

チョウセンゴヨウのアイソザイムの遺伝

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	戸丸,信弘 津村,義彦 大庭,喜八郎
発行元	日本林學會
巻/号	72巻3号
掲載ページ	p. 194-200
発行年月	1990年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

チョウセンゴヨウのアイソザイムの遺伝*

戸丸信弘**・津村義彦**・大庭喜八郎**

戸丸信弘・津村義彦・大庭喜八郎：チョウセンゴヨウのアイソザイムの遺伝 日林誌 72: 194~200, 1990 チョウセンゴヨウの精英樹 25 クローンから得られた自然交配種子の雌性配偶体を用いて、アイソザイムの遺伝支配を解明するためアイソザイム分析を行った。アイソザイムの分離から調査した 9 酵素種は、少なくとも 16 遺伝子座の 34 対立遺伝子に支配されていることが明らかになった。すなわち、グリセリン酸脱水素酵素 (G2DH)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGD)、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)、アスパラギン酸アミノ転移酵素 (GOT) およびホスホグルコムターゼ (PGM) の 5 酵素種においてそれぞれ 1 遺伝子座を明らかにした。またシキミ酸脱水素酵素 (ShDH) とアラニンアミノペプチターゼ (AAP) では各 2 遺伝子座を、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP) では 3 遺伝子座を解明した。さらにリンゴ酸脱水素酵素 (MDH) では、2 遺伝子座間で形成されるヘテロダイマーを検出し、4 遺伝子座に支配されていることがわかった。

TOMARU, Nobuhiro, TSUMURA, Yoshihiko, and OHBA, Kihachiro: Inheritance of isozyme variants in Korean pine (*Pinus koraiensis*) J. Jpn. For. Soc. 72: 194~200, 1990 Megagametophytes from wind-pollinated seeds of 25 plus-tree clones of Korean pine (*Pinus koraiensis* SIEB. et ZUCC.) were electrophoretically analysed for isozyme inheritance. On the basis of isozyme segregation, we found that nine enzyme systems were controlled by at least 34 alleles in 16 loci. A single locus was detected in each of five enzyme systems, glycerate-2-dehydrogenase (G2DH), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), and phosphoglucomutase (PGM). We detected two loci in shikimate dehydrogenase (ShDH) and alanine aminopeptidase (AAP) respectively and found three loci in leucine aminopeptidase (LAP). Malate dehydrogenase (MDH) was under the control of four loci, two of which formed an interlocus heterodimer.

I. はじめに

現在までに、アイソザイムを遺伝標識として用いて、針葉樹の天然集団間および集団内の遺伝変異を調べ、集団の遺伝的構造、遺伝的分化および交配様式などが数多く報告されてきた (LUNDKVIST, 1979; PLESSAS and STRAUSS, 1986)。またクローンの同定、採種源の判定、採種園の花粉動態など育種的な応用研究にもアイソザイムが利用されてきた (ADAMS and JOLY, 1980)。遺伝変異を解明するためにアイソザイムを遺伝標識として用いる場合、まず電気泳動で得られたバンドが遺伝子座に支配されていることを明らかにし、それを標識遺伝子としなければならない。さらに遺伝変異をできるだけ正確に把握するためには、可能なかぎり多くのアイソザイム遺伝子座を利用する必要がある。そのため多くの針葉樹においてアイソザイムの遺伝子座の解明 (遺伝子座分析) がさかに行われてきた (GURIES

and LEDIG, 1978; EL-KASSABY *et al.*, 1982; SHIRAISHI, 1988; TSUMURA *et al.*, 1989)。

裸子植物の雌性配偶体 (胚乳) は減数分裂で生じた母親由来の半数体組織 (n) である。そのためアイソザイム遺伝子がヘテロ接合型である母樹の雌性配偶体では、メンデル遺伝に従って、アイソザイムが 1:1 に分離することが期待される。したがって雌性配偶体を用いれば、自然交配種子を材料としてアイソザイムの遺伝子座支配や遺伝子座間の連鎖を容易に調査することができる。

チョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis* SIEB. et ZUCC.) では、KIM *et al.* (1982)、CHUNG and LEE (1983) および PARK (1983) がデンブングル電気泳動法を用い、雌性配偶体を材料として遺伝子座分析を行った。その結果 7 酵素種を支配する 12 遺伝子座を明らかにしている。

本研究では、より分離能が高いポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い、新たな標識遺伝子の探索のた

* 本研究の要約は第 99 回日本林学会大会 (1988) で発表した。また本研究は文部省昭和 61 年度特定研究補助金の助成を受けた。

** 筑波大学農林学系 Inst. of Agric. For., Univ. of Tsukuba, Ibaraki 305

め、チョウセンゴヨウの精英樹 25 クローンの雌性配偶体を材料として、9 酵素種のアイソザイムの遺伝子支配を解明した。

II. 材料および方法

関東林木育種場長野事業場内の採種園に植栽されているチョウセンゴヨウの精英樹 25 クローンの自然交配種子を実験材料として用いた。それらのうち 22 クローンは長野県の天然林、残りの 3 クローンは群馬県の人工林から選抜された精英樹クローンである。種子は実験に供するまで -25°C の冷凍庫内に保存した。

アイソザイム分析の前処理として、種子の酵素活性を高めるため冷凍庫から取り出した種子を 3% 過酸化水素水で 24 時間浸漬した後、低温湿層処理を 4°C で少なくとも 2 カ月間行った。低温湿層処理終了後、種子の雌性配偶体 (n) を随時実験に供した。アイソザイム分析のうち抽出、遠心分離、染色方法は SHIRAISHI (1988), CONKLE *et al.* (1982), MARTY *et al.* (1984) の方法を若干改変して用い、また電気泳動法は DAVIS (1964) と ORNSTEIN (1964) の方法にほぼ従った。分析した酵素種は、シキミ酸脱水素酵素 (ShDH), グリセリン酸脱水素酵素 (G2DH), リンゴ酸脱水素酵素

(MDH), 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGD), グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD), アスパラギン酸アミノ転移酵素 (GOT), ホスホグルコムターゼ (PGM), ロイシンアミノペプチターゼ (LAP), アラニンアミノペプチターゼ (AAP) の 9 酵素種である。

1 家系当たり 10 個以上の雌性配偶体を分析したもののについて、G 検定 (SOKAL and ROHLF, 1981) を用い、観察された分離比とメンデルの法則から期待される分離比 (1:1) との適合性検定を行った。なお同じバンド (群) が分離する家系が二つ以上ある場合は不均一性の検定を行い家系間で観察分離比のばらつきがないことを確かめた後、それらの観察値を合計した値を用いて適合性検定を行った。

III. 結果および考察

1. シキミ酸脱水素酵素 (ShDH)

ShDH では活性の高い二つのゾーンを観察した。そのうち移動度の小さなゾーン (Rf31) ではすべての家系で 1 本のバンドを観察した。一方移動度の大きなゾーン (Rf 36~39) では 1 本のバンドからなる 2 種類のバンドパターンが 5 家系で分離した (図-1)。これら 5 家系間の不均一性の検定を行ったところ 5% レベル

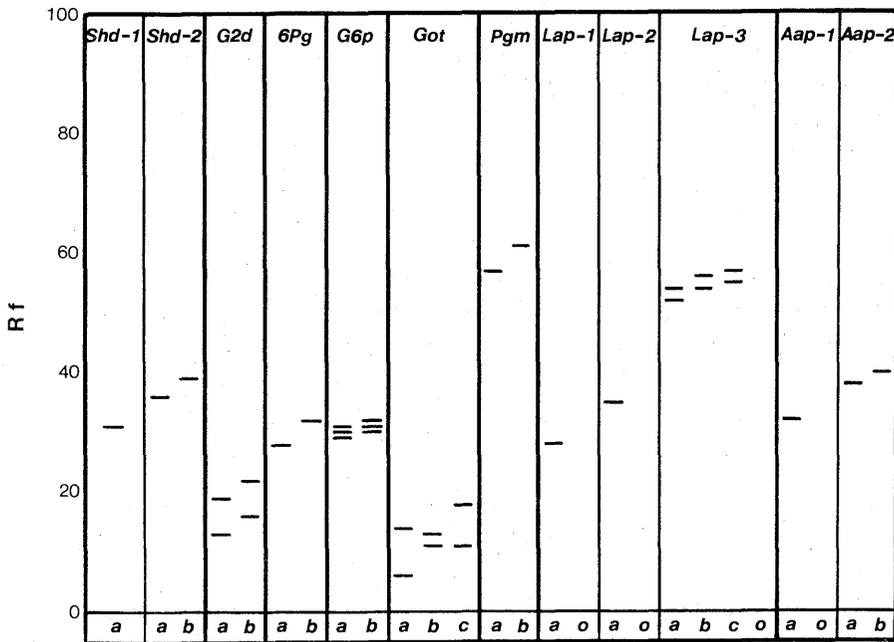


図-1. 8 酵素種の 12 遺伝子座におけるアイソザイムのバンドパターンとそれらに対応する対立遺伝子 Isozyme banding patterns and their allelic designations for 12 loci of 8 enzyme systems Rf is the migrational distance relative to that of the bromophenol blue front.

表-1. ヘテロ接合型の精英樹クローンの雌性配偶体におけるアイソザイムの分離
 Isozyme segregation in megagametophytes of heterozygous plus-tree clones

Locus	No. of families	Genotype	Assayed no.	Segregation	Heterogeneity		Deviation	
					G(df)	P	G(1)	P
<i>Shd-2</i>	5	<i>a/b</i>	88	35 : 53	9.74(4)	<0.05	—	—
				[31 : 37]	5.37(3)	0.15	0.53	0.47]*
<i>G2d</i>	7	<i>a/b</i>	131	57 : 74	4.99(6)	0.55	2.20	0.14
<i>Mdh-1</i>	5	<i>a/b</i>	81	36 : 45	0.60(4)	0.97	1.00	0.32
<i>Mdh-3</i>	1	<i>a/b</i>	20	15 : 5	—	—	5.10	<0.05
				4	<i>b/c</i>	89	42 : 47	2.85(3)
<i>Mdh-4</i>	13	<i>a/b</i>	239	123 : 116	11.89(12)	0.46	0.20	0.66
<i>6Pg</i>	1	<i>a/b</i>	15	8 : 7	—	—	0.06	0.80
<i>G6p</i>	10	<i>a/b</i>	121	61 : 60	11.13(9)	0.27	0.01	0.93
<i>Got</i>	1	<i>a/b</i>	21	9 : 12	—	—	0.42	0.52
				4	<i>a/c</i>	90	44 : 46	2.61(3)
<i>Pgm</i>	4	<i>a/b</i>	81	37 : 45	5.29(3)	0.16	0.78	0.38
				6	<i>a/o</i>	110	63 : 57	7.95(5)
<i>Lap-1</i>	8	<i>a/o</i>	160	79 : 81	13.65(7)	0.06	0.02	0.88
<i>Lap-2</i>	8	<i>a/b</i>	164	89 : 75	8.59(7)	0.29	1.19	0.28
				1	<i>a/c</i>	15	6 : 9	—
<i>Lap-3</i>	1	<i>a/o</i>	25	10 : 15	—	—	0.99	0.32
				3	<i>b/c</i>	56	28 : 28	1.00(2)
<i>Aap-1</i>	10	<i>a/o</i>	173	18 : 12	—	—	1.19	0.28
				1	<i>c/o</i>	30	76 : 97	28.47(9)
<i>Aap-2</i>	4	<i>a/b</i>	64	[56 : 56]	3.71(6)	0.72	0.00	—]*
				35 : 29	2.85(3)	0.42	0.56	0.46

* G-test for heterogeneity and goodness-of-fit to 1 : 1 ratio were made excluding data of families with significant segregation distortion.

表-2. *Shd-2* および *Aap-2* 遺伝子座で分離の歪がみられた精英樹クローンとそれらのアイソザイムの分離

Plus-tree clones with significant segregation distortion and their isozyme segregation in megagametophytes at *Shd-2* and *Aap-2*

Locus	Plus-tree clone	Genotype	Segregation	Deviation	
				G(1)*	P
<i>Shd-2</i>	Maebashi 2	<i>a/b</i>	4 : 16	7.52	<0.01
<i>Aap-2</i>	Ohtaki 108	<i>a/o</i>	5 : 16	5.92	<0.05
	Ohtaki 113	<i>a/o</i>	3 : 22	15.99	<0.01
	Ohtaki 121	<i>a/o</i>	12 : 3	5.60	<0.05

* Degree of freedom.

で有意な値を示した(表-1)。これは前橋2の分離の歪が1%レベルで有意であったためであり(表-2)、これを除く他の4家系の観察値を合計した値で適合性検定を行ったところ、メンデル遺伝に従った分離を確認した。以上の結果から ShDH は単型的な *Shd-1* 遺伝子座と2対立遺伝子を持つ *Shd-2* 遺伝子座によって支配されていると考えられる。CHUNG and LEE(1983)は ShDH を支配する1遺伝子座を明らかにしている。

2. グリセリン酸脱水素酵素(G2DH)

G2DH では1つのゾーン(Rf13~22)を観察し、2本のバンドからなる2種類のバンドパターンが7家系で分離した(図-1)。これら7家系の観察値を合計した値で適合性検定を行った結果、観察された分離比は期待分離比に適合した(表-1)。したがって、少なくともこのゾーンは1遺伝子(*G2d*)によって支配されている。*Pinus thunbergii* (SHIRAISHI, 1988)や *Pinus densiflora* (Na'iem et al., 1989)においても、G2DH で2本のバンドからなるバンドパターンが報告されている。

3. リンゴ酸脱水素酵素(MDH)

MDH ではザイモグラムを五つのゾーンに分けた。最も移動度の大きなゾーンでは活性が不安定なため遺伝子分析を行わなかった。最も移動度の小さなゾーン(Rf15~21)と移動度の大きなゾーン(Rf33~37)ではそれぞれ1本のバンドからなる2種類のバンドパターンを観察し(図-2, 3)、両方ともメンデル遺伝に従った分離がみられた(表-1)。したがってこれらのゾーンでそれぞれ2対立遺伝子を持つ *Mdh-1* と *Mdh-4* 遺伝

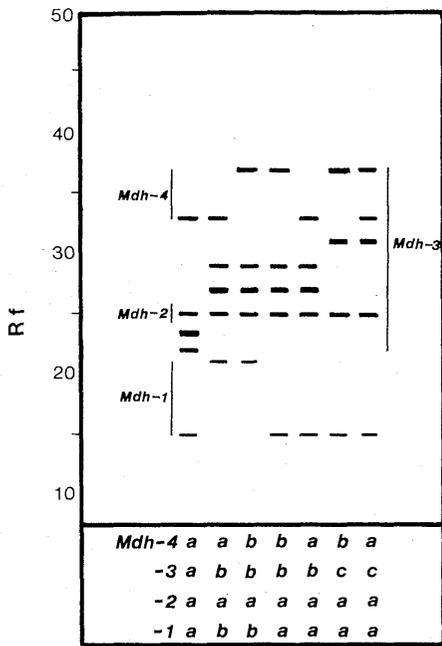


図-2. リンゴ酸脱水素酵素(MDH)の4遺伝子座において観察されたアイソザイムのバンドパターンとそれらに対応する遺伝子型
Isozyme banding patterns observed and their genotypes for four loci which encode malate dehydrogenase(MDH)

子座が明らかになった。

Rf25のゾーンとRf22~37のゾーンでは高活性のバンドを7本観察した(図-2, 3)。Rf25のゾーンではすべての家系で1本のバンドを観察した。一方、Rf22~37のゾーンでは1本のバンドからなる3種類のバンド(Rf22, 29, 37)を観察し、それらは5家系で分離した。Rf22とRf29のバンドは唯一王滝119で分離したが、その分離比は期待分離比に適合しなかった。一方、Rf29とRf37のバンドは4家系で分離し、4家系の観察値を合計した値で適合性検定を行った結果、メンデル遺伝に従った分離を確認した(表-1)。すべての雌性配偶体において、これら二つのゾーンのバンドの中間に、さらに1本のバンドがあらわれた(図-2, 3)。*Pseudotsuga menziesii* (EL-KASSABY, 1981; EL-KASSABY *et al.*, 1982)のMDHでもチョウセンゴヨウと同様なバンドパターンが観察されており、そのバンドの分離からMDHを支配する4遺伝子座が解明されている。それらのうちMdh-2とMdh-3遺伝子座間ではヘテロダイマーが形成され、そのバンドは二つのゾーンのバンドの中間にあらわれる。また同様の報告が*Pinus ponderosa* (O'MALLY *et al.*, 1979)でなされている。したがってチョウセンゴヨウでも2遺伝子座間で形成されるヘテロダイマーのバンドが出現したと考えられる。以上の結果からこれらのゾーンはそれぞれMdh-2とMdh-3遺伝子座によって支配されてい

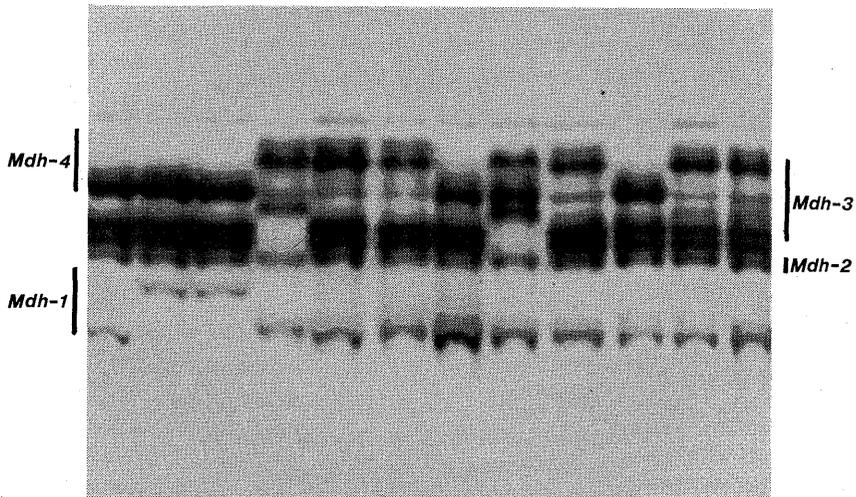


図-3. リンゴ酸脱水素酵素(MDH)で観察されたバンドパターンの分離
Segregation of banding patterns observed in malate dehydrogenase(MDH)
This zymogram shows segregation of banding patterns in three MDH loci (*Mdh-1*, *Mdh-3*, and *Mdh-4*).

ると考えられる。

4. 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGD)

6PGDでは一つのゾーン(Rf28~32)を観察し(図-1), 明らかに1遺伝子座に支配されることが予想された。唯一王滝112において1本のバンドからなる2種類のバンドパターンが分離し、適合性検定の結果メンデル遺伝に従った分離を確認した(表-1)。したがって2対立遺伝子を持つ6Pg遺伝子座が明らかとなった。

5. グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)

G6PDではRf29~32のゾーンに3本のバンドからなる2種類のバンドパターンが6家系で分離した(図-1)。他の針葉樹では、雌性配偶体におけるG6PDアイソザイムのバンドパターンは1本のバンドからなるものが多く報告されている(EL-KASSABY *et al.*, 1982; SHIRAIISHI, 1988; Na'iem *et al.*, 1989)。観察されたバンドパターンの分離比は1遺伝子座によって支配されることを想定した場合の分離比に適合したことから(表-1), 少なくともG6PDを支配する1遺伝子座(G6p)が明らかとなった。

6. アスパラギン酸アミノ転移酵素(GOT)

GOTではザイモグラムを三つのゾーンに分けた。移動度の大きなゾーンでは3~4本のバンドを観察したが、変異がほとんどなかったため遺伝子分析を行わなかった。移動度の小さなゾーン(Rf6~18)では高活性の2本のバンドからなる3種類のバンドパターンが5家系で分離した(図-1)。観察されたバンドパターンの分離は1遺伝子座によって支配されることを想定した場合の分離比に適合したため(表-1), 少なくともこのゾーンは1遺伝子座(Got)によって支配されている。KIM *et al.* (1982)が報告したGOTのバンドパターンは泳動条件が違うにも関わらず、本研究で観察されたものと非常によく似ている。さらにPinus rigida (GURIES and LEDIG, 1978), Picea abies (LUNDKVIST, 1979)においても同様なバンドパターンが報告されている。

7. ホスホグルコムターゼ(PGM)

PGMでは二つのゾーンを観察した。移動度の小さなゾーンは非常に活性が低く不安定であるため遺伝子分析を行わなかった。移動度の大きなゾーン(Rf57~61)では1本のバンドからなる2種類のバンドパターンが4家系で分離し(図-1), 明らかに1遺伝子座に支配されていることが予想された。4家系を用いて分離比の適合性検定を行った結果(表-1), このゾーンは2対立遺伝子を持つPgm遺伝子座によって支配されて

いることがわかった。CHUNG and LEE (1983)はPGMを支配する2遺伝子座を明らかにしている。

8. ロイシンアミノペプチターゼ(LAP)

LAPでは四つのゾーンを観察した。移動度の最も大きなゾーンでは何本かのバンドを観察したが、活性が不安定なため遺伝子分析を行わなかった。Rf28とRf35の二つのゾーンでは1本のバンドを持つ活性型とバンドを持たない不活性型を観察し(図-1), 両ゾーンとも活性型と不活性型の分離比は期待分離比に適合した(表-1)。したがってこれらのゾーンはそれぞれ2対立遺伝子を持つLap-1とLap-2遺伝子座によって支配されている。Rf52~57のゾーンでは2本のバンドからなる3種類の活性型と不活性型の計4種類のバンドパターンを観察した(図-1)。14家系でバンドパターンの分離がみられ、適合性検定の結果メンデル法則に従った分離を確認した(表-1)。したがってこのゾーンのバンド群はLap-3遺伝子座の3種類の活性型遺伝子と不活性型遺伝子の計4種類の対立遺伝子によって支配されている。P. densiflora(Na'iem *et al.*, 1989)においても、2本のバンドからなるバンドパターンを支配している遺伝子座が検出されている。またPARK (1983)は、本研究と同様にLAPを支配する3遺伝子座を明らかにしている。

9. アラニンアミノペプチターゼ(AAP)

AAPではLap-1, Lap-2に支配されるバンドも観察された。これはLAPがAAPの基質として用いたL-アラニンβ-ナフチルアミドに対しても基質特異性を有しているためであると考えられる(SCANDALIOS, 1969)。したがって今回、Lap-1, Lap-2遺伝子座に支配されるバンド以外のものをAAPのバンドとして遺伝子分析の対象とした。ザイモグラムは三つのゾーンに分けられ、このうち移動度の最も大きなゾーンでは変異のない2本の活性の高いバンドを観察した。

Rf32のゾーンではそれぞれ活性の低い1本のバンドを持つ活性型とバンドを持たない不活性型を観察した(図-1)。バンドが分離した家系間で不均一性の検定を行った結果、1%レベルで有意な値を示した(表-1)。これは王滝108, 王滝113, 王滝121の3家系において分離が有意に歪んでいたためであり(表-2), 残りの7家系で適合性検定を行ったところメンデル遺伝に従った分離を確認した。以上の結果からこのゾーンは活性型遺伝子と不活性型遺伝子を持つAap-1遺伝子座によって支配されていると考える。Rf38~40のゾーンでは低活性の1本のバンドからなる2種類のバンドパ

ターンを観察した(図-1)。5家系を用いて適合性検定を行った結果、期待分離比に適合した分離を示したので(表-1)、このゾーンで2対立遺伝子を持つ *Aap-2* 遺伝子座が明らかになった。

以上で述べたように、ヘテロ接合型の延べ97クローンから得られた雌性配偶体の分離をもとに遺伝子分析を行った結果、調査した9酵素種は少なくとも16遺伝子座の合計34対立遺伝子に支配されていることが解明された。KIM *et al.* (1982), CHUNG and LEE (1983) および PARK (1983) はチョウセンゴヨウの遺伝子分析を行い、本研究と重複した4酵素種(ShDH, GOT, PGM, LAP)において7遺伝子座、16対立遺伝子を明らかにしている。本研究においても7遺伝子座、16対立遺伝子を検出したが、アイソザイム分析の条件が違いため、これら両者を単純に比較することはできない。しかし少なくともShDHで検出した2遺伝子座のうち、どちらか一方は今回新たに検出したものである。さらに本研究では上記4酵素種以外の5酵素種(G2DH, MDH, 6PGD, G6PD, AAP)で9遺伝子座、18対立遺伝子を明らかにした。したがって合計10遺伝子座が新たに標識遺伝子として利用可能となった。

統計的に有意な分離の歪が延べ9家系あり、特定の3クローン(前橋2, 王滝108, 王滝121)では2遺伝子座以上で分離が歪んだ。これらの分離の歪の原因として、(1)偶然によるもの、(2)アイソザイム遺伝子への選択の影響、(3)配偶子致死遺伝子などとの連鎖、さらに(4)種子の採取および精選時における他家系材料の混入が考えられる。

これまでのアイソザイム研究の結果、高等2倍体植物において代謝系の酵素種を支配する遺伝子座の最小数は一定であることが解明されている(矢原, 1988)。MDHの最小遺伝子座数は3であり、これらの遺伝子によって形成された酵素蛋白はそれぞれミトコンドリア、マイクロボディ、細胞質ゾルに存在する(GOTTLIEB, 1981; NEWTON, 1983)。またこれらのうちの2遺伝子座間でヘテロダイマーは形成されない。ところがチョウセンゴヨウのMDHにおいて最小遺伝子座数以上の4遺伝子座が検出され、そのうちの2遺伝子座(*Mdh-2*, *Mdh-3*)間でヘテロダイマーが形成されることが明らかになった。この事実はこれらの2遺伝子座が遺伝子重複に起源したことを示唆する。

さらに本研究で対象とした酵素種のうち最小遺伝子座数が解明されている酵素種とその数は、ShDH,

6PGD, G6PD, PGMの2, MDHの3, GOTの4である。したがって6PGD, G6PD, GOT, PGMでは最小遺伝子座数より少ない遺伝子座しか検出できなかった。その原因として6PGD, G6PD, PGMにおいては、抽出と泳動条件が適当でなかったことに起因する酵素の失活、遺伝子発現の組織特異性および分析個体の生理的状态などが考えられる(矢原, 1988)。これらの酵素種については、分析技術を改良することや雌性配偶体以外の組織を供試することによって安定した活性を持つバンドパターンを検出し、それを支配する遺伝子座が明らかにできると思われる。またGOTなどで観察したバンドのうち遺伝子分析が行われなかったものについては、今回使用した家系以外の家系の種子を実験材料として用いることにより新たな遺伝子座が解明できると思われる。

おわりに、チョウセンゴヨウの種子を提供していただいた関東林木育種場および同長野事業場の各位に厚く感謝申し上げます。

引用文献

- ADAMS, W. T. and JOLY, R. J.: Allozyme studies in loblolly pine seed orchards. Clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. *Silvae Genet.* **29**: 1~4, 1980
- CHUNG, H. G. and LEE, S. K.: Inheritance of three isozymes in *Pinus koraiensis*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea **19**: 87~92, 1983 (in Korean with English Summary)
- CONKLE, M. T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B., and HUNTER, S. C.: Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. Gen. Technical Report PSW-64, USDA Forest Service, 18 pp, 1982
- DAVIS, B. J.: Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404~427, 1964
- EL-KASSABY, Y. A.: Genetic interpretation of malate dehydrogenase isozymes in some conifer species. *J. Hered.* **72**: 415~452, 1981
- _____, YEH, F. C., and SZIKLAI, O.: Inheritance of allozyme variants in coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*). *Can. J. Genet. Cytol.* **24**: 325~335, 1982
- GOTTLIEB, L. D.: Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.* **7**: 1~46, 1981
- GURIES, R. P. and LEDIG, F. T.: Inheritance of some polymorphic isoenzymes in pitch pine (*Pinus rigida* MILL.). *Heredity* **40**: 27~32, 1978
- KIM, Z. S., SON, W. H., and YOUN, Y. K.: Inheritance of leucine aminopeptidase and glutamate-oxalate transaminase isozymes in *Pinus koraiensis*.

- Korean J. Genet. 4: 25~31, 1982
- LUNDKVIST, K.: Allozyme frequency distributions in four Swedish populations of Norway spruce (*Picea abies* K.): I. Estimations of genetic variation within and among populations, genetic linkage and a mating system parameter. *Hereditas* 90: 127~143, 1979
- MARTY, T. L., O'MALLEY, D. M., and GURIES, R. P.: A manual for starch gel electrophoresis: new microwave edition. Staff Paper Series 20, 24 pp, Dep. For., Univ. of Wisconsin-Madison, 1984
- Na'iem, M., TSUMURA, Y., UCHIDA, K., NAKAMURA, T., SHIMIZU, S., and OHBA, K.: Inheritance of isozyme variants of megagametophyte in Japanese red pine. *J. Jpn. For. Soc.* 71: 425~434, 1989
- NEWTON, K. J.: Genetics of mitochondrial isozymes. *In* Isozymes in plant genetics and breeding, Part A (TANKSLEY, S. D., and ORTON, T. J., eds.). 157~174, Elsevier, Amsterdam, 1983
- O'MALLEY, D. M., ALLENDORF, F. W., and BLAKE, G. M.: Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in *Pinus ponderosa*. *Biochem. Genet.* 17: 233~250, 1979
- ORNSTEIN, L.: Disc electrophoresis-I: Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 321~349, 1964
- PARK, Y. G.: Inheritance of leucine aminopeptidase, esterase and peroxidase isozymes in *Pinus koraiensis*. *Korean J. Breed.* 15: 147~153, 1983
- PLESSAS, M. E. and STRAUSS, S. H.: Allozyme differentiation among populations, stands, and cohorts in Monterey pine. *Can. J. For. Res.* 16: 1155~1164, 1986
- SCANDALIOS, J. G.: Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: A review. *Biochem. Genet.* 3: 37~74, 1969
- SHIRAISHI, S.: Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* PARL. *Silvae Genet.* 37: 93~100, 1988
- SOKAL, R. R. and ROHLF, F. J.: *Biometry*. 859 pp, W. H. Freeman and Company, New York, 1981
- TSUMURA, Y., UCHIDA, K., and OHBA, K.: Genetic control of isozyme variation in needle tissues of *Cryptomeria japonica*. *J. Hered.* 80: 291~297, 1989
- 矢原徹一: 酵素多型を用いた高等植物の進化学的研究—最近の進歩. *種生物学研究* 12: 26~55, 1988

(1989年5月31日受理)