

RAPD マーカーを用いたニラ交雑個体の選抜技術の確立

中澤佳子¹⁾・生井 潔・酒井美幸²⁾・田崎公久・小林俊一・小玉弘恵¹⁾・土屋久子³⁾・
木村 栄⁴⁾・室井栄一・石原良行⁵⁾・大島一則・天谷正行

摘要：ニラは条件的な単為生殖性を有するため、交雑率が著しく低いことが育種上の障害となっている。そこで、ニラ交雑育種の効率化を図るため、組合せ毎に父親に特異的な RAPD マーカーを検索し、このマーカーの存在を指標に交雑個体の早期選抜技術を確立した。また簡易な DNA 抽出法を検討し、改変 SDS 法が適することを明らかにした。1997～2003 年度に交配した 22 交配組合せ 2673 個体について交雑検定を行い、304 個体の交雑個体を選抜した。22 交配組合せの交雑率は 0～25.8% に分布しており、平均交雑率は 11.4% であった。この結果、幼苗期に交雑個体を選抜でき、定植個体数を従来の約 1/10 に減らせる可能性が示された。

キーワード：ニラ，単為生殖性，RAPD，交雑検定

Selection of Hybrid Plants from Cross Populations of Chinese Chives (*Allium tuberosum* SPR.) by RAPD Marker

Yoshiko NAKAZAWA, Kiyoshi NAMAI, Miyuki SAKAI, Kimihisa TASAKI, Shun-ichi KOBAYASHI, Hiroe KODAMA, Hisako TSUCHIYA, Sakae KIMURA, Eiichi MUROI, Yoshiyuki ISHIHARA, Kazunori OSHIMA AND Masayuki AMAGAI

Summary: Since Chinese chives (*Allium tuberosum* SPR.) have the ability to undergo facultative apomixis, the frequency of hybrids is remarkably low and has been an obstacle in cross-breeding programs. In order to improve breeding efficiency, we introduced the technique of selecting the F₁ hybrid plant using the RAPD marker. Furthermore, in our investigation of simple DNA extraction methods we found that a modified SDS-method was ideal. RAPD marker selection was performed on 2673 individuals from 22 cross-breeding combinations carried out between 1997 and 2003, and it was found that 304 were F₁ hybrids. This gives us an average crossing rate of 11.4% over a distribution of 0～25.8%, allowing us to select for them during the seedling stage and successfully reduce the number of transplants to 1/10th.

Key words: Chinese chives (*Allium tuberosum* SPR.), RAPD (random amplified polymorphic DNA), Apomixis

1) 現栃木県農務部河内農業振興事務所, 2) 現栃木県農務部塩谷農業振興事務所, 3) 現栃木県農務部上都賀農業振興事務所, 4) 現栃木県農業試験場栃木分場, 5) 現栃木県農務部下都賀農業振興事務所

緒言

栃木県は全国一のニラ産地であり、2003 年度の作付面積は約 450ha、生産量は 13,800t となっている。しかし、現在の主力品種のスーパーグリーンベルト等は 7 月～8 月に抽だいするため、この時期の出荷調整には抽だい花茎除去等の作業時間が通常の 2 倍程度要し、生産現場からは晩抽性品種の育成が強く望まれている。このような背景から、栃木県農業試験場では 1986 年度からニラの交雑育種に取り組み、1995 年に葉幅が広く生育の旺盛な品種「きぬみどり」⁸⁾、1996 年にはネギとニラの種間雑種「なかみどり」を育成した^{1,3)}。しかし、ニラは高頻度に単為生殖を行う^{11,12)}ため、交雑育種上の課題となっている¹⁷⁾。ニラの交雑育種では、圃場に展開された株の大部分は母親と同じ遺伝子型を持つ個体(単為生殖個体)なので、定植前の幼苗段階で交雑個体を選抜することはニラの交雑育種の効率化につながり極めて重要である。

天谷²⁾はエステラーゼ酵素多型を利用し、交雑個体を効率的に選抜する方法を試みた。その結果、栃木県農業試験場保存の 38 品種・系統についてエステラーゼ酵素の多型を調査したところ、8 個の酵素多型に分類することができたが、22 品種・系統が同一の酵素多型グループに属したため、エステラーゼ酵素多型のみを利用した手法では選抜可能な交雑組合せが限定された。

Williams ら²⁰⁾は、1980 年代後半から発達した PCR(Polymerase Chain Reaction)技術を利用し、簡易な RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)マーカーの検出法を考案した。以後この検出法は多くの植物の品種識別^{7,9)}、F₁純度検定¹³⁾、遺伝子地図作製⁶⁾などに利用されている。天谷⁴⁾、生井ら¹⁶⁾はこの RAPD マーカーをニラの品種識別に応用し、市販 18 品種および栃木県農業試験場保有の 34 系統の計 52 品種・系統を識別するための 165 個のマーカーを同定した。

一方、RAPD マーカーを利用して F₁ 選抜を行うには、多数の検体から DNA 抽出する必要がある。これには操作が簡単で時間とコストがかからないこと、および抽出した DNA の質が PCR 反応に適したレベルであることが要求される。天谷⁴⁾は改変 CTAB 法^{14,19)}と、ホウ酸珪素化合物を用いて多糖類を除去する方法(Nucleon Phytopure kit:Scot lab 社)によりニラの高分子 DNA が抽出できることを明らかにした。しかし、両方法とも多数のサンプルを扱うには多くの時間と経費を要するため不適であった。

本研究では、ニラの交雑育種の効率化を図るため、簡易で経済的なニラの DNA 抽出方法の検討を行った。

父親に特異的な RAPD マーカーを利用して交雑個体を早期に選抜し、それらの定植を試みた。この結果、栃木農試

のニラ育種ルーチンに本方法を導入することが可能で、定植個体数は RAPD マーカー利用により、従来の約 1/10 に減らせることが示された。

本研究は、農林水産省の地域先端技術共同研究開発促進事業(1996-1998 年度)ならびに先端技術等地域実用化研究促進事業の助成(1999-2001 年度)を受けた。

材料および方法

1. 供試材料

1997 年～2003 年の 7 年間、毎年 7 月～9 月に、温室で栃木県農業試験場の慣行法により交配を行った。採種した種子は交配した翌年 3 月に播種し、1～2 か月間の育苗期間に幼苗の葉身を約 10mg 採取し、鋳型 DNA を抽出して PCR 反応に用いた。22 組合せの交配から得られた 2,673 個体のニラ実生について交雑検定に供した(第 1 表)。

2. 高分子 DNA 抽出方法の検討

DNA 抽出法として、NaOH 抽出法⁵⁾と SDS 法¹⁹⁾を改変した改変 SDS 法(第 1 図)の 2 つの方法を CTAB 法¹⁴⁾と比較した。組織の磨砕は、1.5ml のエッペンドルフ内でプラスチック製のペッスル(フナコシ社製)を用いて行った。得られた DNA の一部を 0.5% agarose, 0.5 × TBE buffer, 100 V の条件で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した後、同時に泳動した DNA/HindIII(濃度既知)マーカーと比較することで濃度および分子量を推定した¹⁸⁾。

3. 交雑検定

抽出した DNA(約 50ng)を鋳型とし、父親(花粉親)に特異的な RAPD マーカーによる交雑検定を行った。PCR 条件は天谷の方法⁴⁾に従い、増幅 DNA 断片の解析には DNA 多型解析装置(デンシトグラフ AE-6920M-FX, ATTO 社)を用いた。組合せ毎に花粉親に特異的なマーカーを生じるプライマーは、天谷⁴⁾および生井ら¹⁶⁾の決定した品種識別に適するプライマーの情報を参考に市販の合成プライマー(12mer:和光純薬社および 10mer:OPERON 社)から予め選定しておき、最低 3 個のプライマーを用いて交雑個体の確認を行った。交雑率が 5%以下の組合せでは、更にプライマーを追加して検定を行い、交雑の確認は再現性を確かめるため 2 度行った。

結果

複数の簡易な DNA 抽出法を比較した。CTAB 法は熱変性や液体窒素による磨砕が必要であるが、NaOH 抽出法と改変 SDS 法ではその必要がなく、その後の操作も改変 SDS 法の RNase 処理以外は室温で行えた。微量高速遠心機(RT18:日立製)で一度に処理できる 18 個の検体処理にかかる時間は、CTAB 法が約 6 時間、NaOH 法が約 1 時間、改変 SDS

法は3時間であった。試薬にかかる費用はNaOH法が最も低く、次いで改変SDS法であった。CTAB法では液体窒素の費用が必要であった。抽出したDNAの純度は、NaOH法ではRNase処理を行わないためRNAの混入が認められ、高分子DNAが壊れたため不鮮明な泳動結果が得られた(データ未掲載)。また、PCRの結果を比較したところ、NaOH法は改変SDS法やCATB法と比較して高分子領域マーカーの再現性が劣った(第2図、第3図)。以上の結果から、改変SDS法が交雑育種での交雑個体選抜に用いるDNA抽出法として適していると判断した(第1図)。

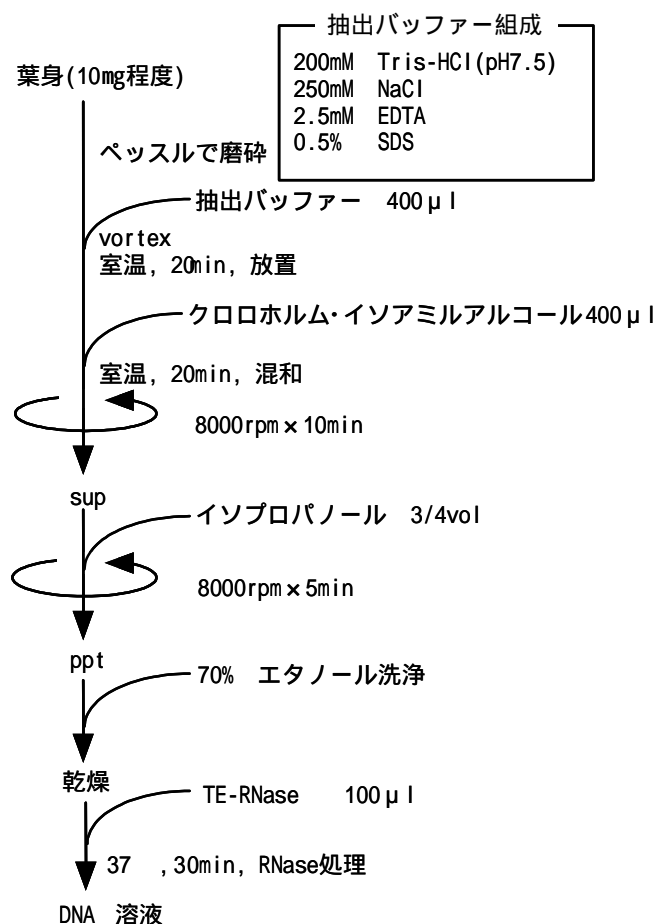
交雑検定に使用するための花粉親特異的なプライマーには、再現性を考慮して明瞭で分子量が2kb程度までのマーカーを生じるものを選定した。交雑検定には最低3個のプライマーを用いたが、交雑率が5%以下の組合せでは更にプライマーを追加して検定を加えた。津南青ニラaが母親であった2組合せでは、5~6個のプライマーを使用した。交雑率は0%であった(第1表)。

22交配組合せ、2673個体のニラについて交雑検定を行った結果(第4図)、304個体が交雑個体と判定された(第1表)。この結果、交雑率は0~25.8%に及び、単為生殖の程度には品種固有の能力が関連していることが推察された。中国ニラaが母親の2組合せでは21.7%、成都が母親の4組合せでは15.5%と比較的高い交雑率であった。これに対し、津南青ニラaが母親の2組合せでは0%であった。特に、成都と津南青ニラaが母親の組合せ結果は、複数年次に渡って同様の傾向を示した。しかし、スーパーグリーンベルトが母親であった3組合せにおいて、漢中冬ニラ西安aと中国ニラaが花粉親の組合せの交雑率はそれぞれ12.3%および17%と高かったが、大分在来が花粉親の組合せでは0%であった。

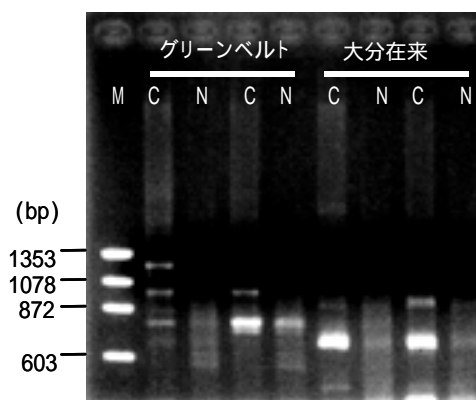
交雑検定は、全ての年度において予定した定植前に終了することができた。この結果、RAPDマーカーによる交雑個体選抜は、現行の育種ルーチンに組み込むことが可能であった。また、無選抜で定植を行っていた従来の方法と比較して、定植個体数は約1/10に減少し、育種にかかる労力を大幅に軽減化できることが示された(第5図)。

考察

DNAマーカーを用いた交雑検定の結果から、多くのニラ品種・系統で高頻度な単為生殖が行われていることが改めて示唆された。小島ら¹¹⁾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%以上であると報告し、天谷²⁾は小山在来の交雑率が約30%であると報告している。本研究では、22交配組合せの2673個体についてDNAマーカーを用いて交雑率を調査した結果、交雑率は0~25.8%

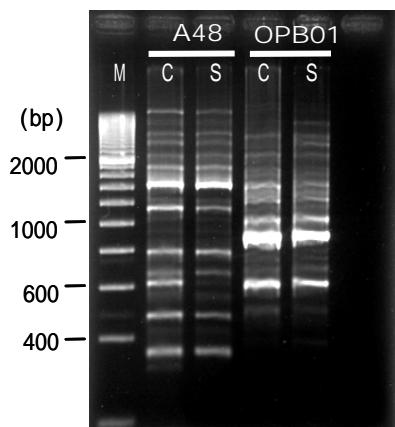


第1図 改変SDS法によるニラの簡易DNA抽出条件



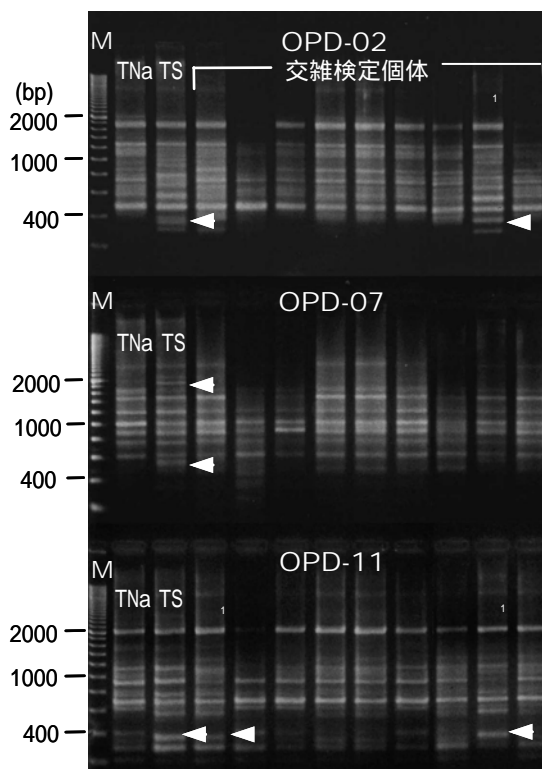
第2図 NaOH法とCTAB法により抽出したDNAを用いたRAPDパターンの比較

M: 分子量マーカー, C: CTAB法, N: NaOH法
プライマー: A-43



第3図 改変SDS法とCTAB法により抽出したDNAを用いたRAPDパターンの比較

M : 分子量マーカー (200bp ladder) C : CTAB法
S : 改変SDS法, プライマー : A48, OPB01
鋳型DNA : テンダーポール



第4図 中国ニラa(TN a) / 朝鮮(TS)の交雑検定結果の一部

◁は交雑検定に用いたRAPDマーカー
M : 分子量マーカー (200bp ladder)
プライマー : OPD-02, OPD-07, OPD-11
印は交雑が確認された個体を意味する

第1表 交雑検定結果

交配組合せ	組合せ番号	供試プライマー**	使用マーカー数	供試個体	交雑確認	交雑率 (%)
中国ニラa/成都	97-01	A08, A42, A51	4	107	27	25.2
成都/中国ニラa	97-02	A08, A42, A51	4	115	18	15.7
中国ニラa/朝鮮	97-03	OPD02, OPD07, OPD11	5	66	12	18.2
朝鮮/中国ニラa	97-04	A43, OPD11, OPD18	4	13	1	7.7
南京791/成都	97-07	A08, A51, OPA02, OPD18	4	22	0	0.0
成都/南京791	97-08	A08, A42, A51, OPA02	4	105	14	13.3
南京791/朝鮮	97-09	A30, A51, OPD07	5	71	4	5.6
朝鮮/南京791	97-10	A43, A51, OPD05, OPD18	5	140	4	2.9
たいりょう/朝鮮	98-03	A08, A30, A42	7	31	8	25.8
漢中冬ニラA/朝鮮	98-07	A30, A42, OPD13	4	20	4	20.0
漢中冬ニラA/成都	98-13	A30, A42, A46	3	21	2	9.5
成都/漢中冬ニラA	98-14	A30, OPA19, OPD15	3	24	5	20.8
成都/台湾	00-02	A01, OPA16, OPB04	4	139	17	12.2
漢中冬ニラ西安a/大分在来	00-03	A08, OPA19, OPB08, OPB10	4	75	13	17.3
津南青ニラa/大分在来	00-04	A42, OPA02, OPA19, OPB08, OPB13	7	116	0	0.0
大分在来/中国ニラa	01-02	A42, A48, OPB10, OPD15	4	832	120	14.4
津南青ニラa/中国ニラa	01-03	A42, A48, OPB10, OPE09	4	214	3	1.4
津南青ニラa/漢中冬ニラ西安a	02-04	A48, OPA05, OPB10, OPC04, OPC12, OPC14	11	31	0	0.0
94-1-106/大分在来	03-01	OPA05, OPA07, OPD12, OPD15	6	26	1	3.8
スーパーグリーンベルト/漢中冬ニラ西安a	03-03	OPC04, OPC14, OPD12, OPE17	5	219	27	12.3
スーパーグリーンベルト/大分在来	03-04	OPA05, OPA07, OPD12, OPD15	6	145	0	0.0
スーパーグリーンベルト/中国ニラa	03-05	A48, OPC04, OPC11, OPD12	4	141	24	17.0
合計				2673	304	11.4

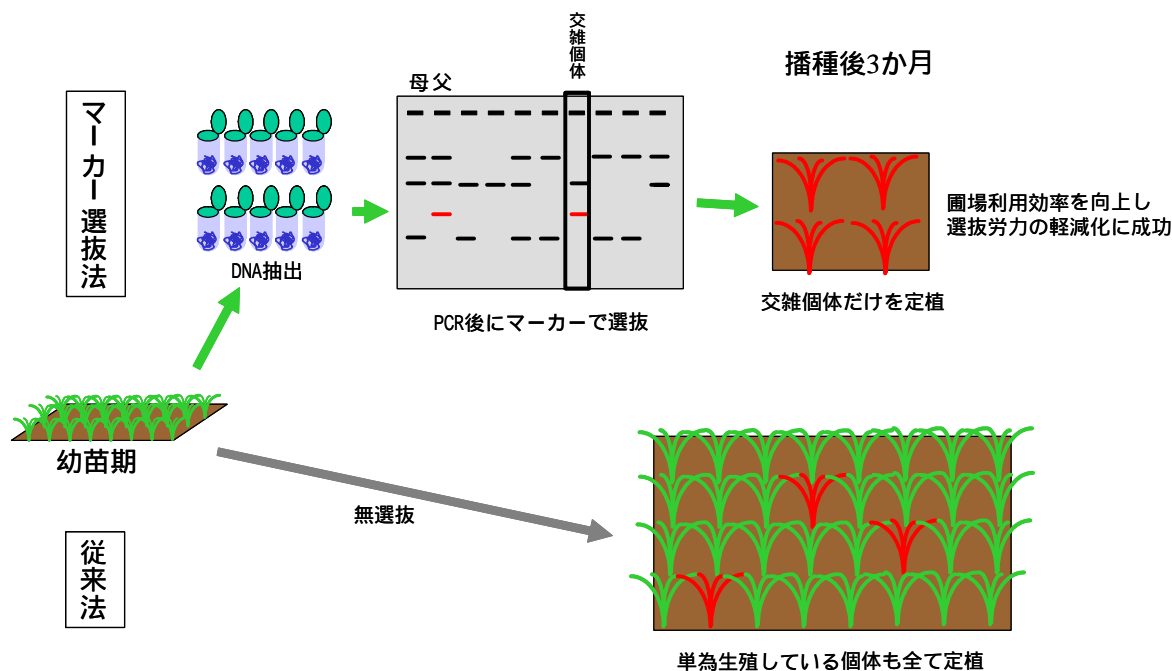
注)Aではじまるプライマーは和光純薬社製の12mer, OPではじまるプライマーはオベロン社製の10mer.

平均交雑率は約 11.4%であった。また、RAPD 法はアイソザイム法に比べて、両親間で異なるマーカーが容易に見つかることから、遺伝的背景が近縁な種同士の組合せ検定においても有効な手段であった。しかし、RAPD 法は簡便である反面、再現性が劣るという欠点がある。今後は、RAPD マーカーを簡便で再現性が高い SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカー化して交雑検定に利用することで、効率の良い選抜ができると考えられる。

DNA マーカーを育種に利用する際に、最も時間を要する作業は DNA 抽出であり、安価で簡易な DNA 抽出法を選択することは大切なことであった。ニラ育種の現状からは、年間約 1000 個体の検定が必要である。改良 SDS 法による DNA 抽出では、PCR の鋳型として数十回分に相当する量が得られるので (データ未掲載)、3 ないし 4 個のプライマーによる検出作業と 2 回の再現性確認には十分であった。実際に改良 SDS 法で 800 個体の交雑検定を行い、育苗中 (3~6 月) に検定を終えることで交雑個体を定植できるため、定植数を約 1/10 に減らせることが示された (第 5 図)。

るニラを用いた研究において、単為生殖性が致死因子と連鎖しており、生殖性に関する分離系統の作出が困難であると報告している。このことは、組合せによっては交雑後の胚発生に障害が起こることを示唆している。単為生殖率の推定に、胚珠の透明化観察法が用いられている¹²⁾。この方法は受粉前の卵細胞の分裂を観察するので、胚発生の過程で起こる枯死の影響を受けずに単為生殖頻度を推定できる点が優れている。品種や選抜個体の単為生殖率を評価するためにも、今後は導入する必要がある。

単為生殖性は、交雑育種においては弊害となる形質であるが、種子生産においては有益な形質である。単為生殖性に関わる遺伝子を制御することができれば、交雑育種の効率化に加えて、ヘテロシスの早期固定化や、種子生産の安定化も期待できる。高頻度に両性生殖をするニラについて、モンゴルより収集された 2 倍体ニラ系統から 3 個体見いだされたという報告^{10, 15)}がある。また、最近の我々の研究でも、漢中冬ニラ A1 という 4 倍体ニラ系統の中から 100% の交雑率を示す個体が得られている¹⁵⁾。この系統は雑ばくな状態で保存されているので、今後は両性生殖個体の再



第5図 RAPDマーカーを用いた選抜法と従来法の比較

 は交雑個体を意味する

交雑検定の結果から、交雑率 (逆に言えば単為生殖率) は母親品種に依存した形質であると推察される結果が得られた。成都や中国ニラ a および大分在来は、安定して交雑率が高かった。スーパーグリーンベルトも 2 組合せでは高い数字であったが、大分在来が花粉親の組合せでは交雑個体が得られなかった。小島ら¹⁰⁾は、2 倍体で両性生殖す

選抜を行う予定である。これを利用して生殖性に関する分離集団が作成できれば、単為生殖性連鎖マーカーの開発につながるものと期待される。両性生殖性母本と生殖型判別マーカーを育種システムに導入できれば、ニラ新品種開発に大きく寄与すると考えられる。

謝 辞

研究を遂行するにあたり,独立行政法人農業・生物系特産産業技術研究機構野菜茶業研究所の小島昭夫博士より貴重なご助言をいただいた。また,阿久津操主任技術員には試験を補助していただいた。ここに記して心から感謝の意を表す。

引用文献

1. 天谷正行・大橋一夫・木村栄・小栗尚子・小島昭夫(1995)ネギとニラの種間雑种植物の育成。栃木農試研報 43:87-94.
2. 天谷正行(1996)エステラーゼ酵素多型を利用したニラ交雑個体の選抜。栃木農試研報 44:49-54.
3. 天谷正行(1997)ネギニラ「なかみどり」の品種特性と栽培の基本。施設園芸 39(5):64-68.
4. 天谷正行(1998)RAPD マーカーによるニラ品種の識別。栃木農試研報 46:29-35.
5. Dubouzet, J.G., Etoh, T., Arisumi, K. and Yoshitake, T. (1996) A Diagnostic Test to Confirm Interspecific *Allium* Hybrids Using Random Amplified Polymorphic DNA from Crude Leaf DNA Extracts. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65:321-322.
6. Hormaza, J.I., Dollo, L. and Polito, V.S. (1994) Identification of a Rapd marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor, Appl. Genet. 89:9-13.
7. Hosoki, T., Nagasato, T., Kimura, D. and Nishimoto, K. (1997) Classification of herbaceous Peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 843- 849.
8. 木村栄(1995)「きぬみどり」野菜園芸技術 22(7):39.
9. 木村鉄矢・小曾納雅則・伴義之(1997)品種識別に有効なプライマーの選抜。育雑 47(別 1):131.
10. 小島昭夫・島崎聡・若生忠幸・小原隆由(1998)モンゴル産ニラ遺伝資源のなかに見出された非単為発生の二倍体。育雑 48(別 2):176.
11. Kojima, A., Nagato, Y. and Hinata, K. (1991) Degree of apomixis in chinese chive (*Allium tuberosum*) estimated by esterase isozyme analysis. Japan. J. Breed. 41:73-83.
12. Kojima, A and Nagato, Y. (1992) Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. Sexual Plant Reproduction 5: 78-85.
13. Matsuura, S., Saito, A and Fujita, Y. (1994) An approach for rapid checking of seed purity by RFLP analysis of nuclear DNA in F_1 hybrid of Cucumber (*cucumis sativas* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:379-383.
14. Murray, M and Thompson, W.F. (1980) Rapid Iso lation of high- molecular-weight plant DNA. Nuc. Acid. Res. 8(19):4321-4325.
15. 中澤佳子・小島昭夫・生井潔・丹羽久子・天谷正行(2003)高頻度有性生殖ニラの RAPD 法による交雑率の推定。育雑 48(別 2):207.
16. 生井潔・天谷正行・丹羽久子・中澤佳子(1998)RAPD 法によるニラの系統識別。育雑 48(別 2):206.
17. 生井兵治(1992)栽培植物における受粉生物学のすすめ [19]. 農及園 67:838-840.
18. Sambrook, J., Fritsch, E.F and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
19. 島本功, 佐々木卓治(1997)新版植物の PCR 実験プロトコール, 秀潤社, pp. 67-68
20. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acid. Res. 18: 6531- 6535.