

## 単一異種染色体添加系統シリーズを用いた *Allium cepa* の遺伝子分析

執行正義 (山口大学 農学部)

shigyo@yamaguchi-u.ac.jp

*Allium cepa* は世界中で栽培されている重要な植物種である。本種には、中高緯度地方に適したタマネギや低緯度地方によく適応したシャロット等が含まれる。両植物間には、生理・生態的特性に関する相異点が多くみられるが、遺伝情報には互換性がある。本研究では、シャロット染色体を添加したネギ単一異種染色体添加系統シリーズの育成を試み、これらを用いて *A. cepa* 遺伝子を詳細に分析した。

### はじめに

異種ゲノムから特定の染色体を一本だけ導入した植物を単一異種染色体添加系統という。Leighty と Taylor (1924) がコムギの単一異種染色体添加系統をはじめて育成して以来、多くの植物種でその作出が行われ、種々の遺伝・育種学的研究に用いられている。1970 年代までは、食用作物、工業原料作物、飼料作物等に限っていた研究も、1980 年代以降、アブラナ類、カボチャ、トマト、ネギ類などの園芸作物で育成する試みがなされ始めた。単一異種染色体添加系統は添加染色体の種類によりタイプ分けされ、その数は染色体提供親の染色体基本数と同じになる。1996 年、筆者は 8 種類のシャロット染色体をそれぞれもつネギの単一異種染色体添加系統のシリーズを完成した。これは、園芸作物において添加系統シリーズが完成した最初の報告となった。本稿では、筆者がこれまでにに行った、同シリーズの育成およびそれらを用いた *A. cepa* の遺伝子分析に関する研究の概要を説明する。

### 単一異種染色体添加系統シリーズの育成

添加系統はネギゲノムを二つとシャロットゲノムを一つもつ異質三倍体にネギを戻し交雑して作出した。三倍体の種子稔性は低かったが、多数の小花を交配して約 270 個体の実生を得た。実生の根端細胞の染色体数を調査した結果、47 個体が 17 本を有していた。PMC の MI 中期における染色体対合を調査したところ、41 個体で  $8\text{II}(\text{八つの二価染色体}) + 1\text{I}(\text{一つの一価染色体})$  が観察された。二価染色体はネギ特有の偏在キアズマを形成しており、これらの個体を単一異種染色体添加系統とみなすことができた。次に、フォイルゲン染色した体細胞染色体の核型分析より、八種類の添加染色体が確認され、シリーズ完成に至った<sup>1)</sup>。さらに、GISH 法による分析を行ったところ、添加染色体はネギ染色体から色分けされ、異種染色体間での遺伝質交換の形跡はなかった<sup>2)</sup>。このことから、添加系統シリーズはそれぞれ純粋なネギのバックグラウンドに完全なシャロット染色体が一本添加されていることがわかった。以上より、このシリーズを用いて、「シャロット染色体添加がネギ諸形質の発現に及ぼす影響を明らかにすること」、ならびに、「シャロットが担う遺伝子および遺伝的マーカーの座乗染色体を決定すること」が可能となった。

### 添加系統シリーズの形態・生理的特性および繁殖能力

添加型間で形態および生理的特性が異なり (図 1) 各々が示した顕著な特性は次の通りであった。第 1 (染色体) 添加型: 仏炎包が平たい球形。第 2 添加型: 葉身がブルーム欠。第 3 添加型: 低種子稔性。第 4 添加型: 仏炎包が鋭先形。第 5 添加型: 葉鞘が黄褐色。第 6 添加型: 葉身が弓なりに展開。第 7 添加型: 葉の展開速度が速い。第 8 添加型: 高種子稔性。他にも添加型毎に種々の特性が観られ、添加染色体が染色体受容親 (ネギ) の形質発現に及ぼす様々な影響が明らかになった<sup>3)</sup>。



図1．単一異種染色体添加系統シリーズの草姿

C：ネギ（対照植物）、1：第1添加型～8：第8添加型

一方、添加系統シリーズは染色体受容親である分けつ性ネギの性質を受け継ぎ、栄養繁殖による系統維持が可能であった。しかし、栄養繁殖中に個体を失うこともあるので、種子繁殖による系統維持も検討した。種子・花粉稔性に関しては、添加型間で程度の差はあったものの、全てが稔性を有していた<sup>4)</sup>。さらに、添加系統を自殖、ならびに、ネギと相反交雑して、添加染色体の後代への伝達を調査したところ、3種類のネギ( )×添加系統( )を除く、全ての交配組合せで伝達が見られた<sup>5,6)</sup>。この研究より、自殖と添加系統( )×ネギ( )を組合せることで、効率的に系統維持できる種子繁殖系を確立することができた。

## シャロットにおける遺伝子および遺伝的マーカーの座乗染色体の決定

### 1．色素生産に関与する遺伝子

形態調査により第5添加型は葉鞘基部で黄褐色の色素を生産することがわかり、この形質発現に関与する遺伝子は第5染色体上にあると考えられた。HPLC分析により葉鞘部で生産されている色素化合物を同定したところ、シャロットでは5種類のアントシアニン系および4種類のフラボノイド系色素化合物が検出されたが、ネギでは検出されなかった。添加系統シリーズでは、第5添加型でのみシャロットで検出された全ての色素化合物がみられ、他の添加型ではみられなかった。このことから、シャロットの葉鞘部におけるアントシアニンおよびフラボノイドの生合成に関与する重要な遺伝子群が第5染色体上に存在することが明らかとなった<sup>7)</sup>。

### 2．アイソザイムおよびDNAの遺伝的マーカー

添加系統シリーズを用いてアイソザイム分析を行い、10種類の遺伝子座が座乗するシャロット染色体を決定した<sup>1)</sup>。その結果を染色体毎にまとめると次の通りである。第1染色体：*Lap-1*、第2：*Got-1*と*6-Pgdh-2*、第3：*Tpi-1*、第4：*Mdh-1*、第5：*Idh-1*と*Pgi-1*、第6：*Adh-1*と*Got-2*、第8：*Gdh-1*。また、両親種を用いて2、3のrDNAの分析を行ったところ、5S rDNAの電気泳動像においてシャロットに特異的なDNA断片がみられた。添加系統シリーズでは、この特異的な断片は第7添加型のみで見られ、5S rDNAが第7染色体上にあることがわかった<sup>1)</sup>。ネギ属植物において、RAPD法はPCRを用いた迅速かつ簡便な多型検出技術として用いられており、得られたDNA断片はマーカーとして遺伝分析に利用されている<sup>8)</sup>。シャロットに特異的な67個のRAPDマーカーを用いて添加系統シリーズを分析した結果、16個のマーカーの座乗染色体を明らかにできた<sup>9)</sup>。以上より、シャロットの全染色体にそれぞれ特異的な遺伝的マーカー（染色体マーカー）を確立することができた。

## 添加系統および染色体マーカーの利用によるタマネギ AFLP 連鎖地図と染色体の対応関係の解明

van Heusden ら (2000) が公表したタマネギ AFLP 連鎖地図は、262 個のマーカーを含む八つの連鎖群から成り、本地図の全長 694cM は全ゲノムの約 8 割をカバーしている。ゲノム研究をさらに効率よく進めるためには、各連鎖群が対応する染色体を明らかにしなければならなかった。そこで、添加系統シリーズおよび染色体マーカーを用いてそれらの対応関係を解明する研究を行った。添加系統シリーズの AFLP 分析により、186 個の AFLP マーカーの座乗する染色体を決定し、八種類の染色体にそれぞれ 17~30 個のマーカーを振り分けることができた。座乗染色体が決定したマーカーのうち、51 個は既にマッピングされたものであり、上記課題を解明する上で重要な糸口を与えた。次に、染色体マーカーをマップに統合した結果、これらと近隣の AFLP マーカーの座乗染色体は一致していた。以上の結果より、八つの連鎖群が対応する染色体がそれぞれ明らかとなり (図 2) <sup>10)</sup>、タマネギゲノム解析を「有用遺伝子が存在する染色体部位を明らかにする」という新たな段階に移行させることができた。

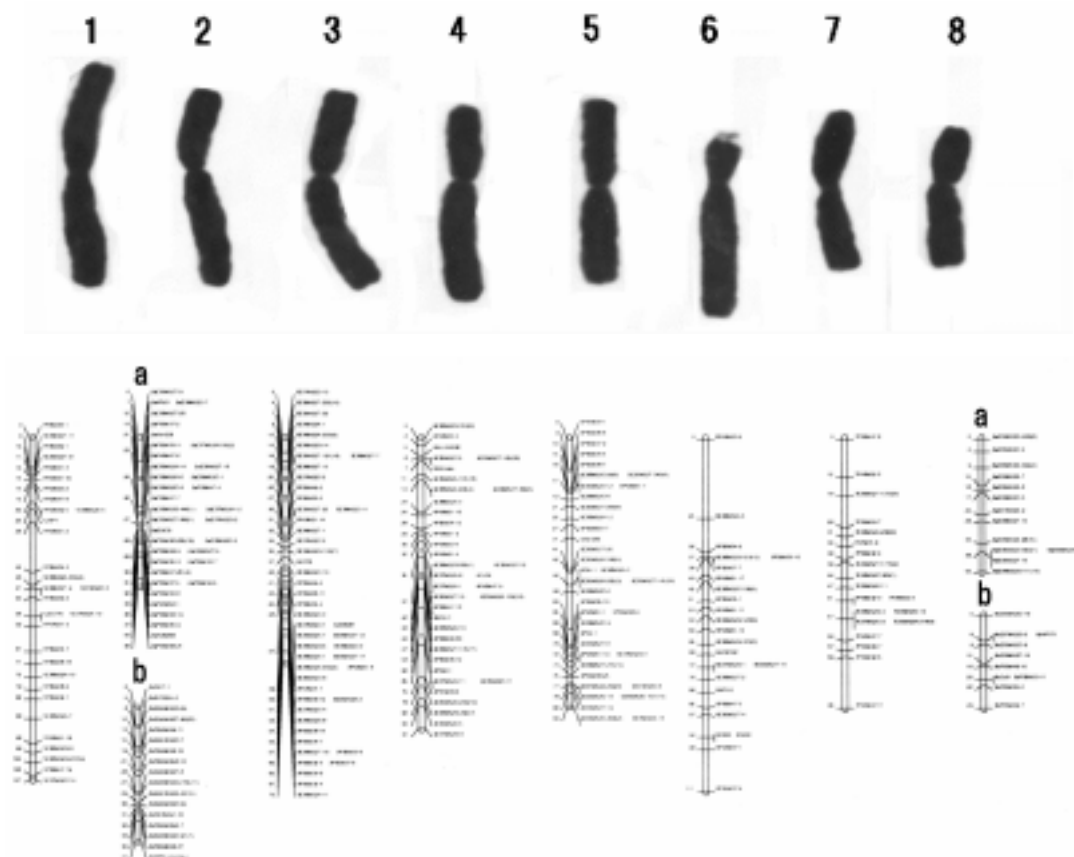


図 2 . 八種類の染色体 ( 1 - 8 ) に対応したタマネギ連鎖地図

### おわりに

上述のように、添加系統シリーズはゲノム解析を含む *A. cepa* の遺伝子分析に際して有効活用された。また、現在、本シリーズはネギ (*A. fistulosum*) の新育種素材としても利用され始めており、シャロットに由来するネギ病害抵抗性や優れた内容成分特性を有する系統が選抜され、添加染色体上の当該領域を含む遺伝質をネギへ効率的に導入する試みがなされている。

### 謝辞

本研究は、筆者が佐賀大学農学部在籍中に、田代洋丞教授のご指導のもとで行ったものであり、終始懇篤なるご指導とご鞭撻をいただいたことに対し謹んで感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Shigyo, M., Y. Tashiro, S. Isshiki and S. Miyazaki 1996. Establishment of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 71: 363-371.
- 2) Shigyo, M., K. Imamura, M. Iino, K. Yamashita and Y. Tashiro 1998. Identification of alien chromosomes in a series of *Allium fistulosum* – *A. cepa* monosomic addition lines by means of genomic in situ hybridization. *Genes Genet. Syst.* 73: 311-315.
- 3) Shigyo, M., M. Iino, S. Isshiki and Y. Tashiro 1997. Morphological characteristics of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 72: 181-186.
- 4) Shigyo, M., M. Iino and Y. Tashiro 1999. Fertility of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extrachromosomes from shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 494-498.
- 5) Shigyo, M., M. Iino, H. Ino and Y. Tashiro 1999. Transmission rates of extra chromosomes in alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion with extra chromosomes from shallot. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 18-22.
- 6) Shigyo, M., T. Wako, A. Kojima, N. Yamauchi and Y. Tashiro 2003. Transmission of alien chromosomes from selfed progenies of a complete set of *Allium* monosomic additions: The development of a reliable method for the maintenance of a monosomic addition set. *Genome* 46: in press.
- 7) Shigyo, M., Y. Tashiro, M. Iino, N. Terahara, K. Ishimaru and S. Isshiki 1997. Chromosomal locations of genes related to flavonoid and anthocyanin production in leaf sheath of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 72: 149-152.
- 8) Shigyo, M., T. Miyazaki and Y. Tashiro 2002. Development of randomly amplified polymorphic DNA markers in cultivated and wild species of section *Cepa* and *Phyllodolon* in *Allium*. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 77: 373-377.
- 9) Shigyo, M., T. Miyazaki, S. Isshiki and Y. Tashiro 1997. Assignment of randomly amplified polymorphic DNA markers to all chromosomes of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 72: 249-252.
- 10) Van Heusden, A. W. & Shigyo, M., Y. Tashiro, R. Vrielink-van Ginkel and C. Kik 2000. AFLP linkage group assignment to the chromosomes of *Allium cepa* L. via monosomic addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 100: 480-486.

### **Gene Analyses of *Allium cepa* by using a Complete Set of Monosomic Addition Lines**

Masayoshi Shigyo (Yamaguchi University, Faculty of Agriculture)

shigyo@yamaguchi-u.ac.jp