

# にら検定交配における倍数性測定による単為生殖率の推定

## 1. 成果の要約

にら育種試験（生産力検定：育種年次 6～7 年目）で行う検定交配について、今回新たに六倍体（以下、○倍体は○x と表記）花粉親系統「HT45-T3」を育成し、倍数性測定による単為生殖率推定法を検証した。これまで単為生殖率の推定は検定交配親に 4x 品種「テンドーポール（以下 TP）」を花粉親として、DNA マーカー利用による検定を行ってきたが、本試験では 6x 花粉親を用いた倍数性測定と従来の DNA マーカーによる両方の検定手法を比較し、両者で同様の検定結果を確認し、検定コストが安く、また検定期間の短い倍数性測定による単為生殖率推定法が有効であることを示した。

## 2. キーワード

検定交配、倍数性、DNA マーカー、六倍体花粉親系統「HT45-T3」

## 3. 試験のねらい

にらの新品種育成には、栽培上有用な形質だけではなく、単為生殖性の特性を利用した種子生産が前提となるため、単為生殖率が高いことが望まれる。これまでにらの単為生殖率は、4x 品種を検定交配の花粉親に利用し、得られた後代の交雑率を DNA マーカーで判定することで推定してきた。この手法は検定作業に約 1 か月の労力と 1 検定系統当たり約 8 万円（試薬等）のコストがかかる。一方、6x 個体を花粉親に用いた場合、交雑判定は倍数性の測定により可能となり、検定が低コストかつ短期間で行うことができる。本試験では 6x 花粉親系統を利用した倍数性測定による単為生殖率推定法を確立し、育種の効率化を図る。

## 4. 試験方法

「H12C2 (4x)」と四季咲き性である「TP (4x)」の交配集団 F<sub>1</sub> に、「TP」を戻し交配して得られた 6x 個体から、抽苔期間が TP と同等の「HT45-T3」を花粉親として選定し、両性生殖性に「H12C2 (4x)」及び単為生殖性に「2020 年生殖性検定系統：15-8-1 (4x) 及び 15-10-2 (4x)」と交配を行い、後代の倍数性及び交雑率を調査した。倍数性の測定はフローサイトメーター（Partec 社、PA 型）により行い、DNA マーカーによる単為生殖率推定結果と比較した。

## 5. 試験結果および考察

- (1) 両性生殖性に「H12C2 (4x)」に「HT45-T3 (6x)」を交配して得られた 75 個体の倍数性を確認した結果、4x、5x、6x の倍数性を判別でき、約 85% が交雑確認個体であった（図-1、表-1）。
- (2) 単為生殖性ニラ「15-8-1 (4x)」及び「15-10-2 (4x)」に「HT45-T3 (6x)」を交配し、倍数性測定と DNA マーカー検出による検定結果を比較した（表-2）。15-8-1 の後代は倍数性測定による検定では推定単為生殖率が 93.3%、DNA マーカーによる検定では推定単為生殖率が 75.0% であった。同様に 15-10-2 後代の単為生殖率は倍数性測定によるものが 85.3%、DNA マーカー検出によるものが 82.1% であった。
- (3) 今回、検定点数の多かった 15-10-2 の単為生殖率の推定結果において、倍数性測定と DNA マーカー検出による結果が同程度であり、検定コストや検定期間等を考慮した場合、倍数性測定による検定方法が有効と考える（表 3）。

（担当者 研究開発部 生物工学研究室 柏谷祐樹）

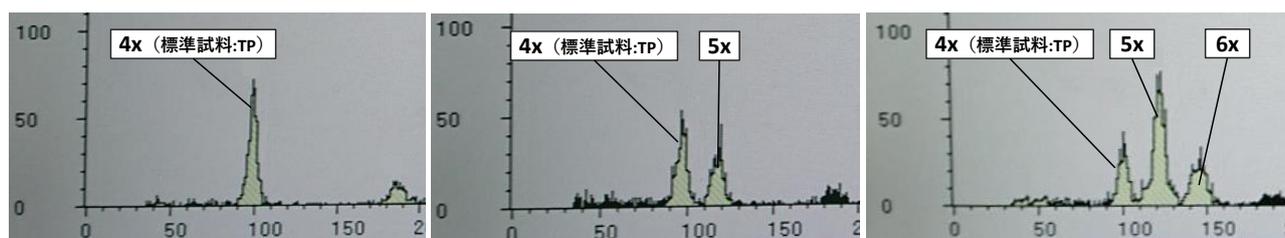


図-1 フローサイトメーターによる各倍数性個体の検出ピーク（横軸：蛍光強度、縦軸：裸核カウント数）

表-1 両性生殖性から「H12C2 (4x)」と「HT45-T3 (6x)」の後代の倍数性

交配子房親	花粉親	検定個体数	後代の倍数性（個・全体に占める割合）※		
			4x	5x	6x
H12C2 (4x)	HT45-T3 (6x)	75	8 (10.7%)	64 (85.3%)	3 (4.0%)

※倍数性が4xのものに6xの個体を交配した場合、交雑個体は両親から半々の染色体を引継ぐので、理論上倍数性は5xとなる。H12C2は両性生殖性ニラであるため、その後代の殆どは5xとなる。

表-2 検定方法の違いによる単為生殖率推定結果比較

交配組合せ		検定方法※1※2	検定個体数	交雑個体※3	推定単為生殖率
子房親（検定系統）	花粉親				
15-8-1 (4x)	HT45-T3 (6x)	倍数性測定※1	15	1	93.3%
	TP (4x)	DNAマーカー検出※2	12	3 (2)※3	75.0%
15-10-2 (4x)	HT45-T3 (6x)	倍数性測定※1	34	5	85.3%
	TP (4x)	DNAマーカー検出※2	67	12	82.1%

※1 倍数性測定法は、後代の倍数性が4xの場合は単為生殖個体、5xの場合は交雑個体と判定

※2 DNAマーカー検出法は、後代に花粉親特異的DNAマーカーが検出された場合、交雑個体と判定

※3 DNAマーカー検出法で交雑個体と判定した個体のうち()内は、花粉親特異的DNAマーカーは検出されなかったが、子房親とも異なるマーカー型を示したため、交雑個体と判定

表-3 検定方法の違いによる作業時間、コスト比較（検定個体数：100個体当たり）

検定方法	検出機器	検定日数	主な検定コスト	備考
倍数性測定	フローサイトメーター (Partec, PA型)	○フローサイトメーターによる蛍光強度測定 50検体/日 →計2日間程度	1,000円以下 (核酸染色液、混合試薬、カミソリ等)	測定方法の事前説明により未経験者でも測定可。測定時は前処理担当と測定担当の2名いた方が良い
DNAマーカー	DNAシーケンサー (Genome Lab BeckmanCoulter)	○花粉親特異的SSRマーカー選定 (6組合せ) 約2週間 (DNA抽出、PCR、電気泳動、解析) ○検定 (DNA抽出、PCR、電気泳動、解析) 約2週間 →約4週間程度	80,000円程度 [PCR試薬・電気泳動試薬 (6回分)]	検定に当たり、PCR操作、分析機器の取り扱い経験が必要