

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4964363号
(P4964363)

(45) 発行日 平成24年6月27日(2012.6.27)

(24) 登録日 平成24年4月6日(2012.4.6)

(51) Int.Cl. F I
A O 1 H 5/00 (2006.01) A O 1 H 5/00 Z

請求項の数 9 (全 12 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2000-517590 (P2000-517590) | (73) 特許権者 | 500195035 |
| (86) (22) 出願日 | 平成10年10月23日(1998.10.23) | | セミニス・ベジタブル・シーズ・インコーポレイテッド |
| (65) 公表番号 | 特表2001-520863 (P2001-520863A) | | Seminis Vegetable Seeds, Inc. |
| (43) 公表日 | 平成13年11月6日(2001.11.6) | | アメリカ合衆国63167ミズーリ州セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード800番 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US1998/022474 | (74) 代理人 | 100081422 |
| (87) 国際公開番号 | W01999/021411 | | 弁理士 田中 光雄 |
| (87) 国際公開日 | 平成11年5月6日(1999.5.6) | (74) 代理人 | 100084146 |
| 審査請求日 | 平成17年7月22日(2005.7.22) | | 弁理士 山崎 宏 |
| 審査番号 | 不服2010-21666 (P2010-21666/J1) | (74) 代理人 | 100122301 |
| 審査請求日 | 平成22年9月27日(2010.9.27) | | 弁理士 富田 憲史 |
| (31) 優先権主張番号 | 08/957,867 | | |
| (32) 優先日 | 平成9年10月27日(1997.10.27) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無核トマト及びその生産方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

90%以上の、無核の果実を生産するハイブリッドトマト(Lycopersicon esculentum)植物を作る方法であって、

(a) トマト(Lycopersicon esculentum)植物の集団から、単為結果遺伝子pat-2がホモ接合性であるトマト(Lycopersicon esculentum)植物を選抜する工程；

(b) トマト(Lycopersicon esculentum)植物の集団から、単為結果遺伝子pat-2がホモ接合性であり、細胞質雄性不稔性(CMS)であるトマト(Lycopersicon esculentum)植物を選抜する工程；及び

(c) 工程(a)及び工程(b)で同定された植物を交雑させ、単為結果遺伝子pat-2がホモ接合性であるハイブリッド植物を作る工程

を含む、前記方法。

【請求項2】

工程(c)のハイブリッド植物を育成または使用することおよび無核のハイブリッドトマト(Lycopersicon esculentum)果実を収穫することを更に含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】

13時間以上の日長を有する場所でハイブリッド植物を育成することを更に含む請求項2に記載の方法。

10

20

【請求項4】

植物の糖分含有量を分析することを更に含む請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】

95%～99%、無核の果実である請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

100%、無核の果実である請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

請求項1から6のいずれか1項に記載の方法により生産されたハイブリッド無核トマト (*Lycopersicon esculentum*) 果実。

【請求項8】

従来トマト果実よりも糖分含有量が高い請求項7に記載のハイブリッド果実。

【請求項9】

請求項1から6のいずれか1項に記載の方法によって得られるハイブリッドトマト (*Lycopersicon esculentum*) 植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の技術分野)

本発明は、無核 (*seedless*) トマト及び該トマトの生産方法に関する。

【0002】

(発明の背景)

多くの作物は、特定の温度範囲及び特定の環境条件下で結実する。前記した温度範囲及び環境条件を逸脱すると、十分量の稔性花粉が生ぜず、受粉及び受精が困難なために通常結実しない。例えば、トマトは15～21 (夜温) 及び30～35 (日温) の狭い温度範囲で結実する。A. N. Lukyanenko, "Parthenocarpy in Tomato" Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 14, p. 167 - 177 (1991)。

【0003】

単為結果は受精なしでの果実の生産である。高いまたは低い日温または夜温、弱い光強度及び高い湿度のようなある環境条件が単為結果にとって好ましい。単為結果は人工的に誘発され得るか、または自然に起こり得る。単為結果を誘発させる場合、結実を助けるために各種の生長調節物質を使用することができる。例えば、地中海沿岸で冬から春にかけて生育させるトマト (*Lycopersicon esculentum*) において結実を助けるためにオーキシシンが通常使用されている。

【0004】

天然または遺伝単為結果は絶対的または条件的であり得る。絶対的単為結果は、遺伝的不稔により生じ、外部刺激なしに起こり、栄養繁殖方法を必要とする。絶対的単為結果は、バナナやパイナップルのような果実で見られる。A. N. Lukyanenko, "Parthenocarpy in Tomato" Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 14, p. 167 - 177 (1991) 参照。条件的単為結果は、受粉及び受精の過程が狭い環境限界に依存するトマト及び他の種で見られる (前掲)。条件的単為結果では、環境刺激に応じて有核果または無核果が生産される。例えば、ロシア国モスクワ近くの Gribovskaja Experimental Vegetable Station からの単為結果トマト系統 "Severianin" は、環境条件に依存して同等の重量を有する無核果または有核果を生産するという優れた能力を有することが判明した。Splittstoesser, Walter E., "Temperature influences Parthenocarpic Fruit Production in Tomato", Proc. Plant Growth Regal. Soc. Am. (1988)。天然の単為結果系統は、子房中に大量の生育促進物質を有し、その結果受粉の失敗または種子未成熟が果実の発育を妨げないことも公知である。

10

20

30

40

50

【0005】

世界中から単為結果を示す多くの栽培品種が研究されてきた。よって、多数の単為結果ソースが公知である。単為結果が1つ以上の劣性遺伝子により遺伝的にコントロールされることは公知である。単為結果をコントロールする多くの劣性遺伝子が公知である。これらの遺伝子は、pat、pat-1、pat-2、pat-3、pat-4及びpat-5である。短葯(shs)対立遺伝子が単為結果果実を生産することも判明している。種子発生サプレッサー(sds)対立遺伝子が無核のまたは非常に小さい核を微量含む通常の果実を生産することも判明している。

【0006】

単為結果果実の問題の1つは、品質が疑わしくなる傾向にあることである。例えば、単為結果果実のサイズは通常の果実に比して小さくなる傾向にある。また、単為結果果実の場合、酸度が低くなる傾向にあり、風味が悪くなる。更に、単為結果果実(特に、トマト)は、低温条件下で生産したときに空洞のような各種奇形を受けることが多い。

10

【0007】

栽培トマト(*Lycopersicon esculentum*)は、米国及び世界において最も重要な野菜の1つである。米国だけでも、毎年数百万トンのトマトが生産されている。作物の商品としての重要性から、栽培種の改良に対する努力が常に必要とされている。

【0008】

数種の単為結果無核トマトは公知である。例えば、トマト系統Farthest North由来のトマトの30%は無核である(Baggett, J. R.ら, Hortsci., 13(5):598(1978年10月); Baggett, J. R.ら, Hortsci., 13(5):599(1978年10月))。トマト系統Oregon 11及びGold Nugget由来のトマトの約50~70%は無核である(Baggett, J. R.ら, Hortiscience. Alexandria American Society for Horticultural Science, 17(6):984-985(1982年12月); Baggett, J. R.ら, Hortiscience. Alexandria, Va.: American Society for Horticultural Science, 20(5):957-958(1985年10月))。更に、これらの無核トマトに関わる問題は、トマトを切ってみなければトマトが無核かを調べるできないことである。従って、従来は無核トマトを得るための方法では、無核果の収率が低い。この方法は、無核果を得るための実際的または商業的に有効な方法ではない。

20

30

【0009】

実質的に無核のトマトは、現在市販されていない。前記トマトは必要とされている。特に種を含む食品を食べることができない厳しい食事制限を受けている人のために良好な品質を有する前記トマトが特に必要とされている。例えば、胃腸管の破裂部分を修復するための手術から回復中の人は通常種を含む食品を食べることができない。種が胃腸管の修復部分の縫合に捕捉されて治癒過程を遅らすようになるという問題がある。胃腸管の壁が十分に治癒しないと、また破裂することがある。

40

【0010】

更に、実質的に無核のトマトは、食品製造及び加工製品業界においても有用である。例えば、完全に無核のトマトは、トマトソースやトマトパスタのような食品をより効率的に且つ低コストで製造することができる。なぜならば、加工前に種を取り除く必要がないからである。

【0011】

従って、本発明の第1の目的は、良好な品質を示す実質的に無核の単為結果トマトを提供することである。本発明の第2の目的は、前記した無核トマトの生産方法を提供することである。

【0012】

50

(発明の要旨)

本発明は、実質的に無核のトマト (Lycopersicon esculentum) を包含する。本発明のトマトは約100%の無核である。本発明の無核トマトは、雄性母本として少なくとも1つの単為結果遺伝子を含むトマト株 (Lycopersicon esculentum) を雌性母本として少なくとも1つの単為結果遺伝子を含む雄性不稔性トマト株 (Lycopersicon esculentum) と交雑させることにより生産される。雄性及び雌性母本系統は、pat、pat-1、pat-2、pat-3、pat-4、pat-5、sha及びsdsのような単為結果遺伝子を含み得る。雄性及び雌性母本系統中の単為結果遺伝子は、本発明の無核トマトを確実に生産するためには同一でなければならない。

10

【0013】

本発明の無核トマトは、母本系統の果実サイズを維持し、従って市場で許容され得るサイズの無核トマトを得るための手段が提供される。本発明の無核トマトは、良好な風味(糖及び酸バランス)をも有し、空洞のような奇形を示さない。

【0014】

(発明の詳細な説明)

本発明は、無核トマト (Lycopersicon esculentum) 及び無核トマトの生産方法を包含する。本明細書中、用語「無核トマト」は、受精した成種を含まないトマトを指す。本発明のトマトは受精した成種を含まないが、小さい白色の未受精卵房を含んでいてもよい。こうした未受精卵房は真種と見做さない。

20

【0015】

本発明の無核トマトは実質的に無核である。本明細書中、用語「実質的に無核」は、トマトが少なくとも90%の無核であることを意味する。好ましくは、本発明の無核トマトは、好ましくは約95~約99%の無核、最も好ましくは約100%の無核である。

【0016】

本発明の無核トマトは、雄性母本として少なくとも1つの単為結果遺伝子を含むトマト株 (Lycopersicon esculentum) を雌性母本として少なくとも1つの単為結果遺伝子を含む雄性不稔性トマト株 (Lycopersicon esculentum) と交雑させることにより生産される。本発明の無核トマトを生産するために交雑させる雄株及び雌株はそれぞれ単為結果遺伝子に対してホモ接合性であり、同一の単為結果遺伝子を含んでいなければならない。

30

【0017】

本発明の無核トマトを生産するために使用される雄性及び雌性母本系統は、少なくとも1つの単為結果遺伝子を含んでいなければならない。母本系統は、pat、pat-1、pat-2、pat-3、pat-4、pat-5、sha、sds等のような単為結果遺伝子を含み得る。実質的に無核のトマトを確実に生産するために、ハイブリダイゼーションにおいて使用する雄性及び雌性母本系統が同一の単為結果遺伝子を含むことが好ましい。例えば、雄性母本系統がpat遺伝子を含むならば、雌性母本系統もpat遺伝子を含んでいなければならない。

【0018】

単為結果遺伝子を含む多くのトマト系統が、本発明の方法において雄性母本系統として使用するために公に入手可能である。本発明において使用可能な単為結果遺伝子を含むトマト系統の例を下表にリストする。

40

【0019】

【表1】

| 栽培品種／ 育種系統 | 原産国 | 遺伝 コントロール | 参考文献 |
|-------------------|-----|--------------|--|
| Severianin | ソ連 | pat-2 | Philouze ら, Genotype and environmental in breeding greenhouse tomatoes 2,54-64(1978) |
| Sub Arctic Plenty | カナダ | pat-5 | Nuez ら, J. Plant Breeding, 96(3), 200-206 (April 1986) |
| Oregon Cherry | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 13(5): 598 (1978) |
| Oregon T5-4 | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 13(5): 598 (1978) |
| Gold Nuggett | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 20(5): 957-958 (1985) |
| Santiam | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 21(5): 1245-1247 (1986) |
| Oregon-11 | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 17(6): 984-985 (1982) |
| Siletz | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 17(6): 984-985 (1982) |
| Oregon Spring | 米国 | 未知 | Baggett ら, Hort. Science, 21(5): 1245-1247 (1986) |
| Oregon Star | 米国 | pat-2 | Baggett ら, Hort. Science, 30(3): 649 (1995) |
| Oregon Pride | 米国 | pat-2 | Baggett ら, Hort. Science, 30(3): 649 (1995) |

表中の参考文献はすべて採用により本明細書に含まれるとする。

【0020】

Oregon-11、Gold Nuggett、Oregon Spring、Oregon Star、Oregon Pride及びSiletzは、P. O. Box 157, (97424) オレゴン州カッテージ・グローブに所在のTerritorial

10

20

30

40

50

Seed Co., から市販されている。Gold Nuggett及びOregon Springも、(04910-9731)メーン州アルピオン、Foss Hill Roadに所在のJohnny's Selected Seeds及び(97321)オレゴン州オールバニー、North Pacific Highway 1190に所在のNichol's Garden Nurseryから入手可能である。Santiam及びOregon Starもオレゴン州オールバニーに所在のNichol's Garden Nurseryから市販されている。

【0021】

更に、ホモ接合性トマト系統由来の単為結果遺伝子を戻し交雑により商品として所望の特性を有するトマト系統に転移することもできる。単為結果遺伝子を含むホモ接合性トマト系統をドナー母本として使用し、商品として所望の特性を有するトマト系統を反復母本として使用する。反復母本をドナー母本と最初に交雑させた後、得られた F_1 後代を自家受粉させる。次いで、 F_2 後代を発育させ、最大の所望園芸形質を併せ持つ無核果実を有する後代のみを選抜する。その後、更に単為結果遺伝子を保持しながら所望の園芸形質を固定するために選抜物を自殖するか、または満足な F_2 分離系が回収されるまで反復母本との更なる戻し交雑を使用する。このトマト系統は、本発明の交雑において雄性母本系統として使用され得る。

10

【0022】

本発明の無核トマトを生産するために使用される雌性母本系統は少なくとも1つの単為結果遺伝子を含み、雄性不稔性をも示す。母本系統は細胞質または遺伝的に雄性不稔性であり得る。本明細書中、株が花粉を生じないかまたは生存不能な花粉しか生じないならば株は「雄性不稔性」である。雄性不稔性株では自家受精が起きない。雄性不稔性株であれば、育種業者は株の花における他家受精をコントロールすることによりハイブリッド種子をより経済的に作成することができる。雌性母本の自家受精を防ぐことにより他家受精をコントロールすることができる。一旦雄性不稔性としたら、株を所望特性を有する遺伝子ドナー株とハイブリダイズすることができる。本発明において、雄性不稔性トマト雌株を、少なくとも1つの同一単為結果遺伝子対を含む雄性稔性トマト雄株とハイブリダイズする。

20

【0023】

雄性不稔性をもたらすための1つの方法は細胞質雄性不稔性を利用することである。細胞質雄性不稔性(CMS)をコントロールする遺伝因子は細胞質内、特に一連のミトコンドリアDNA内にあると考えられている。株中にある2つの共通する細胞質雄性不稔性は、Raphanus sativusのOgura雄性不稔性細胞質及びBrassica napusのポリマ雄性不稔性細胞質である。他の細胞質雄性不稔性及び該不稔性を作成する方法も当業界で公知であり、本発明で使用するために入手可能である。例えば、欧州特許出願公開第363 819号明細書には、不活性化細胞質要素を含むトマト原形質を不活性化核要素を含むSolanum原形質と融合することにより雄性不稔性トマト株に再生され得る融合産物を得ることを含む雄性不稔性トマト株の生産方法を記載している。

30

【0024】

トマトの場合、細胞質雄性不稔性は交雑により伝搬され得る。雌性(卵)母本は細胞質に寄与し、よってCMS雌性に交雑するとCMS子孫が生ずる。しかしながら、核遺伝子はヘテロ接合性である。従って、園芸的に望ましい核特性に対してホモ接合性であるCMS育種系統を作成するためには6~8代の戻し交雑が必要である。

40

【0025】

或いは、細胞質雄性不稔性トマト系統は、原形質融合により生産することができる。例えば、商品として望ましい形質を有する株由来の原形質をCMS系統由来の原形質と融合して、雄性不稔性株を生産してもよい。

【0026】

一般的に、融合のための原形質は、一般的な酵素方法により得ることができる。原形質の

50

酵素的単離は、２ステップ（または逐次）または１ステップ方法を用いて実施され得る。２ステップ方法の場合、株組織をまず、中層を分解することにより細胞を分離するマクエロザイムまたはペクチナーゼを用いて処理する。次いで、遊離した細胞を、原形質を遊離するセルラーゼを用いて処理する。通常、細胞を異なる酵素に１ステップ方法の場合に比して短期間接触させる。１ステップ方法では、組織をマクエロザイム及びセルラーゼを含めた酵素混合物に接触させる。

【 0 0 2 7 】

原形質は負に帯電しているため、自然には融合しない。従って、原形質の融合は誘発させなければならない。原形質の融合は、原形質を高 pH で高レベルのカルシウムを用いて処理することによりまたはポリエングリコールを用いることにより化学的に誘発し得る。また、原形質融合を誘発させるために、援用により本明細書に含まれるとする V i e n k e n ら, P h y s i o l . P l a n t , 5 3 : 6 4 (1 9 8 1) に記載されている電場 + パルス方法のような電気的方法を使用することもできる。

10

【 0 0 2 8 】

原形質が細胞質のみを与えるように、融合前に CMS 系統由来の原形質のような１つの原形質の核物質を除去するかまたは不活性化する。核物質の不活性化は、 γ 線、UV線またはX線を照射することによりなされ得る。場合により、細胞質中の遺伝物質を融合前に不活性化すると、原形質は核物質のみを与える。細胞質物質の不活性化は、原形質をヨード酢酸またはローダミン 6 - G のような化合物に接触させることにより化学的になし得る。一般的に、前記化合物は複製を阻止するかまたはミトコンドリア DNA を破壊する。

20

【 0 0 2 9 】

一旦原形質を融合したら、原形質生長及びカルス形成のためにバランスのとれた栄養素補充物を含む適当な培地で原形質を培養する。培地は、微量要素、多量要素、ビタミン、アミノ酸及び少量の炭水化物（例えば、グルコースのような各種糖類）を含む。前記培地は、細胞分裂及び苗条再生を調節することができる植物ホルモン（オーキシン及びサイトカイン）をも含む。次いで、細胞質雄性不稔性株を再生させる。

【 0 0 3 0 】

本発明では、任意の雄性不稔性トマト株を使用することができる。例えば、援用により本明細書に含まれるとする欧州特許出願公開第 3 6 3 8 1 9 号明細書に記載されている方法に従って生産される細胞質雄性不稔性トマト株を本発明で使用することができる。

30

【 0 0 3 1 】

雌性母本系統として使用される雄性不稔性トマト株は、雄性母本系統中に含まれている単為結果遺伝子と同一の単為結果遺伝子を少なくとも１つ含んでいなければならない。雌性母本系統は、少なくとも１つの単為結果遺伝子に対してホモ接合性のトマト系統を雄性不稔性トマト株を用いて戻り交雑することにより作成することができる。この戻り交雑方法は、CMS 雌性系統に対して単為結果近交系を直接戻り交雑することを含む雄性近交発生とは異なる。なぜならば、自家受粉が不可能なので、園芸的に許容できる単為結果系統は CMS 雌性系統の維持系統として働くからである。CMS トマト系統が単為結果遺伝子に対してホモ接合性であるまで戻り交雑を続ける。100%の株が単為結果果実を結実したなら、ホモ接合性が達成される。

40

【 0 0 3 2 】

本発明の無核トマトは、雄性母本を雌性母本とハイブリダイゼーションすることにより得られる。生じた後代は約 90% の無核、好ましくは約 95% ~ 約 99% の無核、最も好ましくは 100% の無核である。しかしながら、ミツバチのような花粉媒介者が雌性母本系統をこの雌性母本系統中の単為結果遺伝子と同一の単為結果遺伝子を１つも含まない稔性系統からの花粉で受粉させても、後代は約 90% 無核でないことに注目すべきである。

【 0 0 3 3 】

本発明は、ハイブリッドトマト (Lycopersicon esculentum) の生産方法にも関し、その方法は、雄性母本として少なくとも１つの単為結果遺伝子を含むトマト株を雌性母本として少なくとも１つの単為結果遺伝子を含む細胞質雄性不稔性トマ

50

ト株と交雑させてトマトを生産するステップを含む。ハイブリッド株は、雄性不稔性の果実 (*Lycopersicon esculentum*) を与える。最適の結実のために、ハイブリッド株を13時間以上の日長条件下で生育させなければならない。

【0034】

一般的に、株において細胞質雄性不稔性を使用する場合、 F_1 子孫において十分な稔性を確保するために稔性快復遺伝子は雄性花粉媒介業者から転移しなければならない。より具体的には、稔性快復遺伝子の機能はハイブリッドにおいて稔性を快復させることであり、これにより結実できる。雄性母本において単為結果遺伝子を使用することにより、雄性母本由来の稔性快復遺伝子を必要としない細胞質雄性不稔性トマトハイブリッドを得ることができる。単為結果遺伝子が子房を広げ、よってたとえ果実が無核でも実を付けるので、稔性快復遺伝子を必要としない。

10

【0035】

本発明の数種の無核トマトは、従来トマトと同一の速度でのトマトの発育中に大きくなり子房室を有する。これらのトマトの子房室は小さいままであるので、隔膜融合心皮の表面積は従来トマトに比して大きい。図1に、2つの異なるトマトの半分の切断面白黒写真を示す。図1Aは通常の有核の市販トマトの半分であり、図1Bは本発明方法により生産した無核トマトの半分である。これらの写真から分かるように、図1Bに示すトマト半分は図1Aのトマト半分に比してより多くの果肉を含む。従って、本発明の無核トマトはしばしば従来トマトに比してより多くの果肉を含む。

【0036】

更に、本発明の無核トマトは、良好な糖 - 酸バランスを示し、そのために良好な風味を有するトマトが提供される。また、本発明の無核トマトの糖含量は多くの従来トマトに比して多い。

20

【0037】

本発明において糖レベルが高いことは、通常ゲル中に存在する遊離糖を同化する「シンク」として作用する種子がないという事実に関連していると考えられる。本明細書中、用語「シンク」は、他の植物部分に比してより多くの光合成産物(スクロース)を優先的に受容する植物の部分の指す。種子は植物の次の世代、すなわち子孫を示すので植物上の優勢「シンク」を構成する。種子を有する株は、特にストレス下で、発育中の種子に対するスクロースの優先的転流をコードする遺伝的メーキャップを含む。本発明の単為結果トマトの場合、不受精の小さい胚珠は子房に転流した糖を吸収できず、よって消費者に喜ばれる遊離糖が残るようである。

30

【0038】

本発明の無核トマトは、空洞のような奇形を示さず、商品として許容され得るサイズを有する。

【0039】

最後に、本発明の無核トマトは、子房室ゲル面積が小さいので従来トマトに比してうまく薄く切ることができる。

【0040】

本発明の非限定的実施例を示す。

40

【0041】

実施例1

無核トマト96 FH 241の生産方法の説明

本実施例では、本発明方法による無核トマト96 FH 241の発生を記載する。

【0042】

96 FH 241を以下のようにして発生させた。一般的な交雑ハイブリダイゼーション方法を用いて、雌性母本としての“CMS VFN8”と呼ばれる細胞質雄性不稔性(CMS)トマト株を“Det. Parth 1”と呼ばれるトマト株と交雑させた。CMS VFN8は、日本国東京に所在のトキタ種苗(株)から入手した独占権をもつ細胞質雄性不稔性トマト株である。Verticillium dahliae race 1

50

、Fusarium oxysporum race 1及びネコブセンチュウMeloidogyne incognitaに対して耐性を有するPetoseed近交系統であるハイブリッド母本VFN8の種子を、雄性不稔性トマト(Lycopersicon esculentum)“VFN8”のミトコンドリアの代わりに細胞質雄性不稔性Solanum aculeのミトコンドリアを使用したプロトプラスト融合実験において核ドナー母本として使用した。VFN8の株型は活力ある有限であり、実サイズは超大型(200~250g)で、良好な風味を有する。

【0043】

Det. Parth 1は、本発明の譲受人であるSemini's Vegetable Seeds, Inc.が独占権をもつ近交系である有限単為結果トマト株である。Det. Parth 1はpat-2単為結果遺伝子を含む。Det. Parth 1は超大型(200~250g)の実を有する有限低木トマトである。この実は緑色の肩を有し、十分な酸度と高い糖含量のために優れた風味を有する。

10

【0044】

交雑により得られた種子を集め、植付けた。次いで、生じた株を雌性母本としてCMS VFN8を用いて戻し交雑した。この戻し交雑から得た種子を集め、植付けた。次いで、生じた株を雌性母本としてCMS VFN8を用いて再び戻し交雑した。更に3回の戻し交雑を、前回の戻し交雑から得た株及び雌性母本としてCMS VFN8を用いて実施した。全部で5回の戻し交雑を実施した後生じた株を“CMS VFN8/Det. Parth 1*4”と呼ぶ。この株はpat-2遺伝子に対してホモ接合性であった。このCMS VFN8/Det. Parth 1*4株を、無核トマト96 FH 241を発生させるための交雑において雌性母本として使用した。CMS VFN8/Det. Parth 1*4株の種子は、1997年10月13日に(20852)メリーランド州ロックビル、Parklawn Drive, 12301に所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(the American Type Culture Collection)(ATCC)に寄託され、ATCC寄託番号は209361である。この寄託は、寄託期間が寄託日から30年間、寄託機関への最新の請求から5年間、またはこの出願の米国特許の満了期間のいずれか長い期間というブダペスト条約の要件に従ってなされた。CMS VFN8/Det. Parth 1*4株の種子は、寄託機関で生存しなくなったなら補充される。

20

【0045】

一般的な交雑ハイブリダイゼーション方法を用いて、本発明の譲受人であるSemini's Vegetable Seedsから市販されている“Delicious”と呼ばれる自然受粉トマト種を、雌性母本としてオレゴン州コーバリスに所在のOregon State Universityから入手した“33”と呼ばれる独占権をもつトマト株と交雑させた。33は、単為結果遺伝子pat-2を含む。交雑により得られた種子を集め、植付けた。生じた株を雌性母本としてDeliciousを用いて戻し交雑した。生じた株を“F₆(‘Delicious’/33*)”と呼ぶ。この株はpat-2遺伝子に対してホモ接合性である。F₆(‘Delicious’/33*)株を、無核トマト96 FH 241を発生させるための交雑において雄性母本として使用する。F₆(‘Delicious’/33*)株の種子は、1997年10月13日に(20852)メリーランド州ロックビル、Parklawn Drive, 12301に所在のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託され、ATCC寄託番号は209360である。この寄託は、寄託期間が寄託日から30年間、寄託機関への最新の請求から5年間、またはこの出願の米国特許の満了期間のいずれか長い期間というブダペスト条約の要件に従ってなされた。F₆(‘Delicious’/33*)植物の種子は、寄託機関で生存しなくなったなら補充される。

30

40

【0046】

慣用的な交雑ハイブリダイゼーション方法を用い、雌性母本としてのCMS VFN8/Det. Parth 1*4を雄性母本としてのF₆(‘Delicious’/33*)と交雑させた。生じた種子を集め、その後植付けた。得られたトマト96 FH 24

50

1 は 100% 無核であった。

【0047】

実施例 2

Shady Lady 及び 96 FH 241 の糖含量及び糖：酸比を測定した。Shady Lady は、かなり緻密な有限つるを有し、通常大きな実サイズ (180 ~ 220 g) を有する市販種である。96 FH 241 は、本発明方法により生産した無核ハイブリッドトマトである。前記トマトの各サンプルを別々に、滑らかなコンシステンシーが得られるまで慣用のフードブレンダーを用いて均質化した。4 で Beckman GS-6 R 遠心分離機において 1000 x g で 15 分間遠心することにより、各ピュールサンプルからトマト漿液を得た。

10

【0048】

漿液の糖含量は、モデル RFM 91 屈折計 (Bellingham & Stanley) を用いて測定した。屈折計を水及び 10° ブリックスグルコース溶液を用いて校正した。糖含量は° ブリックス (% 糖 (wt/wt)) で表す。2 つのトマトの糖含量を下表に示す。

【0049】

滴定可能な酸度 (A) は、Mettler D67 自動滴定装置を用いて測定した。pH 8.2 の終点及び D. 1000 N 水酸化ナトリウム (VWR) 滴定剤を使用した。滴定可能な酸度はミリモル H⁺ / 100 g - 漿液で表す。糖：酸比 (S/A) は、式：S/A = (° ブリックス / 180.16) / (A / 1000) に従う滴定可能な H⁺ 含量に対する糖のモル比である。2 つのトマトの糖：酸比を下表に示す。

20

【0050】

【表 2】

表 1

| | ブリックス (糖) | 糖：酸比 |
|-------------------------|--------------|------|
| Shady Lady (市販種) | 4.47 | 3.71 |
| 96 FH 241 (無核ハイブリッド) | 6.42 | 3.96 |

30

【0051】

上表の結果から、本発明の方法により生産された無核トマトの糖含量が一般的な市販種のトマトに比して高いことが分かる。本発明のトマトの糖：酸比も一般的なトマトに比して高い。

40

【0052】

本発明について明瞭にし理解を助けるための例として幾分詳細に説明してきたが、添付する請求の範囲によってのみ規定される本発明の範囲で修正及び変更が可能なことは自明である。

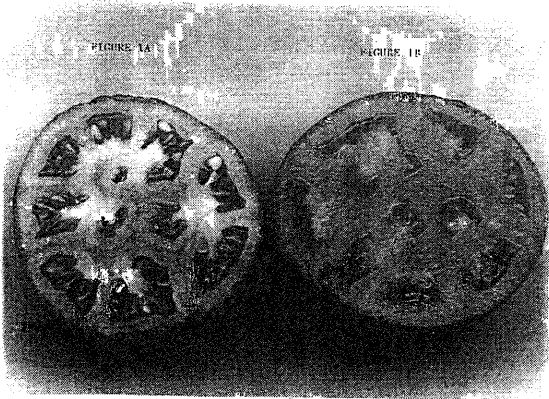
【図面の簡単な説明】

【図 1】 2 つの異なるトマトを半分に切断した切断面の白黒写真である。図 1 A は通常の有核トマトの半分のトマトであり、図 1 B は本発明の無核トマトの半分のトマトである。

。

【 図 1 】

FIGURE 1



フロントページの続き

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(72)発明者 ヒース, ダグラス・エイ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 5 7 6 5、ロツクリン、カブリジヨ・ウエイ・5 5 0 3

合議体

審判長 秋月 美紀子

審判官 杉江 渉

審判官 郡山 順

(56)参考文献 特開平 1 0 - 1 0 8 6 7 6 (J P , A)

特開平 1 0 - 1 0 8 6 7 7 (J P , A)

特開平 2 - 1 3 8 9 2 7 (J P , A)

愛知農総試研報 (1 9 9 0) 第 2 2 号 第 1 2 5 ~ 1 3 1 頁

「今月の農業」農薬・資材・技術 (1 9 9 5) 1 1 月号 第 4 2 - 4 5 頁

Plant Cell Rep. (1 9 9 0) VOL . 8 , p . 5 3 8 - 5 4 1

育種学雑誌 (1 9 9 6) 第 4 6 巻別冊 1 号 第 2 8 7 頁

育種学雑誌 (1 9 9 6) 第 4 6 巻別冊 1 号 第 2 8 8 頁

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A01H5/00-5/12

C12N15/00