

ヒノキ発芽後1年間におけるパーオキシダーゼ酵素パターンの変化

— 予 報 —

九州大学農学部 田 島 正 啓
宮 崎 安 貞
宮 島 寛

はじめに

近年、林木の遺伝子構成の解析は、ザイモグラフ法という新しい研究法の出現によって、著しく進展してきた。しかしながら林木のような超永年生植物では、その芽生えから成木までにアイソザイムパターンがどのように変化し、とくにいつ安定したパターンを示すようになるかはまだ充分に知られていない¹⁾。

本研究は、ヒノキの芽生えから約1年間に、特徴ある変化をした9つの発育ステージをとらえ、パーオキシダーゼ・アイソザイムバンドの消長、従ってまたアイソザイムバンドパターンの安定時期を調べるために行ったものである。

材料と方法

供試材料は、ナンゴウヒと精英樹須崎2号の人工交配で得られた交雑子供群である。すなわち、1972年4月に九州大学粕屋演習林林木育種試験地に集植されている12年生のナンゴウヒを母親とし、これに須崎2号の花粉を交配した。同年10月に得られた種子は、子供群育成のため播種したが、実験期間短縮のため、一部は1972年12月22日粕屋演習林の温室内で播種し、残りは1973年4月中旬に野外で播種した。いずれも播種床にはバット(25×35×10cm)を用い、用土処理した砂土で、播種前に1バット当りN・P・K混合肥料(5:4:3)9.5gを施用した。温室内の気温は冬期間25℃になるようにセットした。

4月播きの子供群は、播種後逐次生育状態を観察し、9月下旬までに次に示す1~8の発育ステージを選び実験材料を採取した。

また、発育の進んだ前年12月播きの子供群は、stage 9に入れた。試料を採取した9つの発育ステージは次のとおりである。

- stage 1 : 種子が発芽し hypocotyl が約0.5cm伸びたとき。
- stage 2 : hypocotyl は十分に伸びきっているが、まだ seed coat は残っている。
- stage 3 : cotyledon が生じたとき。
- stage 4 : cotyledon が十分に伸び、大体水平状態になったとき。
- stage 5 : primary leaf が生じ、epicotyl が見えるようになったとき。
- stage 6 : secondary leaf が生じたとき。
- stage 7 : ヒノキの外観を呈したとき。
- stage 8 : 播種後約160日経たとき。
- stage 9 : 播種後約280日経たとき。

子供個体の供試数は、stage 1 および2が3個体ずつ、stage 3から9までは1個体ずつとした。前者は個体がまだ小さくてアイソザイム用の試料調整が困難であったからである。

材料は葉部分とし、実験を行うまで、-20℃の冷凍庫内に保存した。調べた酵素の種類はパーオキシダーゼ・アイソザイムで、水平式スターチゲル電気泳動法によりアイソザイムバンドを分離し、ジアニシジン方式で染色した。泳動時間は150分、300Vの定電圧下で行った。バンドの同定は、2試料を同時に泳動させる併泳動法によって確実に期した。

すなわち、ナンゴウヒ成木の成葉を保存しておき、これから得た試料を併泳させた。デンシットメーター(応用電気研究所製作、D250-1型)は、この同定を容易にするだけでなく、酵素活性の定量化に効果的であった。

結果と考察

子供群で認められたアイソザイムバンドは総計11本

であり、それらはaからkまでの名のつくバンドである。これらは図-1の左端に示す。これらはいずれも母親であるナンゴウヒかあるいは父親である須崎2号に遺伝的に由来するものと考えられる。すなわち、a酵素の出現はa酵素を作るのにあずかるa遺伝子に、b酵素はb遺伝子にと以下順次k番の遺伝子までが子供

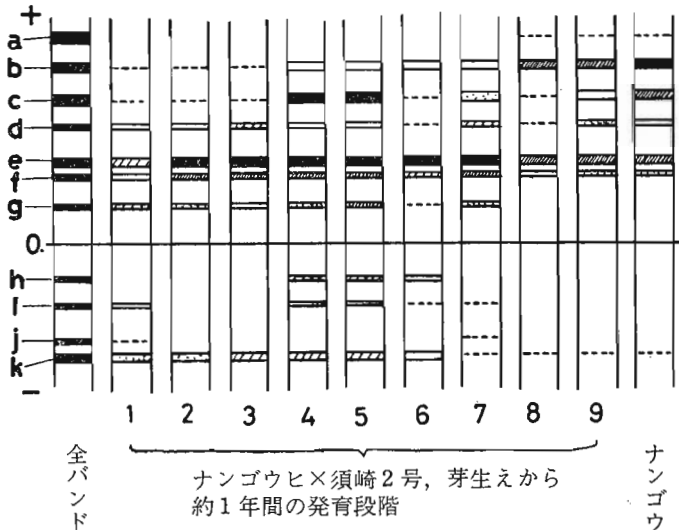


図-1 ナンゴウヒ×須崎2号の子供群の芽生えから約1年間のいろいろな発育段階におけるパーオキシダーゼ・アイソザイム・パターン

群の中に含まれていると考えられる。けれどもヒノキ苗のある発育ステージ、たとえば stage 2 では総計11バンドのポテンシャルティのうち、a, h, i, jの4バンドは欠除していて、a, h, i, jの4遺伝子が発現していない。

イネやトウモロコシなどの1年生作物の極めて若い葉は生育旺盛な発育初期ステージではアイソザイムパターンが活性も含めて著しく変化していくが、成葉期には個体によって一定のパターンに落ち着くことが

報告されている²⁾。また、三上ら³⁾がスギ、アカマツ、クロマツを使用して行った実験では、成木の若葉から11月の生長休止期における成葉までの発育ステージでアイソザイムパターンは相当に変化することが確かめられている。

本実験は稚苗の準備が充分でなく、供試材料が数的に制限されたため、個体間の変動を測定することができず、またシーズンによるバンドの消長の変動に対する配慮を欠いた。しかしながら発芽から通常葉形成にいたる1生育シーズン内の stage 1~7 までの生長期間におけるパターンは不安定で変化しやすいが、生長休止期の稚苗段階 (stage 8~9) ではパターンはそれぞれナンゴウヒ成木成葉のそれにぐっと近づく傾向が認められることが分った。したがって、成葉を用いるという制限を守るならば、1, 2年生稚苗であっても酵素的な比較がある程度可能ではないかという見通しを得た。

今後、パーオキシダーゼ以外の酵素についても同様な変動を測定すること、および、特定バンドについてもその消長と意義について検討を進める予定である。

引用文献

- 1) M. Thompson conkle: Forest Science 17 (4), 494~499, 1971
- 2) Joh G. Scandalios: Biochemical Genetics 3, 37~79, 1969
- 3) 三上進・武藤悟: 林試年報, 132, 1969