

ネギ属雑種植物における減数分裂異常と 染色体動態の解析

山 本 真 紀*

Meiotic abnormality and chromosome dynamics in an *Allium* hybrid

Maki Yamamoto

要旨：動原体の DNA 配列は、生物種によって特異的であることが知られている。ネギ (*Allium fistulosum*, $2n=16$) の動原体特異的 DNA の 5 種類のクローンをプローブとして、ネギとニラの雑種植物ネギニラ (*A. fistulosum* × *A. tuberosum*, $2n=24$) の染色体標本へ FISH 実験を行った。これらクローンは、ネギでは全ての染色体の動原体領域に検出され、ニラでは全ての染色体上に検出されなかったことから、両種の動原体特異的 DNA 配列は相同性がほとんどない。ネギニラにおいては、クローン Afi 11、19、56 では 7 か所の動原体と 5 か所の介在部に、Afi54、61 は 8 か所の動原体と 5 か所の介在部にシグナルが検出された。ネギニラはネギ由来の染色体を 8 本もっているのではほぼネギ染色体を同定できたが、ネギ染色体上での検出領域と比べて量的に異なっており、雑種形成に伴う染色体の構造的な変異の可能性が考えられる。さらに、ネギニラの減数分裂第一分裂中期について紡錘糸が付着する染色体の特定を試みた。免疫染色によって α -チューブリンを検出した後、同一核盤に対してネギの全ゲノム DNA プローブによって GISH 実験を行ったところ、赤道上に並ばない一価染色体はネギ染色体であり紡錘糸の付着がランダムであることがわかった。ネギニラへのネギ花粉の交配実験から胚珠の卵細胞も不稔性を示し減数分裂が正常に行われていないことが示唆され、受粉の刺激で珠芽が形成されたことからネギ属は独特の生殖様式をもつと推察される。

Abstract : The centromeres are characterized by species-specific sequences. The molecular cytogenetic characterization of an *Allium* hybrid “Negi-Nira” (*A. fistulosum* × *A. tuberosum*, $2n=24$) was carried out using five clones of centromere-specific sequences deduced from welsh onion (*A. fistulosum*, $2n=16$) as probes. The centromeric regions of *A. fistulosum* chromosomes precisely demonstrated the presence of all clones however found to be absent in *A. tuberosum* that revealed the non-homology of centromere specific sequences in both parent species. Further, their hybrid (Negi-Nira) also showed diversified signal and location patterns for the used clones since Afi54 was detected with eight centromeric regions whereas Afi11, 19, 56, and 61 displayed signals on seven centromeric as well as four interstitial regions. The centromeric signals precisely identified the eight chromosomes of *A. fistulosum* in “Negi-Nira” however exhibited quantitatively varied signal intensities when compared to the chromosomes of parent species (*A. fistulosum*). Such observation suggests that

*関西福祉科学大学 保健医療学部 教授

the chromosomal structural modifications might have acquired during hybridization events. Further, spindle fiber targeted immuno-staining of “Negi-Nira” chromosomes was performed using α -tubulin antibody to identify the chromosome association pattern at meiotic meta-phase I stage. The re-probing of the same cell by GISH technique using welsh onion genomic DNA as a probe, recognized the univalent chromosomes of welsh onion that unveiled random attachment to the spindle fibers and non-association of homologous chromosomes. The erratic meiosis-directed ovum sterility was confirmed by the crossing experiment between the welsh onion pollen (donor) and the stigma of “Negi-Nira” (receptor). Interestingly, the subsequent formation of bulbils might have attributed through stimulation of the pollination, however indicated the peculiar reproduction pattern in *Allium*.

Key words : ネギ属雑種 *Allium* hybrids 減数分裂 meiosis 染色体動態 chromosome dynamics
 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション Fluorescence *in situ* hybridization 免疫染色
 Immuno-stain

I. はじめに

ネギ (*Allium*) 属植物は種子植物の中でも倍数体が少ないことで知られている。その原因は、種間雑種 (ワケギ、ネギニラなど) や倍加植物 (ラッキョウなど) では配偶子が不稔性になり種子が形成されないことにある。しかし、これら雑種は種子は作れないが地下の球 (バルブ) での栄養生殖が可能である。この点は、ネギ属およびその属するユリ科植物の一部にも共通の大きな特徴であるが、交配による育種では大きな障壁となっている。

そのためネギ属の育種は非常に困難で、せいぜい種内の変異を利用した交配、選抜によるものが主であり、種間雑種の育成は青葉¹⁾によってやぐらネギとタマネギの種間雑種「セイタカネギ」が育成された報告が見られる程度であった。しかし、ネギ属植物にはタマネギ (*Allium cepa*, $2n = 2x = 16$)、ネギ (*A. fistulosum*, $2n = 2x = 16$)、ニラ (*A. tuberosum*, $2n = 4x = 32$)、ニンニク (*A. sativum*, $2n = 2x = 16$)、ラッキョウ (*A. chinense*, $2n = 4x = 32$) な

ど食用に適する種が多く、その健康成分も注目されていることから栄養面や農業上において品種改良や新品種の開発が大きな課題となっている。

たとえばニラは栄養価が高く、ビタミン A、ビタミン C、 β -カロテン、鉄、カルシウム、リンなどを多く含み健康食品として注目されている。現在栽培されているニラ品種の多くは夏抽苔型で、収穫時期に花茎が成長するためそれを除く作業がたいへんな手間になる。また、ニラは自身がもつ単為生殖性のために交雑効率が低く、育種による品種改良は非常に困難である。そこで、ニラに対して春抽苔性と耐寒性を導入するために、ネギとの雑種育成が試みられ、種間雑種植物ネギニラ (品種名「なかみどり」、*A. fistulosum* \times *A. tuberosum*, $2n = 24$) が作出された²⁾。ネギ品種「新里ネギ」の柱頭 (胚珠、 $n = 8$) へ、ニラ品種「きぬみどり」の花粉 ($n = 16$) を交配した胚 (胚発生率 0.2%) を胚救助、培養した個体からのみ植物体を得られた (個体生育率 0.1%)。この個体は種子稔性が全くなく株分けによる栄養繁殖のみで、現在品種

登録されて栃木県内で栽培・流通がなされ、餃子などの加工食品は全国へ出回っている。

さらに、他にも育種の困難を克服するために主に培養技術を駆使した各種種間雑種の育成が試みられている。交配後に胚珠や胚を培養することでラッキョウ (*A. chinense*) とヤマラッキョウ (*A. thunbergii*) の種間雑種が育成され³⁾、ラッキョウとネギおよびラッキョウとタマネギの種間雑種が育成されている⁴⁾。ネギとタマネギの種間雑種は金子らも成功しており (品種名「アリウムハイブリッド」)、ネギがもつ病虫害抵抗性や耐寒性などがタマネギに導入され、エシャロットタイプの生食用新品種が育成された⁵⁾。この品種も種子稔性がなく、人為的な複二倍体化個体でも種子が得られたのは一部である。ネギとノビル (*A. macrostemon*、 $2n = 4x = 32$) の種間雑種は福岡県の葉ネギに滋養強壮効果をノビルから導入してネギに付加価値をつけた品種が福岡農業総合試験場で育成された⁶⁾。この品種 ($2n = 24$ 、異質3倍体) は地上部はネギの形態に近く、地下部はノビルのように肥大した球 (バルブ) を作る。ネギとアサツキ (*A. schoenoprasum*、 $2n = 16$) の種間雑種では、ネギにアサツキの花粉を交配して胚救助によって培養が行われた⁷⁾。アサツキの分けつ性とネギの辛みの少なさを併せもち、葉色の濃さから β カロテンがネギの約7倍となり有用な新品種が誕生している。この雑種も両親種と異なり種子稔性が全くみられず完全な雄性不稔を示す。ニラとギョウジャニンニク (*A. victrialis*、 $2n = 32$) では、ニラにギョウジャニンニクの花粉を交配して胚珠を培養し、種間雑種 ($2n = 4x = 32$) が育成された⁸⁾。両種

の有用形質アリチアミンによる疲労回復やコレステロール抑制作用、抗血栓作用などの薬用効果と収量性の改善を目的として新品種が誕生した。新品種の種子稔性は見られず、ニラの性質であるアポミクシス (単為発生) による種子が得られている。ネギ属種間雑種育成の試みは交配後の胚救助の他にネギとタマネギのプロトプラストの体細胞融合によっても行われている⁹⁾。他には、タマネギとニンニク¹⁰⁾、ネギとタマネギ¹¹⁾、リーキ (西洋ネギ) とニンニク¹²⁾ などでも報告されている。

以上のようにネギ属植物の育種は、種子稔性のあるネギ、ニラ、タマネギ等の種内交配の域であったのが種間雑種の育種が開発され有用新品種の育成が進められている。しかしながら、それらの種子稔性は報告されている範囲では全く見られず、不稔性の原因やしくみは未解明のままである。したがって次世代の育成は主に栄養繁殖となり個体の維持も難しくネギ属育種の課題となっている。

筆者は今までに、ネギ属での不稔性がどのようなメカニズムで生じるのかを明らかにするために、ネギニラを材料として減数分裂第一分裂の染色体分配異常の観察を行い、両親種 (ネギとニラ) の染色体の挙動が異なっていることを明らかにしてきた¹³⁾。一般に植物では、雑種が形成されると減数分裂の際にゲノムを識別して対合して二価染色体を形成する。一価染色体が生じた場合、染色分体が一分染色体として両極へ分配されるコムギ型の分裂や、姉妹染色分体ごとどちらかの極へランダムに分配されるドロゼラ型、両者の中間として一価染色体の一部が分裂するピロゼラ型が知られている¹⁴⁾。減数分裂第一分裂で両極へ分

配された一分染色体の中には行動遅延によって娘細胞の核外に残されるものもあり、小核を形成して花粉の成熟とともに失われることもある。いずれも受精率が下がる場合はあっても種子稔性が失われることはない。

本研究の材料としているネギニラでは、両ゲノムの半数ずつを持ち合わせているが、ニラはもともと四倍体であったため減数分裂では二価染色体を形成できる。しかしネギ染色体は一価染色体を形成することになりその挙動はドロゼラ型であると言える。一価染色体は遅延染色体となり小核の形成も見られる。最終的に花粉は形成されるが、正常な形態をもつ四分子以外に小核が最後まで維持されたり、六～八分子等の小さな花粉が形成されたりする異常も見られ、全てが不稔となる。ネギ属種間雑種のほとんど全てで花粉や胚珠が不稔性を示すことについてはそのメカニズムは不明である。本研究では、ネギ属雑種植物において見られるゲノムによる染色体動態の違いについて紡錘糸と動原体の関係に着目して解析を行った。動原体を構成する機能性タンパク質は動原体特異的ヒストン H3 (CENH3) が知られ、ヒトで最初に CENP-A が発見された¹⁵⁾。CENP-A は酵母からヒトまで種を超えてよく保存されている。植物で報告されている CENH3 もよく保存されており、ネギ (*A. fistulosum*) の動原体特異的タンパク質 CENH3 の抗体は、タマネギ、ネギ、ニラ、ニンニクのどの動原体にも同様に検出されることが報告されている¹⁶⁾。しかし、動原体機能性タンパク質が結合する動原体 DNA 配列は、種によって異なっており特異的であることが知られている。本研究では、ネギ属においても減数分裂の

際に重要な役割をもつ染色体機能要素の一つである動原体の配列の違いを比較検討し、ネギ属種間雑種における不稔性のしくみとネギ属独特の生殖様式について考察したい。

II. 材料と方法

1) 植物材料

本研究ではネギ属雑種植物として栃木県農業試験場で作出され²⁾、分譲いただいたネギニラ (なかみどり、*Allium fistulosum* × *A. tuberosum*、 $2n=24$) を用いた。不稔性のため圃場で栄養生殖によって維持している個体から根端を採取して体細胞分裂期の標本とし、減数分裂期の標本作製については6月初旬頃からつぼみを採取して材料とした。また、ゲノム提供種であるネギ (*A. fistulosum*、 $2n=2x=16$) およびニラ (*A. tuberosum*、 $2n=4x=32$) については、市販の種子から発根させた根端を体細胞分裂期の標本作製の材料とした。

2) プローブ DNA

ネギ (*A. fistulosum*) の動原体特異的タンパク質 CENH3 の mRNA 配列 (GenBank accession No. AB571555) から作製した抗体 (抗 AfiCENH3 抗体) を用い、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法によって、AfiCENH3 タンパク質と共在する DNA 断片を得た中から、FISH によるスクリーニングを行った5クローン (Afi11、Afi19、Afi54、Afi56、Afi61)¹⁶⁾ をネギ動原体特異的 DNA 配列プローブとして使用した。また、染色体識別のマーカーとして 5S rDNA をプローブとした。染色体のゲノムを区別するために、ネギ (九条ネギ) の全ゲノム DNA を抽出しプローブとして用いた。5S rDNA

のジゴキシゲニン標識は PCR 法によって行い、その他のプローブは、ニックトランスレーション法によってビオチンまたはジゴキシゲニンで標識を行った。

3) 抗体

紡錘糸の検出のために抗 α -チューブリンタンパク質抗体（マウス由来、Sigma 社製、T 6199）を使用した。

4) 免疫染色

①花粉母細胞の減数分裂期標本作成

ネギニラの若い蕾を採取し、固定液（3%パラホルムアルデヒド、PHEMES (60 mM PIPES、25 mM HEPES、10 mM EGTA、2 mM MgCl₂、0.35 M ソルビトール)、0.1% TritonX-100) に浸して室温で 15 分間、真空遠心機を用いて固定を行った。固定後、室温の 1×PHEMES 緩衝液で 15 分間ずつ 2 回、真空遠心機を用いて洗浄を行い、新しい 1×PHEMES に置き換えて 4°C で保存した（3~4 週間保存可能）。固定したつぼみをスライドグラス上に取り出し、つぼみあたりの 6 本の葯のうち 1 本を顕微鏡観察して減数分裂第一分裂期の葯を選抜し、酵素液（サイトヘリカーゼ 7.5 μ l、2% セルラーゼオノズカ RS、0.3% ペクトリアーゼ Y23、1.5% マセロザイム R10、PHEMES）へ移し、37°C で 1 時間インキュベートする。PHEMES 緩衝液で室温、5 分間リンスを行い、 β -グルクロニダーゼ溶液（1.5% β -グルクロニダーゼ、PHEMES）で室温、2 時間インキュベートを行った。その後蒸留水へ移して低張処理を行い、ポリ-L-リジンコートのスライドグラスへ滴下、乾燥させて標本作製した。

②免疫染色法

標本を 10% BSA/PBS 溶液にて室温で 1 時間ブロッキングを行う。PBS で室温、5 分間、2 回リンスを行った後、一次抗体（ α -tubulin、SigmaT 6199、1:2000）を標本あたり 200 μ l ずつ滴下して室温で一晩、インキュベートを行った。インキュベート後の標本を PBS で室温、1 時間で 2 回洗浄し、二次抗体（Alexa 488 抗マウス抗体、モレキュラープローブス A11029、1:200）を標本あたり 200 μ l ずつ滴下して室温で一晩、インキュベートを行った。標本を PBS で室温、1 時間で 2 回洗浄し、DAPI で対比染色を行って DABCO で封入し蛍光顕微鏡観察を行った。標本の画像および蛍光シグナルは CCD 冷却カメラで取り込み、画像処理ソフト（Photoshop 6.0）で解析を行った。

5) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法

①標本作製

ネギおよびニラについては、市販の種子（九条ネギ、広幅ニラ）を数十粒、湿らせた濾紙を敷いたシャーレに播種し、約 5 日で発根した根端のおよそ 1 cm を採取した。ネギニラについては、圃場の株から伸張している根端を探して先端およそ 1 cm を採取し、それぞれ氷温蒸留水による前処理（8 時間）およびエタノール：酢酸=3:1 の固定液で固定し、押しつぶし法による標本作製を行った。

さらに、免疫染色によって紡錘糸を検出したネギニラの減数分裂期標本は、封入剤を PBS で洗浄した後、固定液（エタノール：酢酸=3:1）で固定を行い、4% パラホルムアルデヒド/PBS で 5 分間、再固

定を行った。これを蒸留水で 5 分間洗浄し、脱水 (70% エタノール、100% エタノールの順に 5 分間ずつ浸漬)、乾燥させて、ゲノミック *in situ* ハイブリダイゼーション (GISH) 実験用の標本とした。

②FISH 法

ビオチンまたはジゴキシゲニン標識した動原体プローブおよび 5S rDNA プローブは蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 実験により検出を行った。本研究に用いた FISH 法は、Mukai ら¹⁷⁾の方法に準じて行い、2 種類のプローブを同一の標本上で同時に検出する際には、それぞれ別々のハプテン (ビオチンまたはジゴキシゲニン) で標識したプローブを組み合わせ、ビオチン標識したプローブは FITC によって緑色蛍光色で、ジゴキシゲニン標識したプローブはローダミンによって赤色蛍光色で検出を行った。観察は蛍光顕微鏡で行い、染色体画像および蛍光シグナルは冷却 CCD カメラで取り込んで画像処理ソフト (Photoshop 6.0) で解析を行った。

③GISH 法

ネギニラで検出された紡錘糸の付着して

いる染色体のゲノムを区別するために、免疫染色によって紡錘糸が検出された減数分裂期標本に対して、ネギ (九条ネギ) の全ゲノム DNA プローブを用いた GISH 実験を行った。染色体 DNA の変性については、染色体構造を崩さないようにするために 70°C の 70% ホルムアミド/2×SSC で 2 分間の処理を行うところを 1 分間で行った。その他の工程は Mukai ら¹⁷⁾の方法に準じた。

III. 結果と考察

1) ネギ動原体特異的 DNA クローンの FISH 法による検出

ネギ (*A. fistulosum*) の動原体特異的 DNA 配列の 5 クローン (Afi11、Afi19、Afi54、Afi56、Afi61) をプローブとして、ニラ、ネギ、ネギニラの各体細胞 (根端分裂組織) の染色体標本へ、マーカーとして 5 S rDNA とともに同時 FISH 実験を行った。ネギ染色体については、ジゴキシゲニン標識した 5S rDNA は 1 対 2 本の染色体上へ検出され、ビオチン標識した動原体配列のクローンは全てのネギ染色体の動原体

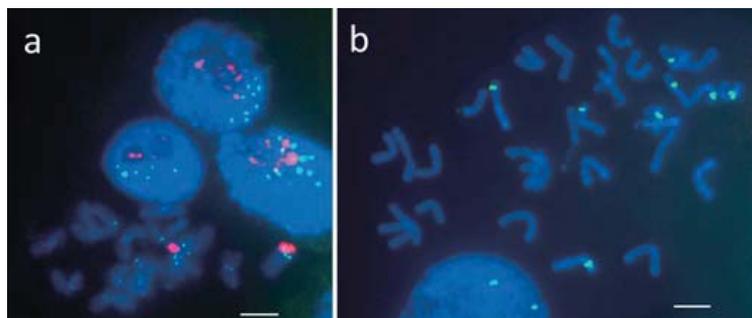


図 1 ネギおよびニラの体細胞染色体における FISH 法によるネギ動原体クローン Afi61 と 5S rDNA の同時検出

a) ネギ (*A. fistulosum*, $2n = 16$) の根端分裂組織の染色体像。ネギの動原体特異的 DNA 配列 (Afi61) はすべての染色体の動原体部 (16 か所) に緑色蛍光色で検出された。5S rDNA はジゴキシゲニン標識により赤色で 2 か所 1 対の染色体上に検出されている。b) ニラ (*Allium tuberosum*, $2n = 16$) の根端分裂組織染色体像。5S rDNA は 8 か所 4 対の染色体上に緑色で検出されている。ジゴキシゲニン標識したネギの動原体特異的 DNA 配列 (Afi61) は全く検出されていない。傍線は 10 μ m。

部へ緑色蛍光色で検出された (図 1 a)。ニラ染色体では、ビオチン標識した 5S rDNA は 4 対 8 本の染色体上に緑色蛍光色で検出されたが、ジゴキシゲニン標識した動原体配列 Afi61 はどの染色体にも検出されず (図 1 b)、他の 4 クローンについても同様であった。したがって、本研究でプローブとしたネギ動原体特異的 DNA 配列の 5 クローンは、ネギニラの染色体標本においてもネギ染色体上にのみ検出されると考えられ、両種の染色体を識別するマーカーになるとともに、紡錘糸の付着の違いも詳しく解析できると期待される。

ビオチン標識した動原体配列の同 5 種類のプローブとジゴキシゲニン標識した 5S rDNA のプローブを用いて、ネギニラの根端分裂組織細胞の染色体上へ同時に FISH 実験を行ったところ、ジゴキシゲニン標識した 5S rDNA のシグナルは 5 本の染色体上に 1 か所ずつ検出された。両親種であるネギは 1 対の染色体の 2 か所に 5S rDNA が存在しており、ニラでは 4 対 8 か所に 5S rDNA が分布していることがわかっているので、それぞれ半数体ずつで、ニラの 4 本の染色体とネギの 1 本の染色体の合計 5 本の染色体上の 5 か所に 5S rDNA が検出されていると考えられる。Afi11、Afi19、Afi56 については、ネギニラ染色体の動原体部の 7 か所 (図 2 a、b、d 矢印) と 5 か所の介在部の合計 11 か所に検出された。介在部については 5S rDNA の検出部位と同所的に検出されており、動原体配列の一部は 5S rDNA との相同性があるものと思われる。図 2 a~e の赤色矢印で示した 5S rDNA が検出された染色体は、動原体部位に緑色のネギ動原体プローブのシグナルが検出されていることから、ネギ染色体であ

ると同定できる。Afi54 および Afi61 プローブについては、動原体部の 8 か所に検出された (図 2 c、e 矢印)。

ネギニラの染色体標本においてネギ動原体プローブの検出からネギ由来の染色体が同定できたが、クローンによってシグナルの強さが異なっており、Afi54 と Afi61 ではネギ染色体の各動原体に比較的強いシグナルが検出できたが、それ以外の動原体プローブでは各核盤において弱いシグナルと強いシグナルが混在していた。さらに、5S rDNA と同所的に見られた動原体部位以外に検出された動原体プローブのシグナルについても、Afi54 と Afi56 においては比較的強いシグナルが見られたが、他のプローブでは非常に弱かった。シグナルの強さは動原体部での各クローンの配列の分量がある程度反映されていると予想される。Nagaki ら¹⁶⁾により、各動原体クローンの配列が解析されており (Afi11: GenBank accession No. AB 735740、Afi19: GenBank accession No. AB 735741、Afi54: GenBank accession No. AB 735742、Afi56: GenBank accession No. AB 735743、Afi61: GenBank accession No. AB 735744)、動原体部位の配列がどのような構成になっているか予想されている。Afi11、Afi19、Afi54、Afi56、Afi61 について Tail-PCR を行った結果、全長 1,646 bp のコンティグが明らかにされた。さらに Afi19 にはミニサテライトが含まれており、PCR によってミニサテライトが縦列反復した配列が数種類得られたことから、ネギ動原体部はミニサテライトが特徴的に縦列反復した構造になっていることが明らかにされている¹⁶⁾。染色体動原体部の構造については、動物、植物を問わず種特異的な反復配列等で構成されている

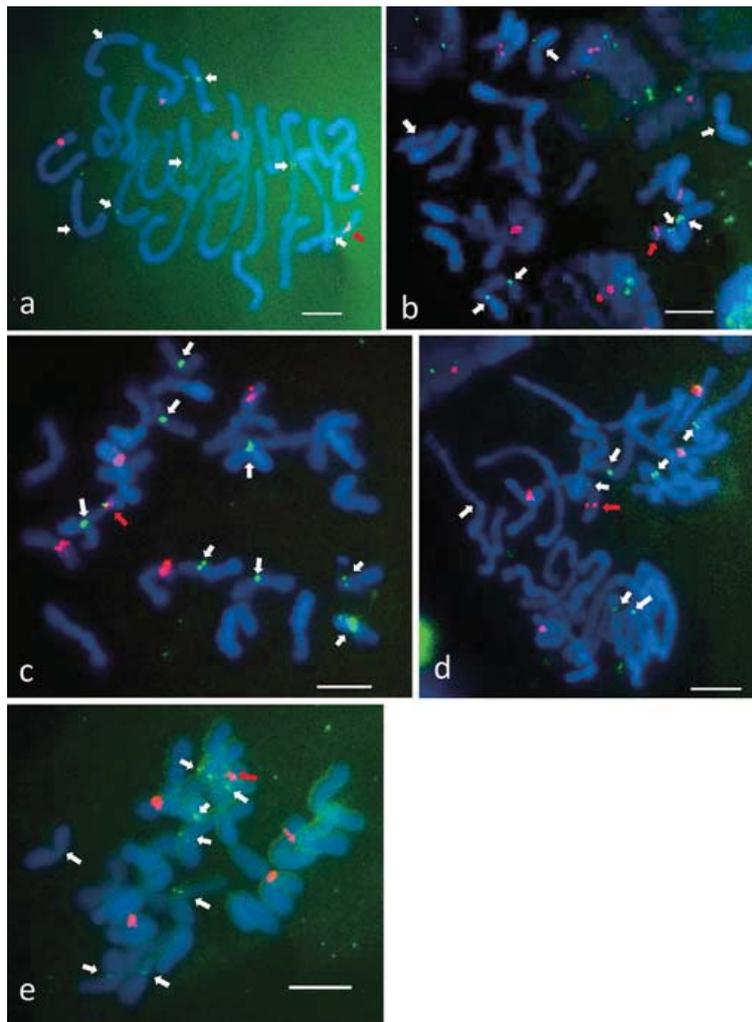


図2 ネギニラ体細胞染色体における FISH 法によるネギ動原体クローンと 5S rDNA の同時検出
 5S rDNA プローブがローダミンによる赤色蛍光色でネギ由来の 1 本とニラ由来の 4 本の染色体上に
 検出されている。動原体クローンはそれぞれ Afi11 (写真 a)、Afi19 (写真 b)、Afi54 (写真 c)、Afi
 56 (写真 d)、Afi61 (写真 e) を用い、FITC によって緑色蛍光色で検出された。a、b、d) 各動原体
 クローンが染色体の動原体部の 7 か所 (矢印) と 5 か所の介在部の合計 12 か所に検出されている。
 c、e) Afi54 および Afi61 クローンが動原体部の 8 か所 (矢印) と 5 か所の介在部の合計 13 か所に検
 出されている。写真 a~e の赤色矢印はネギ染色体上の 5S rDNA のシグナル。傍線は 10 μm 。

が、たとえばシロイヌナズナなどのように
 トランスポゾン配列が非常に多く分布する
 場合も知られており、ドラスティックな構
 造変化も起こっている可能性がある。しか
 し、ネギ属植物では他種で見られるよう
 なトランスポゾン様配列が見いだされてお
 らず、染色体分配と動原体配列の関係を
 考えれば、ネギ属に独特の減数分裂様式
 や生殖機構との関連についてより詳細な
 解析が必

要であると思われる。

2) ネギニラ薬側減数分裂期におけるネギ 由来染色体への紡錘系の付着

ネギニラ薬側減数分裂第一分裂の標本に
 対して α -チューブリン抗体を用いて紡錘
 系の検出を行ったところ、赤道に並んで
 いる染色体へは紡錘系の付着が観察され、
 周囲に散らばっている染色体へは紡錘系
 の付

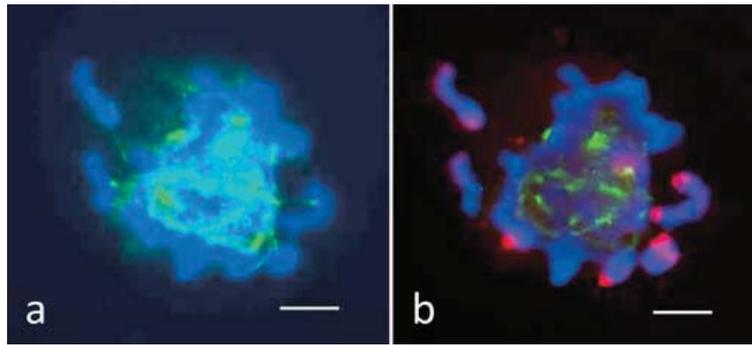


図3 ネギニラ葯側減数分裂第一分裂染色体における免疫染色による紡錘糸および GISH 法によるネギ全ゲノム DNA プローブの検出
a) ネギニラ葯側減数分裂期標本において α -tubulin 抗体を Alexa 488 によって緑色蛍光色で検出した像。
b) 写真 a の実験後、同一の標本に対してジゴキシゲニン標識したネギ全ゲノム DNA プローブを用いた GISH 実験を行い、ネギ染色体がローダミンによって赤色蛍光色で検出されている。傍線は 10 μ m。

着が両側であったり片側であったり、付着が見られなかったりとまちまちであった(図 3 a)。この標本に対してパラホルムアルデヒドによる再固定を行い、ネギ全ゲノム DNA プローブを用いて GISH 実験を行ったのが図 3 b で、紡錘糸の付着がまばらになっているのは赤色シグナルが検出されているネギ染色体であると確認できた。

以前の研究から、赤道に整列する二価染色体はニラ由来、周囲に分散している一価染色体はネギ由来であるとわかっており、赤道に整列できないネギ染色体は遅延染色体となり小核を形成することも明らかとなっているが¹³⁾、ネギ染色体への紡錘糸の付着についての詳細はよくわかっていない。一価染色体の分配様式としてはドロゼラ型であり、減数分裂第二分裂においてネギの一価染色体は正常に分裂する。分裂の様子を観察する限りでは、稔性をもつ植物種と大きな差異はみられないが、減数分裂第一分裂において一価染色体にも紡錘糸が付着して娘核へ誘導されることはわかっている。ネギニラの場合は、その付着の時期が大きくずれてしまい、小核を形成しやすい傾向にあると思われる。ネギ属種間雑種の

特徴として、どのような種の組み合わせであっても必ず稔性が失われてしまうが、種間雑種を人工的に複二倍体化することで全ての染色体が対合して二価染色体を形成できるようにしても、自殖種子は得られず放任受粉でのみわずかに種子形成が認められる程度である⁵⁾。

3) 交配実験によるネギニラ胚珠の稔性の検証

ネギニラでは花粉稔性が失われているが、雌側配偶子である胚珠の稔性を検証するために、開花後めしべが成熟したネギニラの花に両親種であるニラの花粉を人工的に交配する実験を行った。ネギ花粉の交配実験も望ましいが、ネギニラの開花時期は6月初旬～8月で、ネギは時期的に4月～5月下旬で合致しないので、開花時期が7月～8月のニラの方を花粉親に用いた。本研究で用いたネギニラ株は約10年間圃場で維持されており、周囲にネギやニラの株も栽培しているが、このような放任受粉が可能な環境でも今までに種子形成は全く見られなかった。一方、ニラ株の方は毎年種子形成が可能な稔性花粉である。

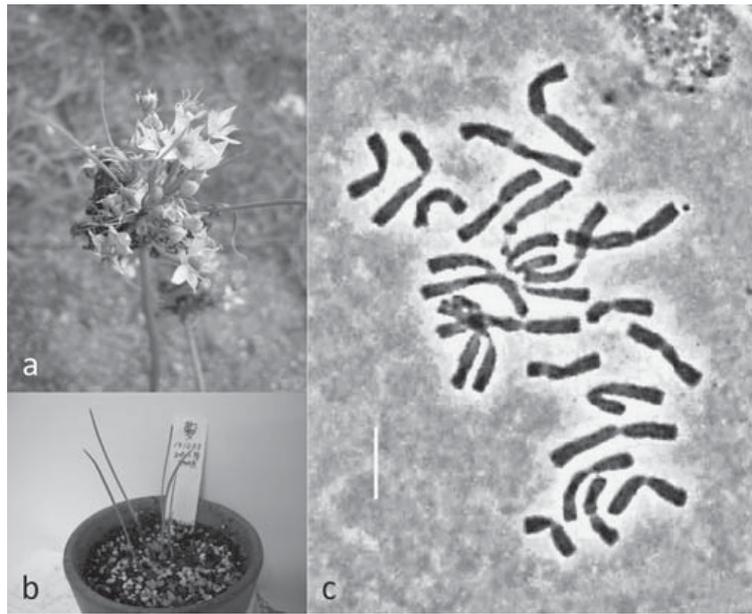


図 4 ネギニラの珠芽および染色体像

a) ネギニラ花序へニラ花粉を人工交配した後に、花托から発生した植物体 (珠芽)。b) 写真 a の珠芽の定植。c) 珠芽の根端分裂組織の押しつぶしによる染色体像。24 本の染色体が観察できる。写真 b の定植個体から発根した根端を採取して前処理、固定を行い押しつぶし標本を作製した。傍線は 10 μm 。

交配実験はニラの開花を待って7月中旬から8月中旬にかけて行った。交配を行った31花序のうち種子が形成された花は全く見られなかった。交配後1~2週間すると子房が膨らんで褐色を帯びてくるが、最終的には子房の充実に至らず全て枯死してしまった。しかしながら交配した花序のうちおよそ3割の花托から発芽が見られ、交配をしなかった別の花序の花托からも1割ほどの頻度で発芽した(図4a)。この発芽個体はネギ属に独特の珠芽とよばれるもので、花托から取り外して植木鉢に定植し(図4b)、根端を採取して染色体数を調べたところ、ネギニラの体細胞と同じ24本であることを確認した(図4c)。

ネギニラの栽培過程において珠芽の出現は一度も見られず報告もないことから、自然条件では起こらない現象であると言える。おそらく稔性花粉の交配により、ネギニラ柱頭へ花粉管の侵入が起こるなどの刺

激が加わり、生理的に珠芽が形成されたものと考えられる。珠芽を形成するネギ属植物には、ネギの一品種「やぐらネギ」やノビルがよく知られており、ニラも単為発生をおこしやすいアポミクシス植物であることが知られている^{18, 19)}。また、やぐら型はニラ²⁰⁾、タマネギ²¹⁾、ラッキョウ²²⁾でも存在することが紹介されている。ニラの珠芽ではその場で発育して先端で開花した「2階ニラ」が報告されているがその発生機序はよくわかっていない²³⁾。やぐら型ラッキョウについては、花の後にその珠芽を植え付けたところ、珠芽から発根が見られ株に成長したと報告されている²²⁾。ネギニラも外的刺激により無性生殖を容易に引き起こしたと考えられることから、ネギもニラも有性生殖を行うが、一般の植物よりも無性生殖を行う能力が強い独特の生殖システムを遺伝的に有していると言えるかも知れない。

ネギ属の雑種植物でほとんど稔性が失われる理由はまだ明らかではないが、今後も細胞レベルでの観察と分子細胞学的な解析によって染色体分配機構の異常の原因を究明していきたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、平成 25 年度関西福祉科学大学研究創成支援制度研究費および平成 22 年度～24 年度岡山大学資源植物科学研究所共同研究費の援助によって行われました。ここに深く感謝の意を表します。また、研究遂行にご協力とご助言を賜りました大阪教育大学 向井康比己教授ならびに実験材料と実験の一部にご協力いただきました岡山大学植物資源科学研究所 長岐清孝准教授および村田稔教授に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) 青葉高 (1979) 葉ネギとして利用できるセイタカネギ. 農耕と園芸 34(5) : 122-123.
- 2) 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. 栃木県農業試験場研究報告 43 : 87-94.
- 3) Nomura, Y., Oosawa, K. (1990) Production of interspecific hybrids between *Allium chinense* and *A. thunbergii* by in ovulo embryo culture. Japan J. breed. 40 : 531-535.
- 4) Nomura, Y., Makara, K. (1993) Production of interspecific hybrids between rakkyo (*Allium chinense*) and some other *Allium* species by embryo rescue. Japan J. breed. 43 : 13-21.
- 5) 金子和彦、岡藤由美子、松本理 (1996) 胚培養による *Allium fistulosum* と *A. cepa* の種間雑種の育成. 山口農業試験場研究報告 47 : 14-18.
- 6) Uemura, M., Sueyoshi, T., Shimomura, K. and Nakahara, T. (2006) Production of interspecific hybrids between *Allium fistulosum* L. and *A. macrostemon* Bunge through ovary culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 87 : 297-304.
- 7) 梅原三貴久、末吉孝行、下村克己、平島敬太、下田満哉、中原隆夫 (2007) ネギとアサツキの種間雑種作出とその特性について. 福岡県農業総合試験場研究報告 26 : 25-30.
- 8) 藤重宣昭、竹田金一 (2008) ニラとギョウジ

ヤニンニクの雑種植物体の育種方法. 特許出願番号 2008-176356、特許公開番号 2010-011817.

- 9) Shimonaka, M., Hosoki, T., Tomita, M. and Yasumuro, Y. (2002) Production of somatic hybrid plants between Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) and bulb onion (*A. cepa* L.) via electrofusion. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71(5) : 623-631.
- 10) Ohsumi, C., Kojima, A., Hinata, K., Etoh, T. and Hayashi, T. (1993) Interspecific hybrid between *Allium cepa* and *Allium sativum*. Theor. Appl. Genet. 85 : 969-975.
- 11) Peffley, E. B. and Hou, A. (2000) Bulb-type onion introgressants possessing *Allium fistulosum* L. genes recovered from interspecific hybrid backcrosses between *A. cepa* L. and *A. fistulosum* L. Theor. Appl. Genet. 100 : 528-534.
- 12) Yanagino, T., Sugawara, E., Watanabe, M. and Takahata, Y. (2003) Production and characterization of an interspecific hybrid between leek and garlic. Theor. Appl. Genet. 107 : 1-5.
- 13) 山本真紀 (2004) FISH 法によるネギ属植物減数分裂期の染色体機能ドメインの挙動解析. 関西女子短期大学紀要 13 : 77-84.
- 14) 藪野友三郎、木下俊郎、村松幹夫、三上哲夫、福田一郎、坂本寧男 (1987) 植物遺伝学. 朝倉書店 pp.1-238.
- 15) Earnshaw W. C. and Rothfield, N. (1985) identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. Chromosoma 91 : 313-321.
- 16) Nagaki, K., Yamamoto, M., Yamaji, N., Mukai, Y. and Murata, M. (2012) Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histon H3 antibody in *Allium*. PLOS ONE 7(12) : e51315.
- 17) Mukai, Y., Nakahara, Y. and Yamamoto, M. (1993) Simultaneous discrimination of the three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence in situ hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. Genome 36 : 489-494.
- 18) Kojima, A., Kozono, T., Nagato, Y. and Hinata, K. (1994) Non-parthenogenetic plants detected in Chinese chive, a facultative apomict. Breeding Science 44 : 143-149.
- 19) 中澤佳子、生井潔、小島昭夫、小林俊一、田崎公久、天谷正行 (2006) 四倍体ニラにおける単為発生性の遺伝様式. 育種学研究 8 : 89-98.

- 20) 木村彰 (2007) 越後の植物観察記 (その 4).
新津植物資料室年報 2006: 26-29.
- 21) 寺分元一 (1997) タマネギ - 主として鱗茎
形成を中心に. 植物の自然誌プランタ 51: 13-
17.
- 22) 南光重毅 (1997) ラッキョウ. 植物の自然誌
プランタ 51: 18-21.
- 23) 櫻井幸枝 (2006) ニラの奇形 (2 階ニラ). 新
潟県植物保護 40: 11.