

ダイコンの自家不和合性に関わる形質の育種学的研究

学位論文内容の要旨

雑種強勢を利用した一代雑種 (F_1) 育種法は、その実用化にあたり F_1 種子の効率的かつ大量の採種方法が前提となり、生殖制御法や受粉制御法の確立が必須となる。現在ではダイコン、キャベツ、ハクサイ等に代表されるアブラナ科野菜のほとんどの品種が自家不和合性を利用して採種された F_1 雑種品種となっている。アブラナ科の自家不和合性は、胞子体型として作用する S (Self-incompatibility) 遺伝子座に存在する一連の複対立遺伝子に支配される。しかし自家不和合性は、その程度に系統間差が存在すること、種々の内的・外的要因により容易に打破されることから、 S 遺伝子以外の遺伝因子にも制御を受けていることが推察される。

自家不和合性を利用した採種方法には、自家不和合性が CO_2 ガスにより打破される現象を利用し原種採種を行う単交配、あるいは S 遺伝子に関する同質遺伝子系統対を用いた複交配、が主に用いられる。 CO_2 ガスによる自家不和合性打破程度 (CO_2 反応性) には系統間差が存在し、単交配の原種採種栽培時には CO_2 反応性が高いことが、他方、 F_1 採種栽培の場面では、単交配、複交配を問わず、高い自家不和合性程度を示すことが原種系統に求められる。しかしこれら形質、すなわち「 S 遺伝子」、「 CO_2 反応性」ならびに「自家不和合性程度」の相互の遺伝的關係は全く明らかにされていない。

以上の背景から本研究は、ダイコンを材料に用いて、一代雑種育種を進める上で特に重要な生殖形質の選抜の為、いわゆる自家不和合性を、「 S 遺伝子」、「 CO_2 反応性」ならびに「自家不和合性程度」に分けて評価すること、さらにそれら形質の遺伝解析を行うことを目的とした。

1. S 遺伝子の多様性を調査するため、交配実験により 71 近交系統および在来種 223 系統の対立性検定を行った。その結果、 $S^{201} \sim S^{237}$ の 37 種類の S 対立遺伝子を同定した。この内 16 種類の S 対立遺伝子 (S^{207} を除く $S^{201} \sim S^{217}$) を有するホモ型系統間交雑により S 遺伝子ヘテロ型個体を作成し、ヘテロ型とホモ型個体の正逆交雑から、各 S 遺伝子間の優劣性検定を行った。その結果、概ね 4 種の型 (I 型; 柱頭・花粉側とも優劣関係を示す, II 型; 花粉側にのみ優劣関係を示す, III; 柱頭側にのみ優劣関係を示す, IV 型; 柱頭・花粉側とも共優性を示す) に集約され、各型の頻度は 18.9%, 20.0%, 11.1% ならびに 45.6% であった。また出現頻度の高かった S 対立遺伝子はすべて優性であった。

2. *Brassica oleracea* の SLG 遺伝子を基にしたプライマーに、ダイコンの全 DNA を鋳型とした PCR より、ダイコン SLG 遺伝子の単離を行った。その結果、 S^{201} は *B. oleracea* の $SLG6$ と DNA レベルで約 80%, アミノ酸レベルで約 88% の相同性を示し、システイン残基、変異・保存領域も既知の SLG 遺伝子と一致した。加えてノーザンブロットによる発現解析の結果、自家不和合性の発現する開花前日から、柱頭特異的で、開花当日に最大の転写産物量を示した。この結果、本実験で初めて、ダイコンの SLG 遺伝子の単離が為されたことになる。

次に、2 種のダイコン SLG 遺伝子 (S^{201} , S^{207}) 間相同配列から再設計したプライマーを用いた PCR より増幅の認められた S 対立遺伝子の内、新たに 7 種を単離し、塩基配列を明ら

かにした。またこれら遺伝子と *Brassica* 属の *SLG* ならびに *SLR* 遺伝子を含めたコード領域におけるクラスター分析を行った。その結果、両種の *SLG* 遺伝子は明瞭なクラスターに類別できなかった。また 5'側領域を用いた場合と 3'側領域を用いた場合とでは分析結果が異なった。

3. ダイコン *SLG* 遺伝子を基にしたプライマーを用い、PCR-RFLP による S 対立遺伝子の同定を行った。S 対立遺伝子の同質遺伝子系統対ならびに F₂ 集団を供試し、PCR-RFLP の結果と交配実験の結果が完全に一致することを確認した。そこで 37 種の S 対立遺伝子 (S²⁰¹~S²³⁷) を供試したところ、29 種で PCR 産物が得られ、*Msp*I による RFLP によりほとんどの S 対立遺伝子が同定できた。また残り 8 種の S 対立遺伝子では PCR 産物が得られなかった。なお S 対立遺伝子の PCR による増幅・非増幅と優・劣性関係は概ね一致した。

4. 自家不和合性程度は自殖結実率、CO₂ 反応性は CO₂ インキュベーターによる伸長花粉管数 {評点 1 (少) ~ 5 (多)} ならびに一莢粒数は蓄自家受粉により各々評価し、在来種系統における遺伝的変異を調査した。

自家不和合性程度は、0% (19 系統) ~ 100% (2 系統) まで広範な変異が確認された。CO₂ 反応性は、評点 1 の系統が全調査系統中約 32% の 11 系統、評点 5 の系統が約 12% の 4 系統であった。一莢粒数は最小 0.9 粒 ~ 最大 6.2 粒であった。また全調査系統における平均一莢粒数は約 2.9 粒であった。S 遺伝子、自家不和合性程度、CO₂ 反応性ならびに一莢粒数の各形質において形質間相関は認められなかった。

5. CO₂ 反応性の分離する F₂ 集団および F₃ 系統を供試して遺伝子分析を行った。その結果、CO₂ 反応性を支配する遺伝因子は S 遺伝子とは異なり、高い CO₂ 反応性は劣性一因子支配であることが明らかとなった。

次に CO₂ ガスに応答する器官を同定するため、先の F₂ 集団から同一 S 対立遺伝子ホモ型で、CO₂ 反応性の異なる 3 個体を抽出した。これら個体間の正逆交雑を行ったが全交雑組合せの内、高い CO₂ 反応性を示す個体を柱頭側に用いた時のみに、その交雑組合せは高い CO₂ 反応性を示した。

自家不和合性程度に関連する遺伝子を単離するため、簡易ディファレンシャルディスプレイ法を行った。その結果、ある任意のプライマーを用いたとき、自家不和合性程度の低い系統に特異的な PCR 産物が得られ、その産物は S-アデノシルメチオニン合成酵素と高い相同性を有していた。同様に CO₂ 反応性に関連する遺伝子を単離するため、簡易ディファレンシャルディスプレイ法を行った。延べ 236 種類のプライマーを用いてスクリーニングしたが、単離するには至らなかった。

6. S 遺伝子ならびに自家不和合性程度ならびに一莢粒数の多様性を基にした栽培ダイコン系統分化を試み、これら形質と他の農業形質との関係を調査した。

各在来品種群間共通な S 対立遺伝子数の数量化 IV 類による計算結果に、主成分分析を適用し、その因子負荷量により系統分類したところ、特に国内品種群は古来の地理的分布や形態形質に関わらず混然一体となり分布した。しかしこれまでの研究では系譜上比較的近いとされる、理想ならびに西町品種群において第 2 主成分の因子負荷量が大きく異なった。自家不和合性程度は各品種群間に有意差は認められなかった。しかし“練馬大根”に関与したとされる品種群の中では自殖結実率平均値に統計的有意差が検出された。一莢粒数は各品種群間に統計的有意差が認められた。すなはちネパール系品種群は比較的高い値を示したのに対し、国内品種群の多くが比較的低い値であった。

最後に本研究を通じて明らかとなった結果を基に、「CO₂ 反応性」を利用した単交配、あるいは「S 遺伝子」に関する同質遺伝子系統対を用いた複交配における、系統育成上での各形質の選抜上の留意点を総合的に考察し、新たな選抜システムを提案した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

ダイコンの自家不和合性に関わる形質の育種学的研究

本論文は、図20、表19、135ページからなる邦文で、別に5編の参考論文が添えられている。ダイコンを含む多くのアブラナ科野菜は、現在、自家不和合性を利用して採種された F_1 雑種品種となっている。雑種強勢を利用した一代雑種 (F_1) 育種法は、その実用化にあたり F_1 種子の効率的かつ大量の採種方法が前提となる。自家不和合性は、S(Self-incompatibility) 遺伝子座に支配されるものの、自家不和合性の程度に系統間差が存在すること、種々の内的・外的要因により容易に打破されることから、S遺伝子以外の遺伝因子にも制御を受けていることが推察される。自家不和合性を利用した採種方法には、自家不和合性が CO_2 ガスにより打破される現象を利用し原種採種を行う単交配、あるいはS遺伝子に関する同質遺伝子系統対を用いた複交配、が主に用いられる。 CO_2 ガスによる自家不和合性打破程度 (CO_2 反応性) には系統間差が存在し、単交配の原種採種栽培時には CO_2 反応性が高いことが、他方、 F_1 採種栽培の場面では、単交配、複交配を問わず、高い自家不和合性程度を示すことが原種系統に求められる。しかしこれら形質、すなわち「S遺伝子」、「 CO_2 反応性」ならびに「自家不和合性程度」の相互の遺伝的關係は全く明らかにされていない。

以上の背景から本研究は、ダイコンの一代雑種育種を進める上で、自家不和合性を、「S遺伝子」、「 CO_2 反応性」ならびに「自家不和合性程度」に分けて総合的に評価したもので、主な結果は次のごとくである。

1. S遺伝子の多様性を調査するため、交配実験により71 近交系統および在来種223系統の対立性検定を行った。その結果、 $S^{201} \sim S^{237}$ の37種類のS対立遺伝子を同定した。この内16種類のS対立遺伝子 (S^{207} を除く $S^{201} \sim S^{217}$) を有するホモ型系統間交雑によりS遺伝子ヘテロ型個体を作成し、ヘテロ型とホモ型個体の正逆交雑から、各S遺伝子間の優劣性検定を行った。その結果、概ね4種の型 (I型; 柱頭・花粉側とも優劣関係を示す, II型; 花粉側にのみ優劣関係を示す, III; 柱頭側にのみ優劣関係を示す, IV型; 柱頭・花粉側とも共優性を示す) に集約

され、各型の頻度は18.9%、20.0%、11.1%ならびに45.6%であった。また出現頻度の高かったS対立遺伝子はすべて優性であった。

2. *Brassica oleracea* のSLG 遺伝子を基にしたプライマーに、ダイコンの全DNAを鋳型としたPCRより、ダイコンSLG 遺伝子を調査した。その結果、 S^{201} は*B.oleracea* のSLG6とDNAレベルで約80%、アミノ酸レベルで約88%の相同性を示し、システイン残基、変異・保存領域も既知のSLG 遺伝子と一致した。また、ノーザンプロット解析の結果、自家不和合性が発現する開花前日から開花当日に柱頭で S^{201} は特異的に転写された。次に、ダイコンSLG 遺伝子の7種類について塩基配列を決定し、コード領域の比較からクラスター分析を行った。その結果、種間のSLG 遺伝子は明瞭なクラスターに類別できなかった。

3. ダイコンSLG 遺伝子配列を基にして、PCR-RFLPによるS対立遺伝子の同定を行った。S対立遺伝子の同質遺伝子系統対ならびに F_2 集団を供試し、PCR-RFLPの結果と交配実験の結果が一致することを確認した。そこで37種のS対立遺伝子 ($S^{201} \sim S^{237}$) を調査したところ、29種でPCR産物が得られ、*Msp*IによるRFLPによりほとんどのS対立遺伝子を同定できた。

4. 在来種系統における遺伝的変異を調査するため、自家不和合性程度を自殖結実率で、 CO_2 反応性を CO_2 インキュベーターによる伸長花粉管数で、また一莢粒数を蓄自家受粉で各々評価した。その結果、3形質ともに系統間に広範な変異が存在することが判った。しかし、これら3形質において相互に相関は認められず、育種的に変異を自由に組み合わせることができると判断できた。

5. CO_2 反応性について遺伝子分析を行った結果、高い CO_2 反応性は劣性一因子支配であることが明らかとなった。また、 CO_2 ガスに応答する器官を同定するため、同一S対立遺伝子を持ち、 CO_2 反応性の異なる3個体を選んで正逆交雑を行った。その結果、高い CO_2 反応性を示す個体を柱頭側に用いた時のみに、高い CO_2 反応性を示すことが判った。

6. S遺伝子、自家不和合性程度ならびに一莢粒数の多様性を基にした栽培ダイコン系統の分類を行うと共に、他の農業形質との関連を調査した。主成分分析の結果は、国内品種群に見られる自家不和合性に関わる諸形質が古来の地理的分布や形態形質とは無関係に分化している傾向を示した。

最後に本研究を通じて明らかとなった結果を基に、「 CO_2 反応性」を利用した単交配、あるいは「S遺伝子」に関する同質遺伝子系統対を用いた複交配における、系統育成上での各形質の選抜上の留意点を総合的に考察し、新たな選抜システムを提案した。

以上のように、本論文は従来解析が不十分であった採種関連要因を総合的に把握し、異なる遺伝要因を明確にした。この成果は、学術的・実用的に高く評価される。よって審査員一同は、新倉聡が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。