

核とオルガネラ間のゲノム再編による  
アブラナ科作物の有用形質創成に関する研究

2020.3

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
生物生産科学専攻

藤田祥明

## 目 次

序章	1
第 1 章 <i>Diplotaxis tenuifolia</i> 細胞質をもつ <i>Brassica rapa</i> における 雌性配偶子形成時の <i>D. tenuifolia</i> 一添加染色体の要求性	4
第 1 節 緒言	4
第 2 節 材料および方法	5
第 3 節 実験結果	11
1. <i>D. tenuifolia</i> 細胞質をもつ <i>B. rapa</i> 系統の育成	11
2. (cyt-Dt) <i>B. rapa</i> MAL 植物の花器形態と種子稔性	20
3. (cyt-Dt) <i>B. rapa</i> MAL 植物の花粉管誘引能力	20
4. (cyt-Dt) <i>B. rapa</i> MAL 植物の胚発達	23
第 4 節 考察	25
第 2 章 <i>Diplotaxis erucoides</i> 細胞質をもつ <i>Brassica napus</i> における 雄性不稔回復機構の探索	30
第 1 節 緒言	30
第 2 節 材料および方法	33
第 3 節 実験結果	43
1. <i>D. erucoides</i> のオルガネラゲノムの導入による <i>Brassica</i> 栽培 3 種の蒴発達の影響	43
2. (cyt-De) <i>B. napus</i> 植物における雄性稔性の遺伝様式	51
3. <i>D. erucoides</i> における雄性不稔原因遺伝子 <i>orf108</i> の解析	51
4. (cyt-De) <i>Brassica</i> 栽培 4 種における <i>orf108</i> のプロセシング位置の同定および発現差解析	55
5. (cyt-De) 二基三倍体植物の蒴発達および <i>orf108</i> の発現差解析	58
第 4 節 考察	58

第 3 章 <i>Diplotaxis erucooides</i> 細胞質をもつ <i>Brassica napus</i> における バイオマス向上の分子機構の解明と実用化	65
第 1 節 緒言	65
第 2 節 材料および方法	66
第 3 節 実験結果	72
1. (cyt-De) <i>B. napus</i> 系統における種子形態および生育特性調査	72
2. (cyt-De) <i>B. napus</i> 系統における葉の内部構造変異	72
3. (cyt-De) <i>B. napus</i> 系統における 葉緑体合成阻害剤によるバイオマス向上の抑制	75
4. (cyt-De) <i>B. napus</i> 系統における発現差異遺伝子の同定	75
5. <i>D. erucooides</i> のオルガネラゲノムの導入による 葉緑体活性および光合成活性への影響	79
6. (cyt-De) <i>B. napus</i> 系統における収量特性調査	79
第 4 節 考察	83
第 4 章 総合考察	87
摘要	93
謝辞	95
引用文献	96

## 序章

国際連合による最新の予想では、2100年の世界人口は110億人となり、人口が現在の77億人から33億人が増加するとともに、2100年の国別人口は現在と相当に異なる状況となる (Pison 2019)。人口増加と食糧およびエネルギーの消費量とは比例関係にあり、食糧供給とエネルギー供給は、人口増加における主要な課題となる。また、近年の地球温暖化を含む世界的な気候変動により世界規模の食糧不足が危惧されている (Bevan *et al.* 2017)。

イネやコムギなどの自殖性植物における従来の品種改良は、半矮性遺伝子を用いた草型改良により飛躍的な収量向上をもたらした (藤巻 2000, Sasaki *et al.* 2002)。トウモロコシやアブラナ科作物などの他殖性植物における品種改良は、両親より優れた形質が表れる雑種強勢 (ヘテローシス) などの利点がみられる一代雑種 ( $F_1$ ) 品種の開発により収量が飛躍的に増加し、現在では世界中で  $F_1$  品種が利用されている (山田 2010, Fujimoto *et al.* 2018)。また、 $F_1$  品種には生育が旺盛になるだけでなく、環境ストレス耐性の補填などの利点もみられる (Schaffasz *et al.* 2019)。これら従来の品種改良は、核ゲノムを対象としており、今後予想されている食糧不足に対応するための安定的な食糧生産を行うには、核ゲノムのみでは対応しきれないことが危惧され、ゲノム再編によるさらなる生産性の向上が求められている。

緑色植物において核ゲノム以外にオルガネラゲノムには葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムが存在し、それらは細胞内共生によって取り込まれたとされる (Gray 2015)。また、アブラナ科作物を含む多くの陸上植物において、核ゲノムはメンデル遺伝する一方、オルガネラゲノムは母性遺伝することが明らかになっている (Birky 2008)。光合成細菌が細胞内共生により誕生した葉緑体は、緑色植物にとって必須のオルガネラであり、光合成ならびにアミノ酸および脂肪酸生合成を含む宿主細胞のための多様な代謝過程を行う役割をもち、緊縮応答と呼ばれる細菌の遺伝子発現・代謝調節機構を保持することから、植物の生長・栄養応答を統括的に制御している (Cashel 1969, Liere *et al.* 2011, Zimorski *et al.* 2014)。また、ミトコンドリアは、植物体の生育やストレス応答に重要な役割を担うとともに (Liberatore *et al.* 2016)、農学的有用形質である細胞質雄

性不稔性 (Cytoplasmic male sterility : CMS) などの植物体の花器形成に密接に関与する (Fujii *et al.* 2011, Kim and Zhang 2018). これらのようにオルガネラゲノムは, 作物を改良する上で有用な形質変異に関与しており, 植物遺伝学におけるオルガネラゲノムの重要性は, Kihara (1982) によって提唱されている. しかしながら, 従来の品種改良は主に核ゲノムに着目しており, オルガネラゲノムを効率的に利用できておらず, 核ゲノムとオルガネラゲノム間の協調性については, あまり研究が進んでいない (Liberatore *et al.* 2016).

核ゲノムとオルガネラゲノム間の協調性を由来とする核-細胞質ハイブリッド (NC-ハイブリッド) は, 「作物育種に役立つ可能性のある核遺伝子の発現に対する細胞質のヘテロティックな効果」と定義された (Kihara 1979). 既存の品種から核ゲノムとオルガネラゲノムを再編成し, NC-ハイブリッドがみられる個体を作成する方法の 1 つとして, 近縁種との種属間交雑を用いて外来性オルガネラゲノムを導入する方法がある (Kaneko and Bang 2014). 種属間交雑による外来性オルガネラゲノムの導入は, コムギにおいて見出されて以来 (Kihara 1951), アブラナ科作物を含むさまざまな作物において主に CMS などの農業的有用形質を得るために試みられ (Chen and Liu 2014), 特にアブラナ科作物では, 多様な種属間交雑が試みられた (Kaneko and Bang 2014). アブラナ科作物において外来性オルガネラゲノムの導入は, CMS に加えて, 除草剤耐性や香味成分, 病害虫への抵抗性などの農業的有用形質に変異を有することを明らかにした (Namai 1987). 外来性オルガネラゲノムの導入に起因する形質変異のほとんどは, 十分な解析が行われていないため実用化されていないが (Kaneko and Bang 2014), CMS は F<sub>1</sub> 品種の種子生産に取り入れられつつあり (Yamagishi and Bhat 2014), 品種改良に間接的に関与する. CMS 体系による F<sub>1</sub> 品種の種子生産は, セイヨウナタネである *B. napus* やカラシナを含む *B. juncea* などの油糧作物において, 種子親として用いられる CMS 系統 (A line) や CMS の維持系統 (B line), 得られた F<sub>1</sub> 品種の雄性稔性を回復させる稔性回復系統 (C line または R line) を用いる 3 系法が利用されている (Chen and Liu 2014, Bohra *et al.* 2016). また, ハクサイやコマツナなどを含む *B. rapa* やキャベツやブロッコリーを含む *B. oleracea* などの葉茎菜類における F<sub>1</sub> 品種は, 主に自家不和合性 (Self-incompatibility : SI) の利用により種子生産が行われているが, SI 体系

は環境変動により F<sub>1</sub> 純度が低下するため (Horisaki and Niikura 2008), SI 体系よりも環境変動の影響を受けにくい CMS 体系の実用化が広く求められている (Yamagishi and Bhat 2014). 現在, 食物嗜好性の多様化, 作物に対する病害虫の生態系の多様化に対応するために, 遺伝的多様性の拡大が求められているが, 生物多様性の保全を目的とした名古屋議定書による海外からの遺伝資源の収集が規制される中, 種内の遺伝資源の利用は困難を要する. これらのことから, オルガネラゲノムを対象とした育種学的アプローチによる新規の品種改良の確立が期待される.

そこで本研究では, NC-ハイブリッドを含む核ゲノムとオルガネラゲノム間の協調性を「核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストーク」と定義し, アブラナ科作物において近縁種のオルガネラゲノムを導入したことでみられるさまざまな表現型を観察し, 外来性オルガネラゲノムがもたらす形質変異を明らかにすることを目的とした. 第 1 章では, 異質細胞質系統において核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークが雌性稔性に及ぼす影響を調査し, 第 2 章では, 雄性稔性に及ぼす影響を調査した. 第 3 章では, 外来性オルガネラゲノムの導入によるバイオマス向上がみられた植物体の特徴づけを行った. これらの研究を通じて, 核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークによる農業的有用形質を実用化するための新たな知見を得ることを試みた.

## 第 1 章

### *Diplotaxis tenuifolia* 細胞質をもつ *Brassica rapa* における 雌性配偶子形成時の *D. tenuifolia* 一添加染色体の要求性

#### 第 1 節 緒言

多くの植物種において異質細胞質系統は、種属間交雑や体細胞雑種などのさまざまな方法によって作出されており (Liu *et al.* 2005, Yamagishi and Bhat 2014), 近縁野生種との種属間雑種および胚救済法は、異質細胞質系統を作出する最も一般的な方法の 1 つである (Sharma *et al.* 1996, Mwangangi *et al.* 2019). 外来性オルガネラゲノムの導入は、細胞質雄性不稔性 (Cytoplasmic male sterility: CMS, Chase 2007, Carlsson *et al.* 2008), 雄しべの花弁化 (Pellan-Deloure and Renard 1987, Matsuzawa *et al.* 1999), 雄しべの雌ずい化 (Murai *et al.* 2002), バイオマス (Allen 2005, Soltani *et al.* 2016), 発芽能力 (Moison *et al.* 2010) および採種形質 (Roux *et al.* 2016) などのさまざまな形質変異を誘発する. 多くの作物において CMS は、一代雑種 ( $F_1$ ) 品種の種子生産に取り入れられつつあるが (Chen and Liu 2014), 他の形質変異についてはほとんど実用化されていない.

アブラナ科は、複数回の全ゲノム重複と種分化を経て (Bowers *et al.* 2003, Jiao *et al.* 2011, Cheng *et al.* 2014), 25 連 338 属 3709 種により構成される (Warwick *et al.* 2006), そのうち *Brassica* と *Raphanus* の 2 属は、葉茎菜類、油糧用、香辛料、観賞用花および飼料用作物として世界中で広く栽培されている (Kaneko and Bang 2014). *Brassica* 栽培種に属する *Brassica rapa* L. ( $2n = 20$ , AA) には、チンゲンサイ (*ssp. chinensis*), コマツナ (*ssp. perviridis*), カブ (*ssp. rapa*), ハクサイ (*ssp. pekinensis*), サイシン (*ssp. parachinensis*) およびミズナ (*ssp. laciniifolia*) などの多くの栽培品種が確立されており、さまざまな近縁野生種との種属間交雑によって外来性オルガネラゲノムが数多く導入されている (Kaneko *et al.* 2009, Yamagishi and Bhat 2014). 異質細胞質 *B. rapa* 系統では CMS に加えて、種子稔性の低下、生育遅延およびクロロシスなどがみられ (Hinata and Konno 1979, Prakash and Chopra 1988, Matsuzawa *et al.* 1999, 須永ら 2017), *B. rapa* において外来性オルガネラゲノムの導入は、栄養生長か

ら生殖生長までのさまざまな発達段階の形質に影響を及ぼす。

アブラナ科近縁野生種である *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. ( $2n = 22$ , DtDt) は、ワイルドルッコラまたはサンドルッコラとして知られており (Pignone *et al.* 1997), 光合成特性が  $C_3$ - $C_4$  中間型を示し, 比較的高温で乾燥した栽培条件に順応するため (Apel *et al.* 1997), 地中海沿岸を中心に広く栽培されている (Richard *et al.* 2006). また, *D. tenuifolia* はグルコシノレート類やフラボノイドの 1 種であるケルセチンを豊富に含み, 人々の健康に良い効果をもたらす可能性がある (Richard *et al.* 2006, Martínez-Sánchez *et al.* 2007). このオルガネラゲノムを *Raphanus sativus* および *B. oleracea* に導入したところ, CMS は観察されなかった (Bang *et al.* 2003, 筒井 2013, 谷口ら 2015). そこで, *D. tenuifolia* と *B. rapa* との属間交雑および *B. rapa* を花粉親に用いた連続戻し交雑を行い, *D. tenuifolia* 細胞質をもつ *B. rapa* CMS 系統の作出を試みたが, 特定の染色体が添加され, 作出された全ての系統において除去できなかった. 異質細胞質系統の作出において特定の染色体が必要な類似した事例は, *Moricandia arvensis* 細胞質 (cyt-*Ma*) をもつ *B. rapa* 系統において観察された (Tsutsui *et al.* 2011).

(cyt-*Ma*) *B. rapa* ( $2n = 20$ ) 植物は, 重度のクロロシスにより発芽後に枯死した一方, (cyt-*Ma*) *M. arvensis* 一染色体添加型 *B. rapa* 系統 (Monosomic addition line: MAL,  $2n = 21$ ) の植物体は, 栄養生長や雄ずい以外の生殖生長に異常のない安定した CMS を示した. (cyt-*Ma*) *B. rapa* 植物における重度のクロロシスは, オルガネラゲノム提供種である *M. arvensis* に由来する添加染色体に座乗する遺伝子によって克服されたと示唆された (Tsutsui *et al.* 2011).

以上のように, 核ゲノムとオルガネラゲノムの間のクロストークによる形質変異は, 異質細胞質系統の作出に大きな影響を与えることから, 本章では, *D. tenuifolia* 細胞質をもつ *B. rapa* MAL 植物がオルガネラゲノム提供種由来の染色体を必要とする原因について調査した.

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 供試材料と生育条件

種子親は, 東北大学アブラナ科シードバンクによって提供された *D. tenuifolia* 系統 1 ( $2n = 22$ , DtDt) を用いた (Table 1-1). 花粉親は, 同質細胞質 *B. rapa*



Table 1-1 Plant materials in Chapter 1.

Genus	Species	Subspecies	lines or cultivar	abbreviation	Source <sup>1)</sup>
<i>Diplotaxis</i>	<i>tenuifolia</i>		1	DtDt	TU
<i>Brassica</i>	<i>rapa</i>	ssp. <i>perviridis</i>	‘Saori’	AA	TS
			‘Hitomi’		
			‘Shousai’		
			‘U-JMS’		UU
		ssp. <i>chinensis</i>	‘Youtei’		TS
			‘Ryokuyou’		
			‘Kazue’		
		ssp. <i>pekinensis</i>	‘Kiraku 70’		
			‘Daifuku’		
			‘Harutourai’		
ssp. <i>parachinensis</i>	‘U-CC’		UU		
	‘Manamina’		TS		

<sup>1)</sup> TU: Tohoku University *Brassica* Seed Bank, TS: Tohoku Seed Company, UU: Laboratory of Plant Breeding, Utsunomiya University, Japan.

( $2n = 20$ , AA) の 10 品種および 2 系統を用いた。コマツナ (*perviridis*) 3 品種: ‘さおり’, ‘ひとみ’, ‘照彩’, チンゲンサイ (*chinensis*) 3 品種: ‘陽帝’, ‘緑陽’, ‘一江’, ハクサイ (*pekinensis*) 3 品種: ‘黄楽 70’, ‘大福’, ‘春到来’ およびサイシン (*parachinensis*) 1 品種: ‘愛味菜’ の合計 10 品種は, 株式会社トーホク (栃木, 日本) によって提供され, ハクサイ (*pekinensis*) 1 系統: ‘U-CC’, コマツナ (*perviridis*) 1 系統: ‘U-JMS’ の合計 2 系統は, 宇都宮大学農学部植物育種学研究室において系統内交配により維持されている系統である。

宇都宮大学植物育種学研究室所有のビニールハウス内においてこれらの植物を 9 月上旬に 2 号ポット (径 6 cm) に播種を行い, その後, 生育に伴い 4 号ポット (径 12 cm) に移植し, 最終的に 6 号素焼鉢 (径 18 cm) に定植し生育させた。

## 2. 雑種後代および複二倍体植物の作出

*D. tenuifolia* と *B. rapa* との間の属間交雑は, 蕾受粉と胚救済法を用いた。蕾受粉は, 開花約 1 日前の蕾を除雄した直後に, その雌しべと新鮮な花粉を受粉させ, その後パラフィン袋を用いて 7 日間袋掛けを行った。胚救済法は, Bang *et al.* (1996) に従い, 子房培養後に胚培養を行った。蕾受粉後 7 日目の子房をサンプリングし, 70 %エタノール (w/v) で数秒, 有効塩素 0.5 %次亜塩素酸ナトリウム溶液 (w/v) で 20 分間振とうによる滅菌処理を施した。クリーンベンチ内において滅菌水を用いて, 滅菌された子房を 3 回洗浄した後, Murashige and Skoog (MS) 寒天培地 (Murashige and Skoog, 1962) に NZ アミン (0.5g/l) とスクロース (30 g/l) を添加した試験管斜面培地 (10ml) に置床し, 25 °C, 16 時間日長下で培養した。子房培養から約 1 ヶ月後に得られた胚をクリーンベンチ内において 1/2 濃度の MS 培地を充填した試験管平面培地 (5 ml) に移植し培養した。胚培養後, 根がよく発達した幼植物体は, バーミキュライトを充填した 2 号ポットに移植し, 明期 17 °C/暗期 12 °C の環境調節室において透明プラスチック袋を掛け慣行に従い, 生育させた。その後 1 週間ごとに袋の上部の一角を切り取り, 3 週間後に袋を取り外すことで順化させた。順化後, 植物の生育に伴って順次鉢上げを行った。複二倍体植物を作出する段階では,

植物体の頂端分裂組織を、0.1%コルヒチン溶液(w/v)を浸した綿で48時間浸し、染色体倍加処理を施した。この処理後、処理された頂端分裂組織以外の他の腋芽を1ヶ月間にわたり除去した。(cyt-Dt) BC<sub>1</sub>植物の作出では、*B. rapa* 9品種を花粉親として用いた蕾受粉およびマルハナバチによる虫媒受粉法を行った。その後の(cyt-Dt) BC<sub>2</sub> から(cyt-Dt) BC<sub>8</sub>植物の作出における連続戻し交雑では、蕾受粉を用いた。

### 3. 交雑後代における細胞遺伝学的調査

BC<sub>1</sub>植物からBC<sub>8</sub>植物における根端細胞を、フォルゲン押しつぶし法によって観察し、体細胞染色体数を決定した。植物体の白く新鮮な伸長した根端を採取し、前処理として8-ヒドロキシキノリン溶液を分注したサンプルビンにその根端を入れ、4℃で5時間浸漬させた後、Farmer固定液(エタノール:酢酸=3:1)を分注したサンプルビンにその根端を移し、4℃で一晩以上固定した。固定された根端を1N HCl液中に60℃で7分間軟化处理した直後に、塩基性フクシン液中に30分以上染色した。スライドガラス上でよく染色されている根端に対して1.0%酢酸カーミン染色液(w/v)による二重染色を行い、カバーガラスをかけ、光学顕微鏡下(BX53LED, オリンパス, 東京, 日本)で体細胞染色体数を観察した。

複二倍体植物およびBC<sub>8</sub>植物の花粉母細胞における減数分裂時の染色体行動調査は、なすりつけ法を用いて以下の手順で行った。2-3mm程度若い蕾から葯を取り出し、その葯から花粉母細胞を押し出し、スライドガラス上に薄く広げ、酢酸カーミン染色液を用いて染色した。その後、カバーガラスをかけ、顕微鏡下で観察した。染色体行動調査は、第一減数分裂中期(MI)、第二減数分裂中期(MII)および四分子について1個体あたり20細胞を観察し、染色体行動を推定した。

酢酸カーミン染色液を用いた花粉粒の染色法を雄性可稔および雄性不稔を評価する基準として使用した。開葯した花芽を採取し、スライドガラス上で花粉粒を酢酸カーミン染色液で染色した。花粉稔性は、光学顕微鏡下で1000個の花粉粒を観察し、濃染した花粉粒を雄性可稔とした。

#### 4. ゲノム DNA 抽出

植物体における葉の Total DNA を CTAB 法 (Doyle and Doyle 1987) に従って抽出した。採取した若い葉 (5 mm<sup>2</sup>, 4 枚程度) を, 2.0 % CTAB 液 (w/v) を分注したチューブに入れ, 細胞破碎装置で葉を破碎した。その後, そのチューブに CIA を分注し, 遠心分離後, 上澄み液を抽出し, その抽出液に 2-プロパノールに添加することでゲノム DNA を沈殿させた。ゲノム DNA は, 1×TE buffer 内に溶解させ, RNase で RNA を処理した。抽出されたゲノム DNA を分光光度計で濃度を測定し, 20 ng/μL に希釈することで均一化した。

#### 5. RAPD 解析

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析には, Dream Taq DNA Polymerase Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., 東京, 日本) および 400 種類の 12-mer ランダムプライマーセット (Common A - D, BEX, 東京, 日本) を用いて PCR を行った。PCR 条件は, Akaba *et al.* (2009) に従って下記の条件に設定し, TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice<sup>TM</sup> (TAKARA BIO INC., 滋賀, 日本) により PCR を実行した。*B. rapa* ゲノムのポジティブコントロールマーカールとして, *B. rapa* A1 に特異的なプライマーペア (Forward primer; 5' GTGTTTCTCTTCAACGCCTTTT 3' , Reverse primer; 5' CACAAAGAATCCCCACAGATTT 3', Cai *et al.* 2012) を用いた。RAPD 解析により得られた PCR 産物は, ローディングダイと混合し, 1×TBE 緩衝液中で 2.0 % アガロースゲル (w/v) にアプライした。その後, 電気泳動は, Mupid-exU (Mupid CO., LTD., 東京, 日本) を用い, 100 V で 30 分間程度行った。アガロースゲルを 0.1 % エチジウムブロマイド溶液 (w/v) で染色し, ゲル撮影装置で撮影した。

・ PCR mix の組成

10X Dream Taq Buffer	1.0 $\mu$ L
dNTP 2mM each	1.0 $\mu$ L
Primer	1.0 $\mu$ L
Template DNA	1.0 $\mu$ L
DreamTaq DNA	0.1 $\mu$ L
Polymerase	
dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu$ L
Total	10.1 $\mu$ L

・ PCR 条件

94 °C	5 min.	1 cycle
94 °C	30 sec.	} 45 cycles
35 °C	30 sec.	
72 °C	1 min.	
72 °C	1 min.	1 cycle

6. シーケンス解析

RAPD 解析により得られた PCR 産物を pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, USA) を用いてクローン化し, ユニバーサルプライマーペア (T7 promoter primer; 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', SP6 promoter primer; 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3', Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて, ダイレクトシーケンス解析を行った (Eurofins Genomics K.K., 東京, 日本). 得られた塩基配列を DNASTar (SeqMan) ソフトウェアで解析し, それらを Multiple Sequence Alignment Parameters (CLC Sequence Viewer 8.0) ソフトウェアを用いて, アライメント処理を行った.

7. 解剖学的解析

花粉管誘引調査のために, 受粉後 48 時間の雌しべを採取し, Farmer 固定液を分注したサンプルビンに入れ, 4 °C で一晩以上固定した. その後, 固定され

た雌しべを Milli-Q 水で洗浄し，1N NaOH を分注したサンプルビンに入れ，60 °C で約 30 分間軟化処理をし，0.1 % アニリンブルー染色液 (w/v) を分注したサンプルビンにその雌しべを移し，1 時間以上直接雌しべを染色した．よく染色された雌しべをスライドガラス上に静置し，その上にカバーガラスを軽く置き，蛍光顕微鏡下 (BX51N-33-FL2, オリンパス, 東京, 日本) で花粉管の動向を観察した．画像した多くの胚珠を得るために，観察により得られた複数の画像を結合した．花粉管を誘引した胚珠の割合は，交雑組合わせごとに少なくとも 15 個の長角果における花粉管を誘引した総数 ( $n$ ) として算出した．

胚発達を比較するために，受粉後 10, 20 および 30 日目 (Days after pollination : DAP) の莢を採取し，Farmer 固定液を分注したサンプルビンにその莢を入れ，10 分間真空浸透させた後に 4 °C で一晚以上固定した．10 DAP および 20 DAP の固定された莢を，20 分毎にエタノールシリーズ (90 %, 70 %, 50 %, 30 %) (w/v) を分注したサンプルビンに入れることで段階的に置換し，透明化液 (抱水クロラール : グリセリン : Milli-Q 水 = 8 : 2 : 1) を分注したサンプルビンに置換された莢を移行し透明化処理を行った．透明化された莢をスライドガラス上に静置し，その上にカバーガラスを軽く置き，微分干渉顕微鏡 (DIC, BX53LED, オリンパス, 東京, 日本) 下で胚の形状を観察した．また，30 DAP の固定された莢を，スライドガラス上に静置し，実体顕微鏡 (Leica S6 E, Leica, Wetzlar, Germany) 下で解剖し，胚の形状を観察した．胚発達段階は，Wilmar and Hellendoorn (1967) に倣って，球状胚，ハート型胚，魚雷胚，杖型胚および成熟胚の 5 つに分類した．

1 莢あたりの結実率は，得られた成熟種子数を平均胚珠数で割ることで算出した．

### 第 3 節 実験結果

#### 1. *D. tenuifolia* 細胞質をもつ *B. rapa* 系統の育成

*D. tenuifolia* と *B. rapa* との雑種 F<sub>1</sub> 植物を作出するために，蕾受粉による属間交雑後に，胚救済法を行った (Fig. 1-1, Table 1-2)．*D. tenuifolia* と *B. rapa* 3 品種および 1 系統 (コマツナ 1 品種 : ‘さおり’, チンゲンサイ 1 品種 : ‘陽帝’, ハクサイ 1 系統 : ‘U-CC’ およびサイシン 1 品種 : ‘愛味菜’ (Mana.)) に

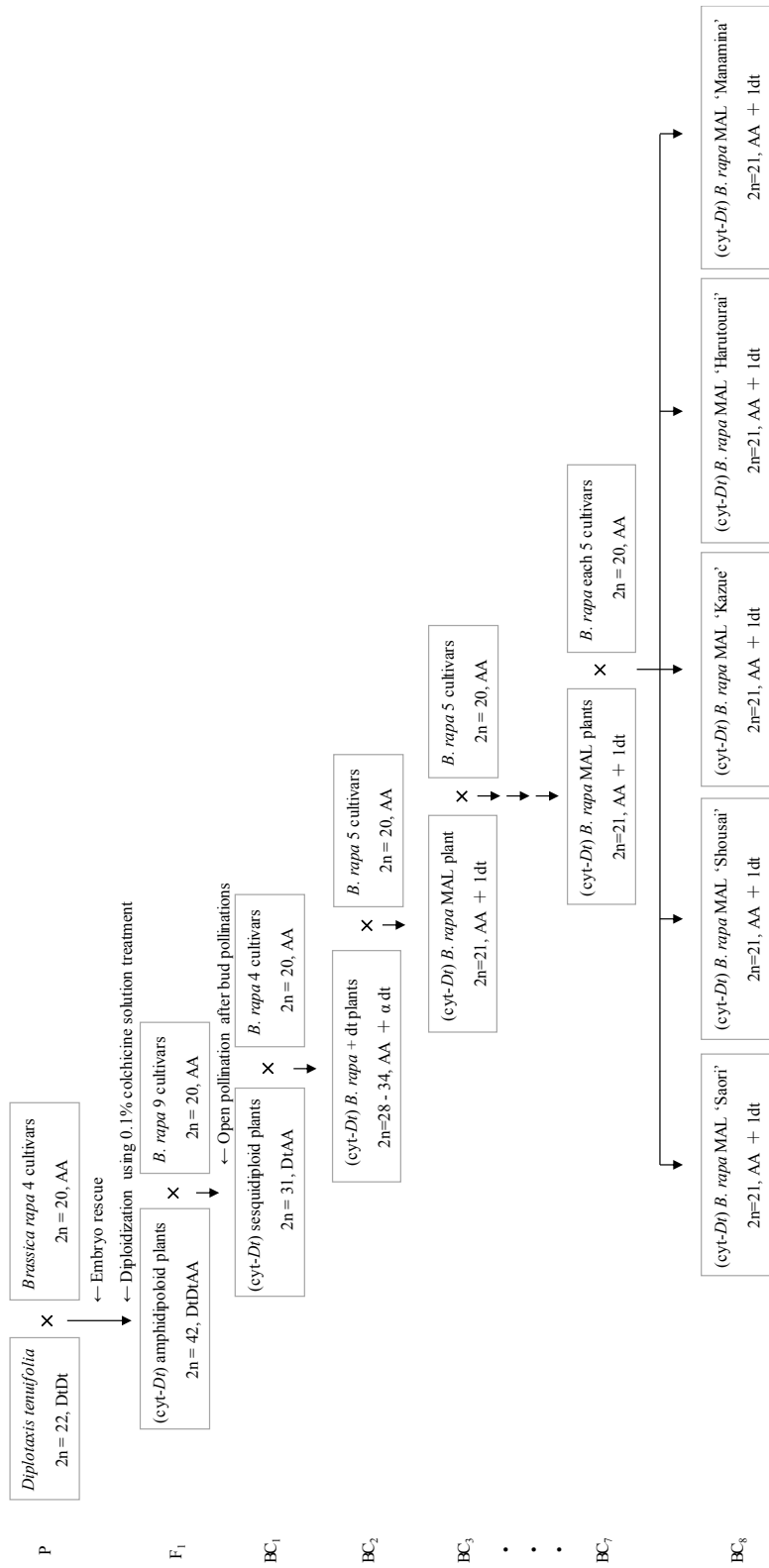


Figure 1-1. Scheme for development to the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL plants. The (cyt-Dt) *B. rapa* MAL plants were produced by intergenetic hybridization between *D. tenuifolia* and *B. rapa*, followed by successive backcrosses to *B. rapa*. (cyt-Dt) means *D. tenuifolia* cytoplasm.

Table 1-2. Production of intergeneric hybrids between *D. tenuifolia* and *B. rapa* using ovary culture followed by embryo culture, and development of BC<sub>1</sub> to BC<sub>3</sub> plants by successive backcrossing with *B. rapa*.

Generations	Cross combinations		Pollen parents	No. of flowers pollinated	No. of ovary culture	No. of embryo culture	No. of pods obtained	No. of seeds obtained	No. of hybrid plants (2n)
	Seed parents (2n)								
F <sub>1</sub>	<i>D. tenuifolia</i>	<i>B. rapa perviridis</i>	'Saori'	58	56	2			1 (42)
		<i>chinensis</i>	'Yohteï'	115	71	3			3 (42)
		<i>pekinensis</i>	'U-CC'	148	119	0			-
		<i>parachinensis</i>	'Manamina'	20	14	0			-
BC <sub>1</sub>	(cyt-Dt) amphidiploid plants (42)	<i>B. rapa</i> 9 cultivars	open pollination <sup>1)</sup>	953			213	66	25 (31)
BC <sub>2</sub>	(cyt-Dt) sesquidiploid plants (31)	<i>B. rapa perviridis</i>	'Saori'	138			76	154	9 (28 - 31)
			'Shousai'	154			4	9	-
			'U-JMS'	134			25	53	9 (32,33)
BC <sub>3</sub>	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> + dt 'Saori'-4 (29)	<i>chinensis</i>	'Yohteï'	395			44	56	18 (31 - 34)
		<i>perviridis</i>	'Saori'	164			8	20	7 (21,22)
			'Shousai'	254			15	67	6 (22 - 23)
		<i>chinensis</i>	'Yohteï'	26			5	0	-
	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> + dt 'Saori'-4 (29)		'Kazue'	48			8	5	1 (21)
	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> + dt 'Saori'-13 (31)		'Harutourai'	221			12	33	7 (21,22)
	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> + dt 'Saori'-15 (32)								

<sup>1)</sup> In the production of BC<sub>1</sub> plants, the open pollination was conducted by bumblebees in a greenhouse placed *B. rapa* 9 cultivars after bud pollinations.



おける 4 つの交雑組合せにおいて、341 花を受粉させた後、260 個の子房を培養した結果、5 個の雑種胚が得られた。得られた雑種胚を用いて、胚培養後に順化および染色体倍加処理を行うことで、4 個体の *D. tenuifolia* 細胞質 (*cyt-Dt*) をもつ複二倍体雑種 F<sub>1</sub> 植物 (2n = 42) が得られた。次に、(*cyt-Dt*) 二基三倍体 BC<sub>1</sub> 植物を作出するために、得られた (*cyt-Dt*) 複二倍体雑種 F<sub>1</sub> 植物を種子親に用い、*B. rapa* 9 品種 (コマツナ 3 品種: ‘さおり’, ‘ひとみ’, ‘照彩’, チンゲンサイ 3 品種: ‘陽帝’, ‘緑陽’, ‘一江’ およびハクサイ 3 品種: ‘黄楽 70’, ‘大福’, ‘春到来’ (Haru.)) を花粉親に用いて、蕾受粉による戻し交雑および放任受粉を行った。その結果、66 粒の種子が得られ、それらから 25 個体の (*cyt-Dt*) 二基三倍体 BC<sub>1</sub> 植物 (2n = 31) が得られた。その後、(*cyt-Dt*) *B. rapa* 系統を作出するために、得られた (*cyt-Dt*) 二基三倍体 BC<sub>1</sub> 植物と *B. rapa* 3 品種および 1 系統 (コマツナ 2 品種, 1 系統: ‘さおり’, ‘照彩’, ‘U-JMS’ および チンゲンサイ 1 品種: ‘陽帝’) との連続戻し交雑を行い、36 個体の (*cyt-Dt*) BC<sub>2</sub> 植物を作出したが、それらの (*cyt-Dt*) BC<sub>2</sub> 植物は、それぞれ 28 - 34 本の染色体をもつ個体であった。そこで、得られた (*cyt-Dt*) BC<sub>2</sub> 植物を種子親に用い、*B. rapa* 5 品種 (コマツナ 2 品種: ‘さおり’, ‘照彩’, チンゲンサイ 2 品種: ‘陽帝’, ‘一江’, ハクサイ 1 品種: ‘Haru’) を花粉親に用いて、再び戻し交雑を行ったところ、21 本の染色体をもつ 4 個体の (*cyt-Dt*) BC<sub>3</sub> 植物を含む 21 個体が得られた。(*cyt-Dt*) *B. rapa* 系統 (2n = 20) を作出するために、21 本の染色体をもつ (*cyt-Dt*) BC<sub>3</sub> 植物 1 個体を種子親に用い、*B. rapa* 5 品種 (コマツナ 2 品種: ‘さおり’, ‘照彩’, チンゲンサイ 2 品種: ‘陽帝’, ‘一江’ および ハクサイ 1 品種 ‘Haru.’) を花粉親に用いた連続戻し交雑によって BC<sub>4</sub> から BC<sub>7</sub> 世代の個体を作出した。その後、(*cyt-Dt*) BC<sub>7</sub> 植物を種子親に、*B. rapa* 5 品種 (コマツナ 2 品種: ‘さおり’, ‘照彩’, チンゲンサイ 1 品種: ‘一江’, ハクサイ 1 品種: ‘Haru.’ およびサイシン 1 品種: ‘Mana.’) を花粉親に、それぞれ戻し交雑を行い、独立した (*cyt-Dt*) BC<sub>8</sub> 植物の 5 系統を作出した。BC<sub>5</sub> から BC<sub>8</sub> 世代までの 145 個体の体細胞染色体数を調査した限り、調査された全ての植物体には 21 本の染色体数が観察され、添加染色体を含んでいることが示唆された (Table 1-3, Fig. 1-2A)。核置換された *B. rapa* 植物は、一染色体添加型 *B. rapa* 系統と *B. rapa* 系統との交雑後代において、理論的には約 50% の確率で

Table 1-3. Distribution of chromosome numbers of the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL plants in BC<sub>5</sub> to BC<sub>7</sub> generations after successive backcrossings by multiple pollen parents of the *B. rapa* five cultivars, and in BC<sub>8</sub> generation after backcrossing by the individual *B. rapa* five cultivars.

Generations	Cross combinations		Number of plants observed	Chromosome numbers (2n)	
	Seed parents (2n)	Pollen parents		20	21
BC <sub>5</sub>	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> BC <sub>4</sub> plants (21)	<i>B. rapa</i> five cultivars	22	0	22
BC <sub>6</sub>	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> BC <sub>5</sub> plants (21)	<i>B. rapa</i> five cultivars	15	0	15
BC <sub>7</sub>	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> BC <sub>6</sub> plants (21)	<i>B. rapa</i> five cultivars	16	0	16
BC <sub>8</sub>	(cyt-Dt) <i>B. rapa</i> BC <sub>7</sub> plants (21)	<i>B. rapa</i> 'Saori'	5	0	5
		<i>B. rapa</i> 'Shousai'	10	0	10
		<i>B. rapa</i> 'Kazue'	8	0	8
		<i>B. rapa</i> 'Harutourai'	60	0	60
		<i>B. rapa</i> 'Manamina'	9	0	9

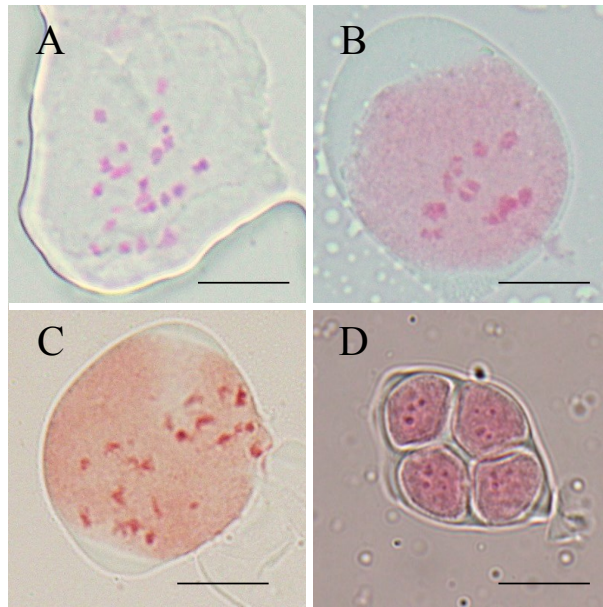


Figure 1-2. Cytogenetical characteristics of the (cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL plant. (A) Somatic chromosome numbers of the root tip of the (cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.' ( $2n = 21$ ). (B - D) Chromosome behavior during meiosis of the (cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.' in metaphase I ( $10_{II} + 1_I$ ) (B), metaphase II ( $10 + 11$ ) (C) and pollen tetrad stage (D). Scale bars: 10  $\mu$ m.

作出されるが、(cyt-Dt) *B. rapa* 植物は作出されなかった。体細胞染色体数の調査結果は、添加染色体が少なくとも 4 世代にわたり伝達し、*B. rapa* 5 品種が花粉親として使用されても維持されることから、(cyt-Dt) *B. rapa* 植物における添加染色体の伝達は、花粉親による影響ではなく、種子親による影響であることが示唆された。

添加染色体をもつ (cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物の減数分裂時における 21 本の染色体行動を明らかにするために、花粉母細胞を観察した結果、第一減数分裂中期 (MI) において 10 個の二価 (10<sub>II</sub>) と 1 個の一価 (1<sub>I</sub>) の染色体が観察され、第二減数分裂中期 (MII) は 10 本と 11 本と異なる染色体数に分離した (Fig. 1-2B, C)。これらの結果から、10 個の二価染色体が *B. rapa* に由来し、1 個の一価染色体は *D. tenuifolia* に由来することが示唆された。さらに、(cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物の四分子期において正常な四分子を形成したことから (Fig. 1-2D)、分裂した雄性配偶子の半数には添加染色体が含まれ、残り半数の雄性配偶子には含まれないことが示唆され、雌性配偶子についても類似した事象が起こっている可能性が推察された。

(cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物の添加染色体の由来を明らかにするために、400 種類のランダムプライマーセットを用いて、RAPD 解析を行った (Fig. 1-3)。 *D. tenuifolia* ゲノムに特異的な PCR 産物を増幅できる RAPD プライマーセットをいくつか選抜し、*D. tenuifolia* と (cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物の間で同じサイズの PCR 産物を増幅することを見出した (Fig. 1-3)。これらの PCR 産物が *D. tenuifolia* ゲノムに由来するかを明らかにするために、PCR 産物をクローニングし、ダイレクトシーケンス解析により配列決定を行い、データベースで最も相同な *B. rapa* 配列を検索し、それらを比較した (Fig. 1-4)。その結果、*D. tenuifolia* と (cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物において *B. rapa* ゲノムの相同配列と比較して、15 箇所の置換と 2 箇所のインデルを含む 17 箇所の変異を同定した。これら全ての変異は、*D. tenuifolia* と (cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物間で共通であり、*B. rapa* とは異なった。(cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物は、*B. rapa* 系統と 8 回の戻し交雑を経ていることから、この DNA 断片が *B. rapa* に由来する染色体と組換えを受けたとは考えにくく、(cyt-Dt) BC<sub>8</sub> 植物は、*D. tenuifolia* に由来する完全または部分的な添加染色体を有している可能性が示唆された。そこで、*D. tenuifolia* 細胞質をもつ *D. tenuifolia* 一

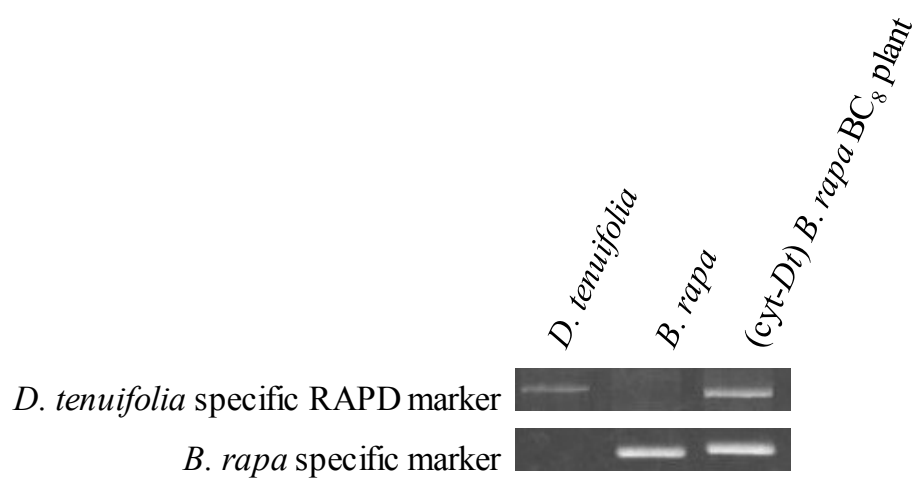


Figure 1-3. PCR analysis using RAPD primer specific for *D. tenuifolia*. *B. rapa* specific marker is a positive control marker of *B. rapa* genome.

<i>B. rapa</i> 'Haru.'	GTAATGGGAT	TGAAGGTGTA	TGTGAGAAAAG	AAACTCTCAT	TTACAGTTTG	50
<i>D. tenuifolia</i>	GTAATGTGAT	TGAAGGTCTA	TGTGAGAAAAG	AAACTCTCAT	TTACAGTTTG	50
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	GTAATGTGAT	TGAAGGTCTA	TGTGAGAAAAG	AAACTCTCAT	TTACAGTTTG	50
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	CTATTATTTT	ATTTAAATAT	TGTATTGAAT	TAGATATAAA	TAAATAAATTT	100
<i>D. tenuifolia</i>	TTATTATTTT	ATTTAAATAT	TGTATTGAAT	TAGATATAAA	TAAATAAATTT	100
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	TTATTATTTT	ATTTAAATAT	TGTATTGAAT	TAGATATAAA	TAAATAAATTT	100
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	TCCCTTTTTT	T - - ACCGGCA	TGGACATGTA	GATATCAAAT	AAAATAGAAA	148
<i>D. tenuifolia</i>	CCCCTTTTTT	TTTACCGGCA	GGGACATGTA	GATATAAAAT	AAAATAGAAA	150
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	CCCCTTTTTT	TTTACCGGCA	GGGACATGTA	GATATAAAAT	AAAATAGAAA	150
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	AAAAGATTTT	TTTATCTGAG	TAATGAGTCA	TCTGACAATT	CATGATTTAG	198
<i>D. tenuifolia</i>	AAAAGATTTT	TTTATCTGAG	TAATGAGTCA	TCTGACAATT	CATGATTTAG	200
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	AAAAGATTTT	TTTATCTGAG	TAATGAGTCA	TCTGACAATT	CATGATTTAG	200
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	ATTCAACTAC	TTATTAAGAA	ACTAATAGCA	AGGAAGAAAAC	AATTTGAGTT	248
<i>D. tenuifolia</i>	ATTCAACTAT	TTATTAATAA	ACTAATAGCA	AGGAAGAAAAC	AATTTGAGTT	250
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	ATTCAACTAT	TTATTAATAA	ACTAATAGCA	AGGAAGAAAAC	AATTTGAGTT	250
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	GATGCGTTTA	CCTAAGTAAG	GACCAATAAA	ATCAAATATT	TTGATCTTCG	298
<i>D. tenuifolia</i>	GATGCGTTTA	CCTAAGTAAG	GACCAATAAA	ATCAAATATT	TTGATCTTCG	300
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	GATGCGTTTA	CCTAAGTAAG	GACCAATAAA	ATCAAATATT	TTGATCTTCG	300
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	AAACCAATTA	AATGAAATTC	TAAAGGTTAA	ATTTTATGGG	CCAGTGCGCG	348
<i>D. tenuifolia</i>	AAACCAATTA	AATGAAATTC	TAAAGGTTCA	ATTTTATGGG	GTAGTGCGCG	350
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	AAACCAATTA	AATGAAATTC	TAAAGGTTCA	ATTTTATGGG	GTAGTGCGCG	350
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	AGAAATCAAAA	TCATAAAATAA	ATGATAGGAT	TTTGAGCGTC	CTGAA - - - -	393
<i>D. tenuifolia</i>	AAAAATCAAAA	TCATAAAATAA	ATGATAGGAT	TTTGAGCGCC	CTGAAAATGC	400
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	AAAAATCAAAA	TCATAAAATAA	ATGATAGGAT	TTTGAGCGCC	CTGAAAATGC	400
<i>B. rapa</i> 'Haru.'	CATAAATATAT					403
<i>D. tenuifolia</i>	CATAAATATAT					410
(cyt-Dt) BC <sub>8</sub> plants	CATAAATATAT					410

Figure 1-4. Alignment of the *D. tenuifolia* specific band sequences. DNA sequence identity is indicated by red boxes. 17 changes among the *B. rapa*, *D. tenuifolia* and (cyt-Dt) BC<sub>8</sub> plants sequences, consisting of 15 substitutions and two indels are indicated by blue boxes.

添加型 *B. rapa* 植物を (cyt-Dt) *B. rapa* MAL と名付け、後代作出において添加染色体が必要な発達段階の探索を試みた。

## 2. (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物における花器形態と種子稔性

(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物における花器形態を特徴付けるために、花器の形態と種子稔性を調査した。(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の花器は、*B. rapa* 植物の花器よりもわずかに小型であった (Fig. 1-5A - D)。(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の花は、短い花糸を含む縮小した雄しべがみられた (Fig. 1-5D)。*B. rapa* 植物の葯には、豊富な花粉粒が含まれており、酢酸カーミン染色液によって濃く染色された (Fig. 1-5E)。対照的に、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の葯には、開花期にわたり葯から花粉粒が散らばらず、染色されない花粉粒が含まれていた (Fig. 1-5F)。したがって、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の雄性配偶体は成熟しておらず、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物は、完全に雄性不稔性を示す CMS 系統であった。蜜線や雌しべを含む他の花器器官は、*B. rapa* 植物と比較して有意な違いはみられなかった。(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ の種子稔性は約 50 % であり (Fig. 1-5G)、半数の胚珠が発達したことが示唆された。(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の種子稔性の低下が自家不和合性に起因するかどうかを明らかにするために、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ に他の亜種系統である *B. rapa* ‘Mana.’ を交雑し、種子稔性を評価した (Fig. 1-5H)。その結果、種子親と同じ系統を花粉親として用いた交雑組合せと同様に種子稔性は、約 50 % を示したことから、自家不和合性の影響は極めて少ないと評価した。

## 3. (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の花粉管誘引能力

(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において、種子稔性が低下した原因を明らかにするために、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の花粉管誘引能力を調査した (Fig. 1-6)。その結果、*B. rapa* ‘Haru.’ においてほとんどの胚珠は花粉管を誘引した (Fig. 1-6A)。一方、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ においては約半数の胚珠は花粉管を誘引し、他の半数は誘引しなかった (Fig. 1-6B)。*B. rapa* ‘Haru.’ では、花粉管を誘引した胚珠率は 83.8 % を示したが、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ では、49.3 % を示した (Fig. 1-6C)。(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の花粉管誘引能力

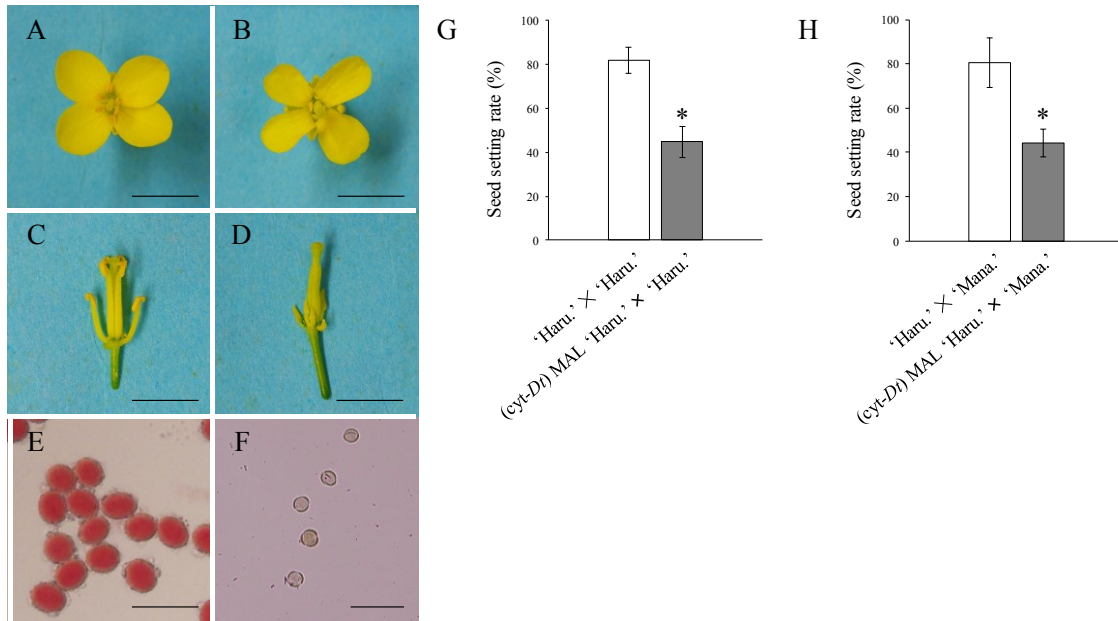


Figure 1-5. Flower organ morphology and fertility of the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL plant. (A-D) Floral morphology of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (left) and the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.' (right). (E) Fertile pollen grains of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'. (F) Sterile pollen grains of the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.'. Scale bars: 5.0 mm in (A-D), 50  $\mu$ m in (E, F). (G) Seed setting rates in sib pollination of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (white) and the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.'  $\times$  the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (grey). (H) Seed setting rates in the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'  $\times$  the euplasmic *B. rapa* 'Mana.' (white) and the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL 'Haru.'  $\times$  the euplasmic *B. rapa* 'Mana.' (grey). The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 10$ . Significant differences ( $p < 0.001$ ) between the euplasmic *B. rapa* line and the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL are indicated by \*.



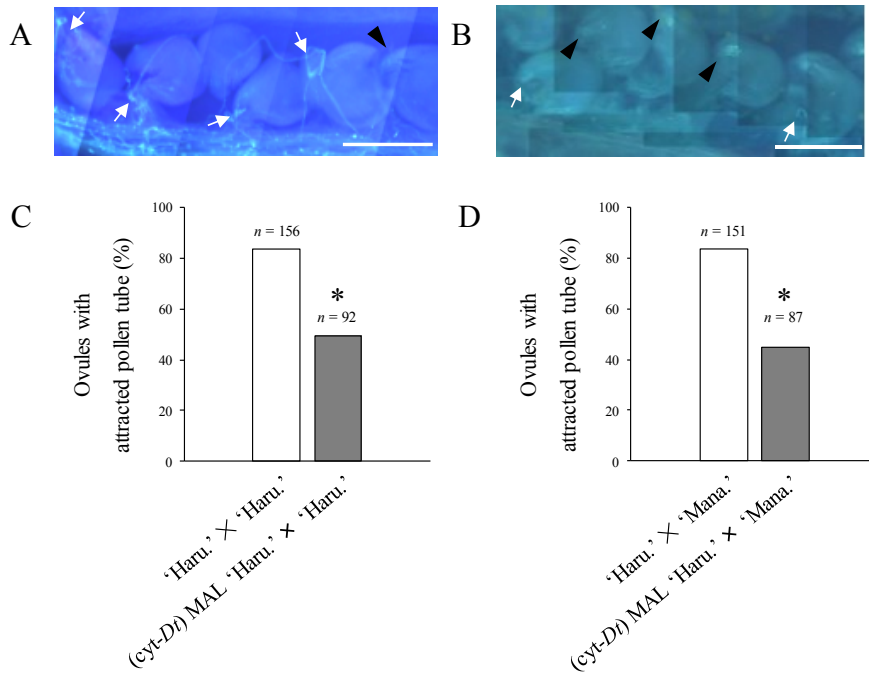


Figure 1-6. The pollen tube attraction ability of the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL plant. (A) Pollen tubes in sib pollination of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'. (B) Pollen tubes in the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 'Haru.' × the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'. Arrows indicate the ovules with attracted pollen tube. Arrowheads indicate the ovules without attracted pollen tube. Scale bars: 50  $\mu$ m. (C) Rates of ovules with attracted pollen tube in sib pollination of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (white) and the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 'Haru.' × the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (grey). (D) Rates of ovules with attracted pollen tube in the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' × the euplasmic *B. rapa* 'Mana.' (white) and the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 'Haru.' × the euplasmic *B. rapa* 'Mana.' (grey). Significant differences ( $p < 0.001$ ) between the euplasmic *B. rapa* and the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL are indicated by \*.

における自家不和合性の影響を調べるために、他の亜種系統である *B. rapa* ‘Mana.’ を花粉親として用いた交雑組合せの花粉管誘引能力を評価した (Fig. 1-6D). その結果、花粉管を誘引した胚珠率は 44.6 %を示し、種子親と同じ系統を花粉親として用いた交雑組合せと類似したことから自家不和合性の影響は非常に少ないと評価した。これらのことから、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の種子稔性の低下は、胚珠の半数に花粉管を誘引する能力がないという事象に関連している可能性が高く、雌性半不稔性を示した。

#### 4. (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の胚発達

(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において受精後に胚発達不全を引き起こすかを明らかにするために、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ において肥大胚珠率と胚発達能を調査した (Fig. 1-7). *B. rapa* ‘Haru.’ の肥大胚珠率は、交配後 10 日目、20 日目および 30 日目 (Days after pollination : DAP) で約 79.5 %を推移した (Fig. 1-7A). 一方、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ の肥大胚珠率は、約 45.2 %を示し、*B. rapa* ‘Haru.’ の約 50 %の値を推移した。また、試験した全ての時点で、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物と *B. rapa* 植物間で肥大胚珠の大きさに有意な差異がみられなかったことから、受精した胚珠のほとんどが両方の系統で少なくとも 30 日間発達し続けたことが示唆された。10 DAP, 20 DAP および 30 DAP において胚の発達段階を 5 つのクラスに分類した (Fig. 1-7B - I). (cyt-Dt) *B. rapa* MAL ‘Haru.’ における胚発達は、20 DAP において *B. rapa* ‘Haru.’ と比較してわずかに発達遅延を示したが、30 DAP の胚発達は、*B. rapa* ‘Haru.’ の成熟胚の比率と類似した。これらの結果から、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において受精した約全ての胚珠は正常に発達したことが示唆され、受精した胚珠は、成熟種子になる可能性を示した。つまり、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の種子稔性の低下は、胚珠の約半数が花粉管を誘引できない事象に起因すると示唆された。したがって、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において受精後障害ではなく受精前障害が、後代の作出に関与することが明らかとなり、雌性配偶体の異常による花粉管誘引能力の欠如が示唆された。

(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の雌性配偶子は、理論的には  $n = 10$  と  $n = 11$  の割合で 2 種類の染色体数に分離するが、雌性半不稔性を示し、全ての後代は常

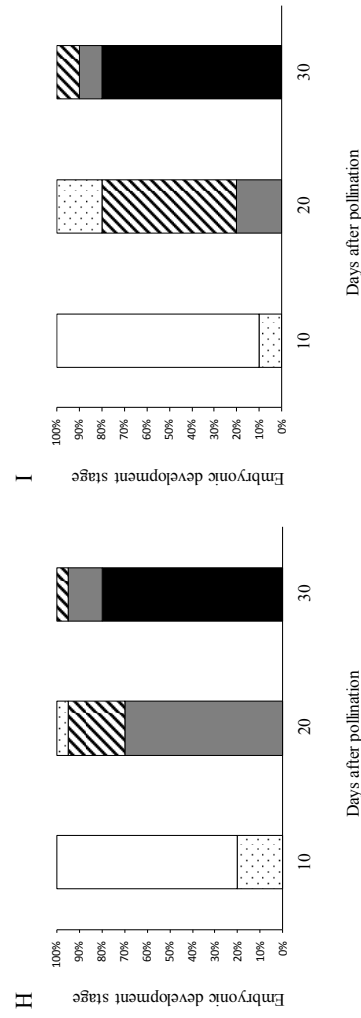
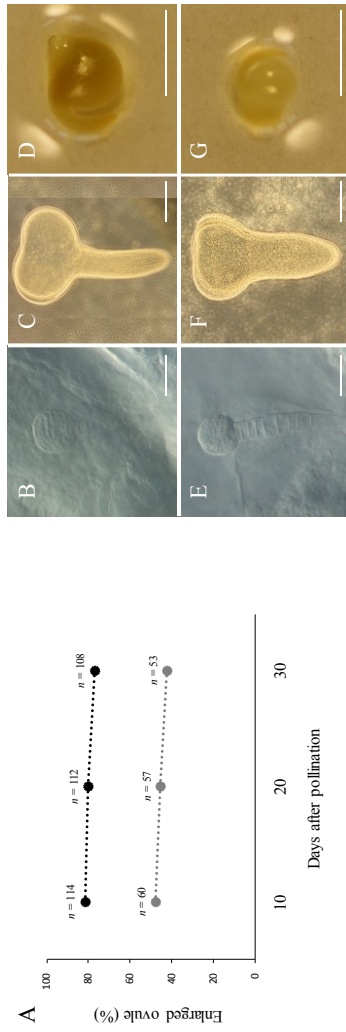


Figure 1-7. The embryo development ability in the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL plant. (A) Number of enlarged ovules of sib pollination of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (black) and the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (gray). The data are the frequencies for the total number of enlarged ovules ( $n$ ) in at least 15 siliques per combination. (B - G) Embryo developments of sib crossing of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (B - D) and the one of crossing combination of the (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 'Haru.'  $\times$  the euplasmic *B. rapa* 'Haru.' (E - G) at 10 days after pollination (B, E), 20 days after pollination (C, F) and 30 days after pollination (D, G). Scale bars: 100 μm in (B, E), 250 μm in (C, F), 500 μm in (D, G). (H) Embryonic development stage of sib crossing of the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'. (I) The (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 'Haru.'  $\times$  the euplasmic *B. rapa* 'Haru.'. The embryonic development stage means five classified stages; globular stage (blanked square), heart stage (dotted square), torpedo stage (hatched square), walking stick stage (gray square), mature stage (black square).  $n = 20$ .

に *D. tenuifolia* に由来する添加染色体をもち、 $2n = 21$  となることから、雌性不稔性は、おそらく *D. tenuifolia* 由来の添加染色体に座乗する遺伝子によって克服されることが示唆された (Fig. 1-8).

#### 第 4 節 考察

さまざまな作物において、CMS などの農業的有用形質を獲得するために種属間交雑が行われ (Budar and Berthomé 2007)、特にアブラナ科作物において多様な近縁野生種との種属間交雑が行われた (Matsuzawa *et al.* 1996). それらの多大な功績により、種属間における交雑不和合性によって雑種後代の作出が困難を要するのに加え、その後の連続戻し交雑において異質細胞質系統が得られない種属間の交雑組合せが存在することが明らかとなった (Kaneko and Bang 2014). 例えば、(cyt-*Ma*) *B. rapa* 系統は、核置換された種子が発芽後に重度のクロロシスを発現し枯死することから異質細胞質系統が得られず、*M. arvensis* の葉緑体ゲノムと *B. rapa* の核ゲノムの不和合性が示唆された (Tsutsui *et al.* 2011). 本章において、(cyt-*Dt*) *B. rapa* 系統の作出を試みたが (Fig. 1-1, Table 1-2), 異質細胞質系統が得られず、*D. tenuifolia* に由来する添加染色体を保持する (cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL 植物のみが得られた (Table 1-3, Fig. 1-2, 1-3). *D. tenuifolia* におけるゲノムデータベースは構築されていないことから、添加染色体の同定には至らなかったが、(cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL 植物において、(cyt-*Dt*) BC<sub>3</sub> 植物 ( $2n=21$ ) の 1 個体を種子親として用いた連続戻し交雑により、後代が作出されたことから同一の添加染色体が伝達されたと示唆された. そこで、(cyt-*Dt*) *B. rapa* MAL 植物と *B. rapa* 系統との交配において、花粉管誘引を調査したところ、添加染色体を保持する雌性配偶子は雌性不稔性を克服する一方、添加染色体を保持していない雌性配偶子は雌性不稔性を引き起こすと示唆された (Fig. 1-6). この外来性オルガネラゲノムの導入に起因する雌性不稔性を細胞質雌性不稔性 (Cytoplasmic female sterility: CFS) と定義し、(cyt-*Dt*) *B. rapa* 植物において異質細胞質系統は、CFS によって作出されず、*D. tenuifolia* に由来する添加染色体が、CFS を克服するために必要であることが示唆された.

(cyt-*Dt*) *B. oleracea* 系統や (cyt-*Dt*) *R. sativus* 系統は、作出過程において雌性不稔性がみられず、BC<sub>2</sub> 世代において異質細胞質系統が作出された一方

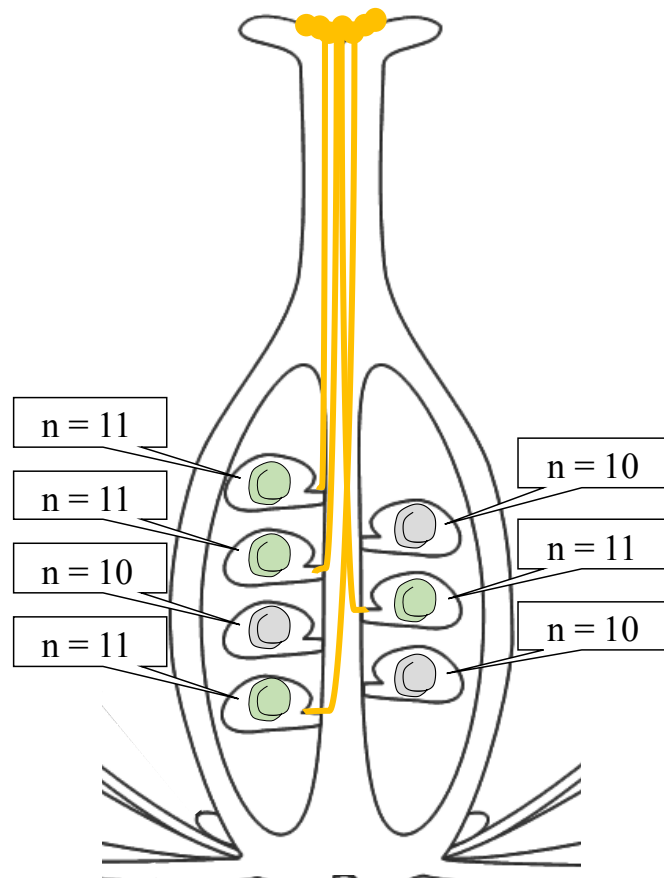


Figure 1-8. A model for understanding seed formation in the (*cyt-Dt*) *B. rapa* MAL plant. Ovules having the additional chromosome ( $n=11$ ) can attract pollen tube, while the other ovules without additional chromosome ( $n=10$ ) cannot attract one.

(谷口 2016, Bang *et al.* 2003), (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物は, CFS により異質細胞質系統が作出されなかったことから, 同一種のオルガネラゲノムの導入を試みたにもかかわらず, 核ゲノムの遺伝的背景によって異質細胞質系統の作出が困難を要することが明らかとなった. 理論的には 2 世代の戻し交雑によって核置換が達成されるが(皿島 1991b), (cyt-Dt) *B. rapa* 系統の作出において, BC<sub>2</sub> 世代では添加染色体の脱落がみられず, *D. tenuifolia* に由来する複数の添加染色体を有する個体のみが得られた (Table 1-2). BC<sub>2</sub> 世代における添加染色体の脱落が起きない原因は, 核ゲノム内の減数分裂時の対合の不均衡に起因すると考えられるが, 核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークも影響を及ぼすことが示唆された. これらのことから, *D. tenuifolia* のオルガネラゲノムは, *B. oleracea* や *R. sativus* の核ゲノムと和合性を示す一方で, *B. rapa* の核ゲノムとは不和合性を示し, この不和合性を克服するには, オルガネラゲノム提供種に由来する添加染色体の保持が有効と示唆された.

(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において花粉管誘引率および肥大胚珠は, 1 莢あたり約 50 %を示し, 添加染色体を有していない胚珠は, 花粉管誘引能力を欠如していることが示唆された. (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物においてほとんどの肥大胚珠は, 30 DAP で成熟胚に発達した (Fig. 1-7A, I). これらのことから, (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の胚珠において添加染色体をもつ胚珠では正常に胚発達が発生し, 添加染色体をもたない胚珠は, 雌性配偶体形成期で不全となり, (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の 1 莢あたりの成熟種子が約半数に低下したと示唆された. 本章では, (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の約半数の胚珠が花粉管を誘引できないことを明らかにしたが (Fig. 1-6), 添加染色体は花粉管誘引に直接関与するだけでなく, 雌性配偶子形成に関与する可能性がある. これらを明らかにするために, (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の半数の雌性配偶体が発達不全であるかを調査する必要がある. 核ゲノムにコードされている多くのペントリコペプチドリピート (PPR) タンパク質は, オルガネラゲノムにコードされている遺伝子の発現を調節することが知られており (Lurin *et al.* 2004), *Arabidopsis* においていくつかの PPR 遺伝子が胚発達に不可欠とされる (Cushing *et al.* 2005). このことから, *D. tenuifolia* のオルガネラゲノムに対応する PPR 遺伝子は, (cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物の添加染色体に由来する核ゲ

ノムにコードされている可能性があり，この PPR 遺伝子を探索することで，外来性オルガネラゲノムが添加染色体に座乗する因子によってどのように調節されているかが明らかになると期待される．

*B. rapa* においてさまざまな近縁野生種由来のオルガネラゲノムを導入することで，異質細胞質 CMS 系統が作出されたが (Yamagishi and Bhat 2014)，種子稔性の低下，生育遅延およびクロロシスなどの F<sub>1</sub> 品種の種子生産や植物体の生育に悪影響を及ぼす生理障害がみられるため実用的な CMS 系統が見出されていない (Hinata and Konno 1979, Prakash and Chopra 1988, Matsuzawa *et al.* 1999, 須永ら 2017)．(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物は，クロロシスがみられず正常に生育する CMS 系統であった．四分子期において正常な四分子を形成したが (Fig. 1-2D)，染色されない発達不全の花粉粒がみられたことから (Fig. 1-5F)，(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物は，小孢子形成期に発達不全となる雄性不稔性タイプであることが示唆された．したがって，(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物は，*B. rapa* の核ゲノムに添加染色体の雌性稔性に関与する回復因子を導入することで，*B. rapa* における F<sub>1</sub> 品種の種子生産に用いられる CMS 体系として期待される．他種への有用な遺伝子の導入は，減数分裂における異親対合を経て成し遂げられ，同祖性染色体対合は異なるゲノム間の遺伝子導入において実用的な方法である (Namai 1987)．この導入方法は以前に提唱されており，例えば，*D. catholica*，*M. arvensis* または *Trachystoma ballii* の細胞質をもつ *B. juncea* CMS 植物に対するそれぞれのオルガネラゲノム提供種に由来し核ゲノムにコードされている回復遺伝子は，*B. juncea* とそれぞれのオルガネラゲノム提供種間の遺伝子組換えによって導入された (Kirti *et al.* 1997, Prakash *et al.* 1998, Pathania *et al.* 2003)．また，*R. sativus* 細胞質をもつ *B. oleracea* 系統の作出において，連続戻し交雑では完全な雌性不稔性により中断されたが (McCollum 1979)，胚救済法 (Bannerot *et al.* 1974) および四倍体の花粉親の利用 (McCollum 1981) によって作出された．さらに，*B. oleracea* 一染色体添加型 *R. sativus* 系統において，種子に放射線を照射することで遺伝子導入に有用な対合型である三価染色体の頻度を向上させた (金子ら 1992)．単一の CMS 体系の利用に伴うリスクを軽減するために，(cyt-Dt) *B. rapa* CMS 植物は，さまざまなアプローチを用いて作出する必要がある．

以上のことから，(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物において雌性配偶子の半数のみが雌性稔性をもち，これらはオルガネラゲノム提供種由来の単一の添加染色体により生存することを明らかにした．本章は，アブラナ科作物において核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークが雌性稔性に影響を及ぼす知見を初めて提供した．



## 第 2 章

### *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつ *Brassica napus* における 雄性不稔回復機構の探索

#### 第 1 節 緒言

植物において種属間交雑は、自然界でまれに起こる一般的な現象であり、新しいエコタイプや種分化を発生させ、種の境界を越えた遺伝子交換を可能にすることにより、植物種の進化に重要な役割を担う (Leflon *et al.* 2006). 今日では、作物の遺伝的基盤を拡大し植物育種へ応用を図るために、種属間交雑を用いることで、近縁野生種から農学的有用形質の導入や異質倍数体系統の作出が求められている (Kaneko and Bang 2014).

倍数性は、多くの顕花植物において進化の過程で起こり (Cui *et al.* 2006, De Smet *et al.* 2013, Weiss-Schneeweiss *et al.* 2013), 現在では顕花植物の 30-35 % は倍数性植物と言われている (藤巻ら 1992). 倍数化はゲノム構造に変異を及ぼし、二倍体種には利用できないゲノム変異を有し (Leitch and Leitch 2008, Zhang *et al.* 2015), 特に、異質倍数化は、染色体再編成および遺伝子発現の調節などのゲノムやエピゲノムのダイナミックな変異によって引き起こされるバイオマス向上、種子収量の増大および菌類への抵抗性などの利点をもたらす (Tonosaki *et al.* 2016). 異数倍数化または倍数性進化におけるモデル植物として *Brassica napus* L. が広く用いられている (Rieseber and Willis 2007, Cheung *et al.* 2009, Kagale *et al.* 2014).

*B. napus* (AACC,  $2n = 38$ ) は、*B. rapa* (AA), *B. nigra* (BB), *B. oleracea* (CC), *B. juncea* (AABB) および *B. carinata* (BBCC) と共に禹の三角形モデルに属し (U 1935), *B. rapa* ( $2n = 20$ ) と *B. oleracea* ( $2n = 18$ ) 間の種間交雑によって、1 万年未満の比較的短時間で形成された異質倍数体植物である (Xiong *et al.* 2011, An *et al.* 2019). *B. napus* は、飼料用、葉菜用および根菜用を含む多様な系統が作出されるとともに、世界的に栽培されている最も重要な油糧種子作物の 1 つであり (Havlickova *et al.* 2017), 石灰質土壌の改善効果をもちファイトレメディエーションでの実用化が期待されている (Lacalle *et al.* 2018). 再合成された *B. napus* において、異質倍数化が葉の表現型や開花期などの遺伝

子発現に影響を及ぼすことが報告されているが (Gaeta *et al.* 2007), 異質倍数化におけるオルガネラゲノムが花器形態へ及ぼす影響はほとんど知られていない。

*Diplotaxis erucoides* (L.) DC. ( $2n = 14$ , DeDe) は, *Brassica* 栽培種に近縁であり (Pradhan *et al.* 1992, Vyas *et al.* 1995, Lysak *et al.* 2005, 筒井 2013), ホワイトウォールロケットとして地中海沿岸を中心に広く栽培されている (Sans and Masalles 1994, Richard *et al.* 2006). また, *D. erucoides* は, アブラナ科作物にとって重要病害である白さび病や黒班病などに対する抵抗性を持ち (Garg *et al.* 2007), *D. erucoides* のオルガネラゲノムは, *B. juncea* (Malik *et al.* 1999, 藤田ら 2016), *B. rapa* (山田ら 2010, Peng *et al.* 2015) および *B. oleracea* (Fujita *et al.* 2018) に導入することで細胞質雄性不稔性 (Cytoplasmic male sterility: CMS) を誘発した。しかし, *B. napus* において雄性可稔を示し (Ringdahl *et al.* 1987, 藤田ら 2015), 同一種のオルガネラゲノムを導入したにもかかわらず, 核ゲノムの遺伝的背景によって雄性形質の表現型が異なることが示された。

CMS は, 核ゲノムにコードされている稔性回復遺伝子とミトコンドリアゲノムにコードされている雄性不稔遺伝子の不和合によって, 正常な機能をもつ花粉粒を生産できなくなる現象であり (Chase 2007), 種内におけるミトコンドリアゲノムの突然変異体の選抜または種属間交雑や細胞融合に基づく外来性オルガネラゲノムの導入に由来する (Table 2-1, Kubo and Newton 2008, Rieseberg and Blackman 2010). アブラナ科植物における花粉粒は, 雄しべの先端にある 4 個の葯室から構成される葯のなかで作られ, 花粉母細胞が減数分裂を経て四分子となり, 順に小孢子, 花粉粒へと分化する。アブラナ科植物の CMS は, 葯の発達不全の段階とその分子機構に基づいて, 花粉嚢形成期に発達不全となるタイプ, 小孢子母細胞形成期に発達不全となるタイプおよび小孢子形成期に発達不全となるタイプの 3 種の雄性不稔タイプに分類されている (Yu and Fu 1990).

ミトコンドリアゲノムにコードされているオープンリーディングフレーム 108 (*orf108*) は, *D. erucoides* のオルガネラゲノムをもつ *B. juncea* において同定された CMS を誘導する原因遺伝子であり (Ashutosh *et al.* 2008), *D. erucoides*, *B. oxyrrhina* および *Moricandia arvensis* を含む多くのアブラナ科の

Table 2-1. Combinations of alloplasmic lines that induce male sterility.

Nuclear donor species	Cytoplasmic donor species
<i>Brassica rapa</i>	<i>B. maurorum</i> -2 (小池ら 2015), <i>B. oxyrrhina</i> (Prakash and Chopra 1988, 1990), <i>Diploptaxis muralis</i> (Hinata and Komoto 1979, Yamasaki et al. 2004)
	<i>D. erucoides</i> (Peng et al. 2015), <i>Enarthrocarpus lyratus</i> (Deol et al. 2003), <i>ErUCA sativa</i> (Matshuzawa et al. 1999), <i>hau</i> (Heng et al. 2015)
	<i>Moricandia arvensis</i> (Tsutsui et al. 2011), <i>Sinapis turgida</i> (須永ら 2017), <i>Ogura</i> (Kaminski et al. 2016)
<i>B. oleracea</i>	<i>B. oxyrrhina</i> (谷口ら 2015), <i>D. muralis</i> (Shimada et al. 2006), <i>D. erucoides</i> (Fujita et al. 2018), <i>Erucastrum canariense</i> (Chamola et al. 2013)
	<i>M. arvensis</i> (Chamola et al. 2013a), <i>Ogura</i> (Kagami et al. 1990, Dey et al. 2011a, b), <i>S. turgida</i> (谷口ら 2015)
<i>B. juncea</i>	<i>B. oxyrrhina</i> (Prakash and Chopra 1990), <i>B. fruticulosa</i> (Atri et al. 2016), <i>B. tournefortii</i> (Pradhan et al. 1991), <i>D. berthautii</i> (Bhat et al. 2008)
	<i>D. catholica</i> (Pathania et al. 2003), <i>D. erucoides</i> (Malik et al. 1999, Bhat et al. 2006), <i>E. canariense</i> (Prakash et al. 2001)
	<i>E. lyratu</i> (Banga et al. 2003), <i>M. arvensis</i> (Kirti et al. 1998, Gaikwad et al. 2006), <i>Ogura</i> (Kirti et al. 1995), <i>Trachystoma balli</i> (Kirti et al. 1997)
<i>B. napus</i>	<i>B. oxyrrhina</i> (沈ら 2012), <i>B. tournefortii</i> (Stewe et al. 1994, Liu et al. 1996), <i>D. muralis</i> (Pellan-Deboure and Renard 1987)
	<i>hau</i> (Wan et al. 2008), <i>S. alba</i> (Wang et al. 2014), <i>S. arvensis</i> (Liu et al. 2015)
<i>Raphanus sativus</i>	<i>B. oxyrrhina</i> (金田ら 1997), <i>B. fruticulosa</i> -401 (門田ら 2014), <i>B. maurorum</i> -2 (Bang et al. 2011)
	<i>D. erucoides</i> (藤田ら 2015), <i>D. tenuifolia</i> (門田 2015), <i>E. vesicaria</i> (房 1996), <i>M. arvensis</i> (門田 2015)

植物種で進化的に保存されている (Kumar *et al.* 2012). *B. oxyrrhina* および *M. arvensis* のオルガネラゲノムが導入された *B. juncea* 植物において, CMS は, ミトコンドリアゲノムに存在し ATP 合成酵素の  $\alpha$  サブユニットのタンパク質をコードする *atp1* と共転写する *orf108* によってもたらされる一方 (Ashutosh *et al.* 2008), その稔性回復は, 核ゲノムに存在しペンタトリコペプチドリピート (PPR) タンパク質をコードすると考えられる稔性回復遺伝子によって *orf108* がプロセッシングされることでもたらされる (Naresh *et al.* 2016). しかし, *D. erucoides* のミトコンドリアゲノムに由来する *orf108* の分子機構がどのように CMS に関与するかは明らかにされていない.

本章では, *D. erucoides* のオルガネラゲノムをもつ *B. napus* 植物において雄性稔性が回復した分子機構を明らかにするために, *D. erucoides* のオルガネラゲノムをもつ *Brassica* 栽培種における雄性配偶体の発達過程の組織学的観察, 雄性稔性の遺伝様式および *orf108* の分子機構を調査した.

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 供試材料と生育条件

供試材料は, *D. erucoides*, *B. rapa* 3 品種, *B. oleracea* 3 品種, *B. napus* 1 系統および *D. erucoides* のオルガネラゲノム (*cyt-De*) が導入された *B. rapa* 3 系統, *B. oleracea* 3 系統, *B. napus* 1 系統および *B. juncea* 1 系統を用いた (Table 2-2).

*D. erucoides* は, 東北大学アブラナ科シードバンクによって提供された. また, *B. rapa* 3 品種のハクサイ (*pekinensis*) ‘大福’, チンゲンサイ (*chinensis*) ‘一江’ およびコマツナ (*perviridis*) ‘さおり’ と *B. oleracea* 1 品種のキャベツ (*capitata*) ‘初恋’ は, 株式会社トーホクによって提供され, *B. oleracea* 2 品種のケール (*acephala*) ‘青汁ケール’ およびキャベツ (*capitata*) ‘中生カンラン’ は, ウタネ (栃木, 日本) によって提供された. *B. napus* 1 系統 ‘BN 502’ は, 宇都宮大学農学部植物育種学研究室において系統内交配により維持されている系統である.

本章で用いた (*cyt-De*) *B. rapa* 系統は, 山田ら (2010) により作出された (*cyt-De*) *B. rapa* 系統に *B. rapa* 9 系統を 7 回戻し交雑を行った BC<sub>9</sub> 世代の 9 系統

Table 2-2 Plant materials in Chapter 2.

Cytoplasm	Genus	Species	Subspecies	lines or cultivar	abbreviation	Source <sup>1)</sup>	Reference					
Euplasmic	<i>Diplotaxis</i>	<i>erucoides</i>			DeDe	TU						
	<i>Brassica</i>	<i>rapa</i>		<i>ssp. pekinensis</i>	‘Daifuku’	AA	TS					
				<i>ssp. chinensis</i>	‘Kazue’		TS					
				<i>ssp. perviridis</i>	‘Saori’		TS					
		<i>oleracea</i>			ver. <i>acephala</i>	‘Aojiru-kale’	CC	US				
					ver. <i>capitata</i>	‘Hatsukoi’		TS				
						‘Nakatekanran’		US				
		<i>napus</i>			‘BN 502’	AACC	UU					
		<i>D. erucoides</i>	<i>Brassica</i>	<i>rapa</i>					山田ら 2010			
<i>ssp. pekinensis</i>										‘Daifuku’	AA	
<i>ssp. chinensis</i>										‘Kazue’		
<i>ssp. perviridis</i>	‘Saori’											
<i>oleracea</i>									Fujita <i>et al.</i> 2018			
										ver. <i>acephala</i>	‘Aojiru-kale’	CC
					ver. <i>capitata</i>	‘Hatsukoi’						
				‘Nakatekanran’								
		<i>napus</i>		‘BN 502’	AACC		藤田ら 2015					
		<i>juncea</i>		‘UBJ-11’	AABB		藤田ら 2016					

<sup>1)</sup> TU: Tohoku University *Brassica* Seed Bank, TS: Tohoku Seed Company, US: Utane Seed Company, UU: Laboratory of Plant Breeding, Utsunomiya University, Japan.

から各亜種から 1 系統ずつの 3 系統である (Fig. 2-1). また, (cyt-De) *B. oleracea* 系統は, Fujita *et al.* (2018) により作出された (cyt-De) *B. oleracea* 系統に *B. oleracea* 4 系統を 1 回戻し交雑を行った BC<sub>5</sub> 世代の 4 系統から 3 系統を用いた (Fig. 2-2). (cyt-De) *B. napus* 系統は, 藤田ら (2015) により作出された (cyt-De) *B. napus* 系統に *B. napus* 5 系統を 3 回戻し交雑を行った BC<sub>5</sub> 世代の 5 系統から 1 系統を用いた (Fig. 2-3). (cyt-De) *B. juncea* 系統は, 藤田ら (2016) により作出された (cyt-De) *B. juncea* 系統に *B. juncea* 12 系統を 2 回戻し交雑を行った BC<sub>5</sub> 世代の 12 系統から 1 系統を用いた (Fig. 2-4).

宇都宮大学植物育種学研究室所有のビニールハウス内において *B. oleracea* 植物を 7 月下旬, その他のアブラナ科栽培種を 9 月上旬に 2 号ポット (径 6 cm) に播種を行い, その後, 生育に伴い 4 号ポット (径 12 cm) に移植し, 最終的に 6 号素焼鉢 (径 18 cm) に定植し生育させた.

## 2. 葯発達の組織学的観察

主茎の頂部から約 2.0-10.0 mm の花蕾を採取し, FAA 固定液 (formalin : acetic acid : ethanol = 1 : 1 : 18) を分注したサンプルビンに入れ, 脱気後, 4 °C で一晚以上固定した. 固定された花蕾を室温で 1 時間ごとにエタノールシリーズ (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 %) (v/v) を分注したそれぞれのサンプルビンに移行し, 段階的に脱水処理を行った. 脱水された花蕾を Technovit 7100 resin (Heraeus, 東京, 日本) に付属する浸漬液を分注したサンプルビンに移行し, 4 °C で少なくとも 7 日間程度樹脂置換処理を行った. 重合液 (浸漬液 : 硬化剤 = 15 : 1) を分注した CRYO DISH No. 1 (SHOEI WORK'S CO., LTD, 東京, 日本) 内に樹脂置換された花蕾を沈め, 室温においてパラフィルム (Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA) を用いて密閉し, 樹脂包埋した. その後, 支持台に取り付けトリミングした包埋試料を Leica RM2255 (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて 4.0 μm の切片を作製し, milli-Q 水を滴下したスライドガラス上に静置した後, 切片をスライドガラス上に接着させるため約 60 °C に設定した恒温器上で乾燥させた. 切片を 1.0 % トルイジンブルー染色液 (w/v) で染色し, 光学顕微鏡下で葯の横断面を観察した. 葯発達段階は, Sanders *et al.* (1999) を基に決定した.

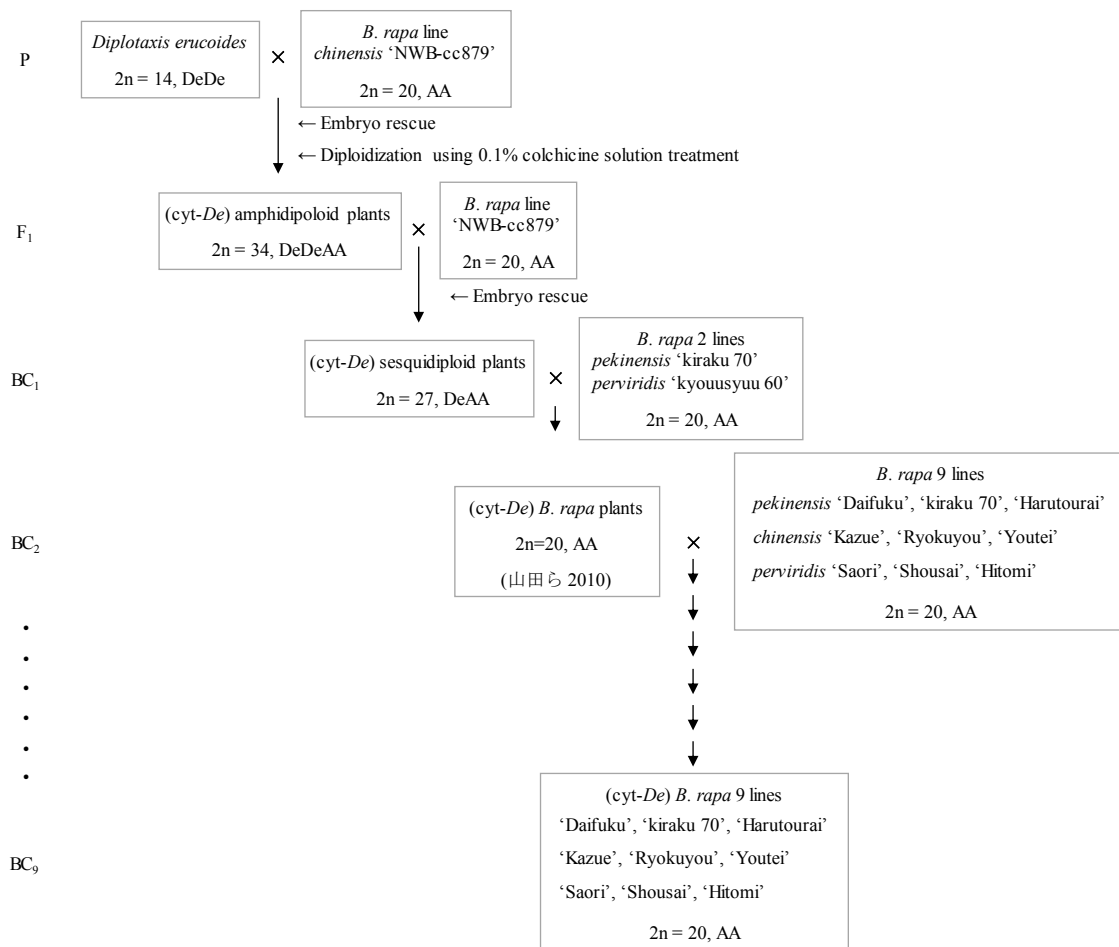


Figure 2-1. Scheme for development to the (*cyt-De*) *B. rapa* lines derived from 山田ら (2010). (*cyt-De*) means *D. erucoides* cytoplasm.

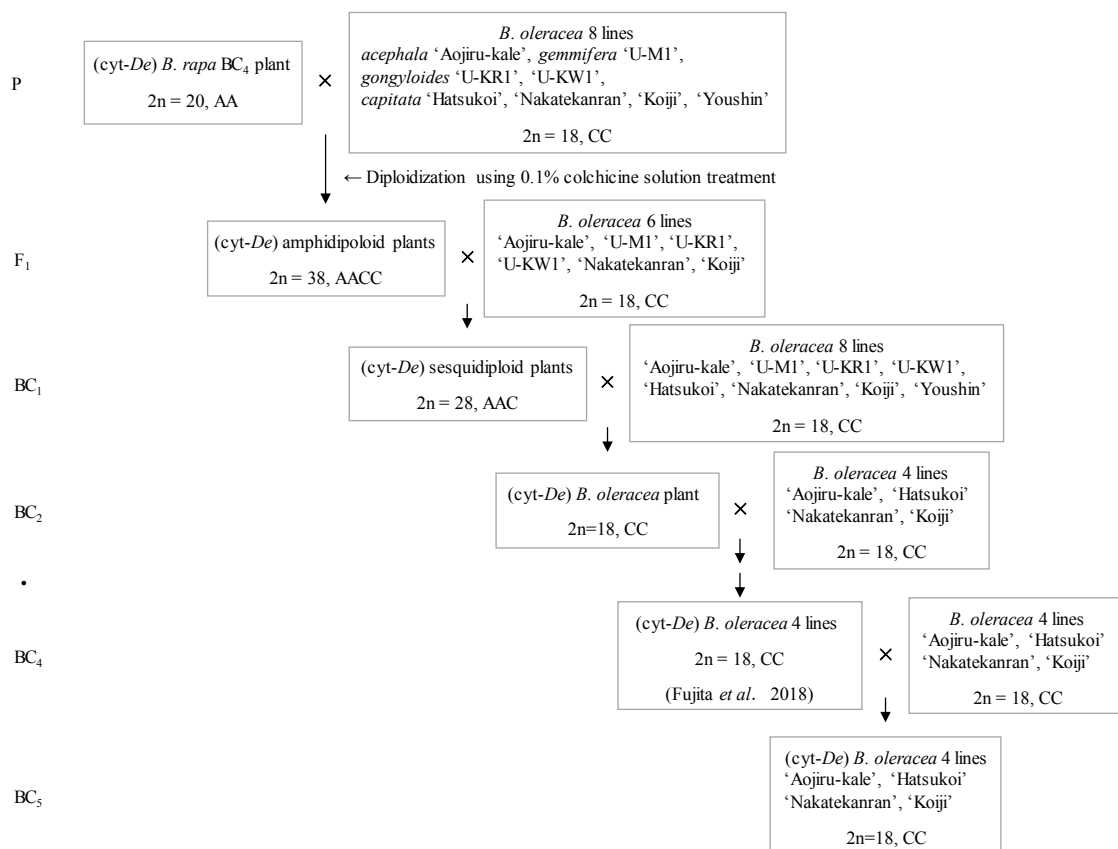


Figure 2-2. Scheme for development to the (*cyt-De*) *B. oleracea* lines derived from Fujita *et al.* (2018).



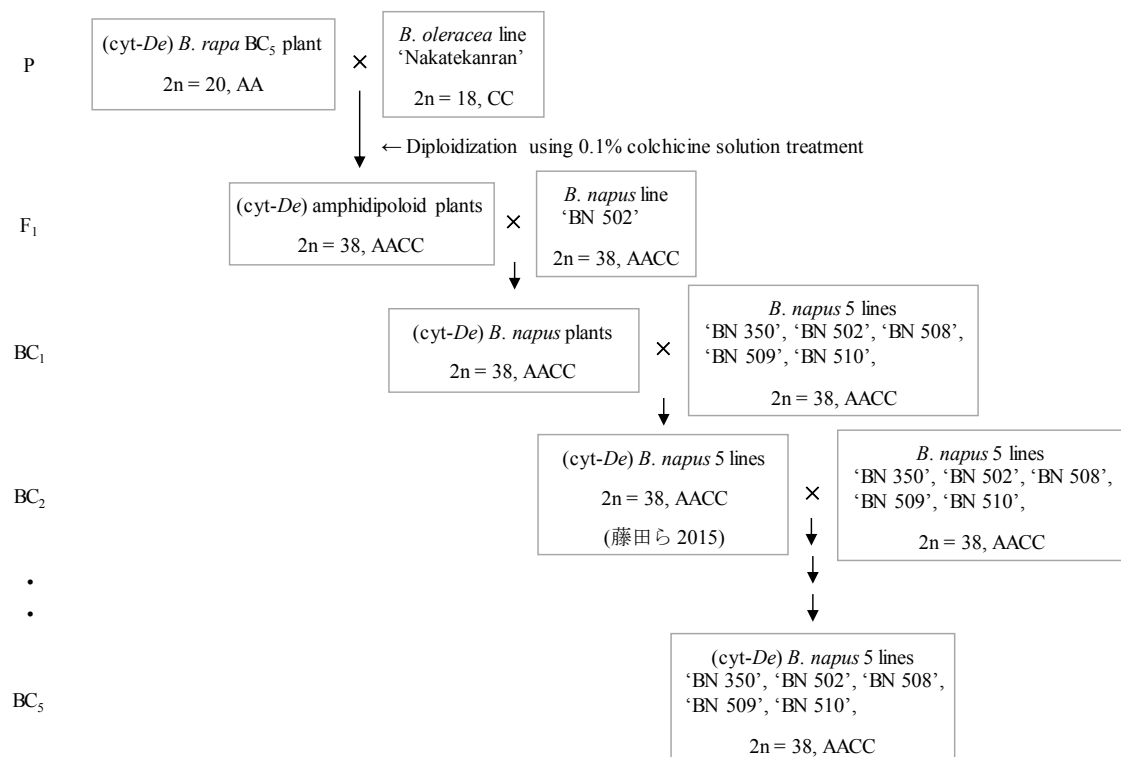


Figure 2-3. Scheme for development to the *(cyt-De)* *B. napus* lines derived from 藤田ら (2015).

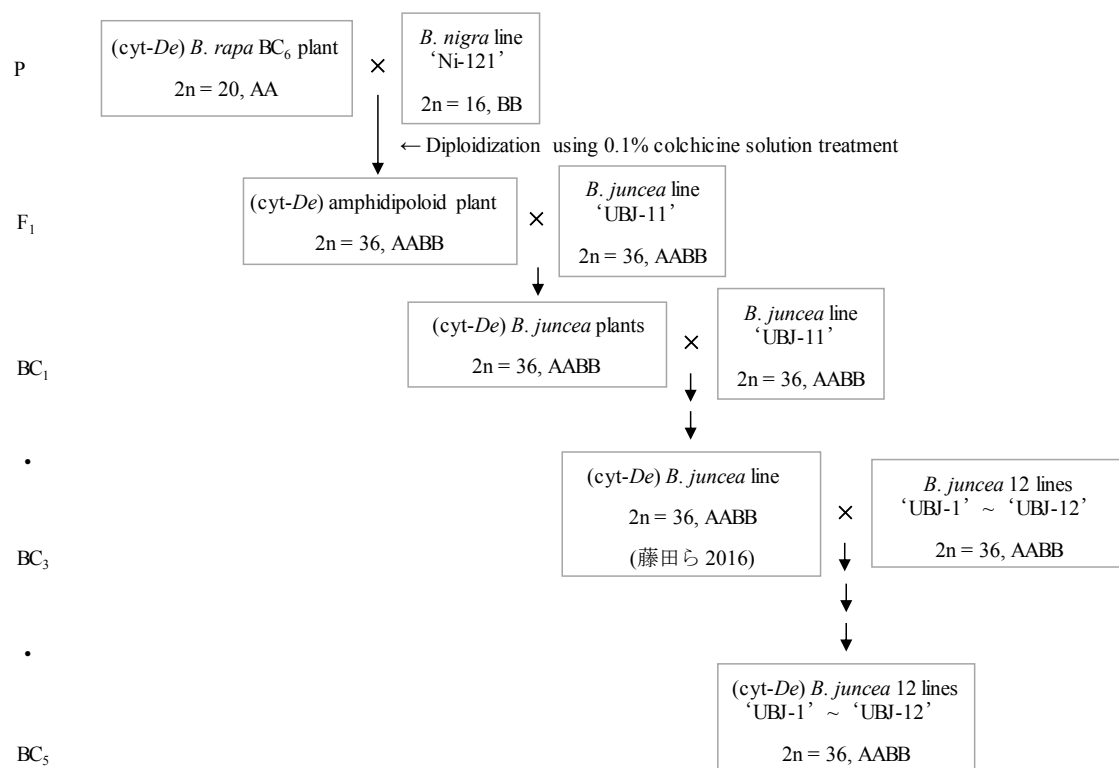


Figure 2-4. Scheme for development to the (cyt-De) *B. juncea* lines derived from 藤田ら (2016).

### 3. 雄性稔性の遺伝様式

花粉稔性を雄性可稔および雄性不稔を分ける主要な基準として用いた。1 個体あたり 3 花序からそれぞれ 1 花を採取し、開葯直後の雄しべをスライドガラス上に滴下した 1.0 % 酢酸カーミン染色液 (w/v) につけ、花粉粒を染色した。花粉稔性は、光学顕微鏡下で 1,000 個の花粉粒を観察することによって算出した。染色された花粉粒を有する植物体を雄性可稔の個体として分類し、花粉粒が染色されていない発達不全の花粉粒を有する植物体を雄性不稔の個体として分類した。また、40-60 % の花粉稔性を有する植物体を半不稔の植物体とみなし、90 % を超える花粉稔性を有する植物体を雄性可稔の植物体とみなした。

雄性稔性の遺伝様式解析のために、半不稔および雄性可稔の植物体を自殖またはそれぞれの花粉稔性を有する植物体との交雑に使用した。

### 4. PCR 解析

PCR 解析を行うために、第 1 章と同様の方法（第 1 章 材料および方法 4. ゲノム DNA 抽出を参照）によりゲノム DNA を抽出した。PCR 解析は、Dream Taq DNA Polymerase Kit および *orf108* 特異的プライマーペア *orf108\_F1 - orf108\_R2*（Table 2-3, Kumar *et al.* 2012, Naresh *et al.* 2016）を用い、TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice™ により解析した。得られた PCR 産物は、第 1 章の方法（第 1 章 材料および方法 5. RAPD 解析を参照）と同様の方法で電気泳動を行った。

#### ・ PCR mix の組成

10X Dream Taq Buffer	1.0 $\mu$ L
dNTP 2mM each	1.0 $\mu$ L
Primer	1.0 $\mu$ L
Template DNA	1.0 $\mu$ L
DreamTaq DNA	0.1 $\mu$ L
Polymerase	
dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu$ L
Total	10.1 $\mu$ L

Table 2-3. Primers used in Chapter 2.

<b>Purpose</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
Direct sequence	<i>orf108</i> _F1	CTTGCAGACCTACTCGGAAC
	<i>orf108</i> _R2	GACCGATCTCATCCACTTGAAA
5' RACE	<i>orf108</i> _5RT_781_5' phosphorylation	CACGTCCTTGCTCGT
	<i>orf108</i> _S1_592	GAATGGCCTTGAATCTTGAG
	<i>orf108</i> _A1_422	GATTCGTTAGTTCCGCAGCT
	<i>orf108</i> _S2_694	TGGATGTTCCC GCGGAAAG
	<i>orf108</i> _A2_361	AAGGAGGAATACCGCTTTAG
Real Time RT-PCR	<i>orf108</i> _F8	ACGGAGTGAAGCTGTCTGGA
	<i>orf108</i> _R5	TGGTGCTGTAAAAGGCGTTG
	<i>atp1</i> _F2	TGCCGCTCAGTTGAAAGCTA
	<i>atp1</i> _R2	TTCTGTCAGCCTTGACCTC

・ PCR 条件

94 °C	3 min.	1 cycle
94 °C	30 sec.	} 35 cycles
60.4 °C	30 sec.	
72 °C	30 sec.	
72 °C	1 min.	1 cycle

5. TA クローニングおよびプラスミド DNA 抽出

FastGene GEL/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd, 東京, 日本) により精製された PCR 産物を pGEM-T Easy Vector に挿入した後, Competent Quick DH5 $\alpha$  (TOYOBO CO., LTD., 大阪, 日本) で増殖させ, NucleoSpin Plasmid EasyPure (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, DÜren, Germany) を用いてプラスミド DNA として抽出した.

6. シーケンス解析

FastGene GEL/PCR Extraction Kit により精製された PCR 産物またはプラスミド DNA についてシーケンス解析を行った (Eurofins Genomics K.K.). 得られた塩基配列を DNASTar (SeqMan) ソフトウェアで解析し, それらを ClustalW ソフトウェア (DNA Data Bank of Japan) を用いてアライメント処理を行った.

7. RNA 抽出

花蕾の Total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて単離し, DNase I (Thermo Fisher Scientific K.K., 東京, 日本) を用いて, ゲノム DNA を処理した.

8. *orf108* 領域におけるプロセシング位置の同定

Kuhn and Binder (2002) に従い, ミトコンドリアゲノムにコードされている *orf108* の転写産物における 5' 末端の配列決定を行うために, 5'-Full RACE Core Set (TAKARA BIO INC., 滋賀, 日本) を使用した. *orf108* に特異的なプライマーを設計し (Table 2-3), 一次 PCR および二次 PCR は, それぞれのプラ

イマーペア *orf108\_S1\_592* - *orf108\_A1\_422* および *orf108\_S2\_694* - *orf108\_A2\_361* を用いた。二次 PCR 産物を TA クローニングし、ダイレクトシーケンス解析を行った。得られた塩基配列を DNASTar ソフトウェアで解析し、それらを Multiple Sequence Alignment Parameters ソフトウェアを用いてアライメント処理を行った。

### 9. Real Time RT-PCR 解析

Real Time RT-PCR 解析の検量線は、*orf108* 特異的プライマーペア *orf108\_F1* - *orf108\_R2* により得られた PCR 産物を TA クローニングした *orf108* プラスミド DNA を使用した。抽出された Total RNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO CO., LTD., 大阪, 日本) を用いて cDNA 合成した。cDNA 合成産物にゲノム DNA の混入がないことは、付属の no-RT Control を用いた PCR 解析によって確認された。Real Time RT-PCR 解析は、FastStart Essential DNA Green Master (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) および *atp1* (*atp1\_F2* - *atp1\_R2*), *mid-orf108* (*orf108\_F8* - *orf108\_R5*) の 2 種のプライマーペアを用い (Table 2-3), LightCycler® 96 System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) により行った。*orf108* 領域における相対発現量は、各系統における *atp1* の発現量を基準として用いた。Real Time RT-PCR 解析は、Rieu and Powers (2009) に従い、各系統 6 個体を用いた。

## 第 3 節 実験結果

### 1. *D. erucoides* のオルガネラゲノムの導入による *Brassica* 栽培 3 種の蒴発達の影響

(*cyt-De*) *Brassica* 栽培 3 種の蒴発達を詳細に比較するために、それぞれの蒴の横断面を観察した (Fig. 2-5 - 2-10)。 *B. rapa* ssp. *pekinensis* ‘Daifuku’ の蒴は、花粉粒まで正常に発達した (Fig. 2-5A - D)。一方、(*cyt-De*) *B. rapa* ‘Daifuku’ の蒴発達は、四分子形成期まで *B. rapa* ‘Daifuku’ と明確な差異がみられなかったが (Fig. 2-5E - F), 小孢子形成期では濃く染色されていない小孢子が観察され (Fig. 2-5G), 形成された花粉粒は発達不全の花粉粒であった (Fig. 2-5H)。  
(*cyt-De*) ssp. *chinensis* *B. rapa* ‘Kazue’ および ssp. *perviridis* ‘Saori’ の蒴発

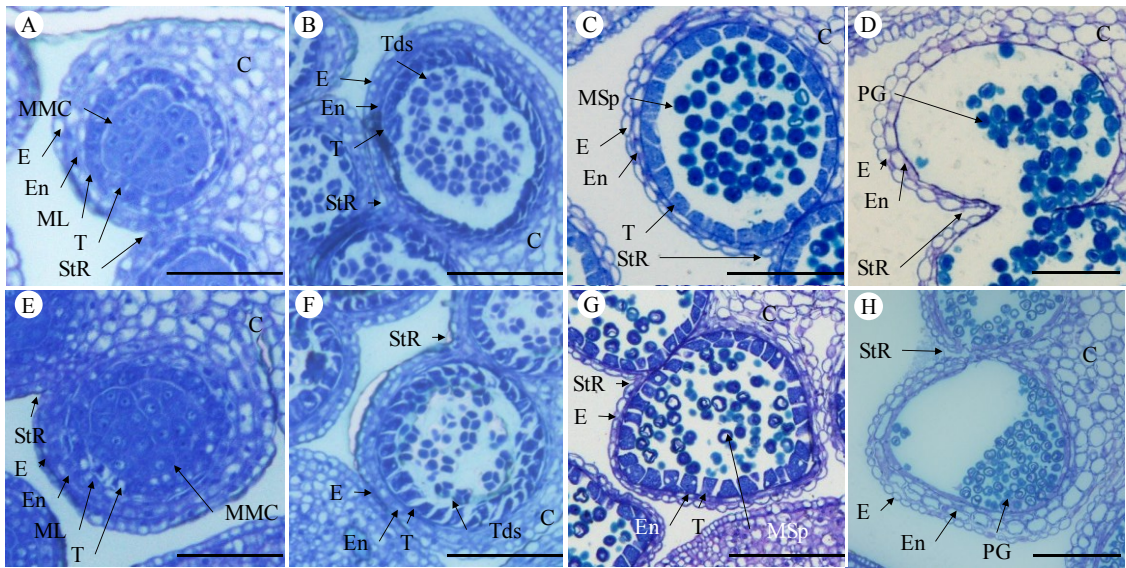


Figure 2-5. Anther development defects of the (*cyt-De*) *B. rapa* plant. (A - H) The images are transverse sections of anthers of the euplasmic *B. rapa* ‘Daifuku’ (A - D) and the (*cyt-De*) *B. rapa* ‘Daifuku’ (E - H). C, connective; E, epidermis; En, endothecium; ML, middle layer; MMC, microspore mother cells; MSP, microspores; PG, pollen grains; StR, stomium region; T, tapetum; Tds, tetrads. Scale bars: 100  $\mu$ m.

達は, (cyt-De) *B. rapa* ‘Daifuku’ と類似していた (Fig. 2-6). *D. erucoides* のオルガネラゲノムが導入された *B. rapa* 3 亜種 3 品種間で類似した蒴発達を示したことから, (cyt-De) *B. rapa* 植物における蒴成達は, A ゲノム特異的な蒴成達であり, (cyt-De) *B. rapa* 植物は, 発達不全の花粉粒を生産する雄性不稔性を示すことが明らかとなった.

*B. oleracea* ver. *pekinensis* ‘Aojiru-kale’ の蒴は, 正常に発達したが (Fig. 2-7A - C), (cyt-De) *B. oleracea* ‘Aojiru-kale’ の蒴成達は, 小孢子母細胞が未分化であり, 雄ずい原基から分化する二次側膜細胞および孢子形成細胞の発生が観察されなかった (Fig. 2-7D - F). (cyt-De) *B. oleracea* ver. *capitata* ‘Hatsukoi’ および ‘Nakatekanran’ の蒴成達は, (cyt-De) *B. oleracea* ‘Aojiru-kale’ と類似していた (Fig. 2-8). *D. erucoides* のオルガネラゲノムが導入された *B. oleracea* 2 亜種 3 品種間で類似した蒴成達を示したことから, (cyt-De) *B. oleracea* 植物における蒴成達が C ゲノム特異的であることを示し, (cyt-De) *B. oleracea* 植物の雄性不稔性は, (cyt-De) *B. rapa* 植物よりも蒴成達の初期段階に表れた.

*B. napus* ‘BN502’ の蒴は, 成熟した花粉粒まで正常に発達した一方 (Fig. 2-9A - C), (cyt-De) *B. napus* ‘BN502’ の蒴は, 蒴の発達初期から 1 蒴あたり最大 2 個の蒴室をもち蒴室数が半数以下であり (Fig. 2-9D-F), 形成された蒴室において, 濃く染色された多くの小孢子が観察された (Fig. 2-9F). 1 花あたりの蒴室数を測定した結果, *B. napus* ‘BN502’ の花蕾は, それぞれ 4 個の蒴室を有する 6 個の蒴がみられ, 1 花あたり 24 個の蒴室をもつ (Fig. 2-10A, C). 一方, (cyt-De) *B. napus* ‘BN502’ の花蕾は, 1 花あたり最大約 5 個の蒴室をもつことが明らかとなった (Fig. 2-10B, C).

以上の結果から, (cyt-De) *B. rapa* 植物は, 蒴室を形成するが発達不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプであり, (cyt-De) *B. oleracea* 植物は, 蒴室が未分化で小孢子母細胞が形成されない雄性不稔タイプであることが分かった. さらに, それらの異質倍数体である (cyt-De) *B. napus* 植物は, 部分的ながらも蒴室を形成し, 雄性可稔の花粉粒を生産することが明らかとなった.



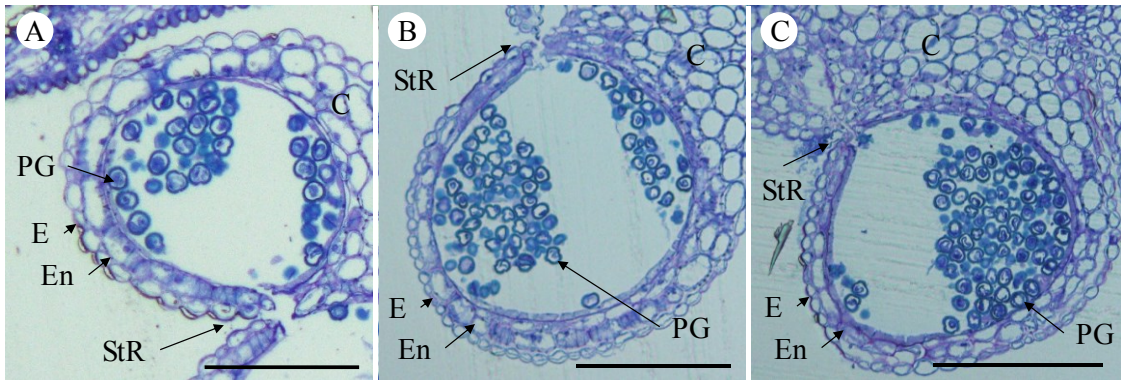


Figure 2-6. Comparison of anther development defects in the (*cyt-De*) *B. rapa* plant. (A - C) The images are transverse sections of anthers of the (*cyt-De*) *B. rapa* ssp. *pekinensis* 'Daifuku' (A), ssp. *chinensis* 'Kazue' (B) and ssp. *perviridis* 'Saori' (C). C, connective; E, epidermis; En, endothecium; PG, pollen grains; StR, stomium region. Scale bars: 100 μm.

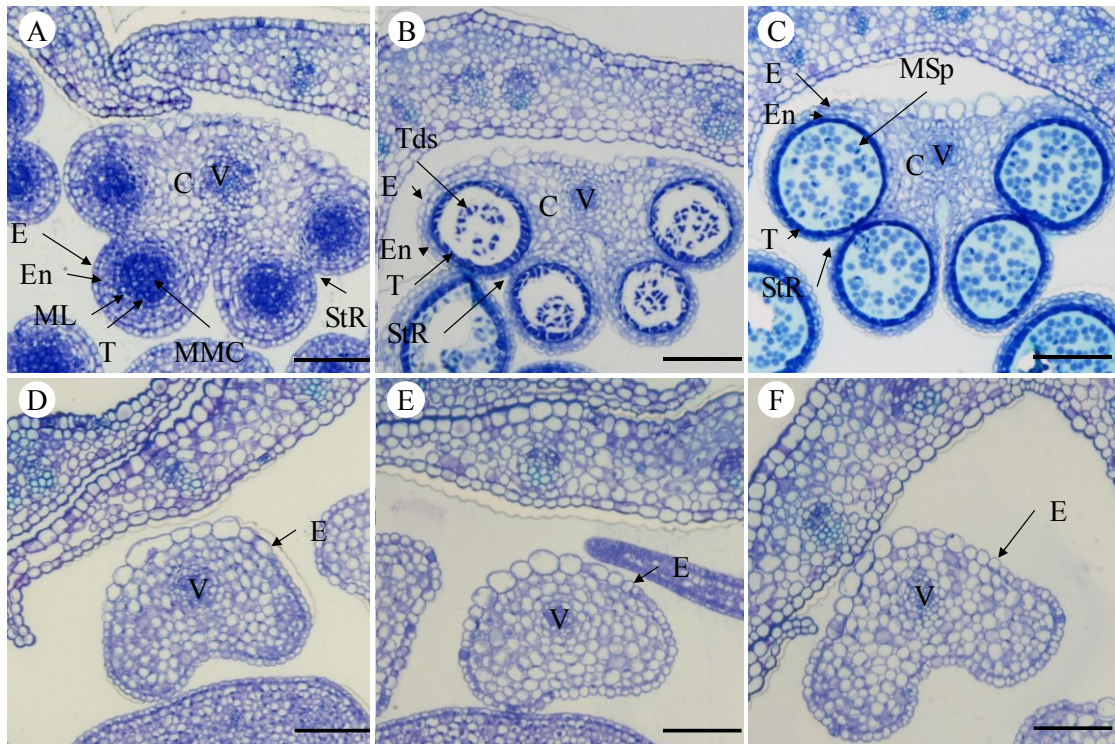


Figure 2-7. Anther locules defects of the (*cyt-De*) *B. oleracea* plant. (A - F) The images are transverse sections of anthers of the euplasmic *B. oleracea* 'Aojiru-kale' (A - C) and the (*cyt-De*) *B. oleracea* 'Aojiru-kale' (D - F). C, connective; E, epidermis; En, endothecium; ML, middle layer; MMC, microspore mother cells; MSp, microspores; StR, stomium region; T, tapetum; Tds, tetrads; V, vascular region. Scale bars: 200  $\mu$ m.

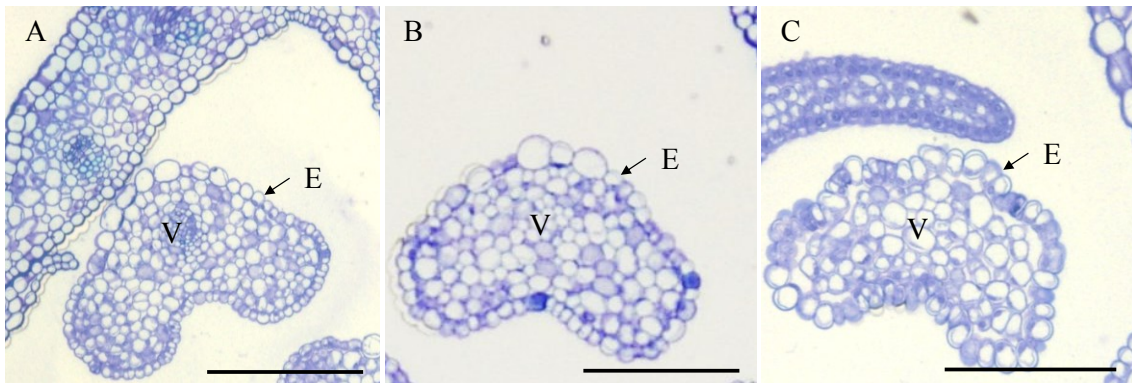


Figure 2-8. Comparison of anther development defects in the (*cyt-De*) *B. oleracea* plant. (A - C) The images are transverse sections of anthers of the (*cyt-De*) *B. oleracea* ver. *pekinensis* 'Aojirukale' (A), ver. *capitata* 'Hatsukoi' (B) and 'Nakatekanran' (C). E, epidermis; V, vascular region. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$ .



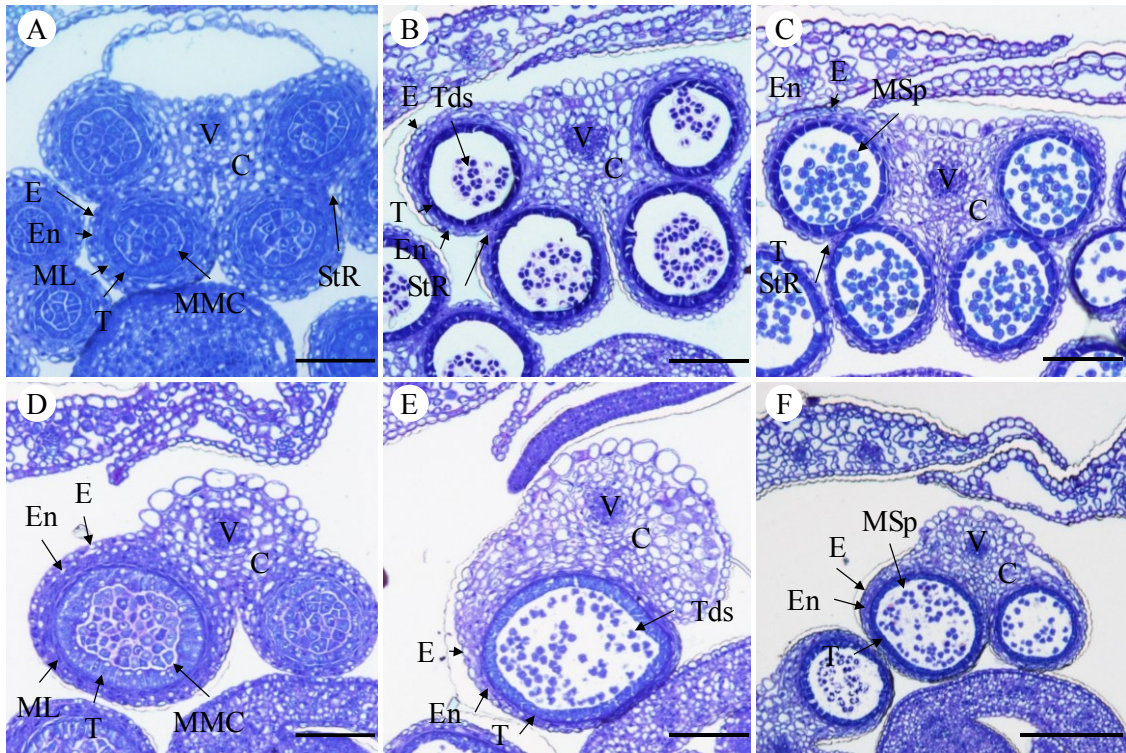


Figure 2-9. Anther development abnormality of the (*cyt-De*) *B. napus* plant. (A - F) The images are transverse sections of anthers of the euplasmic *B. napus* 'BN 502' (A - C) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN 502' (D - F). C, connective; E, epidermis; En, endothecium; ML, middle layer; MMC, microspore mother cells; MSp, microspores; StR, stomium region; T, tapetum; Tds, tetrads; V, vascular region. Scale bars: 200  $\mu$ m.

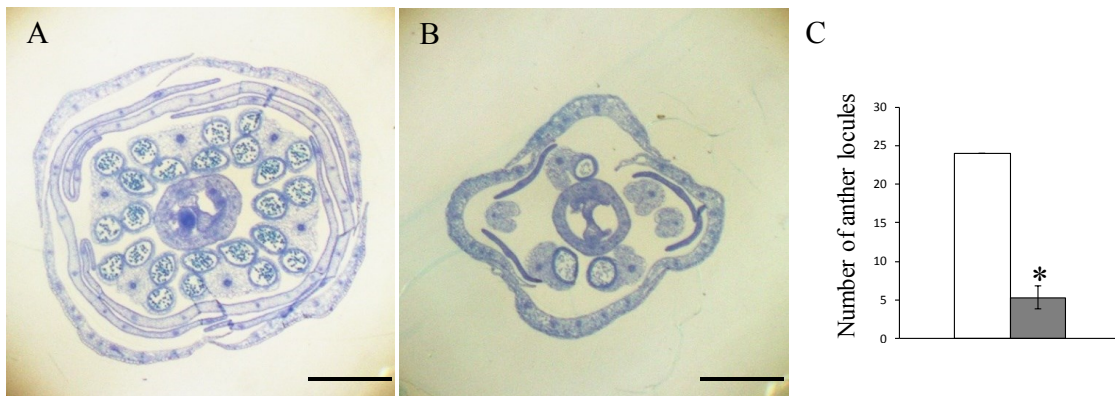


Figure 2-10. Partial remission of anther development of the *(cyt-De)* *B. napus* plant. (A, B) The images are transverse sections of bud of the euplasmic *B. napus* 'BN 502' (A) and the *(cyt-De)* *B. napus* 'BN 502' (B). Scale bars: 200  $\mu$ m. (C) Comparison of number of anther locules per bud in the euplasmic *B. napus* 'BN502' (white) and the *(cyt-De)* *B. napus* 'BN502' (gray). The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 10$ . Significant differences ( $p < 0.001$ ) between the euplasmic *B. napus* 'BN502' and the *(cyt-De)* *B. napus* 'BN502' are indicated by \*.

## 2. (cyt-De) *B. napus* 植物における雄性稔性の遺伝様式

(cyt-De) *B. napus* 植物の雄性稔性の遺伝様式を明らかにするために、(cyt-De) *B. napus* 植物における花粉稔性が雄性可稔(約 100%)または半不稔(約 50%)を示した植物体の自殖後代または半不稔の植物体と雄性可稔の植物体との交雑後代の花粉稔性を調査した (Fig. 2-11, Table 2-4). その結果、雄性可稔の植物体における自殖後代は、試験した全ての植物体において雄性可稔を示した。また、半不稔の植物体における自殖後代は、雄性可稔の植物体が 11 個体、半不稔の植物体が 9 個体であり、約 1:1 の比率を示した。さらに、半不稔の植物体と雄性可稔の植物体との交雑後代における花粉稔性個体は、雄性可稔の植物体が 8 個体、半不稔の植物体が 10 個体であり、約 1:1 の比率を示した。これらの結果から (cyt-De) *B. napus* 植物における雄性稔性の遺伝様式は、配偶体支配であることが示唆された。

## 3. *D. erucoides* における雄性不稔原因遺伝子 *orf108* の解析

*D. erucoides* の *orf108* を他のアブラナ科植物と比較するために、*D. erucoides*, *B. oxyrrhina* および *M. arvensis* の *orf108* コード領域についてダイレクトシーケンス解析を行った (Fig. 2-12). その結果、*D. erucoides* の *orf108* コード領域は、*B. oxyrrhina* と 11 箇所の置換が検出された一方、*M. arvensis* と 100% の相同性が検出された。以上の結果から、*D. erucoides* のオルガネラゲノムを導入した植物体における *orf108* の分子機構は、*M. arvensis* のオルガネラゲノムを導入した植物体と類似することが示唆された。

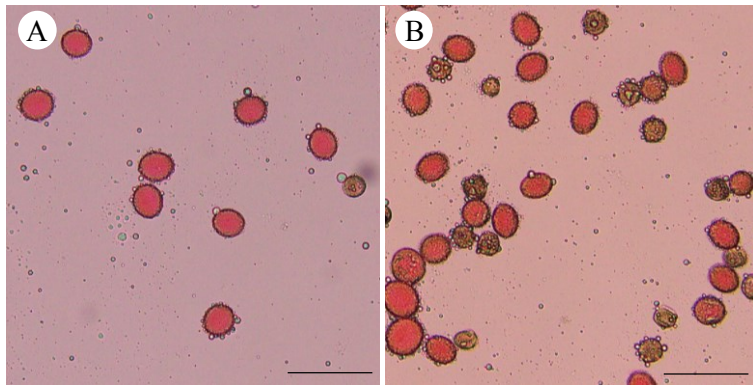


Figure 2-11. Pollen fertility of the (*cyt-De*) *B. napus* plant.  
(A) the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN 502' -1 (PF = 95 %). (B) the  
(*cyt-De*) *B. napus* 'BN 502' -2 (PF = 49 %). Scale bars: 100  $\mu$ m.

Table 2-4. Segregation of male fertility in the (cyt-De) *B. napus* populations.

Cross combinations		Number of plants	Number of plants with each pollen pollen fertility (PF)	
Seed parents (PF, PG) <sup>1)</sup>	Pollen parents (PF, PG)		Full fertility (100 %)	Semi sterility (50 %)
(cyt-De) <i>B. napus</i> 'BN 502' (100, RfRf)	Selfing (100, Rf)	19	19	0
(cyt-De) <i>B. napus</i> 'BN 502' (50, Rfrf)	Selfing (50, rf)	20	11	9
(cyt-De) <i>B. napus</i> 'BN 502' (50, Rfrf)	(cyt-De) <i>B. napus</i> 'BN 502' (100, Rf)	18	8	10

1) PF : Pollen fertility (%), and PG: Pollen genotype



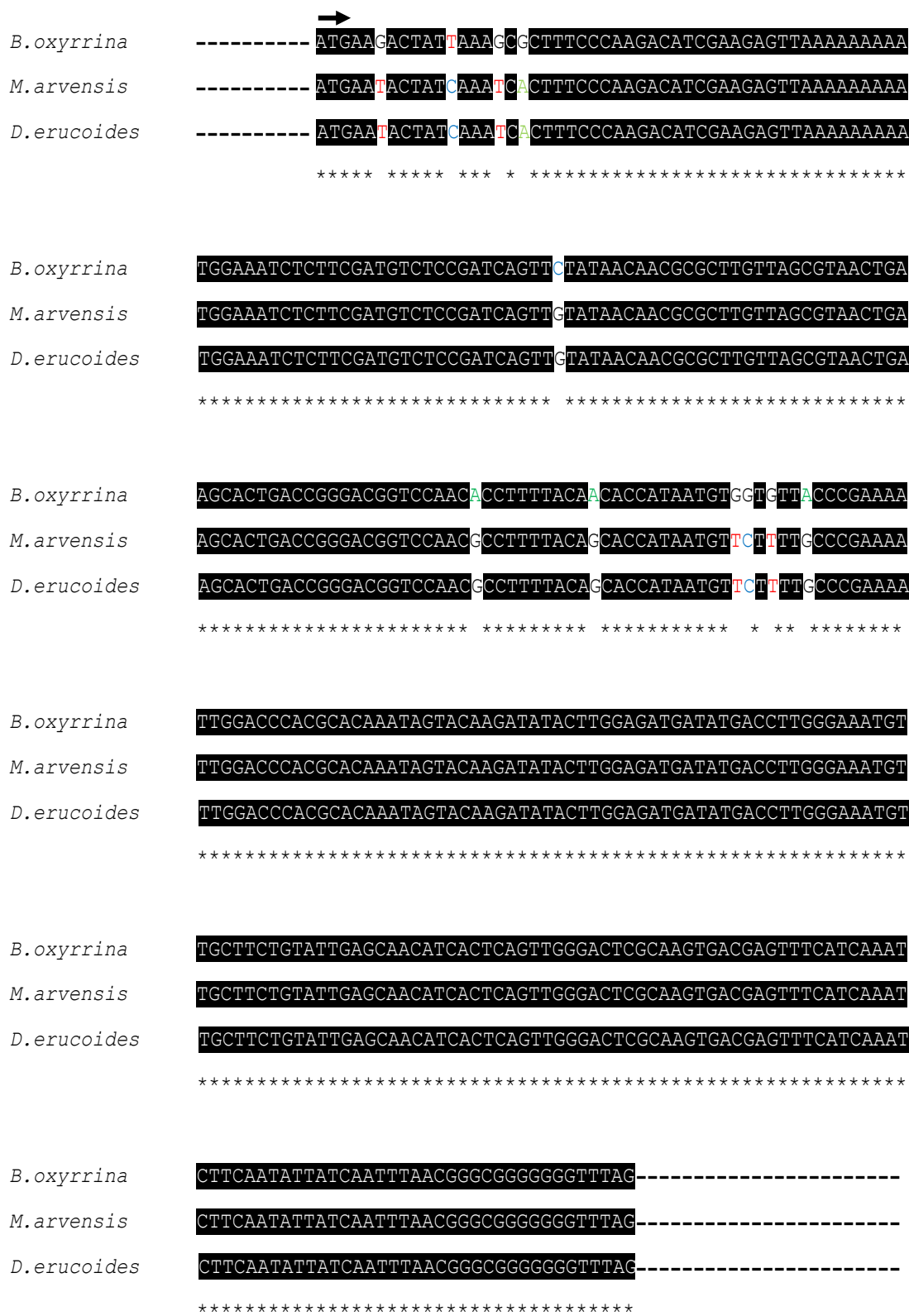


Figure 2-12. Alignment of *atp1* upstream sequences in *B. oxyrrhina*, *M. arvensis* and *D. erucoides* plants. DNA sequence identity is indicated by black boxes. The forward arrow and bar indicate the start and stop codons of *orf108*, respectively.

#### 4. (cyt-De) *Brassica* 栽培 4 種における *orf108* のプロセシング位置の同定 および発現差解析

*D. erucoides* のオルガネラゲノムが導入された *Brassica* 栽培種における *orf108* の分子機構を明らかにするために、まず、5'RACE 法を用いて *orf108* 転写産物がプロセシングされているかを調査した。(Fig. 2-13A)。その結果、発達不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプである (cyt-De) *B. juncea* および (cyt-De) *B. rapa* において、*atp1* と *orf108* の塩基配列のサイズを合わせた位置に特異バンドが検出され、*orf108* のプロセシングが起きていないことが示唆された。一方、*D. erucoides* および (cyt-De) *B. oleracea* において、複数の断片化されたバンドが検出され、雄性可稔を示す *D. erucoides*, (cyt-De) *B. napus* および小孢子母細胞が形成されない (cyt-De) *B. oleracea* において *orf108* 領域でのプロセシングが起これ、プロセシング能力をもつことが示唆された。そこで、*D. erucoides* および (cyt-De) *B. oleracea* における *orf108* のプロセシング位置を同定するために、それらの複数の断片化されたバンドに由来する cDNA 合成産物を抽出し、クローニング後に塩基配列を決定した (Fig. 2-13B)。その結果、(cyt-De) *B. oleracea* は、*orf108* 領域内やその上流において *D. erucoides* と異なる位置でプロセシングが起きていることが明らかとなった。このことから *B. oleracea* は、*D. erucoides* がもつ分子機構とは異なる分子機構を利用して、*D. erucoides* のミトコンドリアゲノムにコードされている *orf108* をプロセシングする能力をもつことが示唆された。次に、*orf108* 領域のプロセシング位置に特異的なプライマーを設計し (Table 2-3, Fig. 2-14A), *D. erucoides* および (cyt-De) *Brassica* 栽培 4 種について Real Time RT-PCR 解析を行った (Fig. 2-14B)。その結果、発達不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプである (cyt-De) *B. juncea* および (cyt-De) *B. rapa* における *orf108* 転写産物量は、それぞれ 2.36 および 1.58 と高い値を示し、転写産物量の低下が認められなかった。一方、雄性可稔を示す *D. erucoides*, (cyt-De) *B. napus* および小孢子母細胞が形成されない雄性不稔タイプである (cyt-De) *B. oleracea* における *orf108* 転写産物量は、それぞれ 0.03, 0.08 および 0.55 と低い値を示し、転写産物量の低下が認められた。

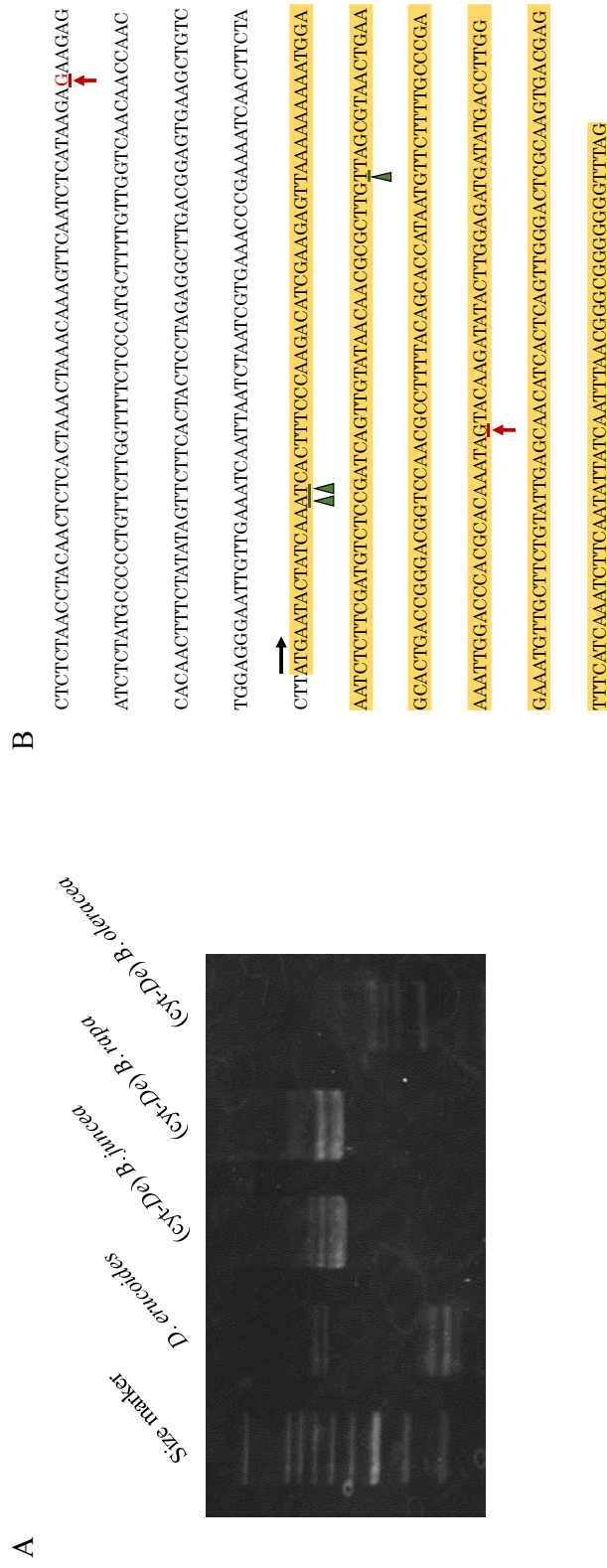


Figure 2-13. Identification of processing position of *orf108*. (A) Electrophoretic image by 5'RACE method in *D. erucoides* and the (*cyt-De*) *Brassica* species. (B) Processing position of *atp1* upstream sequences of *D. erucoides* and the (*cyt-De*) *B. oleracea* plants. The *orf108* region is indicated by yellow boxes. The forward black arrow and black bar indicate the start and stop codons of *orf108*, respectively. The red arrow and the green arrow head indicate the processing position of *D. erucoides* and the (*cyt-De*) *B. oleracea* plants, respectively.

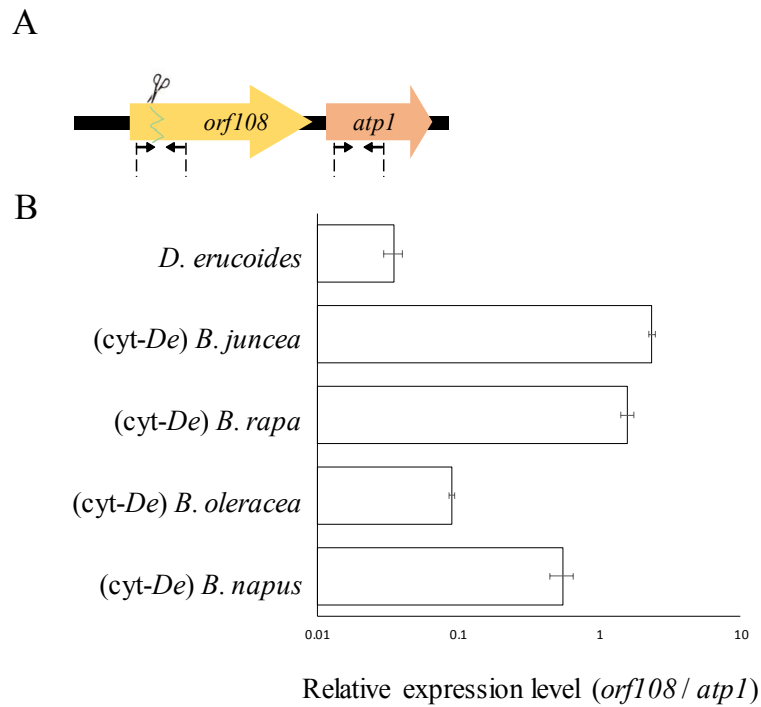


Figure 2-14. Expression patterns of *orf108-atp1* region in buds of the (cyt-De) *Brassica* species. (A) Schematic diagram of primer positions used for real-time PCR in *orf108-atp1*. The scissors indicate the estimated processing position in *orf108*. (B) Relative expression level of *orf108-atp1* region in the *D. erucoides*, the (cyt-De) *B. juncea*, the (cyt-De) *B. rapa*, the (cyt-De) *B. oleracea* and the (cyt-De) *B. napus* plants of semi sterility by Real Time RT-PCR analysis. The data show as means  $\pm$  SD and express logarithm (log 10).,  $n = 10$ .

#### 5. (cyt-De) 二基三倍体植物の葯発達および *orf108* の発現差解析

(cyt-De) *B. napus* 植物にみられる雄性可稔の分子機構の遺伝的根拠を得るために、種子親に半不稔の (cyt-De) *B. napus* 植物を用いて、花粉親に *B. rapa* および *B. oleracea* の植物をそれぞれ用いて種間交雑を行ったところ、54 個体の二基三倍体植物 (AAC ゲノム) と 33 個体の二基三倍体植物 (ACC ゲノム) が得られた。

これらの二基三倍体植物の葯室数、花粉稔性および *orf108* の発現量を調査し、(cyt-De) *B. rapa*, (cyt-De) *B. napus* および (cyt-De) *B. oleracea* と比較した (Fig. 2-15 - 2-17)。1 花あたりの葯室数を計測したところ (Fig. 2-15)、(cyt-De) *B. rapa* 植物 (AA ゲノム) および二基三倍体植物 (AAC ゲノム) は、試験された全ての植物体で 1 花あたり 24 個の葯室数がみられ全ての葯室を形成した。一方、(cyt-De) *B. napus* 植物 (AACC ゲノム) および二基三倍体植物 (ACC ゲノム) は、それぞれ 1 花あたり平均 5 個および 4 個の葯室数みられ、葯室数の低下を示した。

(cyt-De) *B. rapa* 植物の花粉稔性は、全て発達不全の花粉粒であり、雄性不稔と評価した (Fig. 2-16)。一方、二基三倍体植物 (AAC ゲノム)、(cyt-De) *B. napus* 植物および二基三倍体植物 (ACC ゲノム) の花粉稔性は、それぞれ 39.4 %、77.8 % および 27.8 % を示した。花粉稔性と *orf108* の発現量との相関関係を求めたところ (Fig. 2-17)、二基三倍体植物 (AAC ゲノム) において *orf108* の発現量の低下が認められた個体は、雄性可稔を示した。

#### 第 4 節 考察

CMS は、近縁種の外来性オルガネラゲノムを導入することにより、アブラナ科作物やコムギ、タバコ、ヒマワリ、トウガラシなどのさまざまな作物においてみられる普遍的な現象である (Singh *et al.* 2010, Farbos *et al.* 2001, Liu *et al.* 2013, Meena *et al.* 2018)。また、CMS に影響を及ぼすミトコンドリアゲノムに存在する原因遺伝子と核ゲノムに存在する稔性回復遺伝子の相互作用は、多くの植物種において決定されている (Linke and Börner 2005, Chase 2007, Carlsson *et al.* 2008)。しかし、複数の核ゲノム背景において同一種のオルガネラゲノムによる花器形態の影響を比較した研究は数少ない。*Raphanus sativus*

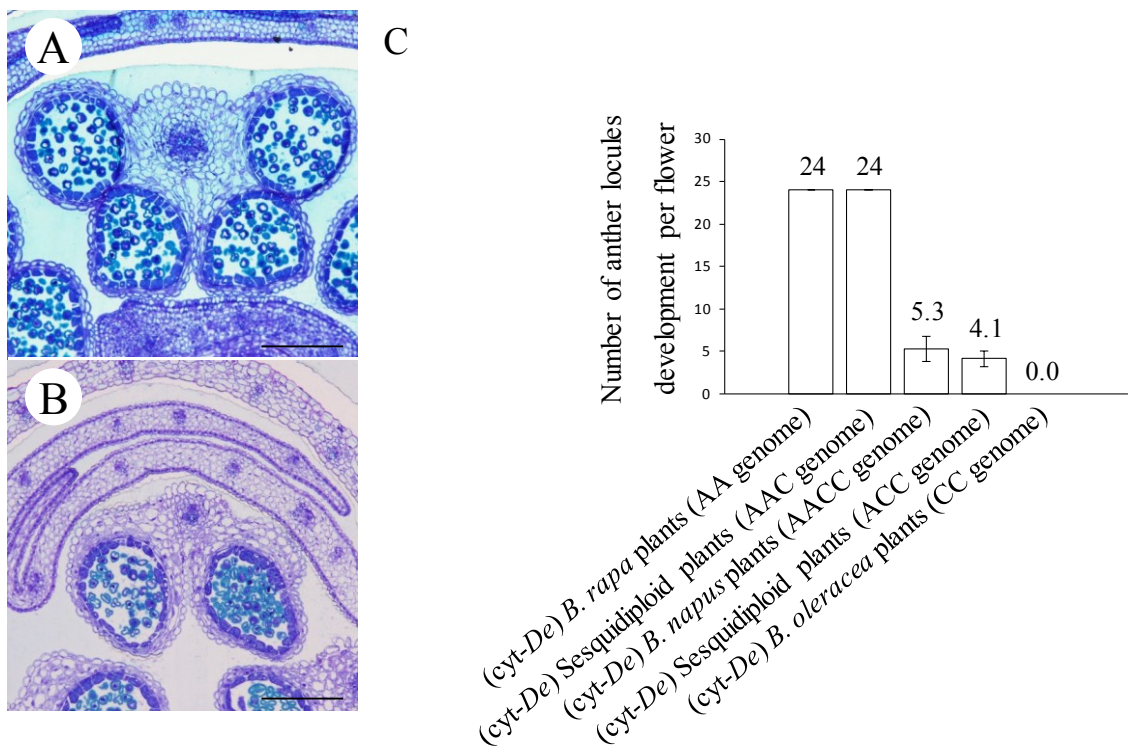


Figure 2-15. Anther locules development abnormality of the (cyt-De) sesquidiploid plants. (A, B) Anther development in the (cyt-De) Sesquidiploid plants (AAC genome) (A) and the (cyt-De) Sesquidiploid plants (ACC genome) (B). Scale bars: 200 μm. (C) Number of anther locules development per flower in each nuclear genomes. The data show as means ± SD,  $n = 10$ .

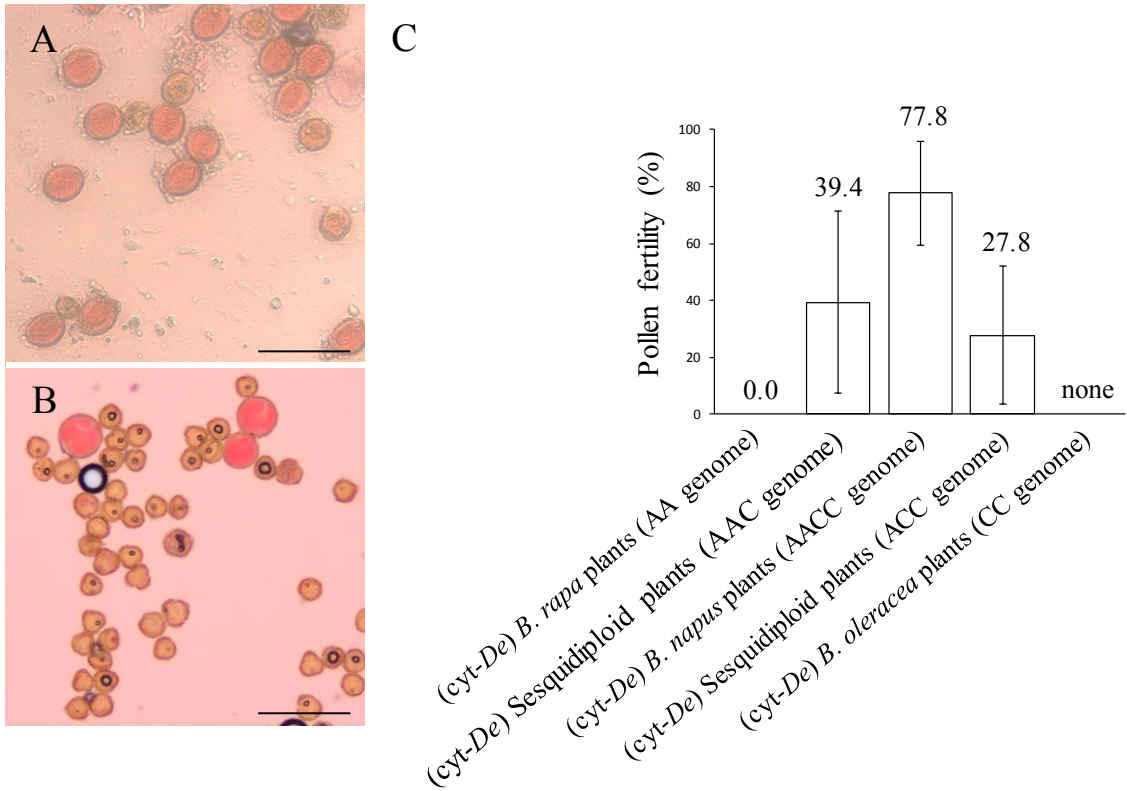


Figure 2-16. Pollen fertility of the (cyt-De) sesquidiploid plants. (A) Pollen fertility (54.2 %) of the (cyt-De) Sesquidiploid plants (AAC genome). (B) Pollen fertility (12.5 %) of the (cyt-De) Sesquidiploid plants (ACC genome). Scale bars: 100  $\mu$ m. (C) Pollen fertility in each nuclear genomes. The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 10$ .

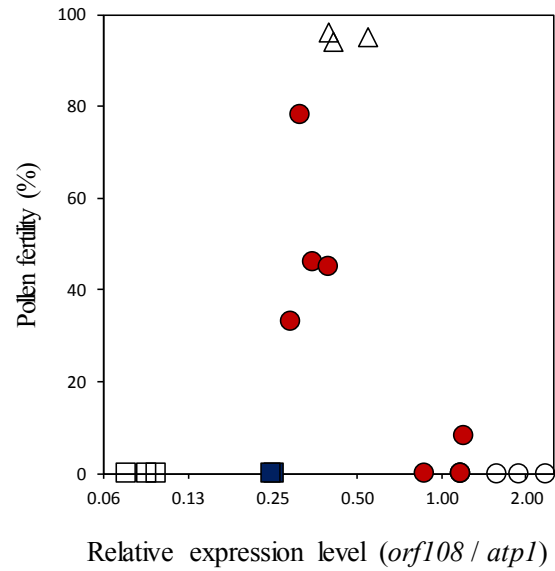


Figure 2-17. Correlation diagram between pollen fertility and expression pattern of *orf108-atp1* region in the (*cyt-De*) *Brassica* species. The red circles indicate the (*cyt-De*) sesquidiploid plants (AAC genome),  $n = 7$ . The blue squares indicate the (*cyt-De*) sesquidiploid plants (ACC genome),  $n = 2$ . The white circles indicate the (*cyt-De*) *B. rapa* plants (AA genome),  $n = 3$ . The white squares indicate the (*cyt-De*) *B. oleracea* plants (CC genome),  $n = 3$ . The white triangles indicate the (*cyt-De*) *B. napus* plants (ACC genome),  $n = 2$ . The data of relative expression level express logarithm ( $\log_{10}$ ).



における雄性不稔突然変異体として発見された *ogu* CMS は、*B. napus* 植物に導入されると雄性稔性は、四分子期において阻害される一方 (Gonzalez-Melendi *et al.* 2008, Yang *et al.* 2008), *B. juncea* 植物に導入されると、雄しべが花弁状の構造に変異する (Meur *et al.* 2006). また、*B. juncea* 植物における雄性不稔突然変異体として発見され、花粉嚢形成期に発達不全となるタイプの *hau* CMS は (Wan *et al.* 2015), *B. napus* 植物に導入されると、雄しべが花弁状の構造に変異する (Wan *et al.* 2008). これらのように、同一種の外来性オルガネラゲノムを複数の核ゲノムに導入したことに起因する花器形態の形態変異は報告されているが、分子機構との関連は報告されていない. 本章では 3 種のアブラナ科作物に *D. erucoides* のオルガネラゲノムを導入したことによる葯発達の影響を、葯の組織学的観察と雄性不稔の原因遺伝子である *orf108* の発現を定量することで特徴付けた. (cyt-De) *B. rapa* 植物は、葯室を形成するが、*orf108* がプロセッシングされないため機能不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプであり、(cyt-De) *B. oleracea* 植物は、*orf108* がプロセッシングされるが、それ以前に葯室が未分化で小孢子母細胞が形成されない雄性不稔タイプであった. それらの異質倍数体の (cyt-De) *B. napus* 植物は、部分的ながらも葯室を形成し、*orf108* 転写産物量の抑制により雄性稔性を寛解したことが明らかとなったことから、異質倍数化により葯室形成能と花粉稔性が相補され、雄性稔性が寛解されたと考えられた. *D. erucoides* における *orf108* と同一の塩基配列をもつ *M. arvensis* のオルガネラゲノムを導入した (cyt-Ma) *B. rapa* 植物は、機能不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプである一方 (筒井 2013), (cyt-Ma) *B. oleracea* 植物は、発達不全の雄しべをもつ雄性不稔タイプであり (Chamola *et al.* 2013a), それらの異質倍数体の (cyt-Ma) *B. napus* 植物は、雄性可稔を示した (未発表). (cyt-Ma) *Brassica* 栽培種における葯の組織学的観察と *orf108* の発現量の解析を試みる必要があるが、これらの先行研究は、異質倍数化により葯室形成能と花粉稔性が相補され、雄性稔性が寛解される現象を支持していると示唆された.

*B. napus* 植物における *pol* CMS は、部分的に葯室を形成し、その葯室形成の抑制は、ミトコンドリアゲノムにコードされている *orf224/atp6* により引き起こされるミトコンドリアのエネルギー欠乏が起因するミトコンドリアゲノムから

核ゲノムへの逆行性調節シグナルによって、孢子形成に関連する遺伝子を負に調節することでもたらされる (An *et al.* 2014). また, *B. juncea* 植物における *hau* CMS 系統の葯は, 葯室の形成不全がみられ, その形成不全は, 胞原細胞形成期において ORF288 が逆行性調節シグナルとして, 初期の葯発達に関連する遺伝子を負に調節し (Heng *et al.* 2018), ミトコンドリアのエネルギー供給に関与するタンパク質の蓄積を減少させることでもたらされる (Heng *et al.* 2019). これらのことから, (*cyt-De*) *B. oleracea* 植物における葯室形成能の欠如または (*cyt-De*) *B. napus* 植物における部分的な葯室形成は, ミトコンドリアゲノムにコードされている何らかの遺伝子による逆行性調節シグナルが孢子形成に関連する遺伝子を負に調節し, 葯室形成を阻害または抑制することでもたらされると示唆された.

(*cyt-De*) *B. napus* 植物における雄性稔性の遺伝様式解析により, (*cyt-De*) *B. napus* 植物は, 配偶体支配雄性不稔であることが明らかとなった (Table 2-4). *M. arvensis* 由来の稔性回復遺伝子は, (*cyt-De*) *B. juncea* 植物において配偶体的に振舞うことから (Bhat *et al.* 2006), *orf108* は配偶体形成段階で作用することが示唆された. いくつかの CMS タンパク質は, ミトコンドリアのエネルギー欠乏をもたらすことで, 小孢子形成期におけるプログラム細胞死シグナルにより配偶体支配雄性不稔を誘発する一方で, その雄性不稔性の回復には, DNA, mRNA, タンパク質または代謝レベルなどの異なる分子機構を介して, 核ゲノムに存在し PPR タンパク質をコードする稔性回復遺伝子により, CMS タンパク質の有害な影響を排除することによりもたらされることが明らかとなっている (Chen and Liu 2014). (*cyt-De*) *B. rapa* 植物は, *orf108* をプロセッシングする能力ををもたない一方, (*cyt-De*) *B. oleracea* 植物は, mRNA レベルで *D. erucoides* とは異なる分子機構により *orf108* をプロセッシングする能力をもつことから (Fig. 2-13), PPR タンパク質をコードすると考えられる稔性回復遺伝子は, A ゲノムではなく C ゲノムに存在することが示唆された. また, C ゲノムをもつ (*cyt-De*) *B. oleracea* 植物と (*cyt-De*) *B. napus* 植物間ではプロセッシング程度が異なることが明らかとなった (Fig. 2-14). これらのことから (*cyt-De*) *B. napus* 植物では, 約 65 % の *orf108* 転写産物量に分解されることによって雄性稔性が寛解されたと示唆された. これらを明らかにするためには, (*cyt-De*)

*Brassica* 栽培種における ORF108 の蓄積量の比較および稔性回復遺伝子の同定を試みる必要がある。

(*cyt-De*) *B. napus* 植物にみられる雄性可稔の分子機構における遺伝的根拠を得るために、二基三倍体植物を作出し、蒴の組織学的観察と *orf108* の発現を定量した (Fig. 2-15 - 17)。蒴室形成能は、A ゲノムが含まれる植物体において蒴室が形成されたことから (Fig. 2-15)、A ゲノムが担っており蒴室数は A ゲノムと C ゲノムのゲノム比に依存することが示唆された。花粉稔性の制御は、A ゲノムおよび C ゲノムをもつ植物体で花粉稔性がみられたことから (Fig. 2-16)、C ゲノムが担っており、C ゲノムをもつ植物体は、A ゲノムにより蒴室が形成されると、花粉稔性を回復することが示唆された。また、(*cyt-De*) 二基三倍体植物の花粉稔性は、同質細胞質をもつ二基三倍体植物 (ACC ゲノム) においても減数分裂時の対合の不均衡により花粉稔性のばらつきがみられることから (Lee and Namai 1992, Kaneko and Bang 2014, Yang *et al.* 2017)、対合の不均衡により花粉稔性がばらつくと考えられた。二基三倍体植物 (AAC ゲノム) において *orf108* のプロセッシングが認められた植物体では、花粉稔性が高い値を示したことから (Fig. 2-17)、*orf108* に依存する稔性回復は、C ゲノムに存在することが示唆された。

以上の結果から、(*cyt-De*) *B. napus* 植物にみられる雄性稔性の寛解は、A ゲノムと C ゲノム間の異質倍数化によって、A ゲノムにおける蒴室形成能と C ゲノムにおける *orf108* の抑制による花粉稔性の回復によりもたらされることが明らかとなった。本章から異質倍数化によって CMS を寛解するという新たな知見が提起された。

### 第 3 章

#### *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつ *Brassica napus* における

#### バイオマス向上の分子機構の解明と実用化

##### 第 1 節 緒言

同一種内における近交系統間の交雑により得られた一代雑種 ( $F_1$ ) 個体が両親より優れた形質を示す雑種強勢 (ヘテローシス) という生物学的現象が植物種などでみられ (Yang *et al.* 2017), 雑種強勢は,  $F_1$  種子を採種する  $F_1$  育種においてアブラナ科作物を含むさまざまな作物や野菜で利用されている (Fujimoto *et al.* 2018). アブラナ科作物は強い雑種強勢を示すなか, 油糧作物である *B. napus* や *B. juncea* は, 種子収量に関して雑種強勢を示し (Fu *et al.* 1990, Jain *et al.* 1994), キャベツを含む *B. oleracea* などの葉茎菜類も高い雑種強勢を示す (Tanaka and Niikura 2006). これらの雑種強勢を得ることを目的とした品種改良は, 核ゲノム内に着目し行われてきた. しかし, 近年の急速な人口増加や気候変動などの問題に対応するために, 食糧やバイオエネルギーの需要が年々高まっていることから (Haberl *et al.* 2011), 作物における更なる収穫量の増産が見込める新たな育種法が求められている.

外来性オルガネラゲノムの導入によって引き起こされる植物体の増大は, コムギ, トウモロコシ, イネなどの穀物やシロイヌナズナにおいて観察されている (Soltani *et al.* 2016, Allen 2005, Wang *et al.* 1998, Moison *et al.* 2010, Roux *et al.* 2016). 植物の進化の過程において, 多くのオルガネラ遺伝子は核ゲノムへ移行したことで (Timmis *et al.* 2004, Bock and Timmis 2008), オルガネラの発達や活性化は, 核ゲノムからオルガネラゲノムへと移行する順行性調節シグナルに調節される. 核ゲノムにコードされているペントトリコペプチドリポート (PPR) タンパク質は, オルガネラゲノム内の標的 mRNA と結合し (Barkan and Small 2014), PRORP1 (proteinaceous RNase P) の働きにより, tRNA 様の二次構造をもつ標的 mRNA が切断され (Gobert *et al.* 2010, Gutmann *et al.* 2012), ミトコンドリアゲノム内での切断により花器形態などに影響を及ぼし (Fujii *et al.* 2016), 葉緑体ゲノム内での切断により葉緑体の機能や光合成活性に影響を及ぼす (Zhou *et al.* 2015). また, 一部の葉緑体で発現する遺

伝子は、葉緑体ゲノムから核ゲノムへのシグナルである逆行性調節シグナルとして働き、多くの核遺伝子の発現を調節し (Jarvis and López-Juéz 2013)、ストレス応答として光合成と収量に影響を及ぼす (Chan *et al.* 2016)。これらの核ゲノムとオルガネラゲノムとが協調的に働く調節機構は、光や温度などの環境要因や内在性ホルモンシグナルへの応答を果たすことから、核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークが品種改良に貢献する可能性があり、品種改良における外来性オルガネラゲノムの影響を解明するためには、さらなる研究が必要である。

アブラナ科近縁野生種である *D. erucooides* のオルガネラゲノム (*cyt-De*) を導入した *B. rapa* (Peng *et al.* 2015)、*B. oleracea* (Fujita *et al.* 2018) および *B. juncea* (Malik *et al.* 1999) は、それぞれの同質細胞質系統と比較して植物体の増大や葉面積の増大、種子サイズの増大が観察され、*D. erucooides* のオルガネラゲノムの導入は、*Brassica* 栽培種において農業的有用形質に変異を有することが示唆された。オルガネラゲノムによる形質変異は、核ゲノムによる形質変異を極力なくすために、近交系統間の正逆交雑後代の植物体間の形質変異を比較する必要があるが (Kihara 1982)、(*cyt-De*) *B. rapa* 系統、(*cyt-De*) *B. oleracea* 系統および (*cyt-De*) *B. juncea* 系統は、雄性不稔性を示すことからこれらの同質細胞質系統との正逆交雑が行えず、オルガネラゲノムを比較する研究に適さない可能性があった。一方、第 2 章の結果から (*cyt-De*) *B. napus* 系統は雄性可稔を示し、正逆交雑が可能であることから、オルガネラゲノムによる形質変異を探索するのに適した系統と考えられた。そこで、本章では、外来性オルガネラゲノムの導入による農業的有用形質の変異を明らかにするために、(*cyt-De*) *B. napus* 系統と *B. napus* 系統との正逆交雑により得られたオルガネラゲノムが異なる 2 系統を用いて、生育特性調査、葉の内部構造の観察、トランスクリプトーム解析、葉緑体と光合成特性調査および収量性調査を試みた。

## 第 2 節 材料および方法

### 1. 供試材料

供試材料は、第 2 章で用いた (*cyt-De*) *B. napus* ‘BN502’ と *B. napus* ‘BN502’ のそれぞれの自殖後代を正逆交雑することにより得られたオルガネラゲノムが

異なる *B. napus* 系統を用いた (Fig. 3-1).

## 2. 葉の生育特性調査およびバイオマスの測定

バーミキュライトを充填した 2 号ポットに発芽した種子を移植し、環境が制御された人工気象器 (LPH-241, 日本医化機器製作所, 大阪, 日本, 明期 14 時間 23 °C, 暗期 10 時間 20 °C, 光度 40 klx) において生育させ、移植後 10, 20 および 30 日目の植物体の総葉面積, 地上部新鮮重, 地上部乾燥重および葉緑素計 SPAD-502 Plus (コニカミノルタ, 東京, 日本) を用いて葉の葉緑素含量を示す SPAD 値を計測した. 総葉面積を計測するために, 植物体の全ての葉を透明なフォルダーに挟んで平らにし, スキャナー (CanoScan LiDE 400, Canon Inc., 東京, 日本) を使用して撮影した. その画像から, 画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて総葉面積を計測し (Schneider *et al.* 2012), 平均値と標準偏差を計算した. 地上部新鮮重は, 規定日に収穫された植物体の地上部を直ちに測定し, 地上部乾燥重は, 地上部新鮮重を測定した植物体を速やかに 80 °C のオーブンで少なくとも 7 日間乾燥させ測定した.

## 3. 葉の内部構造の観察

採取した葉を 5.0 mm<sup>2</sup> にトリミングした後, 第 2 章の方法 (第 2 章 材料および方法 2. 葯発達の組織学的観察を参照) と同様の方法で樹脂切片法を行い葉の横断切片を作製し, 光学顕微鏡下で葉の内部構造を観察した. 柵状組織および海綿状組織の面積, 垂層面方向における表皮細胞間の細胞数は, 画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて計測した. 系統あたり 5 個体の完全展開葉各 10 枚を固定し, 観察および計測を行った.

## 4. 葉緑体合成阻害剤試験

1/2 MS 寒天培地, NZ アミン (0.5g/l) およびスクロース (30 g/l) を混合した混合培地を平面に充填した PLANT CULTURE BOX (100 mL, BBJ Hi-Tech Co., Ltd., 埼玉, 日本) のプラントボックス内に 70 %エタノール (w/v) で数秒, 有効塩素 0.5 %次亜塩素酸ナトリウム溶液 (w/v) で 20 分振とうによる滅菌処理を施した種子をクリーンベンチ内において無菌播種し, 環境が制御された人工

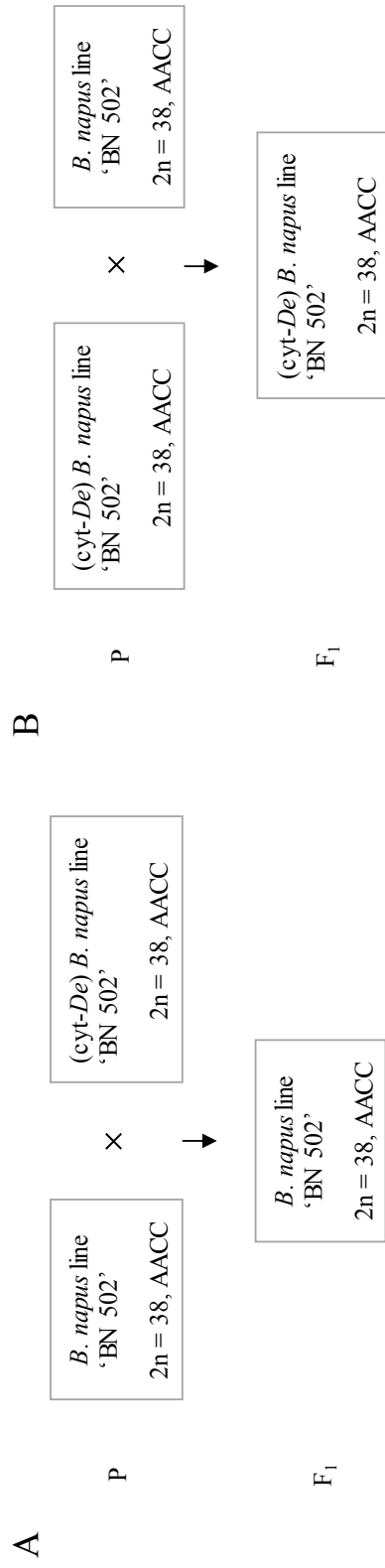


Figure 3-1. Scheme for development to the *B. napus* lines carrying different organelar genomes by reciprocal crosses method. (A,

B) Scheme for development to the euplasmic *B. napus* 'BN502' (A) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (B).

気象器 (LPH-241, 明期 14 時間 23 °C, 暗期 10 時間 20 °C, 光度 40 klx) において植物体を 3 日間生育させ, 0.05  $\mu$ M のカロテノイド生合成阻害剤ノルフルラゾン (AccuStandard Inc., USA), 1/2 MS 寒天培地, NZ アミン (0.5g/l) およびスクロース (30 g/l) を混合した混合培地を平面に充填したプラントボックス内に移植し, 同様に人工気象器内において植物体を生育させ, 生育特性の調査および葉の内部構造の観察を行った.

#### 5. RNA シーケンスおよびデータ処理

本葉の Total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて単離し, DNase I を用いて, ゲノム DNA を処理した. TruSeq Stranded Total RNA Library PrepPlant (illumina, San Diego, USA) を用いて, ライブラリーの作製を行った. その際に, mRNA クリーンアップには RNA Clean XP beads (Beckman, Brea, USA), cDNA 合成後の集積ビーズに ProNex Size-Selective Purification System (Promega, Madison, USA) を用いた. ライブラリーのクオリティチェックは, Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) および LightCycler® 480 System (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて行い, 基準値を満たしたライブラリーを選抜した. シーケンスは, MiSeq (illumina) を用いて行った. 得られたリードのクオリティチェックおよびアダプター配列の除去を Trimmomatic を用いて行い (Bolger *et al.* 2014), Trinity によってアセンブリーを行った. SILVA のデータベースを用いて rRNA の検索と除去を行った後, マッピング, 発現量の計測および発現変動解析には, それぞれ bowtie, RSEM および edgeR のソフトウェアを用いて行った (McDermaid *et al.* 2018).  $\log_{2}FC < -1$  を示した遺伝子をダウンレギュレート,  $\log_{2}FC > 1$  を示した遺伝子をアップレギュレートした発現変動遺伝子として評価した. その後, ソフトウェア TransDecoder を用いて, ORF 抽出および Pfam 検索を行った後, タンパク質のコード領域の推定し, 遺伝子オントロジー (gene ontology: GO) 解析 ( $P$  値  $< 0.005$ ) によりアノテーション解析を行った. 供試数は, Lamarre *et al.* (2018) に基づき設定した.



## 6. Real Time PCR 解析

第 1 章と同様の方法(第 1 章 材料および方法 4. ゲノム DNA 抽出を参照)により抽出したゲノム DNA を Real Time PCR 解析の検量線およびサンプルとして用いた. Real Time PCR 解析は, FastStart Essential DNA Green Master および *ubiq* (B. rapa\_ubiq\_fwd - B. rapa\_ubiq\_rev), *rbcL* (B. rapa\_rbcL\_fwd - B. rapa\_rbcL\_rev), *atpA* (B. rapa\_ubiq\_fwd - B. rapa\_ubiq\_rev) の 3 種のプライマーペアを用い (Table 3-1), LightCycler® 96 System により行った. Real Time PCR 解析は, 各系統 8 個体を用いた.

## 7. 光合成特性調査

光合成測定は, 植物光合成総合解析システム LI-6800 (Li-COR, Inc., Nebraska, USA) を用いて行った. リーフチャンバーの開口部が 2 cm<sup>2</sup> になるアタッチメントを取り付け, リーフチャンバー内の測定環境を流量 300 μmol s<sup>-1</sup>, 相対湿度 60 %, Fan 速度 1000 rpm, 葉温 20-25 °C, CO<sub>2</sub> 濃度 400 ppm の一定条件に設定し, 光量条件を段階的に 500, 800, 1000, 1500, 1800, 500, 300, 200, 100, 60, 40, 20, 10 および 0 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> に設定し, それぞれの光量条件における光合成速度 (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) を計測した. 光合成速度の計測は, 設定条件や光合成速度が十分に安定したところでマッチングを行い, 再び安定したところで Log を記録した. Log データより葉が受ける光量子密度と光合成速度データを抽出することで光-光合成曲線を作成し, 光量子束密度 (μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) おける光合成速度を算出した. 測定には完全に展開した葉を用い, 各系統 10 個体の測定を行った.

## 8. 収量特性調査

宇都宮大学植物育種学研究室所有の畑に畝 (畝幅 180 cm, 畝高 20 cm) を 4 列作り黒マルチで被覆した. 2 号ポットで 20 日間生育させた植物体を 1 列あたり 16 個体を株間 60 cm で移植し, 慣行に従い植物体を生育させた. 放任受粉により受粉させ, 全ての植物体が開花した 1 ヶ月後に収量性調査を行った. 測定項目は, Chao *et al.* (2019) を基に 13 項目とした. 胚珠数は, 受粉後 2 日程度の子房をサンプリングし, 実体顕微鏡下で計測した. 収穫直後に各系統 10

Table 3-1. Primers used in Chapter 3.

<b>Purpose</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>
qPCR	<i>B. rapa</i> _ubiq_fwd	GAGGTGGAGAGCAGTGCAC
	<i>B. rapa</i> _ubiq_rev	CCAAAGCCATCAAAGACGGC
	<i>B. rapa</i> _rbcL_fwd	GTGTTGGATTCAAAGCTGGT
	<i>B. rapa</i> _rbcL_rev	GTGGAACTCCGGGTTGAGGA
	<i>B. rapa</i> _atpA_fwd	GAAAGTTTTTCGAAAGACGA
	<i>B. rapa</i> _atpA_rev	CAATGACTTTGTTAGGGTTA

個体における草丈 (cm), 第一分枝数, 第二分枝数, 第三分枝数, 地上部新鮮重 (g) を計測した. 長角果の長さ (cm) は, 各系統 10 個体で 1 個体あたり 10 莢を計測した. 慣行に従い, 植物体を 1 ヶ月乾燥させ, 各系統 5 個体における地上部乾燥重 (g), 1 莢あたりの種子数, 1 莢あたりの種子重量 (g), 1,000 粒重 (g) を計測した. 結実率 (%) は, 1 莢あたりの種子数 / 胚珠数  $\times$  100, 含水量は, 地上部新鮮重 / 地上部乾燥重により算出した.

### 第 3 節 実験結果

#### 1. (cyt-De) *B. napus* 系統における種子形態および生育特性調査

核ゲノムに由来する形質変異を均一化し, オルガネラゲノムに由来する形質変異を明らかにするために, (cyt-De) *B. napus* 'BN502' 系統と *B. napus* 'BN502' 系統との正逆交雑により得られた F<sub>1</sub> 植物体を作成し, それらの植物体の種子形態および生育特性調査を行った. (cyt-De) *B. napus* 系統の種子は, *B. napus* 系統と比較して 100 粒重が重く, 種子の大粒化を示した (Fig. 3-2A, B). また, (cyt-De) *B. napus* 系統の播種後 7 日目における出芽率は 95 %を示し, 出芽力が高いことが明らかとなった (Fig. 3-2C). (cyt-De) *B. napus* 系統の生育特性を調査するために, 移植後 10 日目, 20 日目および 30 日目における葉の表面積および地上部乾燥重の計測を行った. その結果, (cyt-De) *B. napus* 系統における葉の表面積は, 計測した全ての時点で *B. napus* 系統より有意に高い値を示した (Fig. 3-2D - G). さらに, (cyt-De) *B. napus* 系統における地上部乾燥重も計測した全ての時点で *B. napus* 系統より有意に高い値を示した (Fig. 3-2H). これらのことから, *B. napus* 系統において *D. erucoides* のオルガネラゲノムの導入によりバイオマス向上がみられた.

#### 2. (cyt-De) *B. napus* 系統における葉の内部構造変異

*D. erucoides* のオルガネラゲノムの導入によるバイオマス向上の要因を明らかにするために, 移植後 30 日目の植物体における本葉の横断切片を作製し, 葉の内部構造の観察を行った (Fig. 3-3A). その結果, (cyt-De) *B. napus* 系統の柵状組織は, *B. napus* 系統より葉肉細胞の大きさが有意に大きくなった一方で (Fig. 3-3B), 海綿状組織は, 同程度の値を示した (Fig. 3-3C). また, 垂層面

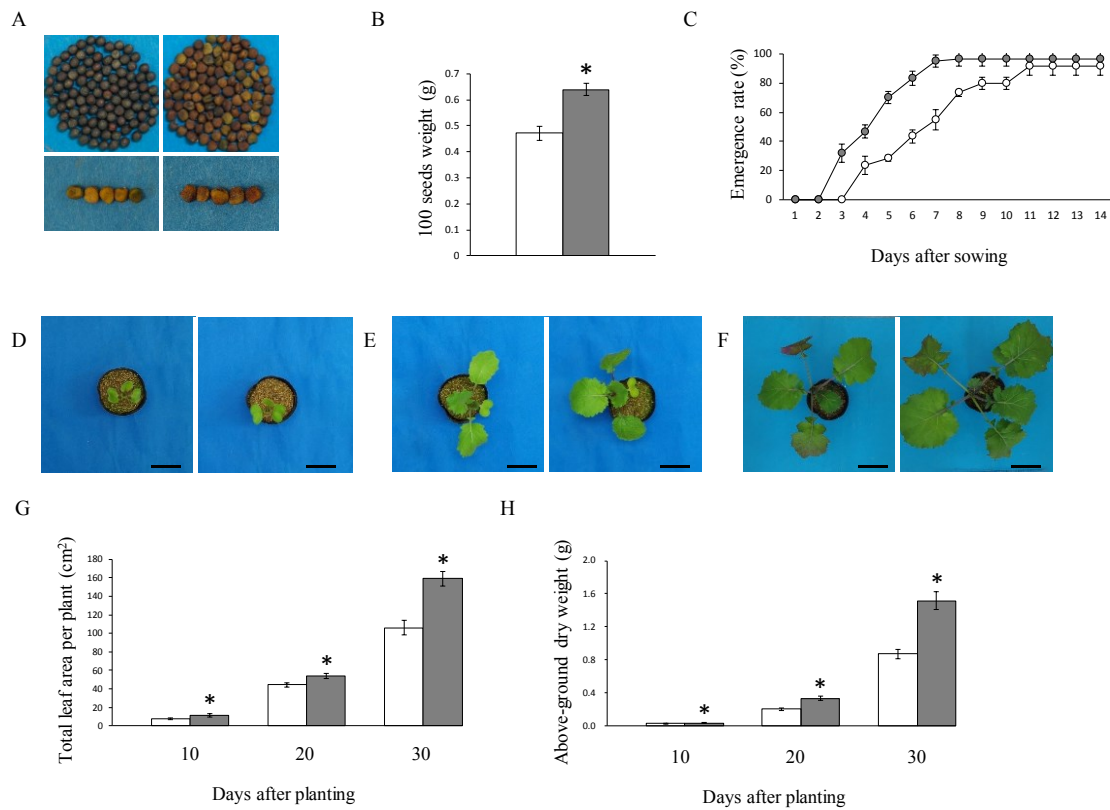


Figure 3-2. Seed morphological and growth characteristics of the (*cyt-De*) *B. napus* plant. (A) Images of 100 seeds of the euplasmic *B. napus* 'BN502' (left) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (right). (B) 100 seeds weight in the euplasmic *B. napus* 'BN502' (white) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (gray). (C) Emergence rate (%) of the euplasmic *B. napus* 'BN502' and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502'. The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 60$ . (D - F) Images of whole plant of the euplasmic *B. napus* 'BN502' (left) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (right) at 10 days after planting (D), 20 days after planting (E) and 30 days after planting (F). Scale bars: 50 mm in (D - F). (G) Total leaf area per plant in the euplasmic *B. napus* 'BN502' (white) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (gray). (H) Above-ground dry weight (g). The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 15$  in (G, H). Significant differences ( $p < 0.005$ ) between the euplasmic *B. napus* 'BN502' and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' are indicated by \* in (B, G, H).

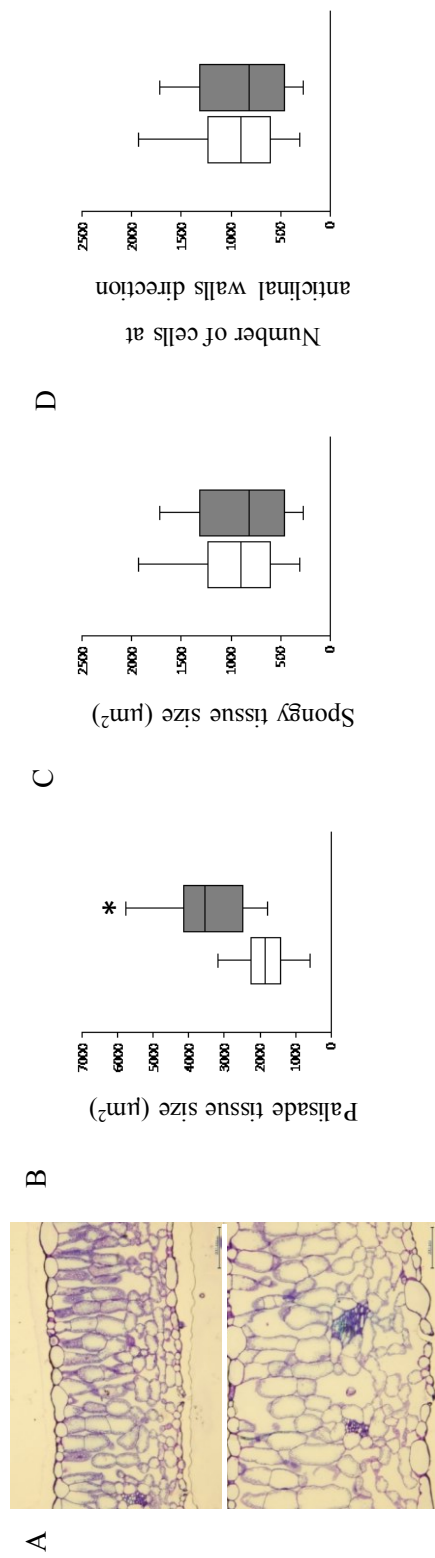


Figure 3-3. Phenotype features of leaves of the (cyt-De) *B. napus* plant. (A) Images of lateral cross-over on the sixth leaf from the euplasmic *B. napus* 'BN502' (upper) and the (cyt-De) *B. napus* 'BN502' (lower). (B) Palisade tissue size of the euplasmic *B. napus* 'BN502' (white) and the (cyt-De) *B. napus* 'BN502' (gray),  $n = 50$ . (C) Spongy tissue size,  $n = 50$ . (D) Number of cells at anticlinal walls direction,  $n = 50$ . Scale bars: 100  $\mu\text{m}$  in (A). Significant differences ( $p < 0.005$ ) between the euplasmic *B. napus* 'BN502' and the (cyt-De) *B. napus* 'BN502' are indicated by \* in (B - D).

方向における表皮細胞間の細胞数は、同程度の値を示したことから (Fig. 3-3D), (cyt-De) *B. napus* 系統は、柵状組織の肥大により、葉が厚くなったことが示唆された。

### 3. (cyt-De) *B. napus* 系統における葉緑体合成阻害剤によるバイオマス向上の抑制

カロテノイド生合成阻害剤である Norflurazon を用いて、葉緑体の働きを抑制した環境下で生育試験を行った (Fig. 3-4). 無処理区において (cyt-De) *B. napus* 系統は、*B. napus* 系統より総葉面積と地上部乾燥重がともに高い値を示した一方で (Fig. 3-4A, C, D), 0.05  $\mu$ M Norflurazon 処理区において総葉面積と地上部乾燥重がともに *B. napus* 系統と同程度の値を示した (Fig. 3-4B - D). 葉の内部構造の観察した結果、無処理区において (cyt-De) *B. napus* 系統の柵状組織の肥大がみられた一方で、Norflurazon 処理区において *B. napus* 系統と同程度の値を示した。これらのことから、(cyt-De) *B. napus* 系統は、カロテノイド生合成阻害剤によって葉緑体活性は抑制されるとバイオマス向上が打ち消されることが明らかとなり、(cyt-De) *B. napus* 系統のバイオマス向上は、葉緑体活性に起因することが示唆された。

### 4. (cyt-De) *B. napus* 系統における発現差異遺伝子の同定

(cyt-De) *B. napus* 系統においてバイオマス向上がみられた播種後 10 日目の葉から Total RNA を抽出し、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、(cyt-De) *B. napus* 系統において *B. napus* 系統と発現量が異なる遺伝子として、461 個の上方制御された遺伝子と 3943 個の下方制御された遺伝子を見出した (Fig. 3-5)。これらの遺伝子について GO 解析によるアノテーション解析を行った結果、ATP 関連遺伝子群、光合成関連遺伝子群が上方制御され、ジアシルグリセロール O-アシルトランスフェラーゼ活性やマグネシウム-キラターゼ活性に関連する遺伝子群や細胞内タンパク質輸送に関連する遺伝子群が下方制御される傾向がみられた (Table 3-2)。

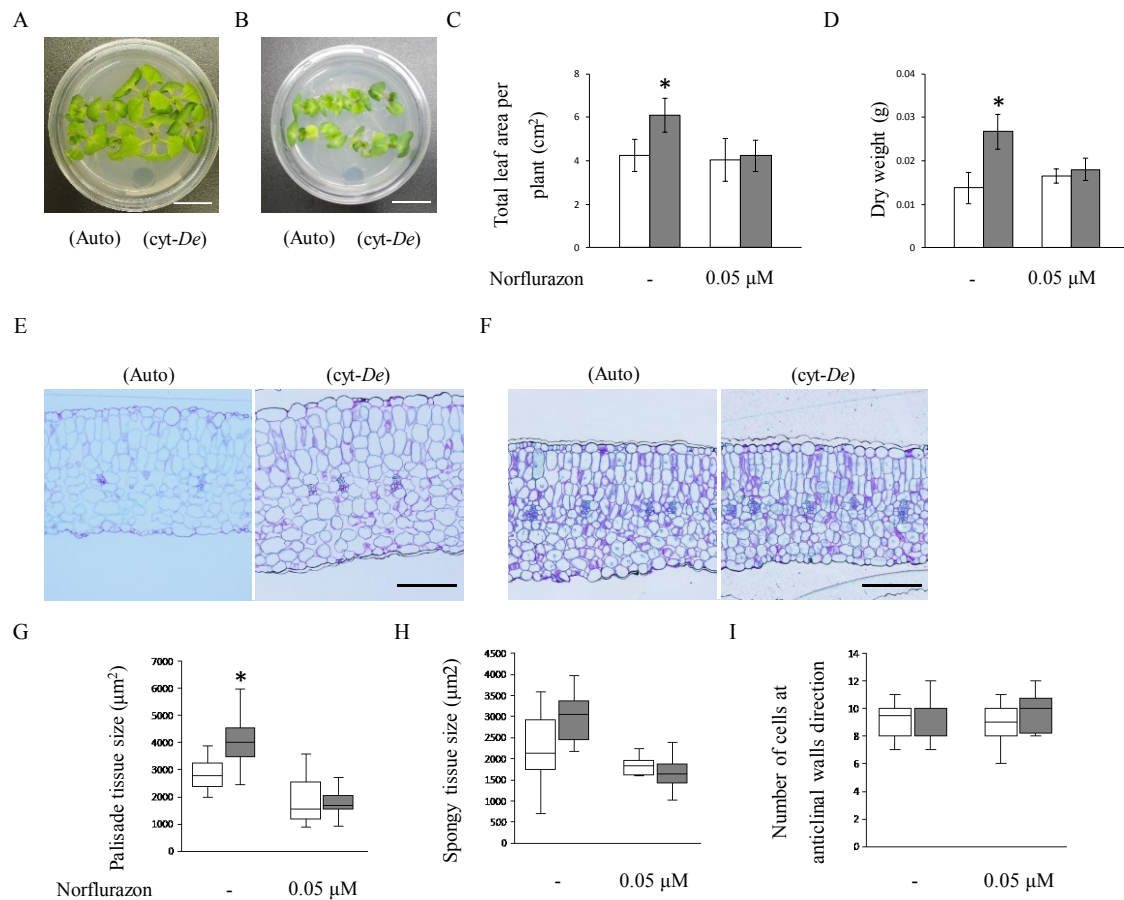


Figure 3-4. Loss of biomass improvement following treatment with norflurazon to inhibit phytoene desaturase in the (*cyt-De*) *B. napus* plant. (A) Images of each four plants of the euplasmic *B. napus* ‘BN502’ (left) and the (*cyt-De*) *B. napus* ‘BN502’ (right) at seven days after sowing (DAS) without norflurazon. (B) Images of each four plants at seven DAS with 0.05  $\mu\text{M}$  norflurazon. Scale bars: 20 mm in (A, B). (C) Total leaf area per plant at seven DAS in the euplasmic *B. napus* ‘BN502’ (white) and the (*cyt-De*) *B. napus* ‘BN502’ (gray). (D) Above-ground dry weight (g) at seven DAS. The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 16$  in (C, D). Significant differences ( $p < 0.05$ ) between the euplasmic *B. napus* ‘BN502’ and the (*cyt-De*) *B. napus* ‘BN502’ are indicated by \* in (C, D). (E) Lateral cross-over Images of cotyledon at seven DAS without norflurazon. (F) Lateral cross-over Images of cotyledon at seven DAS with 0.05  $\mu\text{M}$  norflurazon. Scale bars: 200  $\mu\text{m}$  in (E, F). (G) Palisade tissue size ( $n = 20$ ). (H) Spongy tissue size ( $n = 20$ ). (I) Number of cells at anticlinal walls direction ( $n = 20$ ). Significant differences ( $p < 0.001$ ) between the euplasmic *B. napus* ‘BN502’ and the (*cyt-De*) *B. napus* ‘BN502’ are indicated by \* in (G - I).

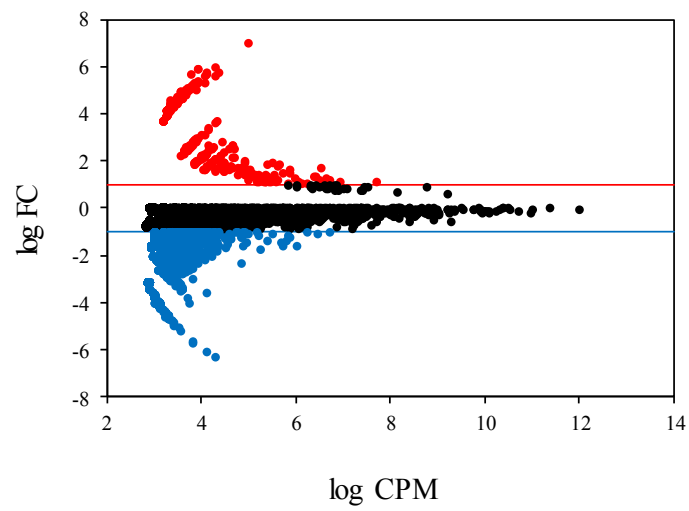


Figure 3-5. Differential expression analysis using RNA-seq of the (*cyt-De*) *B. napus* plant. (a) MA plot. ( $n = 3$ ). The red dots, the blue dots, and the black dots indicate up-regulated genes, down-regulated genes and undifferentiated expression genes, respectively.



Table 3-2. GO terms in biological process in differentially expressed genes of the (*cyt-De*) *B. napus* plants compared to euplasmic *B. napus* plants.

Up regulated	Down regulated
1 Oxidation-reduction process *	Diacylglycerol O-acyltransferase activity *
2 Regulation of photosynthesis *	type I hypersensitivity *
3 ATP binding *	Signal transduction *
4 ATP hydrolysis coupled transmembrane transport *	Magnesium chelatase activity *
5 ATP-dependent proteolysis **	Membrane *
6 ADP binding **	Cell adhesion *
7 NADP+ activity **	Nicotianamine biosynthetic process *
8 Polynucleotide adenylyltransferase activity **	Intracellular protein transport *
9 Adenylate kinase activity **	
10 Photosynthesis **	

\*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.005$

## 5. *D. erucoides* のオルガネラゲノムの導入による葉緑体活性および光合成活性への影響

(*cyt-De*) *B. napus* 系統においてバイオマス向上がみられた本葉を用いて (Fig. 3-6A, B), 葉緑体ゲノムにコードされている葉緑体 DNA (cpDNA) の *rbcL* および *atpA* について Real Time PCR 解析により, それらの cpDNA のコピー数を推定した (Fig. 3-6 C, D). その結果, (*cyt-De*) *B. napus* 系統において *rbcL* および *atpA* は, *B. napus* 系統より低い値を示した (Fig. 3-6C, D). 一方, 同時に葉緑素含量を示す SPAD 値を計測したところ, SPAD 値は, (*cyt-De*) *B. napus* 系統において高い値を示した (Fig. 3-6E).

バイオマス向上がみられた (*cyt-De*) *B. napus* 系統の光合成速度を測定し, 光-光合成曲線を作成した (Fig. 3-6F). その結果, 飽和光下における (*cyt-De*) *B. napus* 系統の光合成速度の最大値は, *B. napus* 系統より相対的に高い値を示す傾向がみられた.

## 6. (*cyt-De*) *B. napus* 系統における収量特性調査

(*cyt-De*) *B. napus* 系統における種子の収量性を特徴付けるために, 種子収量に関連する 13 形質について調査した (Fig. 3-7, Table 3-3). (*cyt-De*) *B. napus* 系統の収穫時における植物体の形質は, *B. napus* 系統と比較して第 1, 第 2 および第 3 分枝数において有意な差異はみられなかったが, 草丈, 地上部新鮮重および地上部乾燥重において有意に高い値を示し, 含水量は同程度の値を示したことから, (*cyt-De*) *B. napus* 系統は, 採種時においても植物体におけるバイオマス向上がみられた. また, (*cyt-De*) *B. napus* 系統の収穫時における種子に関連する形質は, 長角果の長さ, 1 莢あたりの胚珠数, 1 莢あたりの種子数, 1 莢あたりの種子重量および 1,000 粒重において有意に高い値を示し, 結実率は, 同程度の値を示したことから, (*cyt-De*) *B. napus* 系統は, 採種時においても種子形質におけるバイオマス向上がみられた.

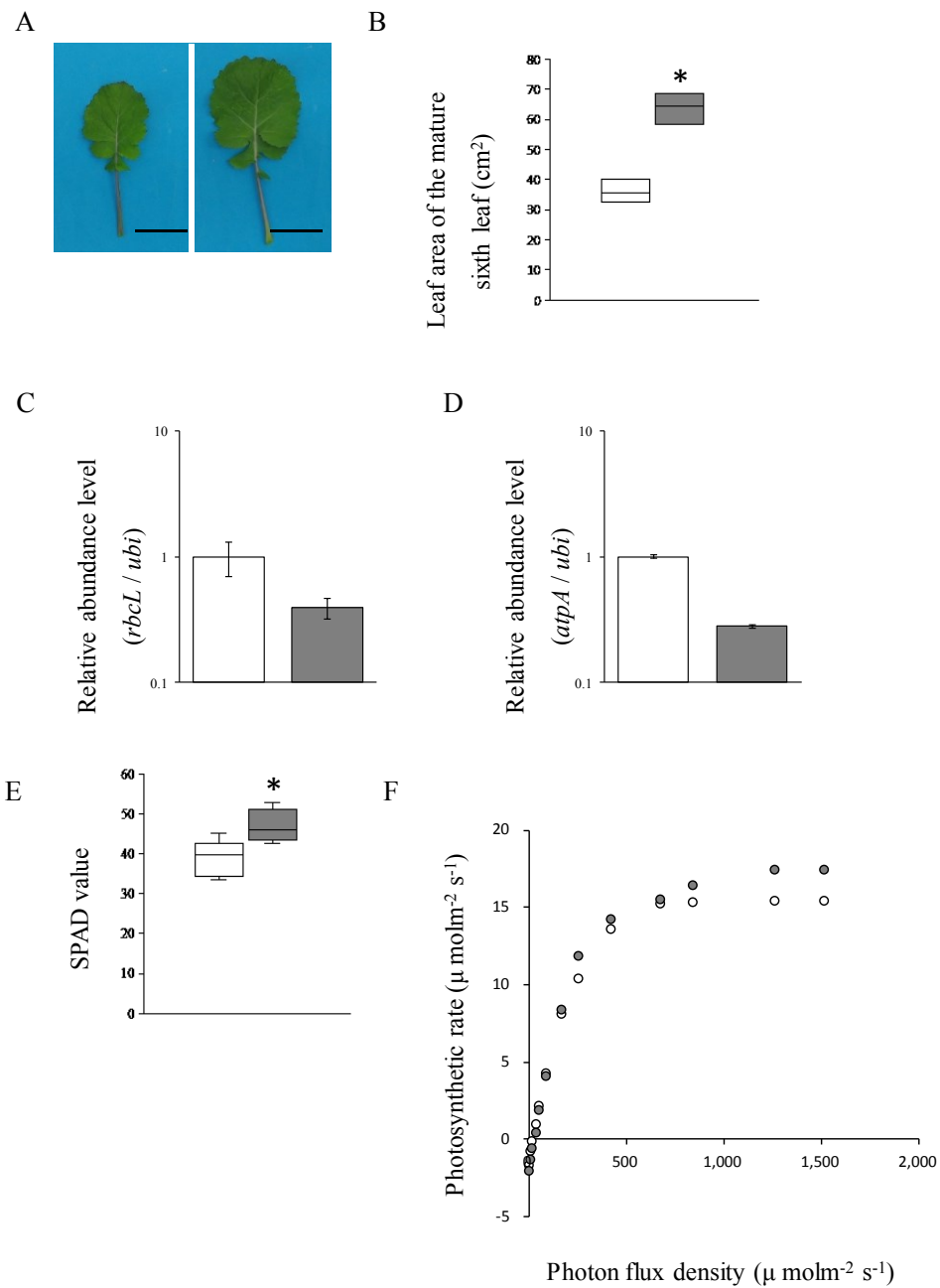


Figure 3-6. Chloroplasts and photosynthesis features of the (*cyt-De*) *B. napus* plant. (A) Images of the mature sixth leaf at 30 days after sowing from the euplasmic *B. napus* 'BN502' (left) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (right). Scale bars: 50 mm. (B) Leaf area of the mature sixth leaf in the euplasmic *B. napus* 'BN502' (white) and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' (gray) ( $n = 15$ ). (C, D) Relative abundance level of cpDNA of *rbcL* (C), *atpA* (D). The data show as means  $\pm$  SD,  $n = 8$ . (E) SPAD value. ( $n = 8$ ). (F) Light response curve of photosynthesis. Significant differences ( $p < 0.005$ ) between the euplasmic *B. napus* 'BN502' and the (*cyt-De*) *B. napus* 'BN502' are indicated by \* in (B-E).

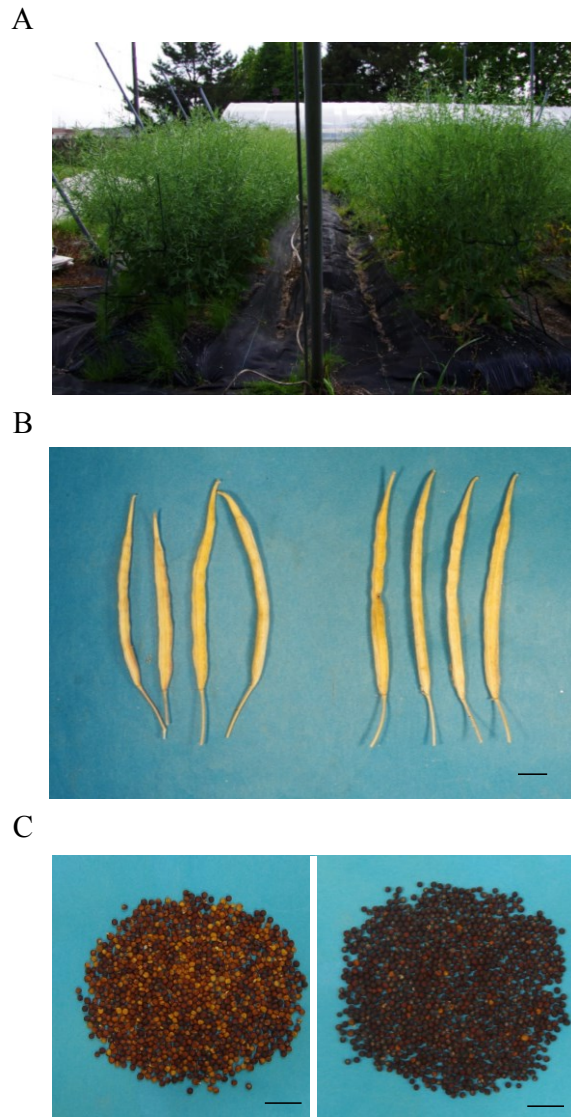


Figure 3-7. Phenotypic variation of the (cyt-*De*) *B. napus* plant in the field experiment. (A) Whole plants of the euplasmic *B. napus* 'BN502' (left) and the (cyt-*De*) *B. napus* 'BN502' (right) at harvesting time. (B) Siliques. (C) 1,000 seeds. Scale bars: 10 mm.

Table 3-3. Phenotypic statistics of the (cyt-De) *B. napus* plant in the field experiment.

Plants	Plant height (cm)	First branch number	Second branch number	Third branch number	Above-ground fresh weight (g)	Above-ground dry weight (g)	Water content
<i>B. napus</i>	175.5 ± 14.7	28.0 ± 3.7	144.2 ± 22.1	117.1 ± 18.5	2625 ± 210.4	672 ± 111	4.25 ± 0.64
(cyt-De) <i>B. napus</i>	199.0 ± 13*	29.8 ± 2.7	153.8 ± 19.3	124.8 ± 20.4	3053 ± 299.2*	932 ± 196*	3.61 ± 0.57

Plants	Silique length (cm)	Ovules number	Seeds number per silique	Seed setting (%)	Seeds weight per silique (g)	1,000 grain weight (g)
<i>B. napus</i>	8.4 ± 0.6	21 ± 2.3	15.9 ± 2.7	77.0 ± 7.0	0.059 ± 0.007	3.23 ± 0.15
(cyt-De) <i>B. napus</i>	10.8 ± 0.6*	26 ± 1.3*	22.3 ± 2.1*	85.6 ± 6.4	0.078 ± 0.015*	3.73 ± 0.17*

Significant differences ( $p < 0.05$ ) between the euplasmic *B. napus* and the (cyt-De) *B. napus* are indicated by \*.

#### 第 4 節 考察

植物において核ゲノムと葉緑体ゲノム間の至適化は、光合成の最適化に不可欠であり (Yeates *et al.* 2019), 核ゲノムと葉緑体ゲノムにコードされたタンパク質間における迅速かつ特異的な相互作用は、植物体の大きさを調節し、種子収量を向上させることから (Hikawa *et al.* 2019), 農業および再生可能エネルギー技術への応用が期待される。本章において、(cyt-De) *B. napus* 系統と *B. napus* 系統との正逆交雑を行い、オルガネラゲノムが異なる系統を作出したところ (Fig. 3-1), (cyt-De) *B. napus* 系統は、葉面積の拡大や柵状組織の肥大によりバイオマス向上に至ったが示唆された (Fig. 3-2, 3-3). (cyt-De) *B. rapa* や *B. oleracea* では、それぞれの同質細胞質系統と比較して葉面積の拡大が観察された一方で、(cyt-De) *Raphanus sativus* では、葉が黄化するクロロシスがみられ、葉面積の減少が観察された (藤田 2017). これらのことから (cyt-De) *B. napus* 系統でみられたバイオマス向上は、核ゲノムと葉緑体ゲノムとのクロストークに起因することが示唆された。

*Arabidopsis thaliana* や *Nicotiana tabacum* における多くの色素体関連遺伝子の変異体は、葉緑体形成の欠陥を示すだけでなく、柵状組織の発達を阻害し、色素体遺伝子の発現が転写レベルまたは翻訳レベルにおいて葉肉細胞の分化に関与することから (Hricová *et al.* 2006, Krech *et al.* 2012), 葉緑体と柵状組織の発達との因果関係が示唆されている (Wycliffe *et al.* 2005, Krech *et al.* 2012). また、*A. thaliana* において葉緑体ゲノムから核ゲノムへの逆行性調節シグナルである色素体遺伝子 *GUN1* が柵状組織の発達に関与することから (Tameshige *et al.* 2013), 本章で観察された柵状組織の肥大は、葉緑体ゲノムに由来する逆行性シグナルが関与していると示唆された。

陸上植物の葉緑体は、 $\beta$ -カロテン、ピオラキサンチン、ネオキササンチン、ルテインの 4 種類のカロテノイドを主成分とし、同じ生合成経路により合成されることから (Breitenbach *et al.* 2001), カロテノイド合成阻害剤 Norflurazon を用いた葉緑体阻害剤試験を行ったところ、(cyt-De) *B. napus* 系統における移植後 10 日目にみられる生育初期のバイオマス向上の効果が打ち消された (Fig. 3-4). *A. thaliana* において、生育初期に同じ化学薬剤を用いて葉緑体の活性を抑制すると、核ゲノム内に由来する雑種強勢が現れなくなることから (Fujimoto

*et al.* 2012), 移植後 10 日目以降の顕著なバイオマスの増大は, 生育初期の葉緑体の活性化が重要であると示唆された. 葉緑体は, 核ゲノムにコードされているタンパク質と葉緑体ゲノムにコードされているタンパク質の複合体により形成されることから (Zhou *et al.* 2015, Cole 2016), 葉緑体の活性化にはそれぞれのゲノム間の至適化が重要となる. *A. thaliana* や *B. rapa* における雑種強勢がみられた F<sub>1</sub> 植物体において葉緑体に移行するタンパク質をコードする遺伝子 (葉緑体ターゲット遺伝子) や光合成関連遺伝子が両親と比較して特異的に増加した (Fujimoto *et al.* 2012, Saeki *et al.* 2016). そこで, バイオマス向上がみられた (*cyt-De*) *B. napus* 系統においてトランスクリプトーム解析により網羅的に遺伝子の発現レベルを *B. napus* 系統と比較した結果 (Fig. 3-5), ATP 関連遺伝子群や光合成関連遺伝子群が *B. napus* 系統より上方制御される傾向がみられた (Table 3-2). *A. thaliana* において生育初期における光合成関連遺伝子の活性化と葉肉細胞の肥大により, 総葉面積の増大をもたらし, 雑種強勢によるバイオマス向上には光合成の活性化が中心的な役割を果たすことが示唆された (Fujimoto *et al.* 2012). これらのことから, (*cyt-De*) *B. napus* 系統において葉緑体ターゲット遺伝子や光合成関連遺伝子の発現量の増加が柵状組織の肥大に寄与する可能性が示唆された.

バイオマス向上がみられた (*cyt-De*) *B. napus* 系統の葉緑体活性を明らかにするために, (*cyt-De*) *B. napus* 系統における cpDNA のコピー数と葉緑素含量の計測を試みた. その結果, (*cyt-De*) *B. napus* 系統における cpDNA のコピー数は, *B. napus* 系統より少ないが (Fig. 3-6C, D), 葉緑素含量は, 多いことが明らかになった (Fig. 3-6E). *Sinapis turgida* のオルガネラゲノムを導入した *B. rapa* 系統では, 黄化した葉がみられ, その葉では cpDNA のコピー数が多いが, 葉緑素含量が少なく柵状組織が薄いことが観察されたことから (須永 2018), 外来性オルガネラゲノムが導入されたアブラナ科栽培種において葉緑体ゲノム数は, 葉緑体活性を測るバイオマーカーになり得る可能性が示唆された.

柵状組織の円柱状構造は, より深い細胞層への光の透過や CO<sub>2</sub> の拡散を促進することから (Terashima *et al.* 2006, Kume 2017), より長い円柱状構造の柵状組織をもつ (*cyt-De*) *B. napus* 系統は, 強光下において高い光合成能を有することが示唆された. また, *A. thaliana* においてより高い光強度が光合成とバイ

オマスの両方を増大することが明らかになっていることから (Fujimoto *et al.* 2012), 強光下における (cyt-De) *B. napus* 系統の光合成速度の計測を行った (Fig. 3-6F). (cyt-De) *B. napus* 系統の飽和光下における光合成速度は, *B. napus* 系統より高い値を示したことから, 高光強度下においてバイオマスをより向上させる可能性が示唆された. 本章では, (cyt-De) *B. napus* 系統においてバイオマス向上と光合成能との関与が示されたが, 効率的に光合成を行うには, 柵状組織の形状と葉緑体光定位運動の協調的調節が極めて重要であることから (Gotoh *et al.* 2018), 外来性オルガネラゲノムの導入によるバイオマス向上には, 葉緑体の生理学的変異が関与する可能性がある. これらを明らかにするには, (cyt-De) *B. napus* 系統における葉緑体光定位運動を調査する必要がある.

(cyt-De) *B. napus* 系統の収量特性は, 植物体および種子形質において高い値を示したが (Fig. 3-7, Table 3-3), (cyt-De) *B. napus* 系統が安定的に高い収量特性を示すのか異なる環境要因において収量特性調査を行う必要がある. また, 柵状組織の発達は, 青色光受容体であるフォトトロピン 2 によって促進されることから (Kozuka *et al.* 2011), 植物工場などの最大量の青色光を受けられる環境下において (cyt-De) *B. napus* 系統のより大きなバイオマス向上が見込めることが示唆された.

*Moricandia arvensis* 細胞質をもつ *B. juncea* CMS 系統は, バイオマスの増大と葉のクロロフィル含有量の増加により, より高い種子収量をもたらした (Chamola *et al.* 2013b). また, (cyt-De) *B. juncea* CMS 系統において, 一次分枝および二次分枝あたりの長角果の数は, 同質細胞質 *B. juncea* 系統よりも高かったが, 長角果あたりの種子数は低く, *D. erucoides* のオルガネラゲノムは, *B. juncea* の核ゲノムに対して農学的有用形質に大きな影響を及ぼさないと示唆された (Chamola *et al.* 2013b). 本章は, (cyt-De) *B. napus* 系統の高い収量特性を明らかにしたが, 核ゲノムとオルガネラゲノムとの至適な組合せを推定するには, 核とオルガネラ間の比較ゲノム解析と外来性オルガネラゲノムを導入したさまざまな栽培種における収量特性調査を集積し, それらの結果を統合する必要がある. その結果, 外来性オルガネラゲノムの導入に起因する農学的有用形質を有する栽培種を簡便に獲得できると期待される. また, 今後, 環境変動がさらに厳しくなると予想され (Bevan *et al.* 2017), 藻類や陸上植物に



において葉緑体ゲノムから核ゲノムへの逆行性調節シグナルは免疫応答に関わる遺伝子群の転写を調節することから (Wang *et al.* 2016), 核ゲノムと葉緑体ゲノム間の至適化による環境適応能力の向上などの点も重要になると示唆された。

本章では, (cyt-De) *B. napus* 系統のバイオマス向上は, 柵状組織の肥大に起因することを明らかにした。さらに, その柵状組織の肥大には, 葉緑体と光合成の活性が関与することを確認した。(cyt-De) *B. napus* 系統は, 収穫量を増産させる育種素材としての実用化が期待されるとともに, これらの研究成果により, 核とオルガネラ間のゲノム再編による「オルガネラゲノムを対象とした育種」というオルガネラ育種法の確立につながることを期待される。

## 第 4 章

### 総合考察

本研究では，アブラナ科近縁野生種のオルガネラゲノムが導入された栽培種において，外来性オルガネラゲノムがもたらす形質変異を明らかにすることを目的に，雌性稔性や雄性稔性などの花器形態への外来性オルガネラゲノムの影響を特徴付けるとともに，外来性オルガネラゲノムによりバイオマス向上がみられる有用系統の作出を試みた．第 1 章では，雌性不稔性により異質細胞質系統の作出が困難となる交雑組合せにおいて，オルガネラゲノム提供種由来の添加染色体によって雌性不稔性を克服する事例を明らかにした．また，第 2 章では，異質倍数化により細胞質雄性不稔性（Cytoplasmic male sterility : CMS）を寛解する事例を明らかにした．さらに，第 3 章では，外来性オルガネラゲノムがもたらすバイオマス向上について特徴づけを行った．本章では，序章で定義した「核ゲノムとオルガネラゲノムとのクロストーク」が及ぼす形質変異の採種における実用化に向けて本研究で用いたアブラナ科植物を実例として考察した．

従来の品種改良は，主に核ゲノム内の遺伝的改変に着目しており，序章に記載した通り，外来性オルガネラゲノムがもたらす形質変異の利用は，CMS の実用化に限定されている．アブラナ科作物で報告されているさまざまなタイプの CMS 体系において *Ogu* CMS 体系や（Ogura 1968），*Pol* CMS 体系が一代雑種（F<sub>1</sub>）品種の種子生産で最も広く使用され（Fu 1987, Singh *et al.* 2019），他殖性作物において CMS 体系は，雑種強勢を付与するために不可欠な育種体系であり，生産性の向上に大きな利益をもたらした（Bohra *et al.* 2016）．

外来性オルガネラゲノムの導入は，CMS に加えてさまざまな形質変異がみられ，本研究で明らかとなった外来性オルガネラゲノムの導入に起因する農業的有用形質を Table 4-1 にまとめた．本研究により，*B. rapa* 系統において *D. tenuifolia* のオルガネラゲノムの導入は，クロロシスがみられず正常に生育する CMS を誘発することが明らかとなり，*D. tenuifolia* の核ゲノムから雌性稔性を克服させる遺伝子を *B. rapa* の核ゲノムに導入する必要があるが，有用な CMS 系統になる得ることが示唆された．また，*D. erucoides* のオルガネラゲノ

Table 4-1. Summary of characterization of agriculturally useful traits in three *Brassica* crops by introduction of organelle genomes of wild relatives in this study.

Organelle genomes		Nuclear genomes		
		<i>B. rapa</i> (AA)	<i>B. oleracea</i> (CC)	<i>B. napus</i> (AACC)
<i>Diplomataxis tenuifolia</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Male sterility (dysfunction pollen grains)</li> <li>• Recovery of female sterility in MAL <sup>1)</sup></li> <li>• Green leaves</li> </ul>			
<i>Diplomataxis erucooides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Male sterility (dysfunction pollen grains)</li> <li>• Increased seed size</li> <li>• Green leaves</li> <li>• Biomass improvement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Male sterility (anther locule unformation)</li> <li>• Increased seed size</li> <li>• Green leaves</li> <li>• Biomass improvement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased seed size</li> <li>• Green leaves</li> <li>• Biomass improvement</li> </ul>	

<sup>1)</sup> MAL shows alloplasmic and monosomic addition line of *Brassica rapa* carrying the cytoplasm and one chromosome of *Diplomataxis tenuifolia*.

ムの導入は、*B. rapa* 系統と *B. oleracea* 系統において、CMS を誘発したことに加えて、*B. rapa* 系統、*B. oleracea* 系統および *B. napus* 系統において、種子や植物体の増大というバイオマス向上がみられ、*D. erucoides* のオルガネラゲノムの導入は、*Brassica* 栽培種において農業的有用形質に変異を有することが示唆された。これら本研究において作出された外来性オルガネラゲノムの導入系統は、アブラナ科作物において大いに有益な育種素材として期待された。これらのことから、外来性オルガネラゲノムの導入は、生産性の向上に大いに貢献する可能性を示した。近年、次世代シーケンシングによりゲノムデータベースの基盤整備が整いつつあり、核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークに関する知見が得られてきているが、オルガネラゲノムにはあまり着目されておらず (Colombo 2019)、オルガネラゲノムを品種改良に活用できていない。外来性オルガネラゲノムの導入を制御することは、核とオルガネラ間のゲノム再編による有用形質の創成につながり、今後の品種改良において多様な育種素材を作出する上で重要となる。

核ゲノムとオルガネラゲノムとのクロストークによる形質変異の活用を目的とし、従来の核ゲノム内の雑種強勢を対象とした F<sub>1</sub> 育種とは異なるオルガネラゲノムを対象とした育種法として「オルガネラ育種」を提起する。これは、核ゲノムとオルガネラゲノムの至適化を試みる育種法であり、従来の F<sub>1</sub> 育種と合わせ、2 種類の育種法に由来する雑種強勢を活用することで、現在よりさらなる生産性の向上が期待される。外来性オルガネラゲノムを導入することで達成されるオルガネラ育種には、他種の農業的有用形質を導入するために、Matsuzawa *et al.* (1996) によって提唱された近縁種との種属間交雑による雑種 F<sub>1</sub> 植物の作出と連続戻し交雑による異質細胞質系統の作出という作出過程を必要とする。多くの種属間は、交雑不和合性を示すが (皿島 1991a)、アブラナ科作物と多種の近縁野生種との種属間交雑における本研究や先行研究によって、種属間交雑や連続戻し交雑におけるさまざまな生殖障壁を克服する方法が明らかとなった (Table 4-2, Kaneko and Bang 2014)。

種属間交雑によって雑種 F<sub>1</sub> 植物を得るには、交雑組合せや雑種方向によって受精前と受精後の障害がみられ、受精前障害には多様な品種または系統を花粉親に用いた蕾受粉により克服され、受精後障害には胚救済法により受精後の

Table 4-2. Summary of techniques for overcoming the reproductive barriers from F<sub>1</sub> to BC<sub>2</sub> generations in interspecific and intergeneric hybridization between Brassicaceae crops and wild relatives.

Reproductive barriers	Techniques for overcoming the reproductive barriers		
	F <sub>1</sub> generation	BC <sub>1</sub> generation	BC <sub>2</sub> generation
I Pre-fertilization barrier	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bud pollination</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bud pollination</li> </ul>	
II Post-fertilization barrier	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo rescue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo rescue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Embryo rescue</li> </ul>
III Low female fertility	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diploidization treatment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repeated pollination using diverse pollen parents</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Repeated pollination using diverse pollen parents</li> </ul>
IV Cytoplasmic female sterility		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilization of bridge plant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilization of bridge plant</li> <li>• Introduction of nuclear restorer gene(s) derived from the cytoplasmic donor species.</li> <li>• Introduction of nuclear restorer gene(s) derived from the cytoplasmic donor species.</li> </ul>

雑種胚の発達を促進することで克服される（房 1996）。さらに，得られた雑種 F<sub>1</sub> 植物は，異種の核ゲノムをもつ異質複半数体であり，減数分裂時の染色体の分離が正常に行われず，受精能力をもつ配偶子形成が困難であることから，染色体倍加処理により複二倍体雑種 F<sub>1</sub> 植物を育成する必要がある。さまざまな異質細胞質アブラナ科作物における BC<sub>1</sub> 世代である二基三倍体植物や BC<sub>2</sub> 世代などのその後の連続戻し交雑後代において，雌性不稔性を示すことで異質細胞質系統が作出できない種間の組合せが存在することが明らかになっている（Kaneko and Bang 2014）。この雌性不稔性は，卵細胞の成熟遅延によって引き起こされた可能性があることから，複数の F<sub>1</sub> 品種を花粉親として反復し交雑を行う反復受粉や橋渡し植物の利用によって克服される場合がある（Fujita *et al.* 2018）。*Diplotaxis erucooides* のオルガネラゲノム（*cyt-De*）を導入した *B. oleracea* 系統は，完全な細胞質雌性不稔性（Cytoplasmic female sterility: CFS）を示したことから作出されず（鄭 2008），オルガネラゲノム提供種由来の添加染色体を保持した。*(cyt-De) B. oleracea* 系統の作出において，その添加染色体を排除し，異質細胞質系統を作出するには，通常の連続戻し交雑ではなく，*(cyt-De) B. rapa* 系統を橋渡し植物として用いることで作出された（Fujita *et al.* 2019）。以上のことから外来性オルガネラゲノムを導入するには，蕾受粉に加えて，胚救済法や反復受粉，橋渡し植物などの手法を適宜用いることによって，交雑不親和性や雌性不稔性などの生殖障壁を克服し，異質細胞質系統を作出する必要がある。

第 3 章で述べたように，*D. erucooides* のオルガネラゲノム（*cyt-De*）の導入は，*Brassica* 栽培種において農業的有用形質に変異を有した一方，*(cyt-De) Raphanus sativus* 系統では，クロロシスによって生育遅延がみられたことから（藤田 2017），*D. erucooides* のオルガネラゲノムと *R. sativus* の核ゲノム間は，至適な組合せではないことが示唆された。*D. erucooides* は，アブラナ 26 種の葉緑体 DNA に基づく系統樹において *R. sativus* より *Brassica* 栽培種と近縁であることが明らかとなっており（筒井 2013），外来性オルガネラゲノムからの雑種強勢を得るための至適なオルガネラゲノム提供種は，核ゲノム提供種との近縁種を選抜するのが望ましいと示唆された。イネやコムギなどのさまざまな作物種において核ゲノムとオルガネラゲノムとの至適な組合せを推定するには，

核とオルガネラ間の比較ゲノム解析と外来性オルガネラゲノムを導入したさまざまな作物種における収量特性調査を集積し，作物種における共通性を見出すことで，オルガネラ育種の一般化を図ることが期待される．

油糧作物である *B. napus* は，野生種からの栽培化やさまざまな育種過程を経て，各地域の気候に適応したさまざまな栽培品種が作出されていることから，種内においても遺伝的に多様な核ゲノムとオルガネラゲノムが存在すると示唆された (Allender and King 2010)．種内の核ゲノムの多様性は，さまざまな研究が行われるとともに，その形質変異の実用化が試みられてきた一方，オルガネラゲノムの多様性には，着目されていない．また，*A. thaliana* における種内のエコタイプ間のダイアレル交配において核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークによって実験圃場という複雑な生育環境下においても抽苔性や種子休眠などの採種形質に変異を及ぼすことが明らかとなっている (Roux *et al.* 2016, Boussardon *et al.* 2019)．これらのことから，従来の F<sub>1</sub> 育種では，雑種強勢の程度を一般組合せ能力や特定組合せ能力により検定しているが，これらの検定においてもオルガネラゲノムが及ぼす影響を考慮する必要があると提起する．

本研究では，従来の核ゲノム内の F<sub>1</sub> 育種とは異なるオルガネラゲノムを対象としたオルガネラ育種の基盤を整備するのに必要な採種形質についての評価を行い，新たな知見を得た．これらの知見は，核ゲノムとオルガネラゲノムとのクロストークの理解に資するものであり，今後，そのクロストークによる形質変異が活用された品種の育成が可能になることが期待される．

## 摘要

アブラナ科近縁野生種の外来性オルガネラゲノムが導入された栽培種について、外来性オルガネラゲノムがもたらす形質変異を明らかにすることを目的に、雌性稔性や雄性稔性、バイオマスの3点への影響に着目し、核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークに起因する農業的有用形質の変異の実用化に向けた新たな知見を得ることを試みた。

### 1. *Diplotaxis tenuifolia* 細胞質をもつ *Brassica rapa* における

#### 雌性稔性時の *D. tenuifolia* 一添加染色体の要求性

異質細胞質系統は、細胞質雄性不稔性 (Cytoplasmic male sterility : CMS) などのさまざまな形質変異を引き起こす。アブラナ科近縁野生種 *D. tenuifolia* のオルガネラゲノム (cyt-Dt) を導入した異質細胞質 *B. rapa* CMS 系統 ( $2n = 20$ ) の作出を試みたが、*D. tenuifolia* 由来の染色体が1本添加された一染色体添加型 *B. rapa* 系統 (Monosomic Addition Line; MAL,  $2n=21$ ) のみが得られ、その後、連続戻し交雑後代においても添加染色体を保持した個体のみが得られた。そこで、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物が後代作出にオルガネラゲノム提供種由来の染色体を必要とする原因について調査したところ、(cyt-Dt) *B. rapa* MAL 植物と *B. rapa* 系統との交配において、胚珠の約50%のみが花粉管を誘引し、誘引した約全ての肥大胚珠において成熟胚が形成され、得られた全ての後代に添加染色体が存在した。これらの結果から、 $n = 10$  ではなく  $n = 11$  の雌性配偶子のみが受精することで成熟種子に発達し、細胞質雌性不稔性はオルガネラゲノム提供種由来の遺伝子によって克服されることが示唆された。これらの結果は、アブラナ科作物において核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークが雌性稔性に影響を及ぼす知見を初めて提起した。

### 2. *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつ *Brassica napus* における

#### 雄性不稔回復機構の探索

*B. rapa* (AAゲノム)、*B. oleracea* (CCゲノム) および *B. napus* (AACCゲノム) のアブラナ科3栽培種においてアブラナ科近縁野生種 *D. eruroides* のオル



ガネラゲノム (*cyt-De*) を導入したことによる葯発達の影響を葯の組織学的観察と雄性不稔の原因遺伝子である *orf108* の発現を定量することで特徴付けた。

(*cyt-De*) *B. rapa* 植物は、葯室を形成するが、*orf108* がプロセッシングされないため機能不全の花粉粒を生産する雄性不稔タイプであり、(*cyt-De*) *B. oleracea* 植物は、*orf108* がプロセッシングされるが、それ以前に葯室が未分化で小孢子母細胞が形成されない雄性不稔タイプであった。それらの異質倍数体の (*cyt-De*) *B. napus* 植物は、部分的ながらも葯室を形成し、*orf108* 転写産物量の抑制により雄性稔性を回復したことが明らかとなり、異質倍数化により葯室形成能と花粉稔性が相補され、雄性稔性を回復していると考えられた。これらの結果は、異質倍数化によって CMS を寛解するという新たな知見を提供した。

### 3. *Diplotaxis erucoides* 細胞質をもつ *Brassica napus* における

#### バイオマス向上の分子機構の解明と実用化

外来性オルガネラゲノムの導入による農業的有用形質の変異を明らかにするために、(*cyt-De*) *B. napus* 系統と *B. napus* 系統との正逆交雑を行い、オルガネラゲノムが異なる系統を作出し、生育特性調査と葉の内部構造の観察を行ったところ、(*cyt-De*) *B. napus* 系統は、柵状組織の肥大によりバイオマス向上に至ったことが明らかとなった。バイオマス向上がみられた (*cyt-De*) *B. napus* 系統は、*B. napus* 系統より ATP 関連遺伝子群や光合成関連遺伝子群が上方制御される傾向がみられ、葉緑体阻害剤の添加により、(*cyt-De*) *B. napus* 系統におけるバイオマス向上の効果が打ち消された。これらのことから、(*cyt-De*) *B. napus* 系統において葉緑体ターゲット遺伝子や光合成関連遺伝子の発現量の増加が柵状組織の肥大に寄与する可能性が示唆された。また、(*cyt-De*) *B. napus* 系統の収量特性は、植物体全体および種子形質において高い値を示し、収穫量を増産させる育種素材としての実用化が期待された。

以上のことから、アブラナ科作物において雌性稔性時に核ゲノムとオルガネラゲノム間のクロストークが影響を及ぼすこと、異質倍数化により CMS を寛解するという新たな知見を見出すとともに、外来性オルガネラゲノムの導入によりバイオマス向上がみられる *B. napus* 系統を作出した。これらの研究成果に

よって、核とオルガネラ間のゲノム再編により有用形質を創成することを目的とした「オルガネラ育種」という新たな育種法の確立につながることを期待される。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり，主指導教員として宇都宮大学農学部植物育種学研究室の房相佑教授には，研究生，修士課程から博士課程において植物体の栽培方法や研究の構想，論文作成など多岐にわたり多大なるご指導，ご鞭撻を賜りましたこと，素晴らしい研究環境を与えて頂いたことに深く感謝いたします。また，同研究室の大西孝幸准教授からは，実験の構想，データ解析などについて適切にご指導，ご助言を頂いたことに心からお礼申し上げますと共に深く感謝いたします。さらに，副指導教員としてご指導およびご校閲を賜りました宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター植物細胞生物学研究室の児玉豊准教授，東京農工大学農学部植物育種学研究室の金勝一樹教授ならびに本論分のご校閲を賜りました宇都宮大学農学部園芸学研究室の山根健治教授，茨城大学農学部植物育種学研究室の久保山勉教授に厚く心からお礼申し上げます。

本研究において，植物体の作出について房相佑教授，沈受炫博士ならびに山田渉様，樹脂切片の作製についてご助言を頂いた物質・材料研究機構の鴻田様，Real Time RT-PCR 解析の条件検討についてご助言を頂いた京都産業大学の山岸博教授，RNA シーケンス解析における条件検討についてご助言を頂いた宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター環境生理学研究室の宮川一志准教授，ライブラリー作製からデータ解析についてご指導，ご支援を頂いた宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター生物分子情報学研究室の鈴木智大准教授ならびに同研究室技術補佐員の石井様，技術補佐員の北村様に重ねて厚くお礼申し上げます。

博士課程での研究生活にあたり，多大なるご支援，ご助言頂いた宇都宮大学植物育種学研究室の皆様，友人，家族に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- Akaba, M., Y. Kaneko, Y. Ito, Y. Nakata, S.W. Bang and Y. Matsuzawa (2009) Production and characterization of *Brassica napus*-*Raphanus sativus* monosomic addition lines mediated by the synthetic amphidiploid “*RaphanoBrassica*”. *Breed. Sci.* 59: 109-118.
- Allen, J.O. (2005) Effect of teosinte cytoplasmic genomes on maize phenotype. *Genetics* 169: 863-880.
- Allender, C.J and G.J. King (2010) Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol.* 10: 54.
- An, H., Z.H. Yang, B. Yi, J. Wen, J.X. Shen, J.X. Tu, C. Ma, T. Fu (2014) Comparative transcript profiling of the fertile and sterile flower buds of pol CMS in *B. napus*. *BMC Genomics* 15: 258.
- An, H., X. Qi, M.L. Gaynor, Y. Hao, S.C. Gebken, M.E. Mabry, A.C. McAlvay, G.R. Teakle, G.C. Conant, M.S. Barker, T. Fu *et al.* (2019) Transcriptome and organellar sequencing highlights the complex origin and diversification of allotetraploid *Brassica napus*. *Nat. Commun.* 10, 2878.
- Apel, P., C. Horstmann and M. Pfeffer (1997) The *Moricandia* syndrome in species of the Brassicaceae-evolutionary aspects. *Photosynthetica* 33: 205-215.
- Ashutosh, P. Kumar, V. Dinesh Kumar, P.C. Sharma, S. Prakash and S.R. Bhat (2008) A novel *orf108* co-transcribed with the *atpA* gene is associated with cytoplasmic male sterility in *Brassica juncea* carrying *Moricandia arvensis* cytoplasm. *Plant Cell Physiol.* 49: 284-289.
- Atri, C., Kaur B, Sharma S, Gandhi N, Verma H, Goyal A, Banga SS (2016) Substituting nuclear genome of *Brassica juncea* (L.) Czern & Coss. in cytoplasmic background of *Brassica fruticulosa* results in cytoplasmic male sterility. *Euphytica* 31-40.
- 房相佑 (1996) ダイコン(*Raphanus sativus* L.) と近縁野生種属との交雑親和性と雑種後代植物の育成に関する研究. 学位論文. 東京農工大学大学院. 東

京. 1-276.

- Bang, S.W., Y. Kaneko and Y. Matsuzawa (1996) Production of intergeneric hybrids between *Raphanus* and *Sinapis* and the cytogenetics of their progenies. Jap. J. Breed. 46: 45-51.
- Bang, S.W., Y. Mizuno, Y. Kaneko, Y. Matsuzawa and K.S. Bang (2003) Production of intergeneric hybrids between the C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. and *Raphanus sativus* L. Breed. Sci. 53: 231-236.
- Bang, S.W., K. Tsutsui, S. Shim and Y. Kaneko (2011) Production and characterization of the novel CMS line of radish (*Raphanus sativus*) carrying *Brassica maurorum* cytoplasm. Plant Breed. 130: 410-412.
- Banga, S.S., J.S. Deol and S.K. Banga (2003) Alloplasmic male-sterile *Brassica juncea* with *Enarthrocarpus lyratus* cytoplasm and the introgression of gene(s) for fertility restoration from cytoplasm donor species. Theor. Appl. Genet. 106: 1390-1395.
- Bannerot, H., L. Bouldard, Y. Cauderon and J. Tempe (1974) Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. Proc. Eucarpia Meeting Cruciferae: 52-54.
- Barkan, A. and I. Small (2014) Pentatricopeptide repeat proteins in plants. Annu. Rev. Plant Biol. 65: 415-442.
- Bevan, M.W., C. Uauy, B.B. Wulff, J. Zhou, K. Krasileva and M.D. Clark (2017) Genomic innovation for crop improvement. Nature 543, 346-354.
- Bhat, S.R., P. Kumar and S. Prakash (2008) An improved cytoplasmic male sterile (*Diplotaxis berthautii*) *Brassica juncea*: identification of restorer and molecular characterization. Euphytica 159: 145-152.
- Bhat, S.R., V. Priya, Ashutosh, K.K. Dwivedi and S. Prakash (2006) *Diplotaxis erucooides* induced cytoplasmic male sterility in *Brassica juncea* is rescued by the *Moricandia arvensis* restorer: genetic and molecular analyses. Plant Breed. 125: 150-155.
- Birky, C.W. (2008) Uniparental inheritance of organelle genes. Curr. Biol. 18: 692-695.

- Bock, R. and J.N. Timmis (2008) Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* 30: 556-566.
- Bohra, A., U.C. Jha, P. Adhimoolam, D. Bisht, N.P. Singh (2016) Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Rep* 35: 967-993.
- Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Boussardon, C., M.L. Martin-Magniette, B. Godin, A. Benamar, B. Vittrant, S. Citerne, T. MaryHuard, D. Macherel, L. Rajjou, and F. Budar (2019) Novel cytonuclear combinations modify *Arabidopsis thaliana* seed physiology and vigor. *Front. Plant Sci.* 10: 32.
- Bowers, J.E., B.A. Chapman, J. Rong and A.H. Paterson (2003) Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature* 422: 433.
- Breitenbach, J., C.F. Zhu and G. Sandmann (2001) Bleaching norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5270-5272.
- Budar, F. and R. Berthomé (2007) Cytoplasmic male sterilities and mitochondrial gene mutations in plants. *Plant mitochondria: annual plant reviews* 31: 278-307.
- Cai, G., Q. Yang, Q. Yang, Z. Zhao, H. Chen, J. Wu, C. Fan and Y. Zhou (2012) Identification of candidate genes of QTLs for seed weight in *Brassica napus* through comparative mapping among *Arabidopsis* and *Brassica* species. *BMC Genet.* 13: 105.
- Carlsson, J., M. Leino, J. Sohlberg, J.F. Sundstrom and K. Glimelius (2008) Mitochondrial regulation of flower development. *Mitochondrion* 8: 74-86.
- Cashel, M. (1969) The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J. Bio. Chem.* 244: 3133-3141.
- Chamola, R., H.S. Balyan and S.R. Bhat (2013a) Transfer of cytoplasmic male sterility from alloplasmic *Brassica juncea* and *B. napus* to cauliflower (*B.*

- oleracea* var. *botrytis*) through interspecific hybridization and embryo culture. Ind. J. Genet. 73: 203-210.
- Chamola, R., H.S. Balyan, S.R. Bhat and A.M. Chevre (2013b) Effect of alien cytoplasm and fertility restorer genes on agronomic and physiological traits of *Brassica juncea* (L.) Czern. Plant Breed. 132: 681-687.
- Chan, K.X., S.Y. Phua, P. Crisp, R. McQuinn and B.J. Pogson (2016) Learning the languages of the chloroplast: retrograde signalling and beyond. Annu. Rev. Plant Biol. 67: 25-53.
- Chao, H., N. Raboanatahiry, X. Wang, W. Zhao, L. Chen, L. Guo, B. Li, D. Hou, S. Pu, L. Zhang, *et al.* (2019) Genetic dissection of harvest index and related traits through genome-wide quantitative trait locus mapping in *Brassica napus* L. Breed. Sci. 69: 104-116.
- Chase, C.D. (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. Trends Genet. 23: 81-90.
- Chen, L. and Y.G. Liu (2014) Male sterility and fertility restoration in crops. Annu Rev Plant Biol. 65: 579-606.
- Cheng, F., J. Wu and X. Wang (2014) Genome triplication drove the diversification of *Brassica* plants. Hortic. Res. 1: 14024.
- Cheung, F., M. Trick, N. Drou, Y.P. Lim, J.Y. Park, S.J. Kwon, J.A. Kim, R. Scott, J.C. Pires, A.H. Paterson, *et al.* (2009) Comparative analysis between homoeologous genome segments of *Brassica napus* and its progenitor species reveals extensive sequence-level divergence. Plant Cell 21: 1912-1928.
- Cole, L.W. (2016) The evolution of per-cell organelle number. Front. Cell Dev. Biol. 4: 85.
- Colombo, N. (2019) TAKING ADVANTAGE OF ORGANELLE GENOMES IN PLANT BREEDING: AN INTEGRATED APPROACH. BAG. J. Bas. Appl. Genet. 30: 35-51.
- Cui, L., P.K. Wall, J.H. Leebens-Mack, B.G. Lindsay, D.E. Soltis, J.J. Doyle, P.S. Soltis, J.E. Carlson, K. Arumuganathan, A. Barakat, *et al.* (2006) Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. Genome Res.

16: 738-749.

- Cushing, D.A., N.R. Forsthoefel, D.R. Gestaut and D.M. Vernon (2005) *Arabidopsis emb175* and other *ppr* knockout mutants reveal essential roles for pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in plant embryogenesis. *Planta* 221: 424-436.
- De Smet, R., K.L. Adams, K. Vandepoele, M.C. Van Montagu, S. Maere and Y. Van de Peer (2013) Convergent gene loss following gene and genome duplications creates single-copy families in flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 2898-2903.
- Deol, J.S., K.R. Shivanna, S. Prakash and S.S. Banga (2003) *Enarthrocarpus lyratus*-based cytoplasmic male sterility and fertility restorer system in *Brassica rapa*. *Plant Breed.* 122: 438-440.
- Dey, S.S., S.R. Sharma, R. Bhatia, C. Parkash and R.N. Barwal (2011a) Superior CMS (*Ogura*) lines with better combining ability improve yield and maturity in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Euphytica* 182:187-197.
- Dey, S.S., Sharma, S.R., C. Parkash, P.R. Kumar and R. Bhatia (2011b) Development and characterization of “*Ogura*” based improved CMS lines of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). *Indian J. Genet. Plant Breed.* 71, 37-42.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Farbos, I., A. Mouras, A. Bereterbide and K. Glimelius (2001) Defective cell proliferation in the floral meristem of alloplasmic plants of *Nicotiana tabacum* leads to abnormal floral organ development and male sterility. *Plant J.* 26(2): 131-142.
- Fu, T., G. Yang and X. Yang (1990) Studies on “three line” Polima cytoplasmic male sterility developed in *Brassica napus*. *Plant Breed.* 104: 115-120.
- Fu, T.D., G.S. Yang and S.N. Yang (1987) Some investigations on polima cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* L. *Cruciferae Newsl* 12: 46-47.
- Fujii, S., C.S. Bond and I.D. Small (2011) Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout



- angiosperm evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 1723-1728.
- Fujii, S., T. Suzuki, P. Giege, T. Higashiyama, N. Koizuka and T. Shikanai (2016) The Restorer-of-fertility-like 2 pentatricopeptide repeat protein and RNase P are required for the processing of mitochondrial *orf291* RNA in *Arabidopsis*. Plant J. 86: 504-513.
- 藤巻宏 (2000) 緑の革命とその後. 熱帯農業 44: 206-212.
- 藤巻宏, 鶴飼保雄, 山元皓二, 藤本文弘 (1992) 第II部 6, 染色体操作. 植物育種学 上 基礎編. 培風館. 東京. 61-74.
- Fujimoto, R., J.M. Taylor, S. Shirasawa, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2012) Heterosis of *Arabidopsis* hybrids between C24 and Col is associated with increased photosynthesis capacity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 7109-7114.
- Fujimoto, R., K. Uezono, S. Ishikura, K. Osabe, W.J. Peacock and E.S. Dennis (2018) Recent research on the mechanism of heterosis is important for crop and vegetable breeding systems. Breed. Sci. 68: 145-158.
- 藤田祥明, 沈受炫, 房相佑 (2015) *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつ異質細胞質 *Brassica napus* 系統の育成と農業的有用形質. 育種学研究. 17(別 2): 93.
- 藤田祥明, 沈受炫, 房相佑 (2016) *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつ *Brassica rapa* を介した異質細胞質 *Raphanus sativus* および *Brassica juncea* の作出. 育種学研究. 18(別 1): 125.
- 藤田祥明 (2017) *Diplotaxis eruroides* 細胞質をもつアブラナ科作物の育成と特性に関する研究. 修士論文. 宇都宮大学. 栃木. 1-102.
- Fujita, Y., K. Sunaga, S. Shim, W. Yamada, T. Ohnishi and S.W. Bang (2018) Production of a desirable *Brassica oleracea* CMS line using an alloplasmic *B. rapa* CMS line carrying *Diplotaxis eruroides* cytoplasm as a bridge plant. Plant Breed. 137: 162-170.
- Gaeta, R.T., J.C. Pires, F. Iniguez-Luy, E. Leon and T.C. Osborn (2007) Genomic changes in resynthesized *Brassica napus* and their effect on gene expression and phenotype. Plant Cell 19: 3403-3417.
- Garg, H., S. Banga, P. Bansal, C. Atri and S.S. Banga (2007) Hybridizing *Brassica rapa* with wild crucifers *Diplotaxis eruroides* and *Brassica maurorum*.

Euphytica 156: 417-424.

- Gobert, A., B. Gutmann, A. Taschner, M. Gossringer, J. Holzmann, R.K. Hartmann, W. Rossmannith and P. Giege (2010) A single *Arabidopsis* organellar protein has RNase P activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 740-744.
- Gonzalez-Melendi, P., M. Uyttewaal, C.N. Morcillo, J.R. Hernandez Mora, S. Fajardo, F. Budar and M.M. Lucas (2008) A light and electron microscopy analysis of the events leading to male sterility in Ogu-INRA CMS of rapeseed (*Brassica napus*). *J. Exp. Bot.* 59: 827-538.
- Gotoh, E., N. Suetsugu, T. Higa, T. Matsushita, H. Tsukaya, and M. Wada. (2018) Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. *Nat. Sci. Rep.* 8: e1472.
- Gray, M.W. (2017) Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Mol. Biol.* 28: 1285-1287.
- Gutmann, B., A. Gobert and P. Giege (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes. Dev.* 26: 1022-1027.
- Haberl, H., K.H. Erb, F. Krausmann, A. Bondeau, C. Lauk, C. Plutzer and J.K. Steinberger (2011) Global bioenergy potentials from agricultural land in 2050: sensitivity to climate change, diets and yields. *Biomass and Bioenergy* 35: 4753-4769.
- Havlickova, L., Z. He, L. Wang, S. Langer, A.L. Harper, H. Kaur, M.R. Broadley, V. Gegas and I. Bancroft (2017) Validation of an updated Associative Transcriptomics platform for the polyploid crop species *Brassica napus* by dissection of the genetic architecture of erucic acid and tocopherol isoform variation in seeds. *Plant J.* 93(1): 181-192.
- Heng, S., J. Gao, C. Wei, F. Chen, X. Li, J. Wen, B. Yi, C. Ma, J. Tu, T. Fu, *et al.* (2018) Transcript levels of *orf288* are associated with the hau cytoplasmic male sterility system and altered nuclear gene expression in *Brassica juncea*. *J. Exp. Bot.* 69: 455-466.
- Heng, S., F. Chen, C. Wei, X. Li, B. Yi, C. Ma, J. Tu, J. Shen, T. Fu, and J. Wen

- (2019) Cytological and iTRAQ-based quantitative proteomic analyses of hau CMS in *Brassica napus* L. J. Pro. 193: 230-238.
- Hikawa, M., K. Nishizawa, and Y. Kodama (2019) Prediction of prospective leaf morphology in lettuce based on intracellular chloroplast position. Sci. Hortic. 251: 20-24.
- Hinata, K. and N. Konno (1979) Studies on a male sterile strain having the *Brassica campestris* nucleus and the *Diplotaxis muralis* cytoplasm. On the breeding procedure and some characteristics of the male sterile strain. Jpn. J. Breed. 29: 305-311.
- Horisaki, A. and S. Niikura (2008) Developmental and environmental factors affecting level of self-incompatibility response in *Brassica rapa* L. Sexual Plant Reproduction 21: 123-132.
- Hricova', A., V. Quesada and J.L. Micol (2006) The *SCABRA3* Nuclear Gene Encodes the Plastid RpoTp RNA Polymerase, Which Is Required for Chloroplast Biogenesis and Mesophyll Cell Proliferation in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 141: 942-956.
- Jain, A., S. Bhatia, S. Banga and M. Lakshmikumaran (1994) Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. Theor. Appl. Genet. 88:116-122.
- Jarvis, P. and E. López-Juéz (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplast and other plastids. Nat. Rev. Mol. Biol. 14, 787-802.
- 鄭凡喜 (2008) アブラナ科野菜と近縁野生種との雑种植物の遺伝育種学的評価に関する研究. 学位論文. 東京農工大学大学院. 東京. 1-136.
- Jiao, Y., N.J. Wickett, S. Ayyampalayam, A.S. Chanderbali, L. Landherr, P.E. Ralph, L.P. Tomsho, Y. Hu, H. Liang, P.S. Soltis, *et al.* (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. Nature 473: 97-100.
- 門田敦生, 陳瑜, 房相佑, 金子幸雄 (2014) *Brassica fruticulosa* 細胞質をもつ雄性不稔ダイコン系統の汎用性と細胞・分子遺伝学的特性. 育種学研究. 16(別 2): 198.

- 門田敦生 (2015) 異質細胞質ダイコン系統でみられる雄性不稔およびクロロシスの分子・細胞遺伝学的解明. 修士論文. 宇都宮大学. 栃木. 1-52.
- Kagale, S., S.J. Robinson, J. Nixon, R. Xiao, T. Huebert, J. Condie, D. Kessler, W.E. Clarke, P.P. Edger, M.G. Links, *et al.* (2014) Polyploid evolution of the Brassicaceae during the Cenozoic era. *Plant Cell* 26: 2777-2791.
- Kagami, T., T. Abamatsu and T. Shiga (1990) Effective transfer of *Ogura* type cytoplasmic male sterile trait from *Brassica campestris* or *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea* by protoplast fusion. In: McFerson, J.R., Kresovich, S., Dwyer, S.G. (Eds.), *Proceedings of 6th Cruciferae General Workshop*. Cornell University. NY. 26.
- Kamiński, P., M. Podwyszyńska, M. Starzycki and E. Starzycka-Korbas (2015) Interspecific hybridisation of cytoplasmic male-sterile rapeseed with *Ogura* cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica* 208: 519-534.
- 金田泉, 加藤正弘 (1997) ダイコン (*Raphanus sativus* L.) における *Brassica oxyrrhina* Coss. 細胞質の効果. 育雑 47: 57-65.
- 金子幸雄, 生井兵治, 松澤康男, 皿島正雄 (1992) カンラン類 1 染色体添加型ダイコンの  $\gamma$  線種子照射による転座型ダイコンの育成. 育雑 42: 383-396.
- Kaneko, Y., S.W. Bang and Y. Matsuzawa (2009) Distant hybridization. *Bio. Breed. Cruci.* 207-247.
- Kaneko, Y. and S.W. Bang (2014) Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of Brassicaceae crops. *Breed. Sci.* 64: 14-22.
- Kihara, H. (1951) Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. *Cytologia* 16: 177-193.
- Kihara, H. (1975) Plant genetics in relation to plant breeding research. *Seiken Ziho* 25/26: 25-40.
- Kihara, H. (1979) Nucleo-cytoplasmic hybrids and nucleo-cytoplasmic heterosis. *Seiken Ziho* 27/28: 1-13.
- Kihara, H. (1982) Importance of cytoplasm in plant genetics. *Cytologia* 47: 435-450.

- Kim, Y.J. and D. Zhang (2018) Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trend Plant Sci.* 23: 53-65.
- Kirti, P.B., S.S. Banga, S. Prakash and V.L. Chopra (1995) Transfer of *Ogu* cytoplasmic male sterility to *Brassica juncea* and improvement of the male sterile line through somatic cell fusion. *Theor. Appl. Genet.* 91: 517-521.
- Kirti, P.B., A. Baldev, K. Gaikwad, S. R. Bhat, V.D. Kumar, S. Prakash and V.L. Chopra (1997) Introgression of a gene restoring fertility to CMS (Trachystoma) *Brassica juncea* and the genetics of restoration. *Plant breed.* 116: 259-262.
- Kirti, P.B., S. Prakash, K. Gaikwad, V.D. Kumar, S.R. Bhat and V.L. Chopra (1998) Chloroplast substitution overcome leaf chlorosis in a *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterile *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1179-1182.
- 小池秀明, 須永啓太, 沈受炫, 房相佑 (2015) *Brassica maurorum* 細胞質をもつ *Brassica rapa* 雄性不稔系統および稔性回復系統の育成. 育種学研究. 17(別2): 45.
- Kozuka, T., S.G. Kong, M. Doi, K. Shimazaki and A. Nagatani (2011) Tissue-autonomous promotion of palisade cell development by phototropin 2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 3684-3695.
- Krech, K., S. Ruf, F.F. Masduki, W. Thiele, D. Bednarczyk, C.A. Albus, N. Tiller, C. Hasse, M.A. Schottler and R. Bock (2012) The plastid genome-encoded Ycf4 protein functions as a nonessential assembly factor for photosystem I in higher plants. *Plant Physiol.* 159: 579-591.
- Kubo, T. and K.J. Newton (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8: 5-14.
- Kuhn, J. and S. Binder (2002) RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of *cox2* transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 30, 439-446.
- Kumar, P., N. Vasupalli, R. Srinivasan and S.R. Bhat (2012) An evolutionarily conserved mitochondrial *orf108* is associated with cytoplasmic male sterility in different alloplasmic lines of *Brassica juncea* and induces male sterility in

- transgenic *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 63: 2921-2932.
- Kume, A. (2017) Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. J. Plant Res. 130: 501-514.
- Lacalle, R.G., M.T. Gomez-Sagasti, U. Artetxe, C. Garbisu and J.M. Becerril (2018) *Brassica napus* has a key role in the recovery of the health of soils contaminated with metals and diesel by rhizoremediation. Sci. Total. Environ. 618: 347-356.
- Lamarre, S., P. Frasse, M. Zouine, D. Labourdette, E. Sainderichin, G. Hu, V. Le Berre-Anton, M. Bouzayen and E. Maza (2018) Optimization of an RNA-Seq Differential Gene Expression Analysis Depending on Biological Replicate Number and Library Size. Front Plant. Sci. 9: 108.
- Lee, K.H. and H. Namai (1992) Pollen fertility and seed set percentage after backcrossing of sesquidiploids (AAC genomes) derived from interspecific hybrid between *Brassica campestris* L (AA) and *Brassica oleracea* L (CC) and frequency-distribution of aneuploids in the progenies. Jap. J. Breed. 42: 43-53.
- Leflon, M., F. Eber, J.C. Letanneur, L. Chelysheva, O. Coriton, V. Huteau, C.D. Ryder, G. Barker, E. Jenczewski and A.M. Chevre (2006) Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) x *Brassica napus* (AACC) hybrids. Theor. Appl. Genet. 113: 1467-1480.
- Leitch, A.R. and I.J. Leitch (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science 320: 481-483.
- Liberatore, K.L., S. Dukowic-Schulze, M.E. Miller, C. Chen and S.F. Kianian (2016) The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. Free Radic. Biol. Med. 100: 238-256.
- Liebers, M., B. Grübler, F. Chevalier, S. Lerbs-Mache, L. Merendino, R. Blanvillain and T. Pfannschmidt (2017). Regulatory shifts in plastid transcription play a key role in morphological conversions of plastids during plant development. Front. Plant Sci. 8: 23.
- Liere, K., A. Weihe and T. Börner (2011) The transcription machineries of plant

- mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J. Plant Physiol.* 168: 1345-1360.
- Linke, B. and T. Borner (2005) Mitochondrial effects on flower and pollen development. *Mitochondrion* 5: 389-402.
- Liu, J.H., M. Landgren and K. Glimelius (1996) Transfer of the *Brassica tournefortii* cytoplasm to *B. napus* for the production of cytoplasmic male sterile *B. napus*. *Physiol. Plant* 96: 123-129.
- Liu, J., X. Xu and X. Deng (2005) Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 82: 19-44.
- Liu, J., R. Xiang, W. Wang, D. Mei, Y. Li, A. S. Mason, L. Fu, and Q. Hu (2015) Cytological and molecular analysis of *Nsa* CMS in *Brassica napus* L. *Euphytica* 206: 279-286.
- Liu, Z., D. Wang, J. Feng, G.J. Seiler, X. Cai and C.C. Jan (2013) Diversifying sunflower germplasm by integration and mapping of a novel male fertility restoration gene. *Genetics* 193: 727-737.
- Lurin, C., C. Andres, S. Aubourg, M. Bellaoui, F. Bitton, C. Bruyere, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, *et al.* (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Lysak, M.A., M.A. Koch, A. Pecinka and I. Schubert (2005) Chromosome triplication found across the tribe *Brassicaceae*. *Genome Res.* 15: 516-525.
- Malik, M., P. Vyas, N.S. Rangaswamy and K.R. Shivanna (1999) Development of two new cytoplasmic male sterile lines of *Brassica juncea* through wide hybridization. *Plant Breed.* 118: 75-78.
- Martínez-Sánchez, A., R. Llorach, M.I. Gil and F. Ferreres (2007) Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agri. Food chem.* 55: 1356-1363.
- Matsuzawa, Y., S. Mekiyanon, Y. Kaneko, S.W. Bang, K. Wakui and Y. Takahata

- (1999) Male sterility in alloplasmic *Brassica rapa* L. carrying *Eruca sativa* cytoplasm. *Plant breed.* 118: 82-84.
- Matsuzawa, Y., Y. Kaneko and S.W. Bang (1996) Prospects of the wide cross for genetics and plant breeding in Brassicaceae. *Bull. Coll. Agric. Utsunomiya Univ.* 16 (2): 5-10.
- McCollum, G.D. (1979) Sterility in successive backcrosses of *RaphanoBrassica* ( $2n = 4x = 36$ ) with recurrent *Brassica oleracea* ( $2n = 2x = 18$ ). *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 479-485.
- McCollum, G.D. (1981) Induction of an alloplasmic male-sterile *Brassica oleracea* by substituting cytoplasm from 'Early Scarlet Globe' radish (*Raphanus sativus*). *Euphytica* 30: 855-859.
- McDermaid, A., B. Monier, J. Zhao, B. Liu and Q. Ma (2018) Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief Bioinform.*
- Meena, O.P., M.S. Dhaliwal and S.K. Jindal (2018) Development of cytoplasmic male sterile lines in chilli (*Capsicum annum* L.) and their evaluation across multiple environments. *Breed. Sci.* 68: 404-412.
- Meur, G., Gaikwad, K., Bhat, S.R., Prakash, S., Kirti, P.B. (2006) Homeotic-like modifications of stamens to petals is associated with aberrant mitochondrial gene expression in cytoplasmic male sterile Ogura *Brassica juncea*. *J. Genet.* 85 (2): 133-139.
- Moison, M., F. Roux, M. Quadrado, R. Duval, M. Ekovich, D.H. Le, M. Verzaux and F. Budar (2010) Cytoplasmic phylogeny and evidence of cyto-nuclear co-adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 63: 728-738.
- Murai, K., S. Takumi, H. Koga and Y. Ogihara (2002) Pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, caused by nuclear-cytoplasm interaction in wheat. *Plant J.* 29: 169-181.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta.* 15: 473-479.
- Mwangangi, I.M., J.K. Muli and J.O. Neondo (2019) Plant Hybridization as an



- Alternative Technique in Plant Breeding Improvement. Asian J Res. Crop Sci. 4(1): 1-11.
- Namai, H. (1987) Inducing cytogenetical alterations by means of interspecific and intergeneric hybridization in *Brassica* crops. Gamma Field Symp. 26: 41-89.
- Naresh, V., S.K. Singh, A. Watts, P. Kumar, V. Kumar, K.R.S.S. Rao and S.R. Bhat (2016) Mutations in the mitochondrial *orf108* render *Moricandia arvensis* restorer ineffective in restoring male fertility to *Brassica oxyrrhina*-based cytoplasmic male sterile line of *B. juncea*. Mol. Breed. 36.
- Ogura, H. (1968) Studies on the new male sterility in Japanese radish, with special references to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem Fac Agric Kagoshima Univ. 6: 39-78.
- Pathania, A., S.R. Bhat, V.D. Kumar, Ashutosh, P.B. Kirti, S. Prakash and V.L. Chopra (2003) Cytoplasmic male sterility in alloplasmic *Brassica juncea* carrying *Diplotaxis catholica* cytoplasm: molecular characterization and genetics of fertility restoration. Theor. Appl. Genet. 107: 455-461.
- Pellan-Delocurme, R. and M. Renard (1987) Identification of maintainer genes in *Brassica napus* L. for male sterility inducing cytoplasm of *Diplotaxis muralis* L. Plant Breed. 99: 89-97.
- Peng, Y., D. Shi, T. Zhang, X. Li, T. Fu, Y. Xu and Z. Wan (2015) Development and utilization of an efficient cytoplasmic male sterile system for Cai-xin (*Brassica rapa* L.). Sci. Hortic. 190: 36-42.
- Pignone, D. (1997) Present Status of Rocket Genetic Resources and Conservation Activities. In: Rocket: a Mediterranean crop for the world. Report of a workshop 13-14. December 1996, Legnaro Italy; Pignone, D., Padulosi, S., Eds.; IPGRI: Rome, pp. 2-12.
- Pison, G. (2019) The population of the world (2019). Population and Sociétés: 1-8.
- Pradhan, A.K., A. Mukhopadhyay and D. Pental (1991) Identification of the putative cytoplasmic donor of a CMS system in *Brassica juncea*. Plant Breed. 106: 204-208.
- Pradhan, A.K., S. Prakash, A. Mukhopadhyay and D. Pental (1992) Phylogeny of

- Brassica* and allied genera based on variation in chloroplast and mitochondrial DNA patterns: molecular and taxonomic classifications are incongruous. *Theor. Appl. Genet.* 85: 331-340.
- Prakash, S. and M. Chopra (1988) Synthesis of alloplasmic *Brassica campestris* as a new source of cytoplasmic male sterility. *Plant Breed.* 101: 253-255.
- Prakash, S. and V. L. Chopra (1990) Male sterility caused by cytoplasm of *Brassica oxyrrhina* in *B. campestris* and *B. juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 79: 285-287.
- Prakash, S., P.B. Kirti, S.R. Bhat, K. Gaikwad, V.D. Kumar and V.L. Chopra (1998) A *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterility and fertility restoration system in *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 488-492.
- Prakash, S., I. Ahuja, H.C. Uprety, V.D. Kumar, S.R. Bhat, P.B. Kirti and V.L. Chopra (2001) Expression of male sterility in alloplasmic *Brassica juncea* with *Erucastrum canariense* cytoplasm and the development of a fertility restoration system. *Plant Breed.* 120: 479-482.
- Richard, N.B., A.S.R. Eduardo, A.M. Fred and A.K. Paul (2006) Ontogenic Profiling of Glucosinolates, Flavonoids, and Other Secondary Metabolites in *Eruca sativa* (Salad Rocket), *Diplotaxis eruroides* (Wall Rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (Wild Rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish Rocket). *Agric. Food Chem.* 4005-4015.
- Rieseberg, L.H., and J.H. Willis (2007) Plant speciation. *Science* 317: 911-914.
- Rieseberg, L.H. and B.K. Blackman (2010) Speciation genes in plants. *Ann. Bot.* 106: 439-55.
- Rieu, I. and S.J. Powers (2009) Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *Plant Cell* 21: 1031-1033.
- Ringdahl, E.A., P.B.E. McVetty and J.L. Sernyk (1987) Intergeneric hybridization of *Diplotaxis* spp. with *Brassica napus*: a source of new CMS systems? *Can. J. Plant Sci.* 67:239-243.
- Roux, F., T. Mary-Huard, E. Barillot, E. Wenes, L. Botran, S. Durand, R. Villoutreix, M.L. Martin-Magniette, C. Camilleri and F. Budar (2016) Cytonuclear interactions affect adaptive traits of the annual plant *Arabidopsis thaliana* in

- the field. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113: 3687-3692.
- Saeki, N., T. Kawanabe, H. Ying, M. Shimizu, M. Kojima, H. Abe, K. Okazaki, M. Kaji, J. M. Taylor, H. Sakakibara, W. J. Peacock, E. S. Dennis and R. Fujimoto (2016) Molecular and cellular characteristics of hybrid vigour in a commercial hybrid of Chinese cabbage. BMC Plant Biol. 16: 45.
- Sanders, P.M., A.Q. Bui, K. Weterings, K.N. McIntire, Y.C. Hsu, P.Y. Lee, M.T. Truong, T.P. Beals and R.B. Goldberg (1999) Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. Sex Plant Reprod. 11: 297-322.
- Sans, F.X. and R. M. Masalles (1994) Life-history variation in the annual arable weed *Diplotaxis erucoides*. Can. J. Bot. 72: 10-19.
- Sasaki, A., M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi and G.S. Khush (2002) Green revolution: a mutant gibberellin-synthesis gene in rice. Nature 416: 701.
- 皿島正雄 (1991a) アブラナ科作物の種・属間交雑親和性, 種・属間交雑によるアブラナ科作物の育種学 (I). 落合書店. 栃木 49-86.
- 皿島正雄 (1991b) アブラナ科作物の復元種育成と形質導入及び細胞質の利用, 種・属間交雑によるアブラナ科作物の育種学 (II). 落合書店. 栃木 125-140.
- Schaffasz, A., S. Windpassinger, R. Snowdon and B. Wittkop (2019) Reproductive Cold Stress Tolerance in Sorghum F<sub>1</sub> Hybrids is a Heterotic Trait. Agronomy 9.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat. Methods 9: 671-675.
- Sharma, D., R. Kaur and K. Kumar (1996) Embryo rescue in plants-a review. Euphytica 89: 325-337.
- 沈受玄, 房相佑, 金子幸雄 (2012) *Brassica oxyrrhina* 細胞質を持つ細胞質雄性不稔ナタネの育成と諸特性. 育種学研究. 14 (別 2): 202.
- Shinada, T., Y. Kikuchi, R. Fujimoto and S. Kishitani (2006) An alloplasmic male-sterile line of *Brassica oleracea* harboring the mitochondria from *Diplotaxis muralis* expresses a novel chimeric open reading frame, *orf72*. Plant Cell Physiol. 47: 549-553.

- Singh, S.K., R. Chatrath and B. Mishra (2010) Perspective of hybrid wheat research: a review. *Indian J. Agric. Sci.* 80: 1013-1027.
- Singh S., S.S. Dey, R. Bhatia, R. Kumar and T.K. Behera (2019) Current understanding of male sterility systems in vegetable *Brassicac*s and their exploitation in hybrid breeding. *Plant Reprod.* 32: 231-256.
- Soltani, A., A. Kumar, M. Mergoum, S.M. Pirseyedi, J.B. Hegstad, M. Mazaheri and S.F. Kianian (2016) Novel nuclear-cytoplasmic interaction in wheat (*Triticum aestivum*) induces vigorous plants. *Funct. Integr. Genomics* 16: 171-182.
- Stiewe, G and G. Röbbelen (1994) Establishing cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* by mitochondrial recombination with *B. tournefortii*. *Plant Breed.* 113: 294-304.
- 須永啓太, 藤田祥明, 大西孝幸, 房相佑 (2017) 異質細胞質系統のクロロシス葉における分化不全. *育種学研究*. 19(別 2): 51.
- 須永啓太 (2018) *Sinapis turgida* 細胞質をもつ *Brassica rapa* 系統の生理・形態的および分子遺伝学的特性調査. 修士論文. 宇都宮大学. 栃木. 1-61.
- Tameshige, T., H., Fujita, K., Watanabe, K., Toyokura, M., Kondo, K., Tatematsu, N., Matsumoto, R., Tsugeki, M., Kawaguchi, M., Nishimura, and K., Okada (2013) Pattern dynamics in adaxialabaxial specific gene expression are modulated by a plastid retrograde signal during *Arabidopsis thaliana* leaf development. *PLoS Genet.* 9: e1003655.
- Tanaka, N. and S. Niikura (2006) Genetic analysis of the developmental characteristics related to the earliness of head formation in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Breed. Sci.* 56: 147-153.
- 谷口高大, 宮内祥多, 門田敦生, 沈受炫, 房相佑 (2015) 近縁野生種 4 種の細胞質をもつ異質細胞質 *Brassica oleracea* 系統の形態的・組織学的および細胞遺伝学的特性. *育種学研究*. 17(別 2): 177.
- 谷口高大 (2016) 近縁野生種 3 種の異質細胞質をもつ *Brassica oleracea* 系統の育成と利用に関する研究. 修士論文. 宇都宮大学. 栃木. 1-42.
- Terashima, I., Y.T. Hanba, Y. Tazoe, P. Vyas, and S. Yano (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation

- to photosynthetic CO<sub>2</sub> diffusion. *J. Exo. Bot.* 57: 343-354.
- Timmis, J.N., M.A. Ayliffe, C.Y. Huang, and W. Martin (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukary-otic chromosomes. *Nature Rev. Genet.* 5: 123-136.
- Tonosaki, K., K. Osabe, T. Kawanabe and R. Fujimoto (2016) The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breed. Sci.* 66: 333-349.
- Tsutsui, K., B.H. Jeong, Y. Ito, S.W. Bang and Y. Kaneko (2011) Production and characterization of an alloplasmic and monosomic addition line of *Brassica rapa* carrying the cytoplasm and one chromosome of *Moricandia arvensis*. *Breed. Sci.* 61: 373-379.
- 筒井康太 (2013) 近縁種の細胞質をもつアブラナ科細胞質雄性不稔系統の育種学的利用に関する研究. 学位論文. 東京農工大学大学院. 東京. 1-205.
- U, N. (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn. J. Bot.* 7, 389-452.
- Vyas, P., S. Prakash, and K.R. Shivanna (1995) Production of wide hybrids and backcross progenies between *Diplotaxis eruroides* and crop *Brassicac*s. *Theor. Appl. Genet.* 90: 549-553.
- Wan, Z., B. Jing, J. Tu, C. Ma, J. Shen, B. Yi, J. Wen, T. Huang, X. Wang and T. Fu (2008) Genetic characterization of a new cytoplasmic male sterility system (hau) in *Brassica juncea* and its transfer to *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 355-362.
- Wan, Z.J., D.Y. Shi, R.C. Zou, Z. Shi, T.D. Fu and Y.J. Xu (2014) Development and utilization of one new cytoplasmic male sterile line of Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* var. *rugosa* Bailey). *Sci. Hortic.* 165: 211-217.
- Wang, C., S. Tang and Y. Tang (1998) Effects of male sterile cytoplasm on yield and agronomic characters in Japonica hybrid rice, *Oryza sativa* L. *Breed. Sci.*, 48: 263-271.
- Wang, J., Y.N. Gao, Y.Q. Kong, J.J. Jiang, A.M. Li, Y.T. Zang and Y.P. Wang (2014)

- Abortive process of a novel rapeseed cytoplasmic male sterility line derived from somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. *J. Integr. Agric.* 13: 741-748.
- Wang, L., T. Yamano, S. Takane, Y. Niikawa, C. Toyokawa, S. Ozawa, R. Tokutsu, Y. Takahashi, J. Minagawa, Y. Kanesaki et al. (2016) Chloroplast-mediated regulation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism by Ca<sup>2+</sup>-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 12586-12591.
- Warwick, S.I., A. Francis and I.A. Al-Shehbaz (2006) Brassicaceae: Species checklist and database on CD-Rom. *Plant Systematics and Evolution* 259: 249-258.
- Weiss-Schneeweiss, H., K. Emadzade, T.S. Jang and G.M. Schneeweiss (2013) Evolutionary consequences, constraints and potential of polyploidy in plants. *Cytogenet Genome Res.* 140: 137-150.
- Wilmar, J. and M. Hellendoorn (1968) Embryo culture of Brussels sprouts for breeding. *Euphytica* 17: 28-37.
- Wycliffe, P., F. Sitbon, J. Wernersson, I. Ezcurra, M. Ellerstrom and L. Rask (2005) Continuous expression in tobacco leaves of a *Brassica napus* PEND homologue blocks differentiation of plastids and development of palisade cells. *Plant J.* 44: 1-15.
- Xiong, Z., R.T. Gaeta and J.C. Pires (2011) Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 7908-7913.
- 山田実 (2010) トウモロコシ, 品種改良の世界史・作物編, 鶴飼保雄, 大澤良編. 悠書館. 東京. 87-109.
- 山田渉, 房相佑, 金子幸雄 (2010) *Brassica rapa* と *Diplotaxis eruroides* との属間交雑後代における 1 染色体添加型および CMS 系統 *B. rapa* の育成と細胞遺伝学的特性. 育種学研究. 12(別 2): 82.
- Yamagishi, H. and S.R. Bhat (2014) Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. *Breed. Sci.* 64: 38-47.

- Yamasaki, S., N. Konno and S. Kishitani (2004) Overexpression of mitochondrial genes is caused by interactions between the nucleus of *Brassica rapa* and the cytoplasm of *Diplotaxis muralis* in the leaves of alloplasmic lines of *B. rapa*. *J. Plant Res.* 117: 339-344.
- Yang, M., X. Wang, D. Ren, H. Huang, M. Xu, G. He and X.W. Deng (2017) Genomic architecture of biomass heterosis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 8101-8106.
- Yang, S., T. Terachi and H. Yamagishi (2008) Inhibition of chalcone synthase expression in anthers of *Raphanus sativus* with *Ogura* male sterile cytoplasm. *Ann. Bot.* 102: 483-489.
- Yang, Y., X. Wei, G. Shi, F. Wei, J. Braynen, J. Zhang, B. Tian, G. Cao and X. Zhang (2017) Molecular and cytological analyses of A and C genomes at meiosis in synthetic allotriploid *Brassica* hybrids (ACC) between *B. napus* (AACC) and *B. oleracea* (CC). *J. Plant Biol.* 60: 181-188.
- Yeates, A.M., M.K. Zubko and A.V. Ruban (2019) Absence of photosynthetic state transitions in alien chloroplasts. *Planta* 250: 589-601.
- Yu, F.Q. and T.D. Fu (1990) Cytomorphological research on anther development of several male-sterile lines in *Brassica napus* L. *J. Wuhan Bot. Res.* 8: 209-210 (In Chinese)
- Zhang, D., Q. Pan, C. Cui, C. Tan, X. Ge, Y. Shao and Z. Li (2015) Genome-specific differential gene expressions in resynthesized *Brassica* allotetraploids from pair-wise crosses of three cultivated diploids revealed by RNA-seq. *Front. Plant Sci.* 6: 957.
- Zhou, W., D. Karcher, A. Fischer, E. Maximova, D. Walther and R. Bock (2015) Multiple RNA processing defects and impaired chloroplast function in plants deficient in the organellar protein-only RNase P enzyme. *PLoS One* 10: e0120533.
- Zimorski, V., C. Ku, W.F. Martin and S.B. Gould (2014) Endosymbiotic theory for organelle origins. *Current opinion in microbiology* 22: 38-48.