

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580046

研究課題名(和文) ナスの6種類の細胞質雄性不稔系統の発現様式及び特性の解明

研究課題名(英文) Interpretation of expression and characteristics of the 6 kinds of the male sterility of eggplant

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室では、*Solanum virginianum*の細胞質をもつナス細胞質置換系統(A系統)において、葉緑体DNAの組換え型が出現し、機能的雄性不稔性を示すことを明らかにしている。本研究では、2009年に*S. virginianum*とナスとの間に新たに育成したB系統のBC1に戻し交雑を繰り返し育成したBC3において、花粉稔性および種子稔性、細胞質DNAの調査を行い、A系統と比較した。その結果、B系統は開葯すること、花粉稔性がA系統より低いことおよび葉緑体DNAが*S. virginianum*型であるという結果が得られた。これらの違いは、葉緑体DNAの違いに起因していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this laboratory, an alloplasmic eggplant (A line) having cytoplasm of *Solanum virginianum* showed a recombinant of chloroplast DNA and clarifies functional male sterility. In this study, I investigated pollen fertility and seed fertility, chloroplast DNA in BC3 which I repeated backcrossing in BC1 of the B line and compared it with the A system. As a result, a result that the B system doing anthesis, pollen fertility being lower than A system and chloroplast DNA were *S. virginianum* type was provided. It is thought that these differences are caused by a difference of chloroplast DNA.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：eggplant *Solanum virginianum* male sterility

1. 研究開始当初の背景

ナス (*Solanum melongena*) はわが国が野菜のハイブリッド育種を世界に先駆けて実用化した種類で、現在の実用品種は、ほとんどが一代雑種である。一代雑種とは、異なる品種・系統の交配によってできる雑種の一代目をいい、両親の組み合わせが良いと、その一代雑種は、生育や収量が両親よりも良くなる性質 (雑種強勢) を示す。ナスはこの雑種強勢が現れやすい作物である (Sambandam, 1962)。一代雑種は環境適応性も高く、ナスの周年供給にも大きく寄与している。ナスの一代雑種子生産には、労力を要する手作業による人工授粉および徐雄が必要である。特に、種子親の徐雄にかかる時間や労力のコストは多大である。もし、雄性不稔性を種子に導入することができれば、徐雄の作業を省くことが可能になるため、ナスの一代雑種の生産のための時間、労働およびコストを大きく削減することが可能となる。

作物の一代雑種育種を行う際に求められる課題の一つには、大量の F_1 種子を得たいとき、いかに人的・時間的・経済的コストなどを抑えて F_1 種子だけを生産することができるかということがある。育種によって作出された F_1 品種作物を恒常的に大量生産する場合には、 F_1 種子の採種効率を向上させることが必要不可欠だといえる。作物の F_1 種子の大量生産にあたっては、トウモロコシのような雌雄同株・単性花植物やハウレンソウのような雌雄異株植物では人手による花粉の受粉管理でもある程度可能であるが、ナスのように雌雄同株・両性花植物で主に自家受精で繁殖を行う作物では、 F_1 種子生産のために利用できる効率的な除雄法を必要とする。この場合、雄性不稔を利用することは人手によるナスの花の除雄作業を省くことができることから有用な方法のひとつである。

雄性不稔は、不稔花粉を生じる花粉不稔型と、花粉に稔性があっても花器の構造上受粉ができずに不稔性を示す機能的雄性不稔型とに分けられるが、一般には花粉不稔型が多い。遺伝的雄性不稔には、植物中の核遺伝子の働きによって生じる核遺伝子型、細胞質のみで支配されている雄性不稔であり、回復遺伝子が存在しないか未発見の場合である細胞質単独型、不稔細胞質とそれに感受性を示す回復遺伝子との相互作用によって種々の程度の稔性をもつ個体を生じる細胞質・核遺伝子型に分類される。核遺伝子型は細胞質に関係なく、劣性遺伝子がホモのとき現れるもので、自然界に比較的容易にみられ、トマト、ナス、ピーマン、カボチャ、メロン、キャベツ、ハクサイ、その他で見出されており、その多くは劣性の突然変異である。細胞質単独型は、完全な母系遺伝を行い、母系に雄性不稔個体を用いれば父系のいかににかかわらず一代雑種はすべて雄性不稔となる。したがって、不稔系統の育成、維持が容易であり、

葉・根菜類などでは、効果的に利用することができる。ブラシカ (アブラナ) 属やトウモロコシなどでその例がみられる。細胞質・核遺伝子型は、特定の細胞質と遺伝子との相互作用によるもので、細胞質が不稔で雄性不稔遺伝子 (ms) が劣勢ホモの場合に雄性不稔性を示すもの (タマネギ、ネギ、ピーマン、ダイコン、ビート、ソラマメなど) と、細胞質が不稔で雄性不稔遺伝子 (ms) が優性の場合に雄性不稔性を示すもの (ニンジン、セルリーなど) がある。

ナスにおける雄性不稔の研究として核遺伝子型によるものが Jasmin (1954)、Nuttall (1963)、Chauhan (1984)、Phatak and Jaworski (1989) らにより報告されている。これらは突然変異によるものであるが、環境的な要因により雄性不稔性の発現がなくなるなどの不安定さがあり実用化されていない。

2. 研究の目的

本研究室では、これまでに戻し交雑で育成したナス属野生種 *Solanum virginianum* の細胞質をもつナス細胞質置換系統において、葉緑体 DNA の組換え型 (A 系統) が出現し、これが開花しても開葯しないタイプの機能的雄性不稔性を示すことを明らかにしている。本研究では、2009 年に *S. virginianum* とナス '千両二号' の F_1 にナス 'Uttara' を交配して新たに育成した BC_1 (B 系統) に戻し交雑を繰り返し育成した BC_3 において、花粉稔性、種子稔性および細胞質 DNA を調べ、A 系統と比較を行った。さらに、PCR-RFLP 法を用い細胞質 DNA の遺伝様式の調査を行った。

3. 研究の方法

雄性不稔を F_1 品種の種子生産の際に種子親として実用化できるか判断する際、雄性不稔性の安定性を確認すると同時に、高い種子稔性、すなわち、正常な花粉を受粉した場合、良く結果することや、多数の種子を生産できることを明らかにしておく必要がある。

Khan and Isshiki (2010) はナス属野生種 *S. anguivi* の細胞質をもつ花粉形成不全型の雄性不稔系統においてナス花粉を受粉することで 100% 近い結果率を示すことならびに花粉親のナスと同等の種子生産力を示し、同雄性不稔系統の F_1 品種の種子生産の際の種子親として高い実用性を証明している。 F_1 品種の種子生産の際には、雄性不稔でない別系統を花粉親として受粉するので、自家受粉よりも正常なナスを受粉することにより正確な種子生産力を評価できると考えられる。

そこで、Khan and Isshiki (2010) にならい、2009 年に作出した *S. virginianum* の細胞質を用いた連続戻し交雑によるナスの細胞質置換系統 (B 系統) の花粉稔性およびナス花粉を受粉することによって種子稔性の

程度を明らかにし、葉緑体 DNA の組換え型である A 系統と比較し、A 系統と B 系統の違いを明らかにするとともに、F₁ 品種の経済的な採種に利用可能か検討を行った。

S. virginianum を種子親、ナス品種 '千両二号' を花粉親として交雑を行い、一代雑種 (F₁) を作出し、F₁ にナス品種 'Uttara' を花粉親として BC₁、BC₁ に再度 'Uttara' を交配し BC₂ の個体 No.1 および個体 No.2 を作出した。今回の調査では、BC₂ から収穫した種子を人工培地上で発芽させ育成した BC₃ を材料として用い、比較材料として B 系統 BC₂ の 2 個体、種子親である *S. virginianum*、花粉親である '千両二号'、反復親である 'Uttara' および葉緑体 DNA の組換え型である A 系統の BC₄ および BC₉ を用いた。

調査内容として、各材料の花粉のおよび種子に関する総性調査とを行った。花粉総性の調査として、花粉の形成有無、花粉のアセトカーミン染色率、人工培地上での花粉発芽率、花粉の放出性を調査した。種子総性の調査として、結果率、種子数を調査した。

一方、PCR-RFLP 法の RFLP とは restriction fragment length polymorphism の略で、直訳すれば制限酵素断片長多型となる。DNA を特定の制限酵素で切断したときに、多型を生じている部位が制限酵素の認識部位にあると、その部位が切断されなくなる。逆に変異によって新たな制限酵素認識部位が生じることもある。通常は complexity の高いゲノム DNA の中から RFLP を探すために、注目する領域をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行う必要があるが、PCR 生成物は既に特定の DNA 領域のみを濃縮したもので、制限酵素で切断して電気泳動を行えば、すぐに RFLP の検索ができる。

ナスにおける細胞質 DNA での PCR-RFLP 分析の研究は葉緑体 DNA について 1998 年に Isshiki ら、ミトコンドリア DNA について 2003 年に Isshiki らによって報告されている。これらの研究では、細胞質 DNA での PCR-RFLP 分析がナスにおける分類の評価や細胞質の同定に利用できることを明らかにしている。

そこで、2009 年に *S. virginianum* の細胞質を用いて作出した連続戻し交雑によるナスの細胞質置換系統 (B 系統) において、PCR-RFLP 法を用い細胞質 DNA の遺伝様式の調査を行い、2005 年に作出した葉緑体 DNA の組換え型である A 系統と比較した。

4. 研究成果

(1) 花粉の形成の有無

供試材料すべてで花粉の形成が確認された。

(2) 花粉のアセトカーミン染色率

S. virginianum が 99%、'千両二号' が 76.8%、'Uttara' が 98.8%、F₁ が 7.9%、BC₁ が 7.5%、BC₂ の個体 No.1 が 49.6%、個体 No.2 が 39.1%、

BC₃ が 56.6%、葉緑体 DNA の組換え型 (A 系統) である BC₄ が 50.9%、BC₉ が 88.8% であった

(3) 人工培地上での花粉発芽率

S. virginianum が 59.4%、'千両二号' が 36.7%、'Uttara' が 71.5%、F₁ が 0%、BC₁ が 0%、BC₂ の個体 No.1 が 2.4%、No.2 が 1.5%、BC₃ が 2.5%、葉緑体 DNA の組換え型 (A 系統) の BC₄ が 12.5%、BC₉ が 14% であった。

(4) 花粉の放出性

S. virginianum、'千両二号'、'Uttara'、F₁、BC₁、BC₂ の個体 No.1、個体 No.2 および BC₃ において花粉の放出性が認められた。A 系統の BC₄ および BC₉ では、葯の先端が開葯せず花粉の放出が認められなかった。

(5) 結果率

B 系統の BC₂ の個体 No.1 が 25.8%、個体 No.2 が 17.5% であり、BC₃ では 27.5% で A 系統の BC₉ が 41.7% であった。

(6) 種子数

1 果あたりの種子数 (発芽するとみられる種子数、発芽しないとみられる種子数) は、BC₂ の個体 No.1 が 7.3 個 (0.3 個、16 個)、個体 No.2 が 20.5 個 (0.5 個、20 個)、BC₃ が 57.6 個 (2.2 個、55.5 個) で A 系統の BC₉ が 140 個 (134.8 個、21 個) であった。

(7) ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析 - nad7/3-4 領域

ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析では、nad7/3-4 領域で制限酵素 *Alu* および *ScrF* を用いて分析を行った。結果、制限酵素 *Alu* で処理したとき *S. virginianum*、BC₂ (B 系統)、BC₃ (B 系統)、BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示し、'Uttara' のみ異なる制限パターンであった。このことから、nad7/3-4 領域では、A 系統および B 系統ともに母性遺伝していることが確認された。

(8) ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 分析 - V7 領域

制限酵素 *Alu* および *ScrF* を用いて分析を行った。結果、制限酵素 *scrF* で処理したとき *S. virginianum*、BC₂ (B 系統)、BC₃ (B 系統)、BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示し、'Uttara' のみ異なる制限パターンであった。このことから、V7 領域では、A 系統および B 系統ともに母性遺伝していることが確認された。

(9) 葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析 - matK AF-MR 領域

葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析では、matK AF-MR 領域で、24 種の制限酵素を用いた分析を行った。結果、制限酵素 *Mbo* で処理したときのみ *S. virginianum*、BC₂ (B 系統)、BC₃ (B 系統) が同じ制限パターンを示し、

‘Uttara’ と BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示した。他の 23 種の制限酵素で処理した結果、多型は検出されなかった。この結果から、matK AF-MR 領域では、B 系統は母性遺伝しており、A 系統は父性遺伝していることが確認された。

(10) 葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析 - rpoC1-C2 領域

24 種の制限酵素で酵素処理した結果、制限酵素 *Alu*、*Msp* において *S. virginianum*、BC₂ (B 系統) BC₃ (B 系統) が同じ制限パターンを示し、‘Uttara’ と BC₄ (A 系統) が同じ制限パターンを示した。また、制限酵素 *Xba* においては *S. virginianum*、BC₂ (B 系統) BC₃ (B 系統) BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示し、‘Uttara’ のみ異なる制限パターンであった。このことから、rpoC1-C2 領域では、B 系統は母性遺伝しているが、A 系統は父性遺伝している箇所と母性遺伝している箇所があることが確認された。

(11) 葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析 - rbcL - ORF106 領域

24 種の制限酵素で酵素処理した結果、制限酵素 *Alu* において *S. virginianum*、BC₂ (B 系統) BC₃ (B 系統) が同じ制限パターンを示し、BC₉ (A 系統) では両親とも異なる制限パターンを示した。制限酵素 *Sty* においては *S. virginianum*、BC₂ (B 系統) BC₃ (B 系統) が同じ制限パターンを示し、‘Uttara’、BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示した。制限酵素 *Rsa* においては *S. virginianum*、BC₂ (B 系統) BC₃ (B 系統) BC₉ (A 系統) が同じ制限パターンを示し、‘Uttara’ のみ異なる制限パターンであった。このことから、rbcL-ORF106 領域では、B 系統は母性遺伝しているが、A 系統は組換えが起こっている箇所、父性遺伝している箇所、母性遺伝している箇所があることが確認された。

供試材料の稔性調査を行ったが、花粉稔性、種子稔性の両方において BC₃ は BC₂ の 2 個体より稔性が高いことが確認された。BC₃ は BC₂ の 2 個体と比較すると花粉稔性の回復がみられることから、戻し交雑を続けることにより更に稔性が回復すると考えられる。また、葉緑体 DNA の組換え型である A 系統は、花粉染色率において B 系統との間に大きな差異はみられなかったが、花粉発芽率が高く、B 系統に比べ花粉稔性が高いことが確認された。B 系統では BC₁、BC₂ の 2 個体および BC₃ において葯が裂開し花粉の放出が認められたが、A 系統では葯が裂開せず花粉の放出は認められなかった。これら、A 系統と B 系統の性質の違いは細胞質の組換えによるものではないかと考えられる。

また、*S. virginianum* の細胞質をもつ B 系統では、BC₃ において、BC₂ の個体 No.1 および個体 No.2 より高い結果率を示した。1 果あた

りの種子数においても個体 No.1 および個体 No.2 に比べ種子数は大幅に増え、稔性の回復はみられたが、発芽するとみられる種子に対して発芽しないとみられる種子数の方が多くみられたため種子稔性は低い。今後、さらに戻し交雑を続けることで、種子稔性も回復すると考えられる。

PCR-RFLP 法を用い細胞質 DNA の遺伝様式を調査した結果、実験の結果より、ミトコンドリア DNA では、A 系統および B 系統ともに細胞質は種子親である *S. virginianum* と同様の制限パターンを示したことから、母性遺伝していることが確認された。葉緑体 DNA では、調査した 3 領域 (matK AF-MR、rpoC1-C2 および rbcL-ORF106) すべてにおいて B 系統は種子親である *S. virginianum* と同様の制限パターンを示したことから、母性遺伝していることが確認された。また、A 系統では、matK AF-MR 領域と rpoC1-C2 領域では、*S. virginianum* や ‘Uttara’ の制限パターンと同じものがあり、母性遺伝している箇所と父性遺伝している箇所があることが確認された。rbcL-ORF106 領域でのみ両親の組換え型が確認された。

以上のことから、A 系統と B 系統の性質の違いは、組換えによって生じた葉緑体 DNA の違いに起因していると考えられる。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

- Md. Mizanur Rahim Khan, Mst.
Hasnunnahar, M. Iwayoshia, S. Isshiki*,
Scientia Horticulturae, 査読有, 157,
2013, pp.39-44.
Md. Mizanur Rahim Khan, Mst.
Hasnunnahar, S. Isshiki*,
HortScience, 査読有, 48, 2013,
pp.422-424.

[学会発表](計 1 件)

- カーン M. M. R. ・ハヌンナハル M. ・岩吉真輝・一色司郎、ナス属野生種 *Solanum virginianum* の細胞質をもつナスの戻し交雑後代の稔性の違いと葉緑体 DNA、園芸研、査読無、13 (別 1)、pp.311、2014 年 3 月 30 日、筑波大学。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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