

## ニラにおける SSR マーカーを利用した遺伝的類縁関係の解析

若樹睦子・田崎公久・生井 潔

**摘要:**ニラ EST-SSR プライマー5 ペアを供試し、栃木県農業試験場(栃木農試)で保有するニラ遺伝資源 94 品種・系統について、クラスター分析により遺伝的類縁関係を解析した。その結果、64 品種・系統が識別できず、全く同じ多型パターンを示す大きな 2 つのクラスターが存在した。そこで、かずさ DNA 研究所と共同で設計した SSR プライマー132 ペアを供試し、大きな 2 つのクラスターのうち各 4 品種について PCR を行い、多型が得られたプライマー4 ペアを選抜した。この SSR プライマー4 ペアを供試して全 94 品種・系統の PCR を行った結果および EST-SSR プライマー5 ペアの結果から、計 69 マーカーが得られた。得られたマーカーの多型データを用いてクラスター分析を行った結果、‘ゆめみどり’を含む 52 品種・系統が識別でき、全供試品種・系統の遺伝的類縁関係が明らかとなった。

**キーワード:** 遺伝的類縁関係, 遺伝資源, クラスター分析, ニラ, SSR マーカー

### Analysis of genetic relatedness using SSR markers in Chinese chive (*Allium ramosum*, syn. *tuberosum*)

Mutsuko WAKAMASU, Kimihisa TASAKI and Kiyosi NAMAI

**Summary:** We analyzed the genetic relationship of Chinese chives (*Allium ramosum*, syn. *tuberosum*) using 94 cultivars and lines obtained from Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station by using five EST-SSR primer pairs. Two major DNA polymorphic patterns were detected, yet 64 cultivars and lines could not be distinguished. Therefore, 132 SSR primer pairs (designed by Kazusa DNA Research Institute and our study group) were tested for eight cultivars and lines selected from the two major DNA polymorphic pattern groups. Four pairs of the tested primers detected DNA polymorphisms in eight cultivars and lines and these were therefore selected for further use. We then typed all of the cultivars and lines using the four selected SSR primers. By using the five EST-SSR primer pairs and the four selected SSR primer pairs, 69 markers were derived from the 94 cultivar and lines. Cluster analysis was then performed using the DNA marker polymorphism data; 52 cultivars and lines, including ‘Yumemidori,’ were identified, thereby revealing the genetic relationship of all the cultivars and lines examined in this study..

**Key words:** Chinese chive, Cluster analysis, Genetic relatedness, Genetic resource, SSR markers

## I 緒言

栃木県のニラは、作付面積 399 ha (全国第 1 位)、収穫量 11,000 t (全国第 2 位、平成 26 年産野菜生産出荷統計)、また産出額 48 億円 (栃木県, 2015) で、県内ではイチゴ、トマトに次ぐ重要野菜である。そのため、栃木農試では、1985 年からニラの交雑育種に取り組んでおり、‘きぬみどり’ (木村, 1995) や、ネギとニラの種間雑種 ‘なかみどり’ (天谷ら, 1995) を育成している。

栽培品種のニラ (*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum*  $2n=4x=32$ ) は、一般に高いアポミクシス率を持つ条件的アポミクトであり (Kojima ら, 1991)、核内倍加による複相大孢子形成および受粉と独立した胚発生の 2 つの要因からなることが明らかとなっている (Kojima and Nagato, 1992a; Kojima and Nagato, 1992b)。これまでに、エステラーゼ酵素多型や RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーによって交雑率の推定が試みられ、交配組み合わせや交配年次によって差はあるものの、0~30.6% といずれも低い交雑率が示されている (Kojima ら, 1991; 天谷, 1996; 中澤ら, 2005)。このアポミクシスがニラ育種の障害となっていたため、中澤ら (2005) は、花粉親に特異的な RAPD マーカーを利用して雑種個体を選抜する技術を確立した。栃木農試では、その技術を用いて選抜した個体の中から ‘ゆめみどり’ を育成し、2014 年に品種登録出願公表された。

さらに、選抜個体の中から交雑率 100% の両性生殖性系統が得られたため (中澤ら, 2003)、これを交配母本とすることで、ニラの交雑育種の体系化が可能となった。一方、非単為発生性系統「97-12-102(H12C2)」単為発生性品種「テンダーポール」との単為発生性に関する分離集団を材料として、バルクセグレガント法 (Ichelmore ら, 1991) により、単為発生性連鎖マーカー (Parthenogenesis Linked Marker: PLM) を開発した (天谷ら, 2010)。これにより、両性生殖性母本と単為発生性連鎖マーカーを用いた画期的なニラ育種システムが確立され (齋藤ら, 2012)、格段に多様性に富み、様々な形質の導入が可能になったといえる。しかし、このシステムを有効に活用するには、交配に用いる両性生殖性中間母本の多様性を増やすとともに、ヘテロシス効果を生み出す交配組み合わせを明らかにする必要がある。そのためには、保有する遺伝資源の遺伝的類縁関係を明らかにすることが極めて重要である。

これまでに、RAPD マーカーを用いて市販 18 品種および栃木農試で保有する 34 系統の計 52 品種・系統の遺伝的類縁関係が明らかにされている (天谷, 1997; 生井ら,

1998)。しかし、その後さらに保存品種・系統が増加しており、両性生殖性系統を含めた遺伝資源について、遺伝的類縁関係を明らかにする必要がある。以前は再現性が劣る RAPD マーカーを用いたが、本研究では再現性に優れかつ共優性を示す SSR (Simple Sequence Repeat, 単純反復配列) マーカーを用いることとした。そこで、EST (Expressed Sequence Tag) - SSR マーカーを開発するとともに (生井ら, 2013)、かずさ DNA 研究所と共同で SSR マーカーの大量開発を行った (田崎ら, 2015)。これらの SSR マーカーを用いて、栃木農試で保存しているニラ遺伝資源 94 品種・系統について遺伝的類縁関係を解析したので報告する。

## II 材料および試験方法

### 1. ニラ供試品種・系統

ニラ品種・系統は、第 1 表に示す栃木農試で保有する遺伝資源 94 品種・系統を供試した。

### 2. DNA 抽出

供試品種・系統の DNA は、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 法 (Murray and Thompson, 1980; 島本・佐々木, 1997) で抽出した。ただし、‘成都’ ‘朝鮮’ ‘呼和浩特’ および ‘63 交雑系統’ の 4 品種・系統は、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) で抽出した。

### 3. 供試 SSR プライマー

SSR プライマーは、ニラ EST 配列から設計した 3 塩基モチーフの nira2024, nira4213, 2 塩基モチーフの nira2784, nira3910, nira5090 の計 5 プライマーペア (生井ら, 2013)、および第 2 表に示す RNA-seq または SSR 濃縮ライブラリーから得られた配列で設計したプライマー (田崎ら, 2015) のうち 132 プライマーペアを供試した。

### 4. PCR 条件

PCR は、Schuelke (2000) の方法によるポストラベル法に従い、ユニバーサル蛍光標識プライマーの濃度を 1/2 に、反応液量を 10  $\mu$ L に変更した。すなわち PCR 反応液組成は、1  $\times$  Reaction Buffer, 0.25 mM dNTP mix, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.04  $\mu$ M フォワードプライマー, 0.16  $\mu$ M リバースプライマー, ユニバーサル蛍光標識プライマーのユニバーサル配列を M13(-21) から M13Rv (CAGGAAACAGCTATGACC) に変更し、Beckman Dye D4 で標識したプライマーを 0.08  $\mu$ M とし、10  $\mu$ L の液量で 0.25 U の PCR 酵素と 10 ng の鋳型 DNA を加えた。なお PCR 酵素は、生井ら (2013) のプライマーを用いた PCR には HybriPol DNA Polymerase (BIOLINE 社)、田崎ら (2015) のプライマーを用いた PCR

第 1 表 供試ニラ 94 品種・系統

No	導入 origin (ID)	品種・系統名	No	導入 origin (ID)	品種・系統名	No	導入 origin (ID)	品種・系統名
1	0001	東北小口山形	36	0304	タフマン	71	-	06-3-140
2	0040	仙台	37	0023	黄ニラa	72	0007	漢中冬ニラa
3	0041	小国	38	-	栃木5号(ゆめみどり)	73	0027	成都
4	0005	大葉南洋	39	9703	ワンダーグリーンベルト	74	9902	クラウンベルト
5	0006	耐寒大葉	40	9708	グリーンロード	75	0102	ダイヤモンドベルト
6	0016	食用花ニラ・広幅	41	0303	タフボーイ	76	0002	津南青ニラa
7	0017	花ニラ	42	1201	ミラクフルグリーンベルト	77	0003	津南青ニラb
8	0018	今田韓国	43	1202	ハイパーグリーンベルト	78	0012	漢中冬ニラ西安A
9	0020	満州	44	0068	94-1-106	79	0037	伊寧
10	0024	黄ニラb	45	0031	南京791	80	0039	法問寺
11	0029	岩舟在来	46	0028	朝鮮	81	0042	高知
12	0032	津引1号・中国	47	0014	漢中広葉A	82	0066	小山在来
13	0034	岡山在来B	48	0013	漢中広葉	83	0067	大分在来
14	0076	バキラ	49	0030	石橋在来	84	0045	祖谷
15	0077	新バキラ	50	-	05-2-223	85	0004	蒙古
16	9701	グリーンベルト	51	9716	きぬみどり	86	0025	台湾
17	9702	スーパーグリーンベルト	52	0011	漢中冬ニラ西安	87	9707	テンダーポール
18	9713	ニューベルト	53	0038	楊陵	88	0071	00-3-81
19	0306	ニコニコ花子	54	0069	97-2-114	89	0036	呼和浩特
20	0402	サムライ	55	-	05-4-172	90	0043	徳都
21	9715	KJ-2425	56	0010	漢中冬ニラB	91	0072	97-12-102(H12C2)
22	9801	サマーグリーンベルト	57	0022	中国ニラb	92	9704	バワフルグリーンベルト
23	0019	東北呼和	58	0015	漢中広葉B	93	-	07-2-163
24	0033	岡山在来A	59	9705	サンダーグリーンベルト	94	9710	たいりょう
25	9714	ジャイアントベルト	60	0301	SK78			
26	0008	漢中冬ニラb	61	0302	海南			
27	0009	漢中冬ニラA	62	0401	リッチ			
28	0021	中国ニラa	63	-	05-4-185			
29	0026	杭州ニラ	64	0101	W-908			
30	0044	宮崎	65	0305	ニコニコ太郎			
31	0070	63交雑系統	66	-	07-3-22			
32	0073	00-1-19	67	9901	吉林			
33	0075	新漢中冬ニラ西安	68	-	05-2-196			
34	9711	大連	69	-	06-2-71			
35	9804	ニラ芽	70	-	06-3-73			

は両性生殖性系統を示す。

第 2 表 供試 SSR プライマー

プライマー名	プライマー設計由来	モチーフ塩基数	プライマー数	備考
nr0001~nr0020		6	20	
nr0401~nr0421	RNA-seq	5	20	nr0411欠
nr1297~nr1318		4	20	nr1310, nr1316欠
nr5027~nr5031		6	5	
nr5032~nr5042		5	11	
nr5043~nr5074	SSR濃縮ライブラリー	4	32	
nr5103~nr5114		3	12	
nr5133~nr5144		2	12	
計			132	

には My Taq DNA Polymerase (BIOLINE 社)を供試した。反応条件は 94 °C・5 分の後、(94°C・30 秒, 56°C・45 秒, 72°C・45 秒)を 30 回繰り返す、さらに(94°C・30 秒, 53°C・45 秒, 72°C・45 秒)を 8 回繰り返した後、72°C・10 分とした。

### 5. PCR 増幅産物の検出

PCR 増幅産物は 1/10 TE で 20 倍希釈し、希釈液 1μL に 25μL のホルムアミド、0.08μL の CEQ size standard-400(Beckman Coulter 社)を加えた後、DNA シー

ケンサーGenomeLab-GeXP(Beckman Coulter 社)で検出した。

検出されたマーカーの大きさは、プライマーごとに最も頻繁に出現するアレルを基本サイズ(a)とし、これと比較して a±塩基数で表示した。

### 6. SSR プライマーの選抜

最初に EST 配列由来の SSR プライマーを用い、全供試品種・系統について多型検出を行った。その結果から、識別できなかった 2 つの大きなクラスターについて、各

4 品種・系統(A:耐寒大葉, 満州, 黄ニラ b およびグリーンベルト B: 漢中冬ニラ b, グリーンロード, きぬみどりおよびミラクルグリーンベルト)の計 8 品種・系統を供試して SSR 濃縮ライブラリーまたは RNA-seq 配列由来の 132 プライマーペアの多型検出を行い, クラスタ内で多型を示すプライマーを選抜した. 次に, 選抜したプライマーを供試し, 全供試品種・系統について多型検出を行った. なお, 8 品種・系統を選定するにあたり, 生井ら(1998)の系統樹による類縁関係を考慮した.

### 7. クラスタ分析

全供試品種・系統に供試した SSR プライマーで得られた多型データを用いて, WWW 上の統計解析プログラム Black-Box(<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html>)により群平均法でクラスタ分析を行い, 系統樹を作成した. なお, クラスタ分析には正規化されたデータを使用した.

## III 結果

### 1. EST 配列由来 SSR プライマーによる多型検出とクラスタ分析

EST 配列から設計した SSR プライマー 5 ペア (nira2024, nira2784, nira3910, nira4213, nira5090) を供試して, 94 品種・系統を PCR 増幅した結果は第 3 表に示した. nira2024 は 1 個, nira2784 は 4 個, nira3910 は 7 個, nira4213

は 7 個, nira5090 は 5 個, 計 24 個のマーカが検出された. EST-SSR マーカーの 94 品種・系統にお

ける保有率は, nira2784 の a が 97.9% と最も高く, 94 品種・系統のうち‘呼和浩特’および‘徳都’を除く 92 品種・系統で検出された. 一方, nira3910 の a+19 の保有率は 1.1% と最も低く, テンダーポールのみで検出される品種特異的マーカーであった.

供試 94 品種・系統について, EST-SSR マーカー 24 個の多型解析結果を用いてクラスタ分析を行った結果を第 4 表に示した. 94 品種・系統のうち, 30 品種・系統が特異的な多型パターンを示し, 品種・系統識別が可能であった. 一方, 品種・系統が特定できない残りの 64 品種・系統の中には, 同一パターンを示した 22 品種・系統および 19 品種・系統の 2 つの大きなクラスタが存在し, それ以外の 23 品種・系統は 2~4 品種・系統が同一なパターンを示す 10 クラスタに分類された.

### 2. SSR プライマーの選抜

EST-SSR マーカーで同一パターンになった 2 つの大きなクラスタの品種・系統を識別可能にするため, 第 4 表に示すようにクラスタ A, B から 4 品種・系統ずつ計 8 品種・系統を選定し, RNA-seq または SSR 濃縮ライブラリー由来の 132 プライマーペアを用いた多型検出を行った結果を第 5 表に示した. 多型が認められたプラ

第 3 表 EST 配列由来 SSR プライマーで検出されたマーカーの保有状況

プライマー名	マーカーサイズ (nt)		マーカー保有品種・系統	
	基本	供試マーカー	系統数	保有率 (%)
nira2024	a=246	a+6	73	77.7
nira2784	a=139	a	92	97.9
		a+12	22	23.4
		a+14	83	88.3
		a+16	35	37.2
nira3910	a=180	a	22	23.4
		a+2	89	94.7
		a+4	7	7.4
		a+8	72	76.6
		a+12	11	11.7
		a+14	13	13.8
		a+19	1	1.1
nira4213	a=150	a	61	64.9
		a+3	8	8.5
		a+6	6	6.4
		a+9	46	48.9
		a+12	84	89.4
		a+15	87	92.6
		a+19	24	25.5
nira5090	a=118	a-3	7	7.4
		a	88	93.6
		a+2	10	10.6
		a+5	72	76.6
		a+7	77	81.9

マーカーサイズはプライマーごとに決定した基本サイズ(a)と比較し, a±塩基数で示す.

第 4 表 クラスター分析結果

EST-SSR <sup>7</sup> プライマー-5ペアでのクラスター分析結果			EST-SSR <sup>7</sup> プライマー-5ペア + SSR <sup>7</sup> プライマー-4ペアのクラスター分析結果		
クラスター	品種・系統名	品種・系統数	クラスター	品種・系統名	品種・系統数
A	大葉南洋、 <b>耐寒大葉</b> 、食用花ニラ・広幅、花ニラ、今田韓国、 <b>満州</b> 、 <b>黄ニラb</b> 、岩舟在来、津引1号・中国、岡山在来B、バキラ、新バキラ、 <b>グリーンベルト</b> 、スーパーグリーンベルト、ニューベルト、ニコニコ花子、サムライ、KJ-2425、サマーグリーンベルト、東北呼和、岡山在来A、ジャイアントベルト	22	A	大葉南洋、 <b>耐寒大葉</b> 、食用花ニラ・広幅、花ニラ、今田韓国、 <b>満州</b> 、 <b>黄ニラb</b> 、岩舟在来、津引1号・中国、岡山在来B、バキラ、新バキラ、 <b>グリーンベルト</b> 、スーパーグリーンベルト、ニューベルト、ニコニコ花子、サムライ	17
B	<b>漢中冬ニラb</b> 、漢中冬ニラA、中国ニラa、杭州ニラ、宮崎、63交雑系統、00-1-19、新漢中冬ニラ西安、大連、ニラ芽、タフマン、黄ニラa、ワンダーグリーンベルト、 <b>グリーンロード</b> 、タフボーイ、 <b>ミラクルグリーンベルト</b> 、ハイパーグリーンベルト、南京791、 <b>きぬみどり</b>	19	B-1	<b>漢中冬ニラb</b> 、漢中冬ニラA、中国ニラa、杭州ニラ、宮崎、63交雑系統、00-1-19、新漢中冬ニラ西安、大連、ニラ芽、タフマン	11
C	東北小口山形、漢中広葉、仙台、小国	4	B-2	ワンダーグリーンベルト、 <b>グリーンロード</b> 、タフボーイ、 <b>ミラクルグリーンベルト</b> 、ハイパーグリーンベルト	5
D	サンダーグリーンベルト、SK78、海南	3	C	仙台、小国	2
E	高知、祖谷	2	D	サンダーグリーンベルト、SK78、海南	3
F	小山在来、大分在来	2	E	—	—
G	漢中広葉A、94-1-106	2	F	小山在来、大分在来	2
H	W-908、ニコニコ太郎	2	G	—	—
I	津南青ニラa、津南青ニラb	2	H	—	—
J	蒙古、台湾	2	I	—	—
K	漢中冬ニラa、成都	2	J	—	—
L	呼和浩特、徳都	2	K	—	—
		64	L	呼和浩特、徳都	2
					42

ゴシック体はSSRプライマー選抜に供試した品種・系統を示す。

第 5 表 クラスター A, B 内において多型検出可能な SSR プライマーの選抜

プライマー名	クラスター内に多型あり	クラスターA, B間の多型あり	多型なし	増幅なしまたは再現性なし	計
nr0001~nr0020	1	7	11	1	20
nr0401~nr0421	0	1	16	3	20
nr1297~nr1318	0	2	12	6	20
nr5027~nr5031	2	0	1	2	5
nr5032~nr5042	0	0	7	4	11
nr5043~nr5074	0	5	7	20	32
nr5103~nr5114	0	2	2	8	12
nr5133~nr5144	1	2	2	7	12
計	4	19	58	51	132

第 6 表 選抜した SSR プライマー-4 ペアによる多型検出結果

クラスター	導入 origin (ID)	品種名	nr0008	nr5027	nr5028	nr5141
A	0006	耐寒大葉	172/173/192	231/249	269/273/276/280/286	221/223
	0020	満州	172/173/192	231/249	269/273/276/280/286	221/223
	0024	黄ニラb	172/173/192	231/249	269/273/276/280/286	221/223
	9701	グリーンベルト	172/173/192	231/249	269/273/276/280/286	221/223
B	0008	漢中冬ニラb	173/190/192	231/249/253	269/273/276/280/286/290	221/223
	9708	グリーンロード	173/190/192	231/249/253	269/273/276/280/ <b>282</b> /286/290	221/223
	9716	きぬみどり	173/190/192/ <b>193/196</b>	231/ <b>239</b> /249/253	269/273/276/280/ <b>282</b> /286/290	<b>219</b> /221/223
	1201	ミラクルグリーンベル	173/190/192	231/249/253	269/273/276/280/ <b>282</b> /286/290	221/223

(単位: nt)

ゴシック体は多型を示したアレル

イマーは 23 ペアで、うち 4 ペアはクラスター内の 4 品種・系統間において多型が得られたが、他の 19 ペアはクラスター A と B の間でのみ多型が認められた。残りのプライマーのうち、58 ペアは多型が認められず、51 ペアは

増幅が認められないか不安定であった。選抜した SSR プライマー-4 ペア(nr0008, nr5027, nr5028, nr5141)による多型検出結果は第 6 表に示したが、クラスター B から選定した 4 品種・系統で多型が認められた。これらの結果

から、遺伝的類縁関係を解析するプライマーとして、nr0008, nr5027, nr5028, nr5141 の4ペアを選抜した。なお、各プライマーの由来およびSSRモチーフの塩基数は、nr0008はRNA-seq由来の6塩基反復、nr5027およびnr5028はSSR濃縮ライブラリー由来の6塩基反復、nr5141はSSR濃縮ライブラリー由来の2塩基反復であった。

### 3. 選抜したSSRプライマーによる多型検出

選抜したSSRプライマー4ペア(nr0008, nr5027, nr5028, nr5141)を供試して94品種・系統をPCR増幅した結果は、第7表に示した。nr0008は10個、nr5027は12個、nr5028は17個、nr5141は6個、計45個のマーカが検出された。SSRマーカの94品種・系統における保有率は、nr0008のaが92.6%と最も高く、94品種・系統のうち87

第7表 RNA-seqおよびSSR濃縮ライブラリー由来のSSRプライマーで検出されたマーカの保有状況

プライマー名	マーカサイズ (nt)		マーカ保有品種・系統			
	基本	供試マーカ	系統数	保有率 (%)		
nr0008	a=173	a-2	9	9.6		
		a-1	23	24.5		
		a	87	92.6		
		a+3	8	8.5		
		a+16	3	3.2		
		a+17	35	37.2		
		a+19	74	78.7		
		a+20	22	23.4		
		a+22	1	1.1		
		a+23	5	5.3		
nr5027	a=231	a+2	3	3.2		
		a+3	13	13.8		
		a+5	11	11.7		
		a+8	21	22.3		
		a+10	1	1.1		
		a+12	6	6.4		
		a+14	3	3.2		
		a+16	20	21.3		
		a+18	73	77.7		
		a+20	9	9.6		
		a+22	42	44.7		
		a+24	3	3.2		
		nr5028	a=269	a-8	17	18.1
				a-4	3	3.2
a-2	5			5.3		
a	69			73.4		
a+2	10			10.6		
a+4	70			74.5		
a+5	8			8.5		
a+6	14			14.9		
a+7	64			68.1		
a+8	9			9.6		
a+9	9			9.6		
a+11	57			60.6		
a+12	9			9.6		
a+13	14			14.9		
a+17	45			47.9		
a+21	29			30.9		
a+23	3			3.2		
nr5141	a=221	a-2	5	5.3		
		a	80	85.1		
		a+2	84	89.4		
		a+4	8	8.5		
		a+10	1	1.1		
		a+12	7	7.4		

マーカサイズはプライマーごとに決定した基本サイズ(a)と比較し、a±塩基数で示す。

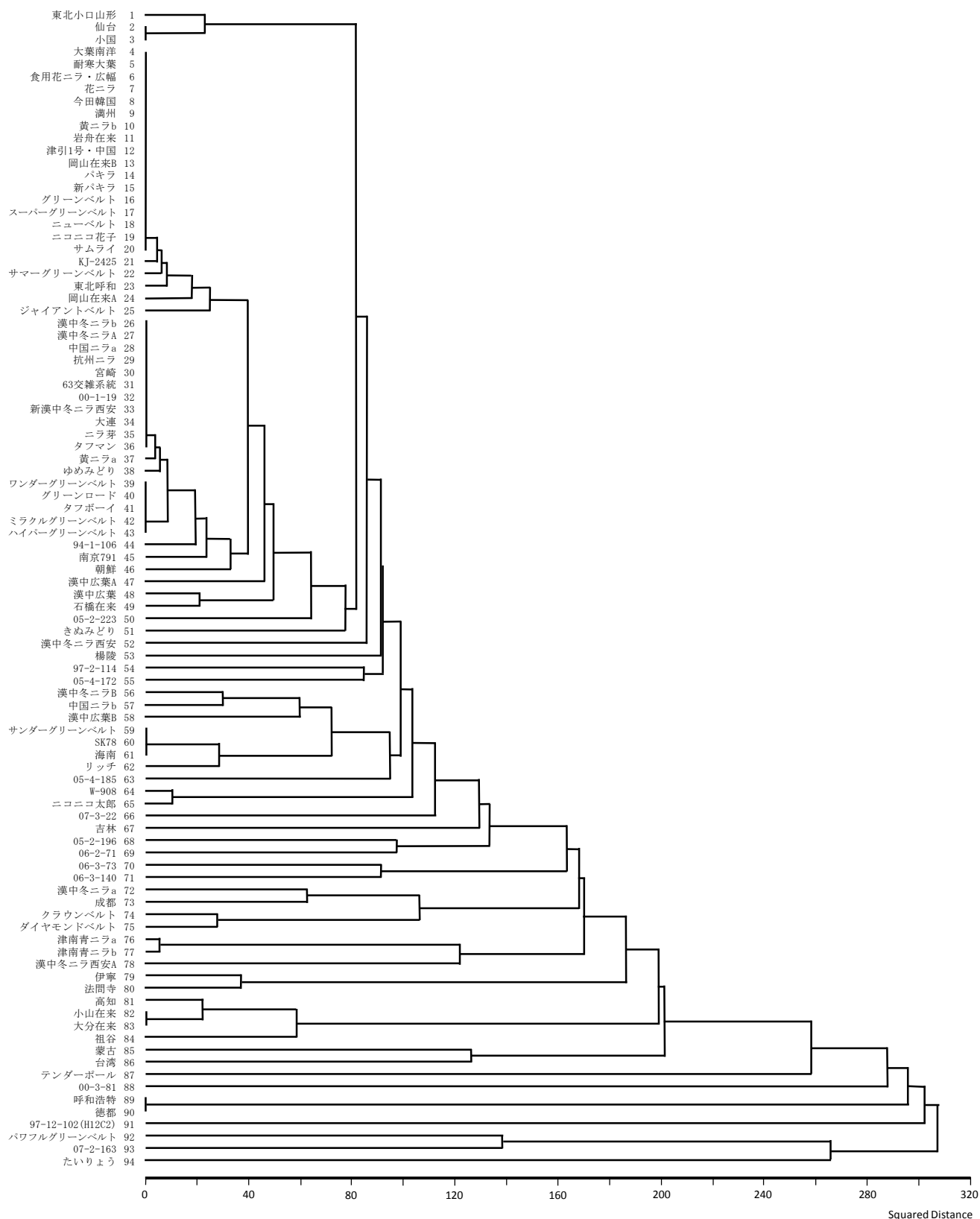
品種・系統で検出された。一方、全品種・系統のうち1品種・系統のみで検出されるマーカが3個確認され、それぞれnr0008のa+22は台湾、nr5027のa+10は97-12-102(H12C2)、nr5141のa+10は00-3-81の品種特異的マーカであった。第3表のEST-SSRプライマー5ペアの結果と第7表の本結果を合わせて、計9ペアのプライマーによって69個のマーカが検出された。

### 4. 全SSRマーカを用いたクラスター分析

69個のSSRマーカの多型データについて、群平均法を用いてクラスター分析を行い、作成した系統樹を第1図に示した。EST-SSRマーカのみでは識別できなかった64品種・系統のうち、新たに22品種・系統についても識別可能となり、全94品種・系統のうち52品種・系統が識別できた。第4表および第1図に示すように、クラスターAでは、22品種・系統のうち‘KJ-2425’‘サマーグリーンベルト’‘東北呼和’‘岡山在来A’‘ジャイアントベルト’の5品種・系統が新たに識別できた。クラスターBでは、19品種・系統のうち‘黄ニラa’‘南京791’‘きぬみどり’の3品種を識別することができ、残りの16品種・系統を11および5品種・系統に分類することができた。また、このほかに識別できなかった10パターン23品種・系統のうち‘東北小口山形’‘漢中広葉’‘高知’‘祖谷’‘漢中広葉A’‘94-1-1067’‘W-908’‘ニコニコ太郎’‘津南青ニラa’‘津南青ニラb’‘蒙古’‘台湾’‘漢中冬ニラa’‘成都’の計14品種・系統が識別できた。なお、交配母本として重要な両性生殖性11系統および新品種‘ゆめみどり’についても、すべて識別が可能であった。

## IV 考察

SSRマーカは、特定の遺伝子座のSSRモチーフの繰り返し回数の違いを検出するため、一般に共優性でありアレル数が多いことから、様々な植物種において遺伝的な類縁関係や多様性の解析に用いられている(Kimuraら, 2002; Yamamotoら, 2004; Krishnaら, 2004; Zhangら, 2012; Shodaら, 2012; Wangら, 2013; 高野・生井, 2015)。本研究では、両性生殖性中間母本を利用した交雑育種が始まったばかりのニラ育種において(齋藤ら, 2012)、母本の多様性を高め、遺伝資源全体の変異幅の拡大を図るための基礎データとして、現在保有する遺伝資源の類縁関係を明らかにすることを目的とした。そのため、供試したSSRプライマーは9ペアと比較的少数であったが、検出された計69個のマーカを用いてクラスター分析による系統樹が作成でき、全遺伝資源の類縁関係の傾向



第1図 ニラ94品種・系統の遺伝的類縁関係

を概観することができたことから、一定の成果を得られたといえる。今後は、遺伝的類縁関係を考慮したニラ育種の交配計画を策定していく予定であり、多くの組合せから生み出される多様性の拡大に期待が持たれる。

一方で本研究では、第4表に示すように、全く同じ多型パターン of 17品種・系統および11品種・系統を始めとして、供試したプライマーだけでは特定できない42品種・系統が存在した。9プライマーペアのみを用いた

解析とはいえ、識別できない品種・系統が多かった。この結果は、ニラが有する条件的アポミクシス(Kojimaら, 1991)に起因する可能性が示唆される。つまり、これまで育成された多くの品種・系統は、採種時や栽培時に発見された形質の異なる個体が選抜されたと推定される。栽培時であれば周りに存在するのは同一品種であるため、自殖による交雑で得られた品種・系統であることが予想され、採種時において得られた場合でも自殖による交雑の可能性が高いと考えられる。ニラはアポミクシスによってヘテロ性が固定されているが、9か所の遺伝子座のみで、自殖で得られた多型を検出するのは難しいと考えられる。それに比較し、人工交配による交雑から得られた‘ゆめみどり’や‘きぬみどり’、両性生殖性系統は、種子親と花粉親の両方の多型が検出されるため、全く同じ多型パターンを示す品種・系統はなかった。今後は、遺伝的な類縁関係と表現型との関連性を明らかにしていく必要がある。

第6表に示すように、SSR マーカーnr5028では、クラスターBで最大7つのピークが検出された。この結果から、ニラが4倍体である(Kojimaら, 1994)ことを考慮しても、更にゲノムが重複している可能性が示唆される。ニラは、ゲノムサイズが31.4 Gb(1C = 32.09 pg)と推定されている(Baranyi and Greilhuber, 1999)巨大なゲノムを有することから、多くの重複配列の存在が予想される。本研究では、RNA-seqやSSR濃縮ライブラリーのシーケンス情報から132プライマーペアを供試したが、他に6,000以上のSSRプライマーが設計済みである(田崎ら, 2015)。今後はそれらを利用して、複相大孢子形成性を始めとした有用形質に連鎖したDNAマーカーの開発を行っていく予定である。複相大孢子形成性は、作用力の大きな遺伝子に制御されているため(Yamashitaら, 2012)、単為発生性連鎖マーカーと同様なバルクセグレガント法(天谷ら, 2010)を用いて、マーカー開発が可能と考えられる。一方、他の有用形質は量的形質であることが想定され、遺伝解析やDNAマーカー開発に困難が伴うことが予想される。しかし、今後のニラ育種を効率化し、画期的な新品種を育成するためには、積極的に取り組んでいく必要があるだろう。

## 謝辞

本研究を実施するにあたり、供試材料を提供していただいた栃木県農業試験場研究開発部野菜研究室の皆様には厚くお礼申しあげる。また、栃木県農業試験場研究開発部生物学研究室の皆様には、貴重なご助言、ご協力をいただいた。ここに記して心から感謝の意を表する。

## 引用文献

- 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
- 天谷正行(1997)RAPD マーカーによるニラ品種の識別. 栃木農試研報 46 : 29-35
- 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種植物の育成. 栃木農試研報 43 : 87-94
- 天谷正行・中澤佳子・松本紀子・飯村一成(2010)バルクセグレガント法によるニラ四倍体(*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum* 2n=4X=32)の単為発生性連鎖マーカーの開発. 育種学研究 12 : 73-80
- Baranyi, M. and Greilhuber, J. (1999) Genome Size in *Allium*: In Quest of Reproducible Data. *Ann. Bot.* 83 : 687-695
- 木村 栄(1995)きぬみどり. 品種登録データ 第4363号
- Kimura, T., Shi, Y.Z., Shoda, M., Kotobuki, K., Matsuta, N., Hayashi, T., Ban, Y. and Yamamoto, T. (2002) Identification of Asian Pear Varieties by SSR Analysis. *Breed. Sci.* 52 : 115-121
- Kojima, A. and Nagato, Y. (1992a) Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. *Sex. Plant Reprod.* 5 : 72-78
- Kojima, A. and Nagato, Y. (1992b) Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. *Sex. Plant. Reprod.* 5 : 79-85
- Kojima, A., Kozono, T., Nagato, Y. and Hinata, K. (1994) Non-parthenogenetic Plants Detected in Chinese Chive, a Facultative Apomict. *Breed. Sci.* 44 : 143-149
- Kojima, A., Nagato, Y. and Hinata, K. (1991) Degree of apomixes in Chinese chive (*Allium tuberosum*) estimated by esterase isozyme analysis. *Japan J. Breed.* 41 : 73-83
- Krishna, G.K., Zhang, J., Burow, M., Pittman, R.N., Delikostadinov, S.G., Lu, Y. and Puppala, N. (2004) Genetic diversity analysis in Valencia peanut (*Arachis hypogaea* L.) using microsatellite markers. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9 : 685-97
- Michelmore, R.W., Paran, I., and Kesseli, R.V. (1991) Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*



- 88 : 9828-9832
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 : 4321-4325.
- 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 法によるニラの系統識別. *育種* 48(別 2) : 207
- 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・大島一則・天谷正行(2005)RAPD マーカーを用いたニラ交雑個体の選抜技術の確立. *栃木農試研報* 55 : 27-32
- 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. *育種* 48(別 2) : 206
- 生井 潔・田崎公久・柏谷祐樹・中澤佳子(2013)ニラ遺伝資源の類縁関係解析に用いる EST-SSR マーカーの作出. *育種学研究* 15(別 1) : 32
- 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)両性生殖性系統と単為発生性連鎖マーカーを利用したニラ四倍体 F1 集団における休眠性および抽だい期の変動. *栃木農試研報* 68 : 15-22
- Schuelke, M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18 : 233-234
- 島本 功・佐々木卓治 (1997) 新版植物の PCR 実験プロトコール : pp. 34-37, 秀潤社, 東京
- Shoda, M., Urasaki, N., Sakiyama, S., Terakami, S., Hosaka, F., Shigeta, N., Nishitani, C. and Yamamoto, T. (2012) DNA profiling of pineapple cultivars in Japan discriminated by SSR markers. *Breed. Sci.* 62 : 352-359
- 高野純一・生井 潔(2015)イチゴ炭疽病耐病性遺伝子の機能解析に用いる 2 倍体野生種系統の選定. *栃木農試研報* 73 : 67-76
- 田崎公久・若樹睦子・平川英樹・笹本茂美・窪岡久乃・南千春・磯部祥子・生井潔(2015)RNA-seq および濃縮ライブラリーによるニラ SSR マーカーの大量開発. *DNA 多型* 24 : 印刷中
- Wang, H., Jiang, J., Chen, S., Qi, X., Peng, H., Pi, Li, Song, A., Guan, Z., Fang, W., Liao, Y. and Chen, F. (2013) Next-generation sequencing of the *Chrysanthemum nankingense* (Asteraceae) transcriptome permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *PLoS One*. 23. e62293
- Yamamoto, T., Kimura, T., Soejima, J., Sanada, T., Ban, Y. and Hayashi, T. (2004) Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breed. Sci.* 54 : 239-244
- Yamashita, K., Nakazawa, Y., Namai, K., Amagai, M., Tsukazaki, H., Wako, T. and Kojima, A. (2012) Modes of inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids. *Breed. Sci.* 62 : 160-169
- Zhang, H., Wei, L., Miao, H., Zhang, T. and Wang, C. (2012) Development and validation of genic-SSR markers in sesame by RNA-seq. *BMC Genomics*. 13 : 316

