることが明らかになり，その組換え価は0.039と推定された。

九林産42，肝付2にそれぞれ黄金ヨレスギを交配した F_1 家系で $S'(Rf:25)$ ， $F'(Rf:27)$ 2本のバンドが1対の対立遺伝子支配であることが明らかになった。九林産42は S'/F' のヘテロ接合，肝付2及び黄金ヨレスギは S'/S' のホモ接合であった。また，この遺伝子とヨレスギ優性遺伝子とは連鎖していなかった。九林産42では $S'(Rf:25)$ と $F'(Rf:27)$ の分離は期待分離から大きくずれ， S' を支配する遺伝子の極めて近傍に単一劣性の胚致死遺伝子が存在するものと推定した。

謝 辞

本研究の実施及びとりまとめに際しては，筑波大学農林学系花田毅一教授，同陣内巖名誉教授，同菊池文雄教授，同赤羽武教授，同海上道雄教授，同内田煌二講師，同中村徹助手から終始御懇切な御指導，御鞭撻と，さらには詳細にわたる御校閲，御助言を賜った。農林水産省林業試験場造林部（現林野庁関東林木育種場）河崎久男博士からは試験材料の提供していただき，とりまとめの際には御指導，御配慮，御助言をいただいた。また，農林水産省林業試験場造林部白石進博士には同位酵素実験技術について御指導を賜った。上記の各位に対し，心から感謝申し上げる。

引用文献

- 1) ADAMS, W. T. & JOLY, R. J. : Genetic of allozym variants in loblolly pine. J. Hered., 71:33-40, 1980.
- 2) 青木幸一郎・永井裕：最新電気泳動法. 671pp 廣川書店, 東京, 1978.
- 3) CONKLE, M. T. : Isozyme specificity during germination and early growth of knobcone pine. Forest Sci., 17:494-498, 1971a.
- 4) CONKLE, M. T. : Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. Forest Sci., 17:190-194, 1971b.
- 5) DIXON, G. H. & SMITHES, O. : Zone electrophoresis of cabbage enzyme in starch gels. Biochem. Biophys. Acta, 23:198-199, 1957.
- 6) GURIES, R. P. & LEDIG, F. T. : Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus Rigida* MILL). Heredity, 40(1):27-32, 1978.
- 7) HUNTER R. L. & MARKERT, C. L. : Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis in starch gels. Science, 125:1294-1295, 1957.
- 8) 川述公弘：ヒノキ産地別実生苗の Peroxidase Isozyme について. 86 回日林講：171-172, 1975.
- 9) 河崎久男・大庭喜八郎：黄金ヨレスギの自殖家系 (S_1) の自殖による胚致死遺伝子の検出. 95 回日林講：335-336, 1984.
- 10) 黒丸亮・河崎久男・大庭喜八郎：ヨレスギ自殖家系幼苗におけるパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝子分析. 日林誌, 65:73-81, 1983.
- 11) MARKERT, C. L. & MOLLER, F. : Multiple form of enzymes, tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. N. A. S., 45:753-763, 1959.
- 12) MATHER, K. : The measurement of linkage in heredity. Methuen, London, 1963 (Rep.)
- 13) MITTON, J. B., LINHART, Y. B., STURGEON, K. B. & HAMRIK, J. L. : Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. J. Hered. 70:86-89, 1979.
- 14) 宮崎安貞：スギのアイソザイムの遺伝的変異. 遺伝, 34(6):23-28, 1980.
- 15) 宮崎安貞・酒井寛一：パーオキシダーゼアイソザイムによるスギ・クローン品種の鑑定. 日林誌, 51(9):235-239, 1969.
- 16) 西村慶二・金光隆義：スギパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝子分析. 90 回日林論：265-266, 1979.
- 17) 大庭喜八郎：ヒノキ葉緑素変異の遺伝. 日林誌, 54(2):56-58, 1972.

- 18) 大庭喜八郎: スギの胚致死遺伝子の検出. 90 回日林論: 257-258, 1979.
- 19) 大庭喜八郎・岩川盈夫・岡田幸郎・村井正文: アカマツ葉緑素変異苗の発生ひん度による自然自殖率の推定および葉緑素変異苗の遺伝. 日林誌, 53(10): 327-333, 1971.
- 20) 大庭喜八郎・河崎久男・福原梢勝: ヨレスギおよび F_1 の自殖, もどし交配による胚致死遺伝子の検出. 92 回日林論: 279-280, 1981.
- 21) 大庭喜八郎・河崎久男・栗延晋: 林木の集団遺伝. 林業試験場業務報告資料(昭和58年度): 140-178, 1983.
- 22) 大庭喜八郎・前田武彦・福原梢勝: ヨレスギの遺伝およびヨレ遺伝子と白子, ミドリスギの両劣性遺伝子との連鎖. 日林誌, 56(8): 276-281, 1974.
- 23) RUDIN & ENBERG: Linkage studies in *Pinus Sylvestris* L. using macro game - tophyte allozymes. *Silvae Genet.*, 27: 1-12, 1978.
- 24) 酒井寛一・朴竜求・宮崎安貞: スギ天然林における遺伝的分化. 日林講: 148-150, 1970
- 25) 坂本慶行・石黒真木夫・北川源四郎: 情報量統計学. 236pp 共立出版, 東京, 1983.
- 26) SCHWARTZ, D.: Genetic studies on mutant enzyme: Synthesis of hybrid enzyme by heterozygotes. *Proc. N.A.S.*, 46: 1210-1215, 1960.
- 27) 白石進・上中久子: クロマツ雌性配偶体アイソザイムの遺伝様式. 林試九支年報: 33, 1981.
- 28) SORENSEN, F.: Linkage between marker genes and embryonic lethal factor may cause disturbed segregation ratios. *Silvae Genet.*, 16: 132-134, 1967.
- 29) SORENSEN, F.: Embryonic genetic load in coastal douglas-fir, *Pseudotsuga Menziesii* var. *Menziesii*. *Am. Nat.*, 130(932): 389-398, 1969.
- 30) 田島正啓・宮島寛・宮崎安貞: ヒノキパーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝子分析. 日林誌, 59(5): 173-177, 1977.
- 31) 津村義彦・大庭喜八郎・陣内巖: スギ針葉のパーオキシダーゼアイソザイムの遺伝様式. 95 回日林論: 325-326, 1984.

SUMMARY

In order to investigate the inheritance of peroxidase isozyme in *Cryptomeria japonica* 国 D. DON, two different materials were analysed by polyacrylamide gel electrophoresis.

The first materials were a three-generation material which consist of two parent clones, Kumotooshi (as female), Okinoyama-sugi (as male), and 10F₁ plants and 6F₂ families. F₂ families were derived from selfing of individual F₁ plants. The three-generation material were originally established to clarify the inheritance of heart wood color of red and black at the Forestry and Forest Products Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. The parents and F₁ plants were propagated by cutting to make clonal families. During September to March, the samples for the analyses were taken from the plants of both clonal and seedling families at the age of two years old.

The second materials involved three parent clones, namely, two plus tree clones of Kimotsuki 2 and Kyushu-rinsan 42 (Kyurinsan 42), and Wogon-yore-sugi clone which was raised after crossing of Yore-sugi (Twisted needle-sugi) and Wogon-sugi. Wogon-sugi has a trait of white to creamy white sprouting in every spring being inherited with paternal transmission. Yore-sugi was heterozygous for a dominant gene controlling needle twisting. Two plus tree clones were pollinated with wogon-yore-sugi pollen, and at the same time, selfing was made for both clones. These materials were also established at the Forestry and Forest Products Research Institute. The samples for the isozyme analyses were taken from two years old seedlings of F₁ and S₁ families.

Polyacrylamide vertical slab gel electrophoresis was made with 7.5% running gel and 3.75% space gel. The samples was stored in a deep-refrigerator at -25°C. One hundred miligram of the needle samples were grained with 0.75 ml buffer solution in a mortar individually, and centrifuged with 11752 x g for five minutes to take supernatant fluid. Electrophoresis was carried out at 4°C, 18 mA/1.38 cm² for 140 minutes. The gels were stained and put for ocular observation of the bands.

For the three-generation material, two loci for peroxidase isozyme were found to be inherited with the Mendelian law. Namely, specific bands of S (Slow, Rf: 35) and F (Fast, Rf: 37) were shown to be controlled by two alleles in a single locus, and the genetic system was monomeric. Kumotooshi was homozygous for S gene and Okinoyama-sugi was heterozygous for the genes of S and F. F₁ plants showed 1 : 1 segregation ratio for S-homozygote and FS-heterozygote. From the heterozygous F₁ plants, FF-, FS- and SS genotypes segregated in the ratio of 1 : 2 : 1. Another locus showed monomeric inheritance of band A (designated arbitrarily, Active, Rf: 39) and band a (nonactive). Distorted segregation of genotypes of SA, Sa, SFA, SFa was resulted in the F₂ family of Kyurinsan 42, and these two loci was found to be linked in the state of FA/Sa, and recombination value was estimated as 0.039.

In the second materials, specific bands S' (Slow, Rf: 25) and F' (Fast, Rf : 27) were proved to be controlled by two alleles in a single locus. Genotype of Kyurinsan 42 was thought to be heterozygous (F'S') and that of Kimotsuki 2 and Wogon-sugi was found to be homozygous (S'S') after selfing and crossing. F₁ families of the cross showed a good fit to 1 : 1 ratio for S'S'- and F'S genotypes. Meanwhile, selfed family of Kyurinsan 42 showed a distorted segregation ratio for 1 (S'S') : 2 (F'S') : 1 (F'F') as 0 : 105 : 44 in individual frequency. It was supposed that the gene for S' of Kyurinsan 42 might be linked closely with an embryonic lethal gene. No linkage was found between this peroxidase locus and the dominant gene for Yore-sugi.