

Allium schoenoprasum L.における
鱗茎形成因子の遺伝的解明に関する研究

2010

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻
(岩手大学)

肖 靖

目 次

| | |
|--|----|
| 序 論 | 1 |
| 第一章 <i>Allium schoenoprasum</i> L.における変種間正逆交雑および戻し 交雑 | 7 |
| 1. 緒言 | 7 |
| 2. 材料および方法 | 8 |
| 3. 結果 | 10 |
| 4. 考察 | 12 |
| 5. 摘要 | 14 |
| 第二章 <i>Allium schoenoprasum</i> L.における鱗茎形成の遺伝性の調 査 | 26 |
| 1. 緒言 | 26 |
| 2. 材料および方法 | 27 |
| 3. 結果 | 28 |
| 4. 考察 | 30 |
| 5. 摘要 | 32 |
| 第三章 バルク法を用いた RAPD 分析による鱗茎形成遺伝子の探索 | 42 |
| 1. 緒言 | 42 |
| 2. 材料および方法 | 43 |

| | |
|-----------------------------------|----|
| 3. 結果 | 46 |
| 4. 考察 | 48 |
| 5. 摘要 | 50 |
| 第四章 <i>in vitro</i> における鱗茎形成条件の確立 | 56 |
| 1. 緒言 | 56 |
| 2. 材料および方法 | 57 |
| 3. 結果 | 58 |
| 4. 考察 | 59 |
| 5. 摘要 | 61 |
| 総合考察 | 76 |
| 総摘要 | 80 |
| 謝 辞 | 84 |
| 引用文献 | 85 |

序 論

球根は植物体の一部が肥大し，生育に適した環境になった場合，生長，発育するのが普通であり，不良環境下では成長を停止して休眠する（塚本，1973）．球根類としては，球茎，塊茎，塊根などとともに葉が肥大したユリ (*Lilium*) やタマネギなど鱗茎類が含まれる．

鱗茎植物はタマネギ (*A. cepa* L.)，ニンニク (*A. sativum* L.) などの蔬菜，ダリア (*Dahlia*)，チューリップ (*Tulipa gesneriana*)，ヒヤシンス (*Hyacinthu orientalis* L.) などの花卉と多くの主要作物が含まれており，非常に重要な作物群である．また，多くの鱗茎植物は鱗茎肥大と同時に休眠を伴い，冬季の低温期間を鱗茎で経過するものや，夏季の高温期間を鱗茎の状態で過ごすものなどがある．鱗茎植物は鱗茎の休眠により，生育に不適な季節あるいは環境条件を支障なく乗り越え，生命の維持と種の維持をはかることができる点で，生物学的意義があるとされている (青葉，1976)．

ネギ属植物 (*Allium* L.) は多様な形態で地下に栄養繁殖器官を発達させているが，結球性を示す種が多く存在する．その中には，主要蔬菜のタマネギ，ニンニクのように鱗茎肥大をして休眠期を持つ種と，ネギ (*A. fistulosum* L.)，ニラ (*A. tuberosum* Rottler.) のように鱗茎肥大せず休眠期を持たない種に大別される．

鱗茎形成や休眠について外的要因に関する研究は多く行われており，鱗茎形成を形態，生態，生理的な観点から調査した報告がある．Dutch iris (*Iris × hollandica*) と lotus (*Nelumbo nucifera*) の貯蔵器官の形成は環境によって制御可能であることが示され

た(Okubo and Uemoto,1981; Masuda et al., 2007). ヒヤシンス, ワケギ (*A.wakegi* Arak)などの鱗茎植物において, これまで長日やABA, 低温の影響が報告されている(Yamazaki et al., 1999, Okubo et al., 1999). *A. atropurpureum* などでは低温処理により球の形成が促進された(青葉, 1970). 特に, タマネギとニンニクは, 全世界において商業的価値が高いため, 球根形成に関する諸要因はかなり明らかにされている. すなわち, タマネギにおいては長日条件が鱗茎形成の主な環境因子であることが明らかにされており(Magruder and Allard,1937), ニンニクでは日長が長くなるほど貯蔵葉形成誘導の作用が強くなる(高樹, 1979). また, タマネギとニンニクの組織培養で 16 時間の長日条件が鱗茎形成に促進的に働くことが報告されている(Kastner et al., 2001;Ayabe and Sumi, 1998). しかし, 最近, ニンニク苗集団は鱗茎の形成能力と環境条件に反応などの特性における大きな変異を示した(Kamenetsky et al., 2003; Shemesh et al., 2008).

一方, 鱗茎形成植物の環境反応などに関する研究は多く報告されるのに対し, 鱗茎形成の遺伝様式および遺伝子レベルでの報告は少ない. その原因は対照として必要な球形成をしない鱗茎植物が容易に得られないことであると思われる. すなわち, 変種間交配による F_1 は容易に得られるものの, その多くが不稔になるためである(Currah and Ockendon,1988;Emsweller and Jones,1935;Van Der Meer and Van Benekom ,1978), したがって, 鱗茎植物において鱗茎形成型が分離できる世代が得られたら, 鱗茎形成因子の遺伝的解明ができると考えられる.

Allium schoenoprasum L.はユリ科(*Liliaceae*)ネギ属に属する耐

寒性の強い多年草の仲間で、北半球の新・旧大陸に非常に多様の形で広く分布し (Leven,1936), 各地で生態種が成立し (青葉, 1982), 多くの生態型と種類が存在する (Stearn,1978; Poulsen,1990).

A. schoenoprasum L.の基本種とされるチャイブは、ヨーロッパでハーブとして栽培されており、約 2000 年前から利用されてきた。分けつ性が高く、夏季に明確な鱗茎形成を示さず、地上部は枯れない。食用には緑色の葉身部を伸長させて用いられる(宮野, 1983)。また、花の群落は可憐で美しく、魅力があるため、観賞用植物として利用されている (Jones and Mann,1963)。

一方、アサツキ (*A. schoenoprasum* var. *foliosum*) は *A. schoenoprasum* L.の変種とされており、日本各地に野生し、奈良、平安時代以前から食用にされてきた。北海道、本州、四国の各地に分布し、数種類の変種が記載されている。在来種および野生植物の選抜系統が東北地方を中心に蔬菜として栽培されている。明確な品種はなく、岡安ら(1980)は形状から球重型と球数型の二つのタイプに分類されるとした。在来種および野生植物の選抜系統が用いられ、栽培上および育種的観点から形態、生態的特性および花粉、種子稔性などの調査が行われ、アサツキの示す多様な変異の様相が明らかにされた (岡安ら, 1980; 高樹, 1987; 高樹ら, 1993)。アサツキは秋と春に分げつを繰り返した後、鱗茎が肥大し、地上部が枯れ休眠に入る。原産地を中国や日本としている。アサツキはラッキョウに似た草姿をして、鱗茎はラッキョウより小型である。分けつ力が非常に強く、各分けつの基部に 1~数個の鱗茎を肥大する。鱗形は狭卵型で外皮は淡紫褐色である(八鍬, 1973)。食用には地下部の分けつした葉鞘あるいは地上に伸長し

た葉身部を含めた球根部を供している(岡安ら, 1980). 特に東北地方では秋に植えつけたアサツキの若芽を雪の中から掘り出し, 正月の料理に用いるなど, 青物の少ない冬期間の貴重な野菜としている. 料理法はひたし物や酢味噌和えが一般的であるが, 汁の実や魚介料理, 鍋物, そばなどの薬味としても利用されている(八鍬, 1973).

チャイブとアサツキの地上部の形態は比較的類似するが, 生理・生態は大きく異なっている点が多い. アサツキは夏季に鱗茎を肥大し, 地上部が枯れ, 休眠するのに対して, チャイブは明確な鱗茎肥大を示さず, 地上部も枯れずに生長を続ける. また, チャイブとアサツキの両変種は高い交雑親和性を持ち, この変種間では自由に乗換えが生じることが明らかとなっている. 得られたF₁植物は, いずれも鱗茎形成性および夏季の休眠性ともに, チャイブに近くなることを報告している(稲田, 1997). これらの特性を持つチャイブ, アサツキの後代を球形成のアサツキと戻し交配を行い, 鱗茎の分離が現れる世代が得られれば, 鱗茎形成に関与する遺伝子を探索できると思われる.

近年, RAPD分析およびアイソザイム分析などの分子遺伝学的手法が, 様々な形質の早期選抜マーカーとして利用されるようになってきた. これらのマーカーは環境の影響を受けにくく再現性が高いため, 園芸作物の品種識別や雑種性の確認などに広く用いられている(宮島ら, 2001). Random amplified polymorphic DNA(RAPD)は, Williams et al.(1990)によって開発された技術で, 植物遺伝育種に使うことのできる無数のマーカーを生み出す分子生物学の実験手法である. 種内の遺伝関係調査には, 育種にお

ける遺伝変異の効果的な利用が必要不可欠で、RAPD マーカーは種間の遺伝的類似性や多様な種類の品種分析に使われる (Tanikawa et al., 2002). 操作はきわめて迅速・簡便であるため、よく使用されている。 *A. schoenoprasum* L.と同じネギ属植物で RAPD 分析を用いた研究としては、 *A. fistulosum* L.と *A. schoenoprasum* L.の種間雑種の研究 (Umehara et al., 2005), リーキ (*A. ampeloprasum* L.)とニンニク (*A. sativum* L.)の種間雑種の作出と特徴付けの研究 (Yanagino et al., 2003)などが挙げられる。特に BSA 技術 (Bulk segregant analysis) は、分離集団の個体の DNA を様々にバルク化することにより、集中的にマーカーを作ることができる画期的な手法とされる (門奈, 1995)。性決定マーカーとして利用されることが多く、キウイ (Harvey et al., 1997), アスパラガス (Jiang and Sink, 1997), トチュウ (Xu et al., 2004), パパイア (Deputy et al., 2002)などの雌雄異株植物で検定がなされてきた。また、鱗茎形成植物の一つであるヒヤシンスにおいて、鱗茎形成を誘導する低温処理を行ったシュートの RNA を PCR した結果特異的な断片が得られ、鱗茎形成経路を活発化する遺伝子との相関が予測された (Ii et al., 2002a,b)。そこで、これらを応用し、鱗茎形成または非鱗茎形成植物に特有のマーカーが発見できれば、鱗茎形成遺伝子の検出が可能となると考える。

以上の研究を背景に、本研究は、ネギ属の鱗茎形成に関与する遺伝的解明を目的に、鱗茎を形成しないチャイブとその変種で鱗茎を形成するアサツキを用いて、 F_1 および BC_1 を獲得し、結球の分離様式の解明、RAPD マーカーによる鱗茎形成遺伝子の探索および *in vitro* における鱗茎形成条件の確立について、以下の実験

で検討した。まず，第一章において，チャイブとアサツキの交雑和合性を明らかにするため，両者の交配による F_1 および BC_1 の作出し，アイソザイム分析による得られた実生の雑種性の検定を行った。鱗茎の分離が現れる世代が得られるため，チャイブとアサツキの交配後代 F_1 は種子親として，アサツキは花粉親として，戻し交配を行い，比較的高比率でアサツキの結球の形質を遺伝し，その結果として，鱗茎の分離が現れる世代が得られた。次に，第二章では，チャイブとアサツキの交配で得られた F_1 実生およびそれらにアサツキを戻し交配した BC_1 実生について，鱗茎形成の遺伝性を調査し，鱗茎形成の遺伝様式を明らかにした。また， BC_1 世代において，結球型集団，非結球型集団のバルクを形成させた。そして，第三章では，第二章で選抜した結球型集団，非結球型集団のバルク間において特異的なバンドが得られるランダムプライマーを用い，RAPD 分析により調査し，得られたプライマーについて集団内のすべて個体に多型バンドが現れるかを調査し，鱗茎形成または非鱗茎形成に関与する RAPD マーカーの探索を目的として行った。続いて，第四章では，アサツキの自殖種を用いて，*in vitro* で培養して，温度と日長条件がアサツキの鱗茎の形成肥大に与える影響を調査した。

第一章

Allium schoenoprasum L.における変種間正逆交雑

および戻し交雑

1. 緒 言

チャイブは *A. schoenoprasum* L. の基本種であり，春から夏までに旺盛な分げつをするが，明確な鱗茎肥大は示さず (Jones and Mann, 1963)，また，年間を通じて葉が枯れない常緑植物的特性を示す．一方，その変種であるアサツキ (*A. schoenoprasum* var. *foliosum* Regel) は，秋と春に分げつを繰り返した後，自然な長日の夏季に明瞭な鱗茎肥大を示すとともに地上部が枯死するなど，チャイブとは異なる生態型をもつ (高樹, 1987)．チャイブとアサツキの変種間交配は，稲田 (1997) により行われており，本交配は容易に後代が得られること，得られた F_1 植物は，鱗茎形成性および夏季の休眠性とも，チャイブに近い特性を示すことを報告している．

このような背景から，チャイブとアサツキの交配において，鱗茎形成型の分離が現れる世代を得るためには，チャイブとアサツキの交配により得られた後代 F_1 とアサツキとの正逆戻し交配を行えば，比較的高比率でアサツキの結球形質が遺伝され，その結果として，鱗茎形成の分離が現れる世代が得られると考えられる．

そこで，本章では，チャイブとアサツキの交雑和合性を明らかにするため，両者の交配による F_1 および BC_1 を作出し，得られた実生についてアイソザイム分析による雑種性の検定を行った．

2. 材料および方法

供試材料および交配

材料として、鱗茎により増殖したチャイブ 3 系統とアサツキ 10 系統を用いた（第 1-1 表）。2004 年 5 月中旬から 6 月上旬にかけて、チャイブとアサツキの正逆交配を行った。これら組合せより獲得種子数が最多の 2 つの組合せ（チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6，チャイブ 6-5×アサツキ 1-3）を選抜し、戻し交配の種子親と花粉親に使用した。F₁ とアサツキの正逆戻し交配は 2005 年 5 月中旬から 6 月上旬にかけて行った。これらは、すべて、岩手大学の圃場の無加温ビニルハウス内で栽培を行った。

種子親に用いた花は開花約 7 日前に除雄し、他花の花粉が接触するのを防ぐため、開花期の 5 月中旬まで花全体をパラフィン製の交配袋で被覆した。花粉は、当年採集した新鮮な花粉または冷凍庫内（-20℃）でシリカゲルと共に保存した貯蔵花粉を用いた。交配は、除雄した花の柱頭に粘液が認められた時期に、ピンセットを用いて 1 花序あたり 20 小花以上の柱頭に花粉を付着させ、交配は 1 花序あたり 3 回以上にわたり行った。受粉後の花は、他花の花粉の混交を避けるため、再び交配袋で被覆した。最終交配日より約 1 ヶ月後に花序を収穫し、1 週間自然乾燥させた後採取し、着果率と小花あたりの獲得種子充実種子数を調査した。得られた種子はパラフィン紙に包み、播種するまでシリカゲルと共に冷蔵庫（5℃）で保存した。

花粉稔性

花粉稔性の調査は，スライドガラスに葯を置き，その上に 1% 酢酸カーミン溶液を 1～数滴滴下した．ピンセットの先で葯を押し，花粉を出したのち，カバーガラスをかぶせ，光学顕微鏡下観察した．300 花粉粒中の濃く着色した花粉を可稔性花粉として計測し，3 反復行った．花粉稔性率を求めた．

播 種

交配で得られた種子を，ろ紙 2 枚を敷き RO 水 5 ml を入れたシャーレに無菌播種し，暗黒下・20℃のグロースチャンバ内で発芽をさせた．発芽率調査の締め切り日数は，3 ヶ月とした．発芽後の種子は，2 種類の方法で育成した．すなわち，用土にソイルフレンドを用い，セルトレイ（縦 28 cm×横 54 cm，200 穴）に移植し，25℃のファイトトロン内での栽培と，1/2MS 斜面培地（ショ糖 3%，寒天 8%，pH5.8）が 10 ml 入った 11.7 cm×3.0 cm テストチューブに継代し，25℃のグロースチャンバ内での培養を行った．

雑種検定

F₁（チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6）および BC₁（F₁（チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6）×アサツキ 2A-6）の実生の雑種性を検定するために，アイソザイム分析を行った．雑種と認められた個体は圃場ファイトロンハウスとビニルハウス内に定植した．アイソザイム分析は，高木（1990）の方法に従い平板ポリアクリルアミド垂直電気泳動法により行った．新鮮葉 50 mg に，抽出液(Wendel and parks,1982)を 1 ml のパスツールピペットで 10-12 滴と海砂（20

～35mesh) 200 mg を加え，冷乳鉢内で摩砕した．摩砕した試料は酸化防止のため，polyvinylpolypyrrolidone(PPVP)約 20 mg を加え攪拌し，粗抽出液とした．粗抽出液を 1.5 ml チューブに移し，12000rpm で 2 分間遠心分離機した．上澄液 50 μ l を電気泳動にかけた．泳動は冷蔵庫内 (5°C) で，pH 8.3 の Tris-Glycine 泳動用緩衝液で，6 mA，4.5 時間で行った．電気泳動終了後，ゲルは MTT 染色を行った．

3. 結 果

花粉稔性

親の花粉稔性率は，チャイブでは 6, 10, アサツキでは 1, 2A, 岩泉，山形，アルプス，河原山，舳倉山およびジンジの各供試系統で 90% 以上と高かったが，チャイブ 7 では 28.6%，アサツキ 2 では 72.4% と低い個体もみられた (第 1-2, 1-3 表)．F₁ 世代の花粉稔性率は，チャイブ 6-1 × アサツキ 2A-6 の供試個体が 90% 以上であったが，他の組合せでは 0～94.3% と幅広い分布を示した (第 1-4 表)．

チャイブとアサツキの交配における交雑和合性

花粉稔性率が 98% 以上と高かったチャイブ 6, 10 と，アサツキ 1, 2A, 河原山の系統を用いて変種間の交配を行った．チャイブを種子親にしてアサツキと交配し，12 組合せが得られた．一方，アサツキを種子親としてチャイブと交配し，9 組合せを得た．チャ

イブ，アサツキの F_1 および BC_1 の地上部の様子を第 1-1 図に示した．正逆交配いずれの組合せでも着果が認められた(第 1-5 表)．着果率についてみると，チャイブを種子親に用いた 12 組合せでは，チャイブ 10-5×アサツキ 1-6 は 100% と最も高かった．アサツキを種子親に用いた 9 組合せでは，アサツキ 1-5×チャイブ 6-5 は 40.6% と高かった．獲得種子数についてみると，チャイブを種子親に用いた 12 組合せでは，チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6 の 1 番目の花序は 139 粒と最も高かった．アサツキを種子親に用いた 9 組合せでは，アサツキ 1-4×チャイブ 10-1 とアサツキ 1-5×チャイブ 6-5 は 13 粒と高かった．

正逆交配の組合せをみると，着果率について，チャイブを種子親に用いた正交配 (21.7%～100%) の方が，アサツキを種子親に用いた逆交配 (9.1%～40.6%) より高かった．獲得種子数も 1 小花あたりの種子数もアサツキを種子親にした逆交配より，チャイブを種子親にした正交配の方が多かった．

戻し交配

チャイブ×アサツキの F_1 を種子親にしてアサツキと戻し交配した結果，9 組合せが得られ，アサツキを種子親にした F_1 との戻し交配では 20 組合せが得られた． F_1 個体を種子親にした 9 組合せでは，(チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6) 20-②を種子親にした組合せが獲得種子数 55 粒で，1 小花あたりの種子数 1.15 で高かった(第 1-6 表)．アサツキを種子親にした 20 組合せでは，河原山 2 を種子親にした組合せが獲得種子数 15 粒で，河原山 1 を種子親にした組合せが 1 小花あたりの種子数 0.35 で高かった．以上の

値は、チャイブとアサツキの正逆交配結果に比べて全体的に少なかった。また、種子が得られなかった組合せは、アサツキの新潟、岩泉、アルプスを種子親にした場合であった。

得られた実生の発芽率

得られた種子を播種したところ、アサツキ河原山 $3 \times F_1$ (チャイブ 6-1 \times アサツキ 2A-6) 24 の交配を除き、すべての組合せで発芽が認められた(第 1-7 表)。発芽率についてみると、 F_1 では 50.0% から 90.0% まで、 BC_1 では 46.7% から 85.7% までそれぞれ分布した。

アイソザイム分析による雑種検定

チャイブとアサツキおよびその後代では、アイソザイム分析による多型が認められた(第 1-2 図)。チャイブでは泳動距離 26cm のところに 1 本のバンド、アサツキでは泳動距離 24cm のところに 1 本のバンドが検出された(第 1-3 図)。 F_1 では泳動距離 24cm ~ 26cm の間に 2 本の親のバンドとその中間の位置にヘテロバンドが現れ、合計 3 本のバンドが検出された。 BC_1 では F_1 のように 3 本のバンドのパターンと、アサツキのように泳動距離 24cm のところに 1 本のバンドのパターンが検出された。以上の結果から、供試個体の雑種性を確認することができた。

4. 考 察

本実験において、チャイブとアサツキの交配で F_1 と BC_1 が得

られたが，アサツキを種子親とした交配と F_1 の戻し交配した場合の獲得種子数が低く，1小花あたりの種子数は少ない傾向にあった（第 1-5 表，第 1-6 表）．これは，アサツキは 1 個体の展開葉数が少なく，また開花時には，これらの葉も先端から黄化が始まっていたため，光合成能力が低下したことが一因と考えられる．高樹ら（1993）の報告でも，アサツキの自然受粉による種子を形成した小花の割合は低いとしている．一方，チャイブや F_1 を種子親に用いた場合は高い着果率を示した．チャイブがアサツキに比べ交配時期の生育が良好で，地上部の茎葉が繁茂していたため，着果と結実に十分な光合成が可能であったことが考えられる．

花粉稔性についてみると，田代(1984)による，ネギとシャロットの稔性を有する花粉を用いて交配することで，種間雑種の種を得ることが可能であることが報告されている．また，末吉ら(2007)によると，ネギおよびシャロットの様々な稔性花粉率の花粉を交配に用いると，稔性花粉率が 80% 以上で種子の形成率が高くなる傾向にある．さらに，稲田ら（1995）は，チャイブとアサツキの花粉発芽率が系統間で大きな差異があることを報告している．そのため，交配する前に，すべての材料の花粉稔性を確認した結果，チャイブとアサツキおよび F_1 の花粉稔性率にはかなりの差異が認められた．これは高樹ら（1993）の結果と一致した．したがって，チャイブとアサツキの交配を効率的に実施し，優良な花粉親を選抜するためには，交配前に花粉稔性率の調査が不可欠であると考えられる．一方， F_1 は多くの個体が 90% 以上の花粉稔性率を示し，正常な減数分裂が行われたことを示している．しかしながら， F_1 個体中に，0% と非常に低い花粉稔性を示した 2 個体が

出現した。両個体が得られた交配組合せでは、他に各 1 個体が調査できたが、90%に近いまたはそれ以上の花粉稔性率であった。また、1 個体は、種子親としてアサツキの戻し交配により次代植物が得られている。Tatlioglu(1993)は、*A. schoenoprasum* L.の雄性不稔性を報告しており、また、稲田(1993)もチャイブとアサツキの交配で、供試材料は異なるが、チャイブの細胞質が関与する雄性不稔個体を観察している。したがって、これらの個体は、交雑による不稔ではなく、雄性不稔性の発現によるものと考えられる。

以上のように、チャイブとアサツキの正逆交配では比較的高い種子稔性を有し、さらに F_1 にもアサツキとの戻し交配で種子稔性のあることが示されたことから、チャイブとアサツキの両変種は高い交雑和合性があるといえる。

5. 摘 要

チャイブ×アサツキにおいて鱗茎の分離が現れる世代が得られるため、チャイブとアサツキ間の正逆交配およびアサツキとの戻し交配を行い、 F_1 および BC_1 が得られた。チャイブとアサツキの正逆交配の 21 組合せ中では着果が認められた。着果した組合せの獲得種子数について調査したところ、河原山 1×チャイブ 10-2、河原山 2×チャイブ 6-2 および河原山 3×チャイブ 10-2 の 2 粒からチャイブ 6-1×アサツキ 2A-6 の 1 番目の花序 139 粒までと幅広く分布した。そのうち、アサツキを種子親に用いた場合では、得られる種子数が少ない傾向がみられたが、チャイブを種子親に

用いた場合では，同一系統内でも個体差が大きかった．ここで得られた種子を播種したところ，アサツキ河原山 $3 \times F_1$ （チャイブ 6-1 \times アサツキ 2A-6）24 の交配を除き，すべての組合せで発芽が認められた．これらの発芽率についてみたところ，アサツキ 1-1 \times チャイブ 10-1，アサツキ 1-2 \times チャイブ 10-1 の 50.0% からチャイブ 6-5 \times アサツキ 1-3 の 90.0% までに分布した．

戻し交配することで，チャイブ \times アサツキの F_1 を種子親にしてアサツキと交配することと，アサツキを種子親して F_1 と交配することで 29 組合せ中，獲得種子数について調査したところ，アサツキの新潟，岩泉，アルプスを種子親にした場合では種子が得られなかったが，そのほかの組合せでは，1 粒から 55 粒まで幅広く分布した．また，いずれの組合せはチャイブ \times アサツキの組合せよりは少数であった． F_1 および BC_1 が作出されたことから，チャイブとアサツキの両変種は高い交雑和合性が明らかになった．

第1-1表 供試材料

| 種 | 系 統 | | | | | | | | | | |
|------|-----|---|----|----|-----|----|----|------|-----|-----|--|
| チャイブ | 6 | 7 | 10 | | | | | | | | |
| アサツキ | 1 | 2 | 2A | 岩泉 | 河原山 | 山形 | 新潟 | アルプス | 舳倉山 | ジンジ | |

第1-2表 チャイブの花粉稔性率

| 系 統 | 個体番号 | 花粉稔性率(%) ^z | 調査年 |
|-----|------|-----------------------|------|
| 6 | 1 | 99.3±0.82 | 2004 |
| | 2 | 99.9±0.14 | 2004 |
| | 3 | 99.7±0.24 | 2004 |
| | 4 | 99.1±0.72 | 2004 |
| | 5 | 99.0±0.47 | 2004 |
| | 6 | 99.9±0.14 | 2004 |
| | 7 | 99.1±0.89 | 2004 |
| | 8 | 100±0.00 | 2004 |
| 7 | 1 | 94.1±2.41 | 2004 |
| | 3 | 94.1±0.98 | 2004 |
| | 4 | 93.6±4.38 | 2004 |
| | 9 | 55.0±9.10 | 2004 |
| | 12 | 28.6±12.9 | 2004 |
| | 14 | 61.7±14.4 | 2004 |
| | 15 | 60.6±18.1 | 2004 |
| 10 | 1 | 99.4±0.36 | 2004 |
| | 2 | 99.7±0.24 | 2004 |
| | 3 | 98.6±0.89 | 2004 |
| | 4 | 99.3±0.62 | 2004 |
| | 5 | 99.4±0.68 | 2004 |
| | 6 | 100±0.00 | 2004 |

^z平均±標準誤差

第1-3表 アサツキの花粉稔性率

| 系統 | 個体番号 | 花粉稔性率(%) ^z | 調査年 |
|------|------|-----------------------|-----------|
| 1 | 1 | 99.4±0.49 | 2004 |
| | 2 | 99.6±0.36 | 2004 |
| | 3 | 99.7±0.24 | 2004 |
| | 4 | 99.8±0.27 | 2004 |
| | 5 | 99.4±0.49 | 2004 |
| | 6 | 99.3±0.47 | 2004 |
| | 7 | 99.9±0.14 | 2004 |
| | 8 | 98.6±1.16 | 2004 |
| | 9 | 99.8±0.27 | 2004 |
| 2 | 1 | 93.2±1.83 | 2004 |
| | 3 | 90.2±1.96 | 2004 |
| | 6 | 72.4±11.4 | 2004 |
| 2A | 1 | 96.0±1.25 | 2005 |
| | 2 | 98.3±0.24 | 2004 |
| | 3 | 99.3±0.41 | 2004 |
| | 5 | 99.1±0.14 | 2004 |
| | 6 | 98.6±0.98 | 2004 |
| | 岩泉 | 1 | 97.2±1.83 |
| | 2 | 94.4±1.89 | 2005 |
| 山形 | 1 | 95.4±0.14 | 2005 |
| | 2 | 98.2±1.21 | 2005 |
| | 4 | 98.0±0.85 | 2005 |
| | 5 | 93.3±0.71 | 2005 |
| | 8 | 98.4±0.27 | 2005 |
| | 新潟 | 1 | 80.4±3.20 |
| 4 | | 82.0±3.63 | 2004 |
| 5 | | 91.1±1.30 | 2004 |
| 6 | | 88.3±2.59 | 2004 |
| アルプス | 1 | 98.2±0.59 | 2005 |
| | 2 | 94.3±0.62 | 2005 |
| | 3 | 94.3±0.71 | 2005 |
| 河原山 | 1 | 99.8±0.27 | 2004 |
| | 2 | 99.9±0.14 | 2004 |
| | 3 | 98.9±1.36 | 2004 |
| | 4 | 100±0.00 | 2004 |
| 舳倉山 | | 99.8±0.14 | 2004 |
| ジンジ | | 98.2±0.27 | 2005 |

^z平均±標準誤差

第1-4表 チャイブ×アサツキの正逆交配によるF₁の花粉稔性率

| 系 統 | 個体番号 | 花粉稔性率(%) ^z | 調査年 |
|-----------------------------------|------|-----------------------|------|
| F ₁ (チャイブ6-1×アサツキ2A-6) | 9 | 95.8±0.83 | 2005 |
| | 10 | 98.0±1.41 | 2005 |
| | 14 | 93.3±0.41 | 2005 |
| | 15 | 94.7±0.85 | 2005 |
| | 20 | 93.2±2.63 | 2005 |
| | 24 | 96.7±1.03 | 2005 |
| | 25 | 95.4±0.76 | 2005 |
| F ₁ (チャイブ6-5×アサツキ1-3) | 17 | 4.78±0.95 | 2005 |
| | 45 | 94.0±3.40 | 2005 |
| F ₁ (チャイブ10-5×アサツキ1-3) | 34 | 0.00 | 2005 |
| | 36 | 88.0±1.18 | 2005 |
| F ₁ (アサツキ1-3×チャイブ6-5) | 4 | 94.3±0.01 | 2005 |
| | 13 | 82.4±0.03 | 2005 |
| F ₁ (アサツキ1-1×チャイブ10-1) | 5 | 84.1±0.05 | 2005 |
| | 9 | 84.7±0.05 | 2005 |

^z平均±標準誤差



第 1-1 図 夏季にかける地上部の様子 (2007 年 7 月 10 日)

第1-5表 チャイブとアサツキの正逆交配結果

| 交配組合せ | | 交配花数 | 着果数 | 着果率(%) | 獲得種子数 | 1小花あたりの種子数 ^γ | 交配日 | 採種日 | |
|-----------|------|----------------|-----|--------|-------|-------------------------|-----------|-----------|------|
| 種子親 | 花粉親 | | | | | | | | |
| チャイブ×アサツキ | | | | | | | | | |
| 6-1 | 2A-6 | ① ^γ | 48 | 40 | 83.3 | 139 | 2.90 | 5/12~5/15 | 6/21 |
| | | ② | 46 | 25 | 54.3 | 80 | 1.74 | 5/9~5/15 | 6/21 |
| | | ③ | 49 | 22 | 44.9 | 82 | 1.67 | 5/13~5/16 | 6/21 |
| | | ④ | 46 | 36 | 78.3 | 112 | 2.43 | 5/14~5/17 | 6/21 |
| | | ⑤ | 29 | 19 | 65.5 | 83 | 2.86 | 5/15~5/17 | 6/22 |
| 6-5 | 1-3 | ① | 39 | 14 | 35.9 | 77 | 1.97 | 5/15~5/17 | 6/21 |
| | | ② | 30 | 25 | 83.3 | 120 | 4.00 | 5/14~5/16 | 6/21 |
| | | ③ | 40 | 27 | 67.5 | 128 | 3.20 | 5/14~5/16 | 6/21 |
| 6-5 | 1-6 | 33 | 21 | 63.6 | 50 | 1.52 | 5/15~5/17 | 6/21 | |
| 7-12 | 1-6 | 83 | 18 | 21.7 | 27 | 0.33 | 5/23~5/26 | 6/22 | |
| 7-14 | 2A-5 | 76 | 31 | 40.8 | 50 | 0.66 | 5/22~5/24 | 6/22 | |
| 10-5 | 1-6 | 15 | 15 | 100.0 | 51 | 3.40 | 5/15~5/17 | 6/22 | |
| アサツキ×チャイブ | | | | | | | | | |
| 1-1 | 10-1 | 29 | 3 | 10.3 | 4 | 0.14 | 5/20~5/23 | 6/22 | |
| 1-2 | 10-1 | 32 | 5 | 15.6 | 6 | 0.19 | 5/20~5/23 | 6/22 | |
| 1-3 | 6-5 | 17 | 4 | 23.5 | 5 | 0.29 | 5/20~5/23 | 6/28 | |
| 1-4 | 10-1 | 28 | 9 | 32.1 | 13 | 0.46 | 5/20~5/23 | 6/22 | |
| 1-5 | 6-5 | 32 | 13 | 40.6 | 13 | 0.41 | 5/20~5/23 | 6/28 | |
| 1-6 | 6-5 | 22 | 4 | 18.2 | 7 | 0.32 | 5/14~5/16 | 6/22 | |
| 河原山1 | 10-2 | 17 | 2 | 11.8 | 2 | 0.12 | 6/8~6/10 | 6/28 | |
| 河原山2 | 6-2 | 34 | 8 | 23.5 | 2 | 0.06 | 6/8~6/10 | 6/28 | |
| 河原山3 | 10-2 | 22 | 2 | 9.1 | 2 | 0.09 | 6/8~6/10 | 6/28 | |

^z(着花数/交配花数)×100

^γ獲得種子数/交配花数

*○付き数字は花序ごとのデータを示す

第1-6表 チャイブとアサツキの正逆交配における戻し交配結果

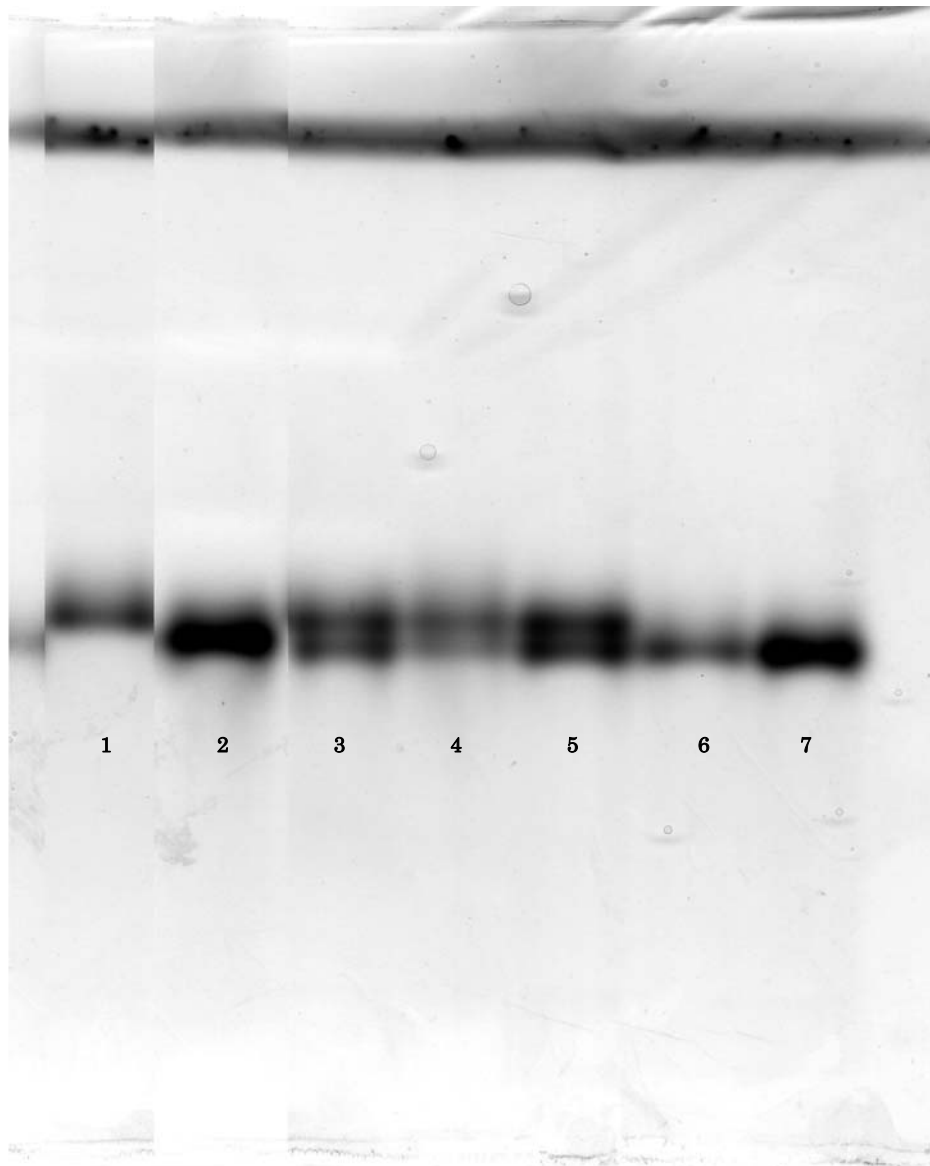
| 交配組合せ | | 交配花数 | 獲得種子数 | 1小花あたりの種子数 ² | 交配日 | 採種日 |
|---------------------------------|--------------|------|-------|-------------------------|-----------|------|
| 種子親 | 花粉親 | | | | | |
| F ₁ (チャイブ×アサツキ)×アサツキ | | | | | | |
| (6-1×2A-6)9 | 2A | 73 | 23 | 0.32 | 5/16~5/25 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)14 | 2A | 60 | 10 | 0.17 | 5/17~5/28 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)15-① | 2A | 45 | 40 | 0.89 | 5/19~5/25 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)15-② | 2A | 66 | 15 | 0.23 | 5/23~6/1 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)20-① | 2A | 61 | 54 | 0.89 | 5/23~6/1 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)20-② | 2A | 48 | 55 | 1.15 | 5/23~6/1 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)24 | 2A | 72 | 8 | 0.11 | 5/20~5/25 | 7/1 |
| (6-1×2A-6)25 | 2A | 54 | 18 | 0.33 | 5/20~6/1 | 7/1 |
| (6-5×1-3)17 | 1 | 65 | 52 | 0.80 | 5/20~6/1 | 7/1 |
| アサツキ×F ₁ (チャイブ×アサツキ) | | | | | | |
| 2-3 | (6-1×2A-6)9 | 44 | 1 | 0.02 | 5/24~5/28 | 7/1 |
| 2A-1 | (6-1×2A-6)20 | 40 | 2 | 0.05 | 5/23~5/28 | 7/1 |
| 2A-3 | (6-1×2A-6)20 | 36 | 1 | 0.03 | 5/22~6/8 | 7/1 |
| 山形1 | (6-1×2A-6)9 | 35 | 2 | 0.06 | 5/17~5/28 | 6/30 |
| 山形2 | (6-1×2A-6)15 | 38 | 3 | 0.08 | 5/25~5/28 | 6/30 |
| 山形4 | (6-1×2A-6)24 | 11 | 3 | 0.27 | 5/25~5/28 | 6/30 |
| 山形5 | (6-1×2A-6)14 | 47 | 1 | 0.02 | 5/17~5/25 | 6/30 |
| 山形7 | (6-1×2A-6)25 | 53 | 4 | 0.08 | 5/21~6/2 | 6/30 |
| 新潟4 | (6-1×2A-6)9 | 29 | 0 | 0.00 | 5/26~6/4 | 7/1 |
| 新潟6-① | (6-1×2A-6)14 | 27 | 0 | 0.00 | 5/26~6/3 | 7/1 |
| 新潟6-② | (6-1×2A-6)14 | 41 | 1 | 0.02 | 5/26~6/4 | 7/1 |
| 岩泉4 | (6-1×2A-6)15 | 55 | 0 | 0.00 | 5/27~6/3 | 7/1 |
| アルプス1 | (6-1×2A-6)20 | 43 | 1 | 0.02 | 6/1~6/8 | 7/1 |
| アルプス2 | (6-1×2A-6)20 | 13 | 0 | 0.00 | 6/1~6/5 | 7/1 |
| アルプス3 | (6-1×2A-6)20 | 42 | 6 | 0.14 | 5/24~6/8 | 7/1 |
| 河原山1 | (6-1×2A-6)24 | 20 | 7 | 0.35 | 6/2~6/12 | 7/1 |
| 河原山2 | (6-1×2A-6)24 | 55 | 15 | 0.27 | 6/2~6/10 | 7/1 |
| 河原山3 | (6-1×2A-6)24 | 54 | 3 | 0.06 | 6/2~6/10 | 7/1 |
| ジンジ4 | (6-1×2A-6)25 | 38 | 5 | 0.13 | 5/31~6/9 | 7/1 |

²獲得種子数/交配花数

第1-7表 交配で得られた種子の発芽率

| 系 統 | 播種数 | 発芽率(%) | 調査年 |
|---|-----|--------|------|
| F₁(チャイブ × アサツキ) | | | |
| 6-1 × 2A-6 | 30 | 73.3 | 2004 |
| 6-1 × 2A-6 | 50 | 82.0 | 2004 |
| 6-5 × 1-3 | 50 | 90.0 | 2004 |
| 7-14 × 2A-5 | 50 | 58.0 | 2004 |
| 10-1 × 2A-6 | 50 | 72.0 | 2004 |
| 10-1 × 2A-6 | 30 | 80.0 | 2004 |
| 10-5 × 1-3 | 50 | 78.0 | 2004 |
| F₁(アサツキ × チャイブ) | | | |
| 1-1 × 10-1 | 4 | 50.0 | 2004 |
| 1-2 × 10-1 | 6 | 50.0 | 2004 |
| 1-4 × 10-1 | 13 | 76.9 | 2004 |
| 1-5 × 6-5 | 13 | 76.9 | 2004 |
| 1-6 × 6-5 | 7 | 57.1 | 2004 |
| BC₁^y(F₁ × アサツキ) | | | |
| F ₁ 14 × アサツキ2A | 40 | 50.0 | 2005 |
| F ₁ 20 × アサツキ2A | 109 | 77.1 | 2005 |
| F ₁ 17 × アサツキ1 | 52 | 63.5 | 2005 |
| BC₁(アサツキ × F₁) | | | |
| アサツキ河原山1 × F ₁ 24 | 7 | 85.7 | 2005 |
| アサツキ河原山2 × F ₁ 24 | 15 | 46.7 | 2005 |
| アサツキ河原山3 × F ₁ 24 | 3 | 0.00 | 2005 |

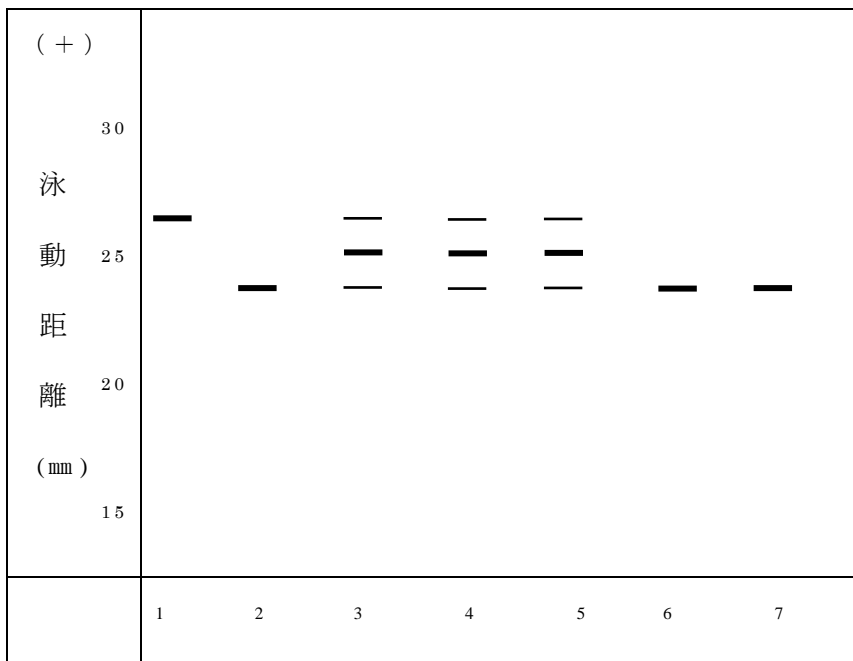
^y F₁14,20,24…チャイブ6-1 × アサツキ2A-6, F₁17…チャイブ6-5 × アサツキ1-3



第 1-2 図アイソザイム分析による観察されたバンドパターンの分離

1:チャイブ 6-1, 2:アサツキ 2A-6, 3: F_1 (チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6),
4: BC_1 -69, 5: BC_1 -67, 6: BC_1 -45, 7: BC_1 -60

* BC_1 : F_1 (チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6) ×アサツキ 2A-6



第 1-3 図 アイソザイム分析による観察されたザイモグラム
 1:チャイブ 6-1, 2:アサツキ 2A-6, 3:F₁(チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6),
 4:BC₁-69, 5:BC₁-67, 6: BC₁-45, 7: BC₁-60
 * BC₁: F₁ (チャイブ 6-1×アサツキ 2A-6) ×アサツキ 2A-6

第二章

Allium schoenoprasum L.における

鱗茎形成の遺伝性の調査

1. 緒 言

地下植物において鱗茎形成の遺伝様式および遺伝子レベルの解明についての報告は少ない。それは、異種交配による可稔の結球型と非結球型の分離できる植物材料を得ることが困難であることが一因と考えられる。しかも、鱗茎形成は環境の影響を受ける。ネギ属 (*Allium*) 植物には結球性を示す種類が多く存在するものの、多くの種間交配による得られた F_1 は不稔であることから、鱗茎形成の遺伝様式の研究はまだ不十分で、不明な点が多い。鱗茎形成型の分離が出現する F_2 または BC_1 が得られれば、その遺伝解析が可能になると考えられる。

チャイブは夏季までに旺盛な分けつをし、明確な鱗茎形成を示さず (Jones and Mann, 1963)、夏季に地上部の枯れがみられなかった (Poulsen, 1990)。一方、その変種であるアサツキは、秋と春に分けつを繰り返した後、夏季に明瞭な鱗茎肥大および地上部が枯れるなどの異なる生態型をもつ。前章で、非結球型であるチャイブと結球型であるアサツキは変種関係にあり、容易に交配が可能であること、またこの変種間では染色体の自由な組換えが生じ

ることを明らかにした。これらの F_1 世代ではすべての個体が鱗茎を肥大しないため、鱗茎形成の遺伝様式について明らかになっていない。

以上のことから、本章ではチャイブとアサツキの交配で得られた F_1 実生およびそれらにアサツキを戻し交配した BC_1 実生について、鱗茎形成の遺伝性を調査した。

2. 材料および方法

供試材料

2004年にチャイブ 6-1 およびアサツキ 2A-6 各 1 個体供試し、チャイブを種子親に、アサツキを花粉親にして交配し F_1 26 株を作出した。これらは、形態学的測定に使用した。2005年に、生態特性がチャイブに類似した F_1 個体群より 1 個体を任意に選抜し、それにアサツキの花粉を交配して BC_1 51 個体を作出した。これらを岩手大学圃場内の無加温ビニルハウス内で栽培した。

鱗茎形成特性の観察と測定

(1) 鱗茎肥大比

2005年7月下旬から8月上旬にかけてチャイブ、アサツキおよびこれらの交配で得られた F_1 個体を掘り上げ、鱗茎肥大比（最大球茎直径／最大葉鞘直径）を各クローン個体 5 反復計測した。また、チャイブ、アサツキおよび BC_1 作出に用いた F_1 1 個体については、年次変動を調査するため、2006年から2009年にかけて鱗茎肥大比を測定した。 F_1 個体にアサツキを戻し交配した BC_1

個体については、2006年から2009年までの4年間にわたって鱗茎肥大比を調査した。

(2) 最大鱗葉厚

鱗茎形成の様子を組織学的に観察するため、鱗茎の最も肥大した位置より横断切片を作製し、トリジンブルーで染色後、実体顕微鏡下で最も厚い鱗片の厚さを最大鱗葉厚として測定された。なお、最大鱗葉厚は、2007年から2009年までの3年間の平均値で表わした。

3. 結 果

F₁およびBC₁世代における鱗茎肥大比の分離

チャイブは、夏季(7月~8月)に休眠に入らず、明瞭な鱗茎肥大はみられなかった(第2-1図)。チャイブの1個体の平均分けつ数は75で、鱗茎肥大比は1.35となった(第2-1表)。一方、アサツキでは、地上部が枯れ、明瞭な鱗茎肥大が観測された。1個体の平均分けつ数は22で、鱗茎肥大比は4.07であった。F₁実生は葉鞘基部の形態がチャイブに近く、アサツキの様に明瞭な鱗茎肥大はみられなかった。夏季に休眠に入らず、1個体の平均分けつ数が60で、鱗茎肥大比は1.33でチャイブに類似された。チャイブ、アサツキおよびF₁の最大球径直径範囲はそれぞれ0.40~0.87cm, 1.20~2.15cm, 0.56~0.92cmであった。チャイブ、アサツキおよびBC₁作出のために用いたF₁1個体について調査したところ、年次間で大きさは異なったが(第2-2表)、いずれの

年もアサツキでは鱗茎肥大比が大きく，チャイブおよび F_1 個体は小さく，チャイブとアサツキおよび F_1 間では 1% 水準で有意差がみられた． F_1 集団の鱗茎肥大比は，1.02~1.19 の範囲になり，チャイブ(1.07)に近い値となり，いずれの個体も明瞭な鱗茎肥大は確認できなかった．

BC_1 個体では鱗茎が肥大する個体と肥大しない個体がともに出現した（第 2-1 図）． BC_1 個体群の分けつ数は 17 から 136 まで幅広く分布した．鱗茎肥大比は 1.49~3.10 の範囲に分布し（第 2-3 表），結球する個体としない個体がともに出現したが，その変異は連続的であり，中間型も多く出現した（第 2-2 図）．

BC_1 世代における最大鱗葉厚の分離

鱗茎の最大肥大部における横断切片面を観察したところ，鱗茎内の分けつ数は 1.2~4.3 の範囲に分布し，最大鱗葉厚は 1.02 から 6.97 まで分布した（第 2-4 表）．鱗茎肥大が認められないチャイブや F_1 と外見上類似した BC_1 個体（第 2-3 図 BC_1 -1）は，鱗茎面の観察でもチャイブや F_1 と近似した（第 2-4 図 D）．外見上，鱗茎肥大が認められた BC_1 個体群は，チャイブ（第 2-4 図 A）や F_1 （第 2-4 図 C）に類似した分けつ型とアサツキ（第 2-4 図 B）に類似した鱗葉肥大型の 2 つのタイプに分類された（第 2-4 図 E,F）． BC_1 個体群の最大鱗葉厚は，チャイブ（0.7 mm）および F_1 個体（1.1 mm）に近い 1.0~1.5 mm，アサツキ（6.4 mm）に近い 5.0 mm 以上，その中間の 3.0~3.5 mm の 3 か所にピークがみられ，中間は最も多く分布した（第 2-5 図）．

4. 考 察

本実験の結果，チャイブとアサツキの交配で得られた F₁ 実生の葉鞘基部の形態はチャイブに近く，鱗茎肥大比もチャイブに近い値となり，いずれの個体も明瞭な鱗茎肥大は確認できなかった。稲田（1997）はチャイブとアサツキの変種間交配で得られた F₁ 植物の鱗茎形成性がチャイブに近くなると報告しており，本実験の結果と一致した。また，結球種としてアサツキを用い，非結球種としてネギを用いた種間交配では，雑種の形態がネギに近く，鱗茎があまり肥大しないことが報告されている (Gonzalez and Ford-Lloyd, 1987; Umehara et al., 2006)。これらのことから，アサツキの鱗茎形成に関する形質は遺伝的に劣性であることが考えられる。一方，他の結球種ラッキョウ (*A. chinese*) とネギとの交雑では，得られる雑種は鱗茎を肥大することが報告されている (Nomura and Makara, 1996)。さらに，ワケギ (*A. wakegi* Araki) は非結球種であるネギを母親とし，結球種である *A. cepa* を父親とした雑種であると考えられている (Tashiro, 1984; Hizume, 1994; Tashiro et al., 1995)。しかも，Arifin et al. (2000) によればネギとタマネギの雑種ワケギは鱗茎を肥大する。Masuzaki et al. (2007) は *A. cepa* において鱗茎形成が優性形質として働くと報告しているが，本実験では *A. schoenoprasum* の鱗茎形成が劣性であることが認められた。

本章では，鱗茎肥大には分けつにより肥大したものと鱗葉そのものが肥大したものがあり，従来使用されている鱗茎肥大比では

判別できなかつたことから、鱗茎肥大の指標として最大鱗葉厚を用いた。その結果、BC₁世代では結球型、非結球型および中間型の3タイプに分離した。このことは、鱗茎形成に関与する遺伝子は二つ以上あることを示す。すなわち、鱗茎形成に関与する遺伝子が二つと仮定した場合、これら二つの遺伝子A、B（AとBは優性形質で非鱗茎形成を支配する；aとbは劣性遺伝子で鱗茎形成を支配する）が相加的に働けば、アサツキの鱗茎形成を支配する遺伝子はaabb、チャイブの非鱗茎形成はAABBで、F₁はAaBbの遺伝子型になり、BC₁は結球型aabb、中間型Aabb、aaBb、非結球型AaBbの遺伝子型を持ち、比率は1:2:1になることが考えられる。もし、三つの遺伝子が働く場合、分離比率は1:6:1になる。本実験ではBC₁において3つのピークが現れ、中間型が最も多く出現し、その比率は1:2:1であった。したがって、鱗茎形成は二つの遺伝子に支配されると考えるのが適当である。

Hanelt (1990)によると *A. cepa* L., *A. fistulosum* L.と *A. chinense* は *Cepa* に属しているが、*A. schoenoprasum* L.は *Schoenoprasum* に属していることが示されている。鱗茎形成と分類の関係はまだ明らかになっていない。ネギ属では鱗茎形成の進化の見解が一致していない。しかし、Kamenetsky と Rabinowitch (2006)により、根茎は、ネギ属先祖の最初の特徴であったが、鱗茎は先進の進化ステージであることが示されている。一方、Fritsch (2001)は、鱗茎形成は進化の産物ではなく、ネギ属先祖の特徴の一つであると述べている。このように、可稔の世代を得ることが困難であるため、鱗茎形成の遺伝性とその優勢性については鱗茎形成進化であるという観点が確立されていない。

本章では，種内で両タイプ植物（結球型と非結球型）が得られた．しかも，鱗茎形成の遺伝性が明らかになった．これはネギ属だけではなく，ほかの結球種でも鱗茎進化の更なる理解を貢献できると考えられる．鱗茎形成と鱗茎休眠の分子研究に役立つと思われる．今後，両タイプの可稔の世代が対照に使えることが考えられる．

5. 摘 要

チャイブは夏までに分けつをし，夏季に明瞭な鱗茎肥大を示さず，地上部の枯れがみられない．チャイブは，夏季に明瞭な鱗茎を生産しないが，その変種であるアサツキは秋と春に分けつを繰り返した後，夏季に明確な鱗茎肥大および地上部が枯れるなど異なる生態型を持つ．本章では，チャイブ×アサツキの F_1 個体および F_1 個体にアサツキを戻し交配して得られた BC_1 個体について，鱗茎肥大の有無を調査した．すべての F_1 個体は鱗茎を肥大しなかった．鱗茎肥大比（最大球茎直径/最大葉鞘直径）に基づく分類したところ， BC_1 個体の鱗茎形成は，非結球型および結球型の2つのタイプに分類された．しかしながら，鱗茎肥大比による分類では，これらの変異は連続的であるため結球型と非結球型を区別することは困難であった．したがって，鱗茎内の最大鱗葉厚に基づいて分類したところ，結球型，中間型および非結球型に明瞭に区別された．これらの結果より，*Allium schoenoprasum* L.における鱗茎形成には，2つの劣性遺伝子が関与していることが示唆された．



第 2-1 図 鱗茎形態の比較 (2007 年 8 月 6 日)

第2-1表 4年間にわたって調査したF₁および両親の結果

| 系 統 | 分けつ数 | max | min | 鱗茎肥大比 ^y |
|-----------------------|------|------|------|--------------------|
| チャイブ | 75 | 0.65 | 0.50 | 1.35 |
| アサツキ | 22 | 1.57 | 0.43 | 4.07 |
| F ₁ | 60 | 0.70 | 0.52 | 1.33 |
| max: 最大球茎直径; | | | | |
| min: 最大葉鞘直径; | | | | |
| ^y max/min. | | | | |

第2-2表 4年間にわたって調査したF₁および両親の鱗茎肥大比^y

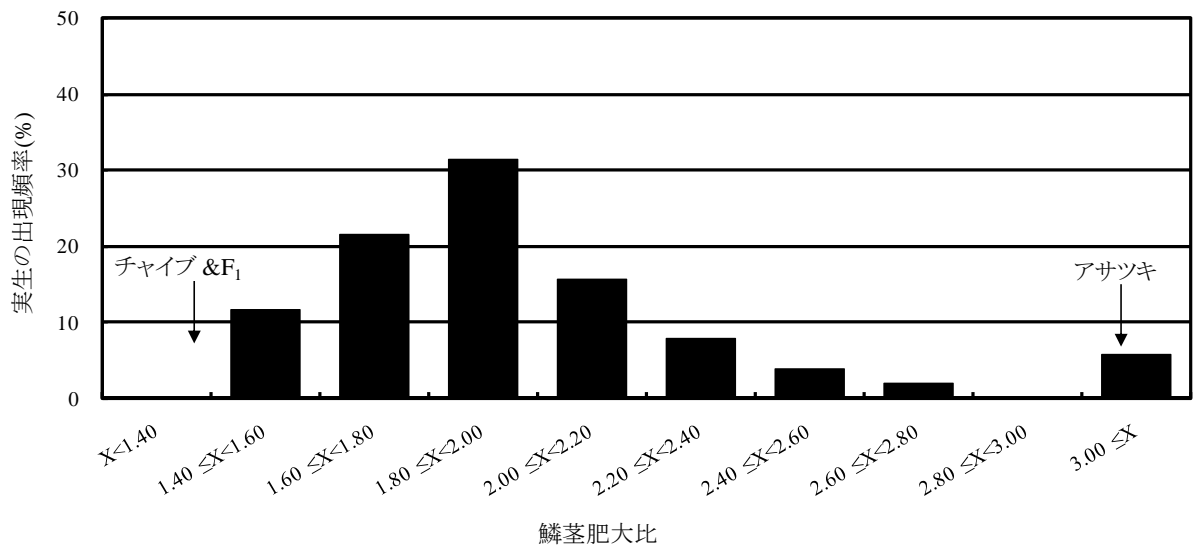
| 系 統 | 2006年 | | 2007年 | | 2008年 | | 2009年 | |
|----------------|-------|----------------|-------|---|-------|---|-------|---|
| アサツキ | 6.31 | a ^z | 4.54 | a | 3.02 | a | 2.70 | a |
| チャイブ | 2.04 | b | 1.19 | b | 1.47 | b | 1.47 | b |
| F ₁ | 1.25 | b | 1.27 | b | 1.38 | b | 1.33 | b |

^z Tukeyの多重検定により異なる英小文字間は同じ年で系統間に1%水準で有意差あり(P<0.01,n=5)

^y最大球茎直径/最大葉鞘直径

第2-3表 BC₁における鱗茎肥大比の分布

| 系統番号 | 分けつ数 | max | min | 鱗茎肥大比 ^y |
|-----------------------|------|------|------|--------------------|
| 16 | 123 | 0.77 | 0.52 | 1.49 |
| 23 | 68 | 0.79 | 0.53 | 1.50 |
| 46 | 53 | 0.59 | 0.39 | 1.52 |
| 57 | 53 | 0.89 | 0.59 | 1.52 |
| 19 | 35 | 0.81 | 0.53 | 1.52 |
| 15 | 127 | 0.97 | 0.62 | 1.56 |
| 83 | 125 | 0.73 | 0.47 | 1.56 |
| 22 | 113 | 1.00 | 0.64 | 1.58 |
| 9 | 59 | 0.92 | 0.58 | 1.59 |
| 58 | 62 | 0.72 | 0.45 | 1.60 |
| 76 | 108 | 0.94 | 0.58 | 1.62 |
| 72 | 122 | 0.98 | 0.61 | 1.62 |
| 48 | 40 | 1.01 | 0.61 | 1.64 |
| 82 | 61 | 0.84 | 0.50 | 1.70 |
| 41 | 59 | 1.05 | 0.61 | 1.70 |
| 62 | 68 | 0.76 | 0.44 | 1.74 |
| 28 | 117 | 1.05 | 0.60 | 1.75 |
| 75 | 87 | 1.26 | 0.72 | 1.76 |
| 44 | 107 | 1.10 | 0.61 | 1.80 |
| 20 | 123 | 1.12 | 0.62 | 1.82 |
| 34 | 123 | 1.17 | 0.64 | 1.82 |
| 42 | 34 | 0.84 | 0.46 | 1.83 |
| 51 | 85 | 0.90 | 0.49 | 1.83 |
| 4 | 74 | 1.24 | 0.67 | 1.85 |
| 10 | 64 | 1.04 | 0.56 | 1.86 |
| 54 | 70 | 1.16 | 0.62 | 1.87 |
| 29 | 69 | 1.15 | 0.61 | 1.88 |
| 60 | 37 | 0.98 | 0.52 | 1.89 |
| 40 | 128 | 1.07 | 0.56 | 1.90 |
| 7 | 81 | 1.18 | 0.62 | 1.91 |
| 8 | 47 | 1.08 | 0.56 | 1.92 |
| 5 | 75 | 1.37 | 0.71 | 1.92 |
| 79 | 42 | 1.16 | 0.59 | 1.96 |
| 12 | 68 | 0.76 | 0.39 | 1.96 |
| 13 | 63 | 1.27 | 0.65 | 1.96 |
| 32 | 62 | 1.00 | 0.51 | 1.98 |
| 49 | 56 | 1.01 | 0.51 | 1.98 |
| 63 | 68 | 0.93 | 0.47 | 1.99 |
| 52 | 48 | 1.11 | 0.56 | 1.99 |
| 69 | 78 | 0.81 | 0.40 | 2.02 |
| 14 | 72 | 1.01 | 0.50 | 2.03 |
| 30 | 112 | 1.18 | 0.57 | 2.06 |
| 17 | 136 | 1.24 | 0.60 | 2.08 |
| 3 | 110 | 1.20 | 0.57 | 2.10 |
| 11 | 17 | 1.22 | 0.56 | 2.20 |
| 31 | 52 | 1.34 | 0.59 | 2.25 |
| 2 | 48 | 1.60 | 0.66 | 2.42 |
| 6 | 72 | 1.22 | 0.49 | 2.49 |
| 24 | 59 | 1.06 | 0.40 | 2.68 |
| 25 | 53 | 1.55 | 0.57 | 2.72 |
| 1 | 42 | 1.50 | 0.48 | 3.10 |
| ^y =max/min | | | | |



第2-2図 BC₁世代における鱗茎肥大比の分離(2006年～2009年に調査した平均値)

第2-4表BC₁における最大鱗葉厚の分布

| 系統番号 | 鱗茎内の 分けつ数 | 最大鱗葉厚 (mm) | | | 平均値 |
|------|--------------|------------|-------|-------|------|
| | | 2007年 | 2008年 | 2009年 | |
| 15 | 3.7 | 1.0 | 1.1 | 1.0 | 1.02 |
| 46 | 2.2 | 0.8 | 1.1 | 1.3 | 1.07 |
| 16 | 2.2 | 0.6 | 1.0 | 4.1 | 1.89 |
| 41 | 2.2 | 1.3 | 3.4 | 1.5 | 2.08 |
| 83 | 1.6 | 1.3 | 3.1 | 2.0 | 2.13 |
| 3 | 3.3 | 2.3 | 2.4 | 1.8 | 2.19 |
| 42 | 1.9 | 0.5 | 2.3 | 4.0 | 2.27 |
| 44 | 3.1 | 1.4 | 4.6 | 1.0 | 2.34 |
| 9 | 1.2 | 1.8 | 3.1 | 3.1 | 2.67 |
| 23 | 2.2 | 2.2 | 2.8 | 3.2 | 2.71 |
| 8 | 2.0 | 1.5 | 3.7 | 3.1 | 2.77 |
| 72 | 4.3 | 2.0 | 2.4 | 4.0 | 2.80 |
| 48 | 2.2 | 1.0 | 3.2 | 4.3 | 2.82 |
| 76 | 3.2 | 1.4 | 3.3 | 4.0 | 2.90 |
| 57 | 2.5 | 1.6 | 3.6 | 4.0 | 3.04 |
| 82 | 2.2 | 1.7 | 3.5 | 4.0 | 3.04 |
| 22 | 2.6 | 2.8 | 3.3 | 3.2 | 3.10 |
| 19 | 2.3 | 2.3 | 3.0 | 4.1 | 3.14 |
| 69 | 2.5 | 2.5 | 3.7 | 3.3 | 3.17 |
| 63 | 2.2 | 3.0 | 3.7 | 3.0 | 3.22 |
| 11 | 1.6 | 3.3 | 3.5 | 2.9 | 3.26 |
| 12 | 1.7 | 2.8 | 3.1 | 3.9 | 3.29 |
| 51 | 2.4 | 2.0 | 3.8 | 4.3 | 3.37 |
| 49 | 1.9 | 3.0 | 4.3 | 3.0 | 3.43 |
| 10 | 2.2 | 3.2 | 3.2 | 4.1 | 3.49 |
| 62 | 1.9 | 3.0 | 3.4 | 4.1 | 3.49 |
| 29 | 2.7 | 2.7 | 3.9 | 4.0 | 3.53 |
| 79 | 2.2 | 2.7 | 4.4 | 3.5 | 3.54 |
| 20 | 3.1 | 3.3 | 4.3 | 3.0 | 3.56 |
| 14 | 2.0 | 4.7 | 5.2 | 1.0 | 3.63 |
| 13 | 2.3 | 2.3 | 4.6 | 4.0 | 3.64 |
| 75 | 2.7 | 2.5 | 5.5 | 3.0 | 3.67 |
| 58 | 1.8 | 3.3 | 3.9 | 3.9 | 3.71 |
| 52 | 2.4 | 4.3 | 3.9 | 3.0 | 3.73 |
| 7 | 2.6 | 2.5 | 4.9 | 4.0 | 3.81 |
| 4 | 2.6 | 3.2 | 4.5 | 5.1 | 4.24 |
| 6 | 2.7 | 4.4 | 3.3 | 5.1 | 4.28 |
| 17 | 1.9 | 4.7 | 5.3 | 3.0 | 4.32 |
| 30 | 1.5 | 2.8 | 5.1 | 5.3 | 4.40 |
| 60 | 2.1 | 4.3 | 5.0 | 4.0 | 4.43 |
| 28 | 2.3 | 6.7 | 3.2 | 4.0 | 4.63 |
| 40 | 2.1 | 4.3 | 6.4 | 3.3 | 4.67 |
| 24 | 1.2 | 3.8 | 4.0 | 6.2 | 4.69 |
| 34 | 3.4 | 4.7 | 4.6 | 5.0 | 4.76 |
| 32 | 1.2 | 4.7 | 5.2 | 4.8 | 4.91 |
| 5 | 1.4 | 4.7 | 5.4 | 4.9 | 4.99 |
| 31 | 1.2 | 4.3 | 6.5 | 5.3 | 5.39 |
| 54 | 1.9 | 4.8 | 5.9 | 5.5 | 5.40 |
| 25 | 1.2 | 5.7 | 6.8 | 5.0 | 5.83 |
| 1 | 1.8 | 7.0 | 7.0 | 6.9 | 6.97 |
| 2 | 2.0 | 6.8 | 7.2 | 6.9 | 6.97 |



チャイブ



アサツキ



F₁



BC₁-1

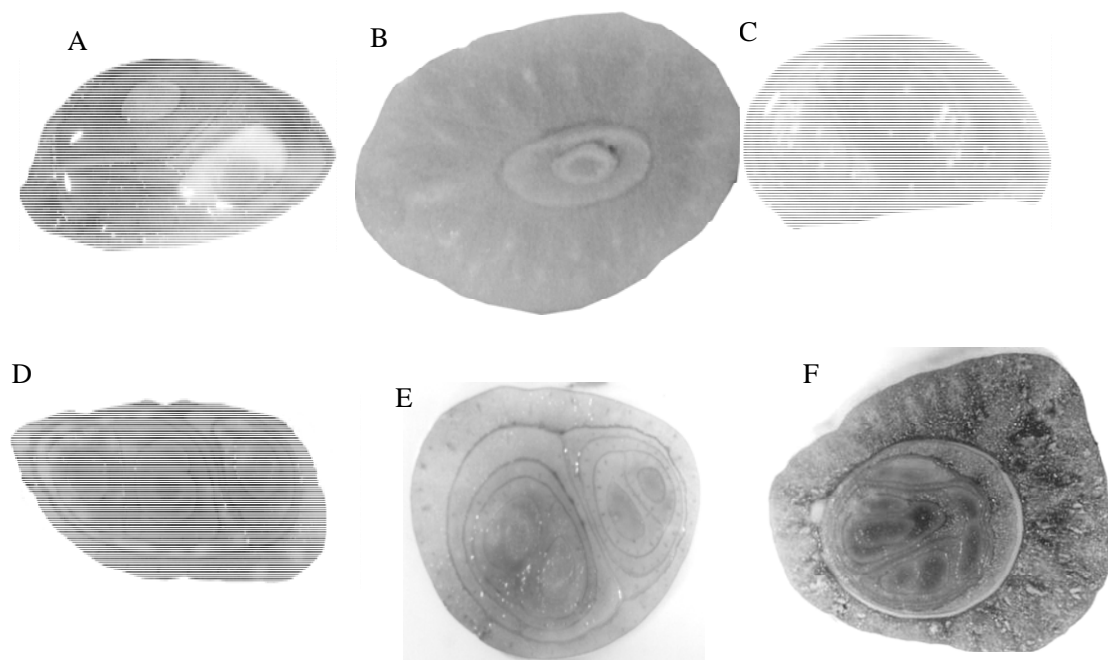


BC₁-2



BC₁-3

第 2-3 図 鱗茎の外見形態



第 2-4 図 鱗茎の横断切片

A: チャイブ, 分げつにより鱗茎が肥大した個体. (BR: 1.19, MT: 0.5 mm)

B: アサツキ, 鱗葉そのものが肥大した個体. (BR: 4.54, MT: 6.2 mm)

C: F₁, 分げつにより鱗茎が肥大した個体. (BR: 1.27, MT: 1.1 mm)

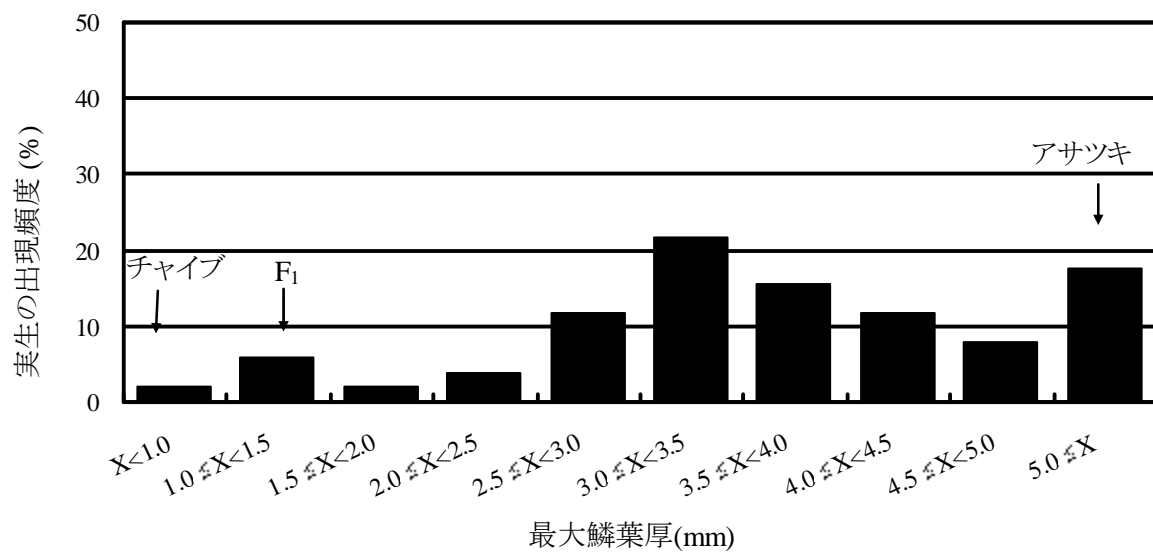
D: BC₁, 分げつにより鱗茎が肥大した個体. (BR: 1.64, MT: 1.0 mm)

E: BC₁, 分げつにより鱗茎が肥大した個体. (BR: 2.12, MT: 1.4 mm)

F: BC₁, 鱗葉そのものが肥大した個体. (BR: 2.25, MT: 4.3 mm)

BR: 鱗茎肥大比

MT: 最大鱗葉厚



第2-5図 BC₁世代における最大鱗葉厚の分離(2007~2009年に調査した平均)

第三章

バルク法を用いた RAPD 分析による

鱗茎形成遺伝子の探索

1. 緒 言

鱗茎形成に関与する分子マーカーの探索を目的とした研究では、対照として結球する植物と結球しない植物が容易に得ることと、得られた実生では、結球型と非結球型を区別する基準のことが問題点になる。このような背景から、本実験の第一章では、非結球型チャイブと結球型アサツキの交配後代 F_1 を種子親として、アサツキを花粉親として、鱗茎形成型の分離が現れる BC_1 世代が得られた。第二章では、鱗茎形成の遺伝様式および最大鱗葉厚を結球型と非結球型を区別する基準とすることが明らかになった。つぎに、遺伝子レベルで鱗茎形成因子を研究し、鱗茎形成に関与する RAPD マーカーが探索できると考える。

RAPD 技術(Williams et al., 1990)は簡潔なジーン多型の検定方法で、遺伝子マーカーとして植物育種で広く使われている。ネギ属植物において、RAPD 分析としては、ニラの種間雑種の確認(Dubouzet et al., 1996), *A. fistulosum* L.と *A. schoenoprasum* L.の種間雑種の研究(Umehara et al., 2006)などの報告がされており、

Dubouzet et al.(1996)の報告では、雑種に花粉親特有のバンドが現れ、RAPD が雑種確認の有効手法であることが明らかとなった。同じネギ属植物において、ギョウジャニンニク (*A.victoralis* *L.spp.Plantaphyllum* Hult.) の系統分類 (稲富ら, 2004) やタマネギの品種識別 (Tanikawa et al., 2002) に RAPD 分析が用いられ、雑種確認にも有効であることが明らかになっている。また、RAPD 分析は、雌雄異株植物の性別検定および系統発生 (Wiessman et al., 1998; Belaj et al., 2000) の研究にも利用されている。特に、オリーブ (Hernandez et al., 2001) とパパイヤ (Urasaki et al., 2002) において、性別を正確で、急速に検定できることが分かった。さらに、BSA (Bulk Segregant Analysis) 技術 (Michelmore et al., 1991) と結合して、個体的 DNA からプールした RAPD 分析がテンサイ (Pelsy and Merdinoglu, 1996) やブドウ (Lahogue et al., 1998) に利用されている。

本実験では、鱗茎形成に関与する RAPD マーカーの探索を目的として、第二章で選抜した結球型集団および非結球型集団の Bulk 間において、ランダムプライマーを用いた RAPD 分析を行い、特異的なバンドが得られたプライマーを用いて、集団内の全個体に多型が現れるかを調査した。

2. 材料および方法

供試材料

供試材料にはチャイブ 6-1, アサツキ 2A-6 および第一章で

(2005年) 作出したこれらの F_1 各 1 個体を用いた。この F_1 を種子親としてアサツキ 2A-6 との戻し交雑によって作出した BC_1 個体 51 個体を用いた。

DNA 抽出

全 DNA は CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) を基本として, (Kobayashi et al., 1998) によって改良された CTAB 法を用い抽出した。若葉の先端部分を液体窒素中で粉碎してから, 1ml の抽出バッファを加えた。12,000rpm, 4°C で 5 分間遠心分離した後, 上澄みを捨て, 上澄み液の粘度が高い場合は再度 1ml の抽出バッファを加え, 遠心分離した。上澄みの粘りがなくなるまで繰り返した。その後, 300 μ l ソルビトールバッファと 200 μ l CTAB バッファを加え, 10 分 60°C でインキュベートして, 500 μ l クロロホルム/イソamilアルコール (24:1) を加えた。12,000 rpm, 20°C で 5 分間遠心分離した後, 上澄みを別のチューブに移した。その後, 267 μ l の isopropanol を使って沈殿させた。チューブは冷凍庫で 30 分放置後, 12,000rpm, 4°C で 5 分間遠心分離した。Isopropanol を捨てた後, 800 μ l 70% エタノールを加え, 再度, 遠心分離し, 上澄み液を捨てた。チューブを真空中で乾燥し, 60 μ l TE に溶解した。55°C で 1 時間インキュベートして, 0.6 μ l RNase を加え, 37°C 60 分間で恒温器内で RNA を消化した。DNA 濃度は分光光度法で測定した。

RAPD 分析

CMN-A00 から CMN-A99 まで, CMN-B00 から CMN-B99 までの 200 種類の 12 塩基ランダムプライマー(BEX)を用い, 結球集団と非結球集団のバルクで RAPD 分析を行った. PCR 反応液は, 30ng の鋳型 DNA, 2.5 μ l の 10 \times PCR バッファー, 0.5unit の Taq DNA Polymerase(Amersham), 0.15 μ M のプライマー, 200 μ M の dNTP を混合し最終容量を 25 μ l とした. PCR 反応はプログラム温度コントロールシステム (PCR Thermal Cycler PERSONAL TP240,TAKARA)上で行い, 90 $^{\circ}$ C -30sec の前処理の後, 熱変性(94 $^{\circ}$ C -30sec), アニーリング(37 $^{\circ}$ C -2min), 伸長反応(72 $^{\circ}$ C -3min)を 45 サイクル繰り返し, 72 $^{\circ}$ C -7min の後処理を行う条件下で DNA を増幅させた. 得られた増幅産物を, 1.5%アガロースゲル(SIGMA)で電気泳動(100V \cdot 40min)後, エチジウムブロマイドで 20 分間染色後, 紫外線カメラで写真撮影を行い, 多型の検出を行った. なお, 明瞭な多型が得られたマーカーは両親と各集団形成個体およびそのほかの個体レベルで再増幅させた.

BSA 技術

BC₁ 個体群は第二章で最大鱗葉厚によって結球集団, 非結球集団に分類された. 結球集団は地上部の夏枯れがみられた最大鱗葉厚が最大の個体から大きい順に 5 個体 (2008 年のデータ), 非結球集団は同様に最大鱗葉厚が最小のものから 5 個体を用いた. 各個体の DNA は約 30ng \cdot μ l⁻¹ に濃度調節した. 各個体の DNA を等量ずつ混合し, 結球集団, 非結球集団 2 つの DNA バルク集団

を作成した。

2 バルク，バルク個体，バルク個体以外の BC₁ 個体における RAPD 分析を行った。

3. 結 果

バルクにおける RAPD 分析

CMN-A00 から CMN-A99 まで，CMN-B00 から CMN-B99 までの 200 種類の 12 塩基ランダムプライマーを用いて電気泳動を行った結果，増幅された DNA 断片を得られた。結球集団と非結球集団のバルクにおいては，200 種類中の 11 種類プライマーで多型バンドが得られた（第 3-1 図）。32 種類のプライマーでは増幅されなかったかあるいはバンドが著しく不明瞭であった。157 種類プライマーでは増幅されたが，結球集団と非結球集団とも同じバンドが得られ，多型がみられなかった。11 種類の各プライマーで得られた総バンド数は 2 本から 5 本まで，得られた多型バンド数は 1 本から 3 本まで検出された（第 3-1 表）。そして，得られた多型バンドの 11 種類プライマーの中には A42，A58，A68 の 3 つプライマーの多型バンドは結球集団から得られた。ほかの 8 種類のプライマーの多型バンドはすべて非結球集団から得られた。

バルクの個体別における RAPD 分析

バルクで多型が得られた 11 種類プライマーを用いて，結球集団バルクと非結球集団バルクの個体別において，PCR を行い，電気泳動でバンドを検出したところ（第 3-2 表），8 種類の A シリ

ーズプライマーにおいて結球集団の個体では少なくとも1個体が増幅されなかった。A15, A33 および A62 プライマーで非結球集団の個体でも1個体が増幅されなかった。結球集団バルクで多型が得られた A42 プライマーを用い, 個体別に電気泳動で多型を検出したところ, 結球集団のバルク 5 個体で 1 つ個体が増幅されず, 4 個体で多型バンドが得られた。しかしながら, 非結球集団バルクの 5 個体でも, 4 個体で多型バンドが得られた。結球集団バルクで多型が得られた A68 プライマーを用い, 個体別に電気泳動で多型を検出したところ, 結球集団バルク 5 個体で 2 個体が増幅されず, 1 個体で多型バンドが得られた。しかし, 非結球集団バルクの 5 個体のうち 4 個体で多型バンドが得られた。結球集団バルクで多型が得られた A58 プライマーを用い, 個体別に電気泳動で多型を検出されたところ, 結球集団バルク 5 個体で 1 個体が増幅されず, ほかの 4 個体で多型バンドが得られた。非結球集団バルクの 5 個体のうち 1 個体で多型バンドが得られた。したがって, A58 で得られたバンドは, 鱗莖形成に関与している可能性が高いと考えられた。非結球集団バルクで多型が得られた A48, A73, B50, B52 プライマーは, 個体別に電気泳動で多型を検出したところ (第 3-2 表), 非結球集団バルクの 5 個体の 4 個体以上で多型バンドが得られた。結球集団バルクの 5 個体の 2 個体または 2 個体以下で多型バンドが得られた。したがって, B50 で得られたバンドは, 鱗莖形成に関与している可能性が高いと考えられた。

バルクの個体以外の個体における RAPD 分析

バルクで多型が得られた 11 種類プライマーを用いてバルク以外の個体において PCR を行い，電気泳動でバンドが検出したところ（第 3-3 表），1 個体が増幅されなかった A15 プライマーを除き，他のプライマーですべて個体が増幅された．バルクの結球集団で多型バンドが得られたプライマーでも，また非結球集団で多型バンドが得られたプライマーでも，その他の個体においては，鱗葉最大厚と多型出現に一定の傾向が認められなかった．従って，鱗茎形成または非鱗茎形成と連鎖している可能性は低いと考えられた．

4. 考 察

本実験では，結球集団，非結球集団バルク間で，明瞭な多型が得られた A15，A33，A42，A48，A58，A 62，A 68，A73，B29，B50，B52 プライマーを用いて個体別の RAPD 分析を行なったところ，結球集団のバルクで多型が得られた A58 プライマーで結球集団の個体別でも 4 個体で多型が得られた．非結球集団のバルクで多型が得られた A48，A73，B50，B52 プライマーで非結球集団の個体別でも 4 つ以上の個体で多型を得ることができた．以上の結果より、これらのマーカーは鱗茎形成に関与する遺伝子を含む領域に隣接している可能性，つまり連鎖している可能性が高いことが考えられた．しかしながら，41 個体の BC₁ について PCR 増幅したところ，多型が出現することで判断した結球個体または非結球個体，最大鱗葉厚で分類した結球個体と一致しなかったため，

鱗莖形成または非鱗莖形成と連鎖している可能性は低いと考えられた。

結球集団と非結球集団に 200 種類のプライマーで BSA を行ったところ、11 種類のプライマーで多型が検出されたが、多型率は 5.5% で低かった。また、32 種類のプライマーでは増幅がみられなかった。このことから、この 200 種類のプライマーでは結球集団と非結球集団のバルクに塩基配列の相補性が低いことが示唆された。本実験で用いたプライマーの数はほかの BSA 研究 (Benet et al., 1995; Chague et al., 1996; Cheng et al., 1996) より少なかったため、多型が得られた要因と考えられる。さらに、バルクで用いた個体数も 5 個体と少なかったことが、個体別の PCR で竹井を得られなかった要因である。また、A シリーズプライマーを用い、結球集団のバルク個体ではすべて 1 個体が増幅されなかった。これはバルクで多型プライマーの選別に影響があるため、多型が得られたプライマーが少なかったことによるものと思われる。よって、調査個体数をさらに増やす必要がある。

今後の実験では、プライマー数をさらに増やし、あるいはプライマーの組み合わせの検討を行うことにより、明瞭なバンドが得られる多くの候補を探索し、鱗莖形成とより密接に連鎖するマーカの開発を図っていくことが必要である。結球個体と非結球個体の間で現れる明確な多型を得られるマーカを探索し、鱗莖形成遺伝子の配列を決定することにより、いまだに成功していない鱗莖形成遺伝子を単離出来る可能性がある。

5. 摘 要

第二章で最大鱗葉厚を指標として，分類した結球型と非結球型において，選抜を行なった．選抜した集団を結球集団，非結球集団としてバルク法を用いた RAPD 分析を行なった．200 種類のプライマーのうち，結球集団バルクと非結球集団バルクでは，11 種類のプライマーで特異的なバンドが得られた．こちら 11 種類プライマーを用いて個体レベルの RAPD 分析を行なった．鱗茎形成に関する推測されるバンドがいくつか得られた．11 種類のプライマーのなか B50 プライマーは，バルクで得られた多型の対応の個体レベルでは 4 個体で多型バンドが得られたため，鱗茎形成に関与する遺伝子を含む領域に隣接している可能性が考えられた．しかし，バルク個体以外の個体においては PCR 増幅したところ，多型が出現することで判断した結球個体または非結球個体は，最大鱗葉厚で分類した結球個体と一致しなかったため，鱗茎形成または非鱗茎形成と連鎖している可能性は低いと考えられた．

第3-1表 バルクにおいてRAPD分析

| プライマー | 配列 | 総バンド数 | 共通バンド数 | 多型 | 多型の由来 |
|-------|--------------|-------|--------|----|-------|
| A15 | ATCGCGGAATAT | 3 | 2 | 1 | 非結球集団 |
| A33 | GACTGCTATACA | 2 | 1 | 1 | 非結球集団 |
| A42 | GAGCAGGAATAT | 2 | 1 | 1 | 結球集団 |
| A48 | CCGCAGGGACCA | 5 | 2 | 3 | 非結球集団 |
| A58 | GTCATGCCTGGA | 2 | 1 | 1 | 結球集団 |
| A62 | TCGTCCGGAGAT | 2 | 1 | 1 | 非結球集団 |
| A68 | ACTTTCGATCCA | 2 | 1 | 1 | 結球集団 |
| A73 | AGCACTGAATCT | 2 | 1 | 1 | 非結球集団 |
| B29 | GATGGTCCGTTT | 2 | 1 | 1 | 非結球集団 |
| B50 | GTGCACGTATGG | 3 | 2 | 1 | 非結球集団 |
| B52 | ATGGCTACTGGC | 3 | 2 | 1 | 非結球集団 |

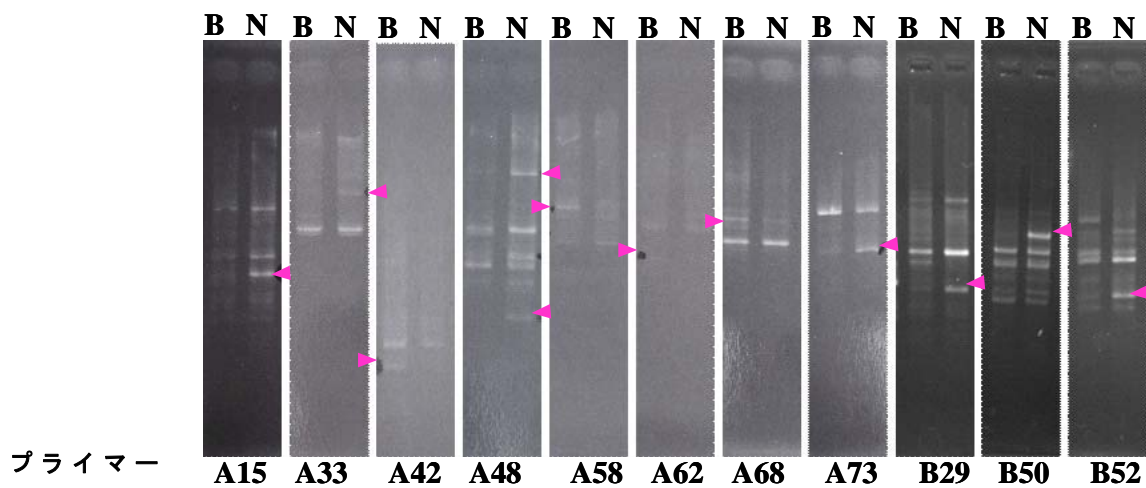
第3-2表 バルクの個体別においてRAPD分析

| 系統番号 | 鱗葉最大厚(mm) | 鱗茎肥大比 | A15 | A33 | A42 | A48 | A58 | A62 | A68 | A73 | B29 | B50 | B52 |
|-------|-----------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 非結球集団 | 42 | 0.5 | × | ○ | × | ○ | × | ○ | × | ○ | × | × | ○ |
| | 16 | 0.6 | — | — | ○ | ○ | × | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| | 46 | 0.8 | × | ○ | ○ | ○ | × | × | ○ | ○ | × | ○ | ○ |
| | 15 | 1.0 | ○ | × | ○ | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| | 48 | 1.0 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ |
| 結球集団 | 54 | 4.8 | × | × | ○ | × | ○ | ○ | × | × | × | × | × |
| | 25 | 5.7 | — | — | — | — | — | — | — | — | × | × | ○ |
| | 28 | 6.7 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | ○ | ○ | × | × | × |
| | 2 | 6.8 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × | ○ | × | ○ |
| | 1 | 7.0 | × | × | ○ | × | ○ | × | — | ○ | × | × | × |

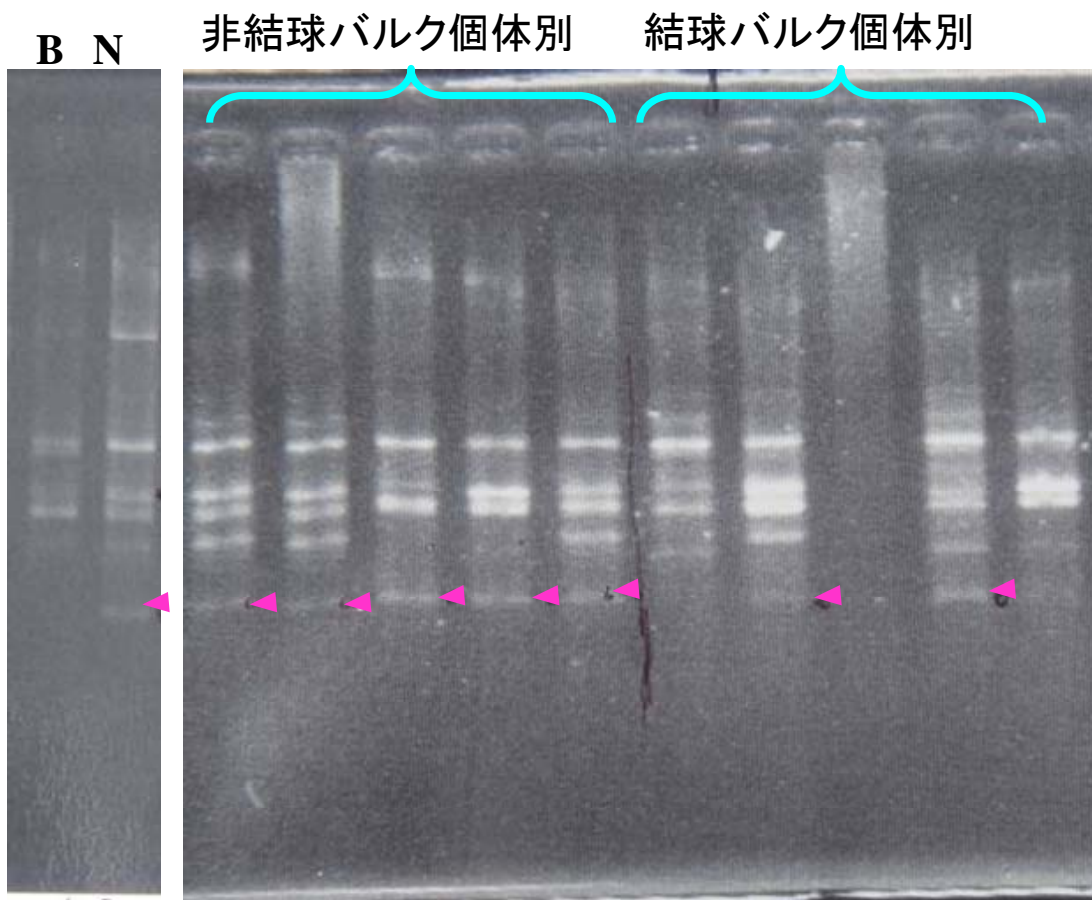
○多型あり
 ×多型なし
 —増幅できなかった

第3-3表 そのほかの個体においてRAPD分析

| 系統番号 | 最大鱗葉厚(mm) | A15 | A33 | A42 | A48 | A58 | A62 | A68 | A73 | B29 | B50 | B52 |
|-----------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 41 | 1.3 | — | × | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 44 | 1.4 | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 76 | 1.4 | × | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ | ○ | × |
| 8 | 1.5 | ○ | ○ | × | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ |
| 57 | 1.6 | ○ | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ | ○ | × | × |
| 82 | 1.7 | ○ | × | × | × | × | ○ | × | × | ○ | × | ○ |
| 51 | 2.0 | × | × | × | × | × | × | × | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 72 | 2.0 | × | × | ○ | × | × | × | × | × | ○ | × | × |
| 23 | 2.2 | ○ | × | ○ | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ |
| 3 | 2.3 | × | ○ | × | × | × | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ |
| 13 | 2.3 | ○ | × | ○ | × | × | × | ○ | × | ○ | × | × |
| 19 | 2.3 | × | ○ | × | ○ | × | ○ | × | × | ○ | × | ○ |
| 7 | 2.5 | × | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 69 | 2.5 | × | ○ | × | × | × | ○ | × | ○ | ○ | × | × |
| 75 | 2.5 | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × | ○ |
| 29 | 2.7 | ○ | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ | × | × |
| 79 | 2.7 | ○ | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ | × | × |
| 12 | 2.8 | × | × | × | × | × | × | × | ○ | ○ | × | × |
| 22 | 2.8 | ○ | ○ | × | ○ | × | × | × | × | × | × | × |
| 30 | 2.8 | ○ | ○ | × | × | ○ | × | ○ | ○ | ○ | × | × |
| 49 | 3.0 | ○ | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 62 | 3.0 | × | × | × | × | ○ | ○ | × | × | ○ | × | × |
| 63 | 3.0 | ○ | × | × | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | × | ○ |
| 59 | 3.0 | × | × | × | × | × | ○ | × | ○ | ○ | × | ○ |
| 53 | 3.0 | ○ | × | × | × | × | ○ | × | ○ | ○ | × | ○ |
| 4 | 3.2 | ○ | ○ | × | ○ | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ |
| 10 | 3.2 | ○ | × | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 11 | 3.3 | × | × | × | × | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ |
| 20 | 3.3 | ○ | × | ○ | × | × | × | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 58 | 3.3 | ○ | × | ○ | × | ○ | × | ○ | × | ○ | ○ | × |
| 24 | 3.8 | × | × | × | × | × | × | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 60 | 4.3 | ○ | × | × | × | ○ | × | × | × | ○ | × | × |
| 31 | 4.3 | × | × | × | ○ | × | × | ○ | ○ | ○ | × | × |
| 40 | 4.3 | × | ○ | × | × | ○ | ○ | × | × | × | × | ○ |
| 52 | 4.3 | ○ | × | × | ○ | ○ | × | ○ | × | × | ○ | × |
| 6 | 4.4 | × | ○ | × | × | × | ○ | ○ | × | ○ | × | ○ |
| 5 | 4.7 | ○ | × | ○ | ○ | × | × | ○ | × | ○ | ○ | × |
| 14 | 4.7 | ○ | ○ | ○ | ○ | × | ○ | × | × | × | ○ | × |
| 17 | 4.7 | ○ | × | ○ | ○ | × | × | ○ | ○ | × | ○ | ○ |
| 34 | 4.7 | × | ○ | × | × | × | × | × | × | × | ○ | × |
| 32 | 4.7 | ○ | × | ○ | ○ | × | × | ○ | × | × | × | ○ |
| ○多型あり | | | | | | | | | | | | |
| × | | | | | | | | | | | | |
| —増幅できなかった | | | | | | | | | | | | |



第3-1図 バルクによるRAPD分析
 B: 結球集団; N: 非結球集団; ◀: 多型バンド



第3-2図 A48においてバルクとバルク個体別のRAPD分析
 B:結球バルク
 N:非結球バルク

第四章

in vitro における鱗茎形成条件の確立

1. 緒言

鱗茎とは鱗葉が重なり合い層状になっている短縮茎のことである。主要蔬菜のタマネギとニンニクにおいて、日長条件（加藤，1963a,b）のほかに温度条件（浜島，1953）、苗齢（今津，1954）、品種（阿部，1955）および苗の栄養条件（岩田，1959）も鱗茎の形成肥大に関係していることが明らかにされている（寺分，1971；寺分，1981）。さらに，タマネギでは，鱗茎の形成や肥大に関与する環境要因も明らかにされている（加藤，1963a,b）。また，観賞用アリウムなどについても，鱗茎形成を形態，生態，生理的な観点から調査した報告がある（青葉，1974）。例えば，ワケギは長日高温条件下で鱗茎肥大が誘起され，前段階の低温遭遇も鱗茎肥大を助長することが報告されている（大久保ら，1981）。また，タマネギの鱗茎を用いて，*in vitro* で貯蔵した鱗茎の生存試験を行った（Kastner, 2001）。タマネギの種子を用いて *in vitro* での鱗茎形成系も確立されている（斉藤，1999）。ニンニクの組織培養で，16時間日長条件で鱗茎肥大したことが報告されている（Ayabe et al., 1998）。しかし，アサツキにおいて，*in vitro* での増殖と液体回転培養の報告があるが（高樹・曲，1994；鈴木・大越，1991），環境条件が鱗茎肥大に与える影響の報告は見当たらない。

したがって，本章では，アサツキの種子を用いて，*in vitro* で

培養して、温度と日長条件がアサツキの鱗茎の形成肥大に与える影響を調査した。

2. 材料と方法

供試材料

供試材料としては、岩手大学農学部西下台圃場のビニルハウス内に定植してあるアサツキ 1 系統を用いた。第一章の交配の方法にしたがって、アサツキ 1 の自殖で得られた種子を用いた。

無菌播種および培養

種子は 10%NaClO とソルビタン酸に浸漬後、超音波洗浄を 10 分間行った。種子をクリーンベンチ内に搬入し、滅菌水で 3 回・各 5 分間洗浄した。種子をろ紙を二枚敷いたシャーレに RO 水 5ml を注いだ上に播種した。播種後、グロースチャンバー内 25℃暗黒条件下で発芽を促した。発芽した実生は、1/2MS 斜面培地(ショ糖 3%，寒天 0.8%，pH 5.8)10 ml を用いる 11.7 cm×3.0 cm のテストチューブに継代し、5℃処理 3 区、10℃処理 3 区、25℃処理 3 区の合計 9 処理区を設け、各処理区に 10 個体を継代培養した(表 4-1)。培養終了後、鱗茎肥大比、葉数、最大葉長を計測した。鱗茎形成の様子を組織的に調査するため、田中・浜(1960)の方を参考しパラフィン切片法を用いて、葉鞘基部の横断切片を作製し、ヘマトキシレンで染色後、光学顕微鏡下で観察を行った。パラフィン切片は、FAA で固定しておいた葉鞘基部をエタノール脱水シ

リーズで脱水した後、パラフィンに包埋し回転プラントミクロトームを用いて 12 μ mm の厚さに切断して作製した。

3. 結果

各処理区の実生を調査したところ、5 $^{\circ}$ C 処理区と 10 $^{\circ}$ C 処理区では鱗茎を肥大し、植物体も成長できたが（第 4-1 図，第 4-2 図），25 $^{\circ}$ C 処理区では 8h 短日でも 16h 長日でも全体が白く，カルスを形成する個体もあり，植物体が正常に生育せず（第 4-3 図），調査できなかった。

5 $^{\circ}$ C 処理区の実生を調査したところ（第 4-2 表，第 4-3 表，第 4-4 表），葉数は 8 時間処理区で 3.20 ± 1.14 枚，8 時間+16 時間処理区で 3.60 ± 1.65 枚，16 時間処理区で 3.60 ± 1.35 枚となった。最大葉長は 8 時間処理区で 6.79 ± 4.49 cm，8 時間+16 時間処理区で 5.10 ± 4.48 cm，16 時間処理区で 6.05 ± 4.04 cm となった。鱗茎肥大比は 8 時間処理区で 1.39 ± 0.33 ，8 時間+16 時間処理区で 2.03 ± 0.43 ，16 時間処理区で 2.27 ± 0.48 となった。8 時間処理区と 8 時間+16 時間処理区，8 時間処理区と 16 時間処理区の鱗茎肥大比は 1% 水準で有意差がみられた（第 4-9 表）。

10 $^{\circ}$ C 処理区の実生を調査したところ（第 4-5 表，第 4-6 表，第 4-7 表），葉数は 8 時間処理区で 4.10 ± 0.88 枚，8 時間+16 時間処理区で 4.10 ± 0.57 枚，16 時間処理区で 4.60 ± 0.97 枚となった。最大葉長は 8 時間処理区で 6.55 ± 2.68 cm，8 時間+16 時間処理区で 5.65 ± 2.51 cm，16 時間処理区で 5.93 ± 3.13 cm となった。鱗茎肥大

比は8時間処理区で 1.91 ± 0.40 , 8時間+16時間処理区で 2.09 ± 0.59 , 16時間処理区で 2.38 ± 0.68 となった。8時間処理区, 8時間+16時間処理区および16時間処理区の鱗茎肥大比では有意差がみられなかったが(第4-9表), 鱗茎の肥大が認められた。

5°C処理区と10°C処理区の比較の結果(第4-8表), 8時間処理区の5°C処理と10°C処理の鱗茎肥大比では1%水準で有意差がみられた(第4-9表)。8時間+16時間処理区の5°C処理と10°C処理の鱗茎肥大比でも5%水準で有意差であった。しかし, 16時間処理区の5°C処理と10°C処理の鱗茎肥大比では有意差がみられなかった。

鱗茎について葉鞘基部の横断切片を観察した結果(第4-4図, 第4-5図), 10°C処理区は表皮層下1, 2, 3本葉の細胞ともに肥大することが観察されたが, 5°C処理区は表皮層下2, 3本葉のみで細胞肥大がみられた。

4. 考 察

本実験では, アサツキの実生において温度と日長の処理を行ない, 調査したところ, 最も鱗茎が肥大した処理区は, 16時間処理間では温度による有意差はなかった。8時間+16時間日長処理区では, 10°C処理区が5°C処理区よりも鱗茎肥大が有意に優った。8時間処理では, 温度にかかわらず外見では鱗茎が肥大しなかった。25°Cの高温処理区では, 鱗茎肥大が見られなかっただけでは

なく、実生が生育できなかった。このことから、日長条件にかかわらず、10℃の前処理により鱗茎肥大を促進できることが明らかとなった。青葉(1972a,b)によると、ニンニクとフリージアには、低温によって鱗茎を形成し得る生理状態の誘起される過程が存在する。また、Okuboら(1999)によるとシャロットとワケギにおいても、低温処理が鱗茎の肥大に促進的に働くことが明らかとなっている。これは本実験の結果と一致した。さらに、本実験では、16時間の5℃、10℃処理区でも鱗茎肥大がみられたが、5℃処理区の植物は成長が旺盛ではないため、アサツキにおいて前処理として、5℃より10℃の低温が鱗茎肥大を促進する最適温度であることが示唆された。

日長について調査したところ、5℃処理区では16時間の長日処理区と8時間+16時間処理区の鱗茎肥大比は有意差がなかった。つまり、鱗茎肥大を促進する効果が同じであることが考えられた。しかし、8時間の短日処理区では、他の2処理区と有意差がみられたため、8時間の短日処理は鱗茎肥大に効果がないと思われた。青葉・高樹(1971)や高樹(1979)によっても、長日がニンニクの球形成を促進するという報告がある。ラッキョウにおいても、長日条件での球肥大が促進されたという報告がある(八鍬, 1989)。また、光源については蛍光灯のみを使用するよりも、蛍光灯と白熱灯を組み合わせるほうが鱗茎肥大を促進するという報告がある(Le Guen-Le Saos et al., 2002)。本実験では蛍光灯のみの使用であるため、今後、白熱灯と組み合わせることによって鱗茎肥大の効果을期待できると考えられる。

5. 摘 要

アサツキ1系統において温度と日長が鱗茎形成に与える影響についての調査を *in vitro* で行なった。温度については 5℃, 10℃, 25℃の処理区を設けたところ, 25℃処理区では日長にかかわらず植物体が形成できず, 調査できなかった。5℃と 10℃処理区を調査した結果, 16時間の長日処理で, 5℃処理区でも 10℃処理区でも鱗茎肥大が確認され, 両区に有意差がなかった。しかし, 8時間の短日処理区と 8時間+16時間処理区で, 10℃処理区ではっきりとした鱗茎肥大がみられ, 5℃処理区との間に有意の差が認められた。

日長は 8時間の短日, 16時間の長日および 8時間+16時間処理区を設け, 5℃処理区では, 鱗茎肥大比は 8時間の短日区で 1.39 ± 0.33 , 16時間の長日区で 2.27 ± 0.48 , 8時間日長 45日後に 16時間の処理区で 2.03 ± 0.43 となった。8時間短日処理区の鱗茎肥大比は 16時間長日処理区と, 8時間+16時間の処理区ともに 1%水準で有意差があった。10℃処理区では, 鱗茎肥大比は 8時間の短日区で 1.91 ± 0.40 , 16時間の長日区で 2.38 ± 0.68 , 8時間+16時間の処理区で 2.09 ± 0.59 となった。各処理区では鱗茎肥大比に有意差がみられなかったが, 鱗茎の肥大が認められた。以上の結果から, 10℃と 16時間日長それぞれが鱗茎肥大を促進する要因であると考えられた。

表4-1 アサツキにおける培養の温度と日長条件

| 前処理 | | | 後処理 | | | |
|--------|----|---------|--------|-------|----|---------|
| 温度(°C) | 日長 | 培養時間(d) | 温度(°C) | 日長(h) | | 培養時間(d) |
| 5 | 暗黒 | 30 | 25 | 8 | 8 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 8 | 16 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 16 | 16 | 45-45 |
| 10 | 暗黒 | 30 | 25 | 8 | 8 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 8 | 16 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 16 | 16 | 45-45 |
| 25 | 暗黒 | 30 | 25 | 8 | 8 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 8 | 16 | 45-45 |
| | 暗黒 | 30 | | 16 | 16 | 45-45 |

第4-2表 5°C8時間+8時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 2 | 3.3 | 0.13 | 0.12 | 1.08 |
| 2 | 2 | 3.3 | 0.14 | 0.09 | 1.56 |
| 3 | 4 | 12.7 | 0.22 | 0.14 | 1.57 |
| 4 | 4 | 5.5 | 0.21 | 0.12 | 1.75 |
| 5 | 3 | 4.5 | 0.14 | 0.1 | 1.40 |
| 6 | 5 | 13 | 0.34 | 0.21 | 1.62 |
| 7 | 2 | 4.5 | 0.12 | 0.2 | 0.60 |
| 8 | 4 | 13.9 | 0.23 | 0.15 | 1.53 |
| 9 | 2 | 3.9 | 0.19 | 0.14 | 1.36 |
| 10 | 4 | 3.3 | 0.2 | 0.14 | 1.43 |
| 平均値 | 3.20 | 6.79 | 0.19 | 0.14 | 1.39 |
| 標準偏差 | 1.14 | 4.49 | 0.07 | 0.04 | 0.33 |

第4-3表 5°C8時間+16時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 2 | 1.2 | 0.24 | 0.12 | 2.00 |
| 2 | 3 | 1.5 | 0.28 | 0.09 | 3.11 |
| 3 | 4 | 11.5 | 0.33 | 0.18 | 1.83 |
| 4 | 5 | 2.2 | 0.26 | 0.12 | 2.17 |
| 5 | 2 | 2.2 | 0.22 | 0.11 | 2.00 |
| 6 | 2 | 8.1 | 0.32 | 0.21 | 1.52 |
| 7 | 2 | 3.2 | 0.26 | 0.14 | 1.86 |
| 8 | 6 | 13.9 | 0.3 | 0.14 | 2.14 |
| 9 | 6 | 3.9 | 0.21 | 0.11 | 1.91 |
| 10 | 4 | 3.3 | 0.26 | 0.15 | 1.73 |
| 平均值 | 3.60 | 5.10 | 0.27 | 0.14 | 2.03 |
| 標準偏差 | 1.65 | 4.48 | 0.04 | 0.04 | 0.43 |

第4-4表 5°C16時間+16時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 3 | 2.1 | 0.29 | 0.13 | 2.23 |
| 2 | 2 | 1.6 | 0.21 | 0.12 | 1.75 |
| 3 | 3 | 11.4 | 0.31 | 0.16 | 1.94 |
| 4 | 5 | 11.3 | 0.21 | 0.13 | 1.62 |
| 5 | 4 | 8.8 | 0.5 | 0.21 | 2.38 |
| 6 | 3 | 3.3 | 0.22 | 0.08 | 2.75 |
| 7 | 3 | 3.4 | 0.36 | 0.15 | 2.40 |
| 8 | 5 | 10.9 | 0.25 | 0.11 | 2.27 |
| 9 | 6 | 3.9 | 0.21 | 0.1 | 2.10 |
| 10 | 2 | 3.8 | 0.26 | 0.08 | 3.25 |
| 平均値 | 3.60 | 6.05 | 0.28 | 0.13 | 2.27 |
| 標準偏差 | 1.35 | 4.04 | 0.09 | 0.04 | 0.48 |

第4-5表 10°C処理8時間+8時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 5 | 5.4 | 0.23 | 0.14 | 1.64 |
| 2 | 4 | 5.7 | 0.29 | 0.14 | 2.07 |
| 3 | 4 | 5.3 | 0.26 | 0.16 | 1.63 |
| 4 | 4 | 6.1 | 0.29 | 0.18 | 1.61 |
| 5 | 5 | 4.6 | 0.29 | 0.14 | 2.07 |
| 6 | 3 | 4.6 | 0.34 | 0.12 | 2.83 |
| 7 | 3 | 8.7 | 0.18 | 0.12 | 1.50 |
| 8 | 5 | 9.5 | 0.21 | 0.12 | 1.75 |
| 9 | 3 | 3.5 | 0.39 | 0.18 | 2.17 |
| 10 | 5 | 12.1 | 0.28 | 0.15 | 1.87 |
| 平均値 | 4.10 | 6.55 | 0.28 | 0.15 | 1.91 |
| 標準偏差 | 0.88 | 2.68 | 0.06 | 0.02 | 0.40 |

第4-6表 10°C8時間+16時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 4 | 6 | 0.32 | 0.15 | 2.13 |
| 2 | 5 | 6.5 | 0.36 | 0.12 | 3.00 |
| 3 | 4 | 5.1 | 0.36 | 0.15 | 2.40 |
| 4 | 4 | 3.5 | 0.21 | 0.14 | 1.50 |
| 5 | 5 | 6 | 0.32 | 0.15 | 2.13 |
| 6 | 4 | 6.3 | 0.21 | 0.14 | 1.50 |
| 7 | 3 | 3.2 | 0.37 | 0.19 | 1.95 |
| 8 | 4 | 11.9 | 0.35 | 0.24 | 1.46 |
| 9 | 4 | 4 | 0.21 | 0.12 | 1.75 |
| 10 | 4 | 4 | 0.43 | 0.14 | 3.07 |
| 平均値 | 4.10 | 5.65 | 0.31 | 0.15 | 2.09 |
| 標準偏差 | 0.57 | 2.51 | 0.08 | 0.04 | 0.59 |

第4-7表 10°C16時間+16時間処理区の培養結果

| 番号 | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
|------|-------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 5 | 6.6 | 0.38 | 0.17 | 2.24 |
| 2 | 5 | 6.5 | 0.34 | 0.12 | 2.83 |
| 3 | 4 | 5.6 | 0.36 | 0.15 | 2.40 |
| 4 | 4 | 3.5 | 0.35 | 0.15 | 2.33 |
| 5 | 5 | 6.3 | 0.32 | 0.15 | 2.13 |
| 6 | 4 | 6.3 | 0.34 | 0.17 | 2.00 |
| 7 | 3 | 3.4 | 0.37 | 0.15 | 2.47 |
| 8 | 6 | 13.9 | 0.35 | 0.24 | 1.46 |
| 9 | 6 | 3.9 | 0.21 | 0.11 | 1.91 |
| 10 | 4 | 3.3 | 0.56 | 0.14 | 4.00 |
| 平均値 | 4.60 | 5.93 | 0.36 | 0.16 | 2.38 |
| 標準偏差 | 0.97 | 3.13 | 0.09 | 0.04 | 0.68 |

| 第4-8表 5°Cと10°C処理区の比較 | | | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 処 理 区 | | 葉数(枚) | 最大葉長(cm) | max(cm) | min(cm) | 鱗茎肥大比 |
| 5°C処理区 | 8時間+8時間 | 3.20±1.14 | 6.79±4.49 | 0.19±0.07 | 0.14±0.04 | 1.39±0.33 |
| | 8時間+16時間 | 3.60±1.65 | 5.10±4.48 | 0.27±0.04 | 0.14±0.04 | 2.03±0.43 |
| | 16時間+16時間 | 3.60±1.35 | 6.05±4.04 | 0.28±0.09 | 0.13±0.04 | 2.27±0.48 |
| 10°C処理区 | 8時間+8時間 | 4.10±0.88 | 6.55±2.68 | 0.28±0.06 | 0.15±0.02 | 1.91±0.40 |
| | 8時間+16時間 | 4.10±0.57 | 5.65±2.51 | 0.31±0.08 | 0.15±0.04 | 2.09±0.59 |
| | 16時間+16時間 | 4.60±0.97 | 5.93±3.13 | 0.36±0.09 | 0.16±0.04 | 2.38±0.68 |

第4-9表 日長と温度が鱗茎肥大比に及ぼす影響

| 処理区 | 日長(h) | 温度(°C) | 鱗茎肥大比 | t検定 | p |
|-----------------------------|-------|--------|-----------|------|----|
| 5°C処理区 | 8→8 | 5 | 1.39±0.33 | 3.75 | ** |
| | 8→16 | 5 | 2.03±0.43 | | |
| | 8→8 | 5 | 1.39±0.33 | 4.81 | ** |
| | 16→16 | 5 | 2.27±0.48 | | |
| | 8→16 | 5 | 2.03±0.43 | 1.19 | |
| | 16→16 | 5 | 2.27±0.48 | | |
| 10°C処理区 | 8→8 | 10 | 1.91±0.40 | 0.78 | |
| | 8→16 | 10 | 2.09±0.59 | | |
| | 8→8 | 10 | 1.91±0.40 | 1.87 | |
| | 16→16 | 10 | 2.38±0.68 | | |
| | 8→16 | 10 | 2.09±0.59 | 1.01 | |
| | 16→16 | 10 | 2.38±0.68 | | |
| 8時間処理区 | 8→8 | 5 | 1.39±0.33 | 3.22 | ** |
| | 8→8 | 10 | 1.91±0.40 | | |
| 8時間+16時間処理区 | 8→16 | 5 | 2.03±0.43 | 2.68 | * |
| | 8→16 | 10 | 2.09±0.59 | | |
| 16時間処理区 | 16→16 | 5 | 2.27±0.48 | 0.41 | |
| | 16→16 | 10 | 2.38±0.68 | | |
| *p<0.05 **p<0.01 n=10 | | | | | |



8時間+ 8時間

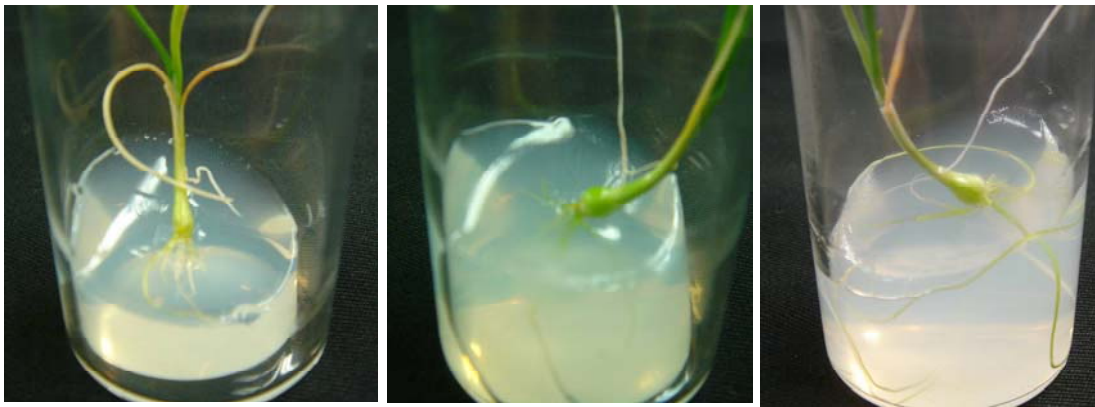


8時間+16時間



16時間+16時間

第4-1図 5°C処理区における鱗茎形成の様子



8時間+ 8時間

8時間+16時間

16時間+16時間

第4-2図 10℃処理区における鱗茎形成の様子

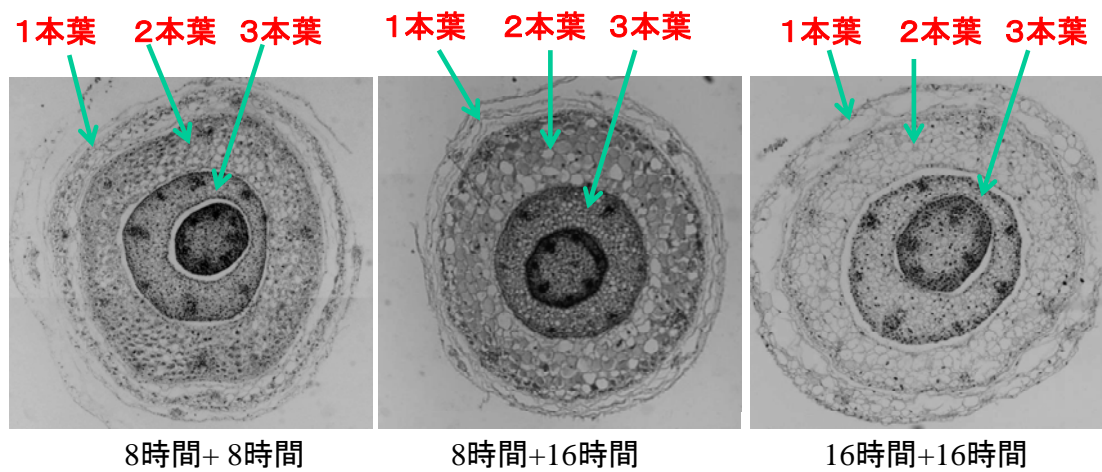


8時間+ 8時間

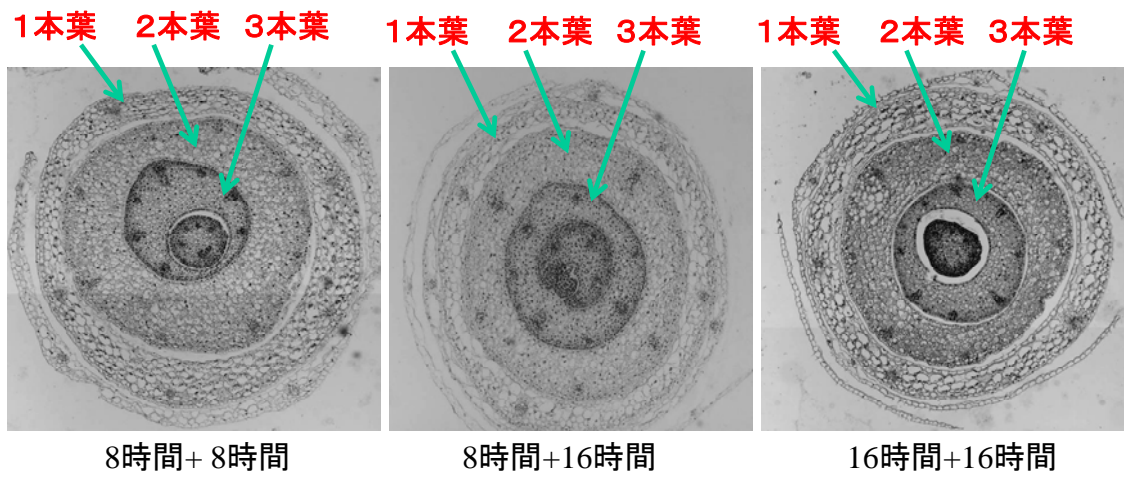
8時間+16時間

16時間+16時間

第4-3図 25°C処理区における麟茎形成の様子



第4-4図 5°C処理区における葉鞘基部横断切片



第4-5図 10°C処理区における葉鞘基部横断切片

総合考察

鱗茎植物はチューリップやユリなどの花卉，タマネギ，ニンニクなどの蔬菜などの主要作物を含む重要かつ大きな作物群である．鱗茎形成について外的要因に関する研究は多く行われてきたが，鱗茎形成の機構についてはまだ明らかにされておらず（斉藤，2000），その遺伝様式および遺伝子レベルでの報告は少ない．

近年，植物の成長過程におけるさまざまな現象を分子レベルで解明する試みがなされているが，多くの場合，モデル植物としてシロイヌナズナの突然変異を利用して行われている．しかし，シロイヌナズナに鱗茎を形成する突然変異体は存在しないこと，また，鱗茎を肥大する植物であっても，その対照として必要な鱗茎を肥大しない植物が容易に得られないため，鱗茎形成を制御する遺伝子の単離はいまだに成功していない．

以上のような背景のもとで，本研究では分子レベルで鱗茎植物における鱗茎形成制御遺伝子の単離を行い，鱗茎形成の遺伝様式および鱗茎形成遺伝子を明らかにすることを試みた．そのため，鱗茎形成能が異なりかつ変種関係にあるチャイブとアサツキを材料として，それらの交配で得られた F_1 実生およびアサツキを戻し交配した BC_1 実生について，鱗茎形成の遺伝性を調査し，鱗茎形成の遺伝様式を検討した．その結果，*A. schoenoprasum* L. の鱗茎形成が劣性であることを明らかにした．これは稲田（1997）の結果と一致した．しかし，同様の結球種と非結球種の交雑実験である，ラッキョウ×ネギ，ラッキョウ×ニラの報告では，種間雑種由来の鱗茎形成は優性形質であることが示唆されている

(Nomura,1996). また, Masuzaki ら(2007)による *A. cepa* においても鱗茎形成が優性形質として働くことが報告されており, 本実験での *A. schoenoprasum* の鱗茎形成が劣性である結果と異なることが認められた. それは種が異なるためであろうと考えられる.

鱗茎の形成状況の指標について, 鱗茎肥大比 (鱗茎部直径/葉鞘部直径) を使用した報告がある (大久保, 1981). しかし, 本研究では, BC₁ 個体群の鱗茎肥大比 (球茎最大直径/葉鞘最大直径) は, 両親の範囲に分布し, 明瞭な鱗茎を肥大する個体としない個体がともに出現したが, その変異は連続的であり, 指標として評価が出来なかった. そこで, 鱗茎の横断切片を作成したところ, BC₁ 個体は, 鱗茎内で分げつを生じたため鱗茎が肥大したものと鱗葉そのものが肥大したためのものの2タイプがみられた. 分げつによる肥大は鱗葉厚の肥厚を伴うこともあるため, 鱗茎肥大の指標としては最大鱗葉厚を用いる方が望ましいと思われた. 最大鱗葉厚にもとづく分類により BC₁ 世代では結球型, 非結球型および中間型の3タイプに分離した. このことから, 鱗茎形成に関与する遺伝子は二つ以上あると思われる. 本結果はネギ属では初めての知見であり, 鱗茎植物育種に有用な情報と考える.

同じネギ属植物において, ギョウジャニンニクの系統分類 (稲富ら, 2004) やタマネギの品種識別 (Tanikawa et al., 2002), ニラの種間雑種の確認 (Dobouzet et al., 1996) に RAPD 分析が用いられた. Dubouzet et al. (1996) の報告では, 雑種に花粉親特有のバンドが現れ, RAPD 分析が雑種確認に有効であることが明らかとなった. また, RAPD 分析は, 雌雄異株植物の性別検定および系統発生 (Wiessman et al., 1998; Belaj et al., 2000) の研究にも利

用されている。特に，オリーブ(Hernandez et al., 2001)とパパイヤにおいては，性別を正確で急速に検定できる (Urasaki et al., 2002;Deputy et al., 2002)。さらに，BSA 技術(Bulk Segregant Analysis)(Michelmore et al., 1991)と結合し，個体的 DNA からプールした，RAPD 分析を使用するバルク法が，テンサイ(Pelsy and Merdinoglu,1996)やブドウ(Lahogue et al., 1998)で利用されている。本研究においては，結球集団または非結球集団にのみ現れる特有なバンドはみられなかったことから，使用したマーカー群の中には，直接鱗茎形成に関与する遺伝子領域を含むマーカーは選抜されていないと考えられる。また，A15, A33, A42, A48, A58, A62, A68, A73, B29, B50, B52 プライマーにおいては，バルク間に差があるバンドが得られたが，個体レベルになるとその差は微小であった。このことから，本研究でバルク間に多型が得られたものの，中には連鎖に関与するものも否定できないため，今後調査個体数をさらに増やして，連鎖分析を行う必要がある。さらに，プライマーの数を増やして，鱗茎肥大個体と鱗茎肥大しない個体間で，明瞭なバンドの有無を発現するマーカーを探索する必要がある。将来的には，得られる鱗茎形成特有マーカー由来の塩基配列を確認することで，鱗茎形成遺伝子の単離の一助になると思われる。

鱗茎肥大に及ぼす環境条件の影響については数多く報告されている(加藤, 1963a, b; 寺分, 1971; 寺分, 1981)。また，*in vitro* において，ニンニクの組織培養で，16 時間日長条件で鱗茎肥大したことが報告されている(Ayabe et al., 1998)。しかし，アサツキの鱗茎肥大における環境条件の報告は見当たらない。本研究では，

アサツキの実生において日長および温度が鱗茎肥大に与える影響の調査を行ったところ、16時間の長日処理区と8時間+16時間処理区の鱗茎肥大比は有意差がなかった。つまり、鱗茎肥大に促進する効果が同じであることが考えられた。青葉(1971)や高樹(1979)によって、長日がニンニクの球形成を促進するという報告がある。ラッキョウにおいても、長日条件での球肥大が促進されたという報告がされている(八鍬, 1989)。温度について調査したところ、10℃低温の前処理で鱗茎の肥大を促進することが認められた。ニンニクとフリージアの鱗茎形成には、低温によって球形成の生理状態が誘起される(青葉, 1972a,b)。また、大久保(1981)によるとワケギにおいても、低温処理が鱗茎の肥大に促進的に働く。これは本実験の結果と一致した。しかし、本研究では、5℃、10℃、25℃の前処理を行ったが、15℃と20℃の処理は行っていないため、10℃の前処理で鱗茎肥大が促進されるどうか簡単に判断できないと考えられた。今後、15℃と20℃の前処理を設けることによって鱗茎肥大の調査を続ける必要があると考えられる。

本研究より、チャイブとアサツキの交配およびこれらのF₁をアサツキと戻し交配から、鱗茎形成の分離ができるBC₁を獲得する方法、鱗茎形成の指標として最大鱗葉厚の調査による鱗茎形成に関与する遺伝子を探索する方法および鱗茎形成の早期選抜の方法が明らかとなった。本研究より得られた知見をもとに研究を継続することによって、鱗茎形成因子の遺伝的解明が明らかになるであろう。

総摘要

鱗茎形成に関与する RAPD マーカーの探索を目的として、変種関係であり、明確な鱗茎肥大を示さないチャイブと明瞭な鱗茎肥大を示すアサツキの交配がこれまで行ってきたが、この交配では、 F_1 世代ではすべての個体がチャイブのように鱗茎を肥大しないため、鱗茎形成の遺伝様式について明らかになっていないことから、鱗茎形成に関与する RAPD マーカーの探索が困難である。鱗茎形成の分離できる世代が得られれば、遺伝子レベルでの分析ができると考えられる。

そこで、本研究ではネギ属の鱗茎形成に関与する遺伝的解明を目的に、鱗茎を形成しないチャイブ (*A. schoenoprasum* L.) とその変種で鱗茎を形成するアサツキ (*A. schoenoprasum* var. *foliosum* Regel) を用いて、 F_1 および BC_1 を獲得し、結球の分離様式の解明、RAPD マーカーによる鱗茎形成遺伝子の探索および *in vitro* における鱗茎形成条件の確立について、以下の実験でを検討した。

1. *A. schoenoprasum* L.における変種間正逆交雑および戻し交雑

チャイブ (3 系統) とアサツキ (10 系統) 間の正逆交配 (F_1) および F_1 とアサツキとの戻し交配 (BC_1) を行い、結球性の分離比を調査した結果、 F_1 個体の 21 組合せ中で着果が認められた。獲得種子数はアサツキを種子親に用いた場合よりも、チャイブを種子親に用いた場合が多く、また同一系統内での差が大きかった。

得られた種子を播種したところ、一部の組合わせを除いたすべての組合せで発芽が認められ、その発芽率は 50.0%～90.0%と変異がみられた。

BC₁ 種子を獲得するため、チャイブ×アサツキの F₁ 個体を種子親にしてアサツキを戻し交配、およびアサツキを種子親にして F₁ 個体を戻し交配して 29 組合せを行った。その結果、アサツキの 3 系統（新潟、岩泉、アルプス）を種子親にした組合せでは種子が得られなかったが、その他の組合せではすべて種子が獲得でき、獲得種子数は 1 粒～55 粒まで多様であった。しかし、その種子数は、いずれの組み合わせにおいても F₁ 個体で得られた種子数よりも少なかった。F₁ および BC₁ が作出されたことから、チャイブとアサツキの変種間交雑は高い交雑和合性を持つことが明らかになった。

2. *A. schoenoprasum* L.における鱗茎形成の遺伝性の調査

F₁ 個体および BC₁ 個体について鱗茎肥大の有無を調査した。すべての F₁ 個体は鱗茎を肥大しなかった。一方、BC₁ 個体の鱗茎形成は、外観上、非結球型および結球型の 2 つのタイプが観察された。しかし、一般に両タイプの分類に用いられている鱗茎肥大比（最大球茎直径/最大葉鞘直径）の調査では変異が連続的であったことから、結球型と非結球型を区別することは困難であった。そこで、鱗茎内の最大鱗葉厚を調査した結果、結球型、中間型および非結球型の 3 タイプに分類でき、ほぼ 1:2:1 に分離した。これらの結果より、*A. schoenoprasum* における鱗茎形成には、2 つ以上の劣性遺伝子が関与していることが示唆された。

3. バルク法を用いた RAPD 分析による鱗茎形成遺伝子の探索

最大鱗葉厚を指標として結球型と非結球型を選抜し、それぞれ結球集団、非結球集団として5個体によるバルク法を用いた RAPD 分析を行なった。200種類のプライマーのうち、11種類のプライマーで両集団間に特異的なバンドが得られた。この11種類のプライマーを用いて個体レベルの RAPD 分析を行なった結果、A 48, A 58, A73, B50, B52 プライマーにおいて、4個体以上で多型バンドが得られた。しかし、バルクに用いた個体以外の個体では、最大鱗葉厚による分類結果と一致しなかったため、それらのマーカーは鱗茎形成または非鱗茎形成と連鎖している可能性は低いと考えられた。

4. *in vitro* における鱗茎形成条件の確立

アサツキ 1 系統を用いて温度と日長が鱗茎形成に与える影響を *in vitro* で調査した。温度処理は 5°C, 10°C, 25°C (いずれも暗黒下, 30日間) の3処理区, 日長処理は温度処理終了後, 25°C 下で, 8時間 (90日間), 8時間 (45日間) + 16時間 (45日間), 16時間 (90日間) の3処理区を設けた。25°C 処理区では日長にかかわらず生育できなかつた。最も鱗茎が肥大した処理区は, 5°C および 10°C の 16時間日長処理で, 温度による有意差はなかつた。8時間 + 16時間日長処理では 10°C 処理区が 5°C 処理区よりも鱗茎肥大が有意に優つた。以上の結果, 10°C, 16時間日長で鱗茎肥大を促進することが認められ, 本条件で鱗茎形成の早期選抜が可能

と判断された。

以上の結果から，変種であるチャイブとアサツキには高い交雑親和性があり，BC₁世代において結球型，非結球型および中間型の3タイプに分離でき，鱗茎形成の遺伝様式を明らかにするとともにバルク法 RAPD 分析により鱗茎形成遺伝子の探索のための重要な情報を得ることが出来た。また，鱗茎形成の早期選抜を *in vitro* で行うための培養条件を明らかにした。

謝 辞

本論文の取りまとめにあたり，主指導教官として終始懇切丁寧なご指導を戴きました岩手大学農学部教授・壽松木章博士に厚く御礼申し上げます．数多くのご助言および指導を戴いた山形大学農学部教授・高樹英明博士，西澤 隆博士，並びに論文を審査いただいた弘前大学農学部教授・荒川修博士に厚く御礼申し上げます。

琉球大学農学部准教授・嬉野健次博士には，本研究の端緒を与えていただくとともに，研究の遂行にあたっては，終始懇切丁寧なご指導とご激励を戴きました．忠心より感謝の意を表します．

本実験の遂行にあたり，実験機器の使用を快く許可していただいた岩手大学農学部准教授・小森貞男博士，同大学教育学部准教授金澤俊成博士に御礼申し上げます．

本実験に多大な援助と協力を戴いた板橋健さん，細矢美穂さん，沼尾格さん，昆亮輔さんをはじめとした岩手大学農学部農業生命科学科蔬菜花卉園芸学研究室の皆さんに深く感謝致します．

引用文献

- 阿部定夫・勝又広太郎・永吉 秀夫. 1955. 本邦玉葱品種の結球に於ける感光性と生態的分化に関する考察. 園学雑. 24:6-16.
- 青葉 高. 1970. 数種の球根花きの球形成に及ぼす低温処理の影響. 園学雑. 39(4):284-290.
- 青葉 高・高樹英明. 1971. ニンニクの球形成に関する研究(第3報). 園学雑. 40:240-245.
- 青葉 高. 1972a. 球根植物の球形成に及ぼす温度の影響 (第1報). 園学雑. 41(3):290-296.
- 青葉 高. 1972b. 球根植物の球形成に及ぼす温度の影響 (第2報). 園学雑. 41(4):393-397.
- 青葉 高. 1974. *Allium Rosen-giganteum* Hybrid の特性. 園学要旨. 昭 49 秋. 312-313.
- 青葉 高. 1976. 球根作物の休眠現象. 農及園. 51(4): 491-496.
- 青葉 高. 1982. 葉菜類・ネギ類. In. 日本の野菜 果菜類・ネギ類. p.137-138. 八坂書房. 東京.
- Arifin, N. S., Y. Ozaki and H. Okubo. 2000. Genetic diversity in Indonesian shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) and *Allium* × *wakegi* revealed by RAPD markers and origin of *A.* × *wakegi* identified by RFLP analyses of amplified chloroplast genes. *Euphytica* 111: 23-31.
- 浅見与七. 1954. 蔬菜品種の生態学的分化に関する研究. 文部省科学試験研究報告. p.16-32. 養賢堂.
- Ayabe, M. and S. Sumi. 1998. Establishment of a novel tissue culture methods, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*. 17:773-779.

- Belaj, A., I. Trujillo, R. Rosa, L. Rallo and M. J. Gimenez. 2000. polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in olive germplasm bank. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126:64-71.
- Benet, H., R. P. Guries, S. Boury and E. B. Smalley. 1995. Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm. *Theor Appl Genet.* 90: 1068-1073.
- Chague, V., J. C. Mercier, M. Guenard, A. Courcel and F. Vedel. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-5 in tomato by bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 92:1045-1051.
- Cheng, F. S., N. F. Weeden and S. K. Brown. 1996. Identification of codominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theor. Appl. Genet.* 93:222-227.
- Currah, L. and D. J. Ockendon. 1988. A hybrid index for *Allium cepa* × *A. fistulosum* crosses. p.190-196. In: Proc 4th *Allium* Symp., Wellesbourne, UK.
- Deputy, J. C., R. Ming, H. Ma., Z. Liu., M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt and J. I. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:107-111.
- Dubouzet, J. G., T. Etoh, K. Arisumi and T. Yoshitake. 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(2): 321-326.
- Emsweller, S. L. and H. A. Jones. 1935. An interspecific hybrid in *Allium*. *Hilgardia.* 9:265-273.
- Fritsch, R. 2001. Taxonomy of the genus *Allium*: Contribution from IPK Gatersleben. *Herbertia.* 56:19-50.

- Gonzalez, L. G. and B. V. Ford-Lloyd. 1987. Facilitation of wide-crossing through embryo rescue and pollen storage in interspecific hybridization of cultured *Allium* species. *Plant Breed.* 98:318-322.
- 浜島直巳. 1953. 玉葱品種の早晩生について. *園学雑.* 22: 33-40.
- Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution, and history. p.1-26. In J. L. Brewster and H. D. Rabinowitch (eds). *Onion and allied crops. I.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Harvey, C. F., G. P. Gill, L. G. Fraser and M. A. Mcneilage. 1997. Sex determination in Actinidia. 1. Sex-linked makers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex Plant Report.* 10:149-154.
- Hernandez, P., R. Rosa, L. Rallo, G. Dorado and A. Martin. 2001. Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.* 103:86-92.
- Hizume, M. 1994. Allodiploid nature of *Allium wakegi* Araki revealed by genomic *in situ* hybridization and localization of 5S and 18S rDNAs. *Jap. J. Genet.* 69:407-415.
- Ii, K., H. Okubo and T. Matumoto. 2002a. Control of bulb dormancy in hyacinth a molecular biological approach. *Acta Hort.* 570: 241-246.
- Ii, K., H. Okubo and Y. Ozaki. 2002b. Differential display of genes induced by low temperature in bulb formation of hyacinth. *Acta Hort.* 570:335-338.
- 稲田委久子・遠藤元庸. 1995. アサツキの系統間変種に関する細胞遺伝学的研究. *園学雑.* 64(2):339-349.
- 稲田委久子. 1997. ネギ近縁種の系統類縁関係に関する細胞遺伝学研究. 九州大学論文博士学位論文. p.205.

- 稲富佳洋・村田菜芳・中野英樹・田村春人・鈴木 卓・大澤勝次.
2004. 多様な生息地から採取したギョウジャニンニク系統の
萌芽期の早晩性および RAPD 分析による分類. 園学研.
3(4):329-332.
- 岩田正利・森田 勇・本多 藤雄. 1959. 窒素供給期間の差異がタ
マネギの生育・収量に及ぼす影響. 園学雑. 28 : 96-108.
- Jiang, C. and K. C. Sink. 1997. RAPD and SCAR markers
linked to the sex expression locus M in asparagus.
Euphytica. 94: 329-333.
- Jones, H. A. and L. K. Mann. 1963. Onions and their allies.
pp.286. Leonard Hill [Books] Ltd., London.
- Kamenetsky, R., I. L. Shafir, M. Baizerman, F. Khassanov, C.
Kik and H. D. Rabinowitch. 2003. Garlic (*Allium sativum*
L.) and its wild relatives from Central Asia: evaluation
for fertility potential. Acta Hort. 637: 83-91.
- Kamenetsky, R. and H. D. Rabinowitch. 2006. The genus
Allium: A developmental and horticultural analysis. p.
329-378. In J. Janick (ed.). Horticultural Review 32, John
Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Kastner, U., A. Klahr, R. J. Keller and R. Kahane. 2001.
Formation of onion bulblets in vitro and viability during
medium-term storage. Plant Cell Reports. 20:137-142.
- 加藤 徹. 1963a. タマネギの球の形成肥大および休眠に関する生
理学的研究 (第 1 報). 園学雑 32 : 229-237.
- 加藤 徹. 1963b. タマネギの球の形成肥大および休眠に関する生
理学的研究 (第 3 報). 園学雑 33 : 53-61.
- Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa and K.
Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction
methods for plants, especially woody plants. Plant Tissue
Culture and Biothecnology 4: 76-80.

- Lahogue, F., P. This and A. Bouquet. 1998. Identification of a codominant scar marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 97:950-959.
- Le Guen-Le Saos, F., A. Hourmant, F. Esnault and J. E. Chauvin. 2002. In vitro Bulb Development in Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group): Effects of Anti-gibberellins, Scrose and Light. *Annals of Botany.* 89: 419-425.
- Leven, A. 1936. Zytologische Studien an *Allium schoenoprasum*. *Hereditas* 22:1-128 (In Germany with English summary)
- Magruder, R. and H. A. Allard. 1937. Bulb formation in some American and European varieties of onions as affected by length of day. *J. Agric. Res.* 54:719-752.
- Masuda, J., Y. Ozaki and H. Okubo. 2007. Rhizome transition to storage organ is under phytochrome control in lotus (*Nelumbo nucifera*). *Planta* 226: 909-915.
- Masuzaki, S., S.Yaguchi, N.Yamauchi and M. Shigyo. 2007. Morphological characterisation of multiple alien addition lines of *Allium* reveals the chromosomal locations of gene(s) related to bulb formation in *Allium cepa* L. *J. Hor. Sci. Bio.* 82(3): 393-396 .
- Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- 宮野清治. 1983. アサツキの生態と品種. 石川県農試レポート第34号:p.11-18.
- 宮島郁夫・尾崎行生・猪立山三鈴・池松良平・大久保敬・五井正

- 憲. 2001. 日本各地に現存するツバキ‘有楽’古木の遺伝的同一性. 園学雑. 70(3): 366-371.
- 門奈理沙. 1995. バルク法を用いた遺伝子ダギング. p.135-140. 島本 功・佐々木卓治監修. 植物の PCR 実験プロトコール. 秀潤社. 東京.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nomura, Y. and K. Makara. 1996. Morphological and agronomical characteristics in interspecific hybrid plants between rakkyo (*Allium chinense*) and other edible *Allium* species. *Breed. Sci.* 46:17-22.
- 岡安俊明・富樫 博・栗田公司. 1980. 庄内砂丘におけるアサツキの系統選抜試験. 砂丘研究 27(1): p.19-22.
- Okubo, H. and S. Uemoto. 1981. Changes in the endogenous growth regulators in bulbous iris in bulb-forming and nonbulb-forming aspects. *Plant Cell Physiol.* 22: 297-301.
- 大久保敬・安谷屋信一・高橋基一・藤枝國光. 1981. ワケギ (*Allium wakegi* Araki) の球形成に関する研究. 園学雑 50(1): 37-43.
- Okubo, H., A. N. Sugiharto and N. Miho. 1999. Bulbin Response of Shallot (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum* Backer) and *Allium* × *wakegi* Araki to Daylength and Temperature. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68(2): 283-285.
- Pelsy, F. and D. Merdinoglu. 1996. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. *Plant Breed* 115: 371-377.
- Poulsen, N. 1990. Chives, *Allium schoenoprasum* L. p. 231-250. In J. L. Brewster and H. D. Rabinowitch (eds). *Onion and allied crops. III.* CRC Press, Boca Raton, Florida.

- 齊藤 新・喜久田嘉郎・幸田泰則. 1999. 無菌培養系におけるタマネギの鱗茎形成. 日本作物学会記事. 68(別2) 208-209.
- 齊藤 新・喜久田嘉郎・幸田泰則. 2000. タマネギ植物体中に含まれる鱗茎形成促進活性と阻害活性の検出. 日本作物学会記事. 69(別2) 180-181.
- Shemesh, E., O. Scholten, H. D. Rabinowitch and R. Kamenetsky. 2008. Unlocking variability: inherent variation and developmental traits of garlic plants originated from sexual reproduction. *Planta* 227: 1013-1024.
- Stearn, W. T. 1978. European species of *Allium* and allied genera of *Alliaceae* asynonymic enumeration. *Ann. Musei Goulandris* 4: 83-198.
- 末吉孝行・下村克己・古賀武・浜地勇次・田代洋丞・執行正義. 2007. シャロット系統'チェンマイ'の開花特性と花粉稔性. 園学雑. 76(別2): 205.
- 鈴木芳成・大越 聡. 1991. アサツキの液体回転培養による苗条原基の誘導および植物体再生. 育種学雑誌. 41 別 2. 304-305.
- 高樹英明. 1979. ニンニクの球形成と休眠に関する研究. 山形大学紀要(農学)第 8 卷(2), 別冊 215-303.
- 高樹英明. 1987. アサツキの成長力の季節的変動と休眠. 園学雑. 56(1):60-69.
- 高樹英明・深沢明子・木下絵里. 1993. アサツキの種子生産と実生栽培に関する研究. 園学雑. 62(別2):216-217.
- 高樹英明・曲英華. 1994. アサツキの *in vitro* 大量増殖法に関する研究. 園学雑. 63(別1): 240-241.
- 高木俊夫, 1990. PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. P13-22. 廣川書店. 東京.

- 田中克己・浜 清. 1963. 顕微鏡標本の作り方. p.135-161. 裳華房. 東京.
- Tanikawa, T., M. Takagi and M. Ichii. 2002. Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71(2):249-251.
- 田代洋丞. 1984. ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究. 佐賀大農彙 53 : 65-73.
- Tashiro, Y. 1984. Genome analysis of *Allium* × *wakegi* Araki. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 52: 399-407.
- Tashiro, Y., T. Oyama, Y. Iwamoto, R. Noda and S. Miyazaki. 1995. Identification of maternal and paternal plants of *Allium* × *wakegi* Araki by RFLP analysis of chloroplast DNA. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63: 819-824.
- Tatlioglu, T. 1993. Chive, *Allium schoenoprasum* L. 3-13. In: G. Kalloo and B. O. Bergh (eds.). Genetic improvement of vegetable crops. Pergamon Press, Oxford.
- 寺分元一. 1971. タマネギのリン茎形成に関する研究(第7報). 園学雑 40 (1) : 17-22.
- 寺分元一. 1981. タマネギのリン茎形成に及ぼす低温の影響. 園学雑 50(1) : 53-59.
- 塚本洋太郎. 1973. 球根作物の休眠問題. 植物の化学調節. 8 : 21-30.
- Umehara, M., T. Sueyoshi, K. Shimomura, M. Iwai, M. Shigyo, K. Hirashima and T. Nakahara. 2006. Interspecific hybrids between *Allium fistulosum* and *Allium schoenoprasum* reveal carotene-rich phenotype. Euphytica 148: 295-301.
- Urasaki, N., Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H.

- Tanaka, H. Oku, I. Chinen and R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). Theor. Appl. Genet.104:281-285.
- Van der Meer Q. P., and Van Bennekom J. L. 1978. Improving the onion crop (*Allium cepa* L.) by transfer of characters from *Allium fistulosum* L. Biul Warzywniczny 22:87-91.
- Wendel. J. F. and C. R. Parks. 1982. Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica* L. J.Hered. 73:197-204.
- Wiessman, Z., N. Avidan, S. Lavee and B. Quebedeaux. 1998. Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:837-841.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
- Xu, W. J., B. W. Wang and K. M. Cui. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. Euphytica. 136:233-238.
- 八 鍬 利 郎 . 1973. ネギ類 . 農 業 技 術 大 系 野 菜 編 8. p417-420. 農 文 協 . 東 京 .
- 八 鍬 利 郎 . 1989. ラ ッ キ ョ ウ 野 菜 園 芸 大 百 科 10. p223-238. 農 文 協 . 東 京 .
- Yamazaki, H., T. Nishijima, Y. Yamato, M. Hamano, M. Koshioka and H. Miura. 1999. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I .Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone.Plant Growth Regulation 29:189-194.
- Yamazaki, H., T. Nishijima, Y. Yamato, M. Hamano, M.

Koshioka and H.Miura. 1999. Involvement of abscisic acid in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. II .A comparison between dormant and nondormant cultivars.Plant Growth Regulation 29:195-200.

Yanagino, T., E. Sugawara, M. Watanabe and Y. Takahata. 2003. Production and characterization of an interspecific hybrid between leek and garlic. Theor Appl Genet. 107:1-5.