

ネギの初期生育におけるヘテロシスに関する研究[†]

小原 隆由

(平成 22 年 8 月 23 日受理)

Heterosis for Seedling Growth in Bunching Onion (*Allium fistulosum* L.)

Takayoshi Ohara

目 次

I 緒 言	2	b 組合せ能力	18
II ネギ品種間 F ₁ の初期生育におけるヘテロシス と DNA マーカーに基づく遺伝的距離との関係	4	IV AFLP および SSR によるネギ連鎖地図の構築	19
1 材料および方法	5	1 材料および方法	19
a 品種間 F ₁ の初期生育量およびヘテロシス	5	a 植物材料	19
b 親品種の AFLP 分析と遺伝的距離の評価	5	b AFLP 分析	19
2 結果	5	c SSR 分析	20
a 品種間 F ₁ の初期生育量とヘテロシス	5	d CAPS 分析	20
b AFLP に基づく親品種間の遺伝的距離とク ラスタ分析	6	e 連鎖解析	20
c 遺伝的距離と F ₁ の初期生育量との関係	6	f 親のヘテロ接合性	20
3 考察	9	2 結果	20
a 品種間 F ₁ の初期生育量とヘテロシス	9	a AFLP 分析	20
b AFLP に基づく親品種間の遺伝的距離	11	b SSR および CAPS 分析	20
c 遺伝的距離とヘテロシスとの関係	11	c 連鎖地図	21
III ネギの初期生育量に関するダイアレル分析	12	d 親のヘテロ接合性	21
1 材料および方法	12	3 考察	21
2 結果	12	a 親のヘテロ接合性	21
a 親および F ₁ の初期生育量とヘテロシス	12	b 連鎖地図	23
b 移植時生体重のダイアレル分析	13	c マーカー分離比の歪み	24
c 移植 4 週後生体重のダイアレル分析	17	V ネギの初期生育量に関する QTL 解析	24
d 草丈のダイアレル分析	17	1 材料および方法	24
3 考察	17	a 植物材料および表現型調査	24
a 初期生育量の遺伝的特性	17	b QTL 解析	25
		c 遺伝効果の推定	25
		2 結果	25
		a 表現型	25

〒514-2392 三重県津市安濃町草生 360
野菜育種研究チーム

[†] 本論文は京都府立大学大学院生命環境科学研究科学学位審査論文 (平成 21 年 9 月) を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は、育種学研究 6, 11-19 (2004) ; 園芸学会雑誌 74, 68-77 (2005) ; *Euphytica* 144, 255-263 (2005) ; *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 78, 436-442 (2009) において発表した。

b	苗生体重の QTL	26
c	両側地図の比較による遺伝効果の推定	26
3	考察	26
a	初期生育量の QTL	26
b	ヘテロシスの遺伝的根拠	26
VI	総合考察	30
1	ネギ品種間 F ₁ におけるヘテロシス	30
2	遺伝的距離によるヘテロシス予測	30
3	初期生育量の遺伝	31
4	連鎖地図作成と QTL の検出	31
5	ヘテロシスの遺伝的根拠	31
6	ヘテロシスを利用したネギの F ₁ 育種	32
摘 要		33
引用文献		34
Summary		37

I 緒 言

ネギ (*Allium fistulosum* L. $2n=2x=16$) はユリ科 (Liliaceae) ネギ属 (*Allium*) に属する多年生草本であり, Japanese bunching onion, Welsh onion 等と呼ばれている。ネギ属にはネギの他, タマネギ (*A. cepa* L.), ワケギ (*A. × wakegi* Araki), ニンニク (*A. sativum* L.), リーキ (*A. ampeloprasum* L.), ニラ (*A. ramosum* L.) 等の重要な野菜が含まれる。ネギとタマネギは同じ *Allium* 属 *Cepa* 節に属する近縁の植物である (Hanelt, 1990)。また, ワケギはネギとタマネギの自然交雑による異質 2 倍体であることが知られている (田代, 1984)。

ネギの原産地は中国北西部と考えられている。原種と見られる野生ネギは発見されていないが, 極めて近縁な野生種 *A. altaicum* Pall. がモンゴルからシベリアにかけて自生している (Inden・Asahira, 1990; 熊沢・勝又, 1965)。ネギは耐寒性, 耐暑性とも強く, シベリアから熱帯アジアまでの幅広い気候で栽培が可能であるが, 特に生産が多いのは日本, 中国, 韓国および台湾等の東アジア諸国である。中国ではすでに紀元前からネギの栽培法や調理法を記した記載が認められ (熊沢・勝又, 1965), 中世にはヨーロッパにも伝えられている。我が国で最初の記述は「日本書紀」(720) に認められる。「本草和名」(918) にも記載があり, 平安時代にはすでに栽培されていたと見られる (青葉, 1982)。なお前述したように, ネギの英語での呼称は Japanese bunching onion とされることが多いが, 原産地や来歴を考慮する

と, Japanese を冠するのは必ずしもふさわしくないと考えられる。このため, 野菜茶業研究所においてはネギの英語表記を bunching onion としている。

現在の我が国において, ネギは周年に渡って生産・利用される最重要野菜の一つであり, 平成 20 年の作付面積は 23,000 ha, 生産量は 510,500 t である (農林水産省大臣官房統計部, 2010)。産出額 (平成 19 年度) は 1,385 億円で, 野菜ではトマト, イチゴ, キュウリに次いで 4 番目に多い (農林水産省大臣官房統計部, 2009)。ネギは, 土寄せによって軟白させた長い葉鞘部を利用する根深ネギと, 土寄せは行わず主に葉身部を利用する葉ネギに大別される。伝統的に, 関東以北では根深ネギが, 関西以西では葉ネギが多く利用されている。ネギの品種は, 我が国の多様な気象環境に適応した多くの地方品種に分化している。これらは形態的, 生態的な特性, 特に冬季の休眠性の違いに基づき, 加賀群, 千住群, 九条群の 3 群に分類され, これらが代表的な品種群として認識されている (Inden・Asahira, 1990; 熊沢・勝又, 1965)。加賀群は冬季に地上部が枯れ休眠するタイプで, 寒冷な北陸から東北, 北海道の積雪地帯に適応し, 根深ネギや葉ネギとして利用されてきた。夏が収穫期になるため, 夏ネギ型とも呼ばれる。加賀群の著名な在来品種として, 葉鞘部が極めて太く短い「下仁田」がある。千住群は冬季も緩やかに生育して休眠せず, 冬どり用の根深ネギとして関東地方で栽培されてきた。分けつが少なく, 土寄せによって長い葉鞘部を収穫できるため, 現在では全国各地で根深ネギとして生産されている。九条群は暖地に適応した品種であり, 冬季も休眠せずに成長を続ける。分けつが多く葉が柔らかいため, 主に関西から九州において葉ネギとして栽培されている。

我が国のネギ生産においては, 中国等からの安価な輸入品に対する競争力向上や, 担い手不足に対応するための収益性向上が重要な課題である。このため, 移植や収穫作業の機械化と, それによって可能となる規模拡大によって, 大幅な省力・低コスト化を図ることが求められている。近年, 育苗・移植作業に関しては, 連結ペーパーポット簡易移植技術が広く普及した他, セル成型苗の全自動移植技術がほぼ確立しており, 大幅な省力化が可能となっている (土屋, 1999; 白岩ら, 2006; 横山, 1996)。ネギは元来, 初期生育速度の遅い作物であり, 慣行の地床育苗では約 3 ヶ月かけて苗重 20~30 g, 葉鞘部直径 6~8 mm の大苗を育苗している。これに対し培地量が少なく育苗期間が限られるセルトレイ等を用いた育苗では, 通常播種後 7 週間, 苗重 1~2 g, 葉鞘部直径

1.5~2.5 mm の極めて小さい苗を移植している。このため、移植後の活着が乾燥や湿害等環境の影響を受けて不安定になりやすく、時に収量減に直結する場合がある。ネギの移植後の活着の安定性は、一般に苗が大きいほど良好である。市販のネギ 10 品種を用いてセル成形苗の活着について調査したところ、移植時の苗地上部重と移植後 1 週間における根部増加量との間には高い相関が認められた（小原ら、未発表）。このことから、セル成形苗の活着の安定性を高めるには、限られた育苗期間内により大きな生育を示す、初期生育の旺盛な品種を開発することが有効と考えられる。

従来に比べ初期生育の優れる品種を育成するにあたっては、一代雑種 (F_1) に現れる雑種強勢（ヘテロシス）を利用することが考えられる。ヘテロシスは、他殖性作物の F_1 育種において、最も有効に活用されている。トウモロコシの F_1 育種は 1930 年代以降米国でめざましい成果を上げ、20 世紀末までに 5~6 倍の収量増加を実現させた（Stuber, 1995）。その間には、優れたヘテロシスを示す両親の組合せを効率的に検定する方法や、より高いヘテロシスが現れるように親系統を改良する方法も工夫されてきた。20 世紀後半には、自殖性作物のイネにおいても F_1 育種の研究が進み、中国では高収量のハイブリッドライスが実用化され広く普及している。一方、我が国では戦後、ナス科、ウリ科等の果菜類やアブラナ科葉菜類を中心に野菜の F_1 育種が大きく進歩し、一部を除くほとんどの品目で優秀な F_1 品種が開発され普及している。しかし、野菜の F_1 育種は、トウモロコシやイネの場合と異なり、ヘテロシスを積極的に利用して収量の増加を図ろうとするものではなく、むしろ形態的特性や品質、病害抵抗性などの優良形質（特に優性遺伝子による形質）の集積や、収穫物の形状や品質の均一性を高める上で、極めて大きな効果を発揮してきた。

ネギと同じ *Allium* 属のタマネギにおいては、品種の F_1 化の歴史は比較的古い。細胞質雄性不稔性（Jones・Clarke, 1943）が報告されたアメリカを中心に F_1 品種が多く育成され、ヘテロシスの大きさや系統間の組合せ能力についても報告されている。我が国においても 1962 年に初めての实用 F_1 品種が発表されて以来、ほとんどのタマネギ実用品種が F_1 となっている。それに対し、ネギの F_1 化は遅く、1980 年代に細胞質雄性不稔性（馬上・上原, 1985 a）を利用した F_1 品種が初めて発表されたが、2000 年前後までは放任受粉品種（OP 品種）が主として栽培されていた。しかし、その後優良な F_1 品種の開発が進み、近年では産地で栽培される品種のほ

とんどを F_1 品種が占めるようになってきている。ただし、これまでネギが F_1 化されてきたのは、他の野菜においてと同様、生育や収穫物の均一性の向上が第一の目的であり、生育に現れるヘテロシスを積極的に利用しているものではない。また、ヘテロシスの大きさや組合せ能力等、ネギの F_1 育種にとって重要な情報はこれまでにほとんど収集されていない状況である。

一方、ネギの重要な育種目標として、上述した初期生育量の他、収量、病害抵抗性、晩抽性、品質等が挙げられる。これらの形質の大部分は量的形質であり、複数の量的遺伝子座（Quantitative trait loci : QTL）に支配されていることが想定される。近年、分子遺伝学的研究の進歩により、複数の遺伝子が関与する量的形質を DNA マーカー連鎖地図上へ位置づけることが可能になっている。重要な QTL に連鎖する選抜マーカーを利用したマーカー利用選抜（Marker-aided selection : MAS）は、今後の品種開発にとって極めて重要なツールとなると考えられる。しかし、ネギでは近縁種間の交雑和合性に関する研究や染色体に関する細胞学的研究は古くから行われてきたが、近年著しく発展した分子遺伝的研究については、他の植物種に比べて大きく遅れている。この原因として、ネギのゲノムサイズが 14.1 pg/1C（Labani・Elkington, 1987）あるいは 1.2×10^4 Mbp（Ricrochら, 2005）と著しく大きいことが挙げられる。また、世代時間が 1~2 年と長いことや、近交弱勢が著しく自殖系統を得るのが困難であることも、その原因の一つと考えられる。近縁のタマネギでは、近年になって、DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成が行われるようになったが（Kingら, 1998 ; Kuhlら, 2004 ; McCallumら, 2001 ; van Heusdenら, 2000）、ネギの連鎖地図は報告されていない。

以上のような背景に基づき、初期生育の優れるネギ F_1 品種の育成に資するため、ネギの初期生育量におけるヘテロシスについて遺伝・育種学的な基礎を明らかにすることを主たる目的として、以下の試験を行った。まず第 II 章では、ネギの初期生育においてどの程度のヘテロシスが現れるのか、また、どのような品種間・品種群間の組合せにおいて強いヘテロシスが現れるのかを把握するため、多くのネギ品種間で F_1 を作成し、初期生育量を評価した。同時に、DNA マーカーを用いて品種間の遺伝的距離を推定し、これに基づいてヘテロシスを予測することが可能か否かを検証した。次に第 III 章においては、ネギの初期生育量の遺伝について全体的な特徴を明らかにすること、また QTL 解析に用いる親系統選定

のための遺伝的情報を得ることを目的とし、9の自殖系統とそれらの片側総当たり交配F₁を用いたダイアレル分析を行った。第IV章では、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)、Simple sequence repeat (SSR)等のDNAマーカーを用いて、ネギの連鎖地図を初めて作成した。第V章においては、この連鎖地図を用いてQTL解析を行い、初期生育に関与するQTLを連鎖地図上に位置付けた。併せて、ネギの初期生育に現れるヘテロシスがどのような遺伝的メカニズムに基づいて発現しているのかを明らかにするため、個々のQTLの遺伝効果について推定を試みた。総合考察においては、得られた情報に基づき、ヘテロシスを利用したネギのF₁育種の可能性について考察を行った。

本論文を取りまとめるにあたり、京都府立大学大学院生命環境科学研究科教授平井正志博士には懇篤なご指導、ご助言ならびにご校閲を賜りました。ここに記して深甚なる感謝の意を表します。また、ご助言とご校閲の労を賜った京都府立大学大学院生命環境科学研究科教授三野真布博士ならびに佐藤茂博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の計画から試験の遂行、取りまとめに至るまで、農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所小島昭夫博士には、常に懇切丁寧なご指導と温かいご激励を賜りました。記して心から感謝を申し上げます。さらに、ダイアレル分析に関して貴重なご助言を賜った元東京大学大学院農学生命科学研究科教授鶴飼保雄博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、野菜茶業研究所旧葉根菜研究部ユリ科育種研究室の共同研究者の方々に多大なご指導とご協力を頂きました。野菜ゲノム研究チーム布目司博士、野菜育種研究チーム塚崎光博士には、AFLPおよびSSR分析について懇切なご指導とご支援を頂きました。さらに、企画調整部業務科(現研究支援センター)の技術専門員の皆様、旧葉根菜研究部ユリ科育種研究室の非常勤職員と依頼研究員の皆様には、圃場試験およびDNA実験の遂行に当たり欠かすことのできない多大なご支援を頂きました。ここに記して心よりの感謝を申し上げます。

II ネギ品種間F₁の初期生育におけるヘテロシスとDNAマーカーに基づく遺伝的距離との関係

ネギと同じ*Allium*属 *cepa* 節のタマネギにおいては、Jones・Clarke (1943)により細胞質雄性不稔性が報告

されて以来、収量等収穫期形質のヘテロシスや組合せ能力について多くの研究が行われている(Havey・Randle, 1996; Hosfieldら, 1977)。それに対しネギでは、雄性不稔系統を用いた少数のF₁において苗重や収量にヘテロシスが現れたことが報告されているが(馬上・上原, 1985b; Zhangら, 1995)、実用的な多くの組合せを用いてヘテロシスの程度や組合せ能力を評価した例はない。初期生育の優れたF₁品種の開発を行うにあたっては、生育初期におけるヘテロシスの程度や、多数の品種間・品種群間での組合せ能力についての情報を得る必要がある。

ヘテロシスは、優性効果の集積や超優性等、異なる遺伝子間で生じる相互作用によって発現すると考えられている(Stuber, 1995)。このため、理論的には同一種内であれば、両親の遺伝的距離が遠いものほど異なる遺伝子の数が増加し、遺伝子間相互作用の頻度も高くなるため、ヘテロシスが增大する可能性がある(Manjarrez-Sandovalら, 1997)。ヘテロシスを利用するF₁育種においては、組合せ能力の評価に最もコストと時間を要する。このため、トウモロコシ、イネ等を中心とする多くの作物において、種々の方法を用いて算出した遺伝的距離によってヘテロシスを予測しようとする試みがなされている。初期には、系統の系譜情報(Mollら, 1965)、形質の実測値(He, 1991; Prasad・Singh, 1986)、アイソザイム多型(Freiら, 1986)等に基づいて遺伝的距離が算出された。その後DNA多型が検出できるようになり、アイソザイムに比べより多くのマーカーが利用可能になった。RFLP(restriction fragment length polymorphism)(Barbosa-Netoら, 1996; Leeら, 1989; Smithら, 1990)、RAPD(random amplified polymorphic DNA)(Liuら, 1999; Xiaoら, 1996)等により算出した遺伝的距離とF₁の能力の間に有意な相関が認められる事例が多く報告されている。一方、AFLP法(Vosら, 1995)は、RFLP法に比べ操作が簡易であり、RAPD法よりも再現性が高いことから、種々の作物の連鎖地図作成等に幅広く利用されている(Jonesら, 1997; van Heusdenら, 2000)。Ajmone Marsanら(1998)は、トウモロコシのF₁の能力とAFLPに基づく遺伝的距離との関係を調査し、AFLP法ではRFLP法に比べてマーカー獲得効率が極めて高いこと、AFLPに基づく遺伝的距離とF₁の能力との間には有意な相関があったことを報告している。

本試験においては、まず第1に、ネギの初期生育においてどの程度のヘテロシスが現れるのか、またどのような品種間・品種群間の組合せで強いヘテロシスが得られ

るのかを把握するため、我が国で栽培される多様なネギの品種間で作成した F₁ の初期生育を詳細に評価した。第 2 に、ネギのヘテロシス予測の可能性を探るため、AFLP マーカーを用いて親品種間の遺伝的距離を推定し、F₁ の初期生育量およびそのヘテロシスとの関係について検討した。

1 材料および方法

a 品種間 F₁ の初期生育量およびヘテロシス

本実験では、代表的な放任受粉品種として千住群から 5 品種（‘元蔵’、‘錦蔵’、‘東京冬黒一本太’、‘西光’、‘金長 3 号’）、加賀群から 2 品種（‘下仁田’、‘松本一本太’）、九条群から 3 品種（‘越津’、‘九条太’、‘浅黄系九条’）および晩抽性の晩ネギから 1 品種（‘元春晩生’）、合計 11 品種を選定した（Table 1）。千住群内の総当たり交配により 10 組合せの F₁ を作成した他、千住群品種を片親とした品種群間の交配により 30 組合せの F₁ を作成し、計 40 組合せの F₁ を試験に供試した（Table 2）。初期生育量の評価は 8 反復乱塊法で行った。F₁ および親品種を、2000 年 3 月 21 日に、培土（ヤンマーナブラ野菜養土）を詰めた 200 穴セルトレイにセル当たり 1 粒播種し、発芽後トレイ下のアンダートレイ上に 3 リットルの培土（クレハ園芸培土）を敷き詰めて育苗した。移植時（播種 7 週間後、ステージ 1）に苗の根部を約 3 cm に切り揃えた後、1 区当たり 6 個体の生体重、草丈（盤茎部から最大葉の先端までの長さ）および根数（盤茎部から発生した主根の数）を調査し平均値を求めた。調査後の苗はビニルハウス内の地床に移植し（約 3500 本/a）、移植 4 週間後（ステージ 2）に同様の調査を行った。両親平均（mid-parent, MP）に対するヘテロシス、優れた方の親（better parent, BP）に対するヘテロシス、および移植時と移植 4 週間後の生体重に基づく相対生長率（RGR-fw (/day)）を次式により求めた。

ヘテロシス (MP) % = 100 × (F₁ 値 - MP 値) / MP 値
 ヘテロシス (BP) % = 100 × (F₁ 値 - BP 値) / BP 値
 RGR-fw = ln (W₂ / W₁) / (t₂ - t₁) ここで W₂, W₁ はそれぞれ計測日 t₂ (ステージ 2), t₁ (ステージ 1) における生体重。

b 親品種の AFLP 分析と遺伝的距離の評価

上述した 11 の親品種について、各品種の特性をよく示す代表的な 1~4 個体を自殖し、S₁ を得た。その S₁ 20 個体から得た等量の若い葉身を混合し、凍結乾燥後、Nucleon PhytoPure（アマシャムバイオサイエンス）

を用いて全 DNA を抽出した。AFLP 分析は Vos ら (1995) の方法に従い、AFLP Analysis System II（インビトロジェン）を用いて行った。全 DNA を Eco R I / Mse I の制限酵素組合せで切断後、アダプターをライゲーションした。予備増幅にはアダプター配列に 1 塩基を付加した Eco R I プライマー (E-A) および 2 塩基を付加した Mse I プライマー (M-CA) を用いた。PCR 反応は GeneAmp 9700（アプライドバイオシステムズ）を用い、94°C・30 秒、56°C・1 分、72°C・1 分を 1 サイクルとして 20 サイクル行った。選択的増幅には 3 塩基を付加した蛍光標識 Eco R I プライマー 8 種 (E-ACA, E-ACT, E-AGG, E-ACG, E-AAG, E-ACC, E-AGC, E-AAC) および 4 塩基を付加した Mse I プライマー 6 種 (M-CAGA, M-CAGT, M-CAGG, M-CAGC, M-CATG, M-CATC) を用いた。PCR 反応は 94°C・30 秒、65°C・30 秒、72°C・2 分を 1 サイクルとし、1 サイクル毎にアニーリング温度を 1°C ずつ下げて 10 サイクル行った後、94°C・30 秒、56°C・30 秒、72°C・1 分を 1 サイクルとして 23 サイクル行った。DNA シーケンサ (ABI PRIZM 377, アプライドバイオシステムズ) を用い、6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって増幅断片を検出した。11 品種間で多型を調査し、次式に従って遺伝的距離を算出した (Ajmone Marsan ら, 1998)。

$$GD(i, j) = 1 - \{2N(i, j) / [N(i) + N(j)]\}$$

ここで N(i, j) は品種 i と j に共通して存在する多型増幅断片の総数、N(i), N(j) はそれぞれ i と j に存在する多型増幅断片の総数。

また、求めた遺伝的距離に基づき系統解析ソフトウェア PHYLIP (Phylogeny influence package) version 3.6 (Felsenstein, 2005) を用いて群平均法 (UPGMA) によるクラスター分析を行った。

2 結 果

a 品種間 F₁ の初期生育量とヘテロシス

Table 1 および Table 2 に親品種と F₁ の初期生育量各形質の平均値およびヘテロシスの程度を示す。親品種の生体重には、移植時で 0.99~1.48 g、移植 4 週間後で 3.4~7.0 g の変異幅があった。F₁ の生体重は、移植時が 1.27~1.75 g、移植 4 週間後が 5.67~8.49 g であり、それぞれ MP 対比で -2~50% (平均 19%)、-3~70% (平均 21%) のヘテロシスが現れた。BP 対比でも、移植時が -13~49% (平均 10%)、移植 4 週間後が -10~46% (平均 10%) のヘテロシスを示した。生体重値に

ついて品種群内あるいは群間の組合せの傾向を見ると、千住群×晩ネギの平均値は他に比べ明らかに低かったが、その他では明確な傾向は認められず、大きい生体重を示す交配組合せは千住群×千住群、千住群×加賀群および千住群×九条群の組合せに広く散在していた。生体重のヘテロシスについては、MP 対比、BP 対比とも千住群×九条群の中に高いヘテロシスを示す組合せが比較的多く認められた。なお千住群×晩ネギの組合せである‘錦蔵’×‘元春晩生’(B×H)は供試した組合せ中で最も高いヘテロシスを示したが、両親品種の生育量が極めて小さいことから、生体重値自体は特に高くなかった。

草丈については、F₁におけるMP対比のヘテロシスは平均7% (移植時)～6% (移植4週後)であり、BP対比のヘテロシスとともに、生体重に比較してやや低かった。品種群別では、千住群×九条群の組合せの中に草丈の値およびヘテロシスが低い組合せが多かった。

根数については、親品種間には移植4週間後で12.0～17.7本と比較的広い変異幅が認められた。F₁は平均8% (移植時)～11% (移植4週後)のMP対比のヘテロシスを現した。根数に関しても、ヘテロシスが低い組合せは千住群×九条群に多かった。

RGR-fwの変異は、親品種間では4.42～5.72であったが、F₁の値は4.81～5.82と比較的差異の幅が小さかった。MP対比のヘテロシスは平均1%と低めであった。

Table 3に各形質の分散分析の結果を示す。生体重、草丈および根数においては、全系統間、親品種-F₁間、

親品種内、F₁内に1%水準で有意な変異が認められた。特に親品種-F₁間の分散は極めて大きかった。RGR-fwについては全系統間、親品種内の分散は有意であったが、親品種-F₁間、F₁内の分散は有意ではなかった。

b AFLPに基づく親品種間の遺伝的距離とクラスター分析

11品種のAFLP分析の結果、22のプライマー組合せで128の再現性のある多型が検出された (Table 4)。多型の検出された断片サイズは95～390 bpで、プライマー組合せ当たりの多型数は1～12であった。この128のAFLPに基づき親品種間の遺伝的距離を算出した (Table 2)。遺伝的距離の最小値は‘錦蔵’ (B)、『東京冬黒一本太’ (C)間の0.07、最大値は‘元春晩生’ (H)、『西光’ (D)間の0.56であった。遺伝的距離の値は同じ品種群に属する品種間では低く、異なる品種群に属する品種間では高い傾向にあった。この遺伝的距離をもとにUPGMA法によるクラスター分析を行った結果をFig 1に示す。デンドログラムは大きく3つのクラスターに分かれた。第1のクラスターはさらに、千住群の5品種を含むクラスターと、加賀群の2品種を含むクラスターに分けられた。第2のクラスターは九条群の3品種からなり、第3のクラスターは晩ネギのみからなっていた。

c 遺伝的距離とF₁の初期生育量との関係

Table 5にAFLPに基づく遺伝的距離とF₁の初期生育

Table 1 Seedling traits of parental cultivars.

Cultivar	Group	Fresh weight (g)		Plant height (cm)		Root number		RGR-fw × 100
		Stage 1 ^z	Stage 2 ^z	Stage 1	stage 2	Stage 1	Stage 2	
A Motokura	Senju	1.36 ab ^y	6.4 a	23.8 abc	34.2 a	9.8 ab	16.9 a	5.45 ab
B Kinzo	Senju	1.01 cd	4.8 ab	21.9 bc	31.4 abc	8.9 bc	15.3 abcd	5.52 ab
C Tokyo-fuyuguro-ipponfuto	Senju	1.39 ab	7.0 a	23.7 abc	35.0 a	9.9 ab	17.7 a	5.72 a
D Saiko	Senju	1.48 a	6.3 a	24.3 abc	35.1 a	10.5 a	17.2 a	5.19 ab
E Kincho 3 gou	Senju	1.41 a	5.8 a	24.0 abc	33.7 ab	10.3 a	15.8 abc	5.00 ab
F Shimonita	Kaga	1.35 abc	5.9 a	21.2 c	29.4 bc	10.2 a	16.8 a	5.26 ab
G Matsumoto-ipponfuto	Kaga	1.33 abc	6.0 a	23.6 abc	35.7 a	10.2 a	16.1 ab	5.31 ab
H Motoharu-bansei	Okunegi	0.99 d	3.4 b	21.5 bc	28.5 c	7.7 d	12.3 d	4.42 b
I Koshizu	Kujo	1.06 bcd	5.0 ab	24.1 abc	34.6 a	8.4 cd	13.3 bcd	5.37 ab
J Kujo-futo	Kujo	1.21 abcd	5.5 ab	25.1 ab	36.1 a	9.5 ab	12.5 cd	5.25 ab
K Asagikei-kujo	Kujo	1.19 abcd	4.7 ab	25.7 a	34.1 a	9.7 ab	12.0 d	4.90 ab

^z Stage 1: transplanting stage (seven weeks after sowing), Stage 2: four weeks after transplanting.

^y Different letters within columns show significant difference by Ryan's multiple range test at the 5% level.

Table 2 Means and heterosis of seedling traits in the 40 F₁s and genetic distances (GDs) among the parents based on 128 AFLPs.

Cross	Fresh weight						Plant height						Root number						RGR·fw × 100			Genetic distance (GD ^x)		
	Stage 1 ^z			Stage 2 ^z			Stage 1			Stage 2			Stage 1			Stage 2			Heterosis					
	Heterosis ^y			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis					
	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP		Mean	MP
	(g)	(%)	(%)	(g)	(%)	(%)	(cm)	(%)	(%)	(cm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Senju × Senju																								
A×B	1.46	24	8	5.78	4	-9	24.3	6	2	33.3	2	-2	11	12	7	17	8	3	4.91	-12	-12	0.165		
A×D	1.67	18	13	7.61	20	20	25.6	6	5	35.5	3	1	12	15	11	20	15	14	5.42	1	-2	0.209		
B×C	1.36	14	-2	6.73	14	-4	24.4	7	3	35.8	8	2	10	10	5	18	7	0	5.71	0	-2	0.065		
B×E	1.51	24	7	6.36	20	10	24.4	6	2	33.4	3	-1	10	9	2	17	11	9	5.14	-3	-8	0.197		
C×A	1.43	4	3	6.55	-2	-7	24.4	3	3	34.9	1	0	10	-3	-3	16	-7	-9	5.44	-4	-6	0.147		
C×D	1.43	0	-3	6.85	3	-2	23.9	0	-2	35.3	1	1	10	-2	-5	18	3	2	5.60	2	-3	0.181		
D×B	1.52	22	3	6.38	14	1	26.0	13	7	36.5	10	4	10	8	0	18	10	4	5.13	-5	-8	0.186		
D×E	1.75	21	19	8.49	40	34	26.5	10	9	39.2	14	12	11	10	9	18	9	5	5.64	10	8	0.211		
E×A	1.59	15	12	7.38	22	16	26.1	9	9	34.9	3	2	10	1	-2	17	6	3	5.49	4	0	0.206		
E×C	1.54	10	9	7.26	14	3	26.6	12	11	37.3	9	7	11	10	8	18	10	4	5.54	2	-4	0.167		
Mean	1.53	15	7	6.94	15	6	25.2	7	5	35.6	5	3	11	7	3	18	7	4	5.40	0	-4	0.173		
Senju × Kaga																								
A×F	1.61	19	19	7.09	16	12	23.9	6	1	32.1	1	-6	11	9	7	18	7	6	5.29	-2	-4	0.323		
A×G	1.71	27	26	7.11	15	12	24.5	3	3	34.3	-2	-4	11	13	11	18	12	9	5.09	-7	-8	0.282		
B×F	1.40	19	4	6.24	16	5	22.2	3	1	31.5	4	0	10	6	0	17	3	-1	5.34	-2	-4	0.304		
B×G	1.27	9	-5	6.25	16	4	23.8	5	1	35.1	5	-2	11	10	3	17	8	6	5.69	4	2	0.254		
C×F	1.50	10	8	7.39	14	5	22.9	2	-3	33.7	5	-4	11	5	4	18	2	0	5.70	3	-2	0.296		
C×G	1.45	7	5	6.32	-3	-10	23.0	-3	-3	31.8	-10	-11	11	5	4	18	9	4	5.25	-6	-9	0.260		
D×F	1.66	17	12	8.12	32	28	23.6	4	-3	35.3	9	0	12	11	10	19	14	13	5.68	8	7	0.338		
D×G	1.49	6	1	7.23	17	14	25.7	7	6	37.4	6	5	10	-2	-4	16	-2	-5	5.64	7	5	0.299		
E×F	1.64	19	16	7.67	31	30	23.9	6	0	32.6	3	-3	11	5	5	18	12	9	5.50	7	4	0.329		
E×G	1.47	7	4	6.69	14	11	23.4	-2	-2	34.5	0	-3	11	8	8	18	15	14	5.42	4	1	0.306		
Mean	1.52	14	9	7.01	17	11	23.7	3	0	33.8	2	-3	11	7	5	18	8	5	5.46	2	-1	0.299		

^zSee Table 1. ^yMP: heterosis over the mid-parent, BP: heterosis over the better parent.

^xGD(i, j) = 1 - [2N(i, j) / (N(i) + N(j))], where N(i, j) is the total number of polymorphic fragments common to cultivar i and j, and N(i) and N(j) are total number of polymorphic fragments present in i and j respectively.

Table 2 (continued)

Cross	Fresh weight						Plant height						Root number						RGR-fw × 100			Genetic distance (GD ^x)		
	Stage 1 ^z			Stage 2 ^z			Stage 1			Stage 2			Stage 1			Stage 2			Heterosis					
	Heterosis ^y			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis			Heterosis					
	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP	Mean	MP	BP		Mean	MP
	(g)	(%)	(%)	(g)	(%)	(%)	(cm)	(%)	(%)	(cm)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Senju × Okunegi																								
H×A	1.34	14	-1	6.13	25	-4	24.3	7	2	34.4	10	1	9	7	-4	16	8	-7	5.42	9	-2	0.471		
B×H	1.50	50	49	7.01	70	46	25.0	15	14	36.1	21	15	10	18	10	17	22	10	5.50	10	-1	0.424		
C×H	1.51	27	9	6.43	23	-8	25.0	10	6	34.2	8	-2	10	9	-3	16	5	-11	5.17	1	-11	0.426		
H×D	1.28	4	-13	6.21	27	-2	25.3	10	4	36.4	14	4	9	-5	-18	17	13	-3	5.64	17	8	0.559		
H×E	1.45	21	3	5.76	25	0	25.4	11	6	33.2	7	-1	11	18	3	17	22	8	4.93	4	-2	0.478		
Mean	1.42	23	9	6.31	34	6	25.0	11	6	34.9	12	3	10	9	-2	16	14	0	5.33	8	-2	0.472		
Senju × Kujo																								
A×I	1.45	20	7	6.61	17	4	24.9	4	3	35.4	3	2	10	10	2	16	9	-2	5.42	-2	-2	0.352		
A×J	1.57	22	16	6.96	17	10	25.0	2	0	35.5	1	-2	11	11	10	16	11	-4	5.31	-3	-4	0.356		
K×A	1.48	16	9	6.76	22	6	26.0	5	1	37.2	9	9	10	8	7	16	13	-3	5.43	4	-2	0.418		
B×I	1.42	38	34	6.01	23	21	25.7	12	7	34.9	6	1	11	22	18	15	6	-1	5.15	-7	-8	0.346		
B×J	1.48	33	22	6.98	36	27	25.3	8	1	37.3	11	3	10	11	8	16	17	7	5.54	1	-1	0.312		
K×B	1.39	27	17	6.60	38	37	26.1	9	1	37.4	14	10	10	7	3	16	18	5	5.56	6	0	0.379		
C×I	1.63	33	18	7.25	21	3	26.2	10	9	36.0	3	3	11	16	7	18	19	5	5.33	-6	-8	0.325		
C×J	1.51	16	9	7.22	15	3	25.0	3	0	36.8	4	2	10	5	4	17	16	-1	5.59	0	-4	0.304		
C×K	1.46	13	5	7.42	26	6	25.4	3	-1	37.8	9	8	10	6	4	17	15	-4	5.82	8	0	0.396		
D×I	1.58	25	7	6.76	20	7	27.5	14	13	36.3	4	3	11	12	1	18	18	5	5.19	-3	-6	0.325		
D×J	1.71	27	16	7.00	18	10	27.9	13	11	38.7	9	7	10	4	-1	15	4	-11	5.04	-5	-6	0.355		
D×K	1.72	29	17	7.69	39	21	28.6	14	11	40.4	17	15	12	15	11	18	25	6	5.35	5	3	0.457		
E×I	1.65	33	17	6.34	18	10	27.5	14	14	36.4	7	5	11	13	2	17	16	7	4.81	-9	-13	0.291		
E×J	1.58	20	12	6.89	22	19	26.3	7	4	37.8	8	5	11	9	5	15	9	-3	5.27	1	-2	0.258		
K×E	1.27	-2	-10	5.67	8	-2	24.3	-2	-5	36.7	8	8	9	-8	-11	15	10	-3	5.35	7	6	0.415		
Mean	1.53	23	13	6.81	23	12	26.1	8	5	37.0	8	5	10	9	5	17	14	0	5.34	0	-3	0.353		
Total mean	1.51	19	10	6.83	21	10	25.1	7	4	35.6	6	2	10	8	3	17	11	2	5.39	1	-2	0.309		

Table 3 Analysis of variance for seedling traits of 11 parents and 40 F₁ s.

Source	d.f.	Mean square						
		Fresh weight		Plant height		Root number		RGR-fw × 100
		Stage 1 ^z	Stage 2 ^z	Stage 1	Stage 2	Stage 1	Stage 2	
Total	407							
Blocks	7	1.61 **	114.4 **	88.96 **	335.13 **	2.54 **	107.99 **	21.17 **
Lines	50	0.23 **	6.4 **	19.10 **	41.67 **	4.86 **	21.40 **	0.52 *
Between parents and F ₁ s	1	4.64 **	116.5 **	176.95 **	320.86 **	53.76 **	305.06 **	0.23
Within parents	10	0.23 **	7.9 **	16.43 **	52.07 **	6.13 **	36.79 **	0.98 **
Within F ₁ s	39	0.12 **	3.2 **	15.74 **	31.84 **	3.29 **	10.19 **	0.41
Error	350	0.03	1.5	1.94	6.59	0.37	2.92	0.36

^z See Table 1.

*, **: Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

Table 4 Number of AFLP markers detected using a combination of *Eco*RI primers (E) with three selective nucleotides and *Mse*I primers (M) with four selective nucleotides and used for estimation of genetic distances among 11 cultivars.

Primer combination	E+	AAG	ACA	ACC	ACT	ACG	AGC	AGG
M+CAGA				5	3			6
CAGC				11	5		3	5
CAGC					9			
CAGC			4	10	6		4	
CAGC		2	12	6	7	2		3
CAGC			10	6		1		8
Total					128			

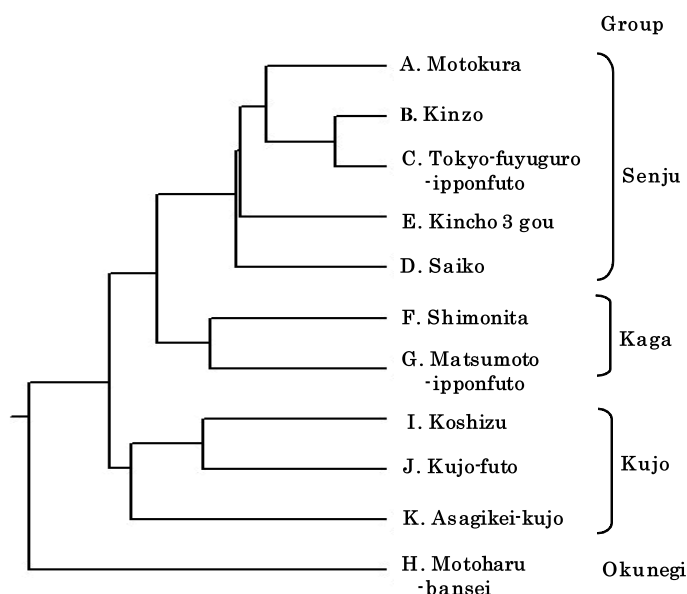


Fig. 1 A dendrogram of 11 bunching onion cultivars generated by UPGMA cluster analysis of genetic distance based on 128 AFLPs.

量各形質またはそのヘテロシスとの相関係数を示す。全ての F₁ によって相関を見た場合、移植 4 週間後の生体重、草丈、根数および RGR-fw に現れる MP 対比のヘテロシスと遺伝的距離の間に有意な正の相関が認められた。しかし、BP 対比のヘテロシスとの間の相関は有意でなかった。一方、千住群 × 千住群の組合せのみ

によって相関をとった場合は、移植時生体重においてのみ弱い相関が認められた。千住群 × 他品種群の組合せにおいては、移植 4 週間後の生体重、草丈および相対生長率において、遺伝的距離との間に有意な正の相関が認められた。Fig. 2 に比較的高い相関関係の認められた移植 4 週間後の生体重における MP 対比のヘテロシスと遺伝的距離の関係、および RGR-fw の MP 対比のヘテロシスと遺伝的距離の関係を示す。全 F₁ について見た場合、両形質のヘテロシスの遺伝的距離に対する回帰は有意であり、遺伝的距離が遠いほど MP 対比のヘテロシスの値は大きくなる傾向は認められた。しかし、同程度の遺伝的距離を示す組合せであっても、ヘテロシスの値にはかなり大きな幅があった。特に、千住群 × 千住群の組合せでは、10 組合せ中 9 組合せの遺伝的距離が 0.15~0.2 前後に集中していたが、それらの移植 4 週間後の生体重における MP 対比のヘテロシスは -2~40% と広い幅を示した。

3 考 察

a 品種間 F₁ の初期生育量とヘテロシス

ネギのヘテロシスに関する研究は極めて少ないが、雄性不稔系統を用いた数組合せの F₁ において、苗重や収量

にヘテロシスが現れたことが報告されている（馬上・上原, 1985 b; Zhang ら, 1995). 本研究においても, 異なる品種群に属する 11 の品種間で作成した F_1 を用いて初期生育を調査した結果, 多くの組合せで生体重, 草丈および根数の 3 形質にヘテロシスが現れることが明らかとなった. 特に生体重については最もヘテロシスが大きく, BP に対する移植時生体重のヘテロシスは 40 の F_1 組合せ中 34 組合せにおいて正の値を示した. 一方, RGR-fw については, BP 対比のヘテロシスが負の値を示す組合せが大部分であったことから, 不完全優性の形質であると考えられる.

また, 千住群×九条群の組合せには, 生体重, 草丈, 根数について高いヘテロシスを示す組合せが比較的高頻度に現れた. したがって, 初期生育の旺盛な F_1 育成のための材料として, 千住群×九条群の組合せは有望と考えられる. 一方, 各形質値の絶対値の高い組合せは, 千住群内, 群間の組合せに関わらず比較的ランダムに現れた. また, 千住群内の組合せのうち '西光'×'金長3号' (D×E) は移植 4 週間後の生体重が供試 F_1 中最も高く, ヘテロシスも高かった. これらのことから, ヘテロシスを高める遺伝変異は千住群内にも十分存在していると考えられる.

Table 5 Correlation coefficients (r) of genetic distance with seedling traits or heterosis in the F_1 s.

Trait	Whole set of crosses (n=40)			Senju × Senju (n=10)			Senju × other group (n=30)		
	Trait mean	Heterosis ^z		Trait mean	Heterosis		Trait mean	Heterosis	
		MP	BP		MP	BP		MP	BP
Stage 1 ^y									
Fresh weight	-0.14	0.18	0.06	0.64 *	0.26	0.71 *	-0.28	0.01	-0.18
Plant height	0.15	0.18	0.01	0.03	0.09	-0.03	0.24	0.36 *	0.17
Root number	-0.32 *	0.04	-0.19	0.45	0.18	0.28	-0.94 **	-0.12	-0.41 **
Stage 2 ^y									
Fresh weight	-0.16	0.46 **	0.13	0.29	0.26	0.46	-0.25	0.43 **	-0.10
Plant height	0.14	0.43 **	0.25	-0.26	-0.14	-0.24	0.22	0.63 **	0.42 **
Root number	-0.33 *	0.44 **	-0.17	0.33	0.25	0.49	-0.24	0.33	-0.25
RGR-fw ×100	-0.03	0.47 **	0.30	-0.25	0.22	0.10	0.04	0.61 **	0.34

^z See Table 2.

^y See Table 1.

*, **: Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

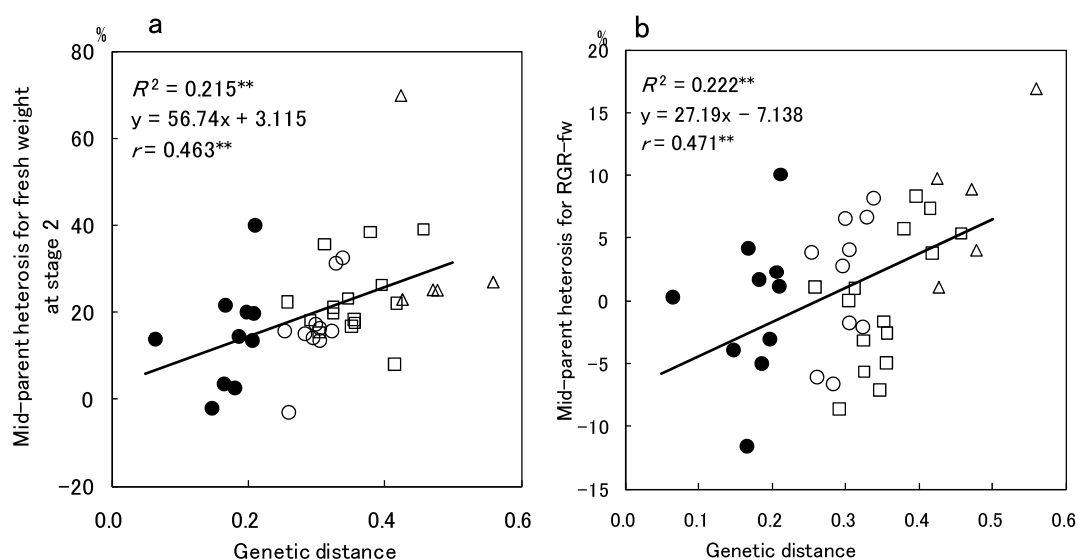


Fig. 2 Linear regression of mid-parent heterosis for fresh weight at four weeks after transplanting (a) and for RGR-fw (b) on genetic distance. ●, Senju × Senju; ○, Senju × Kaga; △, Senju × Okunegi; □, Senju × Kujo. **: Significant at the 1% level.

b AFLP に基づく親品種間の遺伝的距離

他殖性植物は品種内にヘテロ接合性を保持しているため、品種間の遺伝的距離を正確に推定するのは容易ではない。すなわち、品種毎に多数の個体を用いて各遺伝子座における遺伝子型を調査し、推定した各品種・各遺伝子座の遺伝子型頻度に基づいて遺伝的距離を求める必要があり、解析に多大な労力が必要である。本試験では、簡略化のため、数個体の葉を混合してマーカー遺伝子型を調査し、これを各品種の遺伝子型と仮定した。その代わりに、できるだけ多数の遺伝子座（128 AFLP）のデータを反映させることにより、推定精度を高めることとした。この方法で推定した遺伝的距離に基づくクラスター分析の結果（Fig. 1）は、形態・生態的特性に基づく従来の品種群分類（Inden・Asahira, 1990；熊沢・勝又, 1965）と極めて良く一致した。このことから、本試験で得た AFLP マーカーおよび遺伝的距離は、概ねネギ品種間の遺伝的な変異を反映しているものと考えられる。

AFLP はすでに多くの作物において品種や系統の分類や類縁関係の研究に利用できることが報告されている（Ellis ら, 1997；Goto-Yamamoto, 2000；Huh・Ohnishi, 2002）。本実験の結果から、ネギの DNA レベルでの品種群分類に AFLP マーカーが利用可能であることが示唆される。

c 遺伝的距離とヘテロシスとの関係

DNA マーカーに基づく遺伝的距離とヘテロシスの関係は多くの作物において検討されており、Smith ら（1990）は、トウモロコシ F_1 の収量のヘテロシスと RFLP 解析に基づく遺伝的距離との相関が高く、ヘテロシスの予測が可能であるとしている。しかし、本実験においては、移植 4 週間後の各形質の MP 対比のヘテロシスと AFLP による遺伝的距離との間に有意な相関が認められたものの、その相関は高くなかった。また、実用面で重要である BP 対比のヘテロシスについては、遺伝的距離との相関が概ね低かった。これらのことから、本試験で求めた遺伝的距離によってヘテロシスの高い組合せを評価することは難しいと考えられた。このことは、トウモロコシ（Ajmone Marsan ら, 1998；Godshalk ら, 1990）、コムギ（Barbosa-Neto ら, 1996）等における否定的な結果と一致している。遺伝的距離とヘテロシスの相関が高くなかった原因の一つとして、各形質のヘテロシスに直接関連する QTL（quantitative trait loci）と、供試した AFLP マーカーとの連鎖が少ないことが考えられる（Bernardo, 1992；Melchinger ら, 1990）。

各形質は比較的少数の効果の大きな QTL が支配している可能性があり、その場合、形質と連鎖していないランダムなマーカーが増えるほど、無用なマーカー数も増加するため、相関が低くなるのがコンピュータシミュレーションにより確かめられている（Charcosset ら, 1991）。これらのことから、ヘテロシスに関与する QTL に連鎖したマーカーを統計的な手法で選択して使用する試みもなされている（Liu ら, 2002；Zhang ら, 1996）。ただし、鶴飼（2002）は、連鎖不平衡が期待できない場合は、品種・系統間におけるマーカー遺伝子型と QTL 遺伝子型との関連は一定ではないため、ヘテロシスと高い相関を示すマーカーだけを選択して、予測精度を高めようとすることは意味がないとしている。

一方、本試験では、比較的高いヘテロ接合性を保持していると推定される放任受粉品種を親に用いているため、ヘテロシスに関与する QTL におけるヘテロ接合性は、各親により多様であると考えられる。このため、親品種自体において既に発現しているヘテロシスの程度もそれぞれの親で大きく異なると推察され、このことが F_1 における低い相関と関係している可能性がある。その場合、自殖によりヘテロ接合性を減少させた自殖系統間の F_1 を用いることにより、相関が向上する可能性が考えられる。

また、イネにおいて、亜種内（*indica*×*indica*）の交配では収量のヘテロシスと遺伝的距離の間に高い相関が得られるものの、亜種間の交配（*indica*×*japonica*）では相関が低いことが報告されている（Xiao ら, 1996；Zhao ら, 1999）。本試験の結果では、イネの亜種の結果とは異なり、千住群内の交配ではヘテロシスとの相関は低く、群間の交配では高い相関が認められた。一方、コムギでは親系統間の遺伝的多様性が小さかったことが相関の低い原因であると考察されている（Barbosa-Neto ら, 1996）。本試験における千住群内の親間の遺伝的距離は平均 0.17 と群間の平均 0.36 に比べて低く、遺伝的多様性は比較的小さいと見られることから、このことが千住群内における相関が低かったことの一因と考えられる。

以上のように、本試験では、AFLP マーカーに基づく品種間の遺伝的距離によりネギの初期生育に現れるヘテロシスの予測を行うことは難しいと判断された。近年では DNA マーカー解析法と QTL 解析法の進歩により、ヘテロシスに直接関与する QTL の検出が可能になっている。ネギにおいても、ヘテロシスに関与する個々の QTL を検出し、その遺伝効果を詳細に把握することが必要であろう。

Ⅲ ネギの初期生育量に関するダイアレル分析

前章において、ネギ品種間 F_1 の初期生育量には強いヘテロシスが現れることが確認され、初期生育の旺盛な F_1 品種育成の可能性が示された。ヘテロシスを効率的に利用するためには、初期生育についての QTL 解析を行い、それぞれの遺伝子座の効果を詳細に検討することが有効と考えられる。目的形質に関与する重要な QTL をできるだけ見逃さずに検出するためには、多くの異なる交配組合せについて解析を行う必要があるが、それには多大な労力を要する。このため、QTL 解析における交配親の選定においては、目的形質に関与する遺伝子型ができるだけ異なっている両親を選ぶのが一般的である。鶴飼 (2000 b) は、QTL 解析に先立ち、代表的な品種間で総当たり交配を行い、ダイアレル分析 (Hayman, 1954) によって量的形質の遺伝子型について全体的な様相を把握しておくことが有効であるとしている。

ダイアレル分析は、3 以上の品種・系統を同時に解析できる量的形質の遺伝解析手法であり、 F_1 という早い世代で解析が可能である。量的形質に関与する遺伝子の総体的な特性や遺伝様式を把握する上で、またヘテロシス育種において重要となる組合せ能力を評価する上で極めて有効な手法である。また、本手法を用いることで目的形質についての各親系統の遺伝子型を大まかに把握することができるため、QTL 解析に用いる交配親選定のための有用な情報を得ることができる。本試験では、初期生育における生体重や草丈についての遺伝的情報を得るため、ネギ 9 自殖系統を用いてダイアレル分析を行った。

1 材料および方法

ネギの代表的な放任受粉品種として、千住群から 4 品種 ('元蔵', '東京冬黒一本太', '西光', '金長 3 号'), 加賀群から 1 品種 ('下仁田'), 九条群から 3 品種 ('越津', '九条太', '浅黄系九条') および晩抽性の晩ネギ群から 1 品種 ('元春晩生') を選定した。各品種から代表的な 1 個体を選び、自殖を 2 回繰り返して得た合計 9 自殖系統をダイアレル分析の親に用いた (Table 6)。これらを親とした 9×9 片側ダイアレル交配による 36 組合せの F_1 と親系統、および標準品種 2 品種 ('元蔵', '夏扇 2 号') を供試し、2001 年 3 月 21 日播種、8 反復で試験を行った。培土 (ヤンマーナプラ野菜養土) を詰めた 200 穴セルトレイに、セル当たり 1 粒播種し、発芽後トレイ下のアンダートレイ上に 3 リットルの培土 (クレハ園芸

培土) を敷き詰めて育苗した。移植時 (播種 7 週後、ステージ 1) に苗の根部を約 3 cm に切り揃えた後、1 区当たり 8 個体の生体重と草丈 (盤茎部から最大葉の先端までの長さ) を調査し平均値を求めた。調査後の苗は、ビニルハウス内の地床に株間 5 cm、2 条植 (約 3,500 本/a) で移植し、移植 4 週後 (ステージ 2) に同様の調査を行った。ダイアレル分析の計算はコンピュータプログラム DIAL 98 (鶴飼, 1989) を用いて行った。両親平均 (MP) に対するヘテロシスは以下の式により求めた。

ヘテロシス (MP) % = $100 \times (F_1 \text{ 値} - \text{MP 値}) / \text{MP 値}$

初期生育量は種子サイズに強く影響を受け、大きい種子ほど発芽が早く初期生育量が大きい傾向にあることが、ネギ属のリーキ (Benjamin, 1984), トウモロコシ (Hawkins・Cooper, 1979), トマト (Pet・Garretsen, 1983), ダイコン (Smittle, 1982) 等、多くの作物で報告されている。本実験で供試した親および F_1 45 系統の種子重 (千粒重) には大きな差があったため (1.25~2.65 g), 初期生育量各形質と種子千粒重との相関関係を調べたところ、移植時生体重との間にのみ有意な正の相関が認められた (Table 7)。回帰分析の結果、移植時生体重の種子千粒重に対する回帰は有意であったことから (1%水準で有意, 決定係数 $R^2=0.175$), 移植時生体重は種子重に影響を受けていると考えられた。一般に種子重は採種母株の遺伝子型および栄養条件によって大きく影響を受ける。本実験では両親のどちら側を母株としたかによって、あるいは採種母株の栄養条件の差によって種子重に差が生じている可能性があり、これらがバイアスとなって、生体重に関与する他の重要な遺伝子の効果を分析できない可能性がある。そこで種子重の影響をできるだけ除くため、移植時生体重の種子千粒重に対する回帰直線 (回帰係数 $b=0.364$, 1%水準で有意) を用いて、各系統の生体重を以下の式によって補正し、ダイアレル分析に用いた。

生体重補正值 = 生体重測定値 + (全供試系統の千粒重平均値 - 千粒重) $\times 0.364$

2 結果

a 親および F_1 の初期生育量とヘテロシス

Table 8 に各形質の分散分析結果を示す。全ての形質において、全系統間、親系統- F_1 間、親系統内、 F_1 内の各分散は有意であり、特に親系統- F_1 間の分散は最も大きかった。Table 6 および Table 9 に親と F_1 の初期生育量各形質の平均値を示す。親の生体重は大きな変異幅を示し、有意差が認められた。 F_1 の生体重は、移

Table 6 Seedling traits of parental lines used in the diallel analysis.

Line	Source cultivar	Group	Fresh weight (g) ^z		Plant height (cm) ^z	
			Stage 1 ^y	Stage 2 ^y	Stage 1	stage 2
A	Motokura	Senju	1.44 bc	6.1 ab	23.6 d	31.7 de
C	Tokyo-fuyuguro-ipponfuto	Senju	1.57 ab	7.4 ab	26.0 bc	35.4 bc
D	Saiko	Senju	1.77 a	7.8 a	25.3 cd	34.3 bcde
E	Kincho 3gou	Senju	1.41 bc	6.6 ab	24.2 cd	35.0 bcd
F	Shimonita	Kaga	1.09 d	5.6 ab	21.5 e	31.1 e
H	Motoharu-bansei	Okunegi	1.32 c	7.4 ab	24.4 cd	32.4 cde
I	Koshizu	Kujo	1.27 cd	5.5 ab	27.4 ab	36.7 b
J	Kujo-futo	Kujo	1.27 cd	5.1 b	27.6 ab	35.6 bc
K	Asagikei-kujo	Kujo	1.33 c	7.8 a	29.0 a	43.0 a
Standard variety						
	Motokura (OP)	Senju	1.32	7.2	25.2	32.9
	Natsuohgi 2 (F ₁)	Senju	1.46	8.8	26.8	37.9

^z Different letters within columns show significant difference by Ryan's multiple range test at the 5% level.

^y Stage 1: transplanting stage (seven weeks after sowing), Stage 2: four weeks after transplanting.

Table 7 Correlation coefficients (r) between seed weight and seedling traits of 9 parents and 36 F₁s.

Seedling trait	Stage ^z	r
Fresh weight	Stage 1	0.418**
	Stage 2	0.247
Plant height	Stage 1	-0.003
	Stage 2	0.037

^z See Table 6.

** : significant at the 1% level.

植時が 1.49~2.05 g, 移植 4 週後が 8.6~14.7 g と幅広い値を示し, MP 対比でそれぞれ 6~49% (平均 27%), 34~104% (平均 60%) のヘテロシスが現れた. 一方, 草丈についても親の値には有意差が認められた. 草丈のヘテロシスは移植時で 1~19% (平均 11%), 移植 4 週後では 9~31% (平均 20%) と生体重に比べ小さかった.

b 移植時生体重のダイアレル分析

9×9 片側ダイアレル表の分散分析 (Jones, 1965) の結果を Table 10 に示す. 移植時の生体重は, a 項 (相加分散) が有意でなく, b 1 項 (平均的優性偏差) が有意に高かったことから, 相加効果よりも優性効果の役割が大きいことが示された. 優性分散のうち b 1 項のみが有意で b 2 項および b 3 項は有意でなかったことから,

Table 8 Analysis of variance for seedling traits of 9 parents and 36 F₁s.

Source	d.f.	Mean square			
		Fresh weight		Plant height	
		Stage1 ^z	Stage2 ^z	Stage1	Stage2
Total	359				
Blocks	7	1.04 **	85.61 **	44.73 **	170.23 **
Lines	44	0.33 **	37.32 **	40.70 **	202.27 **
Between parents and F ₁ s	1	7.40 **	988.91 **	488.76 **	2827.94 **
Within parents	8	0.31 **	8.87 **	42.52 **	100.72 **
Within F ₁ s	35	0.13 **	16.64 **	27.49 **	150.46 **
Error	308	0.04	2.15	1.54	5.23

^z See Table 6.

** Significant at the 1% level.

Table 9 Fresh weight, plant height and their midparent heterosis in 9 parents and 36 F₁ s.

Trait	Parent	A	C	D	E	F	H	I	J	K	Mean ^x	Mean ^w
Fresh weight at Stage 1 ^z (g)	A	<u>1.44</u> ^y	1.60	1.79	1.78	1.67	1.72	1.90	1.78	1.80	1.75	25
	C	6	<u>1.57</u>	1.84	1.79	1.61	1.66	1.49	1.73	1.85	1.69	16
	D	12	10	<u>1.77</u>	1.97	1.66	1.67	1.78	1.82	2.05	1.82	18
	E	25	20	24	<u>1.41</u>	1.64	1.72	1.71	1.86	1.98	1.80	30
	F	32	21	16	32	<u>1.09</u>	1.59	1.63	1.55	1.71	1.63	31
	H	25	15	8	26	32	<u>1.32</u>	1.59	1.61	1.80	1.67	24
	I	41	5	17	28	38	23	<u>1.27</u>	1.68	1.74	1.69	27
	J	32	22	20	39	32	24	32	<u>1.27</u>	1.94	1.75	31
	K	30	28	32	45	41	36	34	49	<u>1.33</u>	1.86	37
												1.74
Fresh weight at Stage 2 ^z (g)	A	<u>6.1</u>	9.2	9.4	9.1	9.3	10.6	11.4	11.4	13.3	10.5	65
	C	36	<u>7.4</u>	11.6	10.5	10.7	11.1	10.4	11.9	14.2	11.2	61
	D	35	53	<u>7.8</u>	10.9	10.2	11.1	10.9	11.1	14.7	11.2	44
	E	43	50	50	<u>6.6</u>	9.9	9.4	8.7	9.7	12.3	10.0	52
	F	58	65	41	61	<u>5.6</u>	9.7	9.6	9.5	12.1	10.1	63
	H	58	49	45	34	48	<u>7.4</u>	9.6	10.3	12.6	10.5	52
	I	96	61	42	42	72	48	<u>5.5</u>	8.6	11.0	10.0	61
	J	104	91	39	65	78	65	61	<u>5.1</u>	11.1	10.4	72
	K	92	86	49	70	80	66	65	73	<u>7.8</u>	12.7	73
												10.7
Plant height at Stage 1 (cm)	A	<u>23.6</u>	26.3	27.2	27.9	26.6	27.8	30.4	30.0	30.4	28.3	15
	C	6	<u>26.0</u>	27.1	27.5	26.6	27.0	28.2	30.2	30.8	28.0	9
	D	11	6	<u>25.3</u>	27.6	24.8	27.5	27.9	28.8	28.9	27.5	8
	E	17	10	12	<u>24.2</u>	26.0	24.5	29.2	30.3	30.1	27.9	12
	F	18	12	6	14	<u>21.5</u>	25.5	27.2	28.5	27.5	26.6	12
	H	16	7	11	1	11	<u>24.4</u>	27.9	30.6	30.6	27.7	11
	I	19	6	6	13	11	8	<u>27.4</u>	30.9	31.0	29.1	11
	J	17	13	9	17	16	18	13	<u>27.6</u>	30.9	30.0	14
	K	16	12	7	13	9	14	10	9	<u>29.0</u>	30.0	11
												28.3
Plant height at Stage 2 (cm)	A	<u>31.7</u>	36.4	37.7	38.7	33.9	38.1	42.5	43.0	46.6	39.6	18
	C	8	<u>35.4</u>	43.9	40.1	38.9	38.7	43.8	43.7	48.4	41.7	18
	D	14	26	<u>34.3</u>	42.8	37.3	42.3	43.0	45.7	48.3	42.6	23
	E	16	14	24	<u>35.0</u>	36.8	35.9	42.8	44.4	47.1	41.1	17
	F	8	17	14	11	<u>31.1</u>	34.1	40.0	39.0	40.6	37.6	13
	H	19	14	27	7	8	<u>32.4</u>	42.2	43.7	49.0	40.5	19
	I	24	22	21	19	18	22	<u>36.7</u>	46.2	48.2	43.6	22
	J	28	23	31	26	17	29	28	<u>35.6</u>	49.8	44.4	26
	K	25	23	25	21	10	30	21	27	<u>43.0</u>	47.2	23
												42.0

^z See Table 6.^y On the diagonal with underline; average for parent.Above the diagonal; F₁ average.

Below the diagonal; midparent heterosis (%).

Midparent heterosis (%) = (F₁ - MP) × 100 / MP,where F₁ represents the F₁ value and MP represents the midparent value.^x Mean of F₁ averages for each parent.^w Mean of midparent heterosis for each parent.

Table 10 Analysis of variance for seedling traits in 9×9 half diallel tables.

Source	d.f.	Mean square			
		Fresh weight		Plant height	
		Stage1 ^z	Stage2 ^z	Stage1	Stage2
Block	7	0.31	18.8	4.9	275.1
a	8	0.56	50.7 **	134.8	630.6 *
b	36	0.28	34.3 **	19.9	107.2
b1	1	7.39 **	989.0 **	490.0 *	2831.7 **
b2	8	0.17	10.1	7.5	62.0
b3	27	0.05	6.2	6.1	19.7
Error	308	0.45	14.3	120.5	276.7

^z See Table 6.

*, **: significant at the 5, 1% levels, respectively.

Table 11 Analysis of variance of $W_r - V_r$ for seedling traits in half diallel tables.

Source	Fresh weight				Plant height			
	Stage1 ^z		Stage2 ^z		Stage1		Stage2	
	(Set A) ^y		(Set B)		(Set C)		(Set D)	
	d.f.	MS	d.f.	MS	d.f.	MS	d.f.	MS
Array	6	0.00105	6	7.001	8	3.983	7	59.55
Error	49	0.00085	49	6.796	63	2.002	56	31.72

^z See Table 6.^y Set A: 7×7 sub-diallel crosses where the parents C and K were excluded.Set B: 7×7 sub-diallel crosses where the parents A and K were excluded.Set C: 9×9 diallel crosses.Set D: 8×8 sub-diallel crosses where the parent F was excluded.

Table 12 Genetic parameters estimated for each seedling trait.

Parameter		Fresh weight		Plant height	
		Stage1 ^z	Stage2 ^z	Stage1	Stage2
		(Set A) ^y	(Set B)	(Set C)	(Set D)
Additive variance	D	0.041	0.907	5.144	11.21
Dominance variance	H1	0.093	8.702	7.008	44.06
	H2	0.086	8.439	6.252	39.43
Average degree of dominance	$\sqrt{H1/d}$	1.500	3.097	1.167	1.982
Average direction of dominance	h	0.609	6.416	5.185	13.64
Heritability (broad sense)		0.917	0.911	0.966	0.972
Heritability (narrow sense)		0.333	0.216	0.650	0.559
Correlation between $V_r + W_r$ and P_r		-0.814 *	-0.938 **	-0.833 **	-0.958 **
Selection limit (max)		1.86	8.14	31.5	43.3

^z See Table 6.^y See Table 11.

*, **: significant at the 5, 1% levels, respectively.

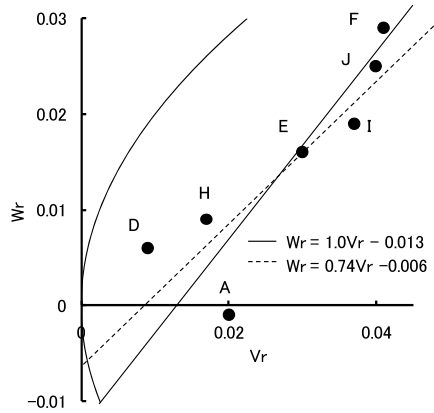


Fig. 3 Vr/Wr graph for fresh weight at transplanting stage in a set of 7×7 sub-diallel crosses where the parents C and K were excluded.

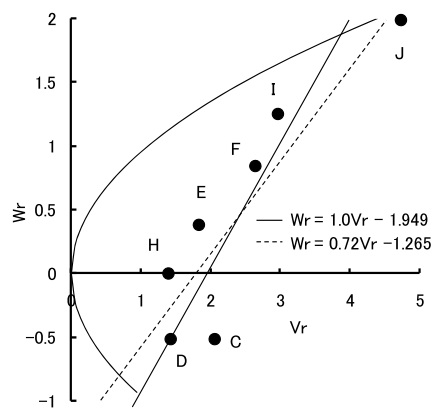


Fig. 4 Vr/Wr graph for fresh weight at 4 weeks after transplanting in a set of 7×7 sub-diallel crosses where the parents A and K were excluded.

平均的に親と F_1 には大きな差が存在するが、その差のうち特定の親や特定の組合せに依存する部分はそれほど大きくないことが明らかとなった。次に V_r (片親を共通とした r 番目の系列の分散) と W_r (r 番目の系列の F_1 と非共通親との共分散) の関係について検討した。 V_r/W_r グラフの回帰直線の傾きが1より著しく低い場合には、非対立遺伝子間の相互作用 (エピスタシス) が存在している可能性があり、このような場合は回帰直線から特に離れて位置する親を除いて再度分析することが行われる (Dwivedi ら, 1980; 濃沼・望月, 1986)。本実験においては、全ての親を用いた 9×9 ダイアレルで分析した場合に回帰直線の傾きが0.62と低かったため、回帰直線から離れて位置していた親 C 系統および K 系統を分析から除き 7×7 ダイアレルとしたところ、回帰直線の傾きが0.74となり1に近づいた (Fig. 3)。さら

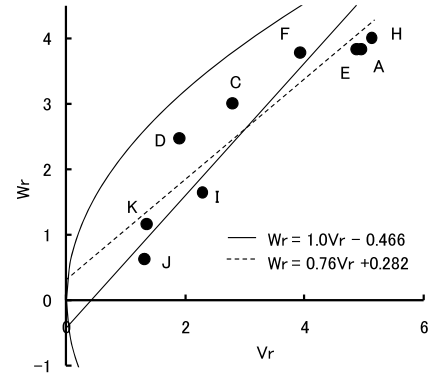


Fig. 5 Vr/Wr graph for plant height at transplanting stage in a set of 9×9 diallel crosses.

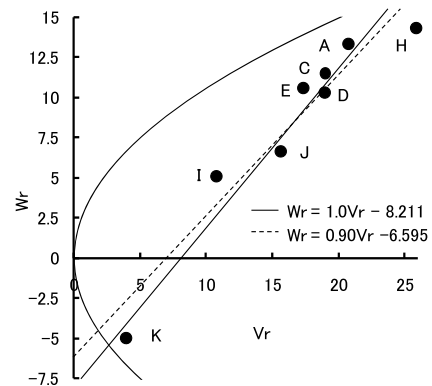


Fig. 6 Vr/Wr graph for plant height at four weeks after transplanting in a set of 8×8 sub-diallel crosses where the parent F was excluded.

に、この 7×7 ダイアレルについてエピスタシスの有無を検定するため、武田・金谷 (1995) と同様の方法で $W_r - V_r$ の均一性に関する分散分析を行った (Table 11)。 $W_r - V_r$ は親系列間で有意性を示さなかったことから、エピスタシスのない相加・優性の遺伝モデルに適合していることが示された。一方、 V_r/W_r グラフにおいては、傾きを1とした回帰直線の W_r 軸切片の値から平均優性度を推定できる。Fig. 3において、回帰直線の傾きを1とした場合の W_r 軸切片は負の値を示したことから、移植時生体重は超優性の形質であることが示された。また、 V_r/W_r グラフにおいて左下方に位置する点は優性対立遺伝子を多く持つ親に相当し、逆に右上方に位置する点は劣性対立遺伝子を多く持つ親に相当する。Fig. 3から、A および D 系統 (千住群由来) が移植時生体重について優性遺伝子を多く持ち、I, J 系統 (九条群由来) および F 系統 (加賀群由来) が劣性遺伝子を多く持つことが示された。 7×7 ダイアレルとして遺伝パラメーターを推定した結果を Table 12 に示す。広義の遺伝率

は0.92と高かったのに対し狭義は0.33と低かったことから、優性効果の寄与が大きいことが示された。また、平均優性度が1より大きい値(1.50)を示したことから、移植時生体重は超優性の形質と言える。Pr(親の値)と V_r+W_r の相関は有意な負の相関($r=-0.81$)を示したことから、大部分の優性遺伝子は正方向、すなわち生体重を高める方向に作用すると考えられる。また、 V_r+W_r のPrに対する回帰から、完全優性親の値、すなわちダイアレル交配の後代から得られる純系の遺伝子型値の最大値(選抜限界)を推定したところ、移植時生体重の選抜限界は1.86(g)と推定された。

c 移植4週後生体重のダイアレル分析

移植4週後の生体重については、ダイアレル表の分散分析におけるa項(相加分散)、b項(優性分散)、b1項(平均的優性偏差)が有意であり、特にb1項は極めて大きかった(Table 10)。 V_r/W_r グラフを検討したところ、9×9ダイアレルでは回帰直線の傾きが0.07と著しく1より低かったため、回帰直線から特に離れて位置していたAおよびK系統を除いて再分析を行った。その結果回帰直線の傾きが0.72となり(Fig. 4)、また W_r-V_r の均一性についての分散分析結果も有意でなかったことから(Table 11)、エピスタシスのない遺伝モデルに適合していると思なせた。 V_r/W_r グラフにおいては、傾きを1とした回帰直線の W_r 軸切片が負の値を示した。また、移植時に比べ、平均優性度は3.1と極めて高く、狭義の遺伝率は0.22と極めて低かったことから(Table 12)、移植4週後の生体重も超優性を示す形質であり、その程度は移植時よりも大きいと考えられた。Prと V_r+W_r の間には有意な負の相関が認められたことから、優性遺伝子の大部分は正方向に作用すると考えられた。また、 V_r+W_r のPrに対する回帰から選抜限界は8.14(g)と推定された。Fig. 4上の点の位置から、CおよびD系統(千住群由来)は優性遺伝子を多く有し、逆にJ系統(九条群由来)は劣性遺伝子を多く有すると推察された。

d 草丈のダイアレル分析

草丈についても、移植時、移植4週後ともにダイアレル表の分散分析におけるb1項が大きく、それに比較してa項は低かった(Table 10)。移植時については、9×9ダイアレルのままで回帰直線の傾きは1に比較的近く(Fig. 5)、 W_r-V_r の均一性についての分散分析で有意性が認められなかったことから(Table 11)、エピ

スタシスの影響は小さいと考えられた。一方、移植4週後の草丈については、9×9ダイアレルのままでは親系列間の W_r-V_r に有意な差があり、エピスタシスの存在する可能性が示唆された。そこで他の親系列の W_r-V_r と最も差のあったF系統(加賀群由来)を除いて8×8ダイアレルとしたところ、系列間の差が有意でなくなり(Table 11)、また、 V_r/W_r グラフの回帰直線の傾きが1に近づいたことから(Fig. 6)、エピスタシスのない遺伝モデルに適合していると思なせた。平均優性度は移植時が1.17、移植4週後が1.98を示したことから(Table 12)、草丈もやはり超優性の形質であり、その程度は移植時よりも移植4週後の方がやや大きいと見ることができる。一方、狭義の遺伝率はそれぞれ0.65、0.56と生体重の場合に比べ高い値を示したことから、生体重に比べると相加的遺伝効果の寄与も大きいと考えられる。Prと V_r+W_r の間には有意な負の相関があり、優性遺伝子の作用は正方向、すなわち草丈を高める方向に働くと考えられた。選抜限界は移植時草丈が31.5(cm)、移植4週後草丈が43.3(cm)と推定された。 V_r/W_r グラフ(Fig. 5, Fig. 6)から、I, J, K系統(九条群由来)は優性遺伝子を多く有し、A, E系統(千住群由来)、H系統(晩ネギ由来)は劣性遺伝子を多く有すると推察された。

3 考 察

a 初期生育量の遺伝的特性

収量や収穫物のサイズ等収穫期の諸形質についてのダイアレル分析の適用例は、イネ(Murai・Kinoshita, 1986)、ダイズ(高木ら, 1990)、ダイコン(Iwataら, 2000)等幅広いが、初期生育に関する形質についての適用は少ない。大潟ら(2002)は5系統のテンサイを用いて草丈等に関するダイアレル分析を行い、生育初期の草丈および葉数は優性効果による分散が極めて大きく、超優性を示すことを報告している。本実験においてネギの9自殖系統を用いてダイアレル分析を行った結果でも同様に、初期生育における生体重、草丈の2形質は優性効果が大きく、超優性を示すことが確認された。特に生体重については優性効果の役割が相加効果に比べ極めて高いことが明らかとなった。このことから、初期生育が旺盛で、特に苗重が速く増加するネギ品種の育成には、高い優性効果を最も効率よく利用できる F_1 育種法が有効であると考えられる。また、移植時の草丈を除く3形質においては、優性遺伝子をホモに集積することが可能となった場合の完全優性親の推定値(選抜限界)に比べ、

より高い値を示す F₁ が複数認められることも、F₁ 育種の有効性を示す重要な証拠である (Table 9, Table 12).

ネギの実用品種はこれまで放任受粉品種が主であったが、最近になって雄性不稔性を利用した F₁ 品種が多く発表されるようになった (社団法人日本種苗協会, 2009). しかし、これまでに発表された F₁ 品種は、主に生育や収穫物の均一性が育種目標であり、生育の旺盛さを主目的として育成されたものではない。本実験におけるヘテロシス (MP 比) は、移植時生体重で最大 49%, 移植 4 週後生体重で最大 104% と大きい値を示した。また、同時に栽培した放任受粉品種 ‘元蔵’ と比較した標準ヘテロシス (ヘテロシス (標準品種比) % = 100 × (F₁ 値 - 標準品種値) / 標準品種値) として算出) は、それぞれ最大 55%, 104% と高く、また F₁ 品種 ‘夏扇 2 号’ と比較した場合でも 40%, 67% の強勢を示しており、実用的に見ても高いヘテロシスレベルといえる。今後、ヘテロシスをより積極的に利用することで、旺盛な初期生育を示す F₁ 品種を育成することが期待できる。

一方、ヘテロシスの発現にはしばしばエピスタシスが大きく関与するとされている (Jinks・Jones, 1958). 今回、相加・優性の遺伝モデルに適合しなかったために生体重の分析から除外した K 系統 (九条群由来) は、F₁ の平均値、ヘテロシス平均ともに全親系統中最も高かった (Table 9). この原因のひとつはエピスタシスによるものと推察され、ネギの F₁ 育種においてもエピスタシスを重要な要因として利用できる可能性がある。

また本実験では、A, C, D 系統等千住群由来の系統は初期生育において生体重を高める優性遺伝子の頻度が高いこと、逆に、I, J, K 系統等九条群由来の系統は草丈を高める遺伝子の頻度が高いことが確認された。このことは、これらの品種群が分化してきた過程、すなわ

ち葉鞘部を食用とする根深ネギ用の千住群においては葉鞘部の肥大性に着目した選抜が、葉身部を食用とする葉ネギ用の九条群においては葉の伸長性に着目した選抜が、長期にわたって行われてきたことと関係していると想像できる。なお、移植 4 週後草丈の解析から除外した F 系統は、葉鞘部が極めて太く短い特徴がある地方品種 ‘下仁田’ に由来する系統である。F 系統を併せて解析した場合に相加・優性の遺伝モデルに適合しなかった理由として、F 系統の有する短葉鞘の遺伝子は他系統の有する草丈に関与する遺伝子群とは別であり、これが移植 4 週後の草丈に強い影響を与えていたことが考えられる。

b 組合せ能力

F₁ 育種においては、組合せ能力の優れた親系統を選定することが最も重要な課題である。Table 13 に組合せ能力に関する Griffing (1956) の分散分析結果 (変量モデル) を示す。各形質とも一般組合せ能力 (GCA) が有意であり、特定組合せ能力 (SCA) の分散はそれに比べ小さかったことから、ネギの初期生育のヘテロシスは、相対的に SCA よりも GCA が重要と見ることができる。一般に GCA は SCA よりも相対的に重要であり、特に遺伝変異に富んだ親間の交配では GCA の重要性が高い傾向があるとされている (鶴飼, 2002). 本実験では遺伝的に離れた親系統を使用していることもあり、SCA に比べ GCA が大きかった可能性もある。これらより、幅広いネギ系統を用いた F₁ 育種では、まずトップ交配等によって高い GCA を持つ親系統を選定した後、それらの間での SCA を検討することで、初期生育について十分なヘテロシスを発現する F₁ を効率的に得ることができると考えられる。

千住群を片親とした組合せを考えた場合、九条群との

Table 13 Analysis of variance for general and specific combining abilities in 9 × 9 half diallel tables.

Source	d.f.	Mean square			
		Fresh weight		Plant height	
		Stage1 ^z	Stage2 ^z	Stage1	Stage2
GCA	8	0.43 **	52.0 **	99.8 **	591.8 **
SCA	27	0.05	6.2	6.1	19.7
Block	7	0.30	25.2	6.0	277.3
Error	245	0.48	16.1	124.9	298.0

^z See Table 6.

** : significant at the 1% level.

系統間 F_1 が高いヘテロシスを示す傾向にあった (Table 9). 初期生育の旺盛な F_1 育成のための親系統を探索していく上で、この品種群間の組合せは極めて有望と考えられる。また、千住群の品種と九条群の品種は初期生育に関する遺伝子型が大きく異なることが示されたことから、この組合せは初期生育に関する QTL 解析の親として最も適切と考えられる。

IV AFLP および SSR による ネギ連鎖地図の構築

近年、DNA マーカー技術と QTL 解析手法の進歩により、複数の遺伝子が関与する量的形質を DNA マーカー連鎖地図上へ位置づけることが可能になっている。重要な QTL に連鎖する選抜マーカーを利用したマーカー利用選抜 (Marker-aided selection : MAS) は、品種開発にとってすでに極めて重要なツールになりつつある。しかし、ネギの分子遺伝に関する研究は、世代時間が長いこと、近交弱勢が著しいこと、ゲノムサイズが著しく大きいこと等の理由で遅れている。

ネギと同じ *Allium* 属 *cepa* 節に属するタマネギ (*A. cepa* L.) では、近年分子遺伝学的研究が進みつつある。King ら (1998) は、タマネギの自殖系統間 F_2 を用い RFLP による連鎖地図を構築した。この地図は、その後、タマネギの乾物重や辛み成分等の QTL 解析に利用されている (Galmarini ら, 2001)。しかし、RFLP は多量の高純度 DNA が必要である上、ゲノムサイズが大きいネギ類においてはバックグラウンドの影響により解析結果が複雑となる等、連鎖地図作成のマーカーとしては利用しにくい。一方、AFLP 法 (Vos ら, 1995) は、RAPD 法に比べ再現性が高く、比較的容易に多数のマーカーを作成できることから、高密度連鎖地図の作成に適していることが報告されている (Becker ら, 1995 ; Wang ら, 1997)。本法はコアプライマーに付加する選択塩基の数を増やすことで、ゲノムサイズの大きい植物にも適用することができる (Han ら, 1999)。van Heusden ら (2000) は、ネギの近縁野生種である *A. roylei* とタマネギの種間交雑 F_2 を用い、AFLP による連鎖地図を構築した。また、同じ *Allium* 属のニンニク (*A. sativum* L.) においても、AFLP を用いた低密度連鎖地図が作成されている (Ipek ら, 2005)。他方、SSR は、マイクロサテライトとも呼ばれ、数塩基からなる単純反復配列を利用した共優性の DNA マーカーである。ゲノム中に比較的偏りなく多数含まれていること、

多型性が高いこと、PCR により容易に解析可能であること等から、極めて利用価値の高いマーカーとして近年様々な植物で利用されている (Jones ら, 1997 ; Nunome ら, 2003)。近年、タマネギやネギにおいても、ゲノムあるいは EST 由来の SSR マーカーが多数開発されるようになった (Fischer・Bachmann, 2000 ; Kuhl ら, 2004 ; Martin ら, 2005 ; Song ら, 2004 ; Tsukazaki ら, 2007, 2008)。

本章では、ネギの初期生育量に関する QTL 解析に利用することを目的とし、ネギの連鎖地図作成を初めて試みた。利用する DNA マーカーとして、第 II 章において品種間の多型を効率よく獲得することが可能であった AFLP を用いることとした。しかし、AFLP 等の優性マーカーに基づいて連鎖地図を作成する場合、通常解析集団として用いられる F_2 では、組換え価の推定値の誤差が著しく高くなり、連鎖地図の信頼性が低下する (鵜飼, 2000 a)。そこで、優性マーカーを用いても組換え価推定の信頼性が高い、両側戻し交配集団 (BC_1) を解析集団として採用した。併せて、共優性の SSR マーカーおよび Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーを地図上に位置付けることにより、両側 BC_1 の地図の統合を試みた。

1 材料および方法

a 植物材料

ネギの自殖系統を用いたダイアレル分析において、初期生育に関する遺伝子型が大きく異なり、しかも F_1 が顕著なヘテロシスを現すことが示された 2 つの自殖系統、D 1 s-15 s-22 (千住群 '西光' 由来 S_2 世代、以下 D 系統とする) および J 1 s-14 s-20 (九条群 '九条太' 由来 S_2 世代、以下 J 系統とする) を解析集団の親として用いた。D 系統と J 系統を交配した F_1 1 個体に D 系統、および J 系統の自殖次代である J 1 s-14 s-20-9 を戻し交配して、両側戻し交配集団 ((D) BC_1 および (J) BC_1) 各 120 個体を作成した。(D) BC_1 集団は親 J 系統の連鎖地図を、(J) BC_1 集団は親 D 系統の連鎖地図を構築するために用いた。Nucleon PhytoPure kit (アマシャムバイオサイエンス) を用い、各個体の若い葉身からゲノム DNA を抽出した。

b AFLP 分析

AFLP 分析は第 II 章に準じて行った。250 ng のゲノム DNA を *Eco* R I と *Mse* I の制限酵素組合せで切断した後、アダプターをライゲーションした。予備増幅には、

アダプター配列に1塩基を付加した *Eco* R I プライマー (E-A) および2塩基を付加した *Mse* I プライマー (M-CA) を用いた。選択的増幅には、3塩基を付加した蛍光標識 *Eco* R I プライマー8種 (E-ACA, E-ACT, E-AGG, E-ACG, E-AAG, E-ACC, E-AGC, E-AAC) および4塩基を付加した *Mse* I プライマー13種 (M-CAGC, M-CAGG, M-CAGT, M-CATC, M-CATG, M-CTCA, M-CTCC, M-CTCG, M-CTCT, M-CTGA, M-CTGC, M-CTGG, M-CTGT) を用いた。PCR反応は GeneAmp 9700 (アプライドバイオシステムズ) により行い、DNAシーケンサ (ABI PRIZM 377, アプライドバイオシステムズ) を用いて増幅断片を検出した。

c SSR分析

ネギのゲノミックライブラリー由来 SSR マーカー (マーカー名 AF-; Song ら, 2004; Tsukazaki ら, 2007, 2008; 若生ら, 2002 a), タマネギゲノミックライブラリー由来 SSR マーカー (マーカー名 AMS; Fischer・Bachmann, 2000), タマネギの EST 由来 SSR マーカー (マーカー名 ACE, ACM; Kuhl ら, 2004; Martin ら, 2005; Tsukazaki ら, 2008) を使用した。PCR反応条件は、最初に94°Cで2分の熱変性を行い、次いで94°C・30秒, 60°C・30秒, 72°C・30秒を1サイクルとし、1サイクル毎にアニーリング温度を1°Cずつ下げて10サイクル行った。続いて94°C・30秒, 50°C・30秒, 72°C・30秒のサイクルを35回行い、最後に72°Cで4分の伸長反応を行った。増幅産物は5%変成ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって検出した。

d CAPS分析

CAPS分析には、タマネギのEST由来のプライマーセットである ACC 013, ACC 033 および ACC 043 を用いた (若生ら, 2002 b)。PCR反応条件は、最初に94°C・2分の熱変性を行い、次いで94°C・30秒, 65°C・30秒, 72°C・30秒を1サイクルとし、アニーリング温度を1サイクル毎に1°C低下させて10回行った。続いて94°C・30秒, 55°C・30秒, 72°C・30秒のサイクルを35回行い、最後に72°Cで4分の伸長反応を行った。ACC 013による増幅産物は制限酵素 ACCII で、ACC 033の増幅産物は *Fok* I で、ACC 043の増幅産物は *Msp* I でそれぞれ切断し、2%アガロースゲル電気泳動により検出した。

e 連鎖解析

各マーカーの分離比は、カイ2乗検定によって1:1の

期待値との適合度を検定した。連鎖解析はコンピュータプログラム Mapmaker/EXP 3.0 (Lander ら, 1987) を用いて行った。地図距離 (cM) の算出には Kosambi 関数を用いた (Kosambi, 1944)。マーカーのグループ分けの際の LOD 閾値は4.0, 最大地図距離30 cMとした。

f 親のヘテロ接合性

親系統のヘテロ接合性を評価するためのマーカーとして、第II章において我が国の多様なネギ品種のDNA多型を評価するために用いた128の AFLP を使用した。親D系統 (S₂世代) および J1 s-14 s-20-9 (S₃世代) をそれぞれ1回自殖し、S₃ および S₄ 家系を作成した。各家系12個体について個別にゲノムDNAを抽出した。128の AFLP 座について、家系内で1個体でも分離が見られた場合は親個体をヘテロと判定し、ヘテロ接合の遺伝子座の割合を推定した。

2 結果

a AFLP分析

(D) BC₁ 集団においては、26のプライマー組合せにより125個の AFLP マーカーが得られた (Table 14)。多型断片の長さは65~406 bp, プライマー組合せあたりの多型マーカー数は1~12個であった。期待される分離比の1:1 (増幅断片有り:無し) から有意に歪んだ分離比 (P < 0.05) を示すマーカーが12個観察された。そのうち8個のマーカーにおいては、増幅断片を有する個体、すなわちヘテロ型が有意に多かった。Mapmakerによる連鎖解析の結果、125の AFLP マーカーのうち117マーカーが連鎖群上に振り分けられた。一方、(J) BC₁ 集団においては、33のプライマー組合せにより156個の AFLP マーカーが得られた (Table 14)。多型断片の長さは67~410 bp, プライマー組合せあたりの多型マーカー数は2~10個であった。分離比が有意に歪んだマーカーは16個観察され、そのうち11個はヘテロ型が過剰であった。156マーカー中147マーカーが連鎖群に振り分けられた。

b SSRおよびCAPS分析

両側の戻し交配集団において SSR マーカーの分離を調査した結果、ネギゲノミックライブラリー由来27個、タマネギゲノミックライブラリー由来1個、タマネギ EST 由来10個の SSR マーカーを連鎖群に振り分けることができた。これらのマーカーは、AFS 075-2を除き全て共優性の分離を示した。AFS 075-2は優性の分離を

Table 14 Number of AFLP markers detected using a combination of *Eco*RI primers (E) with three selective nucleotides and *Mse*I primers (M) with four selective nucleotides and used in linkage analysis of reciprocally backcrossed populations.

Primer combination	(D)BC ₁								(J)BC ₁				
	E+	AAC	AAG	ACA	ACC	ACT	AGC	AGG	AAC	ACA	ACC	ACT	AGC
M+ CAGC					1			7			7	5	
CAGG												4	
CAGT				4	3	3				3	4		
CATC			1	12	5	5	1			6	2	3	2
CATG				9	5			1		7	6		
CTCA									3	5			
CTCC				5	5	2			7	8	4	6	
CTCG						4				4	4	5	
CTCT		4		9	10	3			2	10	5		
CTGA									3	10		4	
CTGC												3	2
CTGG				6	5				3	5		2	
CTGT				7	4	4					3	9	
Total					125						156		

示したため、(D) BC₁ 集団のみにマッピングした。期待される分離比である 1:1 (ヘテロ:ホモ) から有意 ($P < 0.05$) に歪んだマーカーは、(D) BC₁ 集団においては 2 個、(J) BC₁ 集団では 8 個認められた。

CAPS マーカーのうち ACC 013 および ACC 033 については共優性の分離を示したため、両側の地図にマッピングできた。一方、ACC 043 は、J 系統由来断片が判別し難かったため、優性マーカーとして D 系統由来断片の有無を調査し、(J) BC₁ 集団にのみマッピングした。これら CAPS マーカーの分離比は全て期待される分離比 1:1 (ヘテロ:ホモ) に適合していた。

c 連鎖地図

AFLP, SSR, CAPS マーカーの連鎖解析により構築したネギの連鎖地図を Fig. 7 に示す。(D) BC₁ 集団を用いて作成した J 系統の連鎖地図は、16 連鎖群 (J 1 ~ J 16) から成り、157 マーカー (117 AFLP, 38 SSR, 2 CAPS) が位置付けられた。地図の全長は 1,068 cM で、平均マーカー間隔は 6.8 cM であった。(J) BC₁ に基づく D 系統の地図は、15 連鎖群 (D 1 ~ D 15) から成り、186 マーカー (146 AFLP, 37 SSR, 3 CAPS) が座乗した。全長は 1,104 cM で、平均マーカー間隔は 5.9 cM であった。

2 つの地図は、39 の共有性マーカー (37 SSR, 2 CAPS) をアンカーとして、15 対の連鎖群で統合することができた。このうち 12 連鎖群では 2 個以上のアン

カーマーカーが座乗した。

連鎖群 D 3 においては、分離比が有意に歪んだマーカー座 ($P < 0.05$) が 7 個クラスター状に座乗していた。これらのマーカーの分離比は、全てヘテロ型が多い方向に歪んでいた。

d 親のヘテロ接合性

128 個の AFLP について、家系内における分離を調査したところ、D 系統の S₃ 世代では 10 個、J 系統の S₄ 世代では 2 個の AFLP 座において分離が認められ、これらの座はヘテロと判断された。その他の AFLP 座では全ての個体が同一のパターンを示し、固定しているものと判定した。このことから、解析集団の親である S₂ 世代におけるヘテロ接合性は、D 系統では 7.9%、J 系統では 3.1% と推定された。

3 考察

a 親のヘテロ接合性

ネギの花は自家和合性であるが、雄蕊が雌蕊よりも先に成熟し、かつ通常は虫媒受粉であるため、かなりの割合で他殖が生じる (Ford-Lloyd・Armstrong, 1993)。また、自殖により著しい弱勢が生じるため、ネギ品種、特に放任受粉品種はかなりのレベルのヘテロ接合性を維持している (Haishima ら, 1993; Tsukazaki ら, 2006)。本研究における地図作成の材料集団の親系統については、2 回の自殖しか行っていないため、どの程度のヘテロ接合

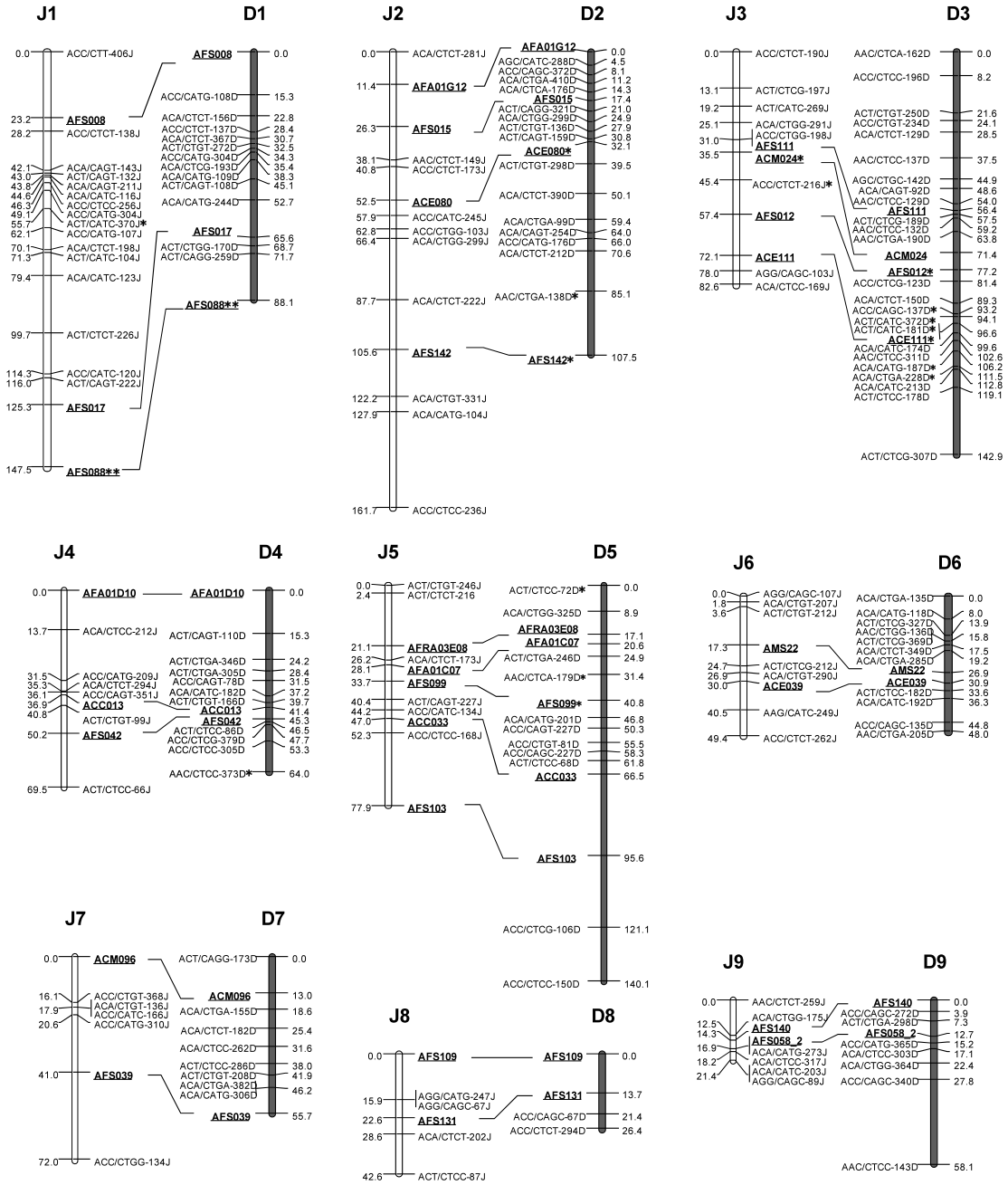


Fig. 7 Genetic linkage maps of Japanese bunching onion constructed with the reciprocally backcrossed progenies, (D)BC₁ and (J)BC₁, respectively. Linkage groups are designated as J1 to J16 for parent J and as D1 to D16 for parent D. These maps were partially aligned using co-dominant markers (underlined). The designation of AFLP marker is based on primer combination (*Eco*RI/*Mse*I), the fragment sizes (bp) and parent initial (D or J). SSR and CAPS markers are boldfaced in the map. Markers showing segregation distortion are indicated by * and **, significant at the 5% and 1% levels, respectively.

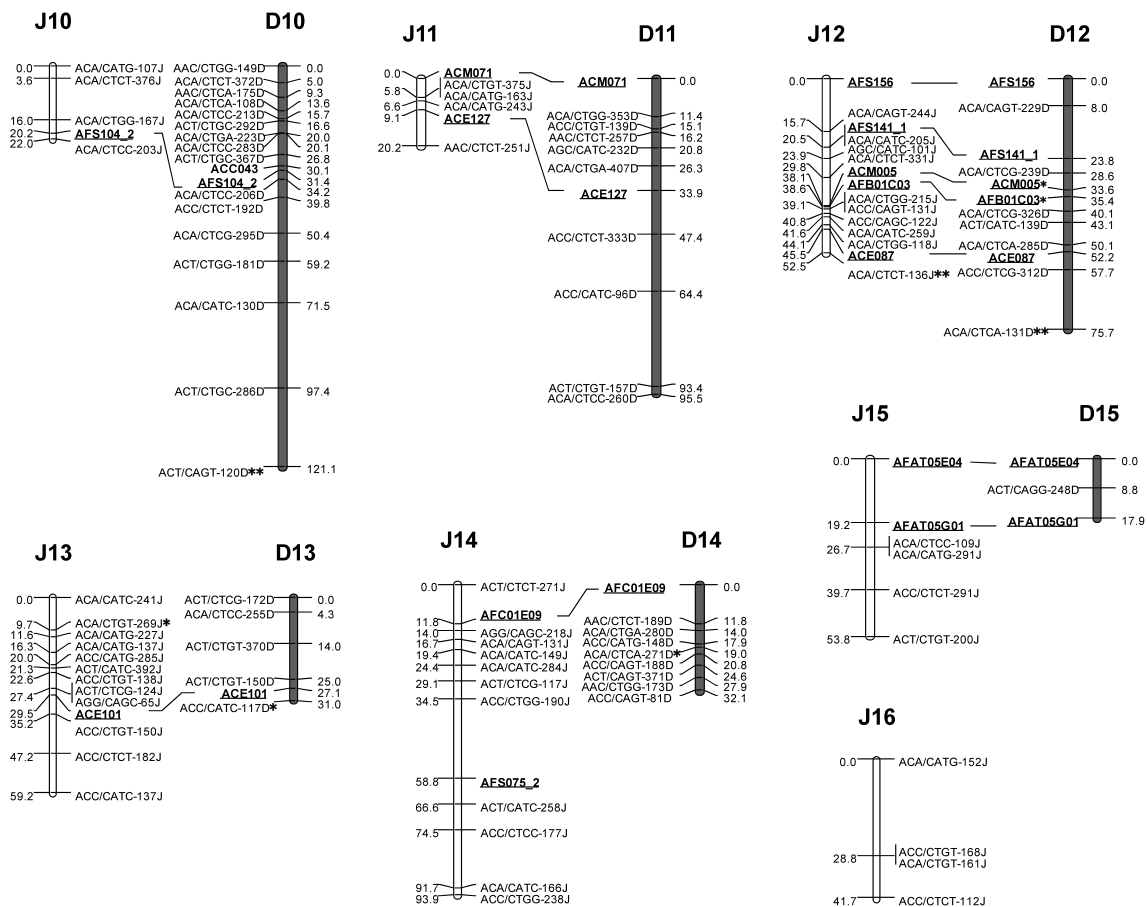


Fig. 7 (continued)

性が残存しているかを把握しておく必要がある。多様なネギ品種の間で多型を示した 128 の AFLP 遺伝子座についてヘテロ接合性を調査した結果、大部分 (92%以上) の遺伝子座が固定していると推定され、ゲノムのほとんどの部分がマッピング可能であると考えられた。さらに、両親のうち一方がヘテロ接合である遺伝子座について考えた場合、そのうちの半数は両親がホモである場合と同様にマッピングすることが可能である。例えば D 系統がヘテロ (*Aa*), J 系統がホモ (*aa*) の場合、50%の F₁ 個体が通常の F₁ と同じヘテロ (*Aa*) であり、親 (*aa*) に戻し交配することにより BC₁ では正常な分離比 1:1 となる。これらのことから、本試験で用いた親の組合せによって、ゲノムの大部分がマッピングできたものと考えられる。

b 連鎖地図

本研究においては、合計 343 のマーカーが、2つの地図上に位置付けられた。また、これらの連鎖地図の 15 連鎖群は、39 の共優性マーカーを用いることで対応付けることができた。この地図は、ネギにおいて初めて報告される連鎖地図である。タマネギにおいて、連鎖地図

の全長は、平均キアズマ頻度 19.0 (Albini・Jones, 1990) から、およそ 1,000 cM と推定されている。Kingら (1998) の構築したタマネギの RFLP 連鎖地図は全長 1,064 cM であり、キアズマ頻度からの推定値とほぼ一致している。同様に、van Heusdenら (2000) は、彼らが作成したタマネギと *A. roylei* の種間交雑による全長 660 cM の AFLP 連鎖地図が、キアズマ頻度 16 に基づく推定値の 80% をカバーしていると評価している。ネギの平均キアズマ頻度は 16.3 と報告されており (Albini・Jones, 1990), 連鎖地図全長はおよそ 800 cM と推定される。我々の作成した地図の全長は、J 系統が 1,068 cM, D 系統が 1,104 cM であることからすると、ゲノムの大部分をカバーしている可能性がある。しかし、連鎖群の数がネギの基本染色体数である $n=8$ に対応しておらず、両側地図に多くの小さな連鎖群が残っていることから、本連鎖地図にはまだ大きなギャップ領域が多数存在しているものと見られる。地図を 8つの連鎖群に収束させ、飽和させるためには、さらにマーカーを追加し、ギャップ領域を埋めていく必要がある。

c マーカー分離比の歪み

分離比が1:1 (ヘテロ:ホモ) から有意に歪んだ AFLP 座の多く (28 座中 19 座) は、ヘテロ型個体の過剰を示していた。そのうち 8 座ではヘテロ型個体が極めて多く、3:1 (ヘテロ:ホモ) の分離比に適合した。このような分離の歪みには 2 つの原因が考えられる。1 つ目の可能性として、ゲノムの重複部位に由来する 2 つの遺伝子座が増幅された場合が考えられる (van Heusden ら, 2000)。重複する 2 個の AFLP を 1 つのマーカーとして解析した場合、分離比は 3:1、あるいは重複部位間に連鎖がある場合は別の分離比になることが予測される。タマネギやニンニクにおいては、ゲノムの重複の頻度が高いことが報告されていることから (King ら, 1998; Ipek ら, 2005)、ネギにおいても多くの重複部分があると考えられる。

2 つ目の原因として、自殖弱勢またはヘテロシスが関与している可能性が考えられる。他殖性植物であるシロツメクサやアルファルファの連鎖地図作成において、ヘテロ型が多い方向に歪んだ多数のマーカーが、連鎖地図上でクラスター状に集中して座乗する現象が報告されている (Brunner ら, 1993; Jones ら, 2003)。この原因は、クラスターの近傍に強いヘテロシスあるいは自殖弱勢に関与する遺伝子座が存在しており、解析集団の作成時に、生育の優れるヘテロ型個体の非意図的な選抜が起きるためと考えられる。本試験においても、連鎖群 D3 上にヘテロ型が多い方向に歪んだマーカーがクラスター状に座乗していた。このことは、D3 連鎖群上にヘテロシスまたは自殖弱勢に関与する重要な遺伝子座が座乗している可能性を示唆している。QTL 解析により、D3 上の遺伝子座の存在を確かめる必要がある。

V ネギの初期生育量に関する QTL 解析

これまでの試験において、幅広い由来のネギ品種や系統間で作成した F_1 の初期生育を調査し、特に苗の生体重において顕著なヘテロシスが発現することを明らかにしてきた。また、ダイアレル分析により初期生育の遺伝についての概要を検討した結果、苗生体重は総体として超優性に遺伝する形質であること、生体重を増加させる方向に働く優性遺伝子は千住群の品種に多く含まれ、九条群には少ないこと等が推定された。今後、初期生育の旺盛な実用 F_1 品種を効率的に育成するため、QTL 解析によって苗の生体重に関与する遺伝子座とその連鎖マーカーを検出し、マーカー利用選抜 (MAS) に用いることが有効と考えられる。

QTL 解析においては、重要形質の連鎖地図上の位置を推定できるだけでなく、個々の QTL が持つ遺伝効果、すなわち優性効果と相加効果を推定することが可能である。そこで近年では、QTL 解析により、これまで十分に解明されていないヘテロシスの遺伝的メカニズムを明らかにしようとする研究が行われるようになってきている。ヘテロシスは古くから主に 2 つの仮説によって説明されている。優性説 (Davenport, 1908; Keeble・Pelley, 1910) は、完全優性～不完全優性を示す複数の遺伝子座が F_1 で集積されることでヘテロシスが生じるという考えである。それに対し超優性説 (East, 1936) は、ある一つの遺伝子座において、ヘテロ接合の方がホモ接合よりも優れた表現型を示すためにヘテロシスが生じるとする説である。なお、2 つの密接に連鎖した優性遺伝子が超優性の 1 遺伝子座のようにふるまう場合を偽超優性と呼ぶ (Jones, 1917)。トウモロコシにおいては、収量や収量構成要素についての QTL 解析が行われ、超優性の遺伝子がヘテロシスに重要な役割を持つことが報告されている (Stuber ら, 1992)。それに対し、イネの収量や苗の形質においては、優性説がヘテロシスの遺伝的根拠として支持されている (Xiao ら, 1995)。

本章では、第 IV 章で作成したネギの両側戻し交配集団の連鎖地図を用いて、初期生育における苗の生体重についての QTL 解析を行った。生体重に関与する寄与率の高い QTL の検出を試みると同時に、得られた QTL がどのような遺伝効果によってヘテロシスを発現しているのか、すなわちヘテロシスが超優性によるのか否かについて解明を試みた。

1 材料および方法

a 植物材料および表現型調査

第 IV 章において連鎖地図作成に使用した両側戻し交配集団、(D) BC_1 および (J) BC_1 集団を個別別に自殖し、 $BC_1 S_1$ 家系を育成した。表現型の調査は 2002 年秋、2003 年春および 2004 年春の 3 回行った。各試験に供試した (D) $BC_1 S_1$ および (J) $BC_1 S_1$ 家系の数は、2002 年秋がそれぞれ 119 家系および 113 家系、2003 年春が 119 家系および 115 家系、2004 年春が 118 家系および 105 家系とした。全ての試験において、培土 (ヤンマーナブラ野菜養土) を詰めた 200 穴セルトレイにセル当たり 1 粒播種し、発芽後トレイ下のアンダートレイ上に 3 リットルの培土 (クレハ園芸培土) を敷き詰めて育苗した。移植時 (播種 7 週後) に苗の根部を約 3 cm に切り揃えた後、移植時生体重 (FW 1) を調査した。調査後

の苗は、ビニルハウス内の地床に株間5cm、2条植(約3,500本/a)で移植し、移植5週後に同様の方法で生体重(FW2)を調査した。2002年秋の試験は、9月13~25日に播種し、1区5個体10反復について調査を行った。同様に2003年春の試験は3月12~14日播種、1区10個体5反復で、2004年春の試験は3月23~25日播種、1区6個体8反復で行った。第III章において、移植時生体重は種子のサイズ(種子重)に強く影響されることを示したが、今回も3回の試験全てにおいて移植時生体重と種子重との間に正の相関が認められた($r=0.28^{**}$ ~ 0.56^{**} , 1%水準で有意)。そこで、種子重の影響をできる限り除くため、各家系の移植時生体重の値を以下の式により補正して用いた。

生体重補正值 = 生体重測定値 + (全供試系統の千粒重平均値 - 千粒重) $\times b$, ここで b は生体重の種子重に対する回帰係数である。

b QTL 解析

QTL 解析に用いる連鎖地図には、第IV章で両側戻し交配集団(D) BC₁ および (J) BC₁ 集団を用いて作成した AFLP, SSR および CAPS による連鎖地図を用いた。コンピュータプログラム QTL Cartographer ver. 2.5 (Wang ら, 2007) を用い、複合区間マッピング(CIM)法による QTL 解析を行った。QTL 検出のための LOD の閾値は 1,000 回の permutation テスト ($P < 0.05$) により求めた。

c 遺伝効果の推定

超優性は、ヘテロ接合体が両親型の2つのホモ接合体

よりも優れていることによる現象である。P₁ ホモ型、P₂ ホモ型およびヘテロ型の遺伝子型値をそれぞれ ($u+a$), ($u-a$) および ($u+d$) で表す場合 (a , 相加効果; d , 優性効果), 超優性の遺伝子座においては優性効果 (d) が相加効果 (a) よりも高い値を示し、平均優性度 ($|d/a|$) は 1 より大きい値となる。

超優性の現象は片側の BC₁ 地図だけでは検出することが出来ない。このため本試験では、QTL がどちらか一方の地図で検出された場合、その部位における両側地図の遺伝効果推定値を比較することにより、超優性の検出を試みた。BC₁ 集団を用いた解析では、(P₁) BC₁ 集団により ($d-a$) の推定値が、(P₂) BC₁ 集団により ($a+d$) の推定値が求められる。本試験では2つの連鎖地図の対応する位置における ($d-a$) および ($a+d$) の推定値から、 a と d の値をそれぞれ推定した。なお、対応する地図上の位置は、一方の地図で検出された QTL の信頼区間に対応するもう一方の地図上の区間において、最も LOD 値の高い位置とした。また、本試験では BC₁ S₁ 世代で表現型を測定しているため、優性効果は理論上 BC₁ 世代の半分に減少している。このため、得られた優性効果の値を2倍し、 d として用いた。

2 結果

a 表現型

親系統、F₁ および BC₁ S₁ 家系の苗生体重を Table 15 に示す。3回の試験を通じ、D 系統の生体重は J 系統に比べて大きかった。また、F₁ の生体重は常に両親よりも大きく、両親平均 (MP) に対するヘテロシスは 30~128 % と高い値を示した。各 BC₁ S₁ 家系の平均値の間には有

Table 15 Seedling weight of parents, F₁ and BC₁ S₁ families.

Trait ^z		D	J	F ₁		(D) BC ₁ S ₁ families		(J) BC ₁ S ₁ families	
		Mean (g)	Mean (g)	Mean (g)	Heterosis ^y (%)	Mean (g)	Range (g)	Mean (g)	Range (g)
FW1	2002 Fall	1.37	1.09	1.60	30	1.31	1.03-1.67 **	1.32	1.00-1.84 **
	2003 Spring	1.94	1.89	2.56	34	2.18	1.60-2.73 **	1.88	1.21-2.49 **
	2004 Spring	1.37	1.23	2.16	66	1.60	1.38-1.99 **	1.44	1.04-1.88 **
FW2	2002 Fall	1.91	1.69	2.72	51	1.96	1.42-2.60 **	2.03	1.56-2.78 **
	2003 Spring	4.22	4.02	7.37	79	4.82	3.70-6.22 **	3.86	2.59-5.12 **
	2004 Spring	3.01	2.27	6.03	128	3.79	2.75-4.67 **	3.10	2.32-4.59 **

^z FW1, Fresh weight at transplanting stage; FW2, Fresh weight at 5 weeks after transplanting.

^y Heterosis over the mid-parent (%) = $100 \times (F_1 \text{ value} - \text{mid-parent value}) / \text{mid-parent value}$.

** : Significant at the 1% level among families.

意な差が認められた。その分布は連続的であり、 F_1 と同程度かそれを上回る生育を示す BC_1S_1 家系も多数現れた。 BC_1S_1 世代の平均値は F_1 よりも低かったが、多くの場合両親平均に比べ高い値を示した。このように、 BC_1S_1 世代においてもヘテロシスが現れていたことから、本解析集団はヘテロシスの研究材料として適当と考えられた。

b 苗生体重の QTL

3回の試験において検出されたQTLをTable 16およびFig. 8に示す。連鎖地図上の各QTLの寄与率は6.7~24.7%であり、顕著に寄与率の高いQTLは見出されなかった。大部分のQTLは生体重を増加させる方向に働いており、それらは優良な親Dだけでなく、生育の劣る親J上にも多く検出された。QTLのうち、D3 (AFS 012 近傍)、J5、J9およびD13連鎖群上のQTLは2回以上の試験において検出されており、これらは安定した効果を有すると考えられた。一方、両側の地図の対応する部位にQTLが検出されたのは、J5およびD5に検出された1対のQTLのみであった。その他のQTLはどちらか一方の地図だけに検出された。

c 両側地図の比較による遺伝効果の推定

検出されたQTL近傍に共有性マーカーが存在し、対応するもう一方の地図上の位置が推定できる場合について、両側集団の比較により各QTLの遺伝効果の推定を試みた (Table 17)。例えば、D系統の地図においてD3連鎖群のAFS 012近傍にQTLが検出されたが、J系統の地図上の対応する位置におけるLODスコアは閾値よりも低く、有意なQTLは検出されなかった。そこで、QTL解析によって得られた両側地図の遺伝効果の推定値、 $(d/2) - a$ および $a + (d/2)$ の値から a と d の値を算出したところ、この部位の平均優性度 $|d/a|$ は3.5と推定され、1よりも極めて大きい値を示した。このことから、本QTLは超優性の遺伝効果を示すと考えることができる。その他のQTLについても、平均優性度が1に近いかあるいはそれ以上の値を示す場合が多く認められ、これらは超優性~完全優性のQTLと考えられた。

J5およびD5連鎖群上の対応する位置に1対のQTLが検出された (Table 17, Fig. 8)。この1対のQTLは同一のQTLと考えられ、その平均優性度は0.5と推定された。また、連鎖群J7上には、平均優性度が0.1と低いQTLが検出された。これらのQTLは、部分優性あるいは相加的な効果を示す遺伝子座と考えられる。

3 考 察

a 初期生育量の QTL

幼苗期の旺盛な生育は、不良環境への適応や雑草との競合において重要な形質であることから、いくつかの主要作物においては初期生育量のQTL解析が行われている。コムギの組換え型自殖系統 (Spielmeyer ら, 2007) やトウモロコシの半数体倍加系統 (Presterl ら, 2007) を用いた解析では、草丈やその他の苗形質についてのQTLが検出されている。また、イネの苗重や草丈についてのQTLが、*japonica* × *indica* の F_2 や BC_1 集団を用いて検出されている (Abdelkhalik ら, 2005; Redona・Mackill, 1996)。本試験においては、ネギの苗生体重に関与する複数のQTLを検出することができた。ただし、各QTLが表現型に及ぼす寄与率は、最大24.7%とそれほど大きくなかった。これらQTLの中でD3 (AFS 012 近傍)、J5、J9およびD13連鎖群上の4つのQTLは、異なる年次や季節においてもほぼ同じ位置に検出されていることから、異なる環境下でも安定して効果を発揮するQTLと考えられる。これら4つのQTLは、旺盛な初期生育についてのマーカー利用選抜 (MAS) のターゲットとして期待される。第IV章において、ヘテロ接合体が多い方向に分離比の歪んだ多数のマーカーが、D3連鎖群のAFS 012近傍にクラスターを形成していることを報告し、この付近にヘテロシスあるいは自殖弱勢に関わる遺伝子座が存在していることを予測した。本試験においてD3連鎖群のAFS 012近傍に効果の高いQTLが検出されたことは、この予測を強く裏付ける結果と考えられる。このD3連鎖群上のQTLは本解析集団において最も安定して効果を発揮しており、さらに後に考察するように、明瞭な超優性を示す。

なお、近年、Tsukazaki ら (2008) はSSRマーカーに基づくネギの連鎖地図を構築し、Shigyō ら (1996) の開発した単一異種染色体添加系統を利用して、各連鎖群をネギあるいはタマネギの染色体に対応付けている。本試験におけるD3連鎖群は、共通して座乗するSSRマーカーから、Tsukazaki のSSR地図の2a連鎖群に対応すると推定される。2a連鎖群はタマネギの第2染色体に相当することが明らかになっている (Tsukazaki ら, 2008)。

b ヘテロシスの遺伝的根拠

ヘテロシスは従来から2つの主要な仮説、優性説および超優性説によって説明されているが、その遺伝的な根拠はこれまで十分に解明されていない。Stuber ら

Table 16 QTLs for seedling weight detected on both BC₁ maps.

J map based on (D) BC ₁ population								
Trait	Linkage group	Marker interval	Threshold ^z	LOD	Genetic effect ((d/2)-a)	PVE (%) ^y		
FW1	2002 Fall	J3	ACC/CTCT-190J - ACT/CTCG-197J		3.3	-0.09	13.5	
		J5	AFRA03E08 - ACA/CTCT-173J	2.6	2.9	0.05	6.7	
		J9	ACA/CTCC-317J- ACA/CATC-203J		6.4	0.07	16.0	
	2003 Spring	J2	ACA/CTCT-281J - AFA01G12	2.6	5.3	0.17	14.6	
		J14	ACA/CATC-149J - ACA/CATC-284J		6.3	0.17	15.9	
	2004 Spring	J5	AFRA03E08 - ACA/CTCT-173J	2.5	2.6	0.06	6.7	
		J8	AFS109 - AGG/CATG-247J		3.6	0.08	9.5	
	FW2	2002 Fall	J5	ACA/CTCT-173J - AFA01C07	2.7	2.9	0.11	7.5
			J9	ACA/CTCC-317J- ACA/CATC-203J		5.2	0.15	14.7
		2003 Spring	J14	ACA/CATC-149J - ACA/CATC-284J	2.7	4.3	0.33	11.5
2004 Spring		J2	AFS015 - AAC/CTCT-149J	2.7	3.0	0.19	6.7	
		J5	ACA/CTCT-173J - AFA01C07		5.1	0.24	11.8	
		J7	ACM096 - ACC/CTGT-368J		3.3	-0.20	7.8	
		J9	ACA/CTCC-317J - ACA/CATC-203J		4.9	0.24	11.3	
D map based on (J) BC ₁ population								
Trait	Linkage group	Marker interval	Threshold ^z	LOD	Genetic effect (a+(d/2))	PVE (%) ^y		
FW1	2002 Fall	D3	AFS012 - ACM024	2.7	3.3	0.16	9.7	
		D5	AFS099 - ACA/CATG-201D		3.3	-0.07	8.7	
	2003 Spring	D3	ACA/CATG-187D - AAC/CTCC-311D	2.5	3.3	0.12	9.8	
		D13	AAC/CTGA-190D - ACT/CTGT-150D		3.3	0.12	10.0	
	2004 Spring	D3	AFS012 - ACM024	2.6	7.8	0.13	24.4	
		D4	ACC/CAGT-78D - ACA/CATC-182D		2.6	3.5	0.08	8.5
		D13	ACT/CTGT-370D - ACT/CTGT-150D		4.3	0.10	13.9	
	FW2	2002 Fall	D3	ACA/CTCT-150D - ACC/CTCG-123D	2.7	7.1	0.34	17.2
			D3	ACA/CTCT-129D - ACC/CTGT-234D		6.0	-0.36	14.9
			D5	AAC/CTCA-179D - AFS099		5.0	-0.18	11.3
2003 Spring		D3	ACA/CATG-187D - AAC/CTCC-311D	2.6	4.1	0.37	12.3	
		D11	ACC/CTCT-333D - ACC/CATC-96D		3.0	-0.33	10.0	
2004 Spring		D3	AFS012 - ACM024	2.6	9.4	0.42	24.7	
		D4	ACT/CTGA-305D - ACC/CAGT-78D		2.6	3.8	0.25	8.8
		D13	ACE101 - ACC/CATC-117D		5.2	0.31	13.2	

^z LOD threshold given by 1,000 permutation test at $P < 0.05$.^y Phenotypic variation explained by the QTL.

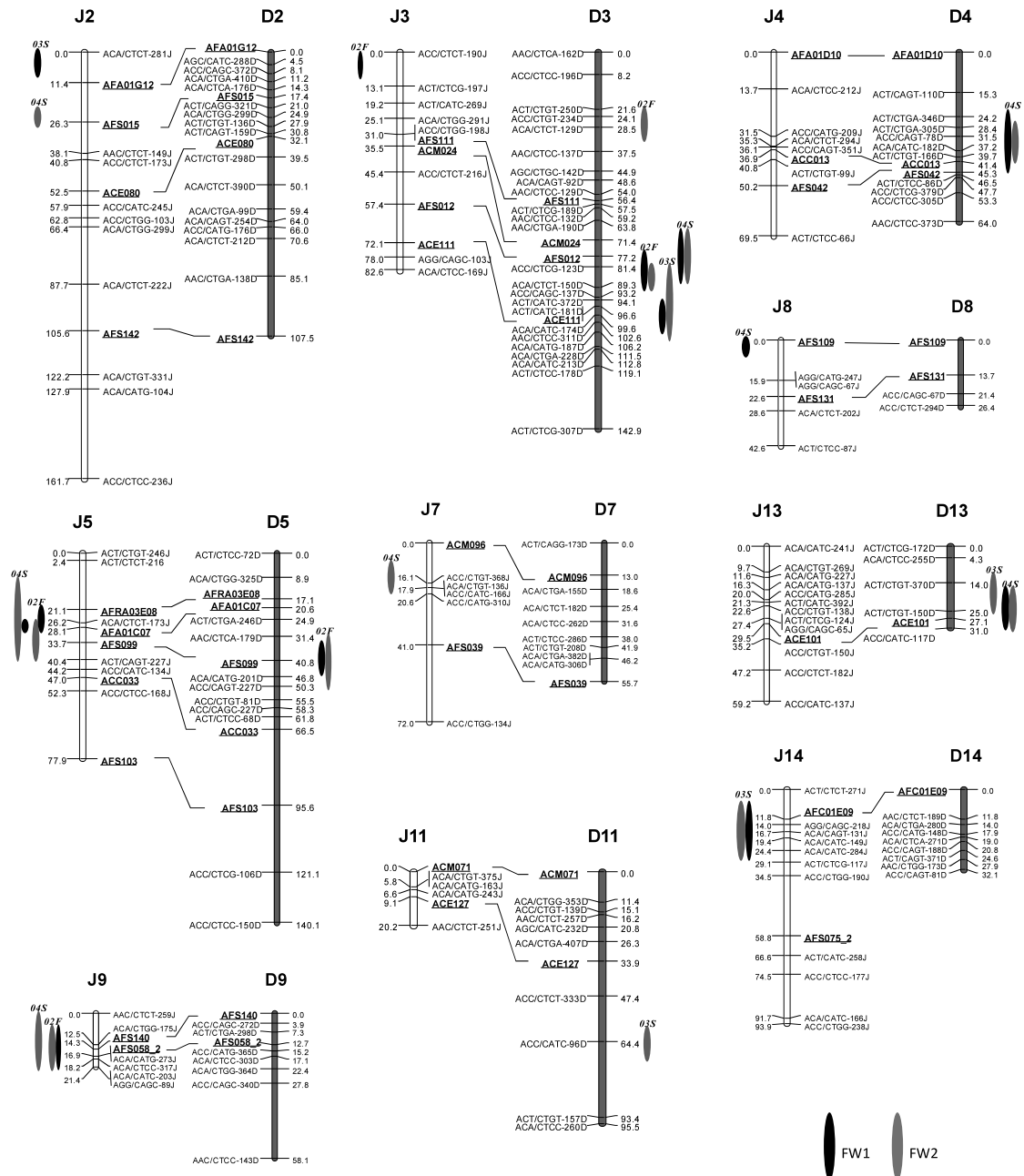


Fig. 8 Putative locations of QTLs for seedling fresh weight on the genetic maps constructed with reciprocally backcrossed progenies, (D)BC₁ and (J)BC₁. Black bars and pale bars respectively show QTLs for FW1 and FW2. Bar length indicates the regions in which the LOD scores are significant at 5% level. Characters above the QTL bars represent the year and season of the examination (S, spring; F, fall).

(1992) は、トウモロコシの収量に関わる多くの QTL についてヘテロ型の表現型がホモ型を上回ることを報告し、超優性がヘテロシスに大きな役割を果たしていると主張した。同様に Lu ら (2003) は、トウモロコシの収量において検出された多数の QTL の優性度を推定した結果、大部分の座が超優性を示したことを報告している。それに対しイネでは、収量や苗の形質に関わる QTL に

おいてヘテロ型がホモ型の表現型を上回る例がなかったことから、部分優性～完全優性を示す複数の優性遺伝子座の集積によってヘテロシスが説明できると結論づけている (Abdelkhalik ら, 2005; Xiao ら, 1995)。一方、エピスタシスを示す遺伝子座による超優性が、イネの収量関連形質のヘテロシスに強く関与しているとの報告もある (Hua ら, 2003; Mei ら, 2005)。ただし、本試験

Table 17 Genetic effect at each QTL estimated by the comparison of corresponding map regions.

Trait	J map based on (D) BC ₁			D map based on (J) BC ₁			Estimates of genetic effects ^z		
	Linkage group	Nearest marker	(d/2)·a	Linkage group	Nearest marker	a+(d/2)	a	d	d/a
FW1 03 Spring	<u>J2</u>	<u>ACA/CTCT-281J</u>	<u>0.17</u>	D2	AFA01G12	0.03	-0.07	0.20	2.9
FW2 04 Spring	<u>J2</u>	<u>AFS015</u>	<u>0.19</u>	D2	ACT/CAGG-321D	-0.02	-0.11	0.17	1.6
FW1 02 Fall	J3	ACC/CTCT-216J	0.04	<u>D3</u>	<u>AFS012</u>	<u>0.16</u>	0.06	0.20	3.5
FW1 04 Spring	J3	ACC/CTCT-216J	0.02	<u>D3</u>	<u>AFS012</u>	<u>0.13</u>	0.06	0.15	2.8
FW2 02 Fall	J3	AFS012	-0.04	<u>D3</u>	<u>ACA/CTCT-150D</u>	<u>0.34</u>	0.19	0.31	1.6
FW2 03 Spring	J3	ACE111	-0.08	<u>D3</u>	<u>ACA/CATG-187D</u>	<u>0.37</u>	0.23	0.29	1.3
FW2 04 Spring	J3	AFS012	0.01	<u>D3</u>	<u>AFS012</u>	<u>0.42</u>	0.21	0.43	2.1
FW1 04 Spring	J4	ACA/CTCT-294J	0.02	<u>D4</u>	<u>ACC/CAGT-78D</u>	<u>0.08</u>	0.03	0.10	3.5
FW2 04 Spring	J4	ACA/CTCC-212J	0.09	<u>D4</u>	<u>ACT/CTGA-305D</u>	<u>0.25</u>	0.08	0.34	4.4
FW1 02 Fall	J5	AFS099	0.05	<u>D5</u>	<u>AFS099</u>	<u>-0.07</u>	-0.06	-0.03	0.5
FW2 02 Fall	<u>J5</u>	<u>ACA/CTCT-173J</u>	<u>0.11</u>	<u>D5</u>	<u>AFS099</u>	<u>-0.18</u>	-0.14	-0.07	0.5
FW2 04 Spring	<u>J5</u>	<u>ACA/CTCT-173J</u>	<u>0.24</u>	D5	AFS099	-0.14	-0.19	0.10	0.5
FW2 04 Spring	<u>J7</u>	<u>ACC/CTGT-368J</u>	<u>-0.20</u>	D7	ACA/CTGA-155D	0.17	0.19	-0.02	0.1
FW1 04 Spring	<u>J8</u>	<u>AFS109</u>	<u>0.08</u>	D8	AFS109	-0.01	-0.04	0.06	1.4
FW1 02 Fall	<u>J9</u>	<u>ACA/CTCC-317J</u>	<u>0.07</u>	D9	AFS140	-0.03	-0.05	0.04	0.9
FW2 02 Fall	<u>J9</u>	<u>ACA/CTCC-317J</u>	<u>0.15</u>	D9	ACA/CTCC-364D	0.04	-0.06	0.19	3.4
FW2 04 Spring	<u>J9</u>	<u>ACA/CTCC-317J</u>	<u>0.24</u>	D9	ACA/CTGG-364D	0.09	-0.07	0.34	4.6
FW1 04 Spring	J13	ACE101	0.01	<u>D13</u>	<u>ACT/CTGT-150D</u>	<u>0.10</u>	0.05	0.10	2.2
FW2 04 Spring	J13	ACE101	0.02	<u>D13</u>	<u>ACC/CATC-117D</u>	<u>0.31</u>	0.14	0.33	2.3
FW1 03 Spring	<u>J14</u>	<u>ACA/CATC-149J</u>	<u>0.17</u>	D14	AFC01E09	0.04	-0.06	0.21	3.2
FW2 03 Spring	<u>J14</u>	<u>ACA/CATC-149J</u>	<u>0.33</u>	D14	AFC01E09	0.28	-0.03	0.62	23.6

^za, additive effect; d, dominant effect.

Significant QTLs detected in composite interval mapping (CIM) are indicated in *italics* with underlining.

The others were not significant in CIM.

で用いた解析集団においては、第三章で行ったダイアレル分析によって、エピスタシスの影響は小さいことが示されている。このため、本報告ではエピスタシスについては考慮せず、単遺伝子座における効果のみを考察する。

ダイアレル分析においては、全ての優性遺伝子をホモに集積することが可能となった場合の純系の表現型最大値、すなわち選抜限界を推定することができる (Hayman, 1954; Christie・Shattuck, 1992)。理論的には、超優性を示す遺伝子座がない限り、選抜限界の値を超える表現型は得られないことになる。著者らは第三章で行った初期生育量のダイアレル分析において、選抜限界よりも高い値を示す F₁ 組合せが多数認められることを報告した。この結果は、超優性の遺伝子座がネギのヘテロシス

に関与していることを強く示唆すると考えられる。

もし、超優性がヘテロシスの主要因である場合、両側連鎖地図の対応する同位置に有意な QTL が検出されることが期待される。しかし、本試験の QTL 解析では、そのような明瞭な超優性の証拠を得ることは出来なかった。超優性の程度が極めて強くない限り、ヘテロ型個体と優良な方のホモ型個体との有意差を検出するのは容易ではないためと考えられる。また本試験では、BC₁ S₁ 世代に比べて優性効果が理論上半分に減少する BC₁ S₁ 世代を用いていることも、有意差が出にくい原因の一つであろう。しかし、各 QTL の優性度を推定したところ、多くの座が 1 よりもかなり大きい値を示した。これらの座は超優性の QTL であると見なすことができる。ただし、

この結果は、必ずしも検出された超優性効果が一つの遺伝子座によりもたらされたことを示すものではなく、2つの密接に連鎖した優性遺伝子座の効果、すなわち偽超優性 (Jones, 1917) である可能性も残っている。これについては第VI章で考察する。

以上のように、ネギの初期生育における苗生体重には、相加、優性、そして超優性に働く多数の QTL が関与していると考えられる。本解析集団における顕著なヘテロシスは、優性遺伝子の累積に加え、超優性 (あるいは偽超優性) を示す遺伝子座が関与することにより発現している可能性が強く示唆される。

VI 総合考察

細胞質雄性不稔性を利用した F₁ 品種化は、ネギにおいても近年急速に進み、最近 10 年間 (1999–2008) に民間種苗会社から発表されたネギ新品種の約 9 割が F₁ 品種となっている (社団法人日本種苗協会, 2009)。これらの F₁ 品種では、従来利用されてきた放任授粉品種に比べ、収穫物の揃いが大きく向上しているが、生育速度や収量の増加への効果は不明であった。また、発現するヘテロシスの程度や組合せ能力、生育や収量に関わる重要形質の遺伝様式といった、育種の基礎となる遺伝的知見の蓄積はほとんどないのが現状であった。本研究の目的は、これらを明らかにすることで、ヘテロシスを最大限有効に活用したネギ F₁ 品種の開発を促進することである。

1 ネギ品種間 F₁ におけるヘテロシス

本研究では、まず始めに、幅広い品種群に属するネギ 11 品種の間で 40 組合せの F₁ を作成し、初期生育量とそのヘテロシスを調査した。その結果、多くの F₁ 組合せで、苗の生体重、草丈、根数にヘテロシスが現れることを明らかにした。特に苗生体重におけるヘテロシスは、両親平均に対して平均 21%、最大 70%、優良親に対しても平均 10%、最大 46% と高い値を示した。また、強いヘテロシスを示す品種群間の組合せは、千住群×九条群の組合せに最も多く含まれていた。これらのことから、従来品種にない優れた初期生育を示す品種が F₁ 育種によって育成可能であることが示唆された。ただし、主に根深ネギとして利用される千住群の品種と、葉ネギとして利用される九条群の品種とでは、分けつ数、葉鞘長、葉鞘径等、実用上重要な収穫物の形態特性が大きく異なっている。一般に、これらの形質は F₁ では両親の中間的

な形態を示す傾向にあるため、千住群と九条群の F₁ そのものを実用品種として直接利用することは難しいと考えられる。実用的な F₁ 育成のためには、組合せ能力、実用形質ともに高い親系統を、戻し交配によって育成する必要があり、長年月を要すると考えられる。この場合、後述するように、ヘテロシスに関与する重要な遺伝子に連鎖する DNA マーカーを用いたマーカー利用選抜 (MAS) が有効となる可能性がある。

一方、千住群内の組合せの中にも、各形質値の絶対値が高く、ヘテロシスも比較的高い値を示す F₁ が認められた。このことから、初期生育量を高める遺伝変異は千住群内にも十分に内在している可能性が考えられる。短期間に初期生育の旺盛な根深ネギ用 F₁ 品種を育成する場合には、最初に千住群内の組合せ能力を評価することが効率的といえる。

2 遺伝的距離によるヘテロシス予測

F₁ 育種における組合せ能力を評価するには、膨大な数の F₁ を作成し、実際に栽培してみる以外に、この作業には多大なコストと長い時間が必要である。もし F₁ に現れるヘテロシスを簡便な方法で予測できれば、有望な F₁ 組合せを極めて効率よく絞り込むことが可能と考えられる。このため、トウモロコシやイネ等において種々の方法により親間の遺伝的距離を推定し、これによってヘテロシスを予測しようとする試みがなされている。近年では RFLP、AFLP 等の DNA マーカーの多型から推定した遺伝的距離と F₁ の能力との間に有意な相関を認めた例がある (Ajmone Marsan ら, 1998; Barbosa-Neto ら, 1996; Lee ら, 1989; Smith ら, 1990)。本試験においては、幅広いネギ品種の遺伝的変異を反映していると考えられる 128 の AFLP 多型に基づいて 11 の親品種間の遺伝的距離を算出した。この遺伝的距離と初期生育のヘテロシスとの間には有意な相関が認められる場合もあった。しかし、総じてその相関は高くないことから、ヘテロシスの予測に使えるものではないと判断せざるを得なかった。この低い相関の主な原因として、形質に関与する QTL と連鎖していないランダムな AFLP マーカーが多いことが想定される (Bernardo, 1992; Charcosset ら, 1991; Melchinger ら, 1990)。従って、ヘテロシスを利用したネギ F₁ 品種育成のためには、ヘテロシスに直接関わる QTL を検出し、それに連鎖するマーカーのみを直接活用することが近道であると思われる。

一方、AFLP 法は、ネギにおいても比較的容易に多数の多型を得ることが可能であり、DNA 多型に基づく

品種・系統の類縁関係の評価や、DNA マーカー連鎖地図の作成において有用であることが、本試験を通じて確認された。

3 初期生育量の遺伝

次に、ネギの初期生育量の遺伝について全体的な様相を明らかにすることを目的とし、ネギ9自殖系統およびそれらの片側総当たり交配による36組合せのF₁を用いてダイアレル分析を行った。苗の生体重については、広義の遺伝率が極めて高いのに対して狭義の遺伝率が低かったこと、平均優性度が1.5~3.1と高い値を示したこと等から、優性的遺伝効果の寄与が極めて大きく、総体として高い超優性を示す形質であることが示された。このことから、初期生育の優れた品種を育成するには、高い優性効果を最も効率よく利用できるF₁育種法が有効であることが改めて確認できた。また、全ての優性遺伝子をホモに集積することが可能となった場合の完全優性親の推定値（選抜限界）に比べ、高い値を示すF₁が多数現れたことから、F₁育種の有効性が示唆される。さらに、千住群に由来する系統と九条群に由来する系統は初期生育に関する遺伝子型が大きく異なっていることが明らかになった。これらのF₁は強いヘテロシスを示す傾向にあることから、初期生育のヘテロシスに關与するQTL検出のための交配親として適切と考えられる。

4 連鎖地図作成とQTLの検出

ネギでは、分子遺伝学的研究が遅れており、これまでに連鎖地図は作成されていなかった。そこで、本研究ではAFLPおよび共優性のSSRマーカーを主に用い、DNAマーカー連鎖地図の構築に初めて取り組んだ。解析集団には、ダイアレル分析の結果に基づき、千住群および九条群に由来する2自殖系統の両側戻し交配集団(BC₁)を供試した。その結果、16連鎖群(J1~J16)および15連鎖群(D1~D15)から成る2つの地図を構築し、共優性SSRおよびCAPSマーカーをアンカーとして両地図を統合することができた。本地図は、初期生育量のQTL解析に用いることを前提として作成したが、千住群と九条群に属する両親間で大きく異なっている形態的特性、例えば葉鞘長、葉鞘径、分けづ数、抽台の早晚などの遺伝解析に利用できる可能性もある。ただし、この連鎖地図はゲノムの大部分をカバーしていると推定されるものの、多数の小さな連鎖群が残っており、まだ飽和していないと見られるため、さらにマーカーを追加して、連鎖群数を8に収束させていく必要があると

考えられた。近年、ネギのゲノミックライブラリー由来のSSRマーカーが多数開発され、利用が可能となっている(Tsukazakiら, 2007)。また、タマネギのEST解析が進められ、1万以上の配列情報が公開されている(Kuhlら, 2004; McCallumら, 2001)。Tsukazakiら(2008)は、これらの情報を用いることで、ネギに利用可能な多数の共優性マーカーを開発し、ネギの千住群×九条群のF₂集団を用いて共優性マーカー主体の連鎖地図を作成している。この地図では、Shigyōら(1996)の開発した単一異種染色体添加系統を利用することで、各連鎖群をネギあるいはタマネギの染色体に対応付けている。このように、汎用性の高い共優性のDNAマーカーを利用することで、詳細かつ正確な連鎖地図の作成が可能になると同時に、ネギとタマネギ等他のネギ属野菜のゲノムの詳細な比較が大きく進展するものと期待される。

本研究では最後に、ネギの初期生育に關与するQTLの検出と、個々のQTLの遺伝子作用の解明を目的とし、複合区間マッピング法により苗生体重のQTL解析を行った。その結果、7~25%の寄与率を示す複数のQTLが両側の地図上に検出された。これらのうち、D3連鎖群、J5連鎖群、J9連鎖群、D13連鎖群上の4個のQTLは、異なる環境下でも効果が安定していたことから、初期生育の優れたF₁品種育成のためのMASのターゲットとして極めて有望と考えられる。特にD3連鎖群上のQTLは、表現型に対する寄与率が比較的高く(最大25%)、また、明瞭な超優性を示す。このQTL近傍には、ヘテロ型が多い方向に分離比が歪んだマーカーがクラスターとなっていることも、本QTLがヘテロシスに強く關与する遺伝子座であることを裏付ける証拠と考えられる。今後は、本試験で検出されたQTLの効果を実際のF₁において検証する必要がある。また、他のネギ品種や系統における本QTLの分布や、他集団への適用の可能性を明らかにしていくことも重要となろう。

5 ヘテロシスの遺伝的根拠

ヘテロシスが優性説(Davenport, 1908; Keeble・Pellow, 1910)によるのか、あるいは超優性説(East, 1936)によるのかについては、長年の論争によっても未だ決着を見ていない。近年、ヘテロシスがどちらの仮説によるのかを証明することを目的としたQTL解析が複数のグループによって行われており、これまでのところトウモロコシでは超優性説を支持する結果(Luら, 2003; Stuberら, 1992)が、イネでは優性説を支持する結果(Abdelkhalikら, 2005; Xiaoら, 1995)が報告さ

れている。本研究では、両側戻し交配集団の QTL 解析の結果を用いて各 QTL の優性度（優性効果／相加効果）を推定し、ネギの初期生育におけるヘテロシスが超優性によるのか否かについて明らかにしようとした。その結果、D3 連鎖群上の QTL を始めとするいくつかの遺伝子座においては優性度が 1 を大きく上回り、超優性に作用している可能性が示された。その他の座においては、相加または優性の遺伝効果も観察された。このことから、本解析集団に現れる顕著なヘテロシスには超優性の QTL が関与しており、これに優性 QTL の作用が加わっているものと推察できる。この結果は、同じ他殖性作物であるトウモロコシにおける結果と同様、ヘテロシスの超優性説を支持するものと言える。ただし、一つの遺伝子座による超優性効果であるとは断言できず、2 つの密接に連鎖した優性遺伝子座が関与する偽超優性（Jones, 1917）による可能性もある。この点を明らかにするためには、各 QTL のより詳細な解析が必要である。トウモロコシにおいて、Stuber ら（1992）の見出した超優性 QTL の一つは、その後の詳細マッピングにより、少なくとも 2 つの優性の QTL から成ることが明らかにされている（Graham ら, 1997）。それに対し、Lu ら（2003）は、超優性を示す別の QTL について、密接な連鎖が切れるように 3 世代にわたるランダム交配を行ったが、超優性と偽超優性を分離できなかったことを報告した。彼らは、その QTL は真の超優性であるか、あるいは極めて密接に連鎖した偽超優性であると考えており、いずれにせよ実用上は超優性に働くものと考察している。

6 ヘテロシスを利用したネギの F₁ 育種

軟白した葉鞘部を収穫する根深ネギ栽培においては、市場流通における収穫物サイズの出荷規格が厳密に設定されている。このため、長期にわたって継続的に収穫を行う秋冬どりの作型等では、在圃性の高い品種、すなわち収穫期間中に収穫物が肥大・伸長しすぎない品種が望ましいとされる。この点では、生育初期に現れる高いヘテロシスが収穫期まで継続することは問題となる可能性がある。馬上・上原（1985 b）はネギの雄性不稔系統を用いて得た F₁ における葉鞘重のヘテロシスは収穫期に近づくと減少することを報告した。また、同じネギ属のタマネギにおいては、優良な自殖系統や放任受粉品種間の組合せ能力が調査され、収量や球重等収穫期のヘテロシスはそれほど高くなく、優性効果に比べ相加効果の役割が大きいことが報告されている（Havey・Randle, 1996；Hosfield ら, 1977）。また、テンサイの草丈等の

解析では、生育初期には強い超優性を示すが、収穫期においては相加効果が高くなり、超優性の程度が低くなることを示されている（大瀧ら, 2002）。ネギの生育期間におけるヘテロシスの発現程度の変化については今後さらに調査する必要があるが、これらの報告から類推すると、収穫期には生育初期に比べヘテロシス程度が低くなる可能性が高い。すなわち、初期生育においては高いヘテロシスを示し、しかも収穫物が肥大しすぎない品種を育成することが可能と思われる。

ヘテロシス利用の別の利点として、栽培期間の短縮が挙げられる。ネギ、特に根深ネギの栽培期間は長く、播種から収穫まで最も短くても 6 ヶ月、作型によっては一年以上を要する。初期生育におけるヘテロシスが大きく、生育の速い品種を用いることで、作型によっては栽培期間の大幅な短縮が可能であろう。従来にはなかった夏播き秋冬どりや春播き夏どり等の新たな作型を開発できる可能性もある。葉ネギ栽培や、より若いネギを収穫する小ネギ栽培においては、年間栽培回数を増やすことができるため、生育の早い品種のメリットはさらに明瞭と考えられる。最近、栽培期間の短縮や土寄せ作業等の省力化、密植による収量の増大を目指した、葉鞘長の短い「短葉性」のネギ品種が育成されている（若生ら, 2010）。ヘテロシスを有効に活用することで、さらに生育期間の短い短葉性 F₁ 品種を育成することが可能であろう。

千住タイプの根深ネギの育種を念頭におき、千住群を片親とした交配組合せを考えた場合、もう一方の親を九条群とした F₁ は高いヘテロシスを示す傾向にあった。実用的な根深ネギ F₁ 品種の親系統育成のためには、ヘテロシスに関与する対立遺伝子の望ましい組合せを維持しつつ、葉鞘長、葉鞘径、葉鞘部の縮まり、分けつ数等の実用形質を千住タイプに近づけていく戻し交配が必要になる。本試験の結果から、このような戻し交配を効率的に実施可能な MAS の戦略を与えることができる。MAS のターゲットとしては、初期生育量に関し安定した効果を示した D3 連鎖群（AFS 012 近傍）、J5 連鎖群、J9 連鎖群および D13 連鎖群上の 4 つの QTL が有望である。このうち D3、J9 および D13 連鎖群上の QTL は超優性の遺伝効果を示す遺伝子座である。このため、F₁ においてはこれらの QTL をヘテロ接合に保つよう、親系統を育成する必要がある。J5 連鎖群上の QTL については、相加～部分優性の遺伝効果を示すため、J 系統の対立遺伝子をホモに持たせればよいと考えられる。ただし、これら 4 つの遺伝子座の表現型に対する寄与率はそれほど高くないため、マーカーによる選抜

に加え、さらに表現型による選抜を行う必要があるだろう。一方、本試験で用いた交配組合せはただ一つの組合せであり、これとは異なる親系統の組合せにおいては、今回検出された QTL とは別の多数のヘテロシス関連 QTL が存在している可能性がある。今後、高いヘテロシスを示す他の交配組合せについて詳細な QTL 解析を行うことにより、ヘテロシスに強く関与する新たな QTL を検出することが出来るであろう。将来的には、これらの QTL のピラミディングを図っていくことで、ヘテロシスを最大限に活用した F₁ 品種の育成が可能になると考えられる。

摘 要

近年、国内のネギ生産においては機械化・省力化による生産コスト低減が重要な課題となっており、全自動移植機の導入を可能にするセル成型育苗法に対応した技術の開発が望まれている。しかし、ネギは初期生育の極めて遅い作物であり、培地量が少なく育苗期間に限られるセル育苗では、慣行の地床育苗に比べ極めて小さい苗を移植せざるを得ない。このため、移植後の活着が乾燥や湿害などの影響を受けて不安定になることが多く、収量減を招く場合もある。この対策として、初期生育に現れる雑種強勢（ヘテロシス）を活用し、限られた育苗期間内により旺盛な生育を示す F₁ 品種を育成することが有効と考えられる。しかし、これまでネギのヘテロシスの程度や組合せ能力についての情報はほとんど報告されていない。また、ゲノムサイズが巨大であること、自殖弱勢が著しいこと等の理由から、遺伝・育種学的研究が遅れている。

本研究ではまず始めに、ネギの初期生育においてどの程度のヘテロシスが発現するのか、また、どのような品種間・品種群間の組合せでヘテロシスが現れるのかを把握するため、幅広い品種群に属するネギ 11 品種の間で作成した 40 組合せの F₁ を供試し、初期生育量およびそのヘテロシスを調査した。移植 4 週間後の生体重では、両親平均に対して -3~70%（平均 21%）、優良親対比でも -10~46%（平均 10%）のヘテロシスが現れた。高いヘテロシスを示す組合せは千住群×九条群に最も多く含まれていたが、千住群内の組合せにおいても実用的に高いヘテロシスを現す組合せが認められた。草丈、根数、相対生長率についてもヘテロシスが現れたが、その程度は生体重に比べ小さかった。また、DNA 多型から推定した品種間の遺伝的距離により、F₁ に現れるヘテロシスが予測可能か否かを検証するため、11 品種の AFLP 分

析によって得られた 128 の DNA 多型を用いて親品種間の遺伝的距離を算出した。この遺伝的距離に基づき UPGMA 法によるクラスター分析を行ったところ、形態・生態的特性による従来の品種群分類と良く一致したことから、本試験で得た AFLP マーカーおよび遺伝的距離は概ねネギ品種間の遺伝的な変異を反映していること、ネギの DNA レベルでの品種群分類に AFLP マーカーが利用可能であることが示唆された。AFLP に基づく遺伝的距離と移植 4 週間後の各形質における両親平均対比のヘテロシスとの間には有意な相関が認められたが、その相関は高くなかった。また、優良親対比のヘテロシスとの遺伝的距離との間の相関は総じて低かった。これらのことから、AFLP に基づく遺伝的距離により品種間 F₁ のヘテロシスの予測を行うことは難しいと判断された。

ネギの初期生育量の遺伝について全体的な特性を明らかにするため、ネギ 9 自殖系統およびそれらの片側ダイアレル交配による 36 組合せの F₁ を用い、初期生育量に関するダイアレル分析を行った。苗の生体重については、移植時（播種 7 週間後）および移植 4 週間ともに、広義の遺伝率が高く狭義の遺伝率が低かったこと、平均優性度が 1 以上を示したことから、優性遺伝効果の寄与が大きく、総体として超優性の形質であると推定された。特に移植 4 週間後の生重については、平均優性度が 3.1 と極めて高く、移植時よりも超優性の程度が大きいと考えられた。草丈についても、移植時、移植 4 週間ともに優性効果が大きく、超優性の形質であることが示された。ただし、狭義の遺伝率は生重の場合に比べ高い値を示したことから、生重に比べると相加効果の役割が大きいと考えられる。生重、草丈ともに、優性遺伝子の平均的作用方向は形質値を増加させる方向であった。千住群×九条群の系統間組合せは高いヘテロシスを示す傾向にあり、この組合せは初期生育の旺盛な F₁ 品種育成のための親系統を探索していく上で極めて有望であると考えられた。また、千住群に由来する系統は生重を高める方向に働く優性遺伝子を多く有し、他方、九条群に由来する系統は草丈を高くする優性遺伝子を多く有する傾向が認められた。このように、千住群×九条群の組合せは顕著なヘテロシスを示す上、初期生育に関する遺伝子型が大きく異なっていることから、QTL 解析の分離集団育成のための親系統の組合せとして適切と考えられた。

ネギでは、分子遺伝学的研究の遅れから、これまでに DNA マーカー連鎖地図は作成されていなかった。そこで、AFLP、SSR および CAPS マーカーを用い、ネギの DNA マーカー連鎖地図を初めて作成した。解析集団

の親には、ダイアレル分析の結果に基づき、千住群および九条群に由来する2自殖系統、D系統およびJ系統を用いた。これらの両側戻し交配集団 (BC₁) を作成し、各120個体を供試して連鎖解析を行った。その結果、16連鎖群 (J1~J15)、157マーカー (117 AFLP, 38 SSR, 2 CAPS) から成るJ系統の連鎖地図、および15連鎖群 (D1~D15)、186マーカー (146 AFLP, 37 SSR, 3 CAPS) から成るD系統の地図を構築した。J系統の地図の全長は1,068 cM、D系統は1,104 cMであり、まだ飽和していないもののゲノムの大部分をカバーしていると推定された。2つの地図は、39の共有性マーカーをアンカーとして、15対の連鎖群で統合できた。

最後に、ネギの初期生育に関する量的遺伝子座 (QTL) の検出と、個々のQTLの遺伝子作用の解明を目的とし、苗生体重のQTL解析を行った。苗生体重の評価にはBC₁S₁家系を用い、3年にわたり3回実施した。F₁および多数のBC₁S₁家系の苗生体重の平均値には顕著なヘテロシスが観察された。複合区間マッピング法によるQTL解析の結果、多くのQTLが両側の地図上に検出された。それぞれのQTLが表現型に及ぼす寄与率は7~25%と推定された。これらのうちD3連鎖群、J5連鎖群、J9連鎖群およびD13連鎖群上の4個のQTLは、異なる環境下でも効果が安定していた。これらのQTLは、初期生育の優れるF₁品種育成のためのMASに利用可能と考えられる。一つの例を除き全てのQTLは片側の地図のみで検出され、もう一方の地図の対応する位置には検出されなかったが、両側地図の解析結果を用いて各QTLの優性度 (優性効果/相加効果) を推定した。その結果、D3連鎖群上のQTLを始めとする複数の遺伝子座において、超優性の遺伝子作用が認められた。その他の座の遺伝子作用は、相加または優性と推定された。本解析集団における苗生体重の顕著なヘテロシスは、優性および超優性の遺伝子作用の集積に基づくと推察された。

引用文献

- 1) Abdelkhalik, A. F., R. Shishido, K. Nomura and H. Ikehashi (2005) : QTL-based analysis of heterosis for grain shape traits and seedling characteristics in an *indica-japonica* hybrid in rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.*, **55**, 41-48.
- 2) Ajmone Marsan, P., P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper and M. Motto (1998) : Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 219-227.
- 3) Albini, S. M. and G. H. Jones (1990) : Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *Allium fistulosum*. III. The F₁ hybrid. *Genome*, **33**, 854-866.
- 4) 青葉高 (1982) : 日本の野菜, pp 120-126. 八坂書房, 東京.
- 5) Barbosa-Neto, J. F., M. E. Sorrells and G. Cisar (1996) : Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP-based estimates of genetic relationship. *Genome*, **39**, 1142-1149.
- 6) Becker, J., P. Vos, M. Kuiper, F. Salamini and M. Heun (1995) : Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 65-73.
- 7) Benjamin, L. R. (1984) : The relative importance of some different sources of plant-weight variation in drilled and transplanted leeks. *J. Agric. Sci., Camb.*, **103**, 527-537.
- 8) Bernardo, R. (1992) : Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. *Theor. Appl. Genet.*, **83**, 628-634.
- 9) Brummer, E. C., J. H. Bouton and G. Kochert (1993) : Development of an RFLP map in diploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.*, **86**, 329-332.
- 10) Charcosset, A., M. Lefort-Buson and A. Gallais (1991) : Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation. *Theor. Appl. Genet.*, **81**, 571-575.
- 11) Christie, B. R. and V. I. Shattuck (1992) : The diallel cross: Design, analysis, and use for plant breeders. *Plant Breed. Rev.*, **9**, 9-36.
- 12) Davenport, C. B. (1908) : Degeneration, albinism and inbreeding. *Science*, **28**, 454-455.
- 13) Dwivedi, S. L., K. N. Ray and R. B. Singh (1980) : Diallel analysis of heading date in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **57**, 43-47.
- 14) East, E. M. (1936) : Heterosis. *Genetics*, **21**, 375-397.
- 15) Ellis, R. P., J. W. McNicol, E. Baird, A. Booth, P. Lawrence, B. Thomas and W. Powell (1997) : The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.*, **3**, 359-369.
- 16) Felsenstein, J. (2005) : PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- 17) Fischer, D. and K. Bachmann (2000) : Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.*, **101**, 153-164.
- 18) Ford-Lloyd, B. V. and S. J. Armstrong (1993) : Welsh onion *Allium fistulosum* L.. G. Kalloo and B. O. Bergh (eds.), Genetic Improvement of Vegetable Crops, pp 51-58. Pergamon Press, Oxford.
- 19) Frei, O. M., C. W. Stuber and M. M. Goodman (1986) : Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Sci.*, **26**, 37-42.
- 20) Galmarini, C. R., I. L. Goldman and M. J. Havey (2001) : Genetic analyses of correlated solids, flavor, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 543-551.
- 21) Godshalk, E. B., M. Lee and K. R. Lamkey (1990) :

- Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor. Appl. Genet.*, **80**, 273-280.
- 22) Goto-Yamamoto, N. (2000) : Phenetic clustering of grapes (*Vitis* spp.) by AFLP analysis. *Breed. Sci.*, **50**, 53-57.
- 23) Graham, G. I., D. W. Wolff and C. W. Stuber (1997) : Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. *Crop Sci.*, **37**, 1601-1610.
- 24) Griffing, J. B. (1956) : Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austral. J. Biol. Sci.*, **9**, 463-493.
- 25) Haishima, M., J. Kato and H. Ikehashi (1993) : Isozyme polymorphism in native cultivars of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Jpn. J. Breed.*, **43**, 367-375.
- 26) Han, T. H., H. J. van Eck, M. J. De Jeu and E. Jacobsen (1999) : Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. *Theor. Appl. Genet.*, **98**, 465-471.
- 27) Hanelt, P. (1990) : Taxonomy, evolution, and history. H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.) , Onions and Allied Crops. Volume I. Botany, physiology, and genetics, pp 1-26. CRC Press, Florida.
- 28) Havey, M. J. and W. M. Randle (1996) : Combining abilities for yield and bulb quality among long- and intermediate-day open-pollinated onion populations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **121**, 604-608.
- 29) Hawkins, R. C. and P. J. M. Cooper (1979) : Effects of seed size on growth and yield of maize in the Kenya highlands. *Expl. Agric.*, **15**, 73-79.
- 30) Hayman, B. I. (1954) : The theory and analysis of diallel crosses. *Genetics*, **39**, 789-809.
- 31) He, Z.-H. (1991) : An investigation of the relationship between the F_1 potential and the measures of genetic distance among wheat lines. *Euphytica*, **58**, 165-170.
- 32) Hosfield, G. L., G. Vest and C. E. Peterson (1977) : Heterosis and combining ability in a diallel cross of onions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **102**, 355-360.
- 33) Hua, J. P., Y. Z. Xing, W. Wu, C. Xu, X. Sun, S. Yu and Q. Zhang (2003) : Single-locus heterotic effects and dominance by dominance interactions can adequately explain the genetic basis of heterosis in an elite rice hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 2574-2579.
- 34) Huh, M. K. and O. Ohnishi (2002) : Genetic diversity and relationship of East Asian natural populations of wild radish revealed by AFLP. *Breed. Sci.*, **52**, 79-88.
- 35) Inden, H. and T. Asahira (1990) : Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). H. D. Rabinowitch and J. L. Brewster (eds.) , Onions and Allied Crops. Vol. III. Biochemistry, Food Science, and Minor Crops, pp 159-178. CRC, Boca Raton.
- 36) Ipek, M., A. Ipek, S. G. Almquist and P. W. Simon (2005) : Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **110**, 228-236.
- 37) Iwata, H. S. Niikura, S. Matsuura, Y. Takano and Y. Ukai (2000) : Diallel analysis of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on eriptic fourier descriptors. *Breed. Sci.*, **50**, 73-80.
- 38) Jinks, J. L. and R. M. Jones (1958) : Estimation of the components of heterosis. *Genetics*, **43**, 223-234.
- 39) Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmioli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp (1997) : Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, **3**, 381-390.
- 40) Jones, D. F. (1917) : Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis. *Genetics*, **2**, 466-479.
- 41) Jones, E. S., L. J. Hughes, M. C. Drayton, M. T. Abberton, T. P. T. Michaelson-Yeates, C. Bowen and J. W. Forster (2003) : An SSR and AFLP molecular marker-based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant. Sci.*, **165**, 531-539.
- 42) Jones, H. A. and A. E. Clarke (1943) : Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **43**, 189-194.
- 43) Jones, R. M. (1965) : Analysis of variance of the half diallel table. *Heredity*, **20**, 117-121.
- 44) Keeble, F. and C. Pellew (1910) : The mode of inheritance of stature and flowering time in peas (*Pisum sativum*). *J. Genet.*, **1**, 47-56.
- 45) King, J. J., J. M. Bradeen, O. Bark, J. A. McCallum and M. J. Havey (1998) : A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 52-62.
- 46) 濃沼圭一・望月昇 (1986) : ダイアレル分析によるトウモロコシのごま葉枯病抵抗性の遺伝解析. 草地試研報, **35**, 35-41.
- 47) Kosambi, D. (1944) : The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.*, **12**, 172-175.
- 48) Kuhl, J. C., F. Cheung, Q. Yuan, W. Martin, Y. Zewdie, J. McCallum, A. Catanach, P. Rutherford, K. C. Sink, M. Jenderek, J. P. Prince, C. D. Town and M. J. Havey (2004) : A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *Plant Cell*, **16**, 114-125.
- 49) 熊沢三郎・勝又広太郎 (1965) : 葱. 熊沢三郎編著, 改著総合蔬菜園芸各論, pp 280-289. 養賢堂, 東京.
- 50) Labani, R. M. and T. T. Elkington (1987) : Nuclear DNA variation in the genus *Allium* L. (Liliaceae). *Heredity*, **59**, 119-128.
- 51) Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S. Lincoln and L. Newburg (1987) : MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**, 174-181.
- 52) Lee, M., E. B. Godshalk, K. R. Lamkey and W. W. Woodman (1989) : Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci.*, **29**, 1067-1071.
- 53) Liu X., K. Ishiki and W. Wang (2002) : Identification of AFLP markers favorable to heterosis in hybrid rice. *Breed. Sci.*, **52**, 201-206.

- 54) Liu, Z.-Q., Y. Pei and Z.-J. Pu (1999) : Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum* L. *Plant Breed.*, **118**, 119-123.
- 55) Lu, H., J. Romero-Severson and R. Bernardo (2003) : Genetic basis of heterosis explored by simple sequence repeat markers in a random-mated maize population. *Theor. Appl. Genet.*, **107**, 494-502.
- 56) Manjarrez-Sandoval, P., T. E. Carter Jr., D. M. Webb and J. W. Burton (1997) : Heterosis in soybean and its prediction by genetic similarity measures. *Crop Sci.*, **37**, 1443-1452.
- 57) Martin, W. J., J. McCallum, M. Shigyo, J. Jakse, J. C. Kuhl, N. Yamane, M. Piether-Joyce, A. F. Gokce, K. C. Sink, C. D. Town and M. J. Havey (2005) : Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Mol. Gen. Genomics*, **274**, 197-204.
- 58) McCallum, J., D. Leite, M. Piether-Joyce and M. J. Havey (2001) : Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **103**, 979-991.
- 59) Mei, H. W., Z. K. Li, Q. Y. Shu, L. B. Guo, Y. P. Wang, X. Q. Yu, C. S. Ying and L. J. Luo (2005) : Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. *Theor. Appl. Genet.*, **110**, 649-659.
- 60) Melchinger, A. E., M. Lee, K. R. Lamkey, A. R. Hallauer and W. L. Woodman (1990) : Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallel sets of maize inbreds. *Theor. Appl. Genet.*, **80**, 488-496.
- 61) Moll, R. H., J. H. Lonquist, J. Velez Fortuno and E. C. Johnson (1965) : The relationship of heterosis and genetic divergence in maize. *Genetics*, **52**, 139-144.
- 62) 馬上武彦・上原武 (1985 a) : ネギの細胞質雄性不稔の遺伝様式. 園学雑, **53**, 432-437.
- 63) 馬上武彦・上原武 (1985 b) : ネギの細胞質雄性不稔性を利用した F₁ 雑種の雑種強勢と自殖弱勢. 育雑, **35**, 175-182.
- 64) Murai, M. and T. Kinoshita (1986) : Diallel analysis of traits concerning yield in rice. *Japan. J. Breed.*, **36**, 7-15.
- 65) 農林水産省大臣官房統計部 (2009) : 平成19年生産農業所得統計, **63**.
- 66) 農林水産省大臣官房統計部 (2010) : 平成20年度野菜生産出荷統計, **24**.
- 67) Nunome, T., K. Suwabe, H. Iketani, M. Hirai (2003) : Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding*, **122**, 256-262.
- 68) 大瀧直樹・田口和憲・田中征勝 (2002) : テンサイの草丈, 葉数及び茎葉重に関する片側ダイアレル分析. 育種学研究, **4**, 77-85.
- 69) Pet, G. and F. Garretsen (1983) : Genetical and environmental factors influencing seed size of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and the effect of seed size on growth and development of tomato plants. *Euphytica*, **32**, 711-718.
- 70) Prasad, S. K. and T. P. Singh (1986) : Heterosis in relation to genetic divergence in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica*, **35**, 919-924.
- 71) Presterl, T., M. Ouzunova, W. Schmidt, E. M. Mööller, F. K. Röber, C. Knaak, K. Ernst, P. Westhoff and H. H. Geiger (2007) : Quantitative trait loci for early plant vigour of maize grown in chilly environments. *Theor. Appl. Genet.*, **114**, 1059-1070.
- 72) Redona, E. D. and D. J. Mackill (1996) : Mapping quantitative trait loci for seedling vigor in rice using RFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 395-402.
- 73) Ricroch, A., R. Yockteng, S. C. Brown and S. Nadot (2005) : Evaluation of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*, **48**, 511-520.
- 74) 社団法人日本種苗協会 (2009) : 野菜品種名鑑 2009年版, 157-164.
- 75) 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.
- 76) 白岩裕隆・鹿島美彦・野口安男・井上浩 (2006) : 全自動ネギ移植機に対応したセル成型育苗法の改良並びに周年利用体系の確立. 鳥取県園試報, **7**, 19-28.
- 77) Smith, O. S., J. S. C. Smith, S. L. Bowen, R. A. Tenborg and S. J. Wall (1990) : Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield, heterosis, and RFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, **80**, 833-840.
- 78) Smittle, D. A. (1982) : Radish (*Raphanus sativus*) growth and yield responses to seed grading by size and aspiration. *Seed Sci. & Technol.*, **10**, 199-205.
- 79) Song, Y. S., K. Suwabe, T. Wako, T. Ohara, T. Nunome and A. Kojima (2004) : Development of microsatellite markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Breed. Sci.*, **54**, 361-365.
- 80) Spielmeier, W., J. Hyles, P. Joaquim, F. Azanza, D. Bonnett, M. E. Ellis, C. Moore and R. A. Richards (2007) : A QTL on chromosome 6A in bread wheat (*Triticum aestivum*) is associated with longer coleoptiles, greater seedling vigour and final plant height. *Theor. Appl. Genet.*, **115**, 59-66.
- 81) Stuber, C. W. (1995) : Heterosis in plant breeding. *Plant Breeding Rev.*, **12**, 227-251.
- 82) Stuber, C. W., S. E. Lincoln, D. W. Wolff, T. Helentjaris and E. S. Lander (1992) : Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*, **132**, 823-839.
- 83) 高木胖・岸川英利・江頭正義 (1990) : ダイズの収量に関連する量的形質のダイアレル分析. 佐賀大農彙, **69**, 9-16.
- 84) 武田和義・金谷良市 (1995) : 二条オオムギにおける裂皮粒歩合のダイアレル分析. 育雑, **45**, 217-221.
- 85) 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, **56**, 1-63.
- 86) 土屋恭一 (1999) : ネギ連結ポット (チェーンポット) 苗の育苗. 農業技術大系, 野菜編, 8-1, pp 209-219. 農文協, 東京.
- 87) Tsukazaki, H., H. Fukuoka, Y. S. Song, K. Yamashita, T. Wako and A. Kojima (2006) : Considerable heterozygosity in commercial F₁ varieties of bunching onion (*Allium fistulosum*) and proposal of breeding scheme for conferring variety traceability using SSR markers. *Breed. Sci.*, **56**, 321-326.

- 88) Tsukazaki, H., T. Nunome, H. Fukuoka, H. Kanamori, I. Kono, K. Yamashita, T. Wako and A. Kojima (2007) : Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica*, **157**, 83-94.
- 89) Tsukazaki, H., K. Yamashita, S. Yaguchi, S. Masuzaki, H. Fukuoka, J. Yonemaru, H. Kanamori, I. Kono, T. T. M. Hang, M. Shigyo, A. Kojima and T. Wako (2008) : Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*). *Theor. Appl. Genet.*, **117**, 1213-1223.
- 90) 鶴飼保雄 (1989) : 量的形質のダイアレル分析のためのパソコン用プログラム DIALL の作成. 育種, **39**, 107-109.
- 91) 鶴飼保雄 (2000 a) : 組換え価の推定. 鶴飼保雄著, ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL, pp 128-132. 東京大学出版会, 東京.
- 92) 鶴飼保雄 (2000 b) : QTL 解析の効率向上と遺伝育種の利用. 鶴飼保雄著, ゲノムレベルの遺伝解析 MAP と QTL, pp 297. 東京大学出版会, 東京.
- 93) 鶴飼保雄 (2002) : ヘテロシス. 鶴飼保雄著, 量的形質の遺伝解析, pp 140-148. 医学出版, 東京.
- 94) van Heusden, A. W., J. W. van Ooijen, R. V. van Ginkel, W. H. J. Verbeek, W. A. Wietsma and C. Kik (2000) : A genetic map of an interspecific cross *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP_{TM}) markers. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 118-126.
- 95) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995) : AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 4407-4414.
- 96) 若生忠幸・小原隆由・Y. S. Song・小島昭夫 (2002 a) : ネギにおける SSR マーカーの開発. 育種学研究, **4** (別 1), 83.
- 97) 若生忠幸・執行正義・田代洋丞・小原隆由・小島昭夫 (2002 b) : シャロット染色体を持つネギ単一異種染色体添加系統におけるさび病抵抗性. 園学雑, **71** (別 1), 348.
- 98) 若生忠幸・小島昭夫・山下謙一郎・塚崎光・小原隆由・坂田好輝 (2010) : 短葉性ネギ品種 'ふゆわらべ' の育成とその特性. 園芸学研究, **9**, 279-285.
- 99) Wang S., C. J. Basten and Z-B. Zeng (2007) : Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>.
- 100) Wang, Y. -H., C. E. Thomas and R. A. Dean (1997) : A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.*, **95**, 791-798.
- 101) Xiao, J., J. Li, L. Yuan, S. R. McCouch and S. D. Tanksley (1996) : Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 637-643.
- 102) Xiao, J., J. Li, L. Yuan and S. D. Tanksley (1995) : Dominance is the major genetic bases of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics*, **140**, 745-754.
- 103) 横山雅機 (1996) : シロネギのセル成型苗を利用した機械移植技術. 静岡農試研報, **41**, 13-23.
- 104) Zhang, Q., W. Youying and Z. Song (1995) : Breeding of a male sterile line on the Welsh onion (*Allium fistulosum* L. var *giganteum* Makino) and preliminary study of its heterosis. *Acta Hort.*, **402**, 273-277.
- 105) Zhang, Q., Z. Q. Zhou, G. P. Yang, C. G. Xu, K. D. Liu and M. A. Saghai Maroof (1996) : Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. *Theor. Appl. Genet.*, **93**, 1218-1224.
- 106) Zhao, M. F., X. H. Li, J. B. Yang, C. G. Xu, R. Y. Hu, D. J. Liu and Q. Zhang (1999) : Relationship between molecular marker heterozygosity and hybrid performance in intra- and inter-subspecific cross of rice. *Plant Breed.*, **118**, 139-144.

Heterosis for Seedling Growth in Bunching Onion (*Allium fistulosum* L.)

Takayoshi Ohara

Summary

Reducing production costs by mechanization and labor saving has become very important in the production of bunching onion (*Allium fistulosum* L.) in Japan. Machine-assisted transplanting of nursery plugs has recently become common because of its substantial saving of labor. However, bunching onion initially grows very slowly, and the nursery period is limited because of the small volume of the plug. Because very young and small seedlings are transplanted into the field, unfavorable weather such as drought or heavy rain can severely retard growth. Therefore, breeding of cultivars showing vigorous seedling growth using heterosis is anticipated. However, little is known about heterosis or the combining abilities in bunching onion. Furthermore, genetic and molecular studies in bunching onion are limited because of its severe inbreeding depression, long generation time, and huge genome size.

Accepted; August 23, 2010

Vegetable Breeding Research Team

360 Kusawa, Ano, Tsu, Mie, 514-2392 Japan

We evaluated heterosis for seedling growth in 11 cultivars of bunching onions belonging to the Senju, Kaga, Kujo, and Okunegi groups and 40 of their intervarietal F_1 progeny. For fresh weight of seedlings at 4 weeks after transplanting, heterosis over the mid-parent (the mean of the parents) ranged from -3% to 70% , with an average of 21% , and heterosis over the better parent ranged from -10% to 46% , with an average of 10% . High heterosis among F_1 hybrids occurred most frequently in the inter-group crosses of Senju \times Kujo, and high heterosis for practical use was also seen in some intra-group crosses within the Senju group. Root number, plant height, and relative growth rate also showed significant heterosis, but the response was less than that for fresh weight. The 11 parental cultivars were assayed for DNA polymorphism by using 128 amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) to estimate genetic distances (GDs). Cluster analysis of the parents based on GDs accorded with the traditional classification based on morphological and ecological characteristics. The GDs were correlated significantly with heterosis over the mid-parent for each seedling trait at 4 weeks after transplanting, but not with heterosis over the better parent. Consequently, these correlations are not applicable for predicting heterosis.

To gain information about the mode of inheritance of seedling growth rate in bunching onion, we conducted a diallel analysis using a 9×9 half-diallel cross involving various types of inbred lines. Fresh weight at the transplanting stage (7 weeks after sowing) showed a high broad-sense heritability (h_B^2) and a low narrow-sense heritability (h_N^2). The average degree of dominance was 1.50, suggesting that fresh weight at the transplanting stage is controlled by overdominant genes. The correlation between $V_r + W_r$ and P_r showed that dominant genes induced heavier weight. Fresh weight at 4 weeks after transplanting also showed a high h_B^2 , a low h_N^2 , and a very high average degree of dominance (3.10), indicating the presence of a higher level of overdominance. Plant height at both growth stages also showed overdominance. Dominant genes increased plant height. The value of h_N^2 was higher for plant height than for fresh weight, suggesting that the contribution of additive effects is larger for plant height than for fresh weight. The F_1 hybrids between the Senju and Kujo groups tended to show higher heterosis. The results suggest that the frequency of the dominant alleles that increased fresh weight was high in the Senju parental lines, whereas the frequency of those that induced an increase in plant height was high in the Kujo lines. This makes the Senju \times Kujo combination appropriate for quantitative trait loci (QTL) analysis of seedling growth.

We constructed the first genetic linkage map of bunching onion based on AFLP and simple sequence repeat (SSR) markers using a set of reciprocally backcrossed populations (BC_1) produced from two inbred lines, D (Senju) and J (Kujo). A linkage map of D constructed from the (J) BC_1 population comprises 186 markers—146 AFLPs, 3 cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS), and 37 SSRs—in 15 linkage groups (LGs) covering 1104 centimorgans (cM). A linkage map of J constructed from the (D) BC_1 population comprises 157 loci—117 AFLPs, 2 CAPS, and 38 SSRs—in 16 LGs covering 1068 cM. Neither map is saturated, but both are considered to cover most of the genome. Fifteen LGs in the two maps were connected by using co-dominant anchor markers: 37 SSRs and 2 CAPS.

QTLs for seedling weight were mapped on the reciprocal BC_1 maps to identify QTLs controlling seedling growth and to elucidate their modes of gene action. Fresh weights of seedlings of $BC_1 S_1$ families were measured in three seasons. Remarkable heterosis was observed in F_1 and many $BC_1 S_1$ families. Many QTLs for seedling weight were detected on the two maps by composite interval mapping. The phenotypic variation explained by a single QTL was $<25\%$. We consider four QTLs on four LGs to be consistently effective across different environmental conditions, because they were detected in different years and seasons. We expect these QTLs to be targets of marker-assisted selection for rapid seedling growth. Most QTLs were detected on one map but not in the corresponding region on the other map. We calculated the degree of dominance at each locus and observed overdominance at some loci. The other loci showed additive or dominant effects. The results suggest that the remarkable heterosis for seedling weight in our breeding population is based on the accumulation of dominant and overdominant gene actions.