

# ハマダイコンにおける細胞質の分化および稔性回復遺伝子の分布

山 岸 博  
京都産業大学工学部生物工学科

## Abstract

Cytoplasmic male sterility and pollen fertility restoration ability against it are crucial characteristics for F<sub>1</sub> hybrid breedings of various important crops. In this report I examined the distribution of the mitochondrial gene (*orf138*) inducing the Ogura male sterility and the restorer gene in Japanese and Korean wild radishes.

DNA was isolated individually from 259 radish plants collected in 15 Japanese and two Korean populations. By the PCR with the DNA, the presence of *orf138* was detected. For the plants having the *orf138*, pollen fertility was observed and the plants showing normal fertility were judged to have the restorer gene. On the other hand, the plants with normal cytoplasm were crossed as the pollen parent with the Ogura male-sterile variety, 'MS - Gensuke'. Based on the observation of the pollen fertility of the hybrids, presence of the restorer gene and the genotype were determined for each pollen parent.

While 39% of the wild radishes possessed the *orf138*, most of them (97%) showed normal pollen fertility and were judged to contain the restorer gene. Among the radishes with the normal cytoplasm, 16% lacked the restorer gene, whereas 34% were estimated as homozygotes for the gene. There was no correlation between the frequency of *orf138* and that of the plants with fertility restorer gene in the populations. The origin of the restorer gene and mechanisms keeping its high frequency in wild radish populations should be clarified further.

## 1. はじめに

植物の品種改良の長い歴史の中で、前世紀に開発されたF<sub>1</sub>育種法は、農業生産に極めて大きく貢献した。たとえばアメリカのトウモロコシ生産量は20世紀後半の50年間で2.46t/ha (1948-1952年) から8.60t/ha (2000年) へと約3.5倍に増加したが<sup>1)</sup>、この主たる要因はF<sub>1</sub>育種の普及にある。このようなF<sub>1</sub>育種による増収効果は、トウモロコシにとどまらず、イネ、ナタネ、ヒマワリ、テンサイ、トマト、タマネギ、キャベツなど極めて多数の農作物で認められているところである。

F<sub>1</sub>育種を確実にかつ効率的に実施するためには、種子親系統の自殖を防ぎ、両親間の交雑を確実に起こす操作が必須である。そのために最も広く利用されている形質が細胞質雄性不稔性である。細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアの遺伝子の働きによって、葯における花粉の形成が不可能になる一方で、雌性器官の受精能力は正常のままであるという現象で、現在までに200種を超える植物で観察されている。それらのうちダイコンで発見されたオグラ型細胞質雄性不稔性は、ダイコンだけでなく同じアブラナ科の*Brassica*属作物にも導入されて、ナタネ、キャベツ、ハクサイなど多くの重要な作物でF<sub>1</sub>育種に用いられている。このオグラ型雄性不稔性の遺伝的来歴は長い間不明確であった。しかし著者らの一連の研究によって、オグラ型雄性不稔性の原因遺伝子（ミトコンドリアの*orf138*）は、ダイコン属の野生種（*Raphanus raphanistrum*）で生じ、それが日本のハマダイコンに伝播したものである事が解明された<sup>2-4)</sup>。

細胞質雄性不稔性はF<sub>1</sub>育種において確実なF<sub>1</sub>種子の採種をもたらすものである。しかしながら、子実を利用する作物においてこの性質を利用する場合には、F<sub>1</sub>採種のためのもう一方の親である花粉親に稔性回復遺伝子を保有させる必要がある。さもなければ、F<sub>1</sub>品種は旺盛な栄養生長を示すものの、全個体が雄性不稔となり、子実生産は全く期待できないことになる。このため、多くのアブラナ科作物のうちでも、特に油料作物として世界的に重要なナタネ（*B. napus*）などでこの性質を利用するためには、同時に稔性回復遺伝子を用いることが必要となる。ところが現在まで、オグラ型雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子は、それが必要とされる*Brassica*属作物では発見されていない。

著者はオグラ型雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子の分布を、広く栽培・野生ダイコンで調査した。その結果、この遺伝子が*R. raphanistrum*およびハマダイコンの両野生ダイコンならびにヨーロッパおよび中国の栽培ダイコンに観察される一方で、日本の栽培ダイコンではほとんど認められないことを明らかにした<sup>5)</sup>。このような異なる種類の栽培、野生ダイコンに存在する稔性回復遺伝子の互いの異同、およびそれらのダイコンにおける細胞質の分化と稔性回復遺伝子の有無の間の対応関係を明らかにすることは、この遺伝子の実用的利用の見地からも、また野生植物における生殖生態学の視点からも非常に興味を持たれる。

そこで本研究では、我国および韓国で収集されたハマダイコンについて、まず大規模に細胞質の分化を調査した。次に、それらの花粉稔性を観察するとともに、交雑実験を行うことにより稔性回復遺伝子の有無を明らかにした。それらの結果にもとづき、ハマダイコンの集団におけるミトコンドリアの雄性不稔遺伝子（*orf138*）と、核の稔性回復遺伝子の分布の対応関係を解明しようとした。

## 2. 材料および方法

我国で収集されたハマダイコン15集団および韓国のハマダイコン2集団を用いた（表—1）。

表-1 ハマダイコンにおける *orf138* の分布と花粉稔性

集 団	調査個体数	<i>orf138</i> を 持つ個体数	可稔個体数
西表島	8	1	8
残波岬	8	5	8
栗 田	21	0	21
奈多浜	10	2	10
室 戸	19	9	19
今 宿	12	2	12
千 歳	18	12	18
伊良湖	18	0	18
串木野	16	14	14
仁 摩	19	3	19
温海温泉	16	14	16
間 島	15	1	15
美浜町	18	5	18
福 江	13	1	13
長 門	15	2	15
城 山	14	12	13
表 善	19	18	19
計	259	101 (39.0%)	256 (98.8%)

各集団について表-1に示した数の個体を栽培し、各個体からDNAを単離した。単離したDNAを用いて、オグラ型雄性不稔性の原因遺伝子であるミトコンドリアの*orf138*を増幅するPCRを行い<sup>3)</sup>、各個体における*orf138*の有無を明らかにした。その後、調査個体が開花した時点で各個体における花粉形成の有無を調査した。上記のPCRによって*orf138*の存在が示され、かつ開花時の調査により花粉の形成が観察された個体は、稔性回復遺伝子を持つと判定した。一方*orf138*を持ちかつ花粉不稔性を示す個体は、稔性回復遺伝子を持たないと判定した。

次にPCRによって*orf138*を持たないことが示された正常型細胞質の個体については、オグラ型雄性不稔性の‘MS源助’との交雑を行った。すなわち‘MS源助’を母本として、これにハマダイコンの各個体の花粉を授粉することによって、雑種種子を得た。得られた雑種種子を播種して、開花まで育てた。‘MS源助’とハマダイコンの個体間の各組合せごとに雑種個体における花粉形成の有無を調査し、各組合せが可稔個体で固定しているか、不稔個体で固定しているかあるいは可稔個体と不稔個体が分離するかを識別した。これによって、交雑に用いた正常型細胞質のハマダイコンが稔性回復遺伝子を持つか否か、および稔性回復遺伝子に関する遺伝子型がホモかヘテロかを推定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 ハマダイコンにおける *orf138* の分布と雄性不稔性

PCRの結果明らかになった、ミトコンドリアの雄性不稔性原因遺伝子 *orf138* の分布を表-1 に示した。調査した17集団のうち、*orf138* を持つ個体が全く観察されなかった集団は2集団（‘栗田’、‘伊良湖’）にとどまり、他の15集団にはすべて *orf138* を持つ個体が含まれていた。集団中の *orf138* を持つ個体の頻度は様々であったが、特に‘串木野’（鹿児島県）、‘温海温泉’（山形県）および‘城山’と‘表善’（いずれも韓国）の集団では80%以上の個体が *orf138* を持っていた。*orf138* を持つ個体の頻度と各集団の地理的な位置との間には、特定の傾向は見出せず、調査したハマダイコン全体では、39%にあたる101個体が *orf138* を有していた。

一方、これら101個体のうち、実際に雄性不稔性を示した個体は、‘串木野’の2個体と‘城山’の1個体の計3個体だけであった。この不稔個体の割合は調査個体全体のわずか1.2%であり、他の個体はすべて正常な花粉形成を示した。このうち *orf138* を持ちながら、可稔性を示した98個体は、いずれも稔性回復遺伝子を持つと判定された。

#### 3.2 正常型細胞質のハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の分布

次に、*orf138* を持たない正常型細胞質のハマダイコン個体を花粉親として、オグラ型雄性不稔性の‘MS源助’との交雑を行った。交雑の結果、花粉稔性の調査が可能なF<sub>1</sub>が5個体以上得られた交雑組合せの数は、全体で106組合せとなった（表-2）。ハマダイコンの集団の中では‘温海温泉’の個体を用いた交雑で、必要な数のF<sub>1</sub>が得られなかった以外は、すべての集団で1~16の組合せのF<sub>1</sub>が獲得された（表-2）。

得られたF<sub>1</sub>の花粉稔性を調査し、雄性不稔性の分離の有無を明らかにすることで、花粉親に用いたハマダイコンの稔性回復遺伝子に関する遺伝子型を以下のように推定した。すなわち、

- a) F<sub>1</sub>の5個体以上がすべて可稔である組合せでは、親のハマダイコンは、稔性回復遺伝子をホモに持つ。
- b) F<sub>1</sub>の中で可稔個体と不稔個体が分離する組合せでは、親のハマダイコンは稔性回復遺伝子をヘテロに持つ。
- c) F<sub>1</sub>の5個体以上がすべて不稔である組合せでは、親のハマダイコンは稔性回復遺伝子を持たない。

このような基準で推定した、正常型細胞質のハマダイコンの稔性回復遺伝子に関する遺伝子型を表-3にまとめた。調査16集団のすべてで稔性回復遺伝子を持つ個体が観察された。特に、集団中のすべての個体が正常型細胞質を持っていた2集団（‘栗田’、‘伊良湖’）においても、それぞれ75%、87.5%と大半の個体が稔性回復遺伝子を有していた。さらに、*orf138* を持つ個体を含む14集団のうち‘残波岬’、‘今宿’、‘千歳’、‘串木野’、‘間島’、‘福江’、‘長門’およ

表-2 ハマダイコンにおける正常型細胞質の個体を用いた‘MS源助’との交配数

集 団	調査個体数	正常型個体数	交配個体数
西表島	8	7	7
残波岬	8	3	2
栗 田	21	21	12
奈多浜	10	8	7
室 戸	19	10	9
今 宿	12	10	10
千 歳	18	6	3
伊良湖	18	18	16
串木野	16	2	1
仁 摩	19	16	12
温海温泉	16	2	0
間 島	15	14	5
美浜町	18	13	10
福 江	13	12	5
長 門	15	13	5
城 山	14	2	1
表 善	19	1	1
計	259	158	106

び‘表善’の8集団では、全個体が稔性回復遺伝子を持っていた。そうした中で‘室戸’のハマダイコンは、調査9個体中5個体で稔性回復遺伝子が認められず、他の集団と比較して、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合が著しく低かった。

調査したハマダイコン全体でみると、調査個体の84%に稔性回復遺伝子が存在し、かつ全体の50%の個体が稔性回復遺伝子をヘテロに持つことが明らかになった（表-3）。これに対して、稔性回復遺伝子を持たない、遺伝子型が劣性ホモの個体の割合は全体で16%で、稔性回復遺伝子をホモに持つ個体の割合（34%）の約半分となった。一方、この稔性回復遺伝子を持たない個体の割合は、*orf138*を持ちながら稔性回復遺伝子を持たない個体の割合と比較して、明らかに増加していた（表-4）。

オグラ型細胞質を持つ個体では、稔性回復遺伝子がない場合、その個体の雄性不稔化に直結する。これは、その個体における種子稔性の低下につながり、適応度を著しく下げる。このため、*orf138*を持つ個体では稔性回復遺伝子を持つ方向に自然選択が働き、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合が極めて高くなると考えられる。これに対して、正常型細胞質の個体においては、稔性回復遺伝子の有無はその個体の適応度に全く影響を与えない。このことが、正常型細胞質のハマダイコンにおいて、*orf138*を持つハマダイコンと比較して、稔性回復遺伝子を持たない個体が増加した理由と考えられる（表-5）。しかしその一方で、正常型のハマダイコンにお

表-3 正常型細胞質のハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の遺伝子型

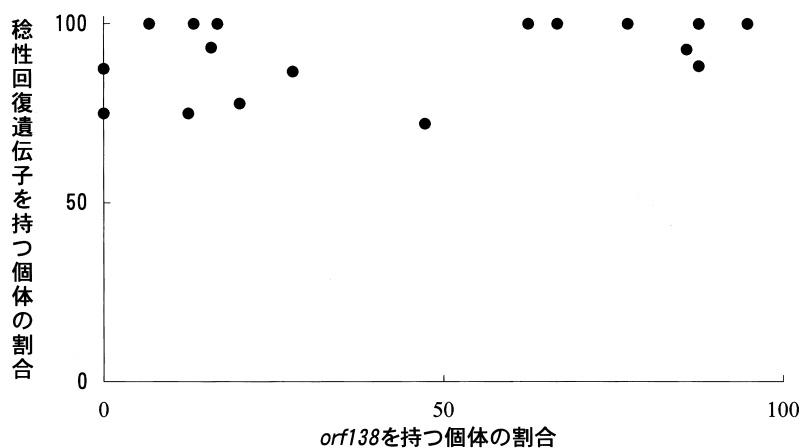
集 団	交配個体数	遺伝子型別個体数		
		Rfホモ	ヘテロ	rfホモ
西表島	7	1	4	2
残波岬	2	2	0	0
栗 田	12	1	8	3
奈多浜	7	3	2	2
室 戸	9	0	4	5
今 宿	10	8	2	0
千 歳	3	3	0	0
伊良湖	16	6	8	2
串木野	1	0	1	0
仁 摩	12	5	6	1
間 島	5	2	3	0
美浜町	10	1	7	2
福 江	5	2	3	0
長 門	5	1	4	0
城 山	1	0	1	0
表 善	1	1	0	0
計	106	36 (34.0%)	53 (50.0%)	17 (16.0%)

表-4 ハマダイコンにおける細胞質の分化と稔性回復遺伝子の分布

集 団	<i>orf138</i> を持つ個体		正常型細胞質を持つ個体		計 (C)	(A) + (B) / (C) %
	Rfを持つ (A)	Rfを 持たない	Rfを持つ (B)	Rfを 持たない		
西表島	1	0	5	2	8	75.0
残波岬	5	0	2	0	7	100
栗 田	0	0	9	3	12	75.0
奈多浜	2	0	5	2	9	77.8
室 戸	9	0	4	5	18	72.2
今 宿	2	0	10	0	12	100
千 歳	12	0	3	0	15	100
伊良湖	0	0	14	2	16	87.5
串木野	12	2	1	0	17	88.2
仁 摩	3	0	11	1	15	93.3
温海温泉	14	0	1	0	15	100
間 島	1	0	5	0	6	100
美浜町	5	0	8	2	15	86.7
福 江	1	0	5	0	6	100
長 門	2	0	5	0	7	100
城 山	11	1	1	0	14	92.9
表 善	18	0	1	0	19	100
計	98	3	90	17	211	

表-5 ハマダイコンにおける細胞質のタイプと稔性回復遺伝子の有無の関係

ミトコンドリア の <i>orf138</i>	稔性回復遺伝子		計
	あり	なし	
あり	101	3	104
なし	89	17	106
計	190	20	210

図-1 ハマダイコンの集団における *orf138* を持つ個体と稔性回復遺伝子を持つ個体の割合の関係

いても、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合は80%を越え、かつこの遺伝子をホモに持つ個体の割合が劣性ホモ個体の割合の2倍以上となっていた（表-3）。これは、ハマダイコンの集団において、*orf138* を持つ個体に極めて高い頻度で存在する稔性回復遺伝子が正常型細胞質の個体に、交雑を通して移入していることを示唆しているものと考えられる。

### 3.3 ハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の頻度

上記2項で述べた稔性回復遺伝子の分布に関する観察結果を、*orf138* を持つ個体と正常型細胞質の個体とでとりまとめた結果を表-4に示した。その上で、各集団について、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合を算出した（表-4）。ハマダイコンの集団における稔性回復遺伝子を持つ個体の割合は、すべて70%以上であり、かつ全個体が稔性回復遺伝子を持つ集団が半数近く認められた。さらに、集団中の *orf138* を持つ個体の割合と稔性回復遺伝子を持つ個体の割合との関係を見ると（図-1）、前者が0%から95%まで、後者が72%から100%まで変動する中で、両者の間には相関は観察されなかった。このことは、ハマダイコンの集団においては、オグラ型雄性不稔細胞質を持つ個体の割合に関係なく、稔性回復遺伝子を持つ個体が極めて高

い割合で存在することを明確に示している。

著者の過去の解析において、栽培ダイコンのうち、日本の品種では稔性回復遺伝子を持つものはほとんど存在せず、中国のダイコンおよびハツカダイコンに稔性回復遺伝子を持つものが散見されている<sup>5)</sup>。これら栽培ダイコンとハマダイコンの大きい相違は、栽培ダイコンは大部分が正常型の細胞質を持つのにに対してハマダイコンでは40%前後の個体が雄性不稔細胞質を持つことである(表-1参照)。このような細胞質の分化の差のみが、ハマダイコンにおいて特異的に稔性回復遺伝子を持つ個体が多いことの原因であろうか。今後、ハマダイコンの持つ稔性回復遺伝子の由来の解明とあわせて、稔性回復遺伝子を持つ個体が高い割合で存在することのメカニズムをさらに詳しく解明する必要がある。

#### 4. まとめ

1) 細胞質雄性不稔性とそれに対する稔性回復遺伝子は植物の育種において極めて有用な特性である。本研究では、我国および韓国に自生するハマダイコンにおける雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の分布を解明した。

2) 日本のハマダイコン15集団、韓国のハマダイコン2集団について、各個体よりDNAを単離し、雄性不稔性の原因遺伝子であるミトコンドリアの*orf138*の有無を、PCRによって調査した。次に*orf138*を持つ個体の花粉稔性を調べて、これらの個体が稔性回復遺伝子を持つかどうかを判定した。その一方で、*orf138*を持たない正常型細胞質の個体の花粉を雄性不稔性の系統‘MS源助’に交雑して雑種個体を得た。これら雑種個体の花粉稔性の分離の調査に基づき、交雑に用いた花粉親のハマダイコンが稔性回復遺伝子を持つかどうかを判定した。

3) 調査したハマダイコンのうち39% (101個体) は*orf138*を持っていたが、そのうち98個体は可稔であり、稔性回復遺伝子を持つと判断された。

4) 正常型細胞質を持つハマダイコンにおいては、84%の個体が、稔性回復遺伝子を持っていた。また同遺伝子をヘテロに持つ個体が全体の50%を占めた。

5) 正常型細胞質の個体における稔性回復遺伝子を持たない個体の割合(16%)は、*orf138*を持つ個体におけるそれより高かった。その一方で、ハマダイコンの集団においては、*orf138*を持つ個体の頻度に関係なく、稔性回復遺伝子を持つ個体が高い割合で見出された。

6) このようにハマダイコンにおいては稔性回復遺伝子が高い頻度で認められるが、その由来と分化については今後さらに詳しく解析する必要がある。

#### 引用文献

- 1) 山田 実 (2005) 農業および園芸 80 : 87-90.



- 2) Yamagishi, H. and T. Terachi (1994) *Theor. Appl. Genet.* 87 : 996-1000.
- 3) Yamagishi, H. and T. Terachi (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93 : 325-332.
- 4) Yamagishi, H. and T. Terachi (1997) *Plant Breed.* 116 : 323-329.
- 5) Yamagishi, H. (1998) *Genes Genet. Syst.* 73 : 79-83.

