種子のタンパク質および酵素の電気泳動パターンによる 種および品種の鑑別に関する研究 (第1報)

ブラシカ類, ダイコンおよびカボチャ類

中村俊一郎

(山口大学農学部)

Studies on the Determination of Species and Cultivars on the Basis of Electrophoretic Patterns of Seed Protein and Seed Enzymes

I. *Brassica* spp., Radish and *Cucurbita* spp.

Shunichiro NAKAMURA

Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi

Summary

The problem of whether cultivars of *Brassica* spp., *Raphanus sativus* or *Cucurbita* spp. could be determined by using the electrophoretic patterns of seed protein or seed enzymes as taxonomic criteria was studied.

For the preparation of protein samples, five grams of seeds were ground in a pestle and then mixed into 20 ml of a phosphate-buffered saline solution. Extraction proceeded overnight in a refrigerator; then the gruel was centrifuged, the supernatant filtered clear and adjusted to pH 8.0 with 0.1 M KOH. The solution was placed in a refrigerator for one hour and then centrifuged. The supernatant was freeze-dried, and the prepared protein was stored dry at -20°C . For the preparation of enzyme samples, one gram of seeds was ground in a pestle and then mixed into four to six ml of a phosphatebuffered saline solution. Extraction proceeded two hours in a refrigerator; then the gruel was centrifuged and the supernatant was freeze-stored at -20°C .

Electrophoresis was carried out with acrylamide gel disc.

The results are summarized in Table 1.

1. *Brassica* species: Protein, peroxydase, LDH, esterase, acid phosphatase, ADH, GDH and CA were available for the determination of species of *Brassica* crop seeds. However, none of these electrophoretic patterns could support a conclusive determination for each species, and it was necessary to use at least two to three kinds of electrophoresis for the full determination.

Electrophoretic zymograms of peroxydase of *B. nigra*, *B. juncea* and *B. carinata* were similar to one another, suggesting that these reactions were controlled by a genome b which these species possessed in common.

No difference of electrophoretic patterns of protein and enzymes was observed among cultivars in each species.

It was considered from this experiment that Chinese cabbage, turnip, Pak-choi, etc. had better be included in one species, that is, *B. campestris*, rather than be separated respectively into *B. pekinensis*, *B. rapa*, *B. chinensis*, etc.

2. Radish: No difference of electrophoretic patterns of seed protein and enzymes was observed among cultivars or groups of cultivars of radish.

3. *Cucurbita* species: For the separation of species only two kinds of electrophoresis were available, and they each detected only one species among the four species. Protein patterns separated *C. pepo* from the other four species and esterase patterns separated *C. ficifolia* from the other four species. It was impossible for

C. moschata, *C. maxima* and Fl of these species to be separated from one another with their electrophoretic patterns.

緒 言

作物の種および品種の同定を、成植物に達しない初期の段階、すなわち幼植物、さらには種子の段階で行なう必要のある場合が多い。種子の形状によって簡単に鑑別のつく場合もあるが、種子の形状による鑑別のできない場合の方法として古くからいろいろの方法が研究され、ムギ類におけるフェノール染色法(11)、ビート類のはい軸の発色程度による鑑別法(11)、ライグラス類の根の蛍光発色法(11)などが実際にも用いられている。

最近アルファルファ、ダイズ、ラッカセイ、ワタ、コムギなどで種子タンパク質の電気泳動パターン、あるいは種子中の各種酵素のザイモグラムを用いて種あるいは品種または品種群の鑑別に成功している。Coulsonら(6)はコムギおよびその近縁種の種子タンパク質をデンブングル泳動してそのパターンを分析し、品種間の相違を認め、また各 Species のパターンがコムギ属およびその近縁種の進化の過程を反映していることを認めた。西川(25)もコムギ類の種子タンパク質および α -アミラーゼをディスク泳動して同様な分析を行なっている。Binghamら(2)はアルファルファ種子のタンパク質をアクリルアミドゲルで泳動して4つの品種群を区別し、また *Medicago falcata* の血の入った場合にバンドに差異が出てくることを観察している。

Larssen(13)は種子タンパク質のアクリルアミドゲル泳動によってイタリアンライグラスとペレニアルライグラスの鑑別に成功し、また Larssen ら(14, 15, 16)はダイズ種子のタンパク質をアクリルアミドゲルで泳動して、13品種はAバンドを有し、48品種はBバンドを有することを認めた。またこの両者をかけあわせた時、 F_1 はAB両バンドを示し、この F_1 を自家受粉した時 F_2 はA, AB およびBバンドの種子の比が1:2:1となった。そしてこのタンパク質特性が単一遺伝子座にある共優性遺伝子によって支配されていると考えた。Butteryら(4)はダイズ種子の種皮のパロオキシダーゼをアクリルアミドゲルで泳動して、そのアイソザイムパターンによって2つの品種群に分けられることを見た。Larssenら(17)はダイズ種子のINT-オキシダーゼのザイモグラムを作って、そのパターンによって3つの品種群に分けられることを認めた。

Vaughanら(29)は *Brassica campestris*, *B. oleracea* および *B. nigra* の種子のタンパク質をアクリルアミドゲルで泳動し、また寒天ゲルで免疫泳動して、その結果

がブラシカ属の分類とよく一致することを見ている。Cherryら(5)は *Gossypium* 属の26 Species および10品種の種子タンパク質をアクリルアミドゲルで泳動して、その泳動パターンが従来のゲノム分析の結果と一致することを見た。Tombs(28)はラッカセイ種子のタンパク質をアクリルアミドゲルおよびカラムクロマトグラフィーで分析して、81系統のラッカセイのうち27系統はarachin Bのみを含み、53系統はarachin AとBとを含み、1系統がarachin Aのみを含むことを見た。本研究はこれらの方法を園芸作物種子に適用して、種子鑑別に用い得るかを明らかにしようとして行なわれたものである。

材料および方法

1. 種子の種類と品種 供試した種子の Species と品種は次ぎのとおりである。特に記したものの以外はいずれも農業試験場および種苗商から分譲を受けたものである。

a. ブラシカ類およびその近縁種

Brassica campestris

ハクサイ：芝罘、野崎2号、のぞみ、耐病65日、

下山千才、高原早生、玉杯、坂東

カブ：津田カブ、聖護院カブ、金町小カブ、極早生金町、あずま中カブ、ゆたか小カブ、富士覆下小カブ、五郎丸、野沢菜

その他：丸葉山東菜、半結球山東菜、雪白タイナ、二貫目タイナ、コマツナ、丸葉コマツナ、千筋京菜、ビタミン菜、雪菜、大阪シロナ

B. oleracea

キャベツ：冬穫B号、冬駿河、早秋、耐寒大御所、四季エース2号、とよひかり、夏蒔秋冬、麗峰、やひこ、US交配ヒット、富士早生、富士極早生、黒葉中生1号

ハナヤサイ：野崎早生、房州新中生、増田晩生、富士中生、山本

ブロッコリー：中里早生、増田中生

B. juncea 三池タカナ、大葉タカナ、三池大葉タカナ、ちりめん大葉タカナ、黄カラシナ、葉カラシナ

B. carinata Ca 104, Ca 109

B. nigra Ni 112

B. napus 農林14号、農林16号、アサヒ、チサヤ

B. adpressa Ad 104, Ad 107

B. fruticulosa Fr 103
B. tournefortii T 162
Eruca sativa E 10, E 12
Sinapis alba Al 2, Al 5
S. turgida ST 1

以上のうち *B. carinata*, *B. nigra*, *B. adpressa*, *B. fruticulosa*, *B. tournefortii*, *Eruca sativa*, *Sinapis alba* および *S. turgida* は東北大学農学部育種学教室から種子の分譲を受けて、当大学農場で隔離採種したものである。

b. ダイコン

白首宮重, 青首宮重, 早太り練馬, みのわせ, 時無, 支那青, 赤丸廿日, 寺尾二年子, 桜島, 聖護院

c. カボチャ類

Cucurbita moschata : みのり, 白菊座, 金剛
C. maxima : 東京, 芳香東京, パターカップ, War-
 ted Hubbard, Jumbo Pink Banana
F₁, *C. maxima* × *C. moschata* : 新土佐, 鉄かぶと
C. pepo : 金糸瓜
C. ficifolia : クロダネカボチャ (2系統)

2. 試料作製法

a. タンパク質 各サンプル種子 5g をとり, 乳ばちで磨碎し, これに pH 7.0 のリン酸緩衝液 (2.5% の NaCl 溶液に l 当たり KH_2PO_4 0.19g, Na_2HPO_4 0.75g を加えたもの) 20ml を加えて, 5°C の冷蔵庫に 1 晩放置する. これを 12,000g で 30 分間遠心分離し, 上澄液をろ過し, 0.1M KOH で pH 8.0 に調整する. この溶液を 5°C の冷蔵庫に 1 時間置いた後, 再び 12,000g で 30 分間遠心分離し, 上澄液を真空凍結乾燥する. こうしてでき上がったタンパク質は -20°C に乾燥冷蔵した. カボチャ種子ははく皮して磨碎したが, 他のものはすべてそのまま磨碎した.

b. 酵素 各サンプル種子 1g をとり, 乳ばちで磨碎し, これに上記の pH 7.0 のリン酸緩衝液を種類により 3.5~6.0ml を加え, 5°C の冷蔵庫に 2 時間置く. これを 12,000g で 30 分間遠心分離し, 上澄液に試料用ゲルを 0.5~2.0ml 加えて -20°C に凍結保存した.

3. 泳動法

a. セルロースアセテート膜泳動

緩衝液: ペロナル緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.05$

泳動: セルロースアセテート膜 (Oxoid), 膜幅 1cm 当たり 0.5mA で通電

染色: タンパク質—Ponceau 3R (3% のトリクロ酢酸液に 0.4% になるように溶かす)
 酵素—アクリルアミドゲルの場合と同じ

b. デンブングル泳動

水平法で不連続緩衝液で行なった.

ゲル調製用緩衝液: トリス—HCl pH 8.5

ブリッジ用緩衝液: ホウ酸緩衝液 pH 8.45

デンブングル: 緩衝液 100ml 当たり加水デンブン 14g を加える

試料は可溶性デンブンと混合してスリットに挿入した.

通電: ゲルの断面積 $1 \times 0.6\text{cm}$ 当たり 4mA

染色: タンパク質—メタノール: 水: 氷酢酸=5:5:1 (容積比) にアミドブラックを 0.5% の割合に溶かしたもので染色

酵素—アクリルアミドゲルの場合と同じ

c. アクリルアミドゲル泳動

ゲルの濃度および pH: 標準サイズおよび標準 pH (分離用ゲル 7.5%—pH 8.9, 試料および濃縮用ゲル 2.5%—pH 6.7)

トリス・グリシン緩衝液: pH 8.3

タンパク質泳動の場合は試料を種類により 15~40mg とり, これを 0.5ml の試料用ゲルに溶解して泳動にかけた. 酵素泳動の場合は試料を 0.2~0.3ml とってゲル管の上部に注いだ.

通電: ディスク 1 本当たり 3~4mA

染色: 別記の通り

4. アクリルアミドの染色

a. タンパク質—アミドブラック 1.0g を 7% 酢酸 200ml に溶かしたもので染色. 脱色は 7% 酢酸中で自然脱色.

b. 酵素

パーオキシダーゼ—酢酸ベンジディンによる (26).

乳酸脱水素酵素 (LDH)—井上 (10), 谷口 (27) または Shaw ら (24) の処方による.

リンゴ酸脱水素酵素 (MDH)—谷口 (27) または Shaw ら (24) の処方による.

エステラーゼ—井上 (10) の処方による.

酸性ホスファターゼ—井上 (10) の処方による.

アルカリ性ホスファターゼ—井上 (10) または Brewer ら (3) の処方による.

アルコール脱水素酵素 (ADH)—Shaw ら (24) の処方による.

グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)—Brewer ら (3) の処方による.

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G-6-PD)—Brewer ら (3) の処方による.

コハク酸脱水素酵素 (SDH)—Brewer ら (3) の処方による.

Table 1. The list of matters which can be detected by patterns of acrylamide gel electrophoresis

Species	Crop name	Total protein	Peroxi-dase	Lactate dehydro-genase (LDH)	Malate dehydro-genase (MDH)	Esterase	Acid phosphatase	Alkaline phosphatase	Alcohol dehydro-genase (ADH)	Glutamate dehydro-genase (GDH)	Glucose-6-phosphate dehydro-genase (G-6-PD)
<i>Brassica campestris</i>	Chinese cabbage, turnip, Pak-choi, etc.	A	A	A		A	A		A	A	
<i>B. nigra</i>	Brown mustard, etc.	B	B	B		Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	Not tested	No reaction
<i>B. oleracea</i>	Cabbage, cauliflower, broccoli, etc.	C	A'	C		B	B	No reaction	B	B	
<i>B. juncea</i>	Leaf mustard	A'	C	A'		C	C		C	A	
<i>B. carinata</i>	Abyssinia mastard	D	C'	A		C'	C'		A	C	
<i>B. napus</i>	Rape	C'	D	D		D	C'		A	A	
<i>Raphanus sativus</i>	Radish	—	—	—	—	—	—	No reaction	—	—	—
<i>Cucurbita moschata</i>	Squash	A				A					
<i>C. maxima</i>	Squash	A				A					
<i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i>	F ₁	A				A					
<i>C. pepo</i>	Vegetable marrow	B				A		No reaction			
<i>C. ficifolia</i>	Fig-leaf gourd	A				B					

Table 1. The list of matters which can be detected by patterns of acrylamide gel electrophoresis (continued)

Species	Succinate dehydrogenase (SDH)	α -Glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD)	Isocitrate dehydrogenase (ICD)	Leucine aminopeptidase (LAP)	6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD)	Carbonic anhydrase (CA)	Difference between cultivar
<i>Brassica campestris</i>							
<i>B. nigra</i>				No reaction	Weak reaction	A	No difference
<i>B. oleracea</i>						Not tested	
<i>B. juncea</i>						B	
<i>B. carinata</i>						B	
<i>B. napus</i>						C	
<i>Raphanus sativus</i>	—	—	—			B	No difference
<i>Cucurbita moschata</i>							
<i>C. maxima</i>				No reaction	Weak reaction		No difference
<i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i>							
<i>C. pepo</i>							
<i>C. ficifolia</i>							

[Note] The difference of letters A, B, C and D shows the difference of electrophoretic patterns. A', B' and C' show that the difference between A and A', B and B' or C and C' is small. X shows that there is no difference.

α -グリセロリン酸脱水素酵素 (α -GPD)—Shaw ら (24) の処方による。

イソクエン酸脱水素酵素 (ICD)—Brewer ら (3) の処方による。

ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)—Brewer ら (3) の処方による。

6-ホスグルコン酸脱水素酵素 (6-PGD)—Brewer ら (3) の処方による。

炭酸脱水素酵素 (CA)—Brewer ら (3) の処方による。

5. タンパク質泳動の定量曲線

タンパク質のディスク泳動の定量曲線を描くためには東洋科学産業のデンストメーター DMV 33-C (620 nm フィルター) を使用した。

結 果

3 種類の泳動法のうち、セルロースアセテート膜泳動とデンプンゲル泳動とは判然とした結果を示さなかったので、実験はもっぱらアクリルアミドゲルのディスク泳動によって行なった。その結果を一括して示すと第 1 表のとおりである。

1. ブラシカ類 ブラシカ類で 2 種以上の species 間にある程度以上の差の認められたのは、タンパク質、パーオキシダーゼ、LDH、エステラーゼ、酸性ホスファターゼ、ADH、GDH および CA で、アルカリ性ホスファターゼ、G-6-PD、LAP および 6-PGD では泳動反応が現われないかまたは極めて微弱であり、MDH、SDH、 α -GPD および ICD では各 species とともに同様なパターンを示した。

品種間差はいずれの泳動像においても認められなかった。ただ *B. campestris* に属するビタミン葉がタンパク質泳動でやや特異なパターンを示したのが注意をひいた。

a. タンパク質 タンパク質の泳動像の 1 部は第 18～21 図のとおりで、その特徴を示したのが第 1～4 図である。またデンストメーターによる定量曲線の一部を第 5～7 図に示す。これらによって見るように、*B. campestris* と *B. juncea* では 3 本の主泳動帯が特徴的であり、*B. juncea* ではこの下 2 本に当たる部分がさらに細かく分れ、またさらに下方にまで泳動帯が及んでいる場合が多い。*B. oleracea* と *B. napus* では 2 本の主泳動帯が特徴であるが、両者の間には微妙な差がある。*B. nigra* は他と全く異なって、全体にわたった泳動帯を示す (第 19 図)、*B. carinata* の泳動像は *B. napus* に近いが、下方の浸潤がなく、また中央部の状態も異なっている (第 20 図)。各 species の中の品種間差は認められなかったが、ただ *B. campestris* に属するビタミン葉は多少他の *B. campestris* と異なって、泳動像が上下にわたり、したが

Fig. 1. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of *Brassica campestris* seeds.

Fig. 2. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of *Brassica oleracea* seeds.

って *B. juncea* にやや似た泳動像を示した (第 1 図)。

b. パーオキシダーゼ *B. campestris* および *B. oleracea* では中央よりやや上部に 1 条の泳動帯を生じたが、*B. oleracea* ではこの泳動帯の上方に浸潤の見られる場合が多い (第 8 図)。*B. juncea* と *B. carinata* とはよく似た泳動帯を示し、泳動帯の中に数条の線が認められる (第 8, 第 23～25 図)。*B. carinata* では時によって極

Fig. 3. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of *Brassica juncea* seeds.

Fig. 4. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of *Brassica napus* seeds.

Fig. 5. Densitometer trace of electrophoresis of protein of Chinese cabbage cv. Kogen-wase.

Fig. 6. Densitometer trace of electrophoresis of protein of cabbage cv. Fuyu-suruga.

Fig. 7. Densitometer trace of electrophoresis of protein of *Brassica juncea* cv. Kikarashina.

Fig. 8. Schematic diagram of electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica* spp. seeds.

めて濃厚な泳動像を示したが、やはりその中に数条の線が認められた(第25図)。*B. nigra*も全体の2/3にわたって極めて濃い泳動反応を示したが、中の線条は見分けることができなかった(第8, 22図)。*B. napus*では中央部に接近した2条が認められ、1本は濃く、1本は薄い(第8, 26図)。

c. LDH *B. campestris*では中央とその下方とに2条の泳動帯が見られた。この2条は同じ濃さの場合、下部の方が濃い場合、上部の方が濃い場合といろいろであった(第9図)。*B. nigra*では中央やや下部に1条が現われる(第9図)。*B. oleracea*では中央部のやや幅広い1条が特徴であった(第9, 27図)。*B. juncea*では*B. campestris*と大体同様の位置に2~3条の泳動帯が現われるが、*B. campestris*のように濃く現われることはない(第9図)。*B. carinata*でも2条の泳動帯として現われ、その位置も*B. campestris*と大体同様である(第9図)。*B. napus*では中央やや上部より1条の泳動帯が現われるのみで、*B. oleracea*のものよりも幅が狭い(第9図)。以上はいずれも井上(10)の処方で染色した泳動像で、谷口(27)あるいはShaw(24)の処方で染色した泳動像では差を見出すことが困難であった。

d. MDH MDHの泳動像はいずれの処方によっても染色像に差を見出すことができなかった。

e. エステラーゼ *B. campestris*では中央からやや下部にかけて泳動の線条が認められる(第28図)。これに対し*B. oleracea*ではこの部分の泳動像がより濃厚な

場合が多く、また上端近くの泳動帯も*B. campestris*と多少異なっている(第29図)。*B. juncea*と*B. carinata*とは互いにやや似た泳動像を示すが(第30, 31図)、*B. carinata*の方がさらに細かい線条が上下にわたっている。*B. napus*では中央の太い線条が特徴である(第31図)。

f. 酸性ホフッターゼ *B. campestris*の泳動帯が中央どまりであるのに対して(第32図)、*B. oleracea*では中央よりさらに下端にまで及ぶ泳動像を示す(第33図)。*B. juncea*, *B. carinata*および*B. napus*の泳動像は互に似ているが、*B. juncea*の反応が最も強くて上方にまで及ぶ場合があり、*B. napus*と*B. carinata*の反応はこれに比べて弱い場合が多い(第32, 34図)。

g. ADH *B. campestris*, *B. carinata*および*B. napus*の3種は互いに似た泳動像を示した。すなわち中央部にはほぼ同大の非染色部を生じた(第10, 35, 36図)。*B. oleracea*では全体が染色して中央の白色帯が現われなかった(第10, 36図)。*B. juncea*では中央部の白色帯が極めて幅広く、上端近くにまで及んでいた(第10, 26図)。

h. GDH *B. campestris*, *B. juncea*および*B. napus*は同様な泳動像を示した(第11, 37図)。すなわち上部約1/3が極めて濃厚に染色された。これに対し*B. oleracea*では位置および大きさはこれらとほぼ同様であるが、中に非染色部分のまじったまだらの染色帯が現われた(第11, 37図)。*B. carinata*では上端から少し下っ

Fig. 9. Schematic diagram of electrophoretic pattern of LDH of *Brassica* spp. seeds.

Fig. 10. Schematic diagram of electrophoretic pattern of ADH of *Brassica* spp. seeds.

Fig. 11. Schematic diagram of electrophoretic pattern of GDH of *Brassica* spp. seeds.

Fig. 12. Schematic diagram of electrophoretic pattern of CA of *Brassica* spp. seeds.

たところに短い染色帯が現われた(第 11, 38 図)。

i. SDH, α -GPD および ICD SDH と α -GPD の泳動像では差が認められず, ICD の泳動像はまちまちで, 適確な泳動像を得ることができなかった。

j. CA *B. campestris* では下端に 2 条の泳動帯が認められ, *B. carinata* では中央やや上部に 1 条, やや下部に 2 条の泳動帯が認められたが, *B. oleracea*, *B. juncea* および *B. napus* でははっきりした泳動帯が現わ

Fig. 13. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of radish seeds.

Fig. 14. Schematic diagram of electrophoretic pattern of LDH of radish seeds. Cv. Shirokubi-miyashige.

れなかった(第 12 図)。

Brassica 属の作物の species 鑑別の参考とするためその他のブラシカ類および近縁種について, タンパク質および酵素の泳動像を作ったが, 上記の栽培種の泳動像と似た場合, 相違する場合など, さまざまであった。その 1 部は第 38 図に示されている。

2. ダイコン ダイコンの泳動像例の 1 部を第 39 図(タンパク質)および第 40 図(エステラーゼ)に示し, またその模式図の 1 部を第 13~15 図に示す。これらによって 1 部がわかるごとく, いずれにおいても品種間の差は認められなかった。タンパク質の像はブラシカの A 型と似ており, LDH もブラシカの A 型の 2 条と対応しており, MDH 像もブラシカ類一般と共通するものであったが, 他のものではブラシカとは異なった独特の泳動像を示した。

3. カボチャ類 カボチャ類の species 間である程度の差の認められたのはタンパク質およびエステラーゼのみで, しかもタンパク質では *C. pepo* のみが, エステラーゼでは *C. ficifolia* のみが区別されたにすぎなかった。

Fig. 15. Schematic diagram of electrophoretic pattern of GDH of radish seeds.

Fig. 16. Schematic diagram of electrophoretic pattern of protein of *Cucurbita* spp. seeds.

a. タンパク質 タンパク質の泳動像は第 41 図に示され、これを模式化したのが第 16 図である。これによってわかるように、はっきりした差の認められるのは *C. pepo* のみで、他の 4 種類の間の差は判然としない。

b. エステラーゼ エステラーゼの泳動像は第 42, 43 図に示され、模式図は第 17 図に示される。これによってわかるように、はっきり差の認められるのは *C. ficifolia* のみで、他の 4 種類の間の差は判然としない。*C. ficifolia* では線条がはしご状に全体にわたって見られるのが特徴である。

Fig. 17. Schematic diagram of electrophoretic pattern of esterase of *Cucurbita* spp. seeds.

考 察

ブラシカ類 ブラシカ属作物の種子はある程度肉眼でも鑑別できる。すなわち、*B. nigra* の種子は極めて微細であり、*B. juncea* の種子はこれについて小さい。*B. campestris*, *B. oleracea*, *B. carinata* および *B. napus* の種子は大体同程度の大きさであるが、*B. napus* の種子は他のものに比べて色が黒っぽい。しかしこの 4 species を適確に区分することは肉眼では困難である。

B. campestris は細分すれば *B. campestris* (タンパナ、和種ナタネなど)、*B. Rapa* (カブ、コマツナなど)、*B. pekinensis* (ハクサイ、山東菜など)、*B. chinensis* (タイナなど)、*B. narinosa* (キサラギナなど)、*B. japonica* (ミズナなど) などに細分されるが、最近ではこれらを一括して *B. campestris* とする考え方が有力であり、本研究で行なった泳動分析でも、タンパク質およびアイソザイムともに *B. campestris* として一括するのが適当であることを示している。江口ら(7)はブラシカ類の種子の発芽 3 日目の幼苗のエステラーゼを寒天ゲルで電気泳動して、*B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. carina* および *B. napus* の間にザイモグラムのパターン差を見出しているが、*B. campestris* 内のハクサイ、カブ、タイナ、京菜などの間には差を見出していない。

Vaughan ら(29)の *B. campestris*, *B. oleracea* および *B. nigra* の種子のタンパク質泳動像は本研究の泳動像と大体一致している。

タンパク質泳動において、キサラギナ×大阪シロナの

交配から系統分離されたビタミン菜がやや他の *B. campestris* と異なった泳動パターンを示したのは興味があるが、しかしアイソザイムでは全く差が見られず、やはり *B. campestris* に属するものと認められた。ビタミン菜のタンパク質泳動像の多少の変異は、選抜過程でタンパク質の内容に多少差を生じたものかもしれない。

またパーオキシダーゼの泳動像において、*B. juncea*, *B. carinata* および *B. nigra* が相互に類似した泳動像を示し(第8, 22~25図), 特に *B. juncea* と *B. carinata* とが類似していることは興味深い。ゲノム分析では *B. nigra* は b ゲノム, *B. juncea* は (a+b) ゲノム, *B. carinata* は (b+c) ゲノムをもっており、共通にもつ b ゲノムがこうした類似したパーオキシダーゼの泳動像を示したものと考えられる。

ブラシカ類では相当多くのタンパク質および酵素の泳動像で差を示したが、6 species の間にすべてはっきりした差を示したものはなく、いずれも2あるいは3 species が類似した泳動像を示している。したがってブラシカ類の鑑別では2~3の酵素あるいはタンパク質の泳動像を同時に作って分析することが必要であろう。

ダイコン ダイコンでは一般的な秋ダイコンの他に、みのわせ、時無、二年子、赤丸廿日、支那青などの、特性の著しく異なった品種を供試したが、いずれにおいても品種間差を見出すことができなかった。

アブラナ科に属する *Brassica*, *Eruca*, *Sinapis* および *Raphanus* の泳動像を比較してみると、相互に似た像を示す場合がしばしばある。たとえばダイコンのタンパク質の泳動像は *B. campestris* のものによく似ており、LDH もブラシカの A 型と対応している。MDH はブラシカ属の一般と区別できない。しかし *Raphanus* のエステラーゼ, ADH および SDH はブラシカ属のいずれとも異なっており、酸性ホスファターゼおよび GDH もある程度相違が見られる。*Eruca* や *Sinapis*, あるいは野生種のブラシカについても同様に、栽培種ブラシカと似た像を示す場合と相違を示す場合があった。しかしこれらの species の間のゲノム構成を関係づけることはできなかった。

カボチャ類 カボチャ類の種子は、クロダネカボチャは真黒で一目りよう然であり、またニホンカボチャの種子も小さくて鑑別が容易である。しかしセイヨウカボチャ、ペボカボチャおよびセイヨウ種とニホン種の F_1 の種子相互間の肉眼での区別は困難である。

カボチャ属5種類の区別がタンパク質あるいは酵素の泳動像で困難であったのは意外であった。わずかに *C. pepo* がタンパク質像で、*C. ficifolia* がエステラーゼ像

で区別され得たのみである。クロダネカボチャの種子は一目りよう然であるから、泳動鑑別で価値のあるのは *C. pepo* を区別するタンパク質の泳動のみということになる。しかし江口ら(8)によれば、カボチャ類種子の発芽3日目の幼苗のエステラーゼを寒天ゲルで泳動して、*C. moschata*, *C. maxima* および *C. pepo* をはっきり区別しており、カボチャでは発芽苗を供試した方がよいのかもしれない。

摘 要

ブラシカ類、ダイコンおよびカボチャ類の種子のタンパク質あるいは酵素をアクリルアミドゲルのディスクで電気泳動して、その泳動パターンによって種子の種、品種または品種群を鑑別することについて研究を行なった。結果を一括すると第1表のごとくである。

1. ブラシカ類作物の種子鑑別に利用価値のあったのは、タンパク質、パーオキシダーゼ, LDH, エステラーゼ, 酸性ホスファターゼ, ADH, GDH および CA であった。しかしこれら1種類のみの泳動によっての完全な区別は不可能で、完全な区別には少なくとも2ないし3種類の泳動を必要とした。*B. nigra*, *B. juncea* および *B. carinata* のパーオキシダーゼ泳動像では相似の反応を現わし、これはこれらが共通に有する b ゲノムによるものと推測された。いずれにおいても品種間差は区別できず、ハクサイ, カブ, ミズナ, タイナなどは電気泳動像による分類からも *B. campestris* として一括するのが妥当であると考えられた。

2. ダイコンでは泳動像における品種間差あるいは品種群間差は検出できなかった。

3. カボチャ類ではわずかに *C. pepo* がタンパク質の、*C. ficifolia* がエステラーゼの泳動像で区別できたのみで、*C. moschata*, *C. maxima* およびそれらの F_1 の間の区別は不可能であった。

謝 辞 本実験の遂行に当たり多大の助力をいただいた永瀬正良、柳井寛ならびに高橋典子の諸氏に厚く感謝の意を表する。

引用文献

1. 青木幸一郎・中埜栄三・大井優一. 1972. 電気泳動実験法. 広川書店, 東京.
2. BINGHAM, E. T., and K. J. YEH. 1971. Electrophoretic patterns among alfalfa seed proteins from selected varieties, experimental stocks, and species accessions. Crop Sci. 11: 58—61.
3. BREWER, G. J., and C. F. SING. 1970. An introduction to isozyme techniques. Academic Press, N. Y.
4. BUTTERY, BR., and R. I. BUZZELL. 1968. Peroxydase activity in seeds of soybean varieties.

- Crop Sci. 8 : 722—725.
5. CHERRY, J. P., F. R. H. KATTERMAN, and J. E. ENDRIZZI. 1970. Comparative studies of seed proteins of species *Gossypium* by gel electrophoresis. *Evolution* 24 : 431—477.
 6. COULSON, C. B., and A. K. SIM. 1964. Proteins of wheat and closely related genera and their relationship to genetical characteristics. *Nature* 202 : 1305—1308.
 7. EGUCHI, H., and T. MATSUI. 1969. Relationships between genome constitution and esterase composition in *Brassica*. *Agr., Kyushu Univ.* 15 : 331—334.
 8. EGUCHI, H., and T. MATSUI. 1969. Phylogenetic study on *Cucurbita* species by means of esterase zymogram. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 15 : 345—353.
 9. 遠藤 徹. 1974. 植物酵素多型の遺伝子支配. 蛋白質・核酸・酵素 19 : 668—682.
 10. 井上 勤. 1974. 電気泳動の実験 (7) (8), ディスク電気泳動法 Disc electrophoresis (上)(下). 科学の実験 25 : 325—332, 433—438.
 11. ISTA. 1976. International Rules for Seed Testing. *Seed Sci. & Technol.* 4 : 1—180.
 12. 菊谷元資. 1969. DISC 電気泳動法 (その1) (その2). 化学と生物 7 : 545—551, 620—627.
 13. LARSEN, A. L. 1966. A distinction between proteins of annual and perennial ryegrass seeds. *Proc. Assoc. Offic. Seed Analysts* 56 : 47—51.
 14. LARSEN, A. L. 1967. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, *Glycine max* (L.) MERILL. *Crop Sci.* 7 : 311—313.
 15. LARSEN, A. L., and B. E. CALDWELL. 1968. Inheritance of certain proteins in soybean seed. *Crop Sci.* 8 : 474—476.
 16. LARSEN, A. L., and B. E. CALDWELL. 1969. Source of protein variants in soybean seed. *Crop Sci.* 9 : 385—387.
 17. LARSEN, A. L., and W. C. BENSON. 1970. Variety specific variants of oxydative enzymes from soybean seed. *Crop Sci.* 10 : 493—495.
 18. MIZUSHIMA, U. 1968. Phylogenetic studies on some wild *Brassica* species. *Tohoku J. Agr. Res.* 19 : 83—99.
 19. MIZUSHIMA, U., and S. TSUNODA. 1967. A plant exploration in *Brassica* and allied genera. *Tohoku J. Agr. Res.* 17 : 249—276.
 20. 水島宇三郎・角田重三郎. 1969. アブラナ属栽培植物の起源について. 農及園. 44 : 1347—1352.
 21. PIERCE, L. C., and J. L. BREWBAKER. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science *Hortscience* 8 : 17—22.
 22. RÖDELLEN, G. 1960. Beiträge zur Analyse des *Brassica*-Genoms. *Chromosoma* 11 : 205—228.
 23. SHANNON, L. M. 1968. Plant isozymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19 : 187—210.
 24. SHAW, C. R., and R. PRASAD. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes—a compilation of recipes. *Biochem. Gen.* 4 : 297—320.
 25. 高橋隆平(編). 1974. アイソザイムの研究とその育種学的意義. 育種学の進歩 第14集 : 59—88 (遠藤徹, 西川浩三, 酒井寛一, 他).
 26. 東洋科学産業. DISC 電気泳動装置取扱説明書.
 27. 谷口順彦. 1974. 電気泳動による魚類の種分化および系統分析に関する研究. 高知大水産実験所研究報告1号.
 28. TOMBS, M. P. 1965. An electrophoretic investigation of ground nuts proteins : the structure of arachin A and B. *Biochem. J.* 96 : 119—133.
 29. VAUGHAN, J. G., A. WAITE, D. BOULTER, and S. WAITERS. 1966. Comparative studies of the seed proteins of *Brassica campestris*, *Brassica oleracea*, and *Brassica nigra*. *J. Exp. Bot.* 17 : 332—343.

Fig. 18

Fig. 19

Fig. 20

Fig. 21

Fig. 18. Electrophoretic pattern of protein of *Brassica campestris* seeds. Turnip cv. Gokuwase-kanamachi.

Fig. 19. Electrophoretic pattern of protein of *Brassica nigra* seeds. Strain Ni 112.

Fig. 20. Electrophoretic pattern of protein of *Brassica carinata* seeds. Strain Ca 104.

Fig. 21. Electrophoretic pattern of protein of *Brassica napus* seeds. Cv. Norin No. 14.

Fig. 22

Fig. 23

Fig. 24

Fig. 25

Fig. 26

Fig. 22. Electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica nigra* seeds. Strain Ni 112.

Fig. 23. Electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica juncea* seeds. Cv. Miike-takana.

Fig. 24. Electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica carinata* seeds. Strain Ca 104.

Fig. 25. Electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica carinata* seeds. From left to right: Strain Ca 104 (two) and Ca 109 (two).

Fig. 26. Electrophoretic pattern of peroxidase of *Brassica napus* seeds. Cv. Norin No. 14.

Fig. 27

Fig. 27. Electrophoretic pattern of LDH of *Brassica oleracea* seeds. From left to right : Cabbage cv. Kuroba-chusei No. 1 and Fuji-wase, and cauliflower cv. Boshu-shinchusei and Nozaki-wase.

Fig. 28

Fig. 29

Fig. 30

Fig. 31

Fig. 28. Electrophoretic pattern of esterase of *Brassica campestris* seeds. From left to right : Chinese cabbage cv. Chifu, Pakchoi cv. Seppaku-taina, Mizuna cv. Chisuji-kyona, Vitamin-na, and Santosai cv. Maruba-santosai.
 Fig. 29. Electrophoretic pattern of esterase of *Brassica oleracea* seeds. From left to right : Cabbage cv. Kuroba-chusei No. 1 (two) and Fuji-wase (two).
 Fig. 30. Electrophoretic pattern of esterase of *Brassica juncea* seeds. From left to right : Cv. Miike-ooba-takana and Kikarashina.
 Fig. 31. Electrophoretic pattern of esterase of *Brassica* spp. seeds. From left to right : *B. napus* cv. Norin No. 14 and *B. carinata*.

Fig. 32

Fig. 33

Fig. 34

Fig. 32. Electrophoretic pattern of acid phosphatase of *Brassica* spp. seeds. From left to right : *B. juncea* cv. Kikarashina and Miike-ooba-takana, *B. campestris* Komatsuna cv. Maruba-komatsuna (two) and *B. carinata* strain Ca 104.

Fig. 33. Electrophoretic pattern of acid phosphatase of *Brassica oleracea* seeds. From left to right : Cabbage cv. Kuroba-chusei No. 1 (two) and cauliflower cv. Boshu-shinchusei (two).

Fig. 34. Electrophoretic pattern of acid phosphatase of *Brassica* spp. seeds. From left to right : *B. napus* cv. Norin No. 14 (three) and *B. carinata* strain Ca 104.

Fig. 35

Fig. 36

Fig. 35. Electrophoretic pattern of ADH of *Brassica campestris* seeds. From left to right : Chinese cabbage cv. Chifu (two), Komatsuna (two) and Vitamin-na (two).

Fig. 36. Electrophoretic pattern of ADH of *Brassica* spp. seeds. From left to right : *B. juncea* cv. Miike-takana (two), *B. oleracea* cabbage cv. Kuroba-chusei No. 1 (two) and *B. napus* cv. Norin No. 14 (two).

Fig. 37

Fig. 38

Fig. 39

- Fig. 37. Electrophoretic pattern of GDH of *Brassica* spp. seeds. From left to right : *B. oleracea* cabbage cv. Kurobachusei No. 1 (two) and cauliflower cv. Nozaki-wase(two), and *B. napus* cv. Norin No. 14.
- Fig. 38. Electrophoretic pattern of GDH of *Brassica* spp. and *Sinapis turgida* seeds. From left to right : *B. carinata* strain Ca 109 (two), *B. tournefortii* strain T 162 (two) and *S. turgida* strain ST 1.
- Fig. 39. Electrophoretic pattern of protein of radish seeds. From left to right : Akamaru-hatsuka (two) and Hayaburi-nerima (two).

Fig. 40

Fig. 41

- Fig. 40. Electrophoretic pattern of esterase of radish seeds. From left to right : Akamaru-hatsuka, Terao-ninengo, Tokinashi, Shina-ao, Shirokubi-miyashige.
- Fig. 41. Electrophoretic pattern of protein of *Cucurbita* spp. seeds. From left to right : *C. moschata* cv. Kongo, *C. maxima* cv. Tokyo, F₁, *C. maxima* × *C. moschata* cv. Shintosa, *C. pepo* cv. Kinshi-uri, and *C. ficifolia*.

Fig. 42

Fig. 43

Fig. 42. Electrophoretic pattern of esterase of *Cucurbita* spp. seeds. From left to right : F₁, *C. maxima* × *C. moschata* cv. Tetsukabuto (three), and *C. ficifolia* (three).

Fig. 43. Electrophoretic pattern of esterase of *Cucurbita* spp. seeds. From left to right : *C. moschata* cv. Kongo, *C. maxima* cv. Buttercup, F₁, *C. maxima* × *C. moschata* cv. Tetsukabuto, *C. ficifolia* (two) and *C. pepo* cv. Kinshuri (two).