

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19580032
研究課題名（和文） 伝統野菜ワケギの食感形成に関与する遺伝子の同定と葉ネギ育種への応用
研究課題名（英文） Identification of genes related to textures in Wakegi onion and its application to breeding for bunching onion
研究代表者 執行 正義（SHIGYO MASAYOSHI） 山口大学・農学部・准教授 研究者番号：40314827

研究成果の概要：ワケギの独特な肉質や食感、風味などは葉ネギには無い優れた形質である。それらの形質を葉ネギに導入することが出来れば新しい品種の育成が可能になる。本研究により、ワケギ独特の食感形成に係わる成分はプロトペクチンおよび水溶性ペクチンであり、それらの代謝関連遺伝子（ペクチンメチルエステラーゼ、ポリガラクトナーゼ）の染色体上での所在が明らかとなるなど、ワケギ独特の食感を有するネギの育成に利用可能な知見が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学 / 園芸学・造園学

キーワード：野菜、ネギ属、染色体工学、食感形成、ペクチン

1. 研究開始当初の背景

ワケギはネギを母親にシャロット（分球性タマネギ）を花粉親にもつ雑種第1代として起源したとされる。本種は耐寒性はあまりないが、低温伸長性に優れるので、わが国では西日本において秋から春にかけて栽培されている。その葉は柔らかく甘味に富み、独特な香りをもつので、酢味噌和え(ぬた)、汁の実、雑煮・雑炊の具あるいは薬味として古くから珍重されてきた。近年の食生活の多様化に伴って葉ネギ類の需要は急増しているにもかかわらず、ワケギの需要・供給はその生

態的特性および消費方法の特殊性のためにほとんど伸びていない。そこで、本研究では、ワケギを育種素材として活用することを考え、ワケギの優れた風味や栄養性を取り込んだ新しい葉ネギ系統を育成することを試みた。

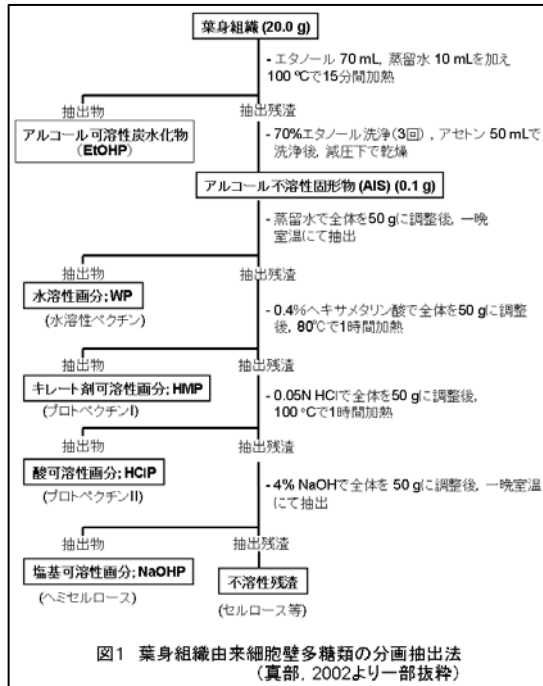
2. 研究の目的

ワケギ独特の食感形成に関与する遺伝子の同定と葉ネギ育種への応用に関する検討を行う。

3. 研究の方法

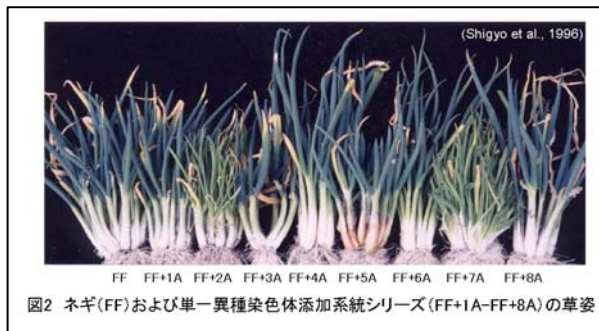
(1) ワケギ特有の食感に関する内容化学成分の同定

ワケギ (*Allium x wakegi* Araki) 3 品種 (‘広島 2 号’, ‘寒知らず’, ‘木原晩生 1 号’) および葉ネギ (*A. fistulosum* L.) 3 品種 (‘FDH’, ‘九条細’, ‘雷王ネギ’) の葉身組織から、真部 (2001) の手法 (図 1) に従って細胞壁多糖類の分画抽出を行い、ネギとワケギの成分組成の違いを調査した。各画分に含まれるペクチンはカルバゾール硫酸法によりガラクトロン酸当量として算出した。



(2) 特有内容成分の生産に関する遺伝系の解明

シャロット (*A. cepa* L. *Aggregatum* group) 由来染色体 (1A~8A) を 1 本ずつ添加した 8 種類のネギ系統 (図 2, FF+1A~FF+8A; 以下添加系統) を用いて①と同様に細胞壁多糖類の分画を行い、ワケギと類似する多糖類プロフィールを示す系統の選抜を行った。



(3) 特有成分の生産に関する遺伝子の DNA 多型解析

野菜の食感形成に係わる炭水化物としてペクチンがあるが、ペクチンの代謝関連酵素であるペクチンメチルエステラーゼ (PE) およびポリガラクトナーゼ (PG) のタマネギ由来の遺伝子配列情報を元にプライマーを作成した。作成したプライマーをワケギの両親種である葉ネギとシャロット、さらに、添加系統シリーズの DNA 多型解析に適用して各遺伝子が座乗するシャロット染色体を決定した。

(4) 二染色体添加系統シリーズの作出

ワケギと類似する多糖類プロフィールを示す添加系統、もしくは、添加染色体上にペクチン代謝関連遺伝子を有する系統の染色体を倍加して、‘特定の異種染色体を一对もつ 4 倍性ネギ系統’ (4 倍性二染色体添加系統; T-Dia) を作出した。作出した 4 倍性二染色体添加系統にネギを戻し交配することで、添加染色体由来の特徴的な多糖類プロフィールを有する新規ネギ F₁ 系統の作出を試みた。

(5) ワケギ由来特有成分形質を導入した

葉ネギ系統の開発

ワケギの染色体倍加処理により作出したワケギ複二倍体 (ゲノム構成 AAF'F') に葉ネギ (FF) を戻し交雑することで得た異質 3 倍体 (AF'F) に、さらに葉ネギを二回戻し交雑することで、ワケギ由来の F'ゲノム領域が理論上 1/8 まで減少した 2 倍性 BC₃ 個体 (2n=16) を作出した。次に、得られた BC₃ 個体のペクチンを分析し、ワケギと類似する組成を示す個体の選抜を行った。

4. 研究成果

(1) 代表的なワケギ 3 品種と葉ネギ 3 品種の葉身由来細胞壁多糖類 (ペクチン) の分画および定量を行った (図 3)。調査したワケギ 3 品種内および葉ネギ 3 品種内でのペクチン含量の品種間差異はみられなかった。全ペクチン含量をワケギと葉ネギ間で比較すると、ワケギの含量が多いことが明らかになった (図 3)。各植物のペクチン組成を比較すると、アルコール可溶性炭水化物 (EtOHP) では葉ネギの含量の方が高いものの、水溶性画分 (WP) およびキレート剤可溶性画分 (HMP) ではワケギの方が高かった。両種間で酸可溶性画分 (HCIP) および塩基可溶性画分 (NaOHP) のペクチン含量に差はみられなかった。このことから、ワケギ独特の食感形成には、キレート剤可溶性画分に含まれるプロトペクチンおよび水溶性画分に含まれる水溶性ペクチンの含有量が強く関係することが示唆された。

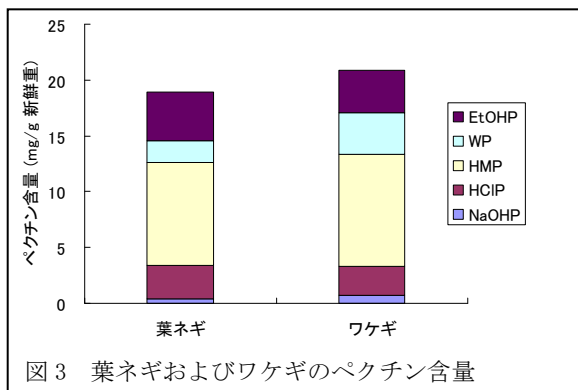


図3 葉ネギおよびワケギのペクチン含量

(2) 添加系統シリーズにおけるペクチン含量の周年変化を調査した結果、葉ネギとワケギの中間的なペクチン組成を示す系統が多くみられた (図4)。対照区の葉ネギと異なるペクチン含量の変動を示した FF+7A および FF+8A では、秋口にプロトペクチン (HMP 画分) と水溶性ペクチン (WP 画分) の著しい増加が認められ、その後急速に減少することが明らかになった。このため、プロペクチンの代謝に関与する遺伝子はシャロットの7Aと8A染色体に存在することが示唆された。また、冬期のFF+2AおよびFF+4Aは対照区の葉ネギと比べて、プロトペクチンと水溶性ペクチンが共に高い値で推移する傾向が認められた。これらのことから、シャロットの2Aおよび4A染色体上にもペクチン代謝関連遺伝子が存在することが示唆された。

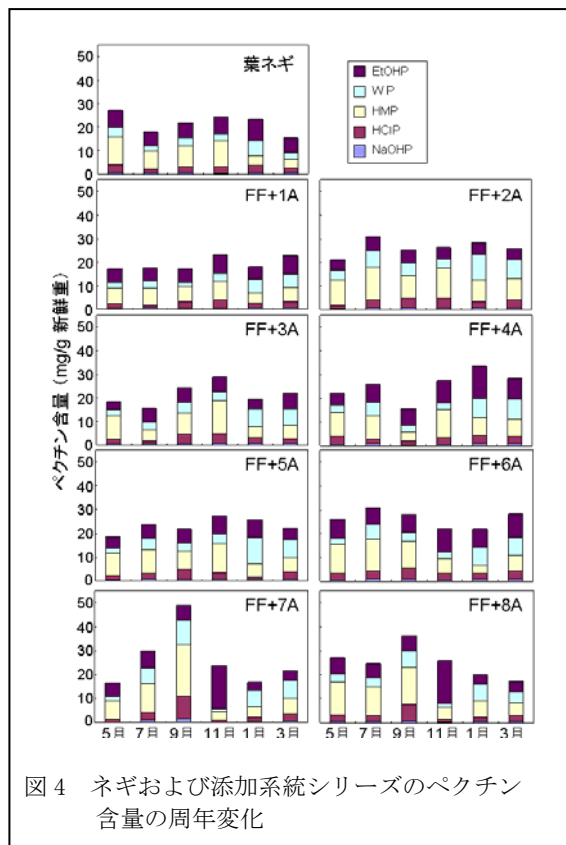


図4 ネギおよび添加系統シリーズのペクチン含量の周年変化

(3) タマネギ由来 cDNA 配列データベース (DFCI - *A. cepa* Gene Index; <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=onion>) 上のペクチン代謝関連酵素遺伝子 (PE, PG) 配列情報よりプライマーセットを作成した。葉ネギおよびシャロットの全DNAとプライマーセットを用いてPCR-RFLP分析を行ったところ、両種間で多型が認められた。そこで、添加系統シリーズに適用したところ、PEはシャロットの7A染色体に、PGは4A染色体上にそれぞれ座乗することが明らかになった (図5)。秋から冬にかけてみられたFF+7Aのペクチン含量の急減は、PEが関与したことが示唆された。また、冬期のFF+4Aにおいて、PGの働きを受け難溶性のペクチンが分解され、プロトペクチンおよび水溶性ペクチンが増加したことが示唆された。

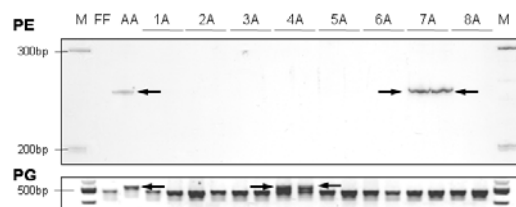


図5 ペクチンメチルエステラーゼ (PE) およびポリガラクトナーゼ (PG) 遺伝子のPCR-RFLP分析
FF: 葉ネギ, AA: シャロット, 1A-8A: 添加系統 (FF+1A-FF+8A), M: 100 bp DNA Ladder.

(4) 上記の研究[(1)~(3)]より、シャロットの2A、4A、7Aおよび8A染色体はペクチン代謝に関与することが明らかとなったので、これらをそれぞれ有する添加系統の染色体を倍加して4倍性二染色体添加系統 (T-Dia) の作出を試みた。コルヒチン添加培地を用いた茎頂培養による染色体倍加処理は、既に4倍性二染色体添加系統が作出されている二つの系統 (FF+1A, FF+5A) を除く系統を用いて行った。その結果、2A、4A、6Aおよび8Aをそれぞれ一対もつ4倍性二染色体添加系統 (T-Dia-2A, -4A, -6A, -8A) の作出に成功した (表1)。倍加したT-Diaの中で旺盛な生育を示し、花芽形成および開花にまで至った3系統 (T-Dia-2A, -4A, -6A) を種子親 (♀) に用い、葉ネギ (♂) を戻し交雑した。その結果、T-Dia-2Aから5個体、T-Dia-4Aから2個体、さらに、T-Dia-6Aから5個体の後代が得られた (表2)。これらは親系統由来の特徴的なペクチン組成を受け継いでいる可能性を有することから、T-Diaを‘ワケギ的な食感をもつ葉ネギ品種’の開発に利用することが期待される。

植物材料	培養莖頂数	再生個体数	倍加個体数
FF+2A	50	16	4
FF+3A	20	1	0
FF+4A	20	5	1
FF+6A	18	7	2
FF+7A	40	8	0
FF+8A	40	10	3

親系統	種子形成 胚種率 (%)	発芽率 (%)	生存数
T-Dia-2A	0.4	38.9	5
T-Dia-4A	1.9	62.5	2
T-Dia-6A	1.7	42.9	5

(5) ワケギ由来異質三倍体 (AF³F) に葉ネギを二回戻し交雑して得られた 116 個体の 2 倍性 BC₃ (I-1~I-116) の中で旺盛な生育を示した個体のペクチン含量を測定した。調査した 7 個体 (I-24,-25,-26,-28,-29,-30,-31) の BC₃ の含量をワケギおよび葉ネギと比較すると、全ペクチン含量は著しく低かったが、全ペクチンに占めるプロトペクチンの割合が高い系統 (I-24,-25) が含まれていた。これらのペクチン組成はワケギと類似していた。したがって、本手法はワケギの食感を有するネギ系統を作出する有力な手段の一つといえるだろう (図 6)。

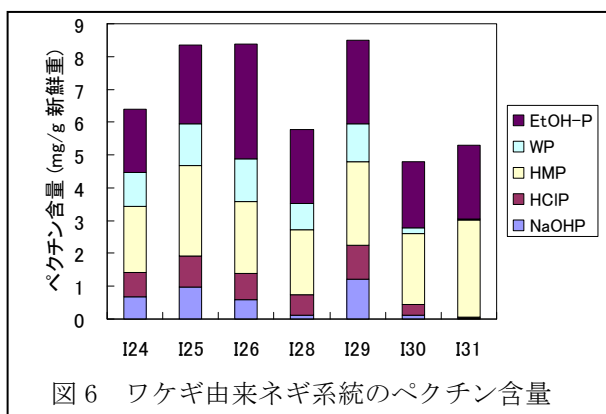


図 6 ワケギ由来ネギ系統のペクチン含量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 浦川真也・谷口成紀・稲田佳奈子・執行

正義・山内直樹. (2009) 栄養繁殖性野菜ワケギ由来の形質を導入した葉ネギ系統の開発. 園芸学会平成 21 年度春季大会. 園学研. 8 (別 1) : pp. 125. (明治大学, 2009 年 3 月 19 日)

(2) 浦川真也, 谷口成紀, 稲田佳奈子, 山内直樹, 執行正義. (2008) ワケギとネギにおける炭水化物組成の比較. 園芸学会平成 20 年度秋季大会. 園学研. 7 (別 2) : pp. 189. (三重大学, 2008 年 9 月 28 日)

(3) Yaguchi, S., Inada, K., Onodera, S., Shiomi, N., Yamauchi, N. and Shigyo, M. (2008) Effect of a Single Alien-Chromosome from Shallot on Nondigestible Carbohydrate Production in Leaf Bunching Onion. 5th Int. ISHS Symp. on Edible Alliaceae (ISEA), Dronten. (October 30, 2007)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

URL:

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~shigyo/newhp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

執行 正義 (SHIGYO MASAYOSHI)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号 : 40314827

(2) 研究分担者

山内 直樹 (YAMAUCHI NAOKI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号 : 60166577