原著論文

セイヨウナタネとカラシナとの正逆交雑による B ゲノム一染色体添加型ナタネの育成とその特性

高嶋美穂^{1,2)}・房 相佑¹⁾・金子幸雄¹⁾

¹⁾ 宇都宮大学農学部植物育種学研究室, 宇都宮市, 〒 321-8505

²⁾ 東京農工大学大学院連合農学研究科, 府中市, 〒 183-8509

摘 要

セイヨウナタネとカラシナとの正逆交雑 F_1 雑種にセイヨウナタネを連続戻し交雑し, 同質細胞質および異質細胞質をもつ B ゲノム一染色体添加型系統 (Monosomic Addition Line: MAL) のセイヨウナタネを得た. 添加された B ゲノムの染色体は, B ゲノム特異 SSR マーカーの有無, 細胞遺伝学および形態学的特性調査によって同定した. その結果, 同質細胞質系統は B ゲノム染色体 a~h の 8 種類のうち a と f を除く 6 種類が, 異質細胞質系統では e と f を除く 6 種類, 添加された染色体の種類では合計 7 種類の MAL が作出できた. 7 種類の MAL の染色体の対合状況は, 大部分が $19_{II}+1_I$ を示したが, g タイプと h タイプには多価染色体もみられた. また g タイプと h タイプは添加染色体が形態に影響を及ぼすことが示唆された. B ゲノム染色体の伝達率は 1.9% から 36.4% であり, いずれの MAL も維持できることが明らかになった. 本研究で作出した MAL はアブラナ属の類縁性の研究や形質導入における有用な材料と考えられる.

キーワード

種間交雑, カラシナ, ナタネ, B ゲノム染色体, 一染色体添加型系統

緒 言

セイヨウナタネ (*Brassica napus*, $2n=38$, AACC, 以下, 「ナタネ」と略称する) は, 世界で約 6000 万トンの生産量があり, そのうちのおよそ 2200 万トンが油糧種子として栽培されており, ナタネ油の原料として重要な作物のひとつである (FAO 2010). また, ナタネは化石燃料の代替油であるバイオディーゼル燃料としても需要が高くなりつつあり, 採油量, 脂肪酸組成やグルコシノレート含量などの成分育種も進められている (Harbans and Anwar 2008).

一方, カラシナ (*Brassica juncea*, $2n=36$, AABB) は搾油または香辛料として主にアジアやアメリカ, インドで栽培が盛んであり, その生産量は世界で約 58 万トンと報告されている (FAO 2010). また, 根朽病抵抗性 (Sacristan and Gerdemann 1986) や重金属耐性 (Zhu *et al.* 1999), 病原菌抑止効果 (Angus *et al.* 1994) など, ナタネにはない

農業上の有用特性をもっている.

これまでに, B ゲノムのもつ有用特性をナタネに導入する目的で, ナタネ×クロガラシ (*Brassica nigra*, $2n=16$, BB) (Meng and Liu 1987) やナタネ×カラシナの交雑 (Roy 1978) が進められてきた. クロガラシとの組合せでは, 雑種を得ることがかなり困難である (Meng and Liu 1987) が, カラシナとの交雑は比較的容易である (Roy 1978) ことが知られている. 一方, 遺伝子組換えナタネが育成されて以来, ナタネとカラシナの 2 種間での交雑による導入遺伝子のカラシナへの遺伝子浸透が問題になっており (Scheffler and Dale 1994, Tsuda *et al.* 2011), その後代植物への遺伝子浸透についての研究が進められている (Tsuda *et al.* 2011).

アブラナ科の種属間交雑では, 減数分裂時の染色体対合による組換えを通して, 有用形質を一方の種から他方の種に導入することが試みられてきた (清水ら 1962). さらに, F_1 雑種植物の染色体対合状況の観察から, ゲノムや染色体間の類縁性についても明らかにされてきた (水島 1952). また, 雑種植物に連続戻し交雑を行うことにより異種染色体を添加した系統を作出することで, 形質

を他種へ導入する研究も行われている。その例として、C ゲノム染色体を添加した一染色体添加型系統 (Monosomic Addition Line: MAL) (*Raphanus sativus* - *Brassica oleracea*, 金子ら 1987 や *Brassica rapa* - *B. oleracea*, Quiros *et al.* 1987) をはじめとして、B ゲノム染色体を添加した *B. napus* - *B. nigra* (Jahier *et al.* 1989, Chèvre *et al.* 1997), *B. oleracea* - *B. nigra* (Chèvre *et al.* 1997) や A ゲノム染色体を添加した *R. sativus* - *B. rapa* (Kaneko *et al.* 2001), 異なる属である *Raphanus* 属の染色体を添加した系統の *B. napus* - *R. sativus* (Akaba *et al.* 2009a) など多くの染色体添加系統が作出されている。

染色体添加系統は、異種ゲノム染色体のもつ病気抵抗性など有用形質を有する染色体および遺伝子を同定するための有効な材料である (Zhu *et al.* 1993, Chèvre *et al.* 1996, Akaba *et al.* 2009b)。しかし、B ゲノム染色体添加系統の作出例は数例のみ (Jahier *et al.* 1989, Struss *et al.* 1991, Chèvre *et al.* 1997, Li *et al.* 2008, Navabi *et al.* 2011) であり、B ゲノムの全染色体 8 種類の添加型植物を全て作出した例はない。また、これまでの研究では、作出できた MAL の細胞遺伝学的調査が中心であり、それぞれの添加染色体が有する形態学的特性や生理学的特性についての研究も Navabi *et al.* (2011) の *Brassica carinata* × *B. napus* 後代における B ゲノム染色体に関する分子遺伝学的調査や形態学的特性の報告があるに過ぎない。

そこで、本研究は、ナタネとカラシナ間の正逆交雑からナタネの細胞質およびカラシナの細胞質をもつ MAL の作出を試み、2 種類の細胞質をもつ MAL の形態学的特性や生理学的特性、B ゲノム染色体と細胞質間の相互作用および各 B ゲノム染色体の特性を明らかにし、今後の *Brassica* 作物育種への基礎的知見を得ようとした。

材料および方法

1. 植物材料

交雑親に用いたナタネ系統は東北大学植物育種学研究室から分譲され、宇都宮大学植物育種学研究室で継代してきた 'N-350' 系統を用いた。カラシナは、栃木市永野川の河原に自生していた生育良好な個体を宇都宮大学の圃場で採種した '永野川' 系統を用いた。また、比較のために用いたクロガラシ 'Ni-121' 系統は東北大学から分譲されたものを当研究室で継代しているものである。なお、雑種後代植物を得るための反復親にはナタネ 'N-350' 系統を用いた。細胞質の識別には、以上の 3 品種のほか、タキイ種苗より購入したものを当研究室で継代しているカブ '聖護院'、キャベツ '富士早生' を用いた。

2. B ゲノム一染色体添加型ナタネ (MAL) の作出

ナタネとカラシナとの正逆交雑後代からカラシナ由来の B ゲノム一染色体を添加した同質細胞質、および異質

Fig. 1. Schematic diagram for the production of Monosomic Addition Lines (MAL) of autoplasmic and alloplasmic *Brassica napus* with each B genome chromosome.

細胞質系統の MAL の育成した過程を、Fig. 1 に示した。本研究では、ナタネを種子親に、カラシナを花粉親として用いた F₁ 植物に、ナタネを 2~3 回戻し交雑して得たナタネ細胞質をもつ系統を同質細胞質系統、カラシナ × ナタネの F₁ 植物 (逆交雑) にナタネを戻し交雑して育成したカラシナ細胞質をもつ系統を、異質細胞質系統と称した。

植物材料の育成は、毎世代ビニールハウスで行った。9 月上旬に直径 6 cm のポリポットに播種し、第 4 葉期頃に 12 cm のポットへ仮植後、第 8 葉期頃に 6 号 (18 cm) の素焼鉢へ定植した。毎世代の交配は蕾受粉法により行った。

F₁ 雑種植物の選抜は、B ゲノム共通の特異配列である 329 bp (Gupta *et al.* 1992, Schelfhout *et al.* 2004) の有無を、Gupta *et al.* (1992) の方法で確認し、葉の形、花の大きさなど形態学的特性を両親植物と比較して行った。PCR 条件は Schelfhout *et al.* (2004) の方法に従った。

BC₁ 世代以降において、B ゲノム染色体添加型植物の選抜は Pradhan *et al.* (2003) の作出したカラシナの B ゲノム染色体に特異的な SSR マーカーを用いた。ゲノム DNA は若葉を用いた C-TAB 法によって抽出した。DNA の増幅は、30 ng ゲノム DNA, 0.5 μM プライマー, 0.2 mM dNTPs (TOYOBO, Osaka, Japan), 1× Dream Taq Buffer, 0.5 U の Taq polymerase (Fermentas, Helsingborg, Sweden) の組成による全 10 μl の混合液で行った。Pradhan *et al.* (2003) の連鎖地図の B ゲノム染色体を a から h と称し、それら a から h 染色体上の全 35 種類のプライマーからスクリーニングし、カラシナの B ゲノム特異マーカーが検出できた再現性のある 18 プライマーを選抜した。プライマーは以下のものを使用した。Ni4H03 (a 染色体), Ni2A01 (a), Ni2A10 (b), Ni4D04 (c), Ni4A09 (c), Ni4B06 (d), Ni4G10 (e), Ni3C05 (e), Ni4A10 (f), Ni4E03 (g), Ni2A07 (g), Ni4B10 (g), Ni4H09 (h), Ni2B07 (h), Ni4C11 (h), Ni4D12 (h), Ni2C08 (h), Ni2A08 (h)。PCR 条件は Padmaja *et al.* (2005) に従って行い、増幅には Gene Amp®PCR System 9700

(Applied Biosystems) を使用した。増幅産物は 2%アгарースゲルで電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射により観察した (Mupid-Scope WD, 株式会社アドバンス)。

BC₂ 世代における MAL の作出のために、8 種類の B ゲノムの染色体のいずれかが添加されているように BC₂ 種子群を選んだ。同質細胞質系統は 8 種類の染色体のうちいずれか数本の染色体を有している個体群 (2n=40~45) を選び、全ての染色体が網羅されている組合せとした。同様に、異質細胞質系統でも f+h などの 2 種類をもつ 2n=40, a+d+g あるいは b+c+d の 3 種類の染色体をもつ 2n=41, a, b, g 以外の 5 種類の染色体をもつ 2n=43 (c+d+e+f+h) というように 8 種類ずつが得られるようなものを用いた。

また、同質および異質細胞質系統の細胞質を識別するために、葉緑体 DNA 上の 3 か所の非コード領域に設計した 3 種類のプライマーセット (trnH-psbA, psbA-trnK, trnL-trnF) を用いて PCR を行った。プライマーの配列を以下に示す。trnH-psbA f: 5'-GAA CGA CGG GAA TTG AAC C-3', trnH-psbA r: 5'-TGC TGT TGA GGC TCC ATC TA-3', psbA-trnK f: 5'-CAA AAC ACC AAA CCA TCC AA-3', psbA-trnK r: 5'-TCG AGT GCG AAT TTG GTA TT-3', trnL-trnF f: 5'-AAT CGT GAG GGT TCA AGT CC-3', trnL-trnF r: 5'-TGG TGA CAC GAG GAT TTT A-3'。PCR 混合液の組成および PCR 条件は Tsutsui *et al.* (2011) に従って行い、正逆交雑由来の MAL, ナタネ, カラシナ, クロガラシ以外にカブ '聖護院', キャベツ '富士早生' を比較として用いた。PCR 産物は ExoSAP-IT (General Electronic Company, illustra, UK) を用いて精製し、Big Dye Terminator (Applied Biosystems, CA, USA) を使用し、Applied Biosystems 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems) によりシーケンス反応を行った。その後、得られた塩基配列は Clustal W (Thompson *et al.* 1994) を用いてアラインメントを行い、MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007) を用いた近隣接合 (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作成し、細胞質ゲノムを明らかにした。

3. 同質および異質細胞質をもつ MAL の形態学的・生理学的・細胞遺伝学的特性と添加染色体の伝達率

形態学的特性および生理学的特性については、発芽率、葉色、分枝数、抽苔性、花径、雌蕊と雄蕊の長さ、莢の形態、千粒重等について調査した。発芽率は、各系統約 50 粒を播種し、1 週間後の発芽数から算出した。葉色、葉のろう質の有無は、生育中期の観察により判断した。分枝数は、開花最盛期に主茎から直接分枝した数を調査した。抽苔性は、蕾の形成が確認できた日を抽苔始めとし、播種から抽苔までの日数を抽苔迄日数として平均値を算出した。花粉母細胞の減数分裂における染色体観察は、1%アセトオルセインなすりつけ法による。花粉稔性は、開花最盛期の花粉を用い、酢酸カーミンで濃染さ

れた花粉を生存花粉とみなし、合計 500 粒から生存花粉率を算出した。花器形態については、開花直後の花径、雌蕊、長さの雄蕊の長さを調査した。莢の長さとは莢の幅は交配 4 週間後にノギスを用いて 10 莢ずつ調査した。なお、莢の幅は莢の中央部分の最も太い部分を測定した。種子稔性は、交配花あたり採種できた充実種子数 (交配花あたりの種子数) で算出した。形態学的特性および生理学的特性は、各系統 1~6 個体を用いて調査した。また、各処理群の差の検定には、Tukey-Kramer の多重検定を用いた。

次世代 (BC₃) への添加染色体の伝達率は、前世代 (BC₂) 植物から得られた種子を用いて、各添加染色体を同定したマーカーが検出された個体数/調査個体数×100 で算出した。

結 果

1. 同質および異質細胞質をもつ MAL の育成と同定

ナタネとカラシナ間の正逆種間交雑における種子獲得状況を Table 1 に示した。交配花あたりの種子数は、ナタネを種子親にした場合 3.67 粒であり、カラシナを種子親にした場合 11.3 粒と、正交雑に比べて多くの種子が得られた。特に逆交雑の組合せでは、両親種のきょうだい間交配による種子稔性 (ナタネ: 17.8 粒およびカラシナ: 6.39 粒) と比較すると中間の値であった。ナタネ×カラシナ (F₁-NJ) で 45 粒、カラシナ×ナタネ (F₁-JN) で 35 粒の F₁ 種子を播種したところ、F₁-NJ では 37 個体、F₁-JN から 34 個体が得られた。形態学的特性と B ゲノム特異マーカーの検出から、F₁-NJ の 34 個体が種間雑種であった。残りの 3 個体は B ゲノム特異マーカーが検出されず、葉の形態がナタネに類似していたことから偽雑種と判断した。一方、F₁-JN では、育成した 34 個体すべてが雑種であった。このうち、F₁-NJ の 6 個体および F₁-JN の 4 個体を用いてナタネと戻し交雑したところ、いずれも種子稔性が非常に低く (0.09 粒と 0.11 粒)、BC₁ 種子を得ることが困難であった (Table 1)。また、ナタネを種子親に F₁ 植物を花粉親として用いた場合も、同様に種子稔性は低かった (0.13 粒と 0.18 粒)。

Pradhan *et al.* (2003) が作成したカラシナ連鎖地図上の B ゲノム特異 SSR マーカーを用いて B ゲノム染色体を同定することにより (Fig. 2), BC₁ 植物の染色体数とその出現頻度を Table 2 に示した。BC₁ 植物の染色体数は同質細胞質系統では、B ゲノム染色体に特異的な SSR マーカーが全くみられない 2n=38 から、7 種類の B ゲノム染色体が含まれる 2n=45 の植物まで多様な系統が得られた。このうち、2n=42 と 2n=43 がそれぞれ 13 個体出現し (それぞれ 27.1%), 最も高頻度であった。一方、異質細胞質系統では 2n=39~45 の染色体数の植物が出現し、2n=42 と 2n=43 が、それぞれ 24.1% と最も多く得られた。このことから、BC₁ 植物では、両細胞質系統とも 4~5 本

Table 1. Cross combinations and seed setting in reciprocal interspecific crosses between *B. napus* and *B. juncea* and their progenies

Cross combination (♀×♂)	No. of pistillate parent plants	No. of flowers pollinated	No. of seeds obtained	Seed setting ¹⁾
<i>B. napus</i> (N) × <i>B. juncea</i> (J)	8	358	1432	3.67±2.18
<i>B. juncea</i> (J) × <i>B. napus</i> (N)	2	266	3024	11.30±2.19
F ₁ -NJ ²⁾ × <i>B. napus</i>	6	563	57	0.09±0.05
F ₁ -JN ³⁾ × <i>B. napus</i>	4	520	56	0.11±0.03
<i>B. napus</i> × F ₁ -NJ	8	1166	170	0.13±0.07
<i>B. napus</i> × F ₁ -JN	6	652	109	0.18±0.12
<i>B. napus</i> sibcross	1	26	464	17.80
<i>B. juncea</i> sibcross	1	28	179	6.39

¹⁾ Mean±SD²⁾ F₁-NJ is the F₁ plant obtained from interspecific crosses of *B. napus* × *B. juncea*.³⁾ F₁-JN is the F₁ plant obtained from interspecific crosses of *B. juncea* × *B. napus*.**Table 2.** Distribution of chromosome numbers in the BC₁ plants by the detection of B-genome chromosome specific SSR markers

Line	Rate	No. of plants observed	2n							
			38	39	40	41	42	43	44	45
autoplasmic		48	4	2	7	4	13	13	3	2
	(%)	(100.0)	(8.3)	(4.2)	(14.5)	(8.3)	(27.1)	(27.1)	(6.3)	(4.2)
alloplasmic		54	0	3	4	6	13	13	10	5
	(%)	(100.0)	(0)	(5.6)	(7.3)	(11.1)	(24.1)	(24.1)	(18.5)	(9.3)

Fig. 2. Identification of B-genome chromosome using the B-genome specific marker. M, size marker; 1, *B. napus* strain 'N-350' (AACC, 2n=38); 2–7 and 9, Plants without d chromosome; 8 and 10, Plants added d chromosome; 11, *B. juncea* strain 'Naganogawa' (AABB, 2n=36); 12, *B. nigra* strain 'Ni-121' (BB, 2n=18). Arrow indicates d-type specific SSR marker in B genome chromosome (126 bp).

の B ゲノム染色体添加型植物が出現しやすい可能性が示された。

BC₁ 世代では、2n=39 の B ゲノム一染色体添加型ナタネが、同質細胞質系統で 2 個体、異質細胞質系統で 3 個体得られた (Table 2)。さらに、MAL を得るために、2n=40~43 の BC₁ 個体から BC₂ 世代を展開し、BC₂ 世代で出現した MAL の添加染色体のタイプ別出現率を BC₁ とともに Table 3 にまとめた。BC₁ 世代で得られた MAL は、同質細胞質系統では g タイプと h タイプ、異質細胞質系統では b タイプ、d タイプおよび h タイプと、両系統で 4 タイプ (b, d, g, h) が得られた。

BC₂ 世代における各 MAL の出現割合は 0% から 8.8% であり、特に c タイプ (同質細胞質系統で 4.3%, 異質細胞質系統では 3.3%) と d タイプ (同 4.3%, 8.8%) は、両細胞質系統ともに比較的高い出現率を示した。一方、a タイプは異質細胞質系統からの 2 個体のみ、e タイプは同質細胞質系統からの 2 個体のみが出現したように、MAL のタイプによっては、一方の細胞質系統から得られ

たものもあった。また、f タイプはどちらの細胞質系統からも得られなかった。以上の結果から、両細胞質系統からの MAL を総合すると、f タイプを除く 7 タイプが得られた。MAL の出現率を世代間で比較してみると、BC₁ 世代では同質細胞質系統と異質細胞質系統でそれぞれ 0.23% と 0.34% であるが、核内の B ゲノム添加染色体がかなり少なくなった BC₂ になると、2.10% と 2.39% となりやや高い出現率を示すことが明らかになった。

同質および異質細胞質をもつ MAL の細胞質の由来を確認するため、葉緑体 DNA の由来を調査した結果が Fig. 3 である。作出した 2 種類の細胞質系統の MAL は異なるクラスターを形成し、種子親と同じグループに属した。したがって同質細胞質系統は C ゲノム細胞質、異質細胞質は A ゲノム細胞質であることが明らかになった。

2. 同質細胞質および異質細胞質をもつ MAL の形態学的特性と生理学的特性

同質細胞質および異質細胞質をもつ MAL の形態学的特性および生理学的特性を Table 4 に示した。発芽率は、同質細胞質系統の b タイプ (35.0%) を除いてほとんどが高かった。葉色は、d タイプと g タイプが比較的明るい緑色を呈した。ろう質はナタネにみられカラシナにはみられない特徴であるが、g タイプは両細胞質系統ともにろう質が少なかった。分枝数は、両細胞質系統ともに b タイプが多く、クロガラシやカラシナのもつ分枝に類似していた (Fig. 4D)。一方、c タイプと d タイプの分枝数は、両細胞質系統ともナタネのように比較的少なかった (Fig. 4E)。抽苔迄日数は、カラシナとクロガラシでそれぞれ 88 日あるいは 93 日と非常に早かったが、ナタネは 134 日であった。添加型の抽苔迄日数は、同質細胞質

Table 3. Monosomic Addition Line (MAL) types ($2n=39$, AACCC+1b) derived from the F_1 or BC_1 plants ($2n=40\sim43$) by backcrossed with the *B. napus*

	Generation	No. of MAL plants obtained	No. of plants in each type with B-genome chromosome								Mean
			a	b	c	d	e	f	g	h	
autoplasmic line	BC_1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	0.23
	(%)	(100.0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0.9)	(0.9)	
	BC_2	35	0	4	9	9	2	0	3	8	2.10
	(%)	(100.0)	(0)	(1.9)	(4.3)	(4.3)	(1.0)	(0)	(1.4)	(3.9)	
alloplasmic line	BC_1	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0.34
	(%)	(100.0)	(0)	(0.9)	(0)	(0.9)	(0)	(0)	(0)	(0.9)	
	BC_2	40	2	7	7	19	0	0	4	1	2.39
	(%)	(100.0)	(0.9)	(3.3)	(3.3)	(8.8)	(0)	(0)	(1.9)	(0.9)

Fig. 3. Chloroplast genome similarity among autoplasmic and alloplasmic MAL and their parental species constructed by the NJ method.

系統の場合は d タイプと g タイプがカラシナに近く、b タイプと e タイプは遅い傾向がみられた。一方、異質細胞質系統の c タイプと d タイプは早く、a タイプ、g タイプ、h タイプはナタネよりも遅かった。したがって、抽苔迄日数は MAL のタイプや細胞質の違いで差異がみられたが、d タイプは両細胞質系統ともに早い傾向であった。花器形態については、g タイプの花径はカラシナと同様小さく、雌蕊や雄蕊の長さも短く、カラシナに似た特性を示した。他のタイプの花径、雌蕊の長さなどの花器各部の形態はナタネと同様かナタネより大きい値を示

した。莢の長さや幅は、それぞれ同質細胞質の g タイプと h タイプが比較的カラシナに類似している傾向がみられたが、異質細胞質系統では、b タイプが短い傾向にあった。千粒重は、ナタネが 4.77 g に比べてカラシナが 2.48 g と値が小さいが、同質細胞質系統の b タイプや c タイプもカラシナと同程度の重さであった。花粉稔性は、同質細胞質系統の b タイプ、g タイプと h タイプは 73.2～78.9% とナタネやカラシナより低い傾向であったが、異質細胞質系統では有意に低いタイプは認められなかった。一方、種子稔性においては、a タイプで最も高く（受粉花あたり 13.8 粒）、同質細胞質系統の b タイプ、g タイプおよび h タイプは低かった。また、異質細胞質系統の方が稔実性は高い傾向であった。

以上のことから、g タイプにはろう質の低下、花器の大きさの小形化など、カラシナの B ゲノム染色体によって発現すると思われる形質が現れていると考えられた。また、b タイプは分枝数が高くなる特性に関与することが考えられた。d タイプは早い抽苔特性を示したことから、カラシナの抽苔性に関する特性が現れていると考えられた。しかし、c タイプおよび d タイプの形態学的特性においては、ナタネとの違いがほとんどみられないことから、B ゲノム染色体の影響が比較的少ないタイプであることが示唆された。

Fig. 4. Morphological characteristics of MAL plants and parental species. A: *Brassica napus* ($2n=38$), B: *Brassica juncea* ($2n=36$), C: *Brassica nigra* ($2n=16$), D: b-type of MAL (alloplasmic line; $2n=39$), E: d-type of MAL (autoplasmic line; $2n=39$).

Table 4. Morphological and physiological characteristics of autoplasmic and alloplasmic MALs

Type	Germination rate (%)	Leaf color	Leaf wax	Branching	Bolting (day)	flower diameter			Stamen length	Pistil length		Pod length (cm)	Pod width (cm)	1000 seed weight (g)	Pollen fertility (%)	Seed setting ⁶⁾
						A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾		D ⁴⁾	E ⁵⁾					
autoplasmic																
b	35.0	Yellow green	++	15.2±0.3	120±8.6	1.60 ^{abc}	1.43 ^{ab}	0.90 ^{bc}	0.70 ^b	0.74 ^a	0.74 ^a	3.74±0.52 ^{bd}	0.37±0.05 ^{ef}	3.53±1.09 ^{cd}	73.2±19.5 ^c	1.77±0.36 ^d
c	90.8	Dark green	++	7.9±1.2	107±4.4	1.55 ^{bc}	1.43 ^{ab}	0.91 ^{bc}	0.72 ^b	0.83 ^a	0.83 ^a	4.33±1.70 ^{bc}	0.33±0.05 ^f	2.88±0.30 ^{de}	89.8±10.1 ^{ab}	5.72±5.61 ^{cd}
d	96.7	Light green	++	7.6±2.2	97±2.4	1.52 ^{bc}	1.32 ^b	0.75 ^{de}	0.51 ^c	0.63 ^b	0.63 ^b	3.59±0.43 ^{bd}	0.43±0.05 ^{cd}	5.08±0.28 ^{ab}	87.6±15.4 ^{abc}	6.57±6.76 ^{cd}
e	95.0	Green	++	11.6±3.8	153±3.6	1.52 ^{bc}	1.42 ^{ab}	1.01 ^{ab}	0.60 ^b	0.74 ^a	0.74 ^a	3.63±0.97 ^e	0.48±0.06 ^{bc}	5.43±0.31 ^a	92.9±4.20 ^{ab}	5.29±3.10 ^{cd}
g	73.3	Yellow green	+	8.0	92	1.31 ^d	1.20 ^c	0.82 ^{cd}	0.62 ^b	0.52 ^b	0.52 ^b	2.80±0.46 ^{de}	0.37±0.06 ^{ef}	5.19 ^{ab}	78.6 ^{bc}	2.14 ^d
h	93.3	Green	++	9.5±4.2	111±3.8	1.73 ^a	1.50 ^a	1.10 ^a	0.83 ^{ab}	0.80 ^a	0.80 ^a	2.90±0.52 ^e	0.33±0.05 ^f	4.40±0.49 ^{bc}	78.9±11.4 ^{bc}	0.78±0.81 ^d
alloplasmic																
a	100.0	Yellow green	+	5.0±2.6	153±6.3	1.65 ^{ab}	1.44 ^{ab}	0.91 ^{bc}	0.75 ^{ab}	0.75 ^a	0.75 ^a	5.91±0.56 ^a	0.52±0.04 ^b	5.00±0.37 ^{ab}	95.3±1.30 ^{ab}	13.8±3.57 ^b
b	96.7	Dark green	++	13.0±3.5	101±2.7	1.72 ^a	1.32 ^b	0.85 ^{cd}	0.71 ^b	0.72 ^a	0.72 ^a	2.92±0.77 ^e	0.44±0.05 ^{cd}	3.80±0.58 ^{cd}	82.6±7.10 ^{abc}	4.43±3.47 ^{cd}
c	100.0	Green	++	7.3±2.2	75±3.6	1.60 ^{abc}	1.32 ^b	0.95 ^{ab}	0.85 ^a	0.73 ^a	0.73 ^a	3.57±0.88 ^{bd}	0.41±0.08 ^{de}	4.30±0.65 ^{bc}	86.0±12.7 ^{abc}	5.16±2.43 ^{cd}
d	100.0	Light green	++	5.8±1.3	80±4.6	1.71 ^a	1.41 ^{ab}	1.00 ^{ab}	0.80 ^{ab}	0.82 ^a	0.82 ^a	4.70±1.23 ^b	0.47±0.05 ^{bc}	4.20±1.24 ^{bc}	87.7±8.40 ^{abc}	5.06±2.46 ^{cd}
g	93.3	Yellow green	+	12.0±2.6	148±5.8	1.12 ^e	1.00 ^d	0.65 ^e	0.52 ^c	0.55 ^{bc}	0.55 ^{bc}	4.38±0.38 ^{bc}	0.53±0.05 ^b	4.00±0.31 ^{cd}	84.1±9.90 ^{abc}	8.40±3.90 ^c
h	93.3	Green	++	7.5	151	1.45 ^{cd}	1.33 ^b	0.92 ^{bc}	0.73 ^b	0.73 ^a	0.73 ^a	3.62±0.68 ^{bd}	0.46±0.09 ^{cd}	5.37 ^a	86.9 ^{abc}	3.83 ^{cd}
<i>Brassica napus</i>	100.0	Green	++	8.0±2.0	134±2.2	1.52 ^{bc}	1.33 ^b	0.80 ^{cd}	0.73 ^b	0.60 ^b	0.60 ^b	4.88±0.22 ^b	0.58±0.05 ^a	4.77 ^{ab}	98.8±0.37 ^a	17.8 ^a
<i>Brassica juncea</i>	95.0	Dark green	—	13.0±1.8	88±5.6	1.11 ^e	0.65 ^e	0.70 ^e	0.55 ^c	0.55 ^{bc}	0.55 ^{bc}	3.39±1.13 ^{cde}	0.32±0.05 ^f	2.48 ^e	99.3±0.37 ^a	6.39 ^{cd}
<i>Brassica nigra</i>	100.0	Light green	—	22.3±0.5	93±2.2	0.90 ^f	0.65 ^e	0.52 ^f	0.40 ^d	0.45 ^c	0.45 ^c	1.48±0.13 ^f	0.24±0.04 ^g	1.14 ^f	95.3±0.36 ^{ab}	1.55 ^d

Numbers in the same column followed by the different letters are significantly different at P=0.05 according to Tukey-Kramer's multiple range test.

^{1,2)} A and B shows the diameter of the length and breadth of the flower.

^{3,4)} C and D shows the length of a long and short filament to the tip of anther.

⁵⁾ E shows the length from the top of the nectary to the tip of the stigma.

⁶⁾ Number of seed per pollinated flower.

Table 5. Chromosome behavior at meiosis of PMCs in MALs

Line	Type	Number of PMCs observed	Chromosome configuration of M I				Number of nuclear plates observed	Chromosome number at M II					Frequency of pollen tetrads (%)
			IV	III	II	I		15	16	17	18	19	
autoplasmic	b	16			18.9	1.10	50			3	13	34	92.2
	c	30			17.7	1.10	30		1	2	4	23	92.9
	d	27			19.0	1.10	16	1			3	12	95.8
	e	58			18.9	1.20	11			1	6	4	97.3
	g	40	0.05	0.025	18.6	1.58	24			4	10	10	79.4
	h	20			19.0	1.00	31			1	6	24	92.5
alloplasmic	a	30			18.9	1.27	66			1	18	47	96.8
	b	28			19.0	1.07	46		1	2	5	38	92.7
	c	29		0.030	18.9	1.10	28			1	6	21	85.2
	d	20			19.0	1.00	21				3	18	94.0
	g	17			18.7	1.59	25			1	4	20	93.5
	h	26	0.19		18.6	1.00	18				4	14	97.5

3. MAL の花粉母細胞減数分裂期における染色体行動と伝達率

MAL の減数分裂期における染色体行動を Table 5 および Fig. 5 に示した. 花粉母細胞減数分裂第一分裂中期 (PMC, MI) における染色体対合は, 大部分が $19_{II}+1_I$ であった (Fig. 5A). III価やIV価染色体のような多価を形成する割合は低かったものの, 同質細胞質系統の g タイプ, 異質細胞質系統の c タイプおよび h タイプでは低頻度ながら多価染色体が観察された. したがって, 一部の B ゲノムの添加染色体では対合もみられるが, 多くの染色体はナタネの A および C ゲノム染色体とは対合し難いことが明らかになった. 第二分裂中期 (MII) の核板における染色体数は $n=15$ から 19 がみられたが, $n=19$ の細胞 (Fig. 5B) が最も多く観察された. しかし Fig. 5C のように遅滞染色体もある程度観察され, BC_2 世代では核内がまだ不安定な状態を示すものもあった. Fig. 5D のように花粉四分子数を調査し算出した花粉四分子率は, 同質細胞質系統の g タイプの 79.4%から異質細胞質系統の h タイプの 97.5%を示し, 同質細胞質系の g タイプでは多分子を形成した.

BC_2 世代で同定した MAL の BC_3 世代における B ゲノム添加染色体の伝達率を, Table 6 に示した. 同質細胞質系統では, どのタイプも異質細胞質より高い伝達率を示した. 異質細胞質系統の a タイプと g タイプはともに約 2%と最も低く, 同質細胞質系統でも g タイプは最も低かった. また, c タイプと d タイプは 21%と 25%と, 同質細胞質系統の c タイプおよび d タイプと同様に最も高かった. これらのことから, 両細胞質ともに, c タイプと d タイプは高い伝達率であり, g タイプは低いことが明らかになった. しかし, 全 7 タイプの MAL が細胞質の系統にもよるが, ある程度の種子稔性を示したこと (Table 4) と, 次代へ伝達したことから, MAL は, 一部のタイプを除き維持できることが明らかになった.

Fig. 5. The chromosome behavior at meiosis of PMCs in the MAL plant ($2n=39$). A: The b-type of autoplasmic MAL showing the $19_{II}+1_I$ at metaphase I. Arrow shows the added B-genome chromosome of *B. juncea*, B: Metaphase II in the a-type alloplasmic MAL, C: Lagging chromosomes showing the h-type autoplasmic MAL, D: Pollen tetrads in the c-type alloplasmic MAL.

Table 6. Female transmission rate of each B-genome chromosome in the autoplasmic and alloplasmic MALs in BC_3 generation

Line	Type	Number of plants observed	Number of MAL plants	Transmission rate of MAL (%)
autoplasmic	b	24	5	20.8
	c	33	12	36.4
	d	26	9	34.6
	e	36	5	13.9
	g	41	2	4.9
	h	27	2	7.4
alloplasmic	a	54	1	1.9
	b	57	4	7.0
	c	48	12	25.0
	d	28	6	21.4
	g	49	1	2.0
	h	27	2	7.4

考 察

異種染色体添加系統は、異種染色体の影響によって種子親にはみられない独特の形質が表れるため、異種染色体のもつ特性を解明することができる (Khush 1973). 特性を明らかにする目的で、B ゲノムを *Brassica* 栽培種に導入した例は、これまでに Jahier *et al.* (1989), Struss *et al.* (1991), Chèvre *et al.* (1997), Li *et al.* (2008), Navabi *et al.* (2011) などが報告されているが、いずれの場合も添加染色体による特性や形質への影響についての情報が少ない. また Navabi *et al.* (2011) 以外についてはタイプ分けもなされておらず、どの B ゲノム染色体が添加されているのか識別がなされていないため、相互比較も困難である. 本研究では、添加型植物作出の際に、Pradhan *et al.* (2003) の連鎖地図をもとにして添加型植物のタイプ分けを行っている. そのためデータベース上の染色体情報と照合が可能であり、他の添加型植物との比較が容易であるという利点をもつ. また今後は、MAL のタイプと連鎖地図の染色体を連携できる可能性もある.

本研究で行ったナタネとカラシナ間の交雑は、ナタネと *B. nigra* (2n=16, BB) 間の交雑 (種子稔性; 0%–1.9%, Kerlan *et al.* 1992) や *Brassica carinata* (2n=34, BBCC) 間の雑種作出能力 (種子稔性; 0.08, Getinet *et al.* 1997) に比べて高く、ナタネとカラシナの正逆交雑 F₁ 雑種の育成は非常に容易であった (交配花あたり 3.67 粒および 11.3 粒). しかし、F₁ 植物の稔性は極端に低く、BC₁ 後代植物の作出が困難であった (同 0.09 と 0.11 粒). また F₁ 植物を花粉親に用いても稔性は低かった (Table 1). これは F₁ 雑種植物が雌性配偶子だけでなく雌性配偶子においてもナタネ配偶子との親和性が低いことを示唆している.

BC₁ 植物にナタネを戻し交雑して得られた BC₂ 世代では、2n=38 から 2n=45 までの植物が出現したことから、BC₁ 世代ではナタネを基本ゲノム (AC, n=19) としながらも、B ゲノム染色体をある程度有する配偶子が受精に至ったものと考えられた. また、本研究における結果では、B ゲノムが 4~5 本含まれている個体が全体の半分を占めていた (Table 2) が、Struss *et al.* (1991) が MAL 作出時に、2n=38~46 の BC₁ 植物が出現していることから、BC₁ 世代で添加されやすい染色体が存在する可能性がある.

2 種類の *Raphanobrassica* (RRCC, 2n=36, RRAA, 2n=38) × *Raphanus sativus* (RR, 2n=18) の後代に *R. sativus* を戻し交雑して得た RRC×RR (金子ら 1987) や RRA×RR (Kaneko *et al.* 2001) では、戻し交雑過程で C ゲノムや A ゲノムの染色体が比較的早く消失し、BC₂ 世代で MAL が育成できることを述べている. 一方、金子ら (1999) は AABB×AA では相当数の F₁ 植物 (AAB, 2n=28, 交配花あたり 4.42 粒) ができるものの、その次代である AAB×AA の種子稔性は極めて低く (交配花あたり 0.08 粒)、その後代の展開が難しいことを示している. さらに、*B. oleracea*

(CC, 2n=18) × *B. nigra* の後代に *B. oleracea* を戻し交雑して得た CCB×CC の組合せでは、添加染色体が 4 本以上含まれる個体が 80%以上出現するが、BC₂ 世代では一染色体添加型植物が得にくいことを指摘している. このことから、単一ゲノム種に B ゲノム染色体を添加した植物を育成することは困難であることが示唆されていた. しかし、本研究で、ナタネ (2n=38, AACC) を遺伝的背景に用いた場合添加系統が得られ、F₁ 世代では低い稔性であったものの、BC₁ および BC₂ 世代では稔性が回復した (データ未掲載). これは、*B. rapa* (AA, 2n=20) × *R. sativus* から得られる二基三倍体 (AAR, 2n=29) では、ダイコン染色体の添加系統は極めてできにくい (Dolstra 1982), *B. napus* × *R. sativus* により作出された 2 種類の *Raphanobrassica* にナタネを戻し交雑した場合は、全 9 種類の添加型植物が作出できている (Akaba *et al.* 2009a). また現在報告されている B ゲノムの MAL においても、ナタネを遺伝的背景としている例が多い (Jahier *et al.* 1989, Struss *et al.* 1991). したがって、ナタネのような複二倍体植物では、添加染色体が遺伝的背景種に影響されにくいと考えられた. しかしながら、本研究の MAL の出現率や伝達率は R ゲノム染色体を添加させた Akaba *et al.* (2009a) の MAL の出現率 (平均 11.9%) と比べると、全体的に低いことから、B ゲノム染色体を添加させた MAL の作出は容易でなく、B ゲノムの添加系統の育成が少なかった理由の一つとも考えられる.

現在までに、一染色体添加型植物の完全な 1 シリーズの育成は少なく、B ゲノムの MAL においても育成されていない. この理由として、Bang *et al.* (2002) は種子稔性や添加染色体の伝達率の低下をひきおこす染色体が存在し、それが MAL 作出時に脱落するためではないかと推察している. また Akaba *et al.* (2009a) は、染色体の中には胚発達の抑制に関する染色体が存在し、その染色体の作用によって植物体が生存しにくいことを報告している. したがって、本研究で f タイプが得られなかったのは、f 染色体が稔性に影響して得られなかったため、あるいは早々に f 染色体だけが脱落してしまうためなどの理由が考えられるが、今のところ明確でない.

BC₂ 世代では、同質細胞質系統では B ゲノム染色体 a~h の 8 種類のうち a と f を除く 6 種類が、異質細胞質系統では e と f を除く 6 種類、添加された染色体の種類では合計 7 種類の MAL が同定できた (Table 3, 4, 5). これらの MAL の減数分裂時の染色体対合と、形態学的特性および生理学的特性調査の結果から、多くのタイプで 19_{II}+1_I を示し (Table 5)、安定した二価染色体が形成され、添加染色体は一価染色体として存在していた. g タイプおよび h タイプにおいては、葉表面がろう質を欠き、花器や莢の大きさが小さいなどカラシナ特有の形態的特性を示した. 多価染色体の形成や遅滞染色体の存在、種子稔性が低い特性から、添加された B ゲノム染色体が大きく影響しているものと考えられた. さらに g タイプや h

タイプで多価対合が形成されていることから、これら 2 タイプの B ゲノム染色体と A または C ゲノム染色体間の組換えを通じた形質導入がおこり得ることも示唆された。また本研究で得られたこれらの 2 タイプは Li *et al.* (2008) の作出した 4 系統の MAL のうち、多価染色体を形成する 1 系統と同様の染色体が添加されているものと推察された。本研究で得られた対合結果は、大部分が安定した $19_{II}+1_I$ を形成し、B ゲノムは A や C ゲノムとの対合が少ないという Jahier *et al.* (1989) や Struss *et al.* (1991), Li *et al.* (2008) の作出した MAL の対合結果と一致している。

また、岩崎・細田 (1966) がカラシナ類の抽苔は、冬季における低温感温性よりむしろ日長に関する感光性によって花芽形成がおこると指摘しているが、本研究で抽苔迄日数が短く、B ゲノム種のもつ早期抽苔に関与している染色体であることが考えられた d タイプは、感光性に関与する遺伝子 (群) が座乗している可能性が示唆された。

Akaba *et al.* (2009a) はナタネとダイコンの細胞質をもつ同質細胞質および異質細胞質をもつ MAL を育成し、異質細胞質において雄性不稔や花器形態の異常を報告していることから、細胞質と添加染色体の関係が MAL の特性に影響を及ぼす可能性を示している。そこで、本研究では、細胞質の違いと形態、および生理学的特性との関係を明らかにするために、異なる 2 種類の細胞質をもつ MAL を作出した。本研究で作出した 2 種類の細胞質系統の MAL は、それぞれ C ゲノム細胞質をもつ系統と A ゲノム細胞質をもつ系統であったが (Fig. 4)、形態学的特性および生理学的特性に影響する明確な差異は両細胞質系統間で認められなかった。これは、C ゲノム細胞質を有する栽培ナタネも存在すること (Uchimiya and Wildman 1978) や、A ゲノムと C ゲノムは系統進化学的にもきわめて近いこと (Song *et al.* 1988) が示されていることから、これら 2 種の細胞質の違いによる差異は生じにくかったものと考えられた。

MAL は添加染色体のもつ有用形質の解析に有効であり、これまでに、MAL を利用して B ゲノムのもつ根朽病抵抗性を導入した (Chèvre *et al.* 1996) 例も報告されている。しかし、これまでに作出された B ゲノムの MAL はどの添加染色体が影響して有用形質が現れているのかについては不明確であった。また B ゲノムに特異的な辛味成分について MAL を用いた解析はなされておらず、関与する染色体や遺伝子について未知である。そこで MAL を用いた辛味成分に関与する染色体についての知見を得るため、現在成分分析を行っている。

本研究では、Pradhan *et al.* (2003) の連鎖地図をもとにして添加型植物のタイプ分けを行ったが、B ゲノムは現在公開されているマーカー数が少ないため、マーカーのさらなる開発および公開が必要とされる。Navabi *et al.* (2011) は B ゲノムのマーカーを開発し、*B. carinata* と

B. napus の交雑の後代植物における解析に用い、組換えを起こした 4 種類の B ゲノム染色体の断片が添加されている個体について調査している。現在それらのマーカーは非公開であるため活用できないが、今後は本研究で同定した B ゲノム染色体などの染色体レベルでの比較に用いることが可能と推察された。このように、汎用性の高いマーカーの開発により、MAL を利用した染色体情報の信頼性や利用性が高まるとともに、他の連鎖地図との対応も可能になり、B ゲノム染色体に関するより多くの情報が得られるものと期待される。

引用文献

- Akaba, M., Y. Kaneko, Y. Ito, T. Nakata, S.W. Bang and Y. Matsuzawa (2009a) Production and characterization of *Brassica napus-Raphanus sativus* monosomic addition lines mediated by the synthetic amphidiploid "*Raphanobrassica*." *Breed. Sci.* 59: 109–118.
- Akaba, M., Y. Kaneko, Y.K. Hatakeyama, M. Ishida, S.W. Bang and Y. Matsuzawa (2009b) Identification and evaluation of clubroot resistance of radish chromosome using a *Brassica napus-Raphanus sativus* monosomic addition line. *Breed. Sci.* 59: 203–206.
- Angus, J.F., P.A. Gardner, J.A. Kirkegaard and J.M. Desmarchelier (1994) Biofumigation: isothiosyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant Soil* 162: 107–112.
- Bang, S.W., Y. Kaneko, Y. Matsuzawa and K.S. Bang (2002) Breeding of *Moricandia arvensis* monosomic chromosome addition lines ($2n=19$) of alloplasmic (*M. arvensis*) *Raphanus sativus*. *Breed. Sci.* 52: 193–199.
- Chèvre, A.M., F. Eber, P. This, P. Barret, X. Tanguy, H. Brun, M. Delseny and M. Renard (1996) Characterization of *Brassica nigra* chromosomes and of blackleg resistance in *B. napus-B. nigra* addition lines. *Plant Breed.* 115: 113–118.
- Chèvre, A.M., F. Eber, P. Barret, P. Dupuy and J. Brace (1997) Identification of the different *Brassica nigra* chromosomes from both sets of *B. oleracea-B. nigra* and *B. napus-B. nigra* addition lines with a special emphasis on chromosome transmission and self-incompatibility. *Theor. Appl. Genet.* 94: 603–611.
- Dolstra, O. (1982) Synthesis and fertility of $\times$ *Brassicoraphanus* and ways of transferring *Raphanus* characters to *Brassica*. *Pudoc. Wageningen*. I11. *Agr. Res. Report.* 917: 1–90.
- FAOSTAT data (2010) <http://faostat3.fao.org/home/index.html>
- Getinet, A., G. Rakow, J.P. Raney and R.K. Downey (1997) Glucosinolate content in interspecific crosses of *Brassica carinata* with *B. juncea* and *B. napus*. *Plant Breed.* 116: 39–46.
- Gupta, V., G. Lakshmisita, M.S. Shaila, V. Jagannathan and M.S. Lakshmikumaran (1992) Characterization of species-specific repeated DNA sequences from *B. nigra*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 397–402.
- Harbans, L.B. and A.H. Anwar (2008) Oil quality of winter hardy rapeseed germplasm relative to biodiesel production. *World J. Agric. Sci.* 4: 1–6.
- 岩崎文雄・細田友雄 (1966) 菜類の抽苔に関する研究 第 1 報 単一ゲノム品種の生長点の構造の変化と抽苔性との関連

- について. 育種 16: 39–44.
- Jahier, J., A.M. Chèvre, A.M. Tanguy and F. Eber (1989) Extraction of disomic addition lines of *Brassica napus*-*B. nigra*. Genome 32: 408–413.
- 金子幸雄・松澤康男・山嶋正雄 (1987) カンラン類 1 染色体添加型ダイコンの育成. 育種 37: 438–452.
- 金子幸雄・房 相佑・松澤康男・石綿 薫・山本浩一郎 (1999) *Brassica* 属 A, B および C ゲノム 3 種 (*B. campestris*, *B. nigra*, *B. oleracea*) の異種染色体添加型植物の育成. 宇大農学報 17(2): 9–15.
- Kaneko, Y., H. Yano, S.W. Bang and Y. Matsuzawa (2001) Production and characterization of *Raphanus sativus*-*Brassica rapa* monosomic chromosome addition lines. Plant Breed. 120: 163–168.
- Kerlan, M.C., A.M. Chèvre, F. Eber, A. Baranger and M. Renard (1992) Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to relate species: I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. Euphytica 62: 145–153.
- Khush, G.S. (1973) Cytogenetics of alien additions and substitutions. In “Cytogenetics of aneuploids” Academic press, New York and London, 238–258.
- Li, M., X. Jun, L. Jiamin, Y. Longjiang and L. Dianrong (2008) The production and cytological analysis of *Brassica napus*—B genome chromosome addition lines and their hybrids. Genes and Genomics 30: 133–140.
- Meng, J.L. and H. Liu (1987) Studies on pollen-pistil interaction between *Brassica napus* and its relative species and genus. Cruciferae Newsletter 12: 60–61.
- 水島宇三郎 (1952) アブラナ類の核遺伝学的研究. 技報堂, 東京. 1–109.
- Navabi, Z.K., K.E. Stead, J.C. Pires, Z. Xiong, A.G. Sharpe, I.A.P. Parkin, M.H. Rahman and A.G. Good (2011) Analysis of B-genome chromosome introgression in interspecific hybrids of *Brassica napus* × *B. carinata*. Genetics 187: 659–673.
- Padmaja, K.L., N. Arumugam, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, Y.S. Sodhi, D. Pental and A.K. Pradhan (2005) Mapping and tagging of seed coat colour and identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea*. Theor. Appl. Genet. 111: 8–14.
- Pradhan, A.K., V. Gupta, A. Mukhopadhyay, N. Arumugam, Y.S. Sodhi and D. Pental (2003) A high-density linkage map in *Brassica juncea* (Indian mustard) using AFLP and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 106: 607–614.
- Quiros, C.F., O. Ochoa, S.F. Kianian and D. Douches (1987) Analysis of the *Brassica oleracea* genome by the generation of *B. campestris*-*oleracea* chromosome addition lines: characterization by isozymes and rDNA genes. Theor. Appl. Genet. 74: 758–766.
- Roy, N.N. (1978) A study on disease variation in the populations of an interspecific crosses of *Brassica juncea* L. × *B. napus* L. Euphytica 27: 145–149.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
- Sacristan, M.D. and M. Gerdemann (1986) Different behavior of *Brassica juncea* and *B. carinata* as sources of *Phoma lingam* resistance in experiments of interspecific transfer to *B. napus*. Plant Breed. 97: 304–314.
- Scheffler, J.A. and P.J. Dale (1994) Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. Transgenic Res. 3: 263–278.
- Schelfhout, C.J., R. Snowdon, W.A. Cowling and J.M. Wroth (2004) A PCR based B-genome-specific marker in *Brassica* species. Theor. Appl. Genet. 109: 917–921.
- 清水 茂・金沢幸三・小林高博 (1962) ハクサイの白腐病抵抗性育種に関する研究. 第3報 種間雑種による白腐病抵抗性品種「平塚一号」の育種. 園試報 1: 157–174.
- Song, K.M., T.C. Osborn and P.H. Williams (1988) *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLPs) 1. Genome evolution of diploid and amphidiploid species. Theor. Appl. Genet. 75: 784–794.
- Struss, D., U. Bellin and G. Röbbelen (1991) Development of B-genome chromosome addition lines of *B. napus* using different interspecific *Brassica* hybrids. Plant Breed. 106: 209–214.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596–1599.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.
- Tsuda, M., K. Konagaya, A. Okuzakaki, Y. Kaneko and Y. Tabei (2011) Occurrence of metaxenia and false hybrids in *Brassica juncea* L. cv. Kikarashina × *B. napus*. Breed. Sci. 61: 358–365.
- 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.
- Uchimiya, H. and S.G. Wildman (1978) Evolution of fraction I protein in relation to origin of amphidiploid *Brassica* species and other members of the Cruciferae. J. Hered. 69: 299–303.
- Zhu, J.S., D. Struss and G. Röbbelen (1993) Studies on resistance to *Phoma lingam* in *Brassica napus*-*Brassica nigra* addition lines. Plant Breed. 111: 192–197.
- Zhu, Y.L., E.A.H. Pilon-Smits, L. Jouanin and N. Terry (1999) Over expression of Glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance. Plant Physiol. 119: 73–79.

Production and characterization of monosomic addition lines of autoplasmic and alloplasmic *Brassica napus* with each B-genome chromosome of *Brassica juncea*

Miho Takashima^{1,2)}, Sang Woo Bang¹⁾ and Yukio Kaneko¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya, Tochigi 321-8505, Japan

²⁾ United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu-shi, Tokyo 183-8509, Japan

Autoplasmic and alloplasmic *Brassica napus* with a single chromosome of B-genome (MAL, 2n=39) were bred from progenies of the reciprocal interspecific F₁ hybrids between *B. napus* (AACC) and *Brassica juncea* (AABB) with backcrossing to *B. napus*. The alien chromosomes of the B-genome (n=8, a–h) of *B. juncea* were identified by B-genome specific microsatellite markers, cytogenetic observation and morphological characteristics. As a results, there were six types in autoplasmic MALs, except for the a-type and the f-type, the alloplasmic ones were also identified to six types, except for the e-type and the f-type. A total of seven types of MAL showed predominantly the chromosome configuration of 19_{II}+1_I in metaphase I but a few multivalent chromosomes were also observed. The morphological traits suggested that the external form was affected by the additional g and h chromosomes. The transmission rates of MALs varied from 1.9% to 36.4%, indicating that each added B-genome chromosome could be inherited to the next generation. Traits of each B-genome chromosomes determined by studying MALs will facilitate the study of transductions and homoeologous relationships in *Brassica* genera.

Key Words: interspecific hybridization, *Brassica juncea*, *Brassica napus*, B-genome chromosome, monosomic addition line (MAL).