

令和 6 年 4 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05566

研究課題名(和文)ナスCMSの新規開発およびCMSと組換え型葉緑体DNAの遺伝様式

研究課題名(英文) New development of eggplant CMS and mode of inheritance of CMS and recombinant chloroplast DNA

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)ナス属野生種*Solanum gilo*の細胞質を用いてナスのCMS系統を育成する。2)ナス属野生種*S. macrocarpon*の細胞質を用いてナスのCMS系統を育成する。3)*S. virginianum*とナスの戻し交雑の後代の実生について細胞質DNAの分析を行う。*S. gilo*の細胞質をもつCMS系統第五代の果実の大きさはナス*S. melongena* 'Uttara'と比べて差が無く、結果率および1果あたりの種子数は概して増加していたことから種子稔性が高くなっていると言える。CMS系統後代は、花粉を全くもたない雄性不稔系統であるといえる。これらのデータは論文として掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、1)ナス属野生種*Solanum gilo*の細胞質を用いてナスのCMS系統を育成する。2)ナス属野生種*S. macrocarpon*の細胞質を用いてナスのCMS系統を育成する。3)*S. virginianum*とナスの戻し交雑の後代の実生について細胞質DNAの分析を行った。その結果、*S. gilo*の細胞質をもつCMS系統がナスに対する細胞質雄性不稔を示したのは、学術的からも社会的からも意義ある結果といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will 1) grow eggplant CMS lines using the cytoplasm of *Solanum gilo*, a wild eggplant species; 2) grow eggplant CMS lines using the cytoplasm of *S. macrocarpon*, a wild eggplant species; 3) analyze cytoplasmic DNA of the seedlings of the later generation of backcrosses between *S. virginianum* and eggplant; and 4) analyze the fruit size of the fifth generation of CMS lines with the cytoplasm of *S. virginianum*. Fruit size of the fifth generation of CMS lines with *S. gilo* cytoplasm did not differ from that of eggplant *S. melongena* 'Uttara', and fruit yield and number of seeds per fruit were generally higher, indicating higher seed fertility. The CMS lines are male-sterile lines with no pollen at all. These data have been published in a paper.

研究分野：園芸科学

キーワード：ナス CMS系統 *Solanum gilo* 花粉形成不全型 戻し交雑 雄性不稔

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、以下の3つのことを計画した。1)ナス属野生種 *Solanum gilo* の細胞質を用いてナスの CMS 系統を育成する。2)ナス属野生種 *Solanum macrocarpon* の細胞質を用いてナスの CMS 系統を育成する。3) *Solanum virginianum* とナスの戻し交雑の後代の実生について細胞質 DNA の分析を行う。それらの中で1)のナス属野生種 *S. gilo* の細胞質を用いてナスの CMS 系統の進捗状況が最も高く、良い結果が得られたので報告する。

2. 研究の目的

ナス (*S. melongena* L.) は、特にアジアにおいて経済的に重要なナス科の野菜である(山口、1983)。ナスの品種間の雑種はかなりの雑種強勢を発現するため、ナスのほとんどの市販品種は F₁ 雑種である (Kakizaki, 1931; Sambandum, 1962)。雄性不稔性は、栽培種のハイブリッド種子の生産に非常に役立つ。ナスのハイブリッド品種のハイブリッド種子の生産は、手作業による除雄、受粉、袋詰めなどを必要とするため手間がかかる。有用なナスの雄性不稔システムが確立できれば、F₁ ハイブリッド種子の生産の労力を軽減できる可能性がある。

タネなし果は一般に種のある果実よりも甘いため、ナスにとって望ましい果実特性である。この性質はナスの漬物の品質向上にも役立つ。通常、ナスの漬物の種子の周囲は茶色になり、これは消費者には好まれない。この褐変はタネなし果を使用することで回避できる。タネなし果を生産するには、信頼性の高い雄性不稔システムと単為結果性を組み合わせることが不可欠である。したがって雄性不稔性は、ナスの雑種種子生産とタネなし果生産の両方にとって重要なキープポイントになる特性である。

ナスの雄性不稔性についてはこれまでにいくつかの報告がなされている。劣性の核遺伝子によって引き起こされる遺伝子雄性不稔が報告されている (Chauhan, 1984; Jasmin, 1954; Nuttall, 1963; Phatak and Jaworski, 1989; Phatak et al., 1991)。ナス近縁野生種 *S. aethiopicum* Gilo Group (論文では *S. gilo* Raddi.) (Fang et al., 1985)、*S. kurzii* Brace & Prain (Khan and Isshiki, 2009)、*S. violaceum* Ort. (Krommydas et al., 2016; Isshiki and Kawawari, 2002)、*S. virginianum* L. (Khan and Isshiki, 2008)、*S. aethiopicum* Aculeatum Group (Kaur et al., 2021; Khan and Isshiki, 2010)、*S. anguivi* Lam (Khan および Isshiki, 2011) および *S. grandifolium* C.V. Morton (Hasnunnahar et al., 2012; Saito et al., 2009) を用いた細胞質雄性不稔が報告された。

長期にわたる商業的に実行可能な育種プログラムにおいて限られた数の雄性不稔性の遺伝資源を使用することは、通常、狭い遺伝的基盤の脆弱性の結果として潜在的なリスクを示すことが知られている。例えば、F₁ 品種の開発において雄性不稔細胞質の単一遺伝資源を集中的に使用することは、トウモロコシのテキサス細胞質の場合などのように悲惨な結果をもたらすことが証明されている (Hooker, 1974)。したがって、この遺伝的基盤を広げ、栽培ナスの遺伝的脆弱性を軽減するためには、雄性不稔性の多様な遺伝資源を見出すことが不可欠である。

Fang ら (1985) は *S. aethiopicum* Gilo (Fang らの論文では *S. gilo* Raddi.) の細胞質を使用して CMS 系統を作成した。本研究は同種の細胞質を用いて CMS を育成したが、起こる現象は異なった。そこで、本研究の目的は、*S. aethiopicum* Gilo の細胞質を利用してナスの新規 CMS 系統を開発することである。この目的のために、連続戻し交配法により作出された細胞質置換系統の稔性特性とオルガネラ DNA を調査し、雄性不稔系統としての実用性を評価した。

3. 研究の方法

細胞質置換系統の作成

雄性不稔ナス (*S. melongena*) を開発するために、*S. aethiopicum* Gilo (すなわち、*S. gilo* Raddi.) を細胞質親として、ナスを核親として利用し、連続戻し交配によってナスの細胞質置換系統を作出した (第1図)。

花粉の稔性

花粉形成能力を調査するために、Singh (2002) は開花直後の花の葯をアセトカーミン溶液中でつぶし、花粉の存在を調べた。15個の花からの葯を植物材料ごとに調査した。花粉粒を生成しない植物を雄性不稔性と定義した。花粉の稔性を評価するために、アセトカーミンによる花粉の染色性を調査した。花粉粒は、開いたばかりの花から葯を解剖することによって抽出された。花粉の染色性は、アセトカーミン溶液中で新鮮な花粉を染色することによって決定された。

減数分裂の観察

新鮮な葯からの花粉母細胞 (PMC) の減数分裂観察は、アセトカーミンなすりつけ法によってランダムに選択された BC₅ 個体について観察を行った。

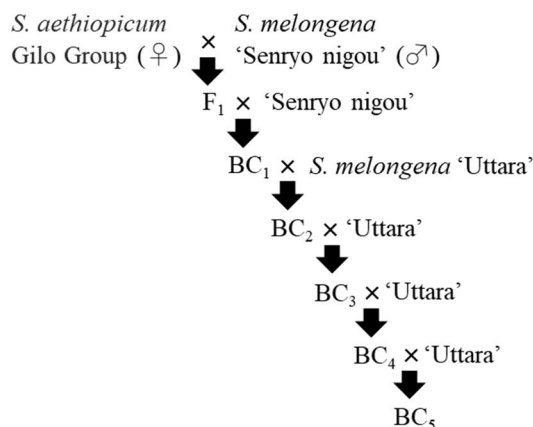


Fig. 1 Development of the backcross progenies between *S. aethiopicum* Gilo and eggplant (*S. melongena*). The pollen parent of the F₁ and BC₁ was *S. melongena* 'Senryo nigou', while the ones from BC₂ onwards was *S. melongena* 'Uttara'.

種子稔性

種子稔性は、結実数と果実あたりの種子の数から評価された。各植物材料につき少なくとも10個の花に *S. melongena* 'Uttara' または '千両2号' を手作業で受粉させた。花の形態 *S. melongena* 'Uttara' と BC₅の花を第2図に示す。特に葯の形態を比較した。



Fig. 2. Flowers of *Solanum melongena* 'Uttara' and the BC₅. The top portion of the anthers of the BC₅ are thinner than those of 'Uttara'.

細胞質の同定

戻し交配子孫の細胞質を同定するために、BC₅世代、*S. aethiopicum* Gilo および *S. melongena* の 'Uttara' および '千両2号' の全DNAを分析した。Murray and Thompson(1980) によって説明された CTAB 法を使用して葉から抽出した。

一色ら(1998)によって記載された方法に従って、*rbcL* と ORF106 の間の PCR 増幅領域の RFLP 分析によって葉緑体 DNA を分析した。PCR 産物を制限酵素 *RsaI* で消化した。

ミトコンドリア DNA は、Khan および Isshiki (2008) によって記載された方法に従って、ミトコンドリアのリボソーム小サブユニット RNA 遺伝子の PCR 増幅された V7 領域の RFLP 分析によって分析された。PCR 産物は *ScrFI* で消化した。cpDNA と mtDNA の消化された PCR 産物を臭化エチジウムを含む 1.5%アガロースゲルで電気泳動し、UV トランスイルミネーターで検出した。

4. 研究成果

S. aethiopicum Gilo '千両2号' の F₁ 雑種の花粉染色性は非常に低かったが、*S. aethiopicum* Gilo 'Uttara' の F₁ 雑種には花粉がなかった(第3図、第1表)。種間雑種 F₁ では、花粉親が '千両2号' である F₁ だけが BC₁ を作る事ができた。

つぎに、BC₁ を花粉親として 'Uttara' と交配し、BC₂ 世代から BC₅ 世代までを育成した(第1図)。BC₁ (F₁ x '千両2号') の花粉染色率は 25.1%であった。BC₂ と BC₃ には調査したすべての個体に花粉がほとんどなかったが、BC₄ と BC₅ には調査したすべての個体に花粉が全くなかった(第3図、第1表)。したがって、花粉不形成の特性は、*S. aethiopicum* Gilo Group の細胞質と *S. melongena* の核間の不和合性によって引き起こされる CMS の一種であると考えられた。

BC₄ および BC₅ 植物はすべて分離なしで花粉を持たないため、CMS には *Rf* 遺伝子がないと考えられる。Fangら(1985)は、同じ CMS が *S. aethiopicum* Gilo (論文では *S. gilo* Raddi.) の細胞質と中国ナス品種の核の組み合わせでも認識されることを報告した。彼らが調査した BC₃ 植物は、花粉不形成の CMS を示し、*Rf* 遺伝子を持っていなかった。これは、我々の CMS 系統と同様だった。Fangら(1985)の CMS 系統の葯には花弁状の葯と痕跡が見られた。これに対し、本研究の CMS 系統の葯は細いものしか見られなかった(第2図)。したがって、本研究の CMS システムは、Fangら(1985)で説明されている以前の CMS システムとは異なると考えられる。

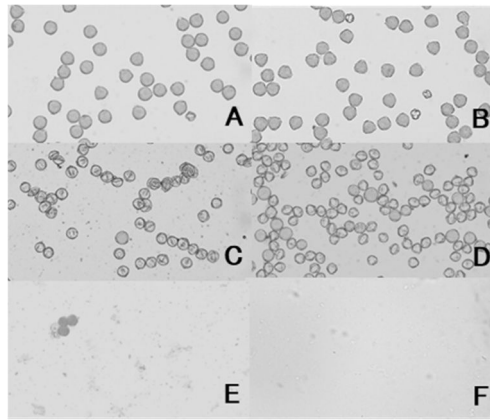


Fig. 3 Pollen stainability of *S. melongena* 'Uttara' and 'Senryo nigou', F₁ (*S. aethiopicum* Gilo × 'Senryo nigou'), BC₁ (F₁ × 'Senryo nigou'), BC₂ (BC₁ × 'Uttara') and BC₅ (BC₄ × 'Uttara'). A: *S. melongena* 'Uttara', B: *S. melongena* 'Senryo nigou', C: F₁ (*S. aethiopicum* Gilo × 'Senryo nigou'), D: BC₁ (F₁ × 'Senryo nigou'), E: BC₂ (BC₁ × 'Uttara'), F: BC₅ (BC₄ × 'Uttara').

Table 1. Pollen fertility in the *S. melongena* 'Uttara', *S. aethiopicum* Gilo and F₁ hybrid (*S. aethiopicum* Gilo × *S. melongena*) and the backcross progenies

Plant material	Number of plants examined	Pollen stainability (%)
<i>Solanum melongena</i> 'Uttara'	10	95.4 ± 1.0
<i>S. aethiopicum</i> Gilo	10	97.1 ± 0.5
F ₁ (<i>S. aet.</i> Gilo × 'Uttara')	10	No pollen
F ₁ (<i>S. aet.</i> Gilo × 'Senryo nigo') ^a	10	7.8 ± 2.1
BC ₁ (F ₁ ^a × 'Senryo nigo')	10	25.1 ± 2.6
BC ₂ (BC ₁ × 'Uttara')	10	Almost no pollen
BC ₃ (BC ₂ × 'Uttara')	10	Almost no pollen
BC ₄ (BC ₃ × 'Uttara')	10	No pollen
BC ₅ (BC ₄ × 'Uttara')	20	No pollen

^aF₁ (*S. aet.* Gilo × 'Senryo nigo')

これまでに、われわれは *Rf* 遺伝子を備えた花粉不形成 CMS システム (Khan and Isshiki, 2010, 2011; Hasnunnahar et al., 2012) および *Rf* 遺伝子を持たない花粉不放出 CMS システム (Isshiki and Kawajiri, 2002) の系統を開発した (Isshiki and Kawajiri, 2002; Khan and Isshiki, 2008, 2009)。本研究の CMS システムは *Rf* 遺伝子を持たない花粉不形成システムであり、ナスの F₁ 育種に有利な新たな選択肢として期待される。

調査した 5 つの BC₅ 植物すべてで減数分裂は確認されなかった。このことが本研究の CMS システムの花粉不形成の直接の原因であると考えられる。同様に、*Solanum anguivi* の細胞質を有するナスの CMS 系統の雄性不稔 BC₅ 植物では減数分裂が確認されなかったこと報告されている (Khan and Isshiki, 2011)。しかしながら、2 つの CMS システムの主な違いは、後代の分離の有無である。われわれの CMS システムは、後代で分離が起こらない細胞質雄性不稔であるが、CMS (Khan and Isshiki, 2011) は、後代で分離が起こる細胞質-核遺伝子型雄性不稔である。

結果率は F₁ (*S. aethiopicum* Gilo および '千両 2 号') から BC₅ まで徐々に増加し、BC₅ では 69% に達した (第 2 表)。BC₄ および BC₅ の果実あたりの種子数も一般に多くなる。BC₄ および BC₅ 世代で見られる結果率および 1 果あたり種子数が比較的高い値を示すこと (第 2 表) は、*S. aethiopicum* Gilo の細胞質が *S. melongena* の種子稔性に顕著な悪影響を及ぼさないことを意味している。

Table 2. Seed fertility in *Solanum melongena* 'Uttara', F₁ (*S. aethiopicum* Gilo × *S. melongena*) and five backcross generations.

Plant materials	No. of crosses	Number of fruit set	Fruit set (%)	No. of seeds per fruit
<i>Solanum melongena</i> 'Uttara'	10	10	100	307.3 ± 46.3
F ₁ (<i>S. aet.</i> Gilo × 'Uttara')	373	0	0	
F ₁ (<i>S. aet.</i> Gilo × <i>S. melongena</i> 'Senryo nigo') ^a	64	1	1.6	6 ^b
BC ₁ (F ₁ ^a × 'Senryo nigo')	53	2	3.8	25 ^c
BC ₂ (BC ₁ × 'Uttara')	210	10	4.8	4 ^b
BC ₃ (BC ₂ × 'Uttara')	52	23	44.2	1.4 ^b
BC ₄ (BC ₃ × 'Uttara')	14	8	57.1	88.9 ± 22.3
BC ₅ (BC ₄ × 'Uttara')	71	49	69.0	43.4 ± 4.4

^a F₁ (*S. aethiopicum* Gilo × *S. melongena* 'Senryo nigo').

^b One fruit with seeds was obtained.

^c Two fruits with seeds were obtained.

S. aethiopicum Gilo の細胞質を *S. melongena* 'Uttara' の細胞質に置き換えるために、この研究では連続戻し交配により 4 つの世代の戻し交雑世代を育成することに成功した。cpDNA と mtDNA の両方の分析において、調査したすべての BC₅ 世代は、細胞質提供親である *S. aethiopicum* Gilo のものと同一の制限パターンを持っていた。これらの結果は、戻し交配の後代における cpDNA および mtDNA の母性遺伝の明確な証拠を提供し、それらの細胞質置換が成功したことを確認する。本研究で認められた cpDNA と mtDNA の母性遺伝は、オルガネラの遺伝が厳密に母性遺伝であるほとんどの植物と一致している (Reboud and Zeyl, 1994)。

一部の雄性不稔システムは環境と昆虫の影響を受けることが報告されている (McVetty, 1997)。たとえば、機能的な雄性不稔ナス UGA-1-MS では、薬が昆虫に食べられた後、または畑での大雨後の暑い日差しの下で、古い花の数個の薬から薬の裂開が観察されている (Phatak et al, 1991)。今回開発した CMS システムは花粉不形成型の雄性不稔性を示すため、薬から花粉が放出される心配はない。したがって、この雄性不稔性は、自家受粉による種子汚染がまったく起こらないという点で、F₁ 種子生産に大きく貢献する。

Rotino ら (1997) は、遺伝子組換えにより優れた単為結果性ナスを開発した。Yoshida ら (1998) はヨーロッパのナス品種が持つ有用な単為結果性を日本品種に導入することに成功した。これらの単為結果性を CMS システムのナスに導入できれば、ナスのタネなし果生産が可能となる。ナスの育種を実用化するためには、ナスの雄性不稔システムの範囲をより広げる必要がある。本研究の *S. aethiopicum* Gilo の細胞質を有する *S. melongena* の現在の CMS システムは、ナスの雄性不稔の遺伝資源を拡大することに成功した。

本研究課題の成果について、*S. aethiopicum* Gilo を遺伝資源として新たな雄性不稔性ナスを開発することに成功した。この雄性不稔性は、*Rf* が存在せず、花粉の生成が全くないタイプであり、われわれがこれまで見出しているタイプとは異なる新しいタイプである。これまでにわれわれの研究室が開発した 6 種類とあわせると計 7 種類の雄性不稔性を開発できたことになる。世界的に見ても、このようにひとつの研究機関において 7 種類もの多くの CMS システムの開発に成功したところはない。現在、オランダや日本の種苗会社と手を組んで同システムを組み込んだナス新品種育成に取り組んでいるところである。

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 Md Mizanur Rahim Khan, Takumi Matsuyama, Ichiro Nakamura, Kenji Ureshino, Takashi Arita, Masaki Iwayoshi, Yuki Ogura-Tsujita and Shiro Isshiki b (Corresponding author)*	4. 巻 60(3)
2. 論文標題 Production of doubled haploid through anther culture of the male fertile lines in the CMS system of eggplant with the cytoplasm of Solanum grandifolium.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Environmental Control in Biology	6. 最初と最後の頁 187-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/ecb.60.187	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 モハマド ミザヌル ラヒム カーン1・有田隆史2・岩吉真輝2・辻田有紀2・一色司郎2*	4. 巻 30巻2号
2. 論文標題 温帯および亜熱帯地域におけるSolanum kurzii およびS. violaceum 細胞質を有するナス雄性不稔系統の種子生産	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 農業生産技術管理学会誌	6. 最初と最後の頁 77-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Md Mizanur Rahim KHAN1, Takashi ARITA2, Masaki IWAYOSHI2, Yuki OGURA-TSUJITA2 and Shiro ISSHIKI2	4. 巻 61(4)
2. 論文標題 Development of a Male-Sterile Line of Eggplant Utilizing the Cytoplasm of Solanum aethiopicum Gilo Group	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Control in Biology	6. 最初と最後の頁 63-67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2525/ecb.61.63	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0件

〔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
---------	---------