

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07645

研究課題名(和文) Solanum macrocarponの細胞質を用いたナス雄性不稔系統の育成

研究課題名(英文) Development of the male sterile line of eggplant using the cytoplasm of Solanum macrocarpon

研究代表者

一色 司郎 (Isshiki, Shiro)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：40253588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Solanum macrocarponの細胞質を利用したナスの新たなCMS系統の育成を目指した。S. macrocarponとナスのF1が不稔であるため、本研究ではF1をコルヒチン処理し複二倍体を作成し、さらに複二倍体を自殖し、複二倍体自殖実生を作成した。これら複二倍体経由の個体を用いてS. macrocarponの細胞質をもつ雄性不稔系統の開発を目指した。その結果、S. macrocarponの細胞質を利用したナスの細胞質置換系統は葯の裂開がない雄性不稔性を有しており、今後、新たなナスの雄性不稔系統の開発が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義や社会的意義は、ナスにおいてコルヒチン核置換法によっても雄性不稔系統の開発を目指すことができた点である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a new CMS line of eggplant using the cytoplasm of Solanum macrocarpon. Since F1 of S. macrocarpon and eggplant is sterile, in this study, F1 was treated with colchicine to produce the amphidiploid, and then the amphidiploid was self-propagated to produce self-fertilized seedlings of the amphidiploid. Using these seedlings from the amphidiploid, we aimed to develop a male sterile line with the cytoplasm of S. macrocarpon. As a result, the cytoplasmic replacement line of eggplant using the cytoplasm of S. macrocarpon has male sterility without anther dehiscence, and the development of a new male sterility line of eggplant can be expected in the future.

研究分野：園芸科学

キーワード：コルヒチン核置換法 細胞質雄性不稔 Solanum macrocarpon ナス 複二倍体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私の研究室では、栽培ナスにナス近縁なナス属野生種の細胞質を導入することによって、6種類のCMS系統を開発することに成功している。しかしながら、長期にわたる商業ベースでの雄性不稔の利用によるF1品種の開発・種子生産を行う場合、限定された数の雄性不稔のみを利用するのは、潜在的风险がある。そこで、本研究では *Solanum macrocarpon* の細胞質を利用したナスの雄性不稔系統の開発を目指した。

2. 研究の目的

私の研究室では、これまでに6種類のナスの雄性不稔系統の開発に成功している。この異種細胞質の栽培種への導入のために、最も基本的な一つの方法として、戻し交雑核置換法、すなわち、野生種を種子親(細胞質親)、栽培種を花粉親(核親)として作出したF1に栽培種を花粉親とする連続戻し交雑を行っていく方法であるが、これを使って当研究室では6種類のCMS系統の開発に至っている。戻し交雑核置換法を行う際、F1に栽培種を交配して戻し交雑第一代(BC1)を得なければならないが、BC1が得られない場合、本手法は用いることができない。今回、*S. macrocarpon* の細胞質を利用したナスの新たなCMS系統の育成を目指しているが、*S. macrocarpon* とナスのF1が不稔であるため、戻し交雑核置換法によるナス細胞質の置換ができない。異種細胞質の栽培種への導入のための他の方法として、コルヒチン核置換法がある。コルヒチン核置換法とは、コルヒチン等によって両親の複二倍体を育成し、これが可稔である場合に、栽培種を連続戻し交雑を行っていく方法である。本研究ではF1をコルヒチン処理し複二倍体を作成し、さらに複二倍体を自殖し、複二倍体自殖実生を作成した。これら複二倍体経由の個体を用いて *S. macrocarpon* の細胞質をもつ雄性不稔系統の開発を目指した。

3. 研究の方法

Solanum macrocarpon を種子親、ナス 'Uttara' を花粉親として作出したF1、F1の複二倍体、複二倍体の自殖実生、複二倍体の自殖実生に 'Uttara' を花粉親として戻し交雑を行いBC1およびBC2を作成した。なお、戻し交雑後代に関しては、BC1を3個体、BC2を1個体用い、比較材料として、種子親である *S. macrocarpon*、花粉親である 'Uttara' を用いた。

まず、花粉のアセトカーミン染色率についてであるが、各供試個体について1株あたり5花を採取し、その葯から花粉をスライドグラス上に落とし、濃度1%(w/v)のアセトカーミン染色液で染色した後、生物顕微鏡下で観察を行い、染色性が良好で勝つ形態的に正常な花粉の割合を調査した。人工培地上での花粉発芽率は、各供試個体について1株あたり5花を採取し、その葯から花粉を人工培地(寒天 10g/l、スクロース 50g/l、ホウ酸 0.05g/l)に散布し、25の明所に4時間以上放置した後、培地をスライドグラスに乗せ、生物顕微鏡下で観察を行い、花粉が発芽し、花粉管の伸長している花粉の割合を調査した。

つぎに、結果率、1果あたりの種子数および種子発芽率について、各供試個体に対して、'Uttara' の花粉を用いて開花当日に花粉の人工授粉および袋がけを行い、約1ヶ月後に結果率を調査した。また、人工授粉から約2ヶ月経過し、果実が十分に成熟した頃に、果実を収穫した。その後、果実から種子を全て取り出し、1果あたりの種子数を調査した。種子発芽率は、得られた種子を播種し、約1ヶ月後に調査した。

さらに、細胞質の同定をするために、それぞれの供試個体の葉より抽出したtotal DNAに対して細胞質DNA(ミトコンドリアDNAおよびクロロプラストDNA)のPCR-RFLP分析を行った。本研究では、BC2の葉より抽出したtotal DNAを材料として用い、比較材料として、種子親である *S. macrocarpon*、花粉親である 'Uttara' の葉より抽出したtotal DNAを用いた。

クロロプラストDNAのPCR-RFLP分析を *rbcL*-ORF106領域において行った。抽出したtotal DNAを鋳型として、クロロプラストDNAの *rbcL*-ORF106領域を、プライマー *rbcL*:5'-ATGTCACCAACAACAGAACTAAAGCAAGT-3' とプライマー-ORF-106; 5'-ACTACAGATCTCTACTACCC-3' を用いてPCRにより増幅させた。反応液組成(50 μ l)は滅菌水 35.65 μ l、10 \times PCR buffer 5.0 μ l、dNTP mixture(2.5mM)2.0 μ l、TaqDNA polymerase(units/ μ l)0.25 μ l、プライマー0.35 μ l、鋳型DNA6.4 μ lとした。反応条件は、熱変性 92 1分、アニーリング 55 1分、伸長 70 4分の35サイクルとし、最後にポストヒーティング 70 7分で行った。増幅産物は *Rsa* によって酵素処理し、エチジウムブロマイドを含む1.5%アガロースゲルで電気泳動後、UV照射下で多型を検出した。

ミトコンドリアDNAのPCR-RFLP分析

ミトコンドリアDNAのPCR-RFLP分析を、V7領域において行った。抽出したtotal DNAを鋳型として、ミトコンドリアDNAのV7領域を、プライマー *mtV7p1*:5'-TATGAACAACAACAACCTGTCTTTAACGGGATGG-3' とプライマー *mtV7p2*:5'-GCGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAG-3' を用いてPCRにより増幅した。反応液組成(50 μ l)は滅菌水 37.3 μ l、10 \times PCR buffer 5.0 μ l、dNTP mixture(2.5mM)4.0 μ l、TaqDNA polymerase(units/ μ l)0.2 μ l、プライマー0.5 μ l、鋳型DNA2.5 μ lとした。反応条件は、熱変性 94 1分、アニーリング 57 1分、伸長 72 2分の35サイクルとし、最後にポストヒーティング

72 5分で行った。増幅産物は ScrF によって酵素処理し、エチジウムブロマイドを含む 1.5% アガロースゲルで電気泳動後、UV 照射下で多型を検出した。

4. 研究成果

花粉のアセトカーミン染色率を調査した結果、*S. macrocarpon* が 94.5%、‘Uttara’が 97.4%、が 7.6%、複二倍体が 17.7%、複二倍体自殖実生が 22.3%、BC₁ が 38.3%、BC₂ が 25.2%であった。人工培地上での花粉発芽率を調査した結果、*S. macrocarpon* が 68.2%、‘Uttara’が 77.2%、F1 が 0.3%、複二倍体が 2.1%、複二倍体自殖実生が 0.3%、BC1 が 1.1%、BC2 が 0%であった（第 1 表）。

第 1 表 . *Solanum macrocarpon* 後代の花粉染色率および花粉発芽率.

供試材料	花粉染色率 (%)	花粉発芽率 (%)
<i>Solanum macrocarpon</i>	94.5	68.2
ナス‘Uttara’	97.4	77.2
F1	22.3	0.3
複二倍体	7.6	0.3
複二倍体自殖実生	17.7	2.1
BC1	38.3	1.1
BC2	25.2	0

結果率を調査した結果、F1 が 0%、複二倍体が 76.1%、複二倍体自殖実生が 72.1%、BC1 が 10.0%、BC2 が 37.2%であった。1 果当たりの種子数は、複二倍体が 0.1 個、複二倍体自殖実生が 0.1 個、BC1 が 5 個、BC2 が 0 個であった。種子発芽率は、F1 が 20.0%、複二倍体自殖実生が 40.0%、BC1 が 45.0%、BC2 が 20.0%であった（第 2 表）。

第 2 表 . *Solanum macrocarpon* 後代の結果率，1 果あたりの種子数および種子発芽率.

供試材料	結果率 (%)	1 果あたり種子数	種子発芽率 (%)
F1	0	—	20.0
複二倍体	76.1	0.1	—
複二倍体自殖実生	72.1	0.1	40.0
BC1	10.0	5	45.0
BC2	37.2	0	20.0

クロロプラスト DNA の PCR-RFLP 分析では、*rbcL*-ORF106 領域において、制限酵素 Rsa を用いて分析を行った結果、*S. macrocarpon* およびが BC2 同じバンドパターンを示し、‘Uttara’は異なるバンドパターンであった。

このことから、*rbcL*-ORF106 領域においては、戻し交雑後代である BC2 は、細胞質が種子親である *S. macrocarpon* 型を示し、母性遺伝していることが確認された。ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析では、V7 領域において、制限酵素 ScrF を用いて分析を行った結果、*S. macrocarpon* および BC2 が同じバンドパターンを示し、ナス ‘Uttara’ は異なるバンドパターンであった。このことから、V7 領域においては、戻し交雑後代である BC2 は、細胞質が種子親である *S. macrocarpon* 型を示し、母性遺伝していることが確認された。

本研究で BC2 のクロロプラスト DNA とミトコンドリア DNA を調査した結果、戻し交雑後代は種子親である *S. macrocarpon* 型を示していることから、細胞質が *S. macrocarpon* から戻し交雑後代へ母性遺伝していると考えられる。

花粉稔性を調査した結果、花粉染色率は BC1 が 38.3%、BC2 は 25.2%と大きな変化は見られなかったものの、花粉発芽率は BC1 で 6%であったのに対して BC2 では 0%となり、花粉の発芽は確認できなかった。

種子稔性を調査した結果、結果率は複二倍体実生から比較すると低下こそしているが、BC1 から BC2 にかけては回復したので、今後さらに回復する可能性がある。その一方で、1 果当たりの種子数に関しては、ナス‘Uttara’の花粉を用いた人工授粉では BC2 の果実から種子を得ることができなかった。これは複二倍体を経由したことが影響したためだと考えられる。複二倍体を経由したことで、それぞれ自殖実生が 4 倍体、BC1 が異質 3 倍体、BC2 では異数体であると考えられる。したがって、BC1 および BC2 では二倍体と同数の染色体ではなかったことで、遺伝

子間で何らかの不調和が生じ、細胞質置換による雄性不稔性の発現だけでなく、種子稔性の低下が起こっているものと考えられる。

以上の結果に加えて葯の裂開も見られていないことから、*S. macrocarpon* の細胞質を利用したナスの細胞質置換系統は雄性不稔性を有しており、今後、新たなナスの雄性不稔系統の開発が期待できる。しかし、そのためには BC2 を種子親とする戻し交雑で種子を獲得し、後代を作出する必要がある。例えば BC1 を用いてもう一度戻し交雑を行い、新たな BC2 を作出する方法や、ナス‘Uttara’以外の栽培種を花粉親として用いる方法などといった、後代を得るための方法を模索する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 KHAN Md. Mizanur Rahim, IWAYOSHI Masaki, OGURA-TSUJITA Yuki, ISSHIKI Shiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Genetic Characterization of the Fertility Restorer (Rf) Genes and Their Linked DNA Marker of the Male Sterile Eggplant Systems Having the Cytoplasm of the Wild Species	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Environment Control in Biology	6. 最初と最後の頁 173 ~ 176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/ecb.56.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xiaqing Yu; Panqiao Wang; Ji Li; Qinzhen Zhao; Changmian Ji; Zaobing Zhu; Yufei Zhai; Xiaodong Qin; Junguo Zhou; Haiyan Yu; Xinchao Cheng; Shiro Isshiki; Molly Jahn; Jeff J Doyle; Carl-Otto Ottosen; Yulin Bai; Qinsheng Cai; Chunyan Cheng; Qunfeng Lou; Sanwen Huang; Jinfeng Chen	4. 巻 2004222
2. 論文標題 Whole Genome Sequence of Synthesized Allopolyploids in Cucumis Reveal Insights into the Genome Evolution of Allopolyploidization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202004222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiro Isshiki ¹ , Ichiro Nakamura ² , Kenji Ureshino ² , Md. Mizanur Rahim Khan (Corresponding author) ^{2,*}	4. 巻 15
2. 論文標題 Pollen fertility differences in the progenies obtained from a cross between eggplant (Solanum melongena L.) as a seed parent and eggplant cytoplasmic substitution lines as pollen parents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Australian Journal of Crop Science	6. 最初と最後の頁 233 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21475/ajcs.21.15.02.p2785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鹿田裕介・有田隆史・岩吉真輝・渡辺久修・辻田有紀・マルト' ミザ' ヌル' ヌム カン・一色司郎
2. 発表標題 Solanum violaceum を利用した ナスの細胞質置換系統の後代における低い花粉稔性
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有田隆史・岩吉真輝・辻田有紀・マルト' ミザ' ヌル' ヌム カン・一色司郎
2. 発表標題 Solanum virginianumを利用したナスの細胞質置換系統の後代における稔性の変化について
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 妹川知史、渡辺久修、辻田有紀、岩吉真輝、一色司郎
2. 発表標題 ナス属野生種Solanum giloの細胞質をもつナスの雄性不稔系統の育成
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鹿田裕介、渡辺久修、辻田有紀、岩吉真輝、一色司郎
2. 発表標題 Solanum kurziiの細胞質を用いたナスの雄性不稔系統について
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 妹川知史・渡辺久修・辻田有紀・岩吉真輝・一色司郎
2. 発表標題 ナスを種子親およびナス細胞質置換系統を花粉親として作出した後代の花粉稔性
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関