

エステラーゼ酵素多型を利用したニラ交雑個体の選抜

天谷正行

摘要：ニラ育種の効率化を図るため、エステラーゼ同位酵素多型により単為生殖個体と有性生殖個体 (F₁) の識別を行った。研究結果を要約すると以下のとおりである。

1. ニラの同位酵素多型は酸性側に遍在しており、F₁選抜に適する pI レンジは4~6であった。
2. 酵素多型により推定された交雑率は組合せ毎に異なっており、特に小山在来/大分在来の組合せにおいて約30%が交雑していた。しかし、その逆の組合せでは交雑率は4.4%と低く、単為生殖が母親の性質に強く依存していることが明らかとなった。
3. 酵素多型による選抜と従来圃場での選抜とを比較したところ、圃場選抜は逸脱する株数が多く、選抜株中には誤認した株も含まれていることから、酵素多型選抜の有用性が明らかとなった。
4. ニラの遺伝資源38品種・系統についてエステラーゼ同位酵素多型を調査した結果、8グループに分類することができた。しかし酵素多型は68%が同一のグループに属しておりかなり偏っていることが明らかとなった。

キーワード：ニラ、単為生殖、エステラーゼ、同位酵素多型、等電点電気泳動、等電点 (pI)

Selection of hybrid plants by Esterase isozyme polymorphism from cross populations of Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler)

Masayuki AMAGAI

Summary: Reproductive system of Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler) is characterized by high degree of apomixis and have been considered difficult to detect hybrid. In order to discriminate hybrid plants from apomicts in F₁ cross populations, polymorphism of leaf esterase isozyme was analyzed by isoelectric focusing. The polymorphic bands were detected at low isoelectric point and pI range from 4 to 6 was suitable to this study. Frequency of hybrids estimated by the isoelectric focusing was different among cross combinations and particularly highest value of approximately 30 % was observed in the cross between 'Oyama zairai' and 'Oita zairai'. However the frequency in the reciprocal crossing was 4.4 %, the maternal effect on apomixis was observed. The detection of hybrids by the phenotype difference in cross populations involved a lot of apomicts, so the detection by the esterase genotype was a very useful method for of hybrid selection. According to the polymorphism of leaf esterase isozyme, thirty eight varieties of Chinese leek stocks were classified into eight groups, however, 68 % of the varieties showed identical zymogram pattern.

Key words: Chinese leek, *Allium tuberosum*, apomixis, hybrid, esterase isozyme polymorphism, isoelectric focusing

I 緒言

栃木県におけるニラ生産は約430haと日本一を誇り、重要な園芸作物として位置づけられている。しかし、現在の主力品種では抽だいが7月～8月に生ずるため、この時期の出荷調整には労働時間が2倍もかかるという調査結果もあり、生産現場からは晩抽だいい品種の育成が強く要望されている。このような背景をふまえて、栃木県農業試験場では昭和61年からニラ新品種の開発に取り組んでおり²⁾、平成4年には葉幅が広く草型の旺盛な新品種「きぬみどり」の育成に成功した。しかし抽だいい性の改良には至っておらず現在も品種改良は進められているところである。晩抽性ニラ品種の育成に年限を要するのは、一つには有効な遺伝資源の不足をあげることができるが、それよりもむしろニラが単為生殖性の高い植物であるという理由によるところが大きい⁴⁾。牧草類においては単為生殖という性質を利用することで、ヘテロシスの固定や安定した種子生産に成功している例があるが^{8, 11)}、ニラの場合は完全有性生殖個体が見つかっていないことから交雑育種での積極的な利用には至っておらず、F₁優良個体を選抜し早期に種子増殖するという目的で利用されているにすぎない。このことは現在の主力な栽培品種が類似した形質のものばかりになっている要因でもある。

さて、植物育種においては遺伝的類縁関係の解明¹⁾、耐病性などの標識選抜⁹⁾を効率よく行う目的で同位酵素多型による解析が利用されている。小島らはエステラーゼ酵素多型を利用して、ニラの単為生殖率が90%以上であることを明らかにした^{3, 5)}。この結果に従うなら、圃場に展開された株の90%は母親と同じ遺伝子型を持つ個

体であり、これらを識別して排除することがニラ育種の飛躍的な効率化につながるものと考えられる。そこで、ニラの育種場面における同位酵素多型による雑種個体選抜を検討した。1993～94年度に交配して得られたF₁個体について、小島らの方法に若干の改良を加えてエステラーゼ同位酵素多型による選抜を行った結果、ニラの単為生殖率は母親の形質に影響されることと、従来のニラに比べ単為生殖率が低い（有性生殖率が高い）系統のあることが明らかになった。また、遺伝資源の材料を調査した結果、エステラーゼ酵素多型が8のグループに分類されたのでここに報告する。

II 供試材料及び試験方法

1. 供試材料

1) F₁個体選抜材料

小山在来a、小山在来b（カルス経由再分化個体）、小山在来c（カルス経由再分化 個体の中から選抜した抽だいい株）、たいりょう、きぬみどりを交配親とし、当場野菜部の慣行法により交配を行った93, 94交雑系のF₁個体を供試した（第1表）。

2) 遺伝資源調査材料

当場で維持する主な遺伝資源38品種・系統を用いた（第2表）。

2. 試験方法

1) 供試時期

93交雑系のF₁個体選抜は平成7年5月に2年株を用いて行った。また、94交雑系ならびに遺伝資源の調査は平成8年4～5月に行った。

2) 等電点電気泳動条件

新葉30mgを採取し、50mM Tris-HCl (pH 7.5)を100 μ l加

第1表 エステラーゼ酵素多型によるF₁個体選抜結果

交配組合せ	93交雑系			94交雑系		
	供試株数	酵素多型選抜F ₁ 株数(%)	圃場選抜F ₁ 株数(IEFとの一致株数)	供試株数	酵素多型選抜F ₁ 株数(%)	圃場選抜F ₁ 株数(IEFとの一致株数)
小山在来a/たいりょう				285	79 (27.7)	17 (14)
小山在来c/たいりょう	317	97 (30.6)	18 (12)	46	8 (17.4)	1 (0)
たいりょう/小山在来a	113	5 (4.4)	3 (2)	91	4 (4.4)	0 (0)
きぬみどり/小山在来a	137	4 (2.9)	7 (1)			
小山在来b/きぬみどり				75	10 (13.3)	4 (2)
小山在来c/きぬみどり	58	1 (1.7)	2 (1)			
きぬみどり/たいりょう	67	1 (1.5)	5 (0)	85	0 (0.0)	0 (0)
たいりょう/きぬみどり	86	8 (9.3)	4 (2)	67	2 (3.0)	0 (0)
小山在来bセルフ				89	1 (1.1)	0 (0)
小山在来cセルフ	58	1 (1.7)	1 (0)			
たいりょうセルフ				36	1 (2.8)	0 (0)

エステラーゼ酵素多型を利用したニラ交雑個体の選抜

えた1.5ml容のエッペンドルフチューブ内でホモジナイザー（池田科学社s-205）により磨砕後、遠心（15000rpm×30min, 5℃）による可溶性タンパク質の分離・抽出を行い電気泳動用試料とした。泳動はファルマシア製の等電点電気泳動装置（Multiphore II）を使用した。用いたゲルの条件は担体として7.5%ポリアクリルアミドゲル, 0.3%N,N-メチレンビスアクリルアミド, 0.075%過硫酸アンモニウム, 両性電解質としてpI 5~8 或いは4~6の7.5% (v/v)のキャリアアンフォライン（LKBファルマシア製）を加えたものであった。また、ゲルの大きさは120×250×0.2mmで、一度に52個体の検定が可能なものを使用し、試料は一検体あたり15μℓを添加した。電極液は陰極側に0.2Mヒスチジン, 陽極側に40mM DLグルタミン酸の組み合わせを使用した。泳動時の通電条件は、予備泳動に5W, 30min, 本泳動に5W, 30min-10W, 30min（全て電圧一定条件）であった。

3) エステラーゼ酵素の活性染色条件

泳動の終了したゲルは蒸留水で軽く表面を洗浄し、Tanksleyらの方法¹⁰⁾に従い直前に調整した染色液（100ml/gel）に浸漬し、暗黒条件の室温条件下で10~15分の活性染色を行った。5%酢酸溶液に移して反応を停止し、蒸留水を数回換えてバックグラウンドの除去を行い、出現したバンドを解析した。

III 結果及び考察

1. F₁交雑個体選抜条件の検討

F₁交雑個体の選抜条件を検討するため、小島らの方法によりpIレンジ5~8の条件で93交雑系の小山在来

c/たいりょうのF₁集団を材料とした等電点電気泳動した結果、活性染色により確認されたエステラーゼ酵素の多型は陰極側よりも陽極側に認められた。しかし、この条件では電極付近のバンドが圧縮されてしまい、交雑個体の選抜には全体像などから推定を余儀なくされる場合もあった（第1図）。そこで酸性側に等電点を有する蛋白質の分離能を向上させるため、添加する両性電解質のpIレンジを4~6に改変したゲルを作製し、同じ試料を等電点電気泳動した。

この結果、pI 5~8の条件では確認できなかったたいりょうに特有な酸性側のバンドが確認され（第2図中矢印）、F₁株の選抜精度が向上した。小島らは単為生殖程度の推定を行う目的で、pI 5~8において両親のエステラーゼ多型に差異を有する交配組合せを用いている。しかし実際の育種への応用を考慮した場合にはpI 5~8の条件では十分でない場合もあることから、pI 4~6の条件で選抜を行うことが適当であると考えられた。

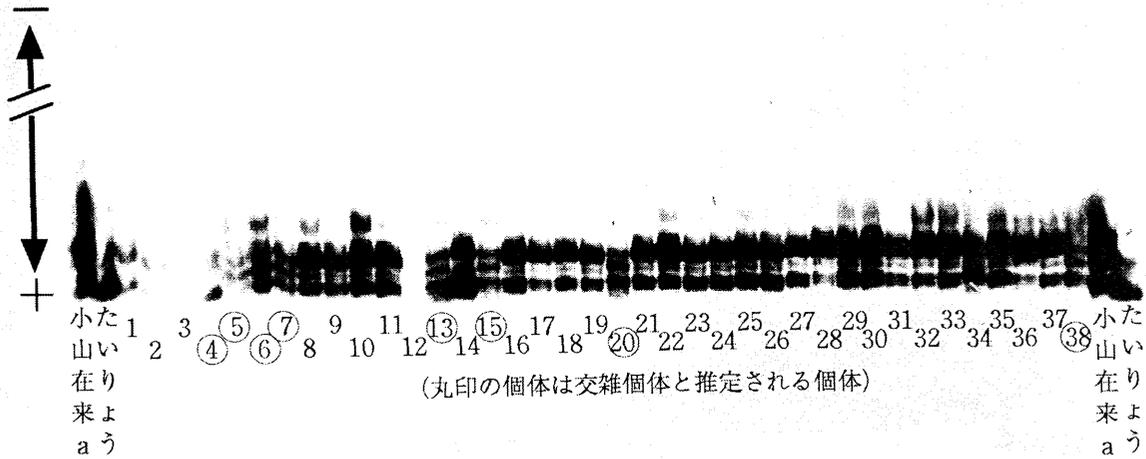
2. F₁交雑個体のエステラーゼ酵素多型による選抜

エステラーゼ酵素多型によるF₁個体選抜の有用性を検討するため、圃場において2年株養成中の集団をスクリーニングした。活性染色されたバンドの内、陽極側に存在するものについて母親のパターンと異なるもの、明らかに父親由来のバンドを有するもの、あるいは両親とは異なるバンドを有するものをF₁個体として識別した（第3図）。

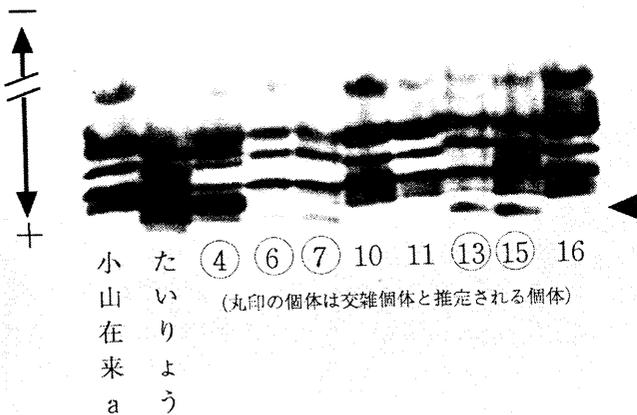
その結果、F₁個体の出現頻度は0~31.4%と組合せにより差が認められた。特に小山在来（aまたはc）/たいりょう

第2表 エステラーゼ酵素多型のバンドパターンによる分類

バンド型	品種・系統名			
a	大葉南洋	耐寒大葉	漢中冬ニラB 1	漢中冬ニラA 2
	漢中広葉	漢中広葉A	食用花ニラ(広巾)	津引1号
	花ニラ	キングベルト	東北呼和	満州
	中国ニラA	キニラA	キニラB	杭州ニラ
	岩舟在来	石橋在来	南京791	台湾
	岡山在来A	岡山在来B	漢中冬ニラ西安	漢中冬ニラ西安A
	東北小口山形	グリーンベルト		
b	津南青ニラA	津南青ニラB		
c	漢中冬ニラB 2	漢中広葉B	中国ニラB	
d	モウコ	朝鮮		
e	漢中冬ニラA 1	成都		
f	栃交1号(きぬみどり)			
g	小山在来			
h	たいりょう			



第1図 小山在来c/たいりょうのF₁個体の等電点電気泳動(pI 5~8)によるエステラーゼアイソザイム型



第2図 小山在来c/たいりょうのF₁個体の等電点電気泳動(pI 4~6)によるエステラーゼアイソザイム型

のものに限定されていること(第3図)から考えて、小山在来が母親の場合にはF₁の識別が困難であり、結果としてF₁個体の識別を逸脱した個体が存在している危険性が指摘された。

酵素多型によるスクリーニングは、①使用する酵素型が両親間で異なっており、②母親の有するバンドが父親に比べて少ないか、③父親が極めてユニークなバンドを有することが望ましいが、交配計画時に酵素多型を考慮した設計を立てない限り、必ずしもこれらの条件が満たされるとは限らない。従って将来的には遺伝子型の差異をも言及できるような、RAPDマーカー¹²⁾による選抜法へと移行することが望ましいと考えられた。

しかし、圃場における特性調査によるF₁選抜と酵素多型による選抜とを比較した結果、酵素多型選抜によって得られたF₁株数は圧倒的に多く、なおかつ圃場選抜個体は酵素多型選抜結果とはあまり一致しないという結果が得られた(第1表)。このことから、本方法をニラの育種現場、特に定植前の苗養成期間中の個体に適用することにより、圃場の利用効率、或いは育種の労力を大幅に省力化することが可能であると思われる。

3. ニラのエステラーゼ酵素多型における多様性について

ニラのエステラーゼ酵素多型における多様性を検討するため、当场で保存している遺伝資源のうち、主要な38品種・系統について等電点電気泳動による分析を行った。この結果、供試材料の68%にあたる26品種・系統がほぼ同一のバンドパターンを有することが明らかとなった(第2表、第4図)。この中には花ニラ品種や中国からの導入品種が多数含まれていた。同時に泳動したpIマーカーの移動度から換算し、陽極側で多型を示すバンドはpI 4.75~5.1の付近に集中しており、条件検討で述べたように電気泳動時のpIレンジは4~6程度が適当であることが証明された。また、導入後に形態的変異

りょうでは3つの集団において約30%の個体がF₁であると推定され、小山在来の潜在的な有性生殖率は30%以上であると考えられた。また、94交雑系の小山在来c/たいりょうにおいては15.2%と低い頻度であったが、93交雑系では同一の株で30%が交雑しているという結果が得られていることから、年次間差かあるいは供試個体数が少なかったことが影響したものと考えられた。この逆の交配では93、94交雑系とも4.4%の交雑しか認められなかった。一般的にニラにおける単為生殖は、複相大胞子の形成と偽受精による単為胚発生によって起こるとされており^{6,7)}、小山在来が母親の場合にのみ有性生殖頻度が高いという結果は、改めて単為生殖性が母親の形質に依存することを示唆している。

一方できぬみどりと小山在来の組合せでは、小山在来bが母親の場合に交雑頻度が高い傾向は認められたが、13.3%とたいりょうの場合に比べて低いものであった。これは、小山在来はきぬみどりに比べてバンド数が多いことや、きぬみどりのバンドはあまり鮮明なもので無いこと(第4図)、さらにF₁と識別された個体の呈示するバンドパターンが小山在来のバンドが欠失するタイプ

を生じた品種のうち漢中冬ニラ、漢中広葉、中国ニラは酵素多型パターンまで変化していることがわかった。海外から導入された品種については遺伝的背景が不明なため、類縁関係についてこれ以上の解析を行うことは不可能であるが、特徴的な8の酵素多型パターンは今後の交配計画に資するものと思われた。

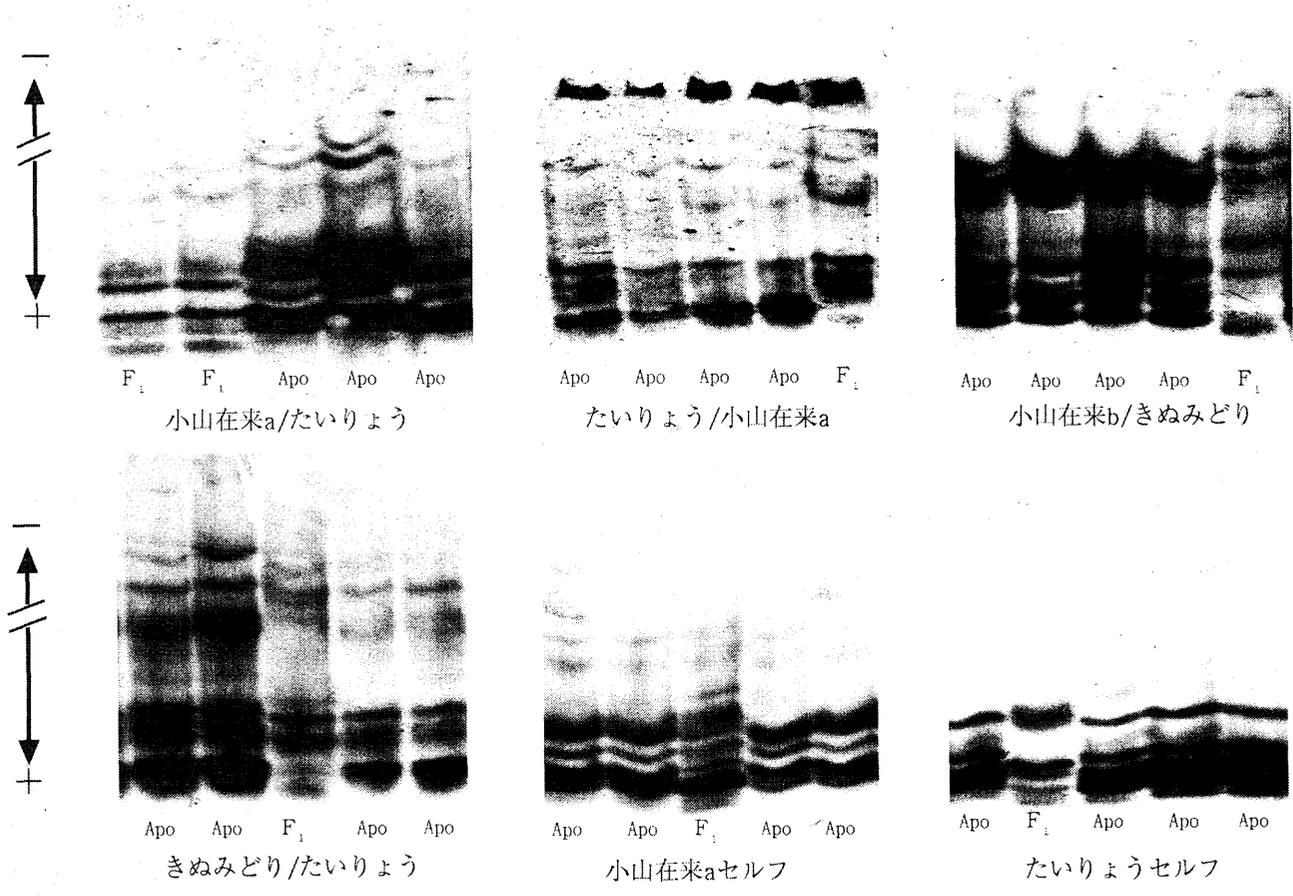
今後はさらに栽培品種についての多様性を検討するとともに、DNAマーカーのような精度の高い方法によりa型に含まれる多数の品種を識別する条件を確立することが必要であると考えられた。

謝 辞

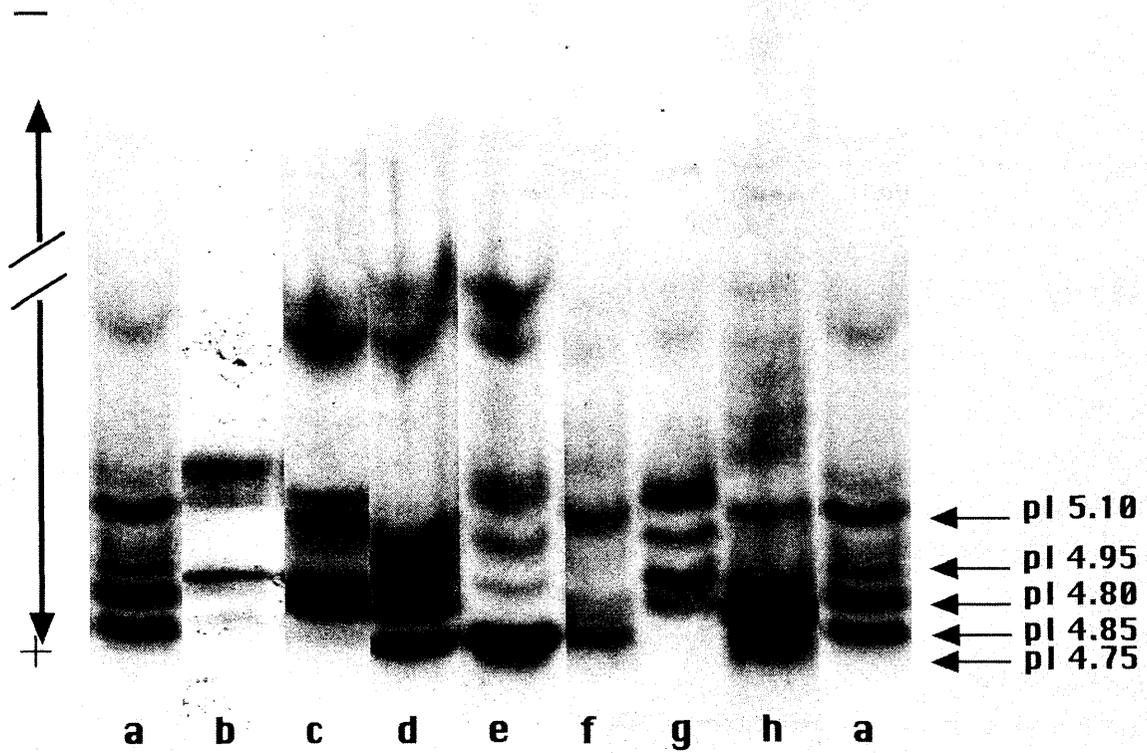
本研究を行うに当たり、野菜部の木村特別研究員をはじめ職員の方々から材料の提供及びニラの特性に関してご指導賜りましたことに感謝いたします。

引用文献

1. Hirai, M., Kozaki, I. and Kajiuira, I. (1986) Isozyme analysis and phylogenic relationship of citrus. Japan J. Breed., 36 : 377 - 389.
2. 木村栄(1995)「きぬみどり」. 野菜園芸技術, 22 (7): p. 39.
3. 小島昭夫, 長戸康朗(1989)エステラーゼアイソザイムを利用したニラの単為生殖率の推定. 育種39. 別2:210-211.
4. Kojima, A and Kawaguchi, T (1989) Apomictic Nature of Chinese Chive (*Allium tuberosum* ROTTL.) Detection in Unpollinated Ovule Culture. Japan J. Breed., 39 : 449 - 456.
5. 小島昭夫, 長戸康朗, 日向康吉(1991)エステラーゼの電気泳動により推定されたニラのアポミクシス率. 育種41(1):73-83.
6. Kojima, A and Nagato, Y (1992) Diplospor embryo-sac formation and the degree of diplospority in *Allium tuberosum* . Sexual Plant Reproduction., 5 : 72-78.
7. ____ and ____ (1992) Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum* . Sexual Plant Reproduction., 5 : 78 - 85.
8. 中川仁(1993)熱帯牧草の細胞遺伝学ならびに育種に関する基礎的研. 広島県農業技術センター研究報



第3図 各交配組合せごとのエステラーゼ酵素多型によるF₁個体の識別
(図中のF₁は交雑個体, Apoは単為生殖個体の意)



第4図 ニラにおけるエステラーゼ酵素多型の多様性

※表中のa～hは第2表のバンド型と同一である

告, 第58号.

9. 早乙女和彦, 吉田久, 小林俊一, 天谷正行(1990) エステラーゼ同位酵素遺伝子型によるオオムギ縞萎縮病抵抗性系統の選抜. 栃木農研報, 37号: 1-9.
10. Tanksley, S. D. and C. M. Rick (1980) Genetics of esterases in species of *Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet., 56: 209 - 219.

11. 鳥山國土(1989) 栄養繁殖作物のアポミクシス育種. 農園, 第64巻, 3号, 3-6.
12. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R. Link, K. J. et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531 - 6535.