

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5265366号
(P5265366)

(45) 発行日 平成25年8月14日(2013.8.14)

(24) 登録日 平成25年5月10日(2013.5.10)

(51) Int. Cl. F I
AO1H 1/00 (2006.01) AO1H 1/00 Z
AO1H 5/00 (2006.01) AO1H 5/00 Z

請求項の数 9 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2008-531544 (P2008-531544)	(73) 特許権者	508088753
(86) (22) 出願日	平成17年9月22日 (2005.9.22)		エンザ・ガーデン・ベヘル・ベスローテ
(65) 公表番号	特表2009-508498 (P2009-508498A)		ン・フェンノートシャップ
(43) 公表日	平成21年3月5日 (2009.3.5)		オランダ国, エヌエルー1602 デーベ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/054759		ー・エンクハイゼン, ヘイリング 1E
(87) 国際公開番号	W02007/038980	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成19年4月12日 (2007.4.12)		弁理士 奥山 尚一
審査請求日	平成20年9月12日 (2008.9.12)	(74) 代理人	100096769
			弁理士 有原 幸一
		(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
		(74) 代理人	100118407
			弁理士 吉田 尚美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1つまたは複数の遺伝形質を紫花のトウガラシ属種の植物から白花のトウガラシ属種の植物へ転移させるための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1つまたは複数の遺伝形質を、前記遺伝形質を有する *C. pubescens* である紫花のトウガラシ属 (*Capsicum*) 種の植物から、*C. chinense* と *C. annuum* との雑種、*C. chinense* または *C. annuum* である白花のトウガラシ属種の植物へ転移させるための方法であって、

(a) 前記遺伝形質を有する *C. pubescens* である紫花のトウガラシ属種の第1の植物と、*C. eximium* である別の紫花のトウガラシ属種の第2の植物とを交雑させて、前記遺伝形質を有する植物を選択することによって、前記遺伝形質を有する第1の雑種植物を作成する工程と、

(b) 前記遺伝形質を有する前記第1の雑種植物と、*C. frutescens* である白花のトウガラシ属種の第1の植物とを交雑させることによって、第2の雑種植物を作成する工程と、

(c) 前記第2の雑種植物と、前記遺伝形質を有する *C. pubescens* である紫花のトウガラシ属種の前記第1の植物とを交雑させて、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択する工程と、

(d) 工程(c)において入手された植物と、*C. chinense* と *C. annuum* との雑種、*C. chinense* または *C. annuum* である白花のトウガラシ属種の植物とを交雑させて、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって第3の雑種植物を作成する工程と

を含む方法。

【請求項 2】

(e) 工程 (d) において入手された、前記遺伝形質を有さない植物を選択し、これらの植物と、前記遺伝形質を有する *C. pubescens* である紫花のトウガラシ属種の前記第 1 の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択する工程と

(f) 工程 (e) において入手された植物と、*C. chinense* と *C. annuum* との雑種、*C. chinense* または *C. annuum* である白花のトウガラシ属種の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって、第 4 の雑種植物を作成する工程と

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(g) 前記遺伝形質を有する第 4 の雑種植物と、*C. chinense* と *C. annuum* との雑種、*C. chinense* または *C. annuum* である前記白花のトウガラシ属種の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって、第 5 の雑種植物を作成する工程をさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

工程 (b) の後に、前記第 2 の雑種植物は自家受粉しており、その子孫が工程 (c) において使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 (c) において入手された前記植物は自家受粉しており、その子孫が工程 (d) において使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

工程 (d) において入手された前記植物は自家受粉しており、その子孫が工程 (e) において使用される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

工程 (e) において入手された前記植物は、自家受粉しており、その子孫が工程 (f) において使用される、請求項 2 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記遺伝形質は、トウガラシ属の病害に対する耐性遺伝子である、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記耐性遺伝子は、細菌性病害である *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* のレース I、III および IV に対する耐性を運ぶ Bs 4 遺伝子である、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1 つまたは複数の遺伝形質を、前記遺伝形質を有する紫花のトウガラシ属 (*Capsicum*) 種の植物から、白花のトウガラシ属種の植物へ転移させるための方法に関する。本発明はさらに、植物自体、ならびに前記植物に由来する果実、種子および他の植物部分にも関する。

【背景技術】

【0002】

トウガラシ属は、ナス科 (*Solanaceae*) の大きな科に属する。トウガラシ属群のいくつかの種は、世界中の多数の国々において露地または保護された条件下で栽培されている貴重な作物である。辛みのある果実を含むトウガラシ属の種類は、一般に、生で、乾燥もしくは抽出してのいずれかで香辛料として使用されている。一般に甘唐辛子として知られている極めて様々な形状および色がある辛みのない果実を含む種は、野菜として広範囲に使用されている。

10

20

30

40

50

【0003】

トウガラシ属は、花の色に基づいて2つの別個の群：例えば、近縁種である *C. annuum* (トウガラシ；カプシカム・アナム)、*C. frutescens* (キダチトウガラシ；カプシカム・フルテセンス)、*C. baccatum* (アヒ・アマリジョ；カプシカム・バカタム)、*C. chacoense*、*C. galapagoense*、*C. praetermissum* および *C. chinense* (カプシカム・シネンセ) を含む白花群と、例えば *C. tovarii*、*C. pubescens* (ロトコ；カプシカム・パブセンス)、*C. eximium* (カプシカム・エキシミウム) および *C. cardenasii* (ウルピカ；カプシカム・カルデナシ) を含む紫花群とに分類することができる。白花群の中では、*Capsicum annuum*、およびその近縁種である *C. frutescens* が最もよく知られている栽培化された種類であり、これらは主として加工用および消費用の甘唐辛子や唐辛子を生産するために使用されている。

10

【0004】

トウガラシ属は、他の植物と同様に、昆虫、線虫、真菌、細菌およびウイルスを含む多数の害虫や病害に攻撃される。そのような細菌性病害の1つは、細菌である *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (キサントモナス・カンベリストリス、病原菌型、斑点細菌病) によって誘発される細菌性斑点病である。トウガラシ属の細菌性斑点病は、葉上についた無数の角斑によって認識できる。初期には、斑点は水浸状である。初期段階で感染した葉は変形し始める。しばしば罹患した葉の辺縁は細い帯状の壊死性組織で縁取られる。感染したトウガラシ属の葉は、早期に落葉し、それによって果実は太陽に曝され、結果として日焼けが生じ、これに続発して果実腐敗や収量低下が生じることがある。トウガラシ属の果実が症状を示すことはまれであるが、早期に感染した場合は落果することがある。

20

【0005】

X. vesicatoria は、温暖な国々や熱帯諸国において、特に屋外栽培作物であるトウガラシ属に蔓延していて損害を与えているので、大きな経済的影響を及ぼしている。この病害の制御は、主として健全な(処理済み)種子からの植物の生産および全シーズン中に講じられる予防手段に頼っている。

【0006】

そのような病害に対する有用な耐性、ならびに果実の品質特性などの他の形質は、固有かつ特異的な形質(例えば、細菌 *Xanthomonas vesicatoria* の特定のレースに対する、白花種には存在しない耐性など)を有する、例えば *C. pubescens* などのトウガラシ属の野生種もしくは他の栽培化された種に存在する可能性がある。そこで、任意の耐性遺伝子などの好都合の遺伝形質を、例えば遠縁種である紫花の *C. pubescens* から、例えば *C. annuum* および/または *C. frutescens* などの一般に使用される白花種へ転移させることは有益な可能性がある。

30

【0007】

しかし、トウガラシ属の相違する種間には、程度の相違する強固な交雑障壁があることは周知である。交雑が不可能であるものがあることも実証されており、他の交雑は、胚培養(*embryo rescue*)などのインビトロ培養法を用いた場合にのみ可能である。さらに、ほとんどの場合に、前記交雑に由来する産物は、完全または部分的に無菌であるため、あらゆるその後の繁殖目的に使用することが不可能になる。

40

【0008】

このため、それにより所望の遺伝形質を相違する紫花と白花のトウガラシ属種間で転移させることのできる方法に対する必要が存在する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、例えば耐性遺伝子などであるがそれには限定されない1つまたは複数の遺伝形質を、紫花のトウガラシ属種の植物から白花のトウガラシ属種の植物へ転移させ

50

るための方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

これは、

(a) 遺伝形質を有する紫花のトウガラシ属種の第1の植物と、別の紫花のトウガラシ属種の第2の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって、前記遺伝形質を有する第1の雑種植物を作成する工程と、

(b) 前記遺伝形質を有する前記第1の雑種植物と、白花のトウガラシ属種の第1の植物とを交雑させることによって、第2の雑種植物を作成する工程と、

(c) 前記第2の雑種植物と、前記遺伝形質を有する紫花のトウガラシ属種の前記第1の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択する工程と、

(d) 工程(c)において入手された植物と、白花のトウガラシ属種の第2の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって、第3の雑種植物を作成する工程と、を含む方法を提供することによって達成される。

【0011】

本発明によると、最初に1つの遺伝形質が紫花のトウガラシ属種から白花のトウガラシ属種へ首尾よく転移される。本発明の方法は、数種の種間交雑の適切な組み合わせ、ならびに次の種への一種の橋として機能する交雑(図1)に基づいている。所望の遺伝形質は、例えば、当業者に知られている周知の分子生物学的手法にしたがって、分子マーカーもしくはバイオアッセイによって追跡することができる。

【0012】

本発明の好ましい実施形態によると、本方法はさらに、

(e) 工程(d)において入手された、前記遺伝形質を有さない植物を選択して、これらの植物と、前記遺伝形質を有する紫花のトウガラシ属種の前記第1の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択する工程と、

(f) 工程(e)において入手された植物と、前記白花のトウガラシ属種の第2の植物とを交雑させ、その子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって第4の雑種植物を作成する工程と

を含む。このようにすると、本発明の方法の工程(d)において入手される前記遺伝形質を有さない植物も、依然として本発明の方法においてさらに使用できる。

【0013】

さらに好ましい実施形態によると、本方法は、

(g) 前記遺伝形質を有する第4の雑種植物と、白花のトウガラシ属種の第2の植物とを交雑させ、そしてその子孫から前記遺伝形質を有する植物を選択することによって第5の雑種植物を作成する工程をさらに含む。そのようにして、紫花のトウガラシ属種に由来する目的とする前記遺伝形質を有するが、白花種のすべての品質態様も含む安定性の白花植物が入手される。

【0014】

好ましくは、工程(b)の後に、第2の雑種植物を自家受粉させ、その子孫は、工程(c)において、前記耐性を確定するため、繁殖能力の態様を改良するため、そしてホモ接合型の、所望の形質を有する遺伝的に安定性の植物を入手するために使用される。

【0015】

また別の好ましい実施形態によると、工程(c)において入手された植物を自家受粉させ、その子孫は、工程(d)において、同様に前記耐性を確定するため、繁殖能力の態様を改良するため、そしてホモ接合型の、所望の形質を有する遺伝的に安定性の植物を入手するために使用される。

【0016】

さらに、他の好ましい実施形態によると、工程(d)において入手された植物を自家受粉させ、その子孫は工程(e)において使用される、および/または工程(e)において入手された植物を自家受粉させ、その子孫は工程(f)において使用される。

【0017】

本発明によると、雑種植物を入手すること、またはプロセスの速度を高めることに関して本プロセスに対して胚培養法が有益である場合は、常に適用される。

【0018】

好ましくは、紫花のトウガラシ属種の第1の植物は、*C. pubescens*、*C. eximium*、および*C. cardenasii*からなる群から選択され、より好ましくは、紫花のトウガラシ属種の第1の植物は*C. pubescens*である。トウガラシ属における最長の遺伝距離は、*C. pubescens*と*C. annuum/frutescens*との間である。これらの種間の直接交雑は、今までは、胚培養法を用いた場合でさえ不可能であることが実証されていた。しかし、本発明の方法を使用することによって、完全に新規の遺伝子プールが*C. annuum*および/または*C. frutescens*の種を利用できるようになる。

10

【0019】

本発明によると、紫花のトウガラシ属種の第2の植物は、*C. pubescens*、*C. eximium*、および*C. cardenasii*からなる群から選択され、好ましくは、紫花のトウガラシ属種の第2の植物は、*C. eximium*もしくは*C. cardenasii*、好ましくは*C. eximium*である。好ましくは、第1の植物は、紫花のトウガラシ属種の第2の植物とは別の種から選択される。

【0020】

本発明の好ましい実施形態では、白花のトウガラシ属種の第1の植物は、*C. baccatum*、*C. frutescens*、*C. chinense*、*C. annuum*、およびそれらの雑種からなる群から選択される。好ましくは、白花のトウガラシ属種の第1の植物は、*C. frutescens*である。

20

【0021】

白花のトウガラシ属種の第2の植物は、好ましくは*C. baccatum*、*C. frutescens*、*C. chinense*および*C. annuum*、ならびにそれらの雑種からなる群から選択され、より好ましくは、白花のトウガラシ属種の第2の植物は、*C. chinense*、*C. annuum*および/またはそれらの雑種である。

【0022】

本発明によると、雑種は、トウガラシ属の2つの相違する種間の交雑、例えば*C. chinense*の種の植物と*C. annuum*種の植物との間の交雑から入手される植物(種間交雑)、または単一種の個体群内の交雑もしくは単一種の栽培品種内の交雑から入手される植物(種内交雑)である。

30

【0023】

本発明のまた別の好ましい実施形態によると、前記遺伝形質は、トウガラシ属のすべての栽培化された種を攻撃する特定のトウガラシ属の病害に対する耐性遺伝子である。1つまたは複数の耐性遺伝子をトウガラシ属の遠縁種から一般に使用される天然にはそのような耐性遺伝子を有していない種へ転移させることによって、新規の耐性植物が提供される。結果として、例えば環境上望ましくない化学処理の使用を減らす、または放棄することさえできる。しかし、他の耐性遺伝子、例えば形状、味質および色などの果実品質特性、収量の改善、着果、および非生物的ストレス(例、低温/塩)に対する耐性などの他の遺伝形質もまた、本発明の方法を用いると転移させることができる。

40

【0024】

特定の好ましい実施形態では、耐性遺伝子は、細菌性病害である*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*のレースI、II、IVおよびVIに対する耐性を運ぶBs4遺伝子である。

【0025】

本発明は、上述した方法によって入手できる植物にさらに関する。

【0026】

詳細には、本発明は、紫花のトウガラシ属種の植物に由来する遺伝形質を有する白花の

50

トウガラシ属種の植物に関してあり、前記植物は前記白花種には通常は存在しない遺伝形質を有する。

【0027】

好ましい実施形態では、前記植物は、*C. baccatum*、*C. frutescens*、*C. chinense*、*C. annuum*、およびそれらの雑種からなる群から選択され、好ましくは、前記植物は、*C. chinense*、*C. annuum*および/またはそれらの雑種である。

【0028】

本発明の好ましい実施形態によると、前記遺伝形質はトウガラシ属の病害に対する耐性遺伝子であり、詳細には、前記耐性遺伝子は、細菌性病害である *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* のレース I、II、IV および VI に対する耐性を運ぶ Bs4 遺伝子である。

10

【0029】

さらに本発明は、上述した植物に由来する果実、種子、およびその他の植物部分に関するが、他の植物部分は、種子、挿し木、ほふく茎、および分裂組織からなる群から選択されてよい。

【0030】

以下では、本発明を実施例および図面によって例示するが、これらは決して本発明の範囲を限定することを意図していない。

【実施例】

20

【0031】

方法

種子をバーミキュライト (*vermiculate*) 上にまき、ロックウール製ブロック内に鉢植えし、成長させ、開花するまで繁殖させた。花のつぼみから除雄し、選択した父系 (*fatherline*) を用いて受粉させた。受粉後 24 ~ 28 日の間に果実を採取し、表面を殺菌し、無菌条件下で開いた。全種子からの胚を無菌的に単離し、*Sibilet al.*, (*Ann. Amelior. Plantae*, 29: 583 - 606, 1979) によって記載されたように胚培養 (ER) 培地へ移した。1 ~ 2 週間後にしっかりと発育した植物を 0.8% の寒天および 20 g/L のスクロースが補給された MS 培地 (*Murashige T. and Skoog F.*, *Physiol. Plant* 15: 473 - 497, 1962) に移植した。その後しっかりと発育した根系を備える植物を温室へ移し、その状態に慎重に適応させた。

30

【0032】

4 ~ 6 週齢の植物の葉を切り取り、耐性植物を選択するために *Xanthomonas campestris vesicatoria* のレース VI を接種した。細菌クローンを冷凍庫内に保存し、1 週間にわたり寒天培地上で増殖させた後に 22°C で接種した。接種用の懸濁液は、細菌を脱ミネラル水中に再懸濁させることによって作成する。細菌懸濁液は、シリンジを用いて葉に塗布した。接種した葉は、22°C の気候室内で 2 日間にわたりガラスで覆った箱の中に保持する。耐性植物の葉は、過敏反応 (HR) によって誘発された接種部位での炭褐色の乾燥した斑点を示す。感受性植物の葉は、接種時点に依存して接種部位での反応を示さないか、または水浸状病変を示す。そこで過敏反応の欠如は、Bs4 遺伝子の不在の指標である。耐性コントロールは *C. pubescens* PI 235047 であり、感受性コントロールは感受性の *C. pubescens* アクセションである。

40

【0033】

交雑:

第 1 の雑種植物は、Bs4 耐性遺伝子を含む *Capsicum pubescens* PI 235047 (雄性、図 2B) (米国農務省) と *Capsicum eximium* (雌性、図 2A) とを交雑させることによって作成した。前記耐性遺伝子を含む 37 種の雑種植物 (図 3A) が得られた。

50

【0034】

第2の雑種植物は、その後C. frutescens PI238059 (雄性、図3B)と耐性遺伝子を含む第1の雑種植物(雌性)とを交雑させることによって作成した。この交雑に由来する第2の雑種植物は、いずれも耐性を示さなかった。

【0035】

続いて、第2の雑種植物(雌性、図4A)とCapsicum pubescens PI235047 (雄性)とを交雑させた。2種の耐性植物が得られた。これらの植物は繁殖能力があったので、F2種子が得られた。

【0036】

さらに、C. annuum (図4B)とC. chinense (図4C)との雑種は、C. chinense PBC306 (アジア野菜研究開発センター)の個体とC. annuum植物の個体とを交雑させることによって作製した。この交雑の産物を再びC. annuumと交雑させた。その後F2種子を入手した。

10

【0037】

続いて、第3の雑種植物(図5)は、第2の雑種植物とC. capsicumもしくはそれらのF2種子に由来する植物との交雑に由来する耐性植物とC. annuum / C. chinense 雑種のF2種子に由来する植物とを交雑させる工程によって作成した。この交雑からの耐性産物をさらに純粋C. annuum系と交雑させた。

【0038】

さらに、Xcv6に対して感受性である前記交雑由来の植物を再びC. pubescens PI235047と交雑させた。次に、その交雑に由来する耐性植物を自家受粉させ、F2種子を入手した。その交雑に由来する耐性植物をその後雑種Abdera MA12に由来する系と交雑させた。この雑種は、C. chinenseとC. annuumとの交雑である。前記最終交雑の結果として生じた耐性植物を自家受粉させ、F2種子を入手した。さらに、最後に言及したPI235047との交雑の自家受粉に由来する植物をさらにいくつかのC. annuum親系と交雑させた。

20

【0039】

結果として、C. pubescensに由来するBs4耐性遺伝子を有するC. annuum植物が得られた(図6)。これらの結果は、本発明の方法を用いると、紫花のトウガラシ属種由来の形質を白花のトウガラシ属種へ導入するのが可能であることを証明している。

30

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】本発明の方法の各工程を示している略図である。

【図2】本発明の方法の好ましい実施形態の第1工程において使用される、C. eximium植物(A)および所望の耐性遺伝子を備えるC. pubescens PI235047(B)植物の写真である。

【図3A】第1の雑種植物、すなわち本発明の方法の第1工程において入手される産物の例を示した図である。

【図3B】C. frutescens PI238059の写真である。

40

【図4】第2の雑種植物(A)の例、ならびにC. annuum(B)およびC. chinense(C)の写真である。

【図5】自家受粉((C. pubescens x C. eximium) x C. frutescens) x (C. chinense x C. annuum)の産物の写真である。

【図6】C. pubescens由来の耐性遺伝子を有するC. annuum植物を示した図である。

【 図 1 】

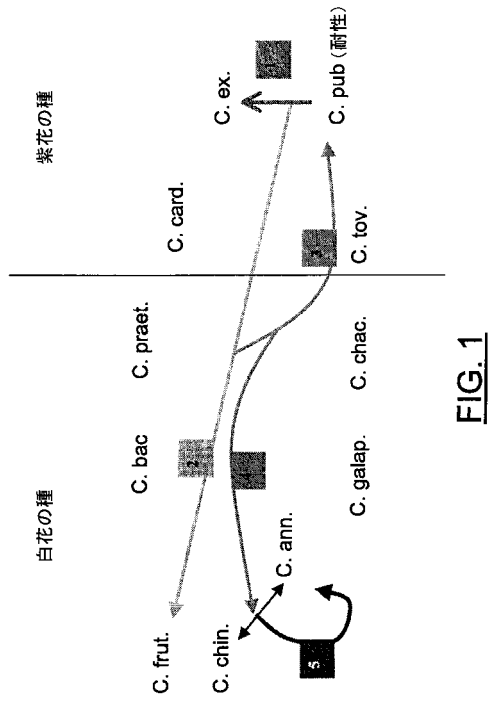


FIG. 1

【 図 2 】

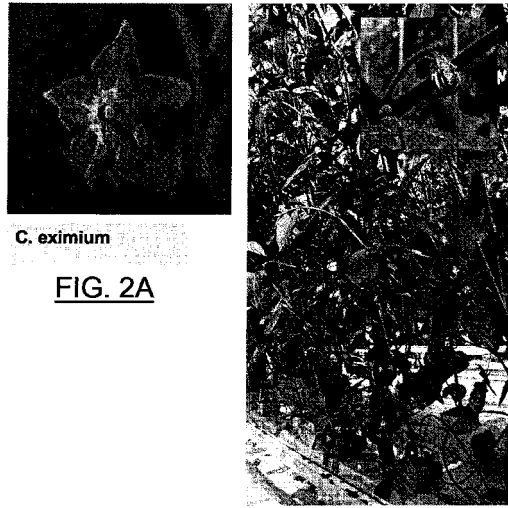


FIG. 2A

所望の耐性を備えるC. pubescens植物

FIG. 2B

【 図 3 】

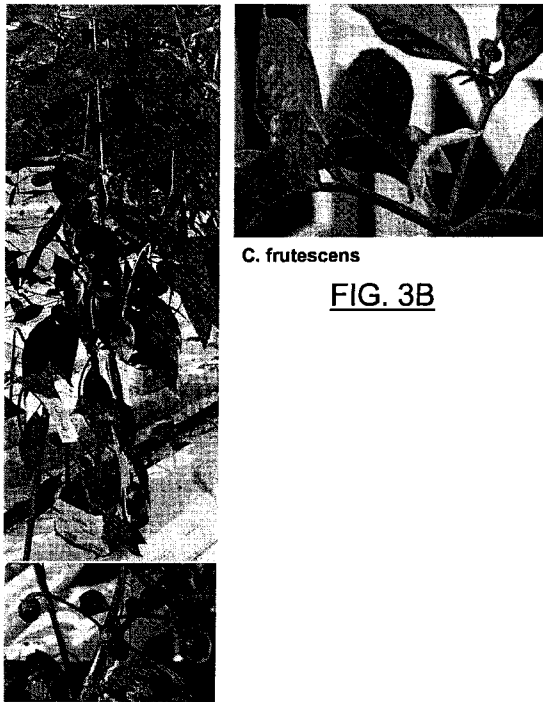


FIG. 3B

工程1の産物
FIG. 3A

【 図 4 】

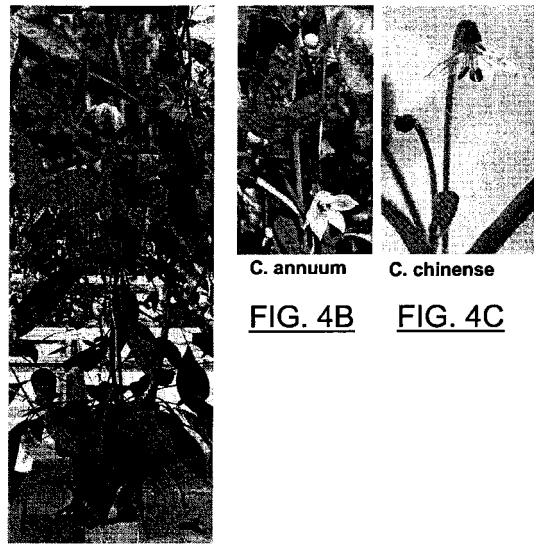


FIG. 4B

FIG. 4C

C. pub, C. exi
およびC. fruitの産物

FIG. 4A

【 図 5 】



C. chinおよびC. ann雑種と組み合わせた、
自家受粉させたC. pub、C. ex、C. frut 植物の産物

FIG. 5

【 図 6 】



FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C



FIG. 6D

フロントページの続き

- (74)代理人 100125380
弁理士 中村 綾子
- (74)代理人 100130960
弁理士 岡本 正之
- (74)代理人 100125036
弁理士 深川 英里
- (74)代理人 100142996
弁理士 森本 聡二
- (72)発明者 リンデマン, ヴァウター
オランダ国, エヌエル 1602 ヘーカー・エンクハイゼン, クルイデール 79
- (72)発明者 ハイドマン, イリス・アルケ
オランダ国, エヌエル 1602 ハーアー・エンクハイゼン, セインダースルート 20

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 新編育種学用語集, 2000年, 第2版, p. 41
NIKOVA V M, IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, 2001年 3月, V37
N3 PART 2, P40-A
YOON JAE BOK, JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, 2004年12
月, V45 N6, P324-329
京都府立大学学術報告. 農学, 1960年, Vol. 12, pp. 40-46
京都府立大学学術報告. 農学, 1961年, Vol. 13, pp. 23-"28-2"
ZIJLSTRA S, HORTSCIENCE, 1991年, V26 N5, P585-586
Plant Disease, 1998年, Vol. 82, No. 7, pp. 794-799

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01H 1/00

A01H 5/00

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

Cinii