

ニンニクの種子繁殖系統に関する研究

衛 藤 威 臣 (鹿児島大学農学部教授)

1. はじめに

ニンニクは重要香辛料作物であるが、野菜としても重要で、世界各地で生産・消費されている。世界的に見れば、日本の重要野菜であるネギ等より重要で、ネギ属作物のなかではタマネギに次ぐ生産量を誇る。しかし、重要であるにも拘わらずニンニクは作物として大きな欠点を有している。不稔で種子形成できないため、交雑育種が不可能な点である。第二の欠点として、球根によるウイルスの継代汚染が挙げられる。ニンニクは球根による栄養繁殖のため、通常、種子繁殖植物では問題とならない球根のウイルス継代汚染が年々深刻なものとなりつつある。そのため、種球の確保が困難となり、ニンニク生産そのものも低迷する結果となっている。このウイルスの継代汚染の問題は茎頂培養によるウイルスフリー株作出によって解決可能となったが、栽培する畑での再汚染の問題が残されている。

ニンニクは完全不稔の代表的作物として知られていたが、Etoh (1983) は稔性で種子を形成する個体を発見し、更にその後、推定一次起源地である中央アジアを二度にわたり探索し、多くの稔性系統を見出した。また、材料収集の過程で、育種上非常に有利な雄性不稔個体を発見した。これらの育種素材を用いて、以後、実用的な種子繁殖系統作出を試みているが、いくつかの隘路がある。一つは種子豊産系統が未だ見出されていない事であり、他の一つは種子形成の少ない原因が不明な点である。

ここでは、種子豊産系統探索のため、ニンニクの二次起源地とされる地中海沿岸地域のうち唯一、抽だい系統の存在が知られているスペイン・ポルトガル地方で材料を収集し、それらの稔性を調査すると共に、雄性不稔性と遺伝的に関連するDNA マーカー (RAPD マーカー) の探索を行い、更に、稔性系統の雌性器官の機能調査を試みた。

2. 材料と方法

スペイン・ポルトガル在来系統は1996年夏、現地でも収集した。従来からの収集系統を含めて、供試材料のニンニクは鹿児島大学の実験圃場で同年秋から栽培に供され、実験に用いられた。稔性を含めた生態調査は1996年から1998年にかけて行った。これらの系統は稔性確認のためのRAPD マーカーも適用した。DNA は若い葉をリーフパンチで打ち抜き、微量抽出する簡易法 (Hong et al. 1997) に従い、PCR に用いてRAPD 解析した。なお、PCR では Operon の OPJ-12プライマー (5'-GTCCCGTGGT-3') を用いた。また、核型分析は根端細胞を塩基性フクシンで染色するホルゲンおしつぶし法によった。稔性及び生態に関しては収集した全55系統について調査を行い、RAPD マーカー適用と核型分析は、そのうち30系統について行った (Table 1, 4)。

雄性不稔性に関して供試した材料は Table 2 に示した。No.200及びF316は過去の調査で雄性不稔性と確認されている系統である。DNA 抽出及びRAPD マーカー探索の方法は Hong et al. (1997) の方法に従った。PCR でスクリーニン

Table 1 Source, flower-bud formation, RAPD markers related to pollen fertility (Hong et al. 1997) and winter growth of Iberian garlic

No.	Accession	Source	Flower-bud formation	RAPD markers	Plant shape in winter
419	410/86	Spain	No formation	-	Erect type
422	879/86	Spain	No formation	-	Erect type
423	A.Campo	Spain	No formation	-	Erect type
424	A.Ibanez	Spain	No formation	-	Erect type
425	Alpujarras	Spain	No formation	-	Erect type
427	Cabra Monturque	Spain	No formation	-	Erect type
430	C.Rica	Spain	No formation	-	Erect type
432	D.Ramos	Spain	No formation	-	Erect type
433	E.Garcia	Spain	No formation	-	Erect type
434	Frio	Spain	No formation	-	Erect type
435	In vitro	Spain	No formation	-	Erect type
436	Isidoro Diaz	Spain	No formation	-	Erect type
437	J.Corral	Spain	No formation	-	Erect type
438	J.Garcia	Spain	No formation	-	Erect type
442	M.G.Victoria	Spain	No formation	-	Erect type
444	Morado de Cordoba	Spain	No formation	-	Erect type
445	N.Mora	Spain	No formation	-	Erect type
447	Rojo de Cuenca	Spain	No formation	-	Erect type
448	Rojo de Falces	Spain	No formation	-	Erect type
450	S.Moreno	Spain	No formation	-	Erect type
451	Ajo Rojo	Spain	No formation	-	Erect type
453	Alcazar S. J. M. 2	Spain	No formation	-	Erect type
454	Alcazar S. J. M. 3	Spain	No formation	-	Erect type
457	Segovia Market 1	Spain	No formation	-	Erect type
460	20/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type
461	21/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type
462	22/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type
463	23/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type
468	36/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type
470	40/96 A	Portugal	No formation	-	Erect type

グしたプライマーは **Table 3** に示した。

雌性生殖器官である胚珠の機能調査は成熟した花芽内部の胚珠細胞の構造観察によった。材料は稔性系統のニンニクで、固定・染色等の方法は Herr (1982) に従い、ノマルスキー微分干渉顕微鏡で、胚珠の発達と成熟期における 8 核の有無を観察することを試みた。

3. 結果と考察

3.1 スペイン・ポルトガル在来系統の稔性

1996年夏に現地にて収集した抽台及び不完全抽台系統は、同年秋に鹿児島で植え付けられた、翌年春まで順調な生育を示したが、いずれの系統も夏に至るまで花芽を分化することなく、また花軸が抽出することなく、枯死した (**Table 1**)。収穫さ

れた球根の内部には、珠芽のみ着性した短い花軸が観察されたので、すべて不完全抽台系統と考えられた。従来収集された不完全抽台系統はすべて不稔だったので、これらも不稔系統と推定された。

しかし、鹿児島の日長はこれらイベリア半島産のニンニクの抽台に不足した事も考えられるので、1997年秋に再度、材料を植え付け、冬季に葉の DNA を抽出して、新たに見いだされたニンニクの稔性に関連する RAPD マーカー (Hong et al. 1997) で稔性検定を行った。プライマーは材料と方法で述べた通りで、稔性と関連するマーカーは 0PJ-12₁₃₀₀ と 0PJ-12₁₇₀₀ (Hong et al. 1997) であったが、スペイン・ポルトガル在来系統に稔性のマーカーは全く検出されなかった (**Table 1**)。従って、これらの系統が不稔であることは、ほぼ確

Table 2 Floristic characters in garlic clones screened for RAPD markers

Cone	No. of flowers-buds	Anther color	Pollen fertility	OPE-09 ₆₀₀	Fertility
No.200	62	yellow	0%	-	male-sterile
F-316	176	yellow	0	-	male-sterile
No.390-2	215	yellow	0	-	male-sterile(?)
F-494	98	yellow	0	-	male-sterile(?)
No.387	236	yellow	0	dark colored	sterile
No.379	126	yellow	0	dark colored	sterile
No.393-2	202	yellow	0	dark colored	sterile
F-17	-	-	-	dark colored	sterile
F-19	-	-	-	dark colored	sterile
F-376	210	yellow	0	dark colored	sterile
F-476	181	yellow	0	dark colored	sterile
No.384	186	yellow	0	dark colored	sterile
F-517	130	yellow	0	dark colored	sterile
No.395-2	229	yellow	0	dark colored	sterile
F-150	252	yellow	0	dark colored	sterile
No.386	252	purple	83.3	dark colored	fertile
No.390-1	312	purple	94.0	dark colored	fertile
No.391-1	241	purple	90.3	dark colored	fertile
No.393-1	288	purple	89.7	dark colored	fertile
No.398	292	purple	61.0	dark colored	fertile
F-138	268	purple	54.7	light colored	fertile
F-294	332	purple	72.0	light colored	fertile
F-308	345	purple	81.3	light colored	fertile
F-437	320	purple	68.0	dark colored	fertile
No.14	No flower-bud formation (bolting)			light colored	sterile
No.31	No flower-bud formation (bolting)			light colored	sterile
No.2	No flower-bud formation (bolting)			light colored	sterile
No.6	No flower-bud formation (incomplete bolting)			light colored	sterile
No.56	No flower-bud formation (non-bolting)			light colored	sterile
No.57	No flower-bud formation (non-bolting)			light colored	sterile

Table 3 RAPD primers used for screening male sterile garlic clones (Operon Technologies)

Code	5' to 3'	Code	5' to 3'	Code	5' to 3'
OPE-01	CCCAAGGTCC	OPK-01	CATTCGAGCC	OPH-01	GGCTGGAGAA
OPE-02	GGTGCGGAA	OPK-02	GTCTCCGCAA	OPH-02	TCGGACGTGA
OPE-03	CCAGATGCAC	OPK-03	CCAGCTTAGG	OPH-03	AGACGTCCAC
OPE-04	GTGACATGCC	OPK-04	CGCCCAAAC	OPH-04	GGAAGTCGCC
OPE-05	TCAGGGAGGT	OPK-05	TCTGTCGAGG	OPH-05	AGTCGTCCCC
OPE-06	AAGACCCCTC	OPK-06	CACCTTTCCC	OPH-06	ACGCATCGCA
OPE-07	AGATGCAGCC	OPK-07	AGCGAGCAA	OPH-07	CTGCATCGTG
OPE-08	TCACCACGGT	OPK-08	GAACACTGGG	OPH-08	GAAACACCCC
OPE-09	CTTACCCEGA	OPK-09	CCCTACCGAC	OPH-09	TGTAGCTGGG
OPE-10	CACCAGGTGA	OPK-10	GTGCAACGTG	OPH-10	CCTACGTGAG
OPE-11	GAGTCTCAGG	OPK-11	AATGCCCCAG	OPH-11	CTTCCGCGAGT
OPE-12	TTATCGCCCC	OPK-12	TGGCCCTCAG	OPH-12	ACGGCAGTGT
OPE-13	CCCGATTCCG	OPK-13	GGTTGTACCC	OPH-13	GACGCCACAC
OPE-14	TGCGGCTGAG	OPK-14	CCCCTACAC	OPH-14	ACCAGGTTGG
OPE-15	ACGCACAACC	OPK-15	CTCCTGCCAA	OPH-15	AATGGCCGAG
OPE-16	GGTGACTGTG	OPK-16	GAGCGTCGAA	OPH-16	CTTCCGCTGG
OPE-17	CTACTGCCGT	OPK-17	CCCAGCTGTG	OPH-17	CACTCTCCTC
OPE-18	GGAGTCGAGA	OPK-18	CCTAGTCGAG	OPH-18	GAATCGGCCA
OPE-19	ACGGCGTATG	OPK-19	CACAGCCGGA	OPH-19	CTGACCAGCC
OPE-20	AACGGTGACC	OPK-20	GTGTCCGGAG	OPH-20	GGGAGACATC
OPI-01	ACCTGGACAC	OPI-02	GGAGGAGAGG	OPI-03	CAGAAGCCCA
OPI-04	CCGCCTAGTC				

Table 4 Karyotypes of the garlic clones collected in Spain and Portugal

No.	(Number of observed cells) × (Karyotype)		Total cells
	Basic karyotype	Derived karyotypes from the basic karyotype	
419	0	1 × (11m + 2sm ₁ ^{sc} + 3sm), 2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	3
422	4		4
423	0	1 × (12m + 2sm ₂ ^{sc} + 2sm), 2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	3
424	0		0
425	1	1 × (11m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 2sm)	2
427	2	1 × (11m + 2sm ₁ ^{sc} + 3sm)	3
430	1	1 × (8m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 5sm)	2
432	2		2
433	2		2
434	0	2 × (10m + 2sm ₂ ^{sc} + 4sm), 2 × (10m + 1sm ₂ ^{sc} + 5sm)	4
435	0	1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 3sm), 1 × (12m + 2sm ₂ ^{sc} + 2sm)	2
436	1	1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 5sm)	2
437	0	1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 5sm), 1 × (11m + 2sm ₁ ^{sc} + 3sm)	2
438	0	1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 5sm)	1
442	0	1 × (8m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 5sm)	1
444	0	2 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 3sm)	2
445	0	1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm), 2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	3
447	3	2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	5
448	0	3 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm), 1 × (8m + 2sm ₁ ^{sc} + 6sm)	4
450	0	1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 2sm), 1 × (12m + 2sm ₂ ^{sc} + 2sm)	2
451	0	1 × (11m + 2sm ₁ ^{sc} + 3sm), 1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 5sm)	2
453	0	2 × (10m + 2sm ₂ ^{sc} + 4sm)	2
454	0	1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm), 1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm), 1 × (10m + 1sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 3sm)	3
457	1	1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	2
460	0	2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm)	2
461	3	1 × (12m + 1sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 2sm)	4
462	1	1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 4sm)	2
463	0	2 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm), 2 × (11m + 1sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm)	4
468	0	1 × (11m + 1sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm), 1 × (9m + 2sm ₁ ^{sc} + 2sm ₂ ^{sc} + 3sm)	2
470	1	1 × (10m + 2sm ₁ ^{sc} + 1sm ₂ ^{sc} + 3sm)	2



Fig.1 Idiogram of the basic karyotype in garlic (Etoh 1985)

実になった。恐らく、起源地である中央アジアから非常に離れて位置し、乾燥して冬暖かなスペイン・ポルトガルでは、ニンニクは生殖生長より栄養生長が旺盛で、球根形成にすぐれる系統のみ伝播したか、それらが結果として選抜されていったかの、どちらかであろう。

ニンニクの16本の染色体は、10本の長い若しく

はやや長い中部染色体、2対(4本)のやや長い次中部付随体染色体、及び1対(2本)の短い次中部染色体を有し(Fig.1)、体細胞染色体の基本核型は次の様に表される(Etoh 1985)。

$$K(2n) = 10m + 2sm_1sc + 2sm_2sc + 2sm$$

過去、報告されたニンニクの核型の多くは、この基本核型で表されるが、この核型からの派生型若しくは変異型も多く見られる(Etoh 1985, 1996)。しかし、稔性系統の核型は常に基本核型であった(Etoh 1983, 1996, Hong et al. 2000)。また、稔性系統は減数分裂で常に8個の二価染色体を形成した(Etoh 1996)が、ここで供試したスペイン・ポルトガル在来系統は花芽を形成しな

いので、ここでは核型から可稔・不稔を推定することとした。核型分析の結果は Table 4 に示した。スペイン・ポルトガル在来系統では基本核型を示す系統は少なく、基本核型からの派生型若しくは変異型が多く見られた。これまでの観察結果から、この基本核型からの派生型若しくは変異型が見られる系統は不稔であることが判明している (Etoh 1985, 1996)。それらは生殖成長を全く行わず、栄養成長を永年続けた結果だと考えられるが、供試材料のスペイン・ポルトガル在来系統も不稔であることが推定された。

スペイン・ポルトガル在来系統は生育の面からも、不稔系統と同じ生態を示すことが明らかとなった。過去、収集された稔性系統は全て冬季に葉は生育を停止し、地に這う匍匐性を示した。冬季、葉が立性を示した系統は全て不稔であった (Etoh 1986, Hong and Etoh 1996)。収集されたスペイン・ポルトガル系統も冬季に葉の生育は停止せず、立性を示した (Table 1)。不稔であることが、この点からも推察される。

以上の結果から、収集されたスペイン・ポルトガル在来系統は全て不稔であることが明らかとなった。これらの系統はスペイン、ポルトガルのジーンバンク (遺伝子銀行) を通じて収集したものであり、いずれもニンニクあるいはネギ属の専門家によって収集されたものである。彼らによれば、イベリア半島には他に抽台系統は存在しないとのことである。従って、イベリア半島には稔性のニンニクが全く存在しないことが明らかとなった。従来の研究 (Etoh et al. 1992) も併せて考察すると、ニンニクの2次起源地とされる地中海沿岸地域には、全く稔性のニンニクが存在しないことも明らかとなった。

3.2 雌性不稔と関連する RAPD マーカーの探索

雌性不稔、稔性、不稔を含め30系統に64種類の10塩基プライマーを適用した (Table 3)。その結

果、No.200及び F316の雌性不稔系統にだけ特異的なバンドは検出出来なかった。しかし、No.390-2及び F494を含めた4系統にだけ特異的に現れないバンドが見いだされた。No.390-2及び F494は稔性花粉は生じないが、子房の肥大は観察された系統である。これら2系統は開花期が稔性系統より早く、稔性の花粉を受粉出来ず、従って種子形成が確認されていないため雌性不稔が未だ確認できていない系統である。しかし、開花後、暫く子房肥大することは観察されているので、雌性不稔である可能性が非常に高い系統である。これら4系統にだけ現れない特異的なバンドが見いだされた (Table 2) が、プライマーは OPE-09 で位置は600bp 付近だったので、OPE-09₆₀₀と名付けた。雌性不稔個体にだけ現れないマーカーがあり得るか否かは論議のある点であるが、今後、実験を重ねることで雌性不稔と真に関連があるあるかを詰めてゆきたい。

試みに、このマーカーを前述の不稔と判定されたスペイン・ポルトガル在来30系統に適用したところ、全てに検出された。少なくとも不稔の系統には常に検出されるのであろう。また、イベリア半島産のニンニクの中には雌性不稔系統すらないことが推察される。

3.3 雌性生殖器官の機能調査

雌性生殖器官は材料と方法で述べた実験方法及びその修正方法で試みたが、1998年夏に形成された稔性系統の花芽では、全く観察出来なかった。手法・技術に問題があったのかもしれない。そのため、今年、1999年になって、ダイコン、タマネギの花芽等を用いて手法・技術の完成に努めたところ、ようやく胚珠の内部の核などが観察出来るようになってきた。ここでは期日の関係で報告出来ないが、1999年夏のニンニクの花芽の雌性生殖器官の観察は恐らく可能になるものと期待している。

4. おわりに

ニンニクの種子繁殖系統の変異幅の拡大と種子豊産系統探索のため、スペイン・ポルトガル在来系統を収集したが、イベリア半島産のニンニクに稔性の種子繁殖系統は存在しなかった。この結果から考えて、ニンニクの2次起源地とされる地中海沿岸地域に種子繁殖系統が存在しないことが推察される。また、種子繁殖系統の育種に非常に有効な雄性不稔と関連するDNA (RAPD) マーカーを探索したところ、恐らく雄性不稔個体だけ現れないマーカーが検出された。ニンニクの雌性生殖器官の機能は手法が不的確であったこともあり1998年に観察できなかったが、手法改良に努めた結果、1999年の材料では観察可能となりつつある。

上記の一連の研究は研究室の大学院生の力によってところが大きかった。渡邊英城、洪重健の両君に心から感謝したい。また、この研究に十分な助成金を御援助戴いた浦上食品・食文化振興財団に心から感謝申し上げたい。

文 献

- 1) Etoh, T. (1983) Germination of the seeds obtained from a clone of garlic, *Allium sativum* L. Proc. Japan. Acad., 59 B (4) :83-87
- 2) Etoh, T. (1985) Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ., 21: 77-132
- 3) Etoh, T. (1986) Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 55 (3) : 312-319
- 4) Etoh, T., T. Johjima and N. Matsuzoe (1992) Fertile garlic clones collected in Caucasia. Proc. International Symposium The Genus *Allium*-Taxonomic Problems and Genetic Resources, 49-54
- 5) Etoh, T. (1996) Cytogenetics in garlic. Proc. International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, 108-115
- 6) Herr, J.M. (1982) An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids. Stain Tech., 57 (3) : 161-169
- 7) Hong, C.-j. and T.Etoh (1996) Fertile clones of garlic (*Allium sativum* L.) abundant around the Tien Shan Mountains. Breeding Science, 46: 349-353
- 8) Hong, C.-j., T.Etoh, B.Landry and N.Matsuzoe (1997) RAPD markers related to pollen fertility in garlic (*Allium sativum* L.). Breeding Science, 47: 359-362
- 9) Hong, C.-j., H. Watanabe, T. Etoh and S. Iwai (2000) Comparison of garlic clones between the center of origin and the westernmost area of distribution. Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ., 36 (in print)

Studies on Garlic Clones Capable of Seed Production

Takeomi Etoh (Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

Garlic, *Allium sativum* L., is a well-known condiment plant and vegetable crop, but it is propagated vegetatively by bulbs. Because of vegetative reproduction, garlic was not bred by crossing, and virus transmission through bulbs is a big problem for the garlic growers. The author discovered several fertile garlic clones only in Central Asia, the center of origin, in 1983 and the following years. However, those clones do not produce enough amounts of seeds. In order to search more fertile clones, the garlic clones were collected in Iberian Peninsula. Spain of this peninsula is the only one country of the Mediterranean area that is known to have bolting clones of garlic.

Thirty collected clones were raised in Kagoshima and the fertility was examined. They bolted incompletely and the flower stems remained in the bulbs without complete growth like other sterile clones. The RAPD markers related to garlic pollen fertility were applied to those collected clones, but the markers were not detected in those clones, showing that no fertile clones exist in Spain and Portugal. Their karyotypes of chromosomes were also analyzed and most of them showed derived types from the basic karyotype of garlic, showing most of them are sterile. Their growing behavior during winter was similar to that of sterile clones examined previously. These results indicated that no fertile clones exist not only in Spain and Portugal but also in the Mediterranean area.

RAPD markers for garlic male sterility which is very useful for cross-breeding were also searched using 30 clones and 64 primers. The marker common to two male-sterile clones was not detected, but one marker named OPE-09₆₀₀ was not detected only in the four clones including two male-sterile clones and two other clones with a high probability of male-sterility.

There is a possibility that the female reproductive organ, ovule, of fertile garlic does not function well, and because of this those fertile garlic maybe produces only small amount of seeds. The anatomical research on the ovule was tried using a differential interference microscope, but the inside of the ovule was not successfully observed yet. This research is continued.