ノート

四倍体ニラにおける複相大孢子形成性の遺伝様式と分離集団の作成

中澤佳子¹⁾・松本紀子^{1,2)}・飯村一成^{1,3)}・天谷正行^{1,4)}・生井 潔^{1,5)}

¹⁾ 栃木県農業試験場, 栃木県宇都宮市, 〒 320-0002

²⁾ 栃木県河内農業振興事務所, 栃木県宇都宮市, 〒 321-0974

³⁾ 栃木県農業試験場いちご研究所, 栃木県栃木市, 〒 328-0007

⁴⁾ 栃木県安足農業振興事務所, 栃木県佐野市, 〒 327-8503

⁵⁾ 栃木県農業大学校, 栃木県宇都宮市, 〒 320-3233

Estimating the inheritance and generating the segregated population of diplospory in tetraploid Chinese leek (*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum*)

Yoshiko Nakazawa¹⁾, Noriko Matsumoto^{1,2)}, Kazunari Iimura^{1,3)}, Masayuki Amagai^{1,4)} and Kiyoshi Namai^{1,5)}

¹⁾ Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station, Utsunomiya, Tochigi 320-0002, Japan

²⁾ Tochigi Prefectural Kawachi Agricultural Promotion Office, Utsunomiya, Tochigi 321-0974, Japan

³⁾ Strawberry Research Center, Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station, Tochigi, Tochigi 328-0007, Japan

⁴⁾ Tochigi Prefectural Ansoku Agricultural Promotion Office, Sano, Tochigi 327-8503, Japan

⁵⁾ Tochigi Prefectural College of Agriculture, Utsunomiya, Tochigi 320-3233, Japan

キーワード

Allium ramosum, *Allium tuberosum*, ニラ, アポミクシス, 複相大孢子形成, 単為発生, 分離集団

緒言

日本で栽培されているニラ (*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum*) 品種・系統の多くは四倍体 ($2n=4x=32$) で (Kojima *et al.* 1994), 条件的アポミクシス性を有している (Kojima *et al.* 1991). ニラが有する条件的アポミクシス性は, 核内倍加した胚嚢母細胞が減数分裂することで生じる非減数性胚嚢形成 (複相大孢子形成: diplospory) と, 卵細胞が受精することなく自律的に胚発生を開始する単為発生 (parthenogenesis) の二つの要因から成り立っている (Kojima and Nagato 1992a, b). アポミクシスは種子親と全く同じ遺伝子型のクローン種子を生じる生殖様式である. このため, アポミクシス性に関わる遺伝子を制御することができれば, ヘテロシスの早期固定化による品種開発年限の短縮や均質な種子生産が可能になり採種の負担が減じるなど, 育種事業の効率化が図られることが期待されている (Hanna and Bashaw 1987, 鳥山 1987, 中島 1990).

栃木県は日本有数のニラ産地であり, 1986 年からニラの交雑育種に取り組んでいる. しかし, 多くのニラ品種

は高いアポミクシス性を持つことから, これを種子親とした交雑種子が得られにくく, ほ場に展開した株の大部分は種子親のクローンとなるため, 育種の効率性や遺伝的変異拡大の障害となっていた. そこで, まず, 定植前の幼苗の段階で交雑個体を選抜することにより, 交雑育種の効率化を試みた. 当初は, エステラーゼアイソザイム多型を利用した交雑個体の識別が実施された (天谷 1996). しかし, エステラーゼアイソザイムはザイモグラムのパターンが限定されており, 利用できる交配組合せが限られることから, その後, 花粉親に特異的な RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーを利用した交雑個体の選抜が実施された (中澤ら 2005). その結果, 選抜した交雑個体のみをほ場で評価することができるようになり, 育種効率が飛躍的に向上し, 新品種「ゆめみどり」が育成された (大島ら 2017). また, 交雑個体の中から単為発生が起らない個体 (非単為発生性個体) を探索し, それらが交雑率 100% の四倍体両性生殖性個体であることを確認した. そして, 非単為発生性個体と単為発生性個体の交雑から得られた集団を用いた遺伝解析の結果, 単為発生を支配する主働遺伝子は単一の優性因子であること, 複相大孢子形成と単為発生は異なる因子に支配されていることが示唆された (中澤ら 2006). さらに, 単為発生性については, 単為発生性に関する分離集団を用いたバルクセグレガント法によって連

編集委員: 西尾 剛

2019 年 10 月 15 日受領 2020 年 2 月 7 日受理

2020 年 3 月 20 日 J-STAGE 早期公開

Correspondence: nakazaway03@pref.tochigi.lg.jp

鎖マーカー PLM (Parthenogenesis Linked Marker) が開発された (天谷ら 2010). それ以降, 栃木県のニラ育種では, 両性生殖性個体と単為発生性連鎖マーカーを利用した新品種育成を行っている (齋藤ら 2012).

しかしながら, ニラの新品種には, 栽培上有用な形質だけではなく, アポミクシスを利用した安定した種子生産が前提となるため, 複相大孢子形成性と単為発生性の両方の形質を有し, かつ高頻度にアポミクシス性を発現する特性が望まれる. 一方, 中間母本として用いられている両性生殖性個体は, 複相大孢子形成性と単為発生性の両方の形質を持たず, かつ交雑個体が四倍体を維持する特性が求められる. 以上の理由により, 単為発生性連鎖マーカーだけではなく, 複相大孢子形成性連鎖マーカーも開発する必要がある.

本報では, もう一つのアポミクシスの要因である複相大孢子形成性に連鎖したマーカーを開発するため, 複相大孢子形成性の遺伝様式を明らかにするとともに, 複相大孢子形成性に関する分離集団を作成したので報告する.

材料および方法

1. 供試材料および分離集団作成経過

非複相大孢子形成性かつ非単為発生性系統の四倍体「97-12-102 ($2n=4x=32$)」を種子親とし, 複相大孢子形成性かつ非単為発生性系統の四倍体「97-11-7 ($2n=4x=32$)」を花粉親として交配を行い, 得られた実生個体集団を育成した (図 1). 交配は 2002, 2003 および 2005 年に行った. また, 「97-12-102」を種子親とし, 複相大孢子形成性かつ非単為発生性系統の四倍体「97-12-43 ($2n=4x=32$)」を花粉親として交配を行い, 得られた実生個体集団を育成した (図 1). 交配は 2006 年に行った. 両集団とも, 中澤ら (2006) と同様の手法で, 交配, 採種および播種を行って実生苗を育成し, さらに種子親には存在せず花粉親にのみ存在する DNA マーカーを用いて交雑を確認後, フローサイトメーター (プロイディアナライザー PA 型, Partec 社) を用いて倍数性を推定した.

2. F_1 個体の複相大孢子形成率調査

複相大孢子形成率は, Kojima and Nagato (1992a) で

図 1. 複相大孢子形成に関する分離集団の系譜.

D: 複相大孢子形成性, d: 非複相大孢子形成性, P: 単為発生性, p: 非単為発生性, ♀: 種子親, ♂: 花粉親.

は, 第一分裂中期の胚嚢母細胞を観察することで算出していたが, 本研究では, F_1 個体の後代実生の倍数性を調査することにより推定した. 具体的には, (97-12-102 × 97-11-7) F_1 集団および (97-12-102 × 97-12-43) F_1 集団を育成し, 各 F_1 個体から自然交雑により採種した. 各 F_1 個体からの採種は, (97-12-102 × 97-11-7) F_1 集団では 2005 ~ 2007 および 2009 年に, (97-12-102 × 97-12-43) F_1 集団では 2007 ~ 2009 年に行った. 得られた種子をセルトレイに播種し, 播種後 1 ~ 2 か月程度の後代実生苗の倍数性をフローサイトメーターにより推定した. 後代実生苗の倍数性が四倍体 ($2n=4x$) の場合は複相大孢子形成を行わない減数性卵細胞と減数性花粉との交雑によって得られた実生であると判定し, 六倍体 ($2n=6x$) の場合は複相大孢子形成に起因する非減数性卵細胞と減数性花粉との交雑によって得られた実生であると判定した. そして, それらの割合から F_1 個体の複相大孢子形成率を調査した (図 2). また, 枯死, 不抽苔により調査できなかった F_1 個体や, 不稔や発芽不良等により後代実生苗数が少なく, 複相大孢子形成の有無について判断できない F_1 個体は, 集団から除いた.

結果および考察

「97-12-102」は, 交雑率が 100% で, 「97-12-102」を種子親としたときの F_1 個体のほとんどが四倍体であることから, 複相大孢子形成性および単為発生性の両方の因子を保有していない系統である. 一方, 「97-11-7」および「97-12-43」は, 交雑率が 100% で, 「97-11-7」および「97-12-43」を種子親としたときの F_1 個体のほとんどが六倍体であることから, 複相大孢子形成性因子は保有しているが, 単為発生性因子を保有していない系統である (中澤ら 2006). よって, 「97-12-102」を種子親とした「97-11-7」または「97-12-43」との交雑集団は, 複相大孢子形成性について分離することが予想されたため, 同因子に連鎖するマーカー開発の材料として期待できると考え, 交配を行った. その結果, (97-12-102 × 97-11-7) および (97-12-102 × 97-12-43) の交配実生はすべて交雑が確認され, フローサイトメーターによる倍数性調査では, ほとんどが四倍体と推定された (表 1). また, (97-12-102 × 97-11-7) の交配実生で四倍体と六倍体の中間と推定された 2 個体の F_1 については, マーカー開発に支障があ

※複相大孢子形成率(%) = (6xの後代実生数) / (4xおよび6xの後代実生数) × 100

図 2. F_1 個体の複相大孢子形成率調査方法.

表 1. フローサイトメーターにより推定した F₁ 集団の倍数性

交雑組合せ	調査個体数	推定された倍数性毎の個体数		
		4x	中間型 ¹⁾	6x
97-12-102×97-11-7	153	151	2	0
97-12-102×97-12-43	73	73	0	0

¹⁾ 中間的な値を示すため、異数体と推定される個体。

ると判断したため、除外した。

次に、(97-12-102×97-11-7) F₁ 集団および (97-12-102×97-12-43) F₁ 集団において、後代実生個体の倍数性を測定することで複相大孢子形成率を調査した。六倍体の出現には非減数性花粉が関与する場合も考えられることから、後代実生において六倍体個体の割合が 0~20% の場合は、翌年以降に再調査を実施した。前者の集団では、定植後、29 個体が枯死し、7 個体が不稔や発芽不良等により後代実生苗数が少なく、複相大孢子形成の有無について判断できなかったため、115 個体について複相大孢子形成率を算出した。後者の集団では、定植後、11 個体が枯死し、2 個体が不抽苔で、4 個体が不稔や発芽不良等により後代実生苗数が少なく、複相大孢子形成の有無について判断できなかったため、56 個体について複相大孢子形成率を算出した (図 3)。その結果、(97-12-102×97-11-7) F₁ 集団については、48% (55/115 個体)、(97-12-102×97-12-43) F₁ 集団については、55% (31/56 個体) が複相大孢子形成個体であった。両集団ともに複相大孢子形成個体と非複相大孢子形成個体がほぼ 1:1 に分離したことから、「97-11-7」や「97-12-43」には一つの

図 3. 2 組合せの F₁ 集団における複相大孢子形成率の分布。

表 2. 交雑後代 (F₁) のカイ二乗検定による複相大孢子形成因子数の推定

交雑組合せ	調査個体数	観察値 (D:N) ¹⁾	花粉親の推定遺伝子型 ²⁾	理論分離比 (D:N) ³⁾	χ^2 値	自由度	p 値
97-12-102×97-11-7	115	55:60	Dddd	C1 (1:1) 57.5:57.5	0.217	1	0.641
				C2 (13:15) 53.4:61.6	0.089	1	0.765
97-12-102×97-12-43	56	31:25	Dddd	C1 (1:1) 28:28	0.642	1	0.423
				C2 (13:15) 26:30	1.790	1	0.180

¹⁾ D: 複相大孢子形成個体数, N: 非複相大孢子形成個体数を意味する。

²⁾ 種子親の遺伝子型は dddd とした。

³⁾ C1: 染色体分離, C2: 染色单体分離を想定した理論分離比。

優性の複相大孢子形成因子が存在することが示唆された。

複相大孢子形成因子を優性 (D) とし、受粉時の遺伝子型による伝達率の偏りが無く、全て同一の遺伝子座が関与すると仮定して、染色体分離と染色单体分離それぞれの場合を想定してカイ二乗検定を行った (表 2)。この結果、「97-11-7」および「97-12-43」では二つの想定される分離様式において、いずれも複相大孢子形成因子が一つ (Dddd) とする仮説に適合した。このことは、ニラと同様に複相大孢子アポミクシス性を持つヒメジョオン (*Erigeron annuus*) やタンポポ (*Taraxacum officinale*) での報告と一致する (Noyes and Rieseberg 2000, Noyes 2005, van Dijk and Bakx-schotman 2004)。一方で、複相大孢子形成率は F₁ 個体間で大きく変動していた (図 3)。これは、単為発生率と同様の現象であり (中澤ら 2006)、主働遺伝子とは別の補助的な遺伝子が関与していることが示唆された。また、今回用いた実験集団において、枯死や発芽不良が認められた。これが、個体固有の遺伝子発現によるものか育成環境によるものかは不明であるが、アポミクシスに関する形質の発現変動について解明していくためにも興味深い現象である。さらに、F₁ 個体の後代実生において異数体と推定される個体が稀にはあるが確認された。そこで、フローサイトメーターで四倍体と六倍体の中間と推定された後代実生 3 個体について、根を酢酸オルセイン液で染色し、押しつぶし法により顕微鏡観察したところ、1 個体は染色体数が 40 本であったが、2 個体は 42 本であった。過去の研究で、両性生殖性系統を種子親として得られた交雑個体中には、数% の割合で異数体と推定される個体がフローサイトメーターで検出されている (中澤ら 2006)。今後、ニラのアポミクシス機構を解明するには、染色体レベルでの解析も必要であると考えている。

現在、栃木県農業試験場では、両性生殖性系統と単為

発生性連鎖マーカーを用いた育種システムをニラ育種に利用している。これによって、得られた後代は 100% 交雑個体になる上、形質変異に富んだニラが出現している (斎藤ら 2012)。さらに、単為発生性連鎖マーカーを用いることで、アポミクシス性の新品種候補が選抜出来るだけでなく、両性生殖性で優れた特性を有する中間母本の育成も可能となる。

一方、二倍体のニラにおける遺伝様式の解明では、単為発生が成り立つには、その前提として複相大孢子形成が必要であることが示唆されている (Yamashita *et al.* 2012)。四倍体のニラにおいても、単為発生には複相大孢子形成が必須であれば、単為発生性に連鎖したマーカー選抜だけでは、理論上 1/2 の確率でアポミクシス性を持たない個体を選抜してしまう危険性がある。今後、本研究で作成した分離集団を用いて、単為発生性連鎖マーカー開発と同様に (天谷ら 2010)、複相大孢子形成性に連鎖したマーカーの開発を進めていく。また、単為発生性連鎖マーカー開発時には、RAPD マーカーのみを用いたが、今後は、生井ら (2013) が作成したニラの EST-SSR (Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat) マーカーと、田崎ら (2015) が作成したニラの RNA-seq や SSR 濃縮ライブラリーのシーケンス情報から設計した 6,000 以上の SSR プライマー対を用いて研究を進めていきたいと考えている。複相大孢子形成性に連鎖したマーカーが開発されることで、新たなニラ育種システムの構築とともに、ニラのアポミクシス機構の解明が進むことを期待する。

謝 辞

栃木県農業試験場園芸技術部野菜研究室 (現 開発研究部野菜研究室) には、ニラの採種および栽培管理に関し多大なる援助をいただいた。また、同生物工学部遺伝

子工学研究室 (現 開発研究部生物工学研究室) の研究員の皆様ならびに阿久津操技術員には、材料養成において多大な尽力を頂いた。ここに厚く御礼を申し上げる。

引用文献

- 天谷正行 (1996) 栃木農試研報 44: 29-35.
 天谷正行・中澤佳子・松本紀子・飯村一成 (2010) 育種学研究 12: 73-80.
 Hanna, W.W. and E.C. Bashaw (1987) Crop Sci. 27: 1136-1139.
 Kojima, A., Y. Nagato and K. Hinata (1991) Japan. J. Breed. 41: 73-83.
 Kojima, A. and Y. Nagato (1992a) Sex. Plant Reprod. 5: 72-78.
 Kojima, A. and Y. Nagato (1992b) Sex. Plant Reprod. 5: 79-85.
 Kojima, A., T. Kozono, Y. Nagato and K. Hinata (1994) Breed. Sci. 44: 143-149.
 中島阜介 (1990) 育種学最近の進歩 31: 35-48.
 中澤佳子・生井 潔・酒井美幸・田崎公久・小林俊一・小玉弘恵・土屋久子・木村 栄・室井栄一・石原良行ら (2005) 栃木農試研報 55: 27-32.
 中澤佳子・生井 潔・小島昭夫・小林俊一・田崎公久・天谷正行 (2006) 育種学研究 8: 89-98.
 生井 潔・田崎公久・柏谷祐樹・中澤佳子 (2013) 育種学研究 15 (別): 32.
 Noyes, R.D. and L.H. Rieserberg (2000) Genetics 155: 379-390.
 Noyes, R.D. (2005) Heredity 94: 193-198.
 大島一則・青木雅子・佐藤隆二・齋藤容徳・仁平祐子・稲葉幸雄・天谷正行・松本紀子・中澤佳子・若樹睦子ら (2017) 園学研 16: 401-408.
 齋藤容徳・大島一則・松本紀子・癸生川真也・中澤佳子・天谷正行 (2012) 栃木農試研報 68: 15-22.
 田崎公久・若樹睦子・生井 潔・平川英樹・笹本茂美・窪岡久乃・南 千春・磯部祥子 (2016) DNA 多型 24: 127-133.
 鳥山國士 (1987) 農業および園芸 62: 1123-1126.
 van Dijk, P.J. and J.M.T. Bakx-Schotman (2004) Genetics 166: 483-492.
 Yamashita, K., Y. Nakazawa, K. Namai, M. Amagai, H. Tsukazaki, T. Wako and A. Kojima (2012) Breed. Sci. 62: 160-169.