

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05575

研究課題名（和文）トウガラシにおいて高温下での着果性を決定づける2遺伝子座の特定

研究課題名（英文）Identification of two gene loci that determine fruit set under high temperatures in chili pepper

研究代表者

山崎 彬（YAMAZAKI, AKIRA）

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：90895418

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：地球温暖化による高温ストレスは農業生産にとって深刻な課題である。これまでに高温着果性を持たない2品種のトウガラシの交雑により高温着果性を持つF1雑種が作出された。本研究ではF1雑種が高温着果性を獲得した原因の究明に取り組んだ。F2集団では、高温着果性と関連する2つの遺伝子領域が存在したが、自殖により作出したF5集団には高温着果性を示す個体は出現しなかったため、ヘテロシスが関与する可能性が示唆された。また、両親品種間での高温ストレスへの花粉発達過程の反応の違いが明らかになった。異なる高温への応答を持つ品種を交雑することで、高温耐性のある個体が作出できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高温ストレス下で生殖能力や着果性を保つためには、高温着果性を有する植物の遺伝的基盤を理解することが重要である。本研究では、高温着果性を持つF1雑種の遺伝子解析を通じて、新たな高温着果性品種の育成に向けた知見を提供した。また、簡易的な花粉発芽率の評価手法を確立し、高温着果性品種のスクリーニングを行った。これにより、品種改良への有用な材料が得られた。本研究の成果は、地球温暖化による高温ストレスが農業生産に与える影響を軽減し、食料安全保障の向上と持続可能な農業の実現に貢献する。

研究成果の概要（英文）：High temperature stress caused by global warming is a serious problem for agricultural production. An F1 hybrid with high temperature fruit set was produced by crossing two chili cultivars without high temperature fruit set. In the F2 population, there were two gene regions associated with high temperature fruit set, but no individuals with high temperature fruit set appeared in the F5 population, suggesting that heterosis may be involved in the acquisition of high temperature fruit set. The results also revealed differences in the response of pollen development to high temperature stress between the parental cultivars. It was suggested that high temperature tolerant individuals could be produced by crossing cultivars with different responses to high temperature.

研究分野：園芸学

キーワード：トウガラシ 着果不良 花粉発芽率 高温ストレス 地球温暖化 施設園芸 高温着果性 花粉

## 1. 研究開始当初の背景

果菜類では、高温下での着果不良により収量が激減することが大きな問題である。地球温暖化による気温上昇が見込まれるため、高温下でも安定的に着果する「高温着果性」を取り入れることは、切実に必要とされている。しかし、トマト (Abdul-Baki・Stommel, 1995) やトウガラシ (Gajanayake ら, 2011) で探索されてきたにも関わらず高温着果性を示す品種はほとんど知られていない。

これまでに私は‘Sy-2’と‘No. 3686’との交雑によって生まれた F<sub>1</sub> 雑種がハウス内で最高気温 40°C を超える高温期にも鈴なりに着果したことを見出した (Yamazaki and Hosokawa, 2019)。一方で両親である‘Sy-2’と‘No. 3686’は、多くのトウガラシ品種と同様に、高温下でほとんど着果しない。つまり高温下で着果しない品種同士の交雑後代が高温着果性を獲得したということである。

F<sub>1</sub> の後代 (F<sub>2</sub>) を用いて高温着果性と関わる 2 つの遺伝子領域を発見した (Yamazaki ら, 2020)。これらは第 6 染色体上の遺伝子領域 (13,500 kb) と第 3 染色体上の遺伝子領域 (18,000 kb) である。2 つの遺伝子領域に「高温着果性の原因遺伝子」が座乗すると考えられるが、遺伝子特定には未だ至っていない。F<sub>1</sub> 雑種およびその後代に現れる強い高温着果性の原因となる遺伝子を同定できれば、高温下で安定的に着果する品種の育成に貢献できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに発見してきた両親品種では高温着果性を持たないにも関わらず、それらの交雑によって育成した F<sub>1</sub> 雑種では高温着果性を獲得する現象に対して、F<sub>1</sub> 雑種の自殖後代の集団から得られた材料を利用する遺伝学的な方法によって、高温着果性に関わる遺伝子および関連する代謝経路の解明を目的とする。本研究の遂行によって、地球温暖化による極端な高温下においても収量が安定する品種の育成に貢献することを目標としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 花粉発芽率を簡易計測する深層学習モデルの構築

トウガラシの高温下での着果性には花粉発芽率に関わると考えられる (Hedhly ら, 2008 ; Yamazaki・Hosokawa, 2019)。従来の手法で花粉発芽率の計測を行うためには多大な時間および労力が必要となる。本研究では、環境条件および系統ごとに花粉発芽率の計測を行うために大量のサンプリングが要求される。そこで、深層学習モデル YOLOv5 の転移学習により、培地上の花粉を発芽花粉または非発芽花粉を識別して計数できる簡易計測手法を確立した。

### (2) 高温下での着果性のファインマッピング

高温下で着果性を持たない‘Sy-2’および‘No. 3686’の F<sub>1</sub> 雑種は、高温下においても着果性を有する。さらに自殖することで得た F<sub>2</sub> 集団の中には、高温下での着果性が F<sub>1</sub> 雑種よりも高い個体が出現した。F<sub>2</sub> 集団の各個体において自殖を繰り返すことで取得した F<sub>4</sub>-RIL 系統の中から、過去の研究で高温下での着果性と関連のあると判明した 2 つの遺伝子領域内に組み換えが認められるものを選抜した。選抜された F<sub>4</sub>-RIL の自殖後代である F<sub>5</sub>-RIL において、候補遺伝子領域の遺伝子型ごとの高温着果性の有無を評価することでファインマッピングを実施した。

### (3) 高温下での花粉発達過程の組織学的観察およびトランスクリプトーム解析

高温下での花粉発芽率の低下は、発芽時の温度に依存することもある (Reddy and Kakani, 2007) が、花粉発達過程への高温ストレスが障害となって現れることが多く報告されている (Hedhly ら, 2008)。トウガラシにおいて、高温下での花粉発芽能力の低下を引き起こす障害を特定するために、組織観察を行った。Erickson and Markhart (2002) の手法に従って花蕾の発達ステージを定義し、それぞれの花蕾発達ステージをレジンに包埋し、トルイジンブルーで染色することによって、プレパラートを作成した。また組織観察から、高温下での花粉発芽能力の低下に関わると考えられた花粉発達過程のトランスクリプトーム解析を実施することで、その要因を明らかにしようと試みた。RNA-seq によって得たトランスクリプトーム情報から GO 解析を行うことによって花粉に現れる高温障害と関連する代謝系を探索した。

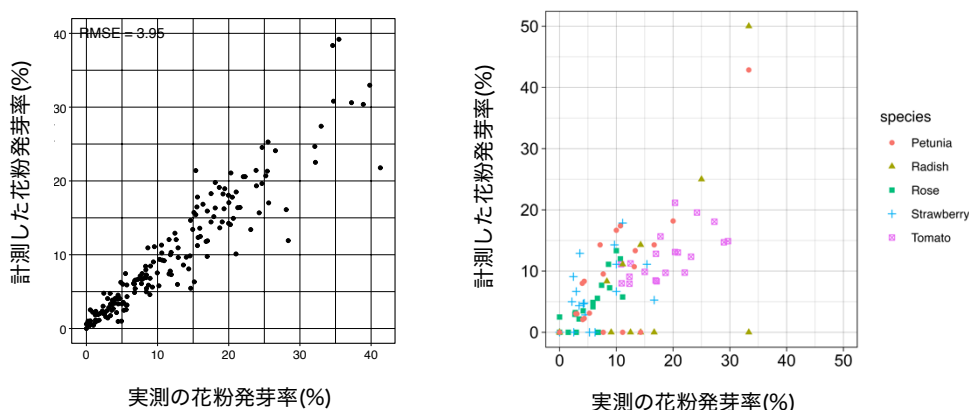
#### (4) 高温下での着果性を有する新規遺伝資源の探索

本研究でのファインマッピングに利用した親植物は、いずれも高温下での着果性を有しない。そのため、ファインマッピングやその後の解析が難しいと考えられた。今後の高温着果性遺伝子の同定や着果機構の解明に利用できる遺伝資源を探索する目的で、高温着果性のスクリーニングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 花粉発芽率を簡易計測する深層学習モデルの構築

200 枚の花粉発芽画像に VoTT ソフトウェアを用いて、アノテーションを行った。Yolov5 の転移学習によって得られたモデルの精度は、mean average precision (mAP) で 0.84 であり、高精度なモデルを構築できたと考えられた。このモデルを利用して、過去に目視で計測して算出した花粉発芽率との比較を行った (第 1 図 A) と、有意な相関が認められ、さらにモデルによって得られた花粉発芽率を形質データとして、GWAS 解析を再解析したところ、過去に検出した候補遺伝子領域が再現できたために、花粉発芽率の簡易計測手法として利用可能であると結論づけた。さらに、トウガラシ以外の品目である、バラ、ペチュニア、トマト、ダイコン、イチゴの花粉を計測に用いたところ、精度はやや低下するものの、花粉の検出および花粉発芽率の計測を行うことができ (第 1 図 B)、幅広く利用できる花粉発芽率の簡易計測手法である可能性が示唆された。



第 1 図 転移学習により獲得した花粉発芽率の簡易計測モデルの精度。

(A) トウガラシおよび (B) トウガラシ以外の種において、深層学習モデルにより計測した花粉発芽率と手動で計測した花粉発芽率を比較した。モデル横軸は手動で計測した実際の花粉発芽率、縦軸は構築した深層学習モデルにより計測した花粉数および発芽率を表す。

##### (2) 高温下での着果性のファインマッピング

高温着果性に関わる候補遺伝子領域は第 6 染色体および第 3 染色体にそれぞれ 1 つずつ認められていたために、第 6 染色体上の領域に関する集団および第 3 染色体に関する集団を分けて調査した。しかし、両集団において、F<sub>1</sub> 雑種で認められていた高い高温着果性がみられる個体は全く現れなかった。したがって、F<sub>2</sub> 集団においては 2 つの遺伝子座による効果が強く現れていたものの、自殖を進めることによって表現型が現れにくくなり、高温着果性には、ヘテロシスおよび複数の遺伝子型による相互作用に関わる可能性が考えられた。ただし、第 6 染色体上の候補遺伝子領域では、下流側に遺伝子型の違いがある集団では、わずかに着果が認められたために、この領域に候補遺伝子が座乗する可能性が示唆された。

したがって遺伝学的手法では、本現象に関わる遺伝子の同定が困難であり、直接的に両親品種と F<sub>1</sub> 雑種を比較することができるトランスクリプトーム解析によって知見を収集する必要があると考えられ、次の実験に取り組んだ。

##### (3) 高温下での花粉発達過程の組織学的観察およびトランスクリプトーム解析

高温下および涼温下での 'Sy-2'、'No.3686' および F<sub>1</sub> 雑種の葯および花粉発達過程の観察したところ、いずれも涼温下においては同様に正常な成熟花粉を発達させていた。しかし、高温下においては、発達過程において品種ごとに異なる障害を生じていた。'Sy-2' においては、高温下で、ほとんどの花粉がステージ 4 以降に白色化しアポトーシスしており、花粉発達を停止したために花粉発芽率が低下したと考えられた。一方で、'No.3686' においては、高温下ではステージ 3 および 4 で起こるべきタペト層の崩壊が遅れ、結果として以降の全ての花粉発達が遅れており、開葯までに成熟花粉に至らなかったために発芽率が低下したと考えられた。F<sub>1</sub> 雑種においては、

一部の花粉において、ステージ4以降でアポトーシスを起こし、発達を停止したものの、多くの花粉では正常に発達した。

組織観察よりステージ3における葯での高温への応答の違いが花粉発達に重要であると考え、網羅的な遺伝子発現状態の解析を行うために、RNA-seqを実施した。得られた品種間の発現変動遺伝子 (DEGs) から GO 解析を試みた。その結果、‘Sy-2’および‘No.3686’と F1 雑種との間の DEGs は、花粉および花粉壁形成関連の遺伝子群がエンリッチメントされていた。また‘Sy-2’と‘No.3686’の間の DEGs は糖代謝に関わる遺伝子群がエンリッチメントされていた。花粉発達中において、花粉内デンプン濃度が開花の数日前に分解されることで低下し、糖濃度は開花当日に最も高くなり、花粉が成熟する。しかし、高温下での高温感受性品種の花粉は開花数日前のデンプン濃度が低下することで、成熟花粉の糖含量が低下し、花粉稔性が低下すると考えられている (Firon ら, 2006)。本研究で供試した2品種は糖代謝に関わる遺伝子の中で、異なる因子に感受性および耐性を持っていた可能性が考えられた。高温に対する花粉発達の感受性・耐性が異なる2品種を交雑して F1 雑種を育成することにより、高温耐性のある雑種が作出できる可能性が示唆された。

#### (4) 高温下での着果性を有する新規遺伝資源の探索

本研究のように、両親品種では高温着果性を持たないものの、F1 雑種では高温着果性を有する植物材料は、興味深い現象が見られるものの、複数の要因が関わるために遺伝子同定には適さないと考えられる。高温着果性遺伝子の同定に向けて、遺伝的に固定された品種で高温着果性を有するものの探索は有用である。そこで、大規模なフェンローハウスを用いて、*Capsicum* 属の栽培種のうち4種を含む、13品種を栽培し、高温下での着果性を評価した。供試した品種の中で、高温着果性が高かったのは‘タカノツメ’および‘五色旭光’であった。花器の形態的特徴および生殖的形質の調査を行ったところ、高温着果性と相関が高かった形質は花粉発芽率であった。

さらに‘タカノツメ’に着目し、インキュベーターを用いて高温処理を行い、高温着果性を持たない‘Peruvian Purple’を対照として、形質を詳細に比較した。‘Peruvian Purple’と比較すると、‘タカノツメ’は有意に高い花粉発芽率を有したが、それぞれの花粉の人工授粉による着果率には大きな差異が認められなかった。また‘Peruvian Purple’では高温下においてほとんど自動自家受粉が起こらなかったが、‘タカノツメ’では高温下においても自動自家受粉量が維持された。しかし自動自家受粉が維持された要因は花の形態には見つからなかった。一方、‘タカノツメ’は‘Peruvian Purple’よりも花粉を多く飛散させる傾向があった。高温下において‘Peruvian Purple’の着果はほとんど見られなかったにも関わらず、自家花粉の人工授粉処理により着果が認められたため、高温下における自動自家受粉能力の低下が着果を強く制限する可能性が示唆された。すなわち、‘タカノツメ’は高温下で高い花粉発芽率を有するが、高温の着果性には自動自家受粉が関わる可能性も示唆された。

#### <引用文献>

- ① Abdul-Baki, A.A. and J.R. Stommel. 1995. Pollen viability and fruit set of tomato genotypes under optimum and high temperature regimes. HortSci. 30:115-117.
- ② Gajanayake, B., B.W. Trader, K.R. Reddy and R.L. Harkess. 2011. Screening ornamental pepper cultivars for temperature tolerance using pollen and physiological parameters. HortSci. 46:878-884.
- ③ Yamazaki, A., K. Shirasawa and M. Hosokawa. 2020. Transgressive segregation and gene regions controlling thermotolerance of fruit set and pollen germination in *Capsicum chinense*. Euphytica. 216:179.
- ④ Hedhly, A., J.I. Hormaza and M. Herrero. 2008. Global warming and sexual plant reproduction. Trends Plant Sci. 14:30-36.
- ⑤ Yamazaki A. and M. Hosokawa. 2019. Increased percentage of fruit set of F1 hybrid of *Capsicum chinense* during high-temperature period. Sci. Hortic. 243:421-427.
- ⑥ Erickson, A.N. and A.H. Markhart. 2002. Flower development stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. Plant Cell Environ. 25: 123-130.
- ⑦ Reddy, K.R. and V.G. Kakani. 2007. Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. Sci. Hortic. 112:130-135.
- ⑧ Firon, N., R. Shaked, M.M. Peet, D.M. Pharr, E. Zamski, K. Rosenfeld, L. Althan and E. Pressman. 2006. Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. Sci. Hortic. 109:212-217.

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 0件）

1. 著者名 Yamazaki Akira, Takezawa Ao, Nakano Ryohei, Nishimura Kazusa, Motoki Ko, Hosokawa Munetaka, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 30
2. 論文標題 Indicator Candidate Traits for Autonomous Fruit Set Ability Under High Temperatures in Capsicum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Horticultural Research	6. 最初と最後の頁 105 ~ 116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2478/johr-2022-0017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Akira, Takezawa Ao, Nishimura Kazusa, Motoki Ko, Nagasaka Kyoka, Nakano Ryohei, Nakazaki Tetsuya, Hosokawa Munetaka	4. 巻 93
2. 論文標題 Pollen Dispersion is a Key Factor for Autonomous Fruit Set under High Temperatures in the <i>Capsicum annum</i> ‘Takanotsume’	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 49 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.qh-094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Akira, Takezawa Ao, Nagasaka Kyoka, Motoki Ko, Nishimura Kazusa, Nakano Ryohei, Nakazaki Tetsuya	4. 巻 36
2. 論文標題 A simple method for measuring pollen germination rate using machine learning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 355 ~ 364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00497-023-00472-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山崎彬・武澤亜緒・長坂京香・元木航・西村和紗・中野龍平・中崎鉄也
2. 発表標題 機械学習を利用した花粉発芽率の迅速計測手法の確立
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武澤亜緒・山崎彬・長坂京香・元木航・西村和紗・中野龍平・細川宗孝・中崎鉄也
2. 発表標題 トウガラシ品種‘タカノツメ’(Capsicum annuum L.)が持つ高温下での高着果性の原因形質の探索
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎彬・武澤亜緒・西村和紗・長坂京香・岩橋優・井上博茂・元木航・中野龍平・細川宗孝・中崎鉄也
2. 発表標題 トウガラシ‘タカノツメ’が有する高温期の自動着果性の遺伝解析
3. 学会等名 園芸学会 令和5年度春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akira Yamazaki, Tatsuya Kitade, Munetaka Hosokawa
2. 発表標題 The effects of high-temperature stress on reproductive development in an F1 hybrid of Capsicum chinense
3. 学会等名 The 4th Asian Horticultural Congress (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------