HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アジアとアフリカに起源する栽培イネ種間雑種の育種障壁克服と倍数体発生の遺伝学的機序
Author(s)	國吉, 大地
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14377号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14377
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94643
Type	doctoral thesis
File Information	Kuniyoshi_Daichi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

アジアとアフリカに起源する栽培イネ種間雑種の育種障壁克服と倍数体発生の遺伝学的機序

北海道大学　大学院農学院

生物資源科学専攻　博士後期課程

國吉　大地

目次

第一章　緒論 3
第二章　葯培養による不稔性小胞子の救済 4
緒言 10
材料および方法 12
結果 15
1. 種間 F1 雑種の花粉稔性 15
2. 種間 F1 雑種の葯培養によるカルス及び植物体再分化 15
3. 再分化植物体のジェノタイピング 15
4. 再分化植物体の倍数性解析 16
5. 再分化植物体の自殖稔性と *HS* 座の接合型 17
6. 再分化植物体の後代の形質 17
7. 4 倍体化による種間 F1 雑種の稔性回復 18
図表 19
考察 35
第三章　種間雑種における 2 倍性小胞子と減数分裂異常の関連性 38
緒言 39
材料および方法 40
結果 42
1. Hom/Het 再分化植物体ゲノムの接合型と倍数性 42
2. FDR 型の減数分裂異常 43
3. SDR 型の減数分裂異常 44
図表 46
考察 58
第四章　ゲノム構造から見た種間雑種における雌雄配偶体の伝達様式の比較 61
緒言 62
材料および方法 64
結果 66
1. 染色体地図の全長(cM)と組換え頻度の雌雄差 66
2. 雄性配偶体に由来する AC 集団で見られた遺伝的な歪み 67
図表 69

考察 79
第五章　総合考察 81
引用文献 86
謝辞 95
Appendix 96

第一章

緒論

交雑育種において，多様な形質を内包した遺伝資源は育種目標を達成するうえで不可欠な存在である．アジア地域を中心に栽培されるイネ種 *Oryza sativa* は熱帯から亜寒帯まで広範囲で栽培されており，地理的・文化的に隔たった多くの地域に適応した多様な特性を有する品種が存在している．そのため耐冷性や耐暑性，栽培地での病害耐性等の多様な形質を種内に保持している(Garris ら，2005)．アジアイネ種内には大別して 2 つ，*japonica* 亜種と *indica* 亜種が存在しており，アジアイネ品種は基本的に種内交雑により作出されてきた．しかし限られた優良な系統のみが優先的に栽培されることや，多くの栽培イネが共通の祖先種に由来することで，遺伝的画一化が起きていることが指摘されている(鵜飼，2003；Yamamoto ら，2010)．今後，世界規模での地球温暖化や農村人口の減少に基づく栽培形態の変化に対応し，食糧確保のためにイネの栽培を安定的に続けていくには，多様な生物・非生物ストレス耐性を保持した頑健なイネ遺伝資源が求められるだろう．*O. sativa* と雑種をつくることのできるイネ種は世界中に分布しているため，多様性の拡大にはこれらの遺伝資源の有効な活用が望まれる．

O. sativa に他のイネ種の遺伝資源を取り込んだ品種として New rice for Africa (NERICA) 系統がこれまでに作出されている．NERICA 系統は *O. sativa* に対してアフリカイネ *O. glaberrima* のゲノム断片を取り込んだ系統である． *O. glaberrima* は *O. sativa* と同じイネ属の AA ゲノム種に属し，両種間の染色体対合が正常であることが確認されている(イネ大事典，2020)．アフリカ地域における伝統的な栽培イネ種である *O. glaberrima* は，低肥沃な土地での栽培適性や乾燥耐性，雑草との競合性を保持している(Sarla ら，2005)．近年，アフリカのサブサハラ地域では急速にイネの栽培が拡大しており，NERICA 系統はアフリカでの栽培に好適な栽培品種として育成された(Jones ら，1997；Sarla ら，2005)．NERICA 系統のゲノムにはアジアイネ由来のゲノム約 9 割に対し，*O. glaberrima* 由来のゲノムが 1 割程度挿入されており，アジアイネから受け継いだ高収量性とアフリカイネ由来の部分的な栽培適性を持つとされる(Ekeleme ら，2009；Ikeda ら，2009；Fukuta ら，2012；Saito ら，2014)．アフリカ地域の約 4 割を占める天水畑地条件下で両親系統を上回る収量を示すことが報告されており，2013 年時点ではアフリカ地域のイネ栽培面積の 1 割強で栽培されている(Saito ら，2014；池田，2019)．NERICA 系統のような雑種品種の利用は，これまでに *O. sativa* の栽培が難しかった厳しい環境での栽培に有効な手段である．

雑種品種利用の上で問題となるのが，*O. sativa* と他のイネ種との間にある雑種障壁である．*O. sativa* と *O. glaberrima* 種間の F1 雑種は栄養生長性こそ劣らないものの，F1 雑種の配偶体は減数分裂後，配偶体発達の段階で顕著な不稔性を示す(Sano ら，1979；Sano，1983；Sano，1990；Koide ら，2008)．配偶体不稔に関与する遺伝子座として，両種間では今までに 13 座の雑種不稔原因遺伝子座(*HS* 座)が報告されている(Sano ら，1979；Sano，1983；Doi ら，1998；Doi ら，1999；Taguchi ら，1999；Ren ら，2006；Zhang ら，2006；Li ら，

2010；Li ら，2011；Xu ら，2014；緒方と小出，2018)．これらの *HS* 座はヘテロ接合型で不稔効果を示すという特徴がある．例として最も初期に発見された *S1* 遺伝子座の場合，*sativa* 型の *S1s* アレルと *glaberrima* 型の *S1g* アレルがあり，どちらのアレルもホモ接合型で保持されている植物体では不稔効果を示さない．*S1s*/*S1g* のヘテロ接合型個体では，配偶体のうち *S1s* アレルを運ぶ花粉のみが選択的に致死性を示すことから，配偶体の 50%が不稔となり，後代へは *S1g* アレルのみが優先的に伝達される(Figure 1-1，Koide ら，2018)．13 座の *HS* 座は，雌雄両配偶体の不稔効果を持つ Gamete eliminator（Ge）と雄性配偶体のみの不稔に関わる Pollen killer(Pk)に分類でき，*S1*，*S2*，*S37(t)*は Ge，そのほかの 10 座は Pk としての不稔効果を持つ(Table 1-1)．両種間の F1 個体では *S1* 座を含め複数の *HS* 座の効果が集積することで，特に小胞子はほぼ完全な不稔性を示す．*S1* 座には，*S1s* アレルと *S1g* アレルの両方に和合性を持つアレル(*S1mut*)が見出されている(Koide ら, 2018)．*S1mut* アレルは *S1s*，*S1g* アレルのどちらとヘテロ接合型を形成した場合においても，配偶体の致死性が示されない中立的なアレルである. 同様のアレルは他の *HS* 座においても見いだされている(Nguyen ら，2016)．*sativa-glaberrima* 種間の *HS* 座の多様性は用いる系統間でも異なることが想定されるが, これらの中立的 *HS* 座を持つ系統を橋渡し種として利用することで, 両種の遺伝子を保持した育種材料の作出が期待される(Li ら，2008；Garavito ら，2010；Li ら，2018)．*HS* 座は不稔効果とアレル伝達の不平衡を同時にもたらすことから，*O. sativa* と *O. glaberrima* 種間の自由な遺伝子交換のためには *HS* 座を克服する必要がある．

遠縁雑種では雑種不稔性の原因として，配偶体形成以前の減数分裂時の異常も懸念される．*O. sativa* と *O. officinalis*(CC ゲノム種)種間の F1 雑種では，染色体対合の異常に基づく減数分裂時の異常が確認されている(Li ら，1964)．染色体対合に基づく異常は，雑種の染色体を倍加させることで解消できる可能性がある．それぞれの種における染色体が同一の核において正常な染色体対合を行えるようになり，このような染色体倍加種を複二倍体と呼ぶ. 栽培作物にはパンコムギやバレイショ等, 多くの複二倍体が存在する(西尾と吉村，2012)．*sativa-officinalis* 種間も同様に，染色体を倍加した複二倍体様の 4 倍体 F1 雑種では稔性が回復することが報告されている(Rodrangboon ら，2002)．*O. sativa* と *O. glaberrima* は同じ AA ゲノム種に属し，*sativa-glaberrima* F1 雑種の小胞子形成時の減数分裂を観察した Morinaga と Kuriyama(1957)は，両種の染色体対合が正常に行われ四分子が形成されたことを報告している．しかし Gopalakrishnan ら(1964)と Oka(1968)は，*sativa-glaberrima* F1 雑種の 2 倍体が完全不稔であるのに対して，*sativa-officinalis* 雑種で見られたように，4 倍体 F1 雑種は自殖稔性を示したことを報告している．*sativa-glaberrima* 種間 F1 雑種の減数分裂動態と倍数性の関連はその後の報告が無く，4 倍体化に基づき稔性が回復した背景は不明である．

イネでは小胞子から植物体を獲得する手段として，葯培養法が普及している(Niizeki と

Oono，1968；Germanà，2011)．葯培養法は，小胞子の詰まった組織である葯組織を脱分化培地上へ置床することで小胞子由来のカルスを誘導し，カルスをさらに再分化培地へ移植することで小胞子由来の再分化植物体の獲得を目指す手法である．栽培イネは基本的に 2 倍体であり，小胞子由来の半数体カルスを獲得してそれを倍加させることで，直ちに全遺伝子座がホモ接合型に固定された純系を得られる．従って育種年限を短縮するための技法として，イネ以外にもコムギやタバコ，ジャガイモ等幅広い作物に用いられている(Powell と Uhrig，1987；El-Hennawy ら，2011；Nakamura と Itagaki，1973；Chaikam ら，2019)．*O. sativa* と *O. glaberrima* 種間の雑種不稔遺伝子座はヘテロ接合型において特異的に不稔効果を持つ．すなわち *HS* 座をヘテロ接合型で持つ植物体を葯培養に供試することで，ホモ接合型で固定した後代が得られれば，それらの後代は両種のゲノムを持ちなおかつ稔性を持つ可能性が考えられる．Woo と Huang(1980)は *O. sativa* と *O. glaberrima* 種間の F1 雑種を用いて葯培養を行い再分化植物を獲得し，穎花の形態と稔性に基づきそれらが半数体，2 倍体あるいは 4 倍体であったことを報告している．しかしこの報告以降，種間雑種における葯培養は報告されず，これらの結果の検証は行われていない．従って，2 種間の不稔性克服の手法として葯培養は有望であるにもかかわらず，*sativa-glaberrima* F1 雑種の葯培養由来植物体の詳細な倍数性やゲノムの解析は今まで行われていない．

本研究では，*O. sativa* 種と *O. glaberrima* 種間の自由な遺伝子交換を実現するうえで障壁となる，両種間の雑種不稔性の克服と，雑種不稔メカニズムの解析を行った．

第二章では，F1 雑種の不稔性小胞子の救済を試みた．減数分裂直後の 1 核期における小胞子がまだ顕著な不稔性を呈していない点に着目し，1 核期の小胞子を含む葯を葯培養に供試することで，致死が運命づけられた小胞子を葯培養によって救済し，再分化植物体を得ることができた．得られたカルス及び再分化植物体は，葯培養で期待される遺伝子接合型とは異なったゲノム構造を保持していた．小胞子由来のカルス及び植物体がすべての遺伝子座をホモ接合型で持ち合わせる原則に対し，一部の個体はホモ接合型とヘテロ接合型の遺伝子座を同一個体内に保持していた．それらの個体の倍数性は主に 2 倍体か 4 倍体であり，4 倍体個体からは稔性を有する後代が得られた．

第三章ではホモ接合型とヘテロ接合型が混在している再分化植物体 12 個体を対象に，全体的な遺伝子座の接合型とゲノムの倍数性についての調査と，減数分裂時の染色体動態の観察を行った．これら一連の解析によって，種間雑種の減数分裂時の異常が，半数体ではなく 2 倍体の小胞子の形成を誘導することを明らかにした．

第四章では，葯培養で得られた小胞子由来のカルスを用いて，これまで調べることができなかった雄性配偶体のゲノム構成を，ジェノタイピングにより解析した．その結果を，雌性配偶体のゲノム構成を反映した BC1F1 集団のジェノタイピング結果と比較することで，雄性配偶体と雌性配偶体の遺伝的差異について考察した．

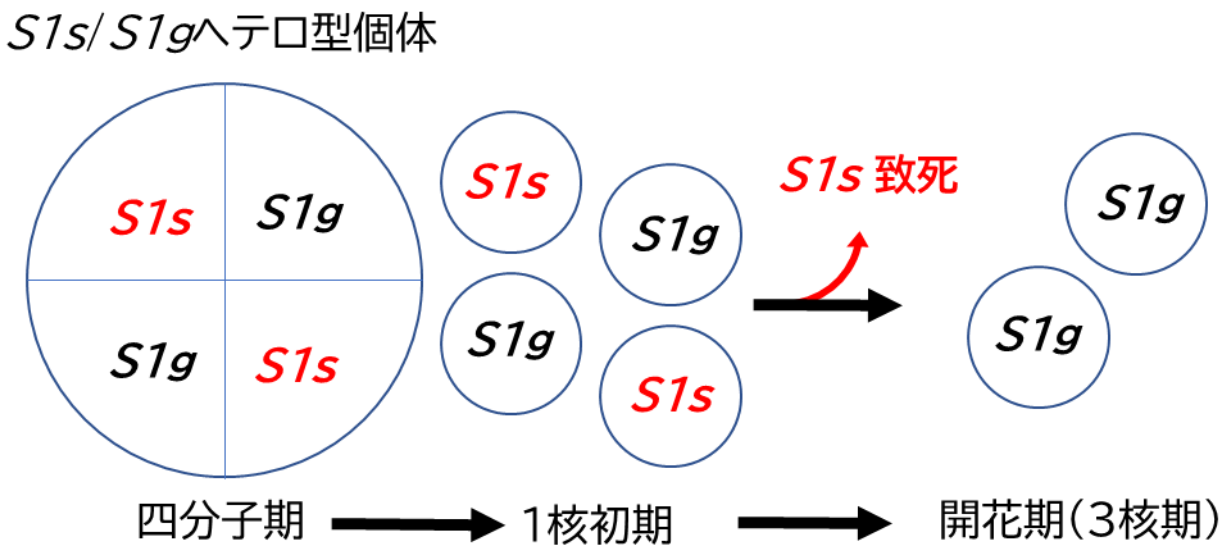


Figure 1-1　*S1*遺伝子座による配偶体不稔の模式図

*S1s*は*sativa*型アレル，*S1g*は*glaberrima*型アレルを示す．*S1s*/*S1g*のヘテロ接合型植物体が生産する配偶体のうち，*S1s*を持つ配偶体は発達過程で致死性を示す．*S1g*アレルを持つ配偶体のみが稔性を持つため，ヘテロ接合型植物体の配偶体稔性は*S1*座の効果だけで50%低下する．

Table 1-1 既報の*HS*座とその機能および優先伝達されるアレル

*HS*座	Chr.	機能	優先伝達アレル
S_1	6	Ge	*g*
S_2	4	Ge	*s*
S_3	11	Pk	*g*
S_{18}	10	Pk	-
S_{19}	3	Pk	*g*
S_{20}	7	Pk	*g*
S_{21}	7	Pk	*s*
$S_{29}(t)$	2	Pk	-
$S_{34}(t)$	3	Pk	-
$S_{36}(t)$	2	Pk	-
$S_{37}(t)$	1	Ge	*g*
$S_{38}(t)$	4	Pk	-
$S_{39}(t)$	12	Pk	-

Ge...Gamete eliminator
Pk...Pollen killer

第二章

葯培養による不稔性小胞子の救済

緒言

Oryza 属には *O. sativa* と *O. glaberrima* の 2 種の栽培種が現存し，これらはいずれも一般的な 2 倍体で，同じ AA ゲノムを保持する種として *Oryza sativa* complex に分類される(Xu ら，2014)．しかし 2 種間の雑種は F1 世代において非常に強度の雑種不稔性を示し，稔性のある自殖種子が得られない(Sano ら，1979)．不稔性の原因は配偶体の形成異常であり，減数分裂後から成熟までの過程において不稔となる配偶体が現れる(Koide ら，2008)．これまでに，*sativa-glaberrima* 種間雑種において雑種不稔性に関与する遺伝子座(*HS* 座)が少なくとも 13 座報告されている(Sano ら，1979；Sano，1983；Doi ら，1998；Taguchi ら，1999；Ren ら，2006；Zhang ら，2006；Li ら，2010；Xu ら，2014)．13 座はいずれも雄性配偶体の不稔効果を持ち，ほぼすべての花粉が致死性を示すため，F1 雑種から自殖種子を得ることができない．一方，雌性配偶体に対して不稔効果を及ぼす *HS* 座は雄性配偶体よりも少ないため，一部の雌性配偶体は正常に成熟することから，親系統の花粉を用いた戻し交雑等が可能である．そのため，今までに両種間における戻し交雑集団の作出例がいくつか報告されており，両種の形質を保持した NERICA(New Rice for Africa)等の有望な固定系統の作出が報告されている(Li ら，2008；Garavito ら，2010；Jones ら，1997)．

花粉への発達途上にある小胞子からは，他の植物体細胞と同様にカルスおよび再分化植物体を誘導することができる(木下ら，2000)．F1 雑種が生産する小胞子を初期段階で培養することで救済できれば，2 種の特徴を受け継いだ雑種植物体の後代が得られる可能性がある．これらの植物体は遺伝資源として有用なだけではなく，未だ謎が多い 2 種間の雑種不稔性のメカニズムを知る手がかりとなりうる．

1960 年代，Gopalakrishnan(1964)と Oka(1968)は，*sativa-glaberrima* 種間の 2 倍体 F1 雑種が不稔である一方，それらの 4 倍体 F1 雑種が自殖稔性を示すことを報告した．Woo と Huang(1980)は，*sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種の葯培養により，4 倍体及び 2 倍体，半数体の再分化植物体が作出できたことを報告した．しかしこれらの研究はその後ほとんど検証されず，葯培養により 4 倍体が出現した背景や，4 倍体雑種の自殖稔性に関わる詳細な解析は行われてきていない．*Oryza* 属内の種間雑種では異なる種由来の相同染色体が細胞内に共存することから，染色体対合と引き続く分配の際に異常が生じることがある(Li ら，1964)．同じイネ科に属するコムギとライムギ間の雑種では，2 種の相同染色体が対合せず，引き続く分配に不具合を生じると同時に，第一分裂の不全に基づく非還元性の配偶体の形成が起きることが報告されている(Silkova ら，2003)．同様の現象は多くの植物で知られる(De Storme と Geelen，2013a)．*sativa-glaberrima* 種間の雑種の場合，減数分裂進行の観察は Morinaga と Kuriyama(1957)が報告しているが，近年の報告は無い．

イネの葯培養では，半数性の雄性配偶体細胞から再分化植物体を獲得する．再分化までの過程で自然倍加することが多いため，半数体由来の 2 倍体植物体(Doubled haploid，DH)が得られる(Grewal ら，2011；Rout ら，2016)．これらの植物体は理論上すべての遺伝子座が

ホモ接合型で固定され，純系として扱うことができる．本研究では，*sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種の葯培養により再分化植物体が得られるかどうかをまず試験した. 結果として 19 個体の植物体が得られ，それらの倍数性解析及びジェノタイピングによるゲノム解析を実施するとともに，再分化植物体の稔性を確認した．また再分化植物体の持つ特徴から示唆された，染色体倍加により雑種不稔性が克服されるという可能性を，2 倍体雑種と 4 倍体雑種を育成して検証した.

材料および方法

植物材料および葯培養

親系統に *O. glaberrima* として IRGC104038(WK21 と呼称)，*O. sativa* として日本晴を用い，葯培養には親系統とそれらの相反交雑に由来する F1 雑種 2 系統を使用した．すべての植物体は北海道大学農学部の世代促進温室で栽培し，短日処理により穂形成を誘導した．葯培養に最適な小胞子の発達段階は 1 核中後期であるとされ，その時期は葉耳間長-5cm - ±0cm に相当し，それを目安に葯培養用の採取を行った(木下ら，2000)．

採取した穂の表面を 70%エタノールで消毒し，乾燥防止のためにプラスチックフィルムで植物体全体を覆い，穂の切り口を水道水に浸した状態で低温処理を行った．低温処理条件は 10℃，4 日-10 日，暗所とした．低温処理後，クリーンベンチ内で葉鞘を裂き開いて穂を取り出し，穂全体を 1 分間 70%エタノール中へ浸漬して表面を消毒した．火炎滅菌した交配用ハサミとピンセットを用いて，穎花の先端を切除して内側にある葯を切り出し，φ90mm のプラスチックシャーレに分注した脱分化用の固形培地(組成は Ap. Table 1 参照)上に置床した． 葯の置床密度はシャーレ 1 枚当たり最大 70 葯とした．置床後，パラフィルム(Bemis)で密閉し，25℃/暗条件で静置培養した．最大で 4 か月間培養し，形成されたカルス数は約 10 日毎に集計した．

形成されたカルスは適宜，再分化培地へと移植した．F1 雑種の葯培養由来カルスは，成長させるために脱分化培地と同組成の維持培地へと移植した後に再分化培地へ移植した．再分化培地は N6 培地(Ap. Table 2 参照)をベースとして調整した固形培地を使用し，25℃/明条件で静置培養して植物体を誘導した．再分化植物体の根が十分に発根したら，世代促進温室内の日陰に植物体を移動させて 2~3 日培養することで日光への馴化を行った．光への馴化後，培地中から植物体を抜き出し，再分化培地を水道水できれいに洗い流して，通常の播種と同様に播種用培土(ピートモス：トーヨコード：バーミキュライト= 1 : 1 : 1)中へ移植した．移植個体は初めの約 1 週間だけ日陰で栽培した．再分化植物体は充分に成長させた後，短日処理を施し出穂を誘導し，種子稔性の測定を行った．大半の個体は WK21 と同様に激しい脱粒性を示したため，正確な種子稔性は測定できず，代わりに稔実種子数を測定した．

親系統及び葯培養後代(RP2-25，38，80)を用いて形質測定を行った．対象形質は花粉稔性，種子稔性，種子長・幅，植物体の背丈，葉身の長さ・幅，葉舌の長さ，雌ずいの柱頭の色とした．RP2 も再分化当代と同様に脱粒性を示すことが予想されたため，穂を袋掛けして正確な種子稔性の計測を行った．

花粉観察

花粉観察用の穂は葉耳間長を目安に採種した．1 核期の観察には葉耳間長-1.0 - +1.0cm，2 核期は+2.0 – +6.0cm の穂を用い，成熟花粉には開花時の穂を用いた．葉耳間長と核期の

関係は，用いたすべての系統間でおおむね共通していた．それぞれの穂から葯を採取して formalin-acetic acid-alcohol (FAA)固定液中に浸漬して固定し観察に用いた．葯をスライドグラス上に置き，ピンセットで粉砕した後に酢酸カーミン溶液(Wako)を 10 μl 加えてカバーグラスで封入し，明視野顕微鏡下で核期を観察した．花粉稔性の確認は，酢酸カーミンの代わりにルゴール液(0.15%(w/v) I_2，1.5%(w/v) KI)を 10 μl 加えて実施した．

体細胞における染色体本数の観察

根端分裂組織を用いて，再分化植物体(#20)が持つ染色体本数(倍数性)の観察を行った．根端から採取した約 1cm の組織片を，2mM 8-ヒドロキシキノリン(8-キノリノール)中に 20℃で 2~2.5 時間浸漬して固定した．固定後，根端から約 1mm を切り取って酵素液(6.0%(w/v)セルラーゼ(Onozuka RS，Yakult Pharmaceutical)，6.0%(w/v)ペクトリアーゼ(Y-23，Kyowa Chemical Products))，75mM KCl)中に 37℃で 60 分間浸漬した．酵素処理後，根端片をピンセットで慎重に取り出してスライドグラス上に置き，蒸留水の水滴中に浸漬して洗浄した．蒸留水を除き，根端片の上からカルノイ液(エタノール:酢酸=3:1)を 10 μl 滴下して根端片をニードルで粉砕してスライド上に広げ，着火して火炎固定した．スライドグラスを，リン酸緩衝(pH 6.8)で 30 倍に希釈したギムザ染色液(関東化学)中に 30 分間浸漬して根端細胞を染色した後，蒸留水で洗浄し，明視野顕微鏡下で染色体本数を観察した．

フローサイトメーターによる倍数性解析

再分化植物体の正確な倍数性は，フローサイトメーター(Partec PA, Partec GmbH, Münster, Germany)により細胞中の DNA 量を測定して親系統と比較することで判定した．植物体の展開葉を採取し，約 5mm 四辺の葉片を 200 μl の細胞核漏出用のバッファー(Quantum Stain NA 2A，CytoTechs)中でカミソリの葉を用いて細かく切り刻み，30 μm のナイロンメッシュでろ過して細胞核を含む試料液を調整した．試料液に DAPI 溶液を 800 μl加えて約 1 分間静置した後，フローサイトメーターで吸光度を測定した．倍数性を測定する際は，再分化植物体と日本晴及び再分化植物体と WK21 をそれぞれ混合した試料液を調整し，まとめてフローサイトメーターで測定して，2 つの親系統と再分化植物体のピークの比を算出し，その平均値を再分化植物体の倍数性レベルとした．また再分化植物体が 2 倍体であった場合，ピーク位置が親系統と重なったためピーク比を算出できなかった．そのため 2 倍体と示唆された再分化植物体は，4 倍体と推定された再分化植物体#28 と混合してフローサイメトリーに供試し，推定 4 倍体とのピーク比により改めて 2 倍体かどうかを判定した．

遺伝子型の判定

再分化植物体の遺伝子型の判定には，既報の SSR マーカー(McCouch ら，2002)を用いた．再分化植物体の展開葉から簡易抽出法によりゲノム DNA を抽出した．ジェノタイピン

グには合計 34 個の DNA マーカーを用いた．DNA マーカーのターゲットとした 34 ヵ所の遺伝領域の内，22 ヵ所はイネの 12 セットの染色体上にランダムに位置し，12 ヵ所は既報の *HS* 座に連鎖しており，*HS* 座の接合型を確認するために用いた．PCR 時の DNA 増幅には GoTaq Green Master Mix (Promega)を用いた．増幅産物は 3%アガロースゲルで電気泳動し，増幅断片長の多型を判別した．

コルヒチン処理による倍加個体の作出

実生の茎頂分裂組織に対するコルヒチン処理(稲崎ら，2007)により 4 倍体の純系を誘導し，4 倍体純系間の交配により雑種 4 倍体を作成した．各系統のイネ種子をテクリード C(×100 希釈)中に 10 分間浸漬し，表面を殺菌した後，ϕ 9cm のプラスチックシャーレに約 30ml ずつ分注した 1%(w/v)素寒天上に播種した．1 シャーレ当たり約 50 粒播種した．28℃，暗条件で 4~7 日間栽培し，シュートの高さが 3~4cm に達した後，シュートの先端を消毒したハサミを用いて約 0.8cm に切りそろえた．実生をシャーレごと転地して，シュートの先端部分を 0.1%(w/v)コルヒチン溶液中に浸漬し，25℃，暗条件で 24 時間コルヒチン処理を行った． 処理後，実生を水道水で洗浄し，寒天培地からイネ播種用培土(ピートモス：トーヨコード：バーミキュライト＝1：1：1)上に移植し，温室で通常栽培した．イネの 4 倍体は有芒傾向があり，本研究ではいずれも無芒の系統(WK21，PL9)を用いたため，主として芒の有無，種子のサイズおよび花粉のサイズ，穂の稔性を指標として倍加種子の選抜を行った．コルヒチン処理当代から収穫された 4 倍体候補種子を発芽させたのち，フローサイトメーターにより最終的な倍数性判定を行った．*O. sativa* 種の PUSUR(2x, 4x)及び DULAR(2x, 4x)の種子は農業生物資源ジーンバンクより取り寄せた．

結果

1. 種間 F1 雑種の花粉稔性

従来, *sativa-glaberrima* 間の種間雑種が強度の雑種不稔性を示すことは良く知られており, 不稔原因遺伝子座が 13 座以上報告されている. 本研究で用いられた日本晴と WK21 間の雑種 F1 個体の小胞子も強度の不稔性を示し(Figure 2-1A, B), 自殖種子は得られなかった(Figure 2-1A). 親系統及び F1 個体の成熟花粉をルゴール液で染色した結果, 親系統の花粉は黒く染まった丸い形状を呈するのに対し, F1 個体の花粉は一切染色されず, 崩壊した形状を呈し, 多糖類を蓄積できておらず不稔性であることが示された(Figure 2-1A). 成熟に至るまでの過程を酢酸カーミン染色下で観察してみると, F1 個体の花粉は減数分裂直後の 1 核初期の時点では, 親系統と同様に丸い形状を保っていた(Figure 2-1B). しかし, F1 個体ではサイズや形状の異なる小胞子が混在していた(Figure 2-1C). 2 核期に入ると, 親系統の小胞子内部は酢酸カーミンでやや赤く染色されるのに対し, F1 個体の花粉は染まらないという違いが現れ始めた(Figure 2-1B). 成熟花粉の段階では染色の差がより顕著となるとともに, F1 個体の花粉は丸い形ではなく, 内部が空洞化した形状を示した(Figure 2-1C).

2. 種間 F1 雑種の葯培養によるカルス及び植物体再分化

親系統及び F1 個体の葯培養によりカルスが得られた(Table 2-1). 脱分化培地として RI-13 培地を用いた場合のそれぞれのカルス形成率(カルスを形成した葯の数/培地に置床した葯の数)は, 日本晴が 4.37%(112/2,565), WK21 が 1.10%(146/13,239)であり, 日本晴/WK21 F1 が 0.07%(11/14,724), WK21/日本晴 F1 が 0.65%(87/13,457)であった(Table 2-1). 引き続き, カルスを N6 再分化培地へ移植して植物体再分化を誘導したが, RI-13 培地で誘導した親系統由来のカルスからは再分化個体が得られなかった. SK-1 培地をカルス誘導に用いた場合, 日本晴のカルス形成率は 6.97%(23/330)であり, N6 培地上での再分化率(植物体を形成したカルス数/移植したカルス数)は 56.52%(13/23)であった(Table 2-1). WK21 からは再分化個体は得られなかった. F1 雑種の再分化率は, 日本晴/WK21 F1 が 9.09%(1/11)であり, WK21/日本晴 F1 が 21.84%(19/87)であった. 日本晴/WK21 F1 雑種に由来する再分化植物体は 1 個体のみであったため, 以降の試験は, WK21/日本晴 F1 雑種由来の 19 個体を用いて行った.

19 個体の再分化植物体は温室で日光への馴化を経て, 土壌へ移植された. 内の 2 個体(#60, #61)は移植後に枯死し, 17 個体が順調に成長し出穂に至った(Figure 2-2). 葉の表面の毛状突起の有無は, 再分化植物体間で分離していることが観察された(Figure 2-3, Table 2-2). 芒は 1 個体(#70)を除きすべての再分化植物体で観察された(Table 2-2).

3. 再分化植物体のジェノタイピング

再分化した 19 個体の植物体の葉からゲノム DNA を抽出し, イネの 12 染色体上にラン

ダムに座乗している 22 個の SSR マーカーを用いてジェノタイピングを行った(Table 2-3, 2-4). 一般的に葯培養で得られる再分化植物体は, 半数体である雄性配偶体に由来するため, すべての遺伝子座で両親どちらか一方のアレルのみを保持している．再分化までの間に倍加していても, すべての遺伝子座がホモ接合型となっており, ヘテロ接合型の遺伝子座は保持していない. ヘテロ接合型を保持する再分化植物体の可能性としては, 葯壁の細胞に由来する場合が考えられ, その場合は F1 個体と同様に, 両親間で多型のあるすべての遺伝子座でヘテロ接合型を示す. 再分化植物体をジェノタイピングした結果, すべての遺伝子座でホモ接合型(Hom)だったのは 2 個体(#60, #96)のみで, 5 個体は(#38, #39, #61, #79, #88)はすべてヘテロ接合型(Het), 残りの 12 個体はホモ接合型とヘテロ接合型(Hom/Het)の遺伝領域を併せ持っていた(Table 2-3). ホモ接合型とヘテロ接合型を併せ持つ可能性としては, 減数分裂異常により異常な配偶体が形成され脱分化した場合か, 複数の小胞子あるいは小胞子由来のカルスが細胞融合した場合が想定された. *sativa-glaberrima* F1 雑種の減数分裂を観察した以前の報告(Morinaga と Kuriyama, 1957)では, 減数分裂は正常であったとされており, 減数分裂異常が原因だった場合はこの報告と相反する結果となる.

4. 再分化植物体の倍数性解析

枯死した 2 個体を除く 17 個体の再分化植物体の倍数性を, フローサイトメーターにより解析した(Figure 2-4A, Table 2-5). 倍数性の決定は, 再分化植物体の細胞核の蛍光強度と, 親系統の 2 倍体である日本晴及び WK21 の細胞核の蛍光強度との比に基づき算出した. 2 倍体であると推定された再分化植物体はさらに, 推定 4 倍体であった#28 との蛍光強度の比に基づき 2 倍体か否かを判断した(Figure 2-4A). 17 個体の内, 2 倍体は 5 個体のみで, 残りの 12 個体は倍数体であり, 4 倍体が 8 個体, 3 倍体が 3 個体, 5 倍体が 1 個体であった(Table 2-5). 半数体は得られなかった. 遺伝子座の接合型と倍数性の間には明らかな相関が無かったが, 唯一, 3 倍体個体はすべての遺伝子座がヘテロ接合型であったグループに属した(Table 2-3, 2-5). 12 個体の Hom/Het 型植物体の内, 5 個体は 2 倍体, 1 個体は 5 倍体であり, 6 個体は 4 倍体であった(Table 2-5). フローサイトメーターで 4 倍体であると推定された 1 個体(#20)について, 分裂期の体細胞を用いたギムザ染色法による染色体本数の観察を行った(Figure 2-4B). 2 倍体である F1 個体の体細胞と比較して, #20 植物体の体細胞は明らかに 40 本以上の染色体を含んでおり, フローサイトメーターによる解析を支持する結果が得られた.

O. sativa 内の *japonica* 亜種と *indica* 亜種間の種内 F1 雑種を用いた葯培養等では一般的に, 再分化植物体は半数体か倍加した 2 倍体であることが多い(Grewal ら, 2011；Nguyen ら, 2016). 一方本研究で用いた *sativa-glaberrima* F1 雑種の葯培養では, 多くの個体(12/19)が倍数体であった. これらの結果から, 植物体の由来となった F1 個体の小胞子にその原因がある可能性が考えられた.

5. 再分化植物体の自殖稔性と *HS* 座の接合型

再分化した植物体 19 個体の内 17 個体が出穂に至り，2 個体(#60，#61)は移植後に枯死した．生き残った植物体の内 5 個体(#20，#25，#38，#47，#80)は種子を実らせた(Table 2-6)．この 5 個体はいずれも 4 倍体であり，4 個体は Hom/Het 型，1 個体(#38)は Het 型植物体であった(Table 2-3，2-6)．これらの個体はいずれも WK21 由来の脱粒性を有していたため，正確な稔性は計測できなかった．しかし#38 と#80 は，比較的多くの種子を実らせた．これらの個体が雑種不稔性を克服していたのかを確認するために，12 ヵ所の *HS* 座について，連鎖マーカーを用いてジェノタイピングを行った(Table 2-4，2-7)．Hom 型の再分化個体である#96 は，すべての *HS* 座を両親どちらか一方のホモ接合型で保持していた．Het 型の 4 個体(#38, #39, #79, #88)は，すべての *HS* 座をヘテロ接合型で保持していた．Hom/Het 型植物体ではホモ型とヘテロ型の *HS* 座が混在していた．稔性を示した#25，#38，#80 は少なくとも 8 つ以上の *HS* 座をヘテロ接合型で保持しており，特に#38 は顕著な自殖不稔性を示す 2 倍体の F1 個体と同様，調査したすべての *HS* 座をヘテロ接合型で保持していた(Table 2-7)．可稔となった原因としてはこれらが 4 倍体であったことが考えられ，この結果は Gopalakrishnan(1964)と Oka(1968)が報告した，*sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種は 2 倍体条件では完全不稔である一方，4 倍体条件では可稔であったという報告と一致する．

6. 再分化植物体の後代の形質

再分化植物体のうち，#25，#38 及び#80 の自殖種子からそれぞれ RP2-25(4 個体)，RP2-38(6 個体)及び RP2-80(5 個体)後代個体群を展開し，計 20 項目の形質の評価を行った(Table 2-8)．3 系統における花粉稔性の平均は 5.8%から 39.0%であり，1 個体を除いて花粉稔性を保持していた(Table 2-8，2-9)．一方種子稔性の平均は 0.1%から 8.0%であり，個体ごとに大きなばらつきが見られた(Table 2-8)．各個体群から 1~2 個体のみが種子稔性を示し，他の個体は不稔であった．再分化植物体と同様に，RP2 系統群の各個体の *HS* 座の接合型を確認した(Table 2-9)．最も種子稔性が高かった RP2-38-6(39.8%，稔実は 49 粒/123 穎花)は *S34(t)*のみがホモ接合型であり，他の *HS* 座は親個体#38 と同様にヘテロ接合型で保持していた．*HS* 座が最も多く固定されていたのは RP2-25-4 と RP2-80-4 であり，4 座の *HS* 座が固定されていたが，種子稔性はそれぞれ 0%と 3.2%であった．一方ですべての *HS* 座がヘテロ接合型である RP2-38-3 の種子稔性は 7.9%であったことから，*HS* 座の接合型と種子稔性の間に明瞭な相関は確認されなかった．

再分化当代の#80 植物体から収穫した種子は，親系統である日本晴 2 倍体と比較して種子長が 1.42 倍，種子幅が 1.33 大きく，もう片方の親である WK21 と比較しても種子長が 1.34 倍，種子幅が 1.38 倍大きかった(Table 2-8)．RP2-80 から収穫した種子も，#80 と同程度の大きさを保持していた（Table 2-8)．

自殖稔性を保持していた 5 個体の再分化植物体の内，#25，#38 及び#80 の稔性は後代にも継承されていたことから，これらの個体は *sativa-glaberrima* 種間の堅固な雑種不稔性を

克服したものと思われる. これら 3 個体の自殖後代 RP2 と, 親個体である日本晴及び WK21 系統の形質を比較した．調査対象とした形質は，種子長，種子幅，植物体の草丈，葉身の長さ，葉身の幅，葉舌の長さ，雌ずいの柱頭の色とした(Table 2-8)．RP2 におけるこれらの形質は基本的に，2 倍体である日本晴及び WK21 と比較してより巨大化している傾向にあり，典型的な 4 倍体化による強勢を反映していると考えられた．RP2 個体の倍数性をフローサイトメトリー法で計測した結果，いずれの個体も親植物体と同様に 4 倍体であることが示唆された(Table 2-10)．柱頭の色は系統間で分離が見られ，RP2-25 系統と RP2-38 系統は WK21 と同じ黒に近い柱頭を有したが, RP2-80 系統は日本晴と同じ白い柱頭を有していた(Table 2-8)．

7．4 倍体化による種間 F1 雑種の稔性回復

Gopalakrishnan(1964)と Oka(1968)は *sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種に関して，2 倍体雑種からは自殖種子が得られない一方で，4 倍体雑種は可稔であったことを報告している．この 2 報以降, *sativa-glaberrima* 種間 F1 雑種の雑種不稔性と倍数性に言及した報告は無い．そこで本研究ではこの結果を再現すべく, 4 倍体種間雑種を作成して種子稔性の調査を行った(Table 2-11)．植物材料として *O. glaberrima* の WK21，*O. sativa* ssp. *japonica* に属する PL9，ssp. *indica* に属する PUSUR，DULAR を用いた．WK21/Nip F1 雑種と同様に，WK21/PL9，WK21/PUSUR 及び WK21/DULAR の 2 倍体 F1 雑種からは，いずれも自殖種子は得られなかった(0.0%，Table 2-11)．一方，これらの 4 倍体 F1 雑種は 3 系統すべて稔性を示した(Table 2-11)．最も稔性が高かったのは WK21/PUSUR の 4 倍体 F1 雑種で 13.4%であり，WK21/PL9 の 4 倍体 F1 雑種は 8.6%，WK21/DULAR の 4 倍体 F1 雑種は 3.4%であった．親系統の稔性は，2 倍体親系統が 91.4%-95.9%であったのに対し，4 倍体親系統は 31.1%-62.2%と低い稔性を示した．これは同質 4 倍体化に伴う一般的な稔性低下であると考えられた(Koide ら，2020)．雑種 4 倍体はいずれも，親系統である 4 倍体より低い稔性を示した．

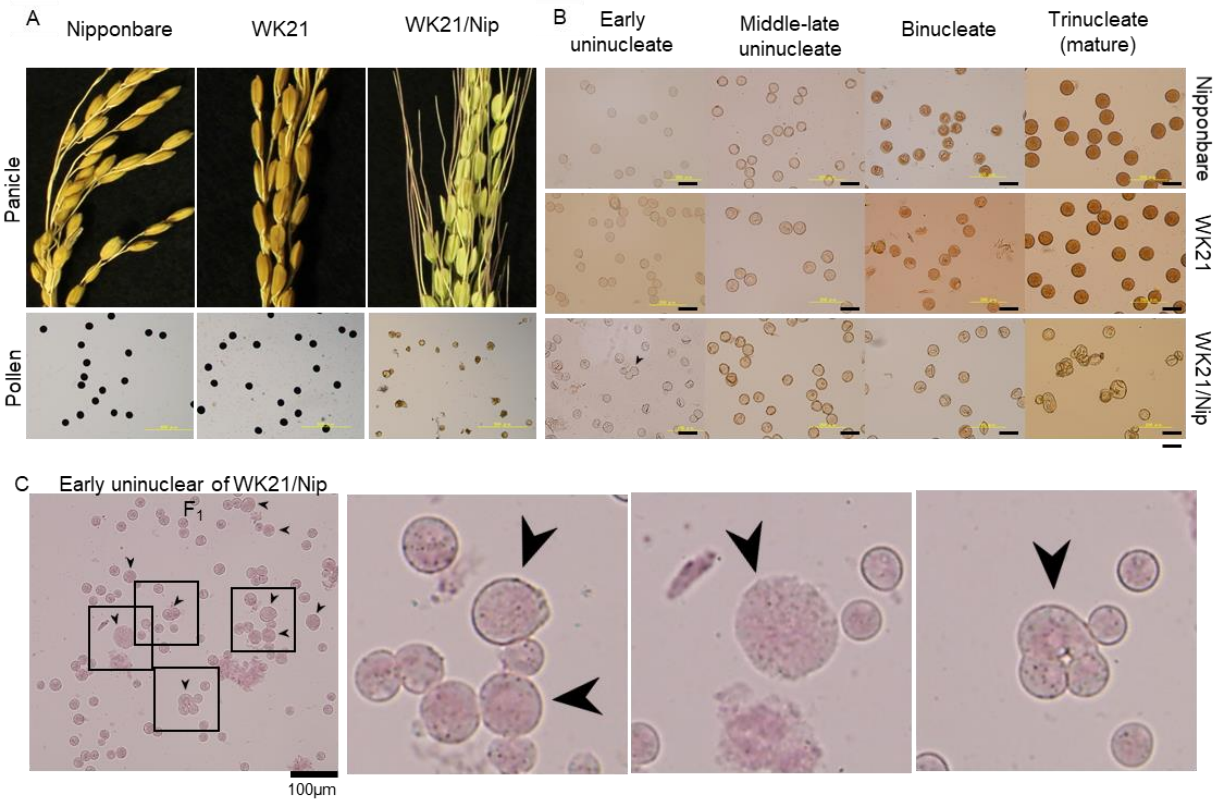


Figure 2-1　日本晴，WK21及びWK21/Nip F1雑種の種子稔性と花粉の発達

A　種子稔性および花粉稔性．花粉は開花後にサンプリングし，ルゴール液で染色し観察した．

B　花粉の発達過程を酢酸カーミンで染色し観察した．

C　1核初期のWK21/Nip F1雑種の小胞子．巨大な小胞子や異形の小胞子が観察された．

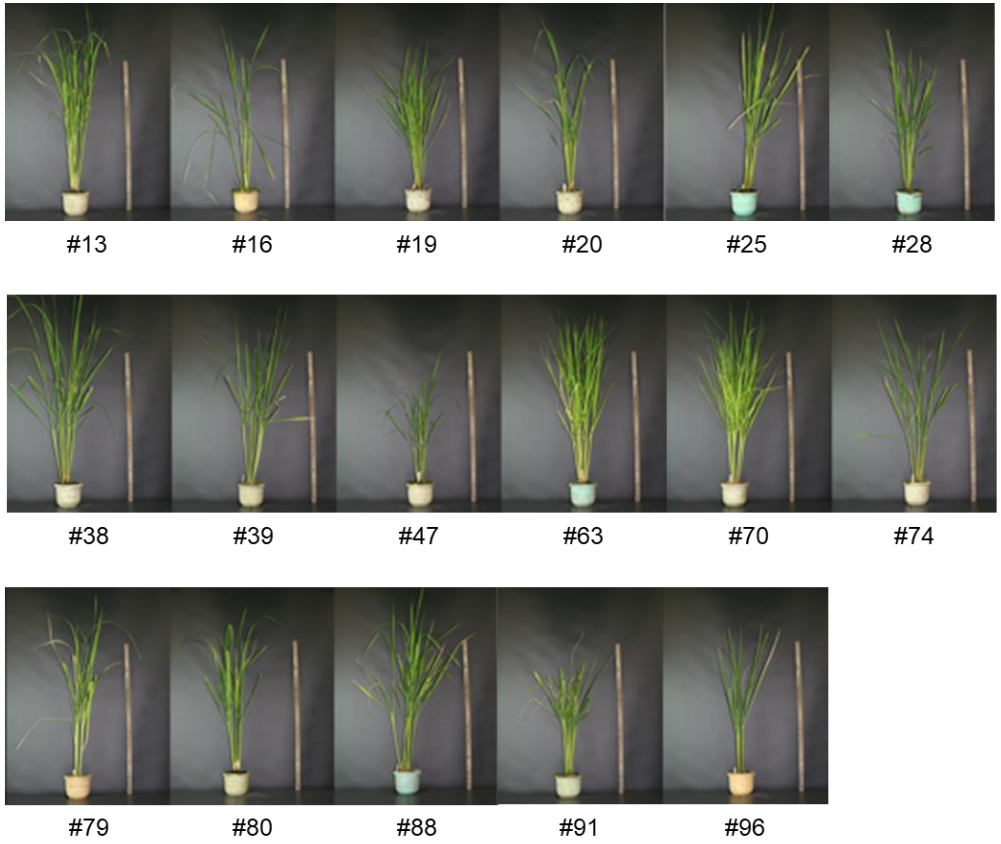


Figure 2-2　WK21/Nip F1葯培養に由来する17個体の再分化植物体

19個体中2個体(#60, #61)は移植後すぐに枯死したため写真なし．17個体は北海道大学農学部の世代促進温室内で順調に生育した後，短日処理を施すことで出穂した．

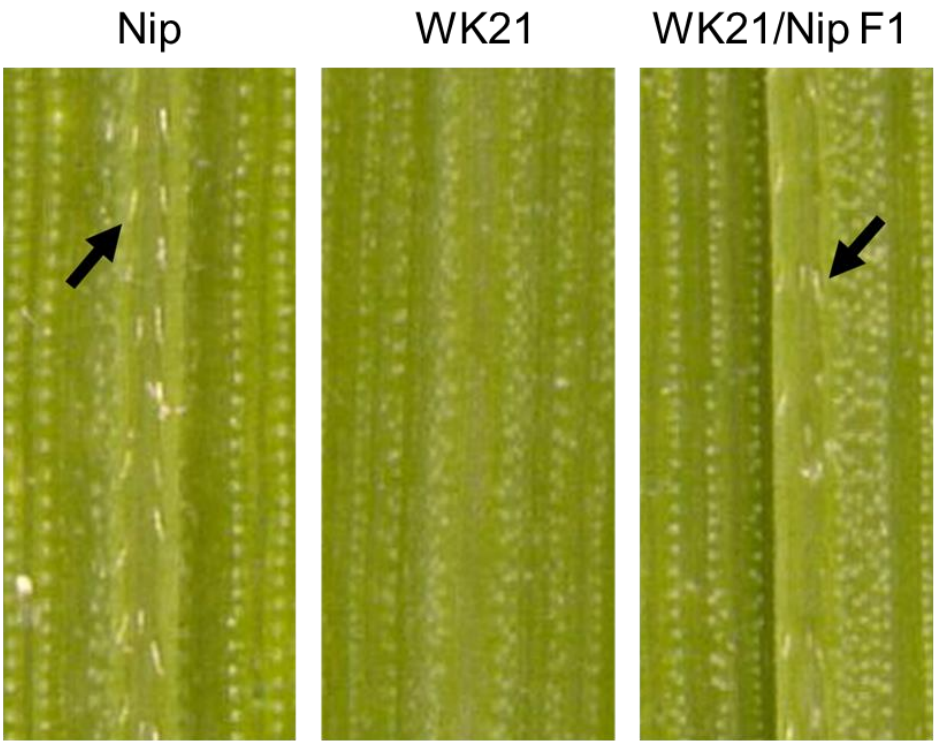


Figure 2-3　葉表面のRoughとSmoothについて

　黒い矢印は毛茸を指す．Roughタイプ(Nip，WK21/Nip F1)は葉表面に毛茸が存在しており，指で触るとザラザラした感覚がある．Smoothタイプ(WK21)の葉表面には毛茸が無く，指で触っても引っかかりを感じない．

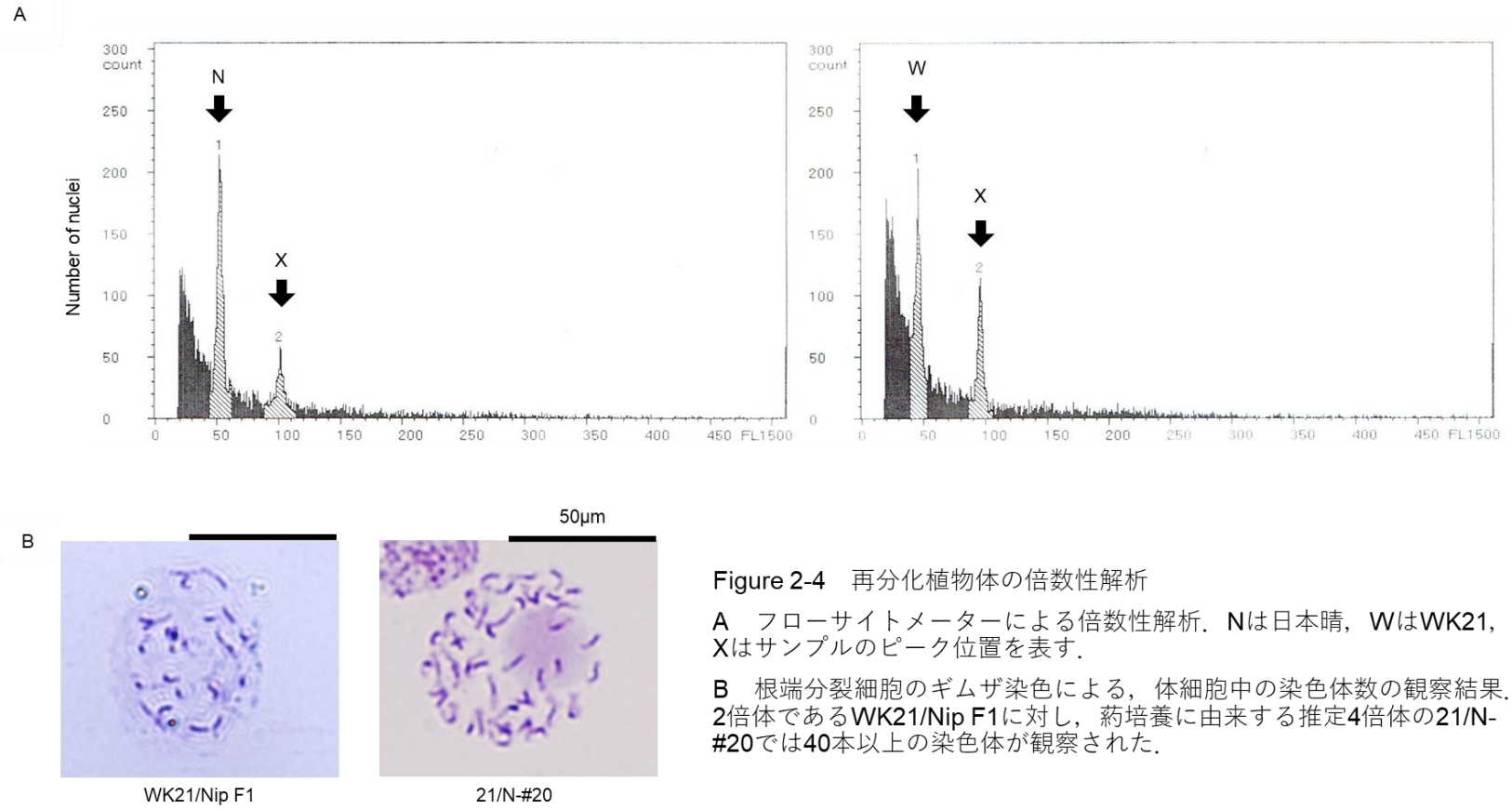


Figure 2-4　再分化植物体の倍数性解析

A　フローサイトメーターによる倍数性解析．Nは日本晴，WはWK21，Xはサンプルのピーク位置を表す．

B　根端分裂細胞のギムザ染色による，体細胞中の染色体数の観察結果．2倍体であるWK21/Nip F1に対し，葯培養に由来する推定4倍体の21/N-#20では40本以上の染色体が観察された．

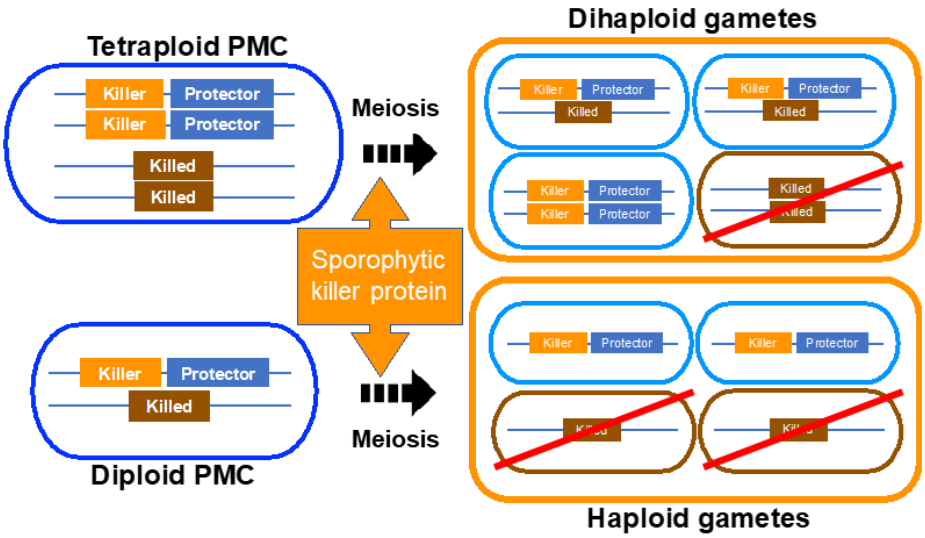


Figure 2-5　*killer-protector*モデルに基づく*HS*座の効果と倍数性の関連

*killer*は配偶体致死効果を持ち，*protector*は*killer*の致死効果から配偶体を保護する．*killer*と*protector*は密に連鎖している．

*killer-protector*アレルと*killed*アレルが 1 : 1 の比でヘテロ接合型を形成しているとき，２倍体では*killer-protector*アレルが全配偶体の50%に継承されるため，*killer-protector*アレルを持たない50%の配偶体が不稔となる．しかし４倍体では*killer-protector*アレルは全配偶体の75%に継承されるため，残りの25%のみが不稔となることが考えられる．従って，倍加に伴い，*killer-protector*モデルに基づくHS座の効果が減衰する可能性が考えられる．

Table 2-1 日本晴，WK21及びF1雑種の葯培養により得られたカルスと再分化個体の数

Rice strains		Induction medium	No. of cultured anthers	No. of anthers producing callus (%)	No. of replanted calli[a]	No. of regenerated calli (%)
Nipponbare	*O. sativa*	RI-13	2,565	112 (4.37)	10	0
		SK-1	330	23 (6.97)	23	13 (56.52)
WK21	*O. glaberrima*	RI-13	13,239	146 (1.10)	10	0
Nipponbare × WK21	F1	RI-13	14,724	11 (0.07)	11	1 (9.09)
WK21 × Nipponbare		RI-13	13,457	87 (0.65)	87	19 (21.84)

[a] 再分化にはN6再分化培地を用いた.

Table 2-2　親系統及び再分化植物体の葉表面の形質と芒の有無

Plant ID	Nip	WK21	F1	#60	#96	#13	#16	#19	#20	#25	#28	#47	#63	#70	#74	#80	#91	#38	#39	#61	#79	#88
Leaf surface[a]	R	S	R	-	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	-	S	S
Awn	No	No	Yes	-	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	Yes

[a] R...Rough, S...Smooth

Table 2-3　再分化植物体のジェノタイプ

Marker	Nip	WK21	F1	#60	#96	#13	#16	#19	#20	#25	#28	#47	#63	#70	#74	#80	#91	#38	#39	#61	#79	#88
1-1	N	W	H	N	N	H	H	H	H	H	H	H	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H
1-2	N	W	H	N	N	H	H	W	W	H	W	W	H	H	H	N	H	H	H	H	H	H
2-1	N	W	H	N	N	H	W	-	H	H	N	H	H	W	H	H	N	H	H	H	H	H
3-1	N	W	H	W	N	H	W	W	H	N	H	H	H	H	H	W	W	H	H	H	H	H
4-1	N	W	H	N	N	H	N	H	H	H	W	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H
4-2	N	W	H	N	W	H	H	N	H	H	H	N	H	H	H	H	N	H	H	H	H	H
5-1	N	W	H	W	W	N	H	H	H	H	H	H	N	H	H	H	H	H	H	H	H	H
5-2	N	W	H	N	W	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	N	H	H	-	H	H	H
6-1	N	W	H	W	W	H	H	H	H	H	H	H	H	W	H	H	N	H	H	H	H	H
6-2	N	W	H	N	W	H	H	N	W	H	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H
7-1	N	W	H	W	N	H	H	H	H	H	H	N	W	H	N	H	H	H	H	H	H	H
7-2	N	W	H	N	N	H	H	H	H	H	W	H	N	W	N	H	N	H	H	H	H	H
8-1	N	W	H	N	W	H	H	H	N	H	H	W	N	H	H	W	H	H	H	H	H	H
8-2	N	W	H	W	W	H	W	H	H	W	N	W	H	N	H	N	H	H	H	H	H	H
9-1	N	W	H	N	N	N	W	H	H	W	H	W	N	N	H	N	H	H	H	H	H	H
9-2	N	W	H	N	N	N	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
10-1	N	W	H	N	W	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	N	H	H	H	H	H	H
10-2	N	W	H	N	N	H	N	H	H	N	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
11-1	N	W	H	N	W	H	H	W	N	W	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
11-2	N	W	H	W	N	N	N	H	H	H	N	H	H	H	H	H	W	H	H	H	H	H
12-1	N	W	H	W	W	H	N	H	H	H	W	H	H	H	H	H	W	H	H	H	H	H
12-2	N	W	H	N	N	H	N	H	H	W	H	H	W	W	H	H	N	H	H	H	H	H

22個のDNAマーカーを用いてジェノタイピングを行った．各染色体辺り１個か２個のマーカーを用いた．#60と#96は両親どちらか一方のホモ接合型アレルのみを保持していた．12個体の再分化植物体は，ホモ接合型とヘテロ接合型のアレルの両方を保持していた．残りの５個体はヘテロ接合型のアレルのみを保持していた．青色の"N"は日本晴型アレル，赤色の"W"はWK21型アレル，黄色の"H"は日本晴とWK21のヘテロ接合型をそれぞれ表す．

Table 2-4　ジェノタイピングに用いたマーカー一覧

Code	Location (Mbp)	Chr	Primer	Forward sequence	Reverce sequence
1-1	2.8	1	RM3740	5'-ATCCCAACTCTAAGCCACCC-3'	5'-CTACCCGTCACCAACTCACC-3'
1-2	36.5	1	RM3825	5'-AAAGCCCCCAAAAGCAGTAC-3'	5'-GTGAAACTCTGGGGTGTTCG-3'
2-1	10.2	2	RM3501	5'-TCCTAGTGCATCAGCACAGC-3'	5'-GTCCGTTTCAGCAAGCAAAC-3'
3-1	5.5	3	RM5442	5'-AGGAGACAGGAAAGCCTTCC-3'	5'-CGAGTCGACCAGGCTAGAAC-3'
4-1	4.7	4	RM6487	5'-AGAAGCTGTAGACGATGGCC-3'	5'-CTAGACCTCATCCCCTTCCC-3'
4-2	20.1	4	RM3643	5'-AGCATGAGCAGGTGCTAGTG-3'	5'-CGTTGCATGTGTGATGGC-3'
5-1	0.3	5	RM5816	5'-CTGCATGCATGACTGCATC-3'	5'-TGACTCTGATCGATCCATGG-3'
5-2	28.3	5	RM6313	5'-ATCCAGATCCACTTTGACCG-3'	5'-GGAGGACTTCTACCATCCTTG-3'
6-1	1.4	6	RM8074	5'-TACTACCACTTCTAGATGAGTTCAG-3'	5'-CTGAATACACTTCAATTTCTCTC-3'
6-2	31.1	6	RM1031	5'-GTGAAGGCACACCAACCG-3'	5'-GACGAGGATCGAATTCGAAG-3'
7-1	1.0	7	RM6222	5'-CCTCCTATCCGGAGAAGGAC-3'	5'-AACACGTTTGAGTTCCAGGC-3'
7-2	20.8	7	RM3826	5'-TTAGCTTTCCTCCAGTCTCC-3'	5'-ACGGGTATCTGAAACACAAC-3'
8-1	0.1	8	RM6369	5'-CAAGCTAGGGCTGCATAAGC-3'	5'-GCTTCACCTACCTACCTCACC-3'
8-2	19.0	8	RM3153	5'-CGGTTCTTTTCACATGGTCG-3'	5'-ATCACAACAAGCTCGACGTG-3'
9-1	15.4	9	RM3700	5'-AAATGCCCCATGCACAAC-3'	5'-TTGTCAGATTGTCACCAGGG-3'
9-2	22.7	9	RM205	5'-CTGGTTCTGTATGGGAGCAG-3'	5'-CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG-3'
10-1	17.5	10	RM5620	5'-TCGACTTGAAGCATCACACC-3'	5'-TCTGAAATGTCAAGTGGGCC-3'
10-2	23.1	10	RM4771	5'-ACGTTGATTTCATTCAGGTC-3'	5'-ACGCTAACTGAGAAACATGG-3'
11-1	0.4	11	RM286	5'-GGCTTCATCTTTGGCGAC-3'	5'-CCGGATTCACGAGATAAACTC-3'
11-2	18.3	11	RM209	5'-ATATGAGTTGCTGTCGTGCG-3'	5'-CAACTTGCATCCTCCCCTCC-3'
12-1	6.8	12	RM7003	5'-GGCAGACATACAGCTTATAGGC-3'	5'-TGCAAATGAACCCCTCTAGC-3'
12-2	17.5	12	RM1261	5'-GTCCATGCCCAAGACACAAC-3'	5'-GTTACATCATGGGTGACCCC-3'
HS -linked markers					
S1	2.2	6	RM19359	5'-GATCCAAGTAGGCACGAGTCACC-3'	5'-AGCTGATTCCTCTCTGCTTCTCG-3'
S18	12.8	10	RM25321	5'-CACTTCTTGTCACTGTACACACTCC-3'	5'-CACATGCCGTATATCAACTACCG-3'
S19	0.1	3	RM60	5'-AGTCCCATGTTCCACTTCCG-3'	5'-ATGGCTACTGCCTGTACTAC-3'
S20	3.1	7	RM82	5'-TGCTTCTTGTCAATTCGCC-3'	5'-CGACTCGTGGAGGTACGG-3'
S21	26.8	7	RM429	5'-TCCCTCCAGCAATGTCTTTC-3'	5'-CCTTCATCTTGCTTTCCACC-3'
S29(t)	2.9	2	RM279	5'-GCGGGAGAGGGATCTCCT-3'	5'-GGCTAGGAGTTAACCTCGCG-3'
S3	9.0	11	RM536	5'-TCTCTCCTCTTGTTTGGCTC-3'	5'-ACACACCAACACGACCACAC-3'
S34(t)	9.8	3	RM7	5'-TTCGCCATGAAGTCTCTCG-3'	5'-CCTCCCATCATTTCGTTGTT-3'
S36(t)	35.4	2	RM207	5'-CCATTCGTGAGAAGATCTGA-3'	5'-CACCTCATCCTCGTAACGCC-3'
S37(t)	15.1	1	RM449	5'-TTGGGAGGTGTTGATAAGGC-3'	5'-ACCACCAGCGTCTCTCTCTC-3'
S38(t)	0.2	4	RM16260	5'-TGCTAGTAGGAGAGGAGCGAAGC-3'	5'-ACTGTGAGTCGTGTCAGAGTTGG-3'
S39(t)	0.7	12	RM5568	5'-ATTATTGCTTGCGCCTTTAG-3'	5'-AACGGAACAGATCCAAATG-3'

Table 2-5　フローサイトメーターによる倍数性判定結果

Plant ID	Relative ploidy to Nipponbare	Relative ploidy to WK21	Relative ploidy (Average)	Relative ploidy to RP1-#28	Estimated ploidy level
#16	1.94	2.05	2.00	-	4x
#20	1.91	2.08	2.00	-	
#25	1.93	2.08	2.01	-	
#28	1.96	2.08	2.02	-	
#38	1.94	2.08	2.01	-	
#47	1.93	2.01	1.97	-	
#80	1.94	2.12	2.03	-	
#96	1.91	2.06	1.98	-	
#88	1.48	1.53	1.51	-	3x
#79	1.44	1.56	1.50	-	
#39	1.46	1.55	1.51	-	
#74	2.44	2.58	2.51	-	5x
#13	-	-	-	0.50	2x
#19	-	-	-	0.49	
#63	-	-	-	0.50	
#70	-	-	-	0.49	
#91	-	-	-	0.51	

倍数体(3-5倍体)の倍数性は，2つの2倍体親系統と比較して倍数性を定めた．2倍体と推定された植物体の倍数性は，推定4倍体再分化植物体の#28と比較して　2倍体か否かを判断した．

Table 2-6 再分化植物体から得られた種子数，および植物体の倍数性

Plant ID	#13	#19	#63	#70	#91	#39	#79	#88	#16	#20	#25	#28	#38	#47	#80	#96	#74
Collected seeds no.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	0	18	1	32	0	0
Ploidy	2x					3x			4x								5x

Table 2-7　再分化植物体の*HS*-locusの接合型

	Regenerated plant ID																		
HS locus	#60	#96	#13	#16	#19	#20	#25	#28	#47	#63	#70	#74	#80	#91	#38	#39	#61	#79	#88
S_1	W	W	H	H	H	H	H	H	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H
S_3	W	W	H	N	H	H	H	N	W	H	N	H	H	W	H	H	H	H	H
S_{18}	N	W	H	H	H	H	H	W	H	H	W	H	N	N	H	H	H	H	H
S_{19}	W	W	H	H	H	H	H	H	H	H	N	N	W	W	H	H	H	H	H
S_{20}	N	N	H	H	H	H	H	H	H	W	H	N	H	N	H	H	H	H	H
S_{21}	N	N	H	H	H	N	W	H	H	N	W	N	H	N	H	H	H	H	H
$S_{29}(t)$	W	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	N	N	H	H	H	H	H	H
$S_{34}(t)$	W	N	H	W	W	H	N	H	H	N	H	H	H	W	H	H	H	H	H
$S_{36}(t)$	N	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
$S_{37}(t)$	W	N	H	W	H	H	H	W	H	H	W	H	H	N	H	H	H	H	H
$S_{38}(t)$	N	N	H	N	H	N	H	W	H	H	W	H	H	H	H	H	H	H	H
$S_{39}(t)$	W	N	H	H	N	N	N	H	N	H	H	H	N	N	H	H	H	H	H
No. of heterozygous *HS*	0	0	12	8	10	9	9	8	10	9	5	8	8	4	12	12	12	12	12

Table 2-8　RP2-#25,　#38,　#80系統の形質

Plant materials	Pollen fertility (%)	Seed set rate (%)	Seed size[2] (mm)		Seed size[3] (mm)		Plant height (cm)	Leaf length（cm）				Leaf width（cm）				Ligule length（cm）				Color of stigma
			Length	Width	Length	Width		Flag leaf	Flag -1[4]	Flag -2	Flag -3	Flag leaf	Flag-1	Flag -2	Flag -3	Flag leaf	Flag -1	Flag -2	Flag -3	
[1] RP2-25 (n=4)	5.8±1.8	0.1±0.2	n. d.		n. d.		122.9±6.6	28.0± 7.7	59.0± 13.2	77.7± 8.6	81.6± 4.2	2.13± 0.07	1.71± 0.09	1.47± 0.13	1.50± 0.07	0.65± 0.16	1.97± 0.42	3.43± 1.08	2.94± 0.86	Blackish purple
RP2-38 (n=6)	16.5±20.1	8.0±14.5	n. d		8.7±0.5	2.9±0.3	130.7±13.9	26.7± 14.2	55.6± 21.1	78.5± 6.8	81.5± 8.7	1.94± 0.25	1.56± 0.29	1.51± 0.13	1.49± 0.11	0.82± 0.29	1.63± 0.34	2.62± 0.67	2.58± 0.41	Blackish purple
RP2-80 (n=5)	39.0±20.7	0.6±1.3	9.1±0.5	3.6±0.3	9.0±0.2	4.0±0.3	120.3±3	16.3± 8.4	43.4± 7.3	75.1± 5.7	78.8± 6.8	1.64± 0.61	1.86± 0.26	1.87± 0.10	1.67± 0.16	0.47± 0.14	0.96± 0.29	1.70± 0.31	1.52± 0.21	White
WK21 (seed parent)	90.4±1.6	91.5±1.1	6.8±0.4	2.6±0.3	-	-	115.1	18.6	40.2	69.2	61.3	1.60	1.40	1.25	1.45	0.40	0.50	0.55	0.70	Blackish purple
Nipponbare (pollen parent)	89.7±1.3	85.0±1.1	6.4±0.4	2.7±0.2	-	-	97.9	18.4	33.2	56.7	69.5	1.45	1.43	1.30	1.20	0.40	0.85	1.00	1.30	White
WK21/Nip	0.0±0.0	0.0±0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Blackish purple

[1]PR2は葯培養由来植物体の自殖次代．[2]葯培養当代から得られた種子．[3]RP2世代から得られた種子．[4]Flag -1，Flag -2，Flag -3は止め葉から-1葉，-2葉，-3葉目の葉を指す．
RP2世代の個体数はそれぞれ，RP2-25が4個体，RP2-38が6個体，RP2-80が5個体．

Table 2-9　RP2-#25,　#38,　#80系統の各個体の稔性と*HS*座の接合型

Plant line	RP2-25 (n=4)				RP2-38 (n=6)						RP2-80 (n=5)				
Individual No.	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5
Pollen fertility (%) (IKI stained / total pollens)	4.2 (24/578)	4.1 (26/634)	6.6 (28/424)	8.3 (6/72)	0.0 (0/242)	15.4 (114/738)	19.8 (226/1140)	0.9 (4/464)	4.4 (18/410)	58.3 (274/470)	47.1 (368/782)	n.d.	7.1 (12/170)	37.9 (154/406)	64.1 (328/512)
Seed set rate (%) (Fertile / total seeds)	0 (0/44)	0.5 (1/185)	0 (0/86)	0 (0/111)	0 (0/54)	0 (0/42)	7.9 (8/101)	0 (0/44)	0 (0/85)	39.8 (49/123)	0 (0/44)	0 (0/96)	0 (0/13)	3.2 (1/31)	0 (0/38)
HS-locus	Genotypes of RP2 individuals														
S1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S18	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	N	N	N	N	N
S19	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	W	W	W	W	W
S20	H	H	H	W	H	H	H	H	W	H	H	H	H	H	H
S21	W	W	W	W	H	H	H	H	H	H	H	H	H	N	H
S34(t)	N	N	N	N	H	H	H	H	H	W	-	H	H	-	-
S36(t)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S37(t)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S38(t)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
S39(t)	N	N	N	N	H	H	H	H	H	H	N	N	N	N	N

Table 2-10 RP2-#25, #38, #80系統の各個体の倍数性

Plant ID		Relative ploidy to Nipponbare	Relative ploidy to WK21	Relative ploidy (Average)	Estimated ploidy level
RP2-#25	1	1.95	2.07	2.01	4x
	2	1.92	2.12	2.02	4x
	3	1.89	2.07	1.98	4x
	4	1.93	2.05	1.99	4x
RP2-#38	1	1.96	2.11	2.04	4x
	2	1.99	2.15	2.07	4x
	3	1.99	2.14	2.06	4x
	4	1.97	2.10	2.04	4x
	5	1.96	2.08	2.02	4x
	6	1.98	2.13	2.06	4x
RP2-#80	1	1.95	2.07	2.01	4x
	2	1.96	2.09	2.03	4x
	3	1.98	2.12	2.05	4x
	4	1.97	2.14	2.05	4x
	5	1.93	2.06	2.00	4x

Table 2-11 *sativa*-*glaberrima* 種間F1雑種の2倍体および4倍体の種子稔性

Plant variety	Specie	Ploidy	Seed set rate (%) (fertile / total seeds)	
PL9	*O. sativa* ssp. *japonica*	2X	95.2	(119/125)
		4X	54.3	(334/615)
PUSUR	*O. sativa* ssp. *indica*	2X	95.9	(260/271)
		4X	62.2	(158/254)
DULAR		2X	94.0	(264/281)
		4X	34.4	(22/64)
WK21	*O. glaberrima*	2X	91.4	(181/198)
		4X	31.1	(59/190)
WK21/PL9 F1	Interspecific	2X	0.0	(0/256)
		4X	**8.6**	**(59/689)**
WK21/PUSUR F1		2X	0.0	(0/288)
		4X	**13.4**	**(49/365)**
WK21/DULAR F1		2X	0.0	(0/100)
		4X	**3.4**	**(18/532)**
WK21/Nipponbare F1		2X	0.0	(0/249)

考察

sativa-glaberrima 種間雑種 F1 の葯培養による雑種植物の作成

sativa-glaberrima 種間の F1 個体は強度の配偶体不稔性を示すため雑種後代は得られない(Sano ら，1979；Ouyang ら，2013)．本研究では F1 雑種の不稔性小胞子からカルスを誘導し，それを再分化させることで雑種後代を得ることに成功した．再分化植物体 19 個体中 5 個体は稔性を有した．Kanaoka ら(2018)は，雑種不稔性を示す植物体の小胞子からカルスを誘導するに際して，1 核期の小胞子を培養に供することが重要だと報告している．この条件はコムギにおいても同様である(Hassawi ら，1990)．オオムギ及びセイヨウアブラナでは，1 核期の小胞子からの直接的な胚様体誘導が行われる(Hoekstra ら, 1992；Telmer ら, 1992)．小胞子からの胚誘導率あるいはカルス形成率は 2 核期以降，極端に低下し，成熟した配偶体へと不可逆的に発達していく(木下ら，2000)．*sativa-glaberrima* 種間の小胞子致死は，減数分裂直後の 1 核期においてはまだ顕現していない(Figure 2-1B)．従って，*sativa-glaberrima* 種間 F1 個体から葯培養法によりカルス及び再分化植物体を得るためには，カルス形成適期でありかつ雑種不稔性の影響が顕著でない 1 核期に培養することこそが肝心だと言える．

一般的な 2 倍体イネの葯培養で得られる 2 倍体植物は，半数体である小胞子が自然倍加して得られるため，原則としてすべての遺伝子座がホモ接合型に固定されている．しかし本研究で得られた再分化植物体 19 個体の内，DH は 2 個体(#60，#96)のみで，他の植物体はヘテロ接合型遺伝子座を保持しており，一般的な DH とは異なっていた(Table 2-3)．

接合型の多様性

葯培養で得られた再分化植物体は，遺伝子座の接合型から 3 つのグループに分かれた(Table 2-3)．

(1) すべての遺伝子座がホモ接合型である Hom 植物体(2 個体)．

(2) すべての遺伝子座がヘテロ接合型である Het 植物体(5 個体)．

(3) ホモ接合型とヘテロ接合型の遺伝子座を併せ持つ Hom/Het 植物体(12 個体)．

1 番目の Hom 植物体群は半数体である小胞子を起源とし，再分化までの過程で自然倍加した植物体であると推定される．2 番目の Het 植物体群の背景は 2 つの可能性が考えられる．1 つ目は，葯培養時に小胞子ではなく F1 個体の体細胞である葯壁からカルスが脱分化した可能性で，カルスからの再分化植物体はすべての遺伝子座がヘテロ接合型となる．2 つ目は，減数分裂前の花粉母細胞(4x)が脱分化した場合で，同様にすべての遺伝子座がヘテロ接合型となる．最後の Hom/Het 植物体群は，減数分裂時の相同組換えを正常に終えた後の 2 倍性小胞子から出現したと考えられる(Pinson と Rutger，1993)．4 倍体の Hom/Het 植物体は 2 倍性小胞子が再分化までの過程で自然倍加して生じ，2 倍体の Hom/Het 植物体では自然倍加が起こらず再分化したと考えられる．種内雑種の葯培養でもヘテロ接合型を持つ再分化植物体は得られており，それらは体細胞に由来するかあるいは培養変異によると

推測されている(Grewal ら，2011；Nguyen ら，2016； Rout ら，2016；Naik ら，2017)．これらの再分化植物体は本論文の第 3 章にて詳細に議論する．

倍数化による雑種不稔性回避のメカニズム

19 個体の再分化植物体の内，種子をつけた 5 個体はいずれも 4 倍体で，ヘテロ接合性のゲノム領域を保持しており DH 個体ではなかった(Table 2-3，2-6)．5 個体の内 4 個体は Hom/Het 型で，1 個体は驚くべきことに *sativa-glaberrima* 種間 F1 植物体と同様のゲノムを持つ完全な Het 型個体であった．Hom/Het 型の個体はまた，雑種不稔性の原因となる多くの *HS* 座をヘテロ接合型で保持している．致死となる側のアレルを持つ配偶体は不稔性を示す(Figure 1-1，Sano，1990)．*S1* 座をはじめとした *HS* 座の多くは半不稔影響を示し，1 つのヘテロ接合型の *HS* 座につき配偶体の稔性は 50%低下する(Figure 1-1)．多数のヘテロ型 *HS* 座の効果が集積することで，F1 雑種の雄性配偶体はほぼ完全な不稔性を示す．本研究では，多数の *HS* 座をヘテロ接合型で保持しながらも部分的に稔性を持つ 4 倍体植物体が得られた．両親系統へ戻し交雑された雑種を除き，稔性のある *sativa-glaberrima* 種間雑種を得ることは難しい．19 個体の内，稔性を示した 5 個体はいずれも 4 倍体であったことから，倍数化が *sativa-glaberrima* 種間の雑種不稔性克服の鍵となった可能性がある．

近年，*sativa-glaberrima* 種間で最も早期に報告された *HS* 座である *S1* 座の原因遺伝子が単離され，その働き方の仕組みとして *killer-protector* システムが提唱された(Yang ら，2012；Li ら，2020)．この仕組みは，互いに密に連鎖した *killer* 遺伝子と *protector* 遺伝子より構成され，*killer* 遺伝子は配偶体致死効果を持ち，*protector* 遺伝子は *killer* 遺伝子からの配偶体保護効果を持つ．*killer-protector* アレルが片側の染色体のみに存在するヘテロ接合型植物体では，配偶体全体の半数のみに *killer-protector* アレルが継承される．従って *killer* 遺伝子が胞子体的に発現した場合，*killer-protector* アレルを運ぶ 50%の配偶体のみが生存し，*killer-protector* アレルを持たない 50%は致死性となる半不稔性が呈される(Figure 2-5)．一方で 4 倍体の場合，*killer-protector* アレルは配偶体全体の 75%に継承されることが期待される(Figure 2-5)．故に 4 倍体では，単一の *HS* 座の効果が半不稔効果から四半不稔効果へ減衰することが予想される．従って，多数の *HS* 座を持つにも関わらず稔性を持った 4 倍体が出現した背景としては，*HS* 座の効果が減衰した可能性が考えられる．

葯培養で得られた稔性植物体の形質

sativa-glaberrima 種間 F1 雑種の葯培養で得られた再分化植物体の内，#20，#25，#38，#47 及び#80 は稔性を保持していた(Table 2-6)．これらはいずれも 4 倍体であり，#25，#38 及び#80 からは後代系統が展開された(Table 2-8)．RP2-25，RP2-38 及び RP2-80 系統の個体間では，部分的に稔性を持つ個体と完全不稔性個体が分離した(Table 2-8，2-9)．*HS* 座の接合型と稔性の有無との間の相関性は本研究では明瞭に示されなかったが，特定の遺伝背景下では 4 倍性により不稔性が克服される可能性が示された(Table 2-9)．#38 及び#80

から得られた種子のサイズは日本晴及び WK21 より 1.3-1.4 倍大きく，この形質は後代へと継承されていた(Table 2-8)．RP2 系統の植物体の背丈，葉身の長さと幅，葉舌の長さはいずれも日本晴及び WK21 に優っていた(Table 2-8)．RP2 系統はいずれも 4 倍体に近い倍数性を保持していたことから，このバイオマス量の増大は 4 倍体化によりもたらされた典型的な形質であると考えられる．一方でこれらの系統は F1 個体由来のヘテロ接合性を保持していたため，一部はヘテロシスの寄与も考えられる．しかし本研究で用いた日本晴と WK21 に間の F1 個体は，これらのバイオマス関連形質について両親の中間的な形質を示す傾向を持ったため，RP2 系統のバイオマス量は主に倍加によりもたらされたと推測する．ヘテロシスが主因だった場合，これらの形質を継代して維持し続けることは難しいだろう．

1 つのヘテロ接合型の座が固定される際，2 倍体植物では毎代 50%がホモ接合型となり，最低 2 世代でヘテロ接合率が 1/4 以下に低下する．一方 4 倍体植物では，代当たり約 8.3%(1/12)のみがホモ接合型となるため，ヘテロ接合率が 1/4 以下に低下するには最低 16 世代経る必要がある．この 2 倍体と 4 倍体の差は，例えば 2 つの異なるゲノム間で遺伝子交換を行いたい場合，ヘテロ接合性を長く保っていられる 4 倍体の方が，相同組換えによる遺伝子交換の機会をより多く提供できる可能性がある．従って雑種 4 倍体は，2 倍体よりも長い世代にわたり，相同組換えの機会を提供する潜在性を持ち，新しい遺伝子組み合わせをより多く生み出しうる可能性を秘めた育種材料でもある．

イネ雑種 4 倍体は複二倍体か？

雑種 2 倍体が不稔を示す場合，その原因はしばしば減数分裂時の染色体対合に帰結する(Jauhar，2007)．同祖染色体間の対合が不十分であるため，減数分裂時に二価染色体ではなく一価染色体が形成されることがある(Jauhar，2007；Silkova ら 2003；Silkova ら，2016)．そのため染色体分配がうまくいかず，正常に配偶体が形成されない．この型の雑種不稔性は，雑種の倍加による完全に相補な相同染色体の補完により解決される場合があり，倍加した雑種は一般的に複二倍体と呼ばれる．複二倍体の減数分裂では，異なる親種に由来する同祖染色体の代わりに，倍加によりもたらされた相同染色体間で対合が起きる(Jauhar，2007)．従って，同祖染色体間つまり種間の染色体対合は起きず，相同組換えによる種間の遺伝子交換が難しくなる．そのため雑種 4 倍体を遺伝子交換の橋渡しとして用いる場合，雑種 4 倍が複二倍体か否かを確かめる必要がある．

本研究で得られた 4 倍体雑種は，以下の点から復 2 倍体ではないと考える．

① 2 倍体雑種の葯培養により，相同組換えを経た後代が得られている(Table 2-3)．従って 2 種の染色体は正常に対合する．

② 4 倍体雑種の後代に形質の分離が見られる(未公表データ．山本ら，2020)．

以上の事実に基づき，雑種 4 倍体は複二倍体ではないと推測する．

第三章

種間雑種における 2 倍性小胞子と

減数分裂異常の関連性

緒言

第 2 章で述べたように，*sativa-glaberrima* 種間 F1 雑種(WK21/Nip F1)の葯培養によって稔性を持つ 5 つの個体が得られた．これらの個体はすべて 4 倍体であった．Gopalakishnan ら(1964)や Oka(1968)の 1960 年代の研究以降，両種間の雑種不稔性と倍数性との関連性が指摘されてきたが，それを検証した報告はなされていない．私の研究において *sativa-glaberrima* 雑種不稔の克服には，4 倍体 F1 雑種の利用が有効であることを示した(Table 2-8)．葯培養によって生じた 4 倍体も，2 倍体 F1 雑種と同様に全体がヘテロ接合型かあるいは部分的にヘテロ接合型を保持していた(Table 2-3，2-4)．2 倍体イネの葯培養で小胞子から得られる再分化植物体は原則的に，すべての遺伝子座がホモ接合型となる．部分的にヘテロ接合型を持つ植物体の由来としては，異常な減数分裂に起因する異数性配偶体か，第一分裂か第二分裂のどちらか一方が完全に欠落した非還元性の配偶体が考えられる．フローサイトメトリー法による倍数性測定結果に基づけば，再分化植物体は基本染色体数のほぼ整数倍の染色体セットを保持していたことから，ヘテロ接合性を併せ持つ植物体は異数性ではなく非還元性配偶体に由来すると想定された．2 倍体イネの非還元性配偶体は 2 倍体であるため，葯培養により 4 倍体が多く出現した理由はこれらの自然倍加によるのかもしれない．この考えを元に，非還元性の 2 倍性配偶体が形成される可能性の高い，F1 雑種の雄性配偶体の減数分裂過程を，染色体の挙動に着目して解析した．

非還元性配偶体の形成は多くの植物で報告され，減数分裂の第一分裂か第二分裂が欠失した際に生産される(De Storme と Geelen，2013a)．*sativa-glaberrima* 種間の減数分裂を調べた報告はほとんどないが，2 種間の F1 個体における雄性配偶体形成を調べた Morinaga と Kuriyama(1957)は，両種間の染色体対合が正常であり，減数分裂進行にも異常はなく 4 分子が形成されたことを報告している．第 2 章における小胞子観察では，減数分裂直後に正常な小胞子が観察されるが，巨大な小胞子や分裂途中の小胞子も観察されている(Figure 2-1C)ことから，減数分裂異常に基づく非還元性小胞子の形成が疑われる．非還元性配偶体の形成過程において第一分裂の異常は，相同染色体間での分離が起きず，引き続く第二分裂で姉妹染色体の分離のみが生じて，相同染色体対を含む配偶体を生じる(第一分裂復旧：First division restitution，FDR)(Figure 3-1)．第二分裂で異常が起こると，第一分裂で相同染色体が分離し，姉妹染色体間で対を形成したままの配偶体を生じる(第二分裂復旧：Second division restitution，SDR)(Figure 3-1)．2 つの減数分裂異常はそれぞれ FDR では相同染色体との対，SDR では姉妹染色体との対が生じることから，遺伝的組換えが抑制されているセントロメアの多型を利用して，ヘテロ接合型を併せ持っていた葯培養由来植物体が非還元性小胞子に由来するか否かを確認することができる．本章では，種間雑種由来の葯培養再分化植物体が倍数性を生じた原因を探ると共に，雑種不稔遺伝子座に先行してこれらの非還元性の減数分裂異常が小胞子の不稔にも関与する可能性を考察する．

材料および方法

植物材料

ジェノタイピングには第 2 章でホモ接合型とヘテロ接合型の遺伝子座を併せ持っていた 12 個体(Hom/Het 型植物体．#13，#16，#19，#20，#25，#28，#47，#63，#70，#74，#80，#91．Table 2-3)を用いた．植物体の展開葉から DNA を抽出し，ジェノタイピングに用いた．

減数分裂の観察には *O. sativa* として日本晴，*O. glaberrima* として WK21，種間雑種として WK21/Nip F1 を用いた．すべての植物体は北海道大学農学部の世代促進温室で栽培され，短日処理を施して生殖生長を誘導し，減数分裂の観察に用いた．

遺伝子型の判定

再分化植物体のセントロメア近傍における接合型の判定には，既報の SSR マーカー(McCouch，2002)と CAPS マーカーに加え，日本晴と WK21 のゲノムシーケンスの比較に基づいて設計した In/Del マーカーを用いた．日本晴のゲノムシーケンスは IRGSP-1.0(RAP-DB)，WK21 のゲノムシーケンスは DDBJ に登録されている DRS049718 をそれぞれ参照した．再分化植物体の展開葉から簡易抽出法によりゲノム DNA を抽出した．ジェノタイピングの際は，セントロメアの上流側近傍及び下流側近傍にそれぞれ 1 個の DNA マーカーを用意したため，合計 24 個の DNA マーカーを使用した．それぞれの染色体のセントロメア位置は Rice Genome Annotation Project のデータベースを参照とした(http://rice.plantbiology.msu.edu/annotation_pseudo_centromeres.shtml)．PCR 時の DNA 増幅には GoTaq Green Master Mix (Promega)を用いた．増幅産物は 3%アガロースゲルで電気泳動し，増幅断片長の多型を判別した．

免疫染色

減数分裂期の観察のために，穂ばらみ期の穂を葉耳間長-6cm - -1cm の段階で採取した．ピンセットで葉鞘を裂き開いて穂を取り出し，免疫染色用の固定バッファー(Microtubule stabilizing buffer に 0.1% (v/v) Triton X-100，3% (w/v) パラフォルムアルデヒドを溶解．Ap. Table 3 参照)中に浸漬して 10 分間脱気し，さらに 10 分間静置して固定した．固定液を捨てて 1×PBS を加えて 10 分間浸漬し，1×PBS でこの洗浄を 2 回繰り返した後，1×PBS 中に浸漬して観察まで冷蔵庫(4℃)で保管した．スライドグラス上に 1×PBS を 20 μl 滴下し，固定した穂から葯を切り出して置床し粉砕した後，-80℃で 30 分以上凍結した．凍結後，カミソリを用いてカバーグラスを引きはがして風乾させ，サンプル上に一次抗体反応液(Ap. Table 4 参照)を 100 μl 滴下してパラフィルムで封入した．一次抗体は抗 OsCenH3 ラビット抗体(長岐清孝博士(岡山大学)より分譲)と抗 α-チューブリンマウス抗体(T6199，Sigma-Aldrich)の 2 種類を用いた．スライドグラスを湿箱中に静

置し，37℃で 1 時間反応させた．1×PBS の入った容器の中にスライドグラスを浸し，パラフィルムをはがした後，1×PBS 中にスライドグラスを垂直にセットし，10 分間振盪させて洗浄する操作を 2 度行った．洗浄後，スライドグラスを取り出して残った 1×PBS をブロワーで吹き飛ばして風乾させ，二次抗体反応液(Ap. Table 4 参照)を 100μl 滴下してパラフィルムで封入した．二次抗体は Alexa Fluor 488-labeled anti-mouse antibody (Invitrogen) 及び Alexa Fluor 555-labeled antirabbit antibody (Invitrogen)の 2 種を用いた．一次反応と同じ手順で反応させ洗浄し，ブロワーで風乾させた後，褪色防止及び染色体の DAPI 染色のために，サンプル上に ProLong Diamond anti-fade with DAPI (Invitrogen) を 20μl 滴下し，カバーグラスで封入した後，蛍光顕微鏡下で観察した (Nagaki ら，2004).

結果

1. Hom/Het 再分化植物体ゲノムの接合型と倍数性

葯培養を用いて再分化植物体を作出した以前の報告でも，ヘテロ型の遺伝子領域を持つ個体は得られており(Grewal ら, 2011；Nguyen ら, 2016； Rout ら, 2016；Naik ら, 2017)，葯壁である体細胞からの脱分化や培養変異の可能性が論じられている．しかし今回の Hom/Het 型植物体はホモ型の遺伝子座を併せ持つ点で F1 の体細胞由来カルスとは異なり，かつ転座や逆位等の培養変異が全染色体規模のヘテロ接合型をもたらすとは考えにくい．そこでまず，減数分裂時の異常により複数の染色体セットを保持した非還元性の小胞子が誕生し，それらが脱分化した可能性を検討した．非還元性配偶体の主要な形成過程として FDR と SDR が知られている(Figure 3-1；De Storme と Geelen, 2013a)．FDR は第一分裂時の相同染色体間の分離が起きず，引き続く第二分裂の姉妹染色分体間の分離は起きることから，生成される配偶体は半数体相当の 1 セットの染色体の代わりに，相同染色体の関係にある 2 セットの染色体を保持する．SDR は，第一分裂は正常に終了し引き続く第二分裂の姉妹染色分体間の分離が起きず，結果として配偶体は姉妹染色体の関係にある 2 セットの染色体を保持する(Figure 3-1)．染色体の分離に先立つ遺伝的組換えが正常に行われている場合，FDR・SDR 型の両配偶体ともに，ホモ型とヘテロ型が混在したゲノムを保持している．FDR 型・SDR 型の配偶体共に体細胞と同じ数の染色体を保持しているため，2 倍体であるイネなら 2 倍性の配偶体が形成される．非還元性小胞子が再分化植物体の由来となった場合，2 倍体あるいは自然倍加した 4 倍体植物体が出現すると考えられる．

FDR 型および SDR 型の非還元性配偶体は保持する染色体セットに特徴を持つ．すなわち，FDR 型配偶体は相同染色体のセットを保持し，SDR 型配偶体は姉妹染色体のセットを保持している．今回用いた *sativa-glaberrima* F1 個体が非還元性小胞子を産生する場合，FDR 型小胞子はすべての染色体対について相同染色体の関係にあることから，片側は *sativa* 由来の染色分体であり，もう片側は *glaberrima* 由来の染色分体となっている(Figure 3-1)．SDR 型小胞子は，すべての染色体対が姉妹染色体の関係にあるため，染色体対の片側の染色分体が *sativa* 由来ならもう一方も *sativa* 由来，片側が *glaberrima* 由来ならもう一方も *glaberrima* 由来の染色分体となっている(Figure 3-1)．従って，減数分裂時に組換えが抑制されているセントロメアの接合型に着目した場合，原則的に，FDR 型小胞子のセントロメアの接合型は 12 対すべてにおいて *sativa-glaberrima* のヘテロ接合型が維持されており，SDR 型小胞子は 12 対すべてにおいて *sativa* 型あるいは *glaberrima* 型のホモ接合型が維持されていることが予想される．そこで，Hom/Het 型植物体 12 個体のセントロメア領域における接合型を検証するために，日本晴と WK21 のセントロメア領域の In/Del 多型に対し DNA マーカーを設計してジェノタイピングを行った．結果は非常に明瞭で，12 個体中 8 個体は 12 対すべての染色体のセントロメア領域がヘテロ接合型であり，4 個体は *sativa* 型か *glaberrima* 型のホモ接合型であった(Table 3-1，3-2)．これらの結果は，前者の 8 個体が

FDR 型の小胞子に由来し，後者の 4 個体が SDR 型小胞子に由来したことを示した．

セントロメア以外の領域について Het 型であった 5 個体の植物体は，うち 3 個体(#39, #79，#88)が 3 倍体，1 個体は 4 倍体(#38)，1 個体(#61)が枯死したため倍数性は不明であったが, いずれの個体のセントロメア領域も他の領域と同様にヘテロ接合型であった(Table 3-3，3-4)．花粉母細胞は 4 倍性のゲノムを持ち，引き続く第一分裂と第二分裂の両方が不全となった細胞が起源となった場合，#38 のような 4 倍体の Het 型植物体が出現しうる．3 倍体の Het 型植物体の起源は，すべての遺伝子座がヘテロ接合型と仮定した場合，4 倍性の花粉母細胞から 1 セットの染色体が減数分裂過程で脱落し 3 倍性となった細胞等が考えられるが，その産生機構を詳細に仮定するのは難しい．

最後に Hom 型であった 2 個体(#60，#96)の内，#96 は 4 倍体であり，#60 は枯死したため倍数性は不明であったが，セントロメア領域は 2 個体とも他の領域と同様にホモ接合型であった(Table 3-3，3-4)．

小胞子由来の再分化植物体はヘテロ接合性の遺伝領域を原則的に持たない．Hom/Het 型配偶体は非還元性小胞子に由来する可能性があり，非還元性小胞子は 2 倍体であるため，自然倍加して再分化すれば 4 倍体になる．本研究で得られた再分化植物体のうち，稔性が確認された植物体はすべて，ヘテロ接合性を持つ 4 倍体であった．そのため，Hom/Het 型の接合性が生じた原因と稔性との関連性を理解することが重要である．Hom/Het 型のゲノム接合性を示す 12 個体の再分化植物体は，セントロメア領域の遺伝子型解析の結果，8 個体は FDR 型の接合型を有し，4 個体は SDR 型の接合型を有することが推定できた．

2. FDR 型の減数分裂異常

FDR を誘導しうる異常としては，減数第一分裂時において二価染色体の代わりに一価染色体が形成されることが報告されている(Jauhar，2007；Silkova と Loginova，2016)．そこで，日本晴，WK21 及び F1 個体における減数第一分裂を観察した(Figure 3-2，3-3)．二価染色体と一価染色体では染色体の形状の他，染色体上の動原体配向性に違いが生じることが予想された．そのため．動原体に局在するタンパク質である OsCenH3 の抗体(anti-OsCenH3 antibody(rabbit))及び二次抗体(anti-rabbit antibody)を用いて標識し蛍光顕微鏡下で動原体の配向性を観察した．また，減数分裂の進行段階を把握するため，進行段階に応じた変化を見せる紡錘体及び染色体も同様に染色した．紡錘体に局在するα-tubulin タンパク質を anti-α-tubulin(T6199，mouse)及び二次抗体(anti-mouse antibody)を用いて標識した．染色体は核酸を対象とし，DAPI により標識した．日本晴及び WK21 では減数分裂第一分裂が始まった後，diplotene 期において対合した染色体が徐々に凝縮し，metaphase I 期に赤道面上に一様に配置され，紡錘体により二極に分割されていく様子が明瞭に観察された(Figure 3-2)．α-tubulin は diplotene 期より以前においては細胞内に分布していたが，核膜が崩壊する diakinesis 期以降は，紡錘体を形成して動原体部へ結合し，染色体を両極へ分割していく様子が観察された(Figure 3-2)．*sativa-glaberrima* F1 個体では，親個体と同様に二

価染色体を形成(Figure 3-3A，B)し第一分裂を正常に終える花粉母細胞(Pollen mother cell, PMC)と同時に, 明らかに一価染色体を形成している異常なPMCも察された(Figure 3-3B). 二価染色体は一般的に以下のような特徴がある.

① 2倍体のイネでは1つの花粉母細胞内に，12対の二価染色体が形成される.

② 二価染色体の両極に動原体シグナルが出現する．1対の二価染色体は，4本の染色分体より構成される．第一分裂では，姉妹染色体の関係にある 2 本の染色分体同士が同じ極へ運ばれる．そのため，姉妹染色体の関係にある 2 本の染色分体の動原体は 1 ヵ所に束ねられて存在する(一極配向性). 異なる姉妹染色体ペアに由来する2つの一極配向性の動原体が二価染色体の両極に位置しているため，二価染色体の動原体シグナルはペアを形成しているように映る.

一部の PMC では，Diakinesis 期において 13 以上の染色体が含まれ，それらの染色体の動原体が対になっておらず，細長い棒状の形状をしている一価染色体の特徴を持つ染色体が観察された(Figure 3-3B，Table 3-5)．F1 個体において一価染色体を含む PMC は 8.3%(5/60)の頻度で観察され，日本晴及び WK21 では一価染色体を形成する PMC は観察されなかった. 第一分裂時における二価染色体形成は，減数分裂を遂行するために重要な要素である. 二価染色体の両端の動原体に対して，両極へと誘導するための紡錘体がそれぞれ結合しなければ正常な分配は行われない．FDR による配偶体形成が報告されているコムギ雑種では，すべての染色体が一価染色体となり，第一分裂がスキップされ，続いて細胞分裂と相同な減数第二分裂が起きることで FDR 型配偶体が誘導される(Silkova ら，2003)．イネ雑種においても，一価染色体の形成が FDR 型配偶体形成の一因である可能性がある.

3. SDR 型の減数分裂異常

もう 1 つの減数分裂異常として考えられる SDR は，第二分裂が起きない現象である(De Storme と Geelen，2013a；De Storme と Geelen，2020)．そこで第一分裂と同様に，PMC を用いて染色体及び動原体と紡錘体を染色し，第二分裂動態を観察した(Figure 3-4)．今回，日本晴における第二分裂は観察できなかった．もう一方の親個体である WK21 の減数第二分裂では，第一分裂が終わった後，一極配向から二極配向へ変化した姉妹染色体の動原体に対して紡錘体が結合し，それぞれの極へと分配される様子が観察された(Figure 3-4A)．第二分裂を終えた PMC 内には 4 つの核が観察された．*sativa-glaberrima* F1 個体では，親個体と同様に減数第二分裂を終える PMC が観察される一方，親個体と異なる特徴を持つ PMC も察された(Figure 3-4B，3-5)．姉妹染色体の分配が行われる Metaphase II 期において，Meiosis I で別れた 2 つの核のうち，片側では紡錘体由来の α-tubulin シグナルが明瞭に検出されるのに対し，もう片側の核ではシグナルが検出されなかった(Figure 3-5A)．従って α-tubulin シグナルが見られなかった核では紡錘体形成は行われず，姉妹染色体が分配されない可能性が示唆された．また，第二分裂終期において，Telophase II の PMC と同時に Telophase I の時期にある PMC が観察された(Figure 3-

5B，Table 3-5)．先述した PMC における紡錘体形成が見られなかった核と同様に，これらの核においても紡錘体形成が行われない場合，SDR 型の配偶体が誘導される可能性がある．従って，SDR 型の配偶体形成には紡錘体形成が関与している可能性が示唆された．

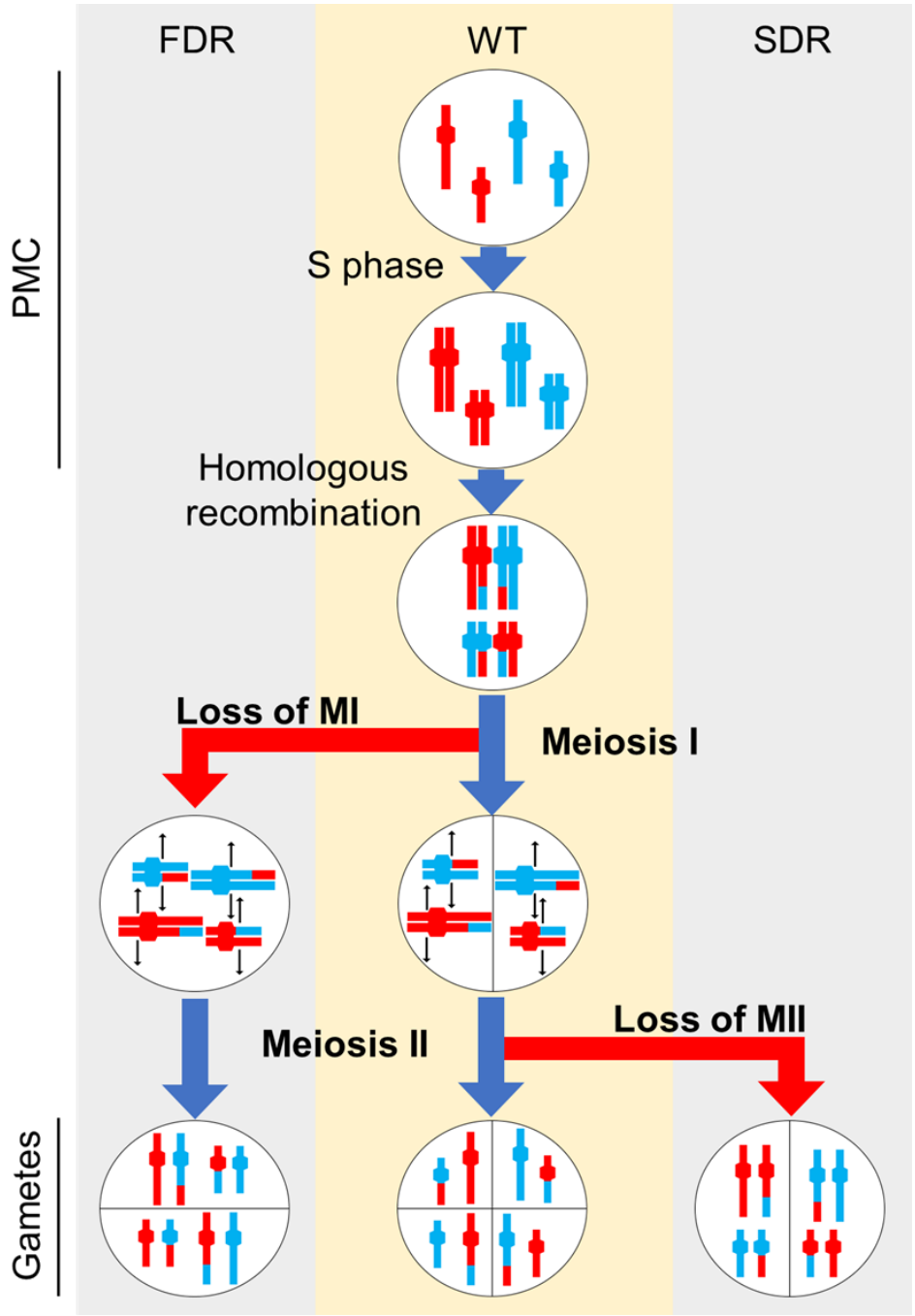


Figure 3-1　非還元配偶体の形成メカニズム

　青と赤のブロックはそれぞれ1本の染色分体を表す．各染色分体の太くなっている部分はセントロメア領域を表す．相同染色体間の遺伝的組換えの後，FDRでは第一分裂，SDRでは第二分裂を欠き，それぞれFDR型とSDR型の非還元性配偶体を生じる．

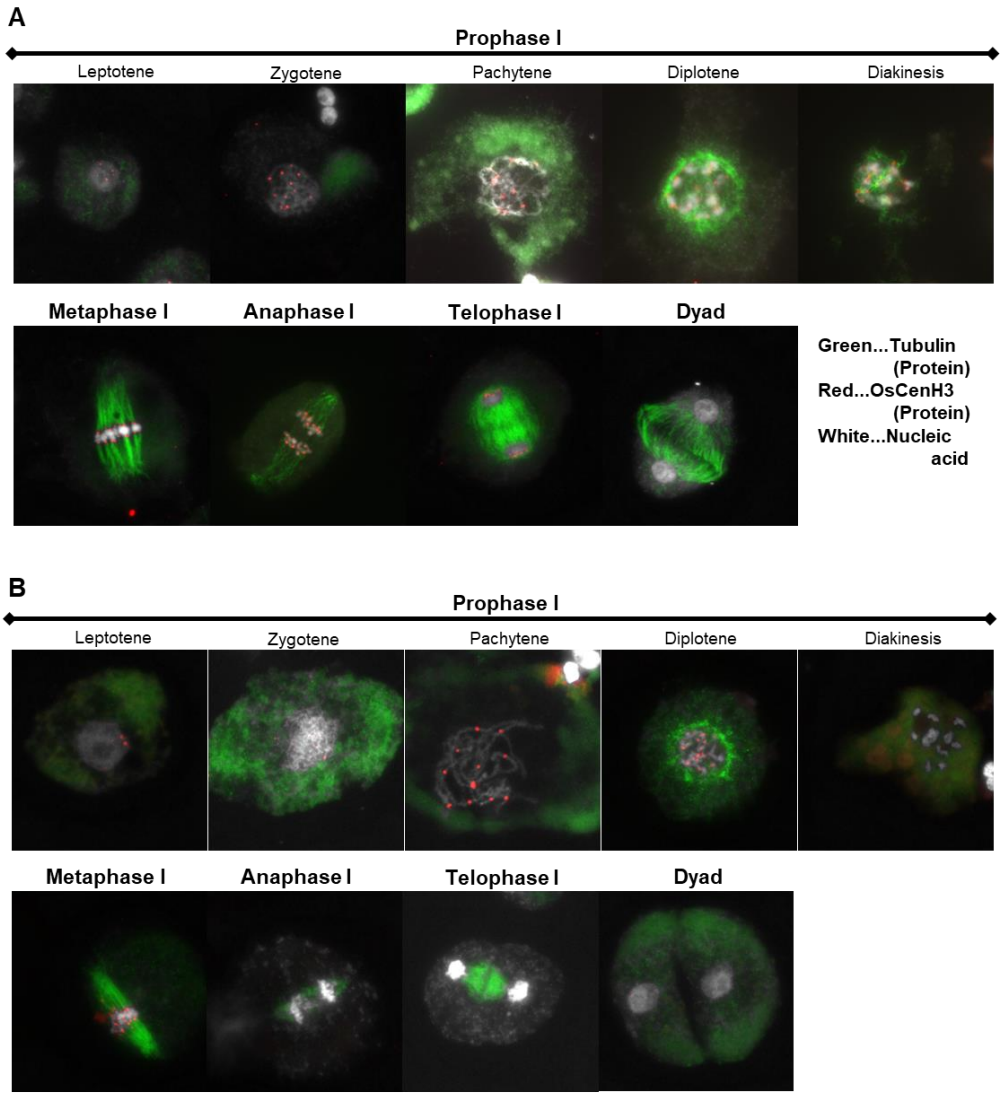


Figure 3-2　2種の親系統における減数第一分裂の進行

A　日本晴における減数第一分裂.

B　WK21における減数第一分裂.

図中の白色の蛍光は染色体，緑色は紡錘体，赤色は動原体をそれぞれ表す.

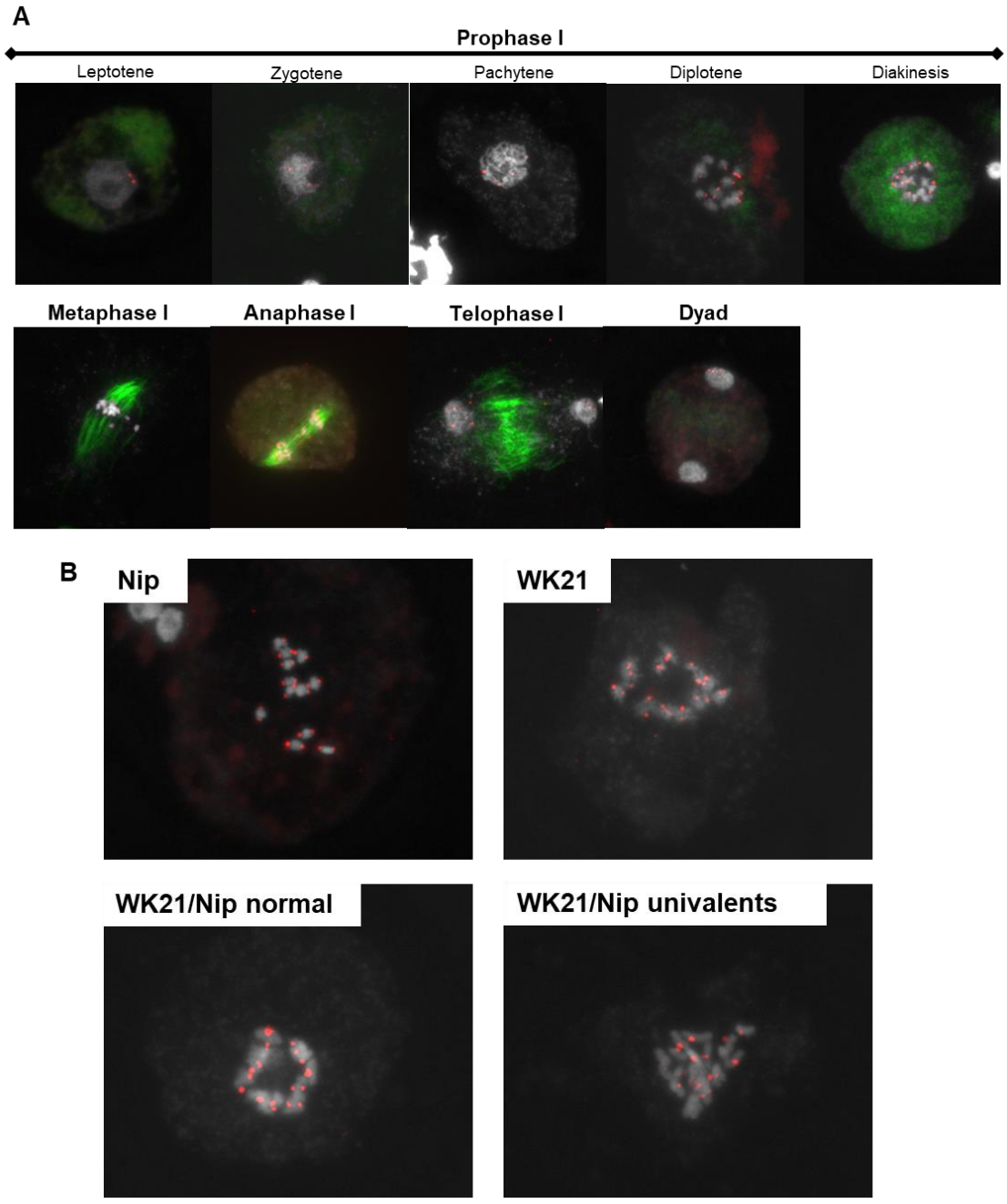


Figure 3-3　F1雑種における減数第一分裂の進行

A　WK21/Nip F1雑種における減数第一分裂.

B　親系統とF1雑種で見られた染色体対合について．F1雑種では一価染色体を含むPMCが観察された.

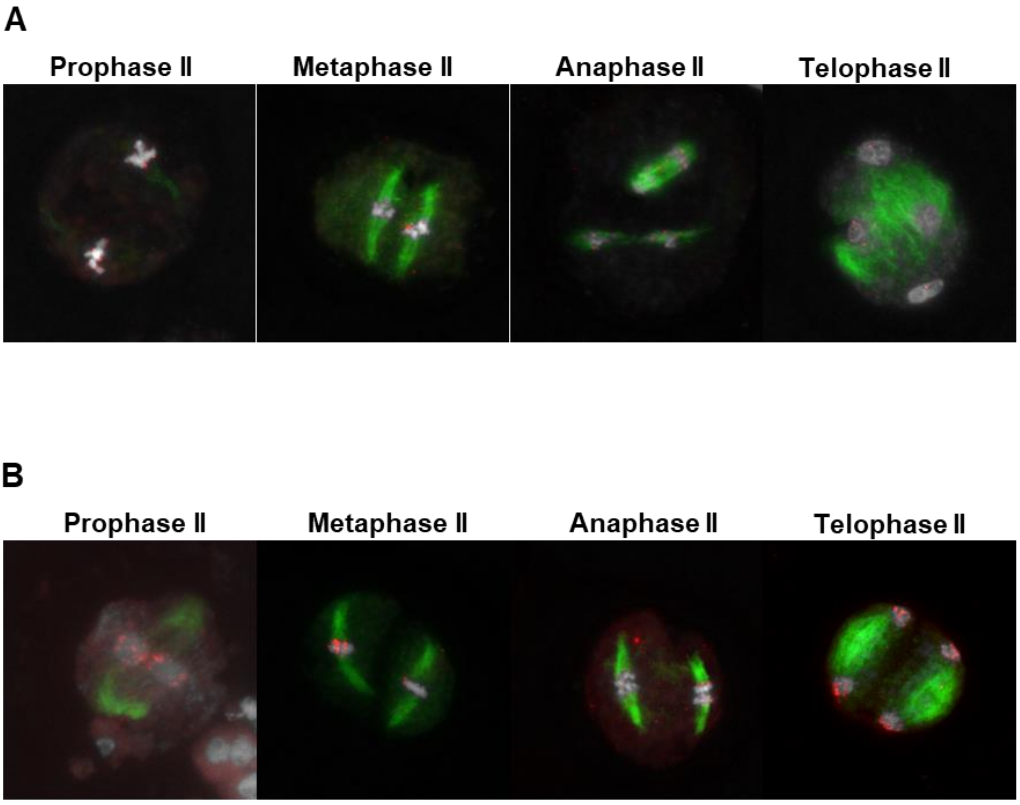


Figure 3-4　WK21とWK21/Nip F1雑種における第二分裂

A　WK21における第二分裂.

B　WK21/Nip F1雑種における第二分裂.

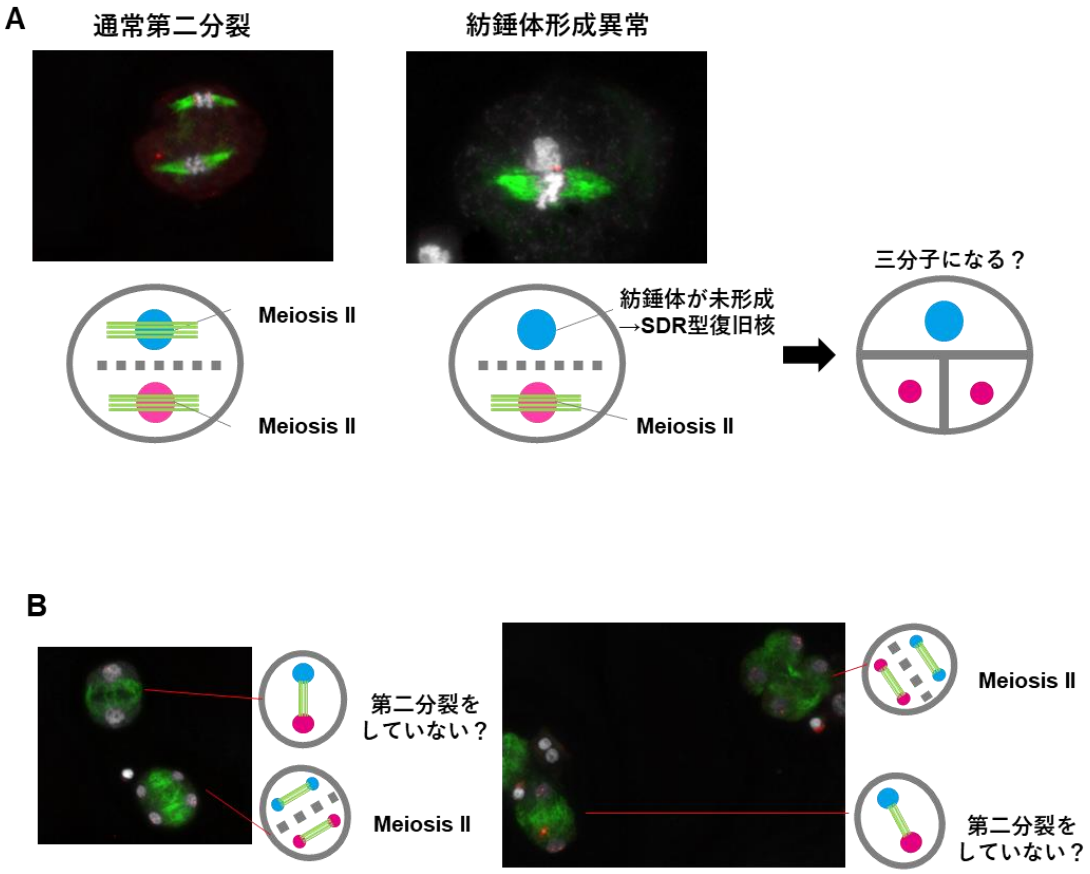


Figure 3-5　WK21/Nip F1雑種で見られた紡錘体形成の異常

A　通常の第二分裂(左)と紡錘体形成異常を示したPMC(右)．右のPMCでは下半分の娘核では紡錘体が形成され，上半分は形成されていない．

B　F1雑種では第一分裂と第二分裂が混在している様子が多く見られた．

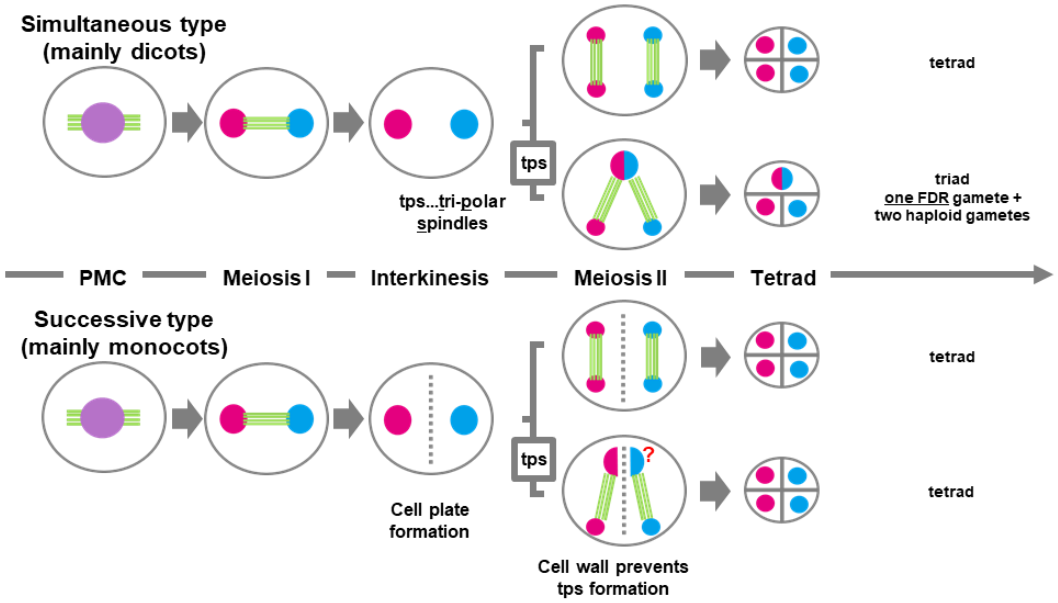


Figure 3-6　第二分裂時の紡錘体配向性の異常によるFDR誘導

　緑色の線の束は紡錘体，紫色の円はPMCの核(4x)，赤・青色の円はそれぞれ娘核(2x or x)を表す．Tripolar spindle(tps)は紡錘体配向性異常の一種であり，同時型の細胞質分裂を行う植物では，第二分裂時の細胞極が4つから3つへと変化することで，第一分裂の復旧が誘導されることがある．

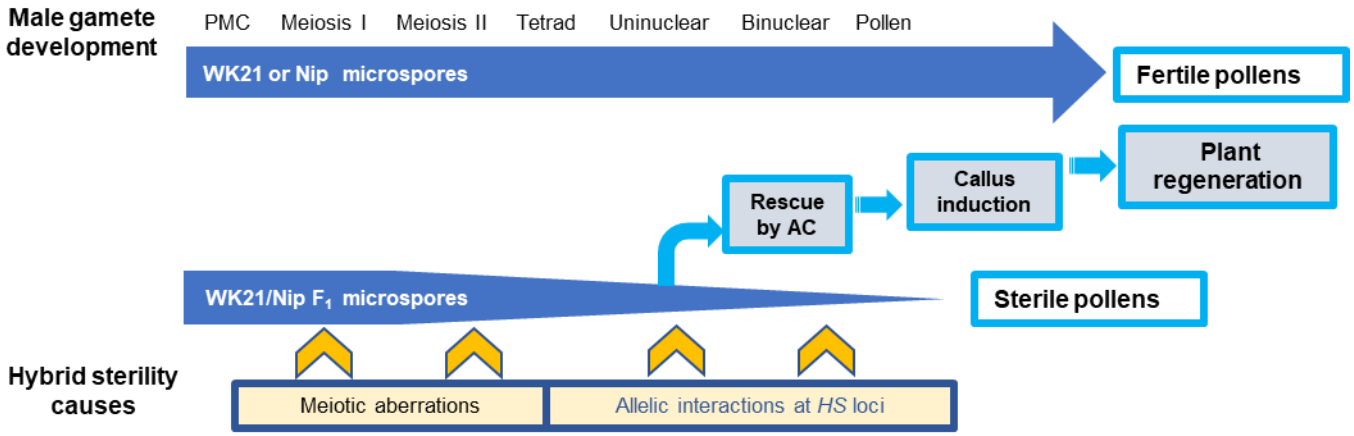


Figure 3-7　雑種不稔性と葯培養による救済

*sativa-glaberrima*種間の雑種不稔性は従来，減数分裂後の小胞子発達段階での*HS*座間相互作用が主因だと考えられてきた．しかし，小胞子形成以前の減数分裂異常もまた雑種不稔の主要な構成要素であることが，本結果より示唆された．

非還元性小胞子を含め，小胞子は減数分裂直後の1核期にはまだ生きており，それらからカルスを誘導することで，稔性を持つ再分化植物体が得られた．再分化植物体は*sativa*と*glaberrima*の中間的ゲノムを保持していた．

Table 3-1　Hom/Het型の12植物体のセントロメア接合型

Regen. plant ID	Centromere markers																								
	1-c1	1-c2	2-c1	2-c2	3-c1	3-c2	4-c1	4-c2	5-c1	5-c2	6-c1	6-c2	7-c1	7-c2	8-c1	8-c2	9-c1	9-c2	10-c1	10-c2	11-c1	11-c2	12-c1	12-c2	
#13	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	FDR
#19	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#20	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#25	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#47	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#63	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#74	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#80	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
#16	W	W	W	W	W	W	N	N	W	W	N	N	N	N	W	W	W	W	W	W	N	N	N	N	SDR
#28	W	W	N	N	N	N	W	W	N	N	N	N	W	W	N	N	W	W	W	W	N	N	W	W	
#70	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	N	N	N	N	W	W	N	N	W	W	
#91	N	N	N	N	W	W	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	W	W	N	N	W	W	N	N	

イネの全12染色体のセントロメア領域に対し，合計で24個のマーカー(Table 3-2)を用いてジェノタイピングを行った．12個体のHom/Het型植物体のセントロメア領域は，すべてヘテロ接合型(FDR)かすべてホモ接合型(SDR)のいずれかに分かれた．

Table 3-2　セントロメア領域のジェノタイピングに用いたマーカー一覧

Code	Location (Mbp)	Chr	Primer	Forward sequence	Reverce sequence
1-c1	15.1	1	RM449	5'-TTGGGAGGTGTTGATAAGGC-3'	5'-ACCACCAGCGTCTCTCTCTC-3'
1-c2	17.1	1	UH1-d2	5'-AGGTTTAGCGTCAGTACTTGGG-3'	5'-ACACGGTTGAATGATAGACACT-3'
2-c1	13.5	2	UH2-u4	5'-AGTTAAAAGTTAACTCGCCGACG-3'	5'-CAGTAAGCATCCTACGGCTCC-3'
2-c2	13.8	2	UH2-d1	5'-TCAGTGCTCCAGTTCAGCAT-3'	5'-GGCTGAGGAACCAGGAGTTT-3'
3-c1	18.7	3	RM6146	5'-ATCTTCTCCGGTTCTCCCTC-3'	5'-AAGGAGGGAGGAGGCAGTAG-3'
3-c2	19.9	3	UH3-d1	5'-TGCTGTGAGAATATGTCCACCA-3'	5'-AGCAAGGGAAGCTATTTACGGA-3'
4-c1	9.1	4	UH4-u1	5'-CAGGGAGCTGCACTTCTCAA-3'	5'-TTCAGGTTGCCTCCACCTTG-3'
4-c2	9.3	4	UH4-d1	5'-TGTATGGTATTCACCCCCGG-3'	5'-TGGAGCTCTGAGAAATACGAATCC-3'
5-c1	9.6	5	RM3381	5'-ACAAGCACCAGCCACAATAG-3'	5'-GGTGTTGTTTTGGACGAACG-3'
5-c2	12.6	5	UH5-d1	5'-TGTGATGTGCAATTGCTCGTC-3'	5'-TCCAATGGTCCGTTCAATCGT-3'
6-c1	14.9	6	UH6-u2	5'-ACCAGTTTTTCCATCTCCAAACC-3'	5'-CGGCCGGCTAGAAACAAGAT-3'
6-c2	15.6	6	UH6-d1	5'-ATACCAACACCCGACCACCA-3'	5'-TTTAGCGGTGGAAGACGACG-3'
7-c1	11.9	7	UH7-u2	5'-TCACCGCGGAGAATCAACAA-3'	5'-AGCCATACCAGCTGATGTCG-3'
7-c2	12.3	7	UH7-d1	5'-CAGATTCAAACTCTGATACTACCAGG-3'	5'-TGATCACGTCATATGCTTCAATGTG-3'
8-c1	12.7	8	UH8-u1	5'-TTGGGGGCATAGCTCTTGTT-3'	5'-GCTGTTCCCCATTTTACTGCA-3'
8-c2	13.7	8	UH8-d1	5'-TGATCATCACAAGTGTCTTTTCGT-3'	5'-TCCTCATCGGTCAAAGTGCT-3'
9-c1	2.6	9	UH9-u1	5'-AACGGACCGATGGTATAGCT-3'	5'-ATGCTGAGGTAGATTATATGGTGT-3'
9-c2	2.9	9	UH9-d1	5'-GTGACAGCCAAGTCCGTCAT-3'	5'-GGTCAAGAAGGTGCAGGTGA-3'
10-c1	7.4	10	C51124	5'-CACTTCAGTGCTGGGTGTGC-3'	5'-TCAAAGGGCAAGTTAACGAC-3'
10-c2	8.5	10	UH10-d3	5'-ACCGAGCACTTATCTACTTGCA-3'	5'-GGGGATGATTTCACCCGTAG-3'
11-c1	12.0	11	UH11-u1	5'-TATCTTTACTGTTACAACGCACCG-3'	5'-CCATCTCACGGGTGGGTG-3'
11-c2	12.2	11	UH11-d1	5'-GCTGAAAGTGAAATGTATTGCACC-3'	5'-ACTAGAACGATACTATAACCCGGT-3'
12-c1	11.4	12	UH12-u3	5'-GATTAGGACGGCGTTCTGCT-3'	5'-AGAAAGGGCTAAACAGGTTCCT-3'
12-c2	12.1	12	UH12-d1	5'-TGATAGAGCCATGGTGACCG-3'	5'-TGTTGCAAATATTTTGAAGCGATAAG-3'

Table 3-3　小胞子由来カルス(2個体)と葯壁由来と推定されるカルス(5個体)のセントロメア接合型

Regen. plant ID	Centromere markers																							
	1-c1	1-c2	2-c1	2-c2	3-c1	3-c2	4-c1	4-c2	5-c1	5-c2	6-c1	6-c2	7-c1	7-c2	8-c1	8-c2	9-c1	9-c2	10-c1	10-c2	11-c1	11-c2	12-c1	12-c2
#60	W	W	W	W	W	W	N	N	N	-	N	N	N	N	W	W	N	N	N	N	W	W	N	N
#96	N	N	W	W	N	N	W	W	N	N	W	W	N	N	W	W	W	W	W	W	N	N	N	N
#38	H	H	H	H	H	-	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
#39	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
#61	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
#79	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
#88	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Table 3-4　再分化植物体の倍数性，ゲノムの接合性，由来となった細胞の種類および種子稔性

Regen. plant ID	Ploidy	Genetic zygosity		Types of meiotic aberration	Collected seed no
		Non-centromeric region	Centromeric region		
#60	-	Hom	Hom	haploid gamete	0
#96	4x	Hom	Hom	haploid gamete	0
#13	2x	Hom/Het	Het	FDR	0
#19	2x	Hom/Het	Het	FDR	0
#20	4x	Hom/Het	Het	FDR	2
#25	4x	Hom/Het	Het	FDR	4
#47	4x	Hom/Het	Het	FDR	1
#63	2x	Hom/Het	Het	FDR	0
#74	5x	Hom/Het	Het	FDR	0
#80	4x	Hom/Het	Het	FDR	32
#16	4x	Hom/Het	Hom	SDR	0
#28	4x	Hom/Het	Hom	SDR	0
#70	2x	Hom/Het	Hom	SDR	0
#91	2x	Hom/Het	Hom	SDR	0
#38	4x	Het	Het	-	18
#39	3x	Het	Het	-	0
#61	-	Het	Het	-	0
#79	3x	Het	Het	-	0
#88	3x	Het	Het	-	0

Hom...すべてホモ接合型，Het...すべてヘテロ接合型，Hom/Het...ホモ接合型とヘテロ接合型が混在していたことをそれぞれ表す．FDRは第一分裂復旧，SDRは第二分裂復旧型の非還元性小胞子をそれぞれ表す．

Table 3-5　F1雑種で見られた減数分裂異常の頻度

	Meisosi I (Diplotene - Diakinesis)		Meiosis II (Anaphase II-Telophase II)	
	Normal	Anomaly	Normal	Anomaly
Nip	58	0	-	-
WK21	8	0	8	0
WK21/Nip	55	5	22	3

考察

減数分裂時の不全と倍数化

イネの葯培養において，小胞子はカルス形成を経て植物体へ分化する．カルス形成に最適な時期は花粉発達の一核中期―後期に相当する．F1 雑種の減数分裂直後の小胞子(Figure 1B)には，通常の小胞子の 2 倍程の直径を持つものや，形状の異なる小胞子が混在していた．フローサイトメトリー法での倍数性測定の結果，Hom/Het 型の 12 個体の内，2 倍体は 5 個体，4 倍体は 6 個体であり，また 5 倍体が 1 個体含まれた(Table 3-4)．これらの結果は F1 雑種において，減数分裂時の不全もしくは減数分裂後の小胞子の融合が，倍加した染色体を生じ，それらが脱分化することで倍数性個体が得られた可能性を示唆した．再分化植物体のゲノム解析により，Hom/Het 型の 12 個体は，減数分裂時の正常な相同組換えを経た後，染色体分配の不全を経て生じた小胞子，非還元性小胞子に由来することが示唆された．免疫染色法により紡錘体(α-tubulin タンパク質)及び動原体(OsCenH3 タンパク質)を可視化して減数分裂時の動態を観察した結果，F1 雑種の PMC では紡錘体の配向性の異常および一価染色体の形成が観察された(Figure 3-3B，3-5)．従って F1 雑種では第一分裂あるいは第二分裂が不全となることで，2 倍性の小胞子が形成され，2 倍体以上の倍数性を伴った再分化植物体が形成されたと考えられた．第一分裂と第二分裂の両方が起きなかった 4 倍性の配偶体からカルスが形成された場合，4 倍体の植物体へ再分化しうる．Het 型の 4 倍体は F1 体細胞を起源に持つ可能性と同時に，4 倍性の小胞子から発生した可能性も除外できない(Table 3-4)．3 倍体の Het 型の 3 倍体はすべての遺伝子座がヘテロ接合型であった(Table 2-3，2-7，3-3，3-4)．減数分裂前の 4 倍性 PMC はすべての遺伝子座がヘテロ接合型であり，そこから何らかの原因により半数体相当の染色体セットが減じた 3 倍性の細胞もすべての遺伝子座がヘテロ接合型となる．一方，複数の半数性小胞子が融合して 3 倍性の小胞子を形成した場合はホモ接合型の遺伝子座が現れる蓋然性が高い．従って 3 倍体植物体は，減数分裂の過程で PMC が半数体と 3 倍体に分かれ，3 倍体が脱分化したことで得られたと推測する．5 倍体は Hom/Het 型のゲノムを保持していたが，出現した背景を推定することは非常に難しく，複数の小胞子が融合した由来をもつ可能性が考えられた(Table 3-4)．

FDR を誘導する異常について

FDR 型の非還元性配偶体形成が知られるコムギ雑種では，減数母細胞において二価染色体の代わりに一価染色体の形成が確認され，その後一回の分裂のみを行うことで，FDR 型配偶体が形成される(Silkova ら，2003；Jauhar，2017)．本研究でも同様に，F1 雑種において一価染色体形成が観察されたことから，コムギと同様のメカニズムに基づく FDR 型配偶体の形成が想定される．他の植物では別経路での FDR 型配偶体形成が報告されており，双子葉植物では第二分裂における紡錘体異常が，第一分裂の復旧をもたらす(De Storme と Geelen，2013a)．第二分裂時，1 つの花粉母細胞の紡錘体は 4 つの極を持ち，それぞれの極

へ基本染色体のセットが分配される(Figure 3-4，3-6)．このとき，双子葉植物では第二分裂の紡錘体配向性が 4 極性から 3 極性になる配向性異常が報告されている(De Storme と Geelen，2013a)．紡錘体の 3 極性配向が起きた場合，減数分裂の完了後に形成される四分子が不均等な三分子へと変化し，3 つの小胞子の内 1 つは FDR 型の復旧核を持った配偶体となる(Figure 3-6)．*Arabidopsis thaliana* では，FDR 型配偶体を伴う三分子形成が詳細に報告されている((De Storme と Geelen，2020)．

しかしこの現象は主に双子葉植物に限定されると考えられる．減数分裂により雄性配偶体が形成される際，細胞質分裂の様式には同時型と逐次型がある(Figure 3-6)．ほとんどの双子葉植物は減数分裂時，同時型の細胞質分裂を行う(De Storme と Geelen，2013b)．第一分裂後の細胞質分裂は起きず，第二分裂が終わった後に 4 つの核の間に細胞壁が形成され，四分子が形成される．しかしイネを含めたほとんどの単子葉植物は，第一分裂後と第二分裂後にそれぞれ細胞壁が形成される逐次型の細胞質分裂を行う．単子葉植物では，第一分裂後に分かれた娘核の間に仕切りが形成されることから，第二分裂時に紡錘体形成の異常が起きたとしても，第一分裂が復旧する蓋然性は低い(Figure 3-6)．今回の第一分裂の観察でも，2 つの娘核の間に仕切りが観察されている(Figure3-2，dyad)．

細胞板の形成異常も復旧核の形成に関与することが報告されている(De Storme と Geelen，2013a)．逐次型細胞質分裂を行うイネにおいても，細胞板の形成異常を伴った紡錘体配向性の異常が，非還元性配偶体形成に関与する可能性は考えられる．従って，イネの種間雑種における FDR 型配偶体形成の総体を知るためには，染色体，紡錘体，動原体の観察に加えて，細胞板染色下での観察も今後必要である．

SDR を誘導する異常について

本章では，第二分裂時における紡錘体の形成異常(欠損)がイネの SDR 型配偶体を形成する可能性を示唆した(Figure 3-4，3-5)．PMC の片側でのみ錘体形成異常が見られた場合，結果として三分子が形成され，そのうち 1 つが SDR 型配偶体となる可能性がある(Figure 3-5A)．しかし，この紡錘体形成異常が第一分裂後の両方の娘核で起きた場合，この PMC がこれから第二分裂を行うのか，それとも両方異常なのか区別がつかない(Figure 3-5B)．本研究では SDR 型配偶体形成に至る可能性がある PMC を見出しつつも，それを証明する手段を持ち合わせていなかった．減数分裂が終了したか否かを確認する技法が必要である．減数分裂後に PMC から消失するシグナルの 1 つとして，姉妹染色体の動原体部の膠着シグナルがある．姉妹染色体の動原体部の膠着は第二分裂が始まる直前まで維持される(Watanabe，2012)．コムギにおける非還元性小胞子形成を観察した以前の報告では，姉妹染色体の動原体部における“ヒストン H3 の 10 番目のセリン残基(H3Ser10ph)”をターゲットとし，姉妹染色体同士の膠着が維持されているか否かを観察している(Silkova と Loginova，2016)．姉妹染色体の膠着は減数分裂後に解除され，間期核へ移行すると考えられる．今後の研究では減数分裂終了の指標として H3Ser10ph のリン酸化も可視化することで，SDR 型

配偶体形成の原因としての，第二分裂時の紡錘体形成異常の詳細な解析が求められる．

以上の結果から，*sativa-glaberrima* F1 雑種から生じた小胞子の一部は，非還元的な減数分裂により 2 倍性を保持する可能性が強く支持された．FDR と SDR を軸とした減数分裂異常は，小胞子に 2 倍性をもたらすとともに，実際には F1 雑種の花粉の崩壊における雑種不稔遺伝子の作用に先駆けて不稔の主要因となる可能性が高い．2 倍体の非還元性小胞子は，*HS* 座の効果の減衰の可能性に基づき，雑種不稔性を回避できた可能性がある（Figure 2-5）．従って，通常種間雑種の配偶体不稔性を融合する減数分裂異常が，幸いにも小胞子の雑種不稔性を低減し，葯培養により救済されることで倍数化個体の作出につながったと考えられる．

減数分裂異常と雑種不稔性の関連性

減数分裂時の異常はそれ自体が配偶体致死を導くだろう．本研究では *sativa-glaberrima* F1 雑種において非還元性小胞子が形成されることが確認された．2 倍性の非還元性小胞子がたとえ花粉としての稔性を持っていたとしても，半数性の雌性配偶体との受精後代は不稔性の 3 倍体となる．従って，非還元性小胞子を形成することも雑種崩壊の一部とみなすことができる．今までに *sativa-glaberrima* F1 雑種の雑種不稔性は，正常な減数分裂を経た後，小胞子発達の段階における *HS* 座の相互作用が主に研究されてきた．しかし本研究の結果から，減数分裂時点での異常もまた，*sativa-glaberrima* 種間の雑種不稔性の構成要素であることが示された（Figure 3-7）．

第四章

ゲノム構造から見た種間雑種における

雌雄配偶体の伝達様式の比較

緒言

O. sativa 種内では今までに多くの連鎖地図が作成されており，Harushima ら(1997)は，日本晴(ssp. *japonica*)と Kasalath(ssp. *indica*)亜種間の F2 集団を用いて，2275 個の DNA マーカーから構成される連鎖地図を報告した. この連鎖地図は今までに, 例として形質と DNA マーカーの連鎖解析による形質支配遺伝領域の同定・遺伝子単離や，量的形質を支配する遺伝子座群(QTLs)の全体的な検出，育種プログラムにおける形質連鎖マーカーを利用した早期の個体選抜等に不可欠な情報ソースとしての機能を発揮してきた(Yamasaki ら，1999；Fujisawa ら，1999). 近年では個体のシーケンシングの低価格化により高精度な形質-遺伝子間の連鎖解析手法も確立されているが，DNA マーカーを用いた選抜は初期投資が少なく操作も簡便で敷居が低いことから，多くの作物でマーカー選抜育種が行われている.

連鎖地図は相同組換えに基づく遺伝的組換え現象を利用し，2 つの遺伝領域の間の遺伝距離を推定する．2 つの自殖作物系統間の連鎖地図を作成する場合，まず 2 種を交配して F1 個体を作成し，自殖 F2 世代あるいは親系統と戻し交雑した BC1F1 世代を作出する．F2 世代の集団は F1 個体における雌雄両方の配偶体形成時の相同組換えの結果を反映しているのに対し，BC1F1 世代は，F1 雑種が花粉親なら雄性配偶体，種子親なら雌性配偶体の相同組換えの結果を反映しており，その結果を解析することで 2 つの系統間の連鎖地図を得ることができる(Harushima ら，1998)．従って，2 系統間に雑種障壁が存在すること等により相同組換えが起きない場合や，F1 個体の配偶体が雑種不稔性等による致死性を示す場合，後代が得られないために連鎖解析が難しくなる.

O. sativa と *O. glaberrima* の間には雑種障壁が存在する. 2 種間の雑種形成は可能な一方，雑種 F1 個体は旺盛な生育を行った後，配偶体形成過程で雑種不稔性を示す．不稔性は特に雄性配偶体で顕著であり，ほぼすべての花粉が開花以前に致死となる．雌性配偶体は一部が稔性を持つことから，親系統との戻し交雑系統を作出することで両種間の遺伝子交換が達成されている(Yamamoto ら，2018)．雑種における配偶体の致死は，雑種不稔遺伝子座において生じる対立遺伝子間の相互作用の後，一方の対立遺伝子だけが生き残ることに主として起因する(Figure 1-3；Yang ら，2012)．複数の雑種不稔遺伝子座がゲノムに存在すれば，全体で生き残ることの可能な配偶体は 2^n (n は雑種不稔遺伝子座の数)分の 1 に減少する．対立遺伝子間の相互作用により，一方の対立遺伝子だけが後代に伝達されると，分離の歪みが後代の遺伝子型に反映される(Sano，1990；Xie ら，2019)．分離の歪みは結果として，連鎖や組換え頻度にも影響する．雌雄の配偶体でゲノム全体の遺伝子型の分離パターンが異なる結果が得られるとすれば，種間雑種における減数分裂中の組換え頻度が雌雄で異なる可能性や，雑種不稔性に起因する分離の歪みが，雌雄の配偶体で異なる可能性が考えられる.

従来，*sativa-glaberrima* F1 雑種を種子親とした BC1F1 集団を作出することで，雌性配偶体形成時の相同組換えに基づく連鎖地図の作製も報告されている(Li ら, 2008；Garavito ら，2010；Xu ら，2014)．F1 雑種の雄性配偶体はほぼ完全に不稔性であることから，その遺伝

子型の解析は困難で，雄性配偶体形成時の相同組換えの結果を反映した連鎖地図も報告されていない．

私は第 2 章で述べた通り，*O. sativa* と *O. glaberrima* 種間の F1 個体の葯を培養することで，雄性配偶体に由来するカルスを得た．本研究ではそれらカルスの遺伝解析を通して，雄性配偶体の遺伝構成の一端を明らかにした．また九州大学の協力を得て，九州大学で作出された *sativa-glaberrima* 種間の BC1F1 集団の解析結果，すなわち雌性配偶体の遺伝構成を反映した集団の解析結果と比較することで，*sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種から生じる配偶体における雌雄の違いを検討した．

材料・方法

植物材料

① 雄性配偶体の解析

WK21/Nip F1 個体の葯培養に由来する 87 個のカルスのうち，通常の減数分裂を経た小胞子に由来する 27 個のカルスをジェノタイピングに用いた．カルスをそれぞれ脱分化培地上で十分に増殖させた後，カルスを半分に切り分け，片方を再分化培地へと移植し，もう一方を DNA 抽出に用いた．カルスを 1.5ml マイクロチューブに回収した後，ペッスルで組織を押しつぶして粉砕し，粉砕液に対して DNA 簡易抽出バッファーを加えて DNA 抽出を行った．ジェノタイピングを行い，すべての遺伝子座がホモ接合型であったカルスのみ(27 個)を解析に用いた(Table 4-1，4-2)．

② 雌性配偶体の解析

雌性配偶体の解析は，九州大学の戻し交雑集団(BC1F1 集団)を用いて行われた．WK18/T65//WK18(109 個体，以下 WK18 BC1F1)，T65/WK18//T65(93 個体，以下 T65 BC1F1)の 2 つの BC1F1 集団を作出し，各個体から gDNA を抽出してジェノタイピングに用いた．

カルスのジェノタイピング

既報の SSR マーカー(McCouch ら，2002)に加えて，Nip と WK21 のゲノムシーケンスの比較に基づき設計した In/Del マーカーを用いた．Nip のゲノムシーケンスは IRGSP-1.0(RAP-DB)，WK21 のゲノムシーケンスは DDBJ に登録されている DRS049718 をそれぞれ参照した．マーカーは，核染色体の物理距離 5Mb ごとに 1 ヵ所設けた後，組換え頻度が高い領域については別途新たにマーカーを設けた．F1 個体由来のカルスから簡易抽出法によりゲノム DNA を抽出し，それをテンプレートとしてジェノタイピングを行った．

地図距離の算定及び連鎖地図の作製

地図距離(d)は，2 つのマーカー間の組換え頻度(r)に基づきコサンビの式により算出した．

$$r = \text{組換え型個体数/全個体数} \quad \text{(組換え頻度)}$$

$$d = \ln\{(1+2r)/(1-2r)\}/4 \quad \text{(コサンビの式)}$$

それぞれの集団の連鎖地図は，算出した地図距離に基づき R の qtl パッケージにより作製した．R/qtl は，以下の HP よりダウンロードした(https://rqtl.org/)．

遺伝的歪み領域の検出

AC 集団及び 2 つの BC1F1 集団のジェノタイピング結果に基づき，個々の遺伝領域における伝達頻度が歪んでいるか否かを検定した．それぞれのマーカーの理想的な分離頻度を *sativa*：*glaberrima* = 1:1 と仮定し，その比から逸脱しているか否かをカイ二乗検定により検

定した．有意水準は 5%とした．また偽陽性の歪みを除くために，Benjamini & Hochberg 法(BH 法)による補正を行った．False discovery rate を 0.05 として有意であった分離歪みのみを，実際に歪んでいた領域として採用した．

結果

1. 染色体地図の全長(cM)と組換え頻度の雌雄差

AC 集団，WK18 BC1F1 集団および T65 BC1F1 集団の 3 つについて，それぞれ 112 個，191 個，184 個の DNA マーカーを用いてジェノタイピングを行い，隣接するマーカー間の組換え頻度に基づき染色体地図を作成した(Figure 4-1，Ap. Figure 1，Table4-3，Ap. Table 5)．AC 集団において最も地図全長(cM)が長い染色体は，塩基長(Mb)が最も長い第 1 染色体(280.6cM)であり，最も短かったのは第 9 染色体(95.1cM)であった(Table 4-3)．各染色体の塩基長と相同組換えの相関を Figure 4-2 に示す．予想される通り地図長と塩基長の間には，塩基長に比例して地図長も長くなる正の相関があった．塩基長当たりの地図長の比を取った組換え頻度(cM/Mb)の値に着目すると，12 対の染色体の平均的組換え頻度は 5.69 cM/Mb であり，第 3，5，8 染色体は比較的高く(average 7.06 cM/Mb)，第 4，9，11 染色体は比較的低い(同 4.39)組換え頻度を示した(Table 4-3)．また，染色体内で組換え頻度の高い領域と低い領域が観察された(Figure 4-3)．組換え頻度の低い領域はいずれの染色体においても，各染色体における CentO(セントロメア反復配列)の位置と概ね一致しており，セントロメアとしての機能を担う配列の領域であるために組換えが抑制されていることが推察された．染色体塩基長(Mb)と組み換え頻度の間の相関を Figure 4-2B に示す．今回用いた AC 集団では両者の間に相関(R=0.43)が認められ，染色体ごとの組換え頻度の差が染色体の塩基長に部分的に依存している可能性を示唆した．

2 つの BC1F1 集団のうち，T65 BC1F1 集団では AC 集団と同様に，最も地図全長が長い染色体は第 1 染色体(207.1cM)であり，WK18 BC1F1 集団では第 3 染色体(172.0cM)が最長であった(Ap. Table 5)．最も地図全長の短い染色体は 3 集団間で異なっており，T65 BC1F1 集団では第 10 染色体(82.3cM)，WK18 BC1F1 集団では第 12 染色体(75.1cM)であった(Ap. Table 5)．組換え頻度に着目すると，T65 BC1F1 集団では平均組換え頻度は 4.48 cM/Mb，WK18 BC1F1 集団では 3.72 cM/Mb であり，いずれも AC 集団より低い組換え頻度を示した．AC 集団において相対的に高い組換え頻度を示した第 3，5，8 染色体は，T65 BC1F1 集団では平均 5.71 cM/Mb，WK18 BC1F1 集団では 4.21 cM/Mb であり，いずれも 12 対の染色体中で相対的に高い値を示し，3 つの染色体における組換えが雌雄を問わず盛んに行われていることが示唆された．AC 集団で組換え頻度の低かった第 4，9，11 染色体は，T65 BC1F1 集団(平均 3.52)と WK18 BC1F1 集団(平均 3.30)両方とも平均より低く，染色体ごとの組換え頻度は 3 集団で共通した傾向を示した(Table 4-3，Ap. Table 5)．Garavito ら(2010)の報告では，IR64(*O. sativa* ssp. *indica*)と TOG5681(*O. glaberrima*)種間の BC1F1 集団(IR64/TOG5681//IR64)を用いた染色体地図が作成された(Ap. Table 6)．染色体地図とマーカー物理位置の情報に基づけば，この報告における 12 染色体の組換え頻度はおよそ 5.15cM/Mb であり，第 3，5，8 染色体の平均組換え頻度はおよそ 5.90 cM/Mb，第 4，9，11 染色体の平均組換え頻度はおよそ 4.32 cM/Mb と見積もられ，染色体ごとの組

換え頻度は WK18 及び T65 BC1F1 集団と共通した傾向を示していた(Ap. Table 5，Ap. Figure 2，3)．従って，*sativa-glaberrima* 種間の F1 雑種では雌雄を問わず，特に第 4，9，11 染色体は相同組換えが起こりやすく，第 3，5，8 染色体は組み換わりにくい共通した傾向が示唆された．AC 集団と 2 つの BC1F1 集団の組換え頻度(cM/Mb)を比較した場合は，12 染色体すべてにおいて AC 集団の組換え頻度がより高かったことから，相同組換えは雌性配偶体よりも雄性配偶体形成時により盛んに起きている可能性が示唆された(Ap. Figure 3，Table 4-3，Ap. Table 5)．

2. 雄性配偶体に由来する AC 集団で見られた遺伝的な歪み

AC 集団における DNA マーカーの分離頻度を Figure 4-4 に示す．第 1，3，4，6，7 染色体の 6 つの領域において，分離比が歪んでいる DNA マーカーが検出された(Table 4-4，$p<0.05$，False discovery rate 補正(BH 法)込み)．第 1 染色体を除き，これらの歪み領域の近傍には，*O. sativa* と *O. glaberrima* 種間で報告されている雑種不稔原因遺伝子座(*HS* 座)が座乗していた．第 3 染色体の c3-0.0，RM60 近傍には *S19*，第 4 染色体の c4-24.7 近傍には *S2*，第 6 染色体の c6-0.2，RM204，c5-5.1 近傍には *S1*，第 7 染色体の c7-0.1 近傍には *S20*, c7-25.1, RN429, c7-29.6 近傍には *S21* が報告されている．唯一，第 1 染色体の RM1387 近傍には *HS* 座が報告されていないにも関わらず，分離比が大きく歪んでおり，*sativa* 型アレルが多く保持されていた(Figure 4-4，Table 4-4)．AC 集団の全アレルの頻度は *sativa* 型(0.535)が *glaberrima* 型(0.465)よりも多く出現しており，*sativa* 型へ有意に偏っていた(Table 4-5，$p<0.01$)．2 つの BC1F1 集団では異なった歪みが観察された(Ap. Figure 4，Ap. Table 7, 8). WK18 BC1F1 集団では第 6 染色体にのみ有意な歪みが観察され(Ap. Table 7)，T65 BC1F1 集団では第 1，3，4．6，7，8 染色体上のマーカーで分離比の歪みが観察された(Ap. Table 8)．両方の集団で歪んでいた第 6 染色体上の 7 つのマーカーは互いにすべて共通しており，これらのマーカーの分離歪みは AC 集団と同じく，*S1* 座の影響であると推察された．T65 BC1F1 集団では他に，*S2*，*S19*，*S20* 座近傍のマーカーで歪みが観察された(Ap. Table 8)．*S19* 及び *S20* 遺伝子座はこれまで雄性配偶体のみの不稔に関与する遺伝子座として報告されている(Taguchi ら，1999；Doi ら，1999)．また，AC 集団で歪みがみられた第 1 染色体の長腕端部において，AC 集団同様に *sativa* 型アレルへの分離歪みが検出された．第 8 染色体長腕上の有意な歪み(d1L84)は，T65 BC1F1 集団でのみ観察された(Ap. Table 8)．

既報の *HS* 座のうち，*S1*，*S2*，*S19*，*S20* 座の 4 つは雌雄両方の配偶体において伝達頻度の歪みをもたらし，*S21* 座は雄性配偶体特異的に働く可能性が示唆された．雌雄両方で歪んでいた *HS* 座のうち *S1* 座は，雌性配偶体と雄性配偶体の両方で不稔効果を示すことが以前に報告されており，本結果と一致していた(Koide ら，2018)．染色体全体のジェノタイピング解析から，分離の歪みを生じた DNA マーカーの近傍には *HS* 座が連鎖していた(Table 4-4，Ap. Table 7，8)．雌雄両方の配偶体で歪みが見られた領域の近傍には *S1*,

S2，*S19*，*S20* が座乗していた．特に *S1* 座は雌雄両配偶体において雑種不稔性に基づく強い分離の歪みを生じた．一方 *S21* 座は AC 集団でのみ分離の歪みを生じる *HS* 座で，雄性配偶体選択的に作用する既報の結果と一致した．第 1 染色体の長腕端部には，既報の *HS* と対応しない分離の歪みを生じる領域が AC 集団と T65 BC1F1 集団に存在した(Table 4-4，Ap. Table 8)．この分離の歪みを生じる原因は不明であり，新しい *HS* 座の可能性か，*HS* 座とは無縁な特定の配偶体の伝達優先性を示すものかもしれない．AC 集団で見られた全体的なアレル頻度の *sativa* 型への偏りは，2 つの BC1F1 集団では観察されなかった(Ap. Table 9)．Nip と WK21 は Nip の方が高いカルス形成率を示したことため，この偏りは葯培養による影響か，雄性配偶体そのものの特異性を示すのかもしれない(Table 2-1，Table 4-5)．

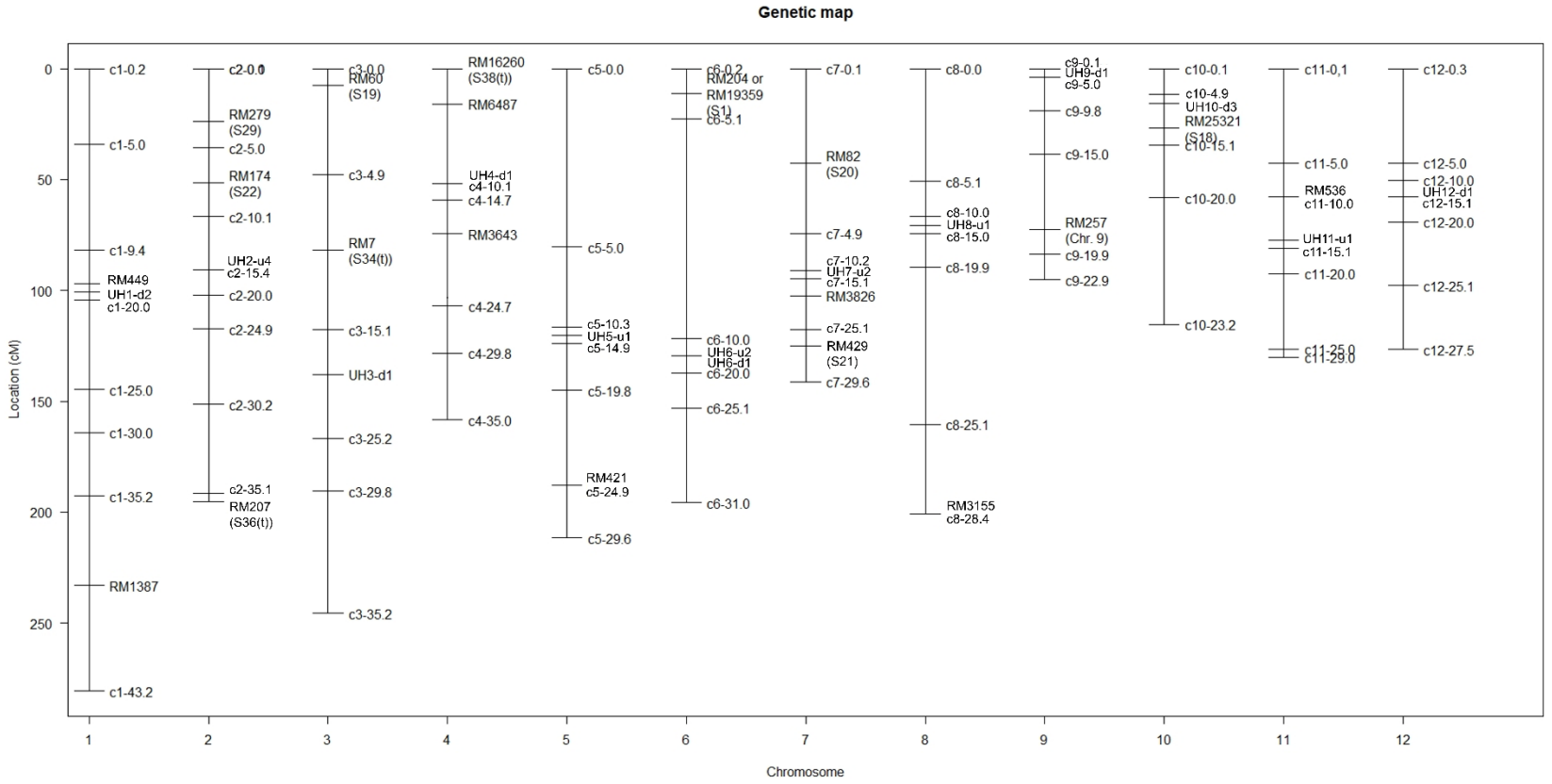


Figure 4-1　*sativa-glaberrima* F1雑種の雄性配偶体に基づく連鎖図
連鎖地図のベースはR/qtlにより作製．文字の重なり等は適宜修正した.

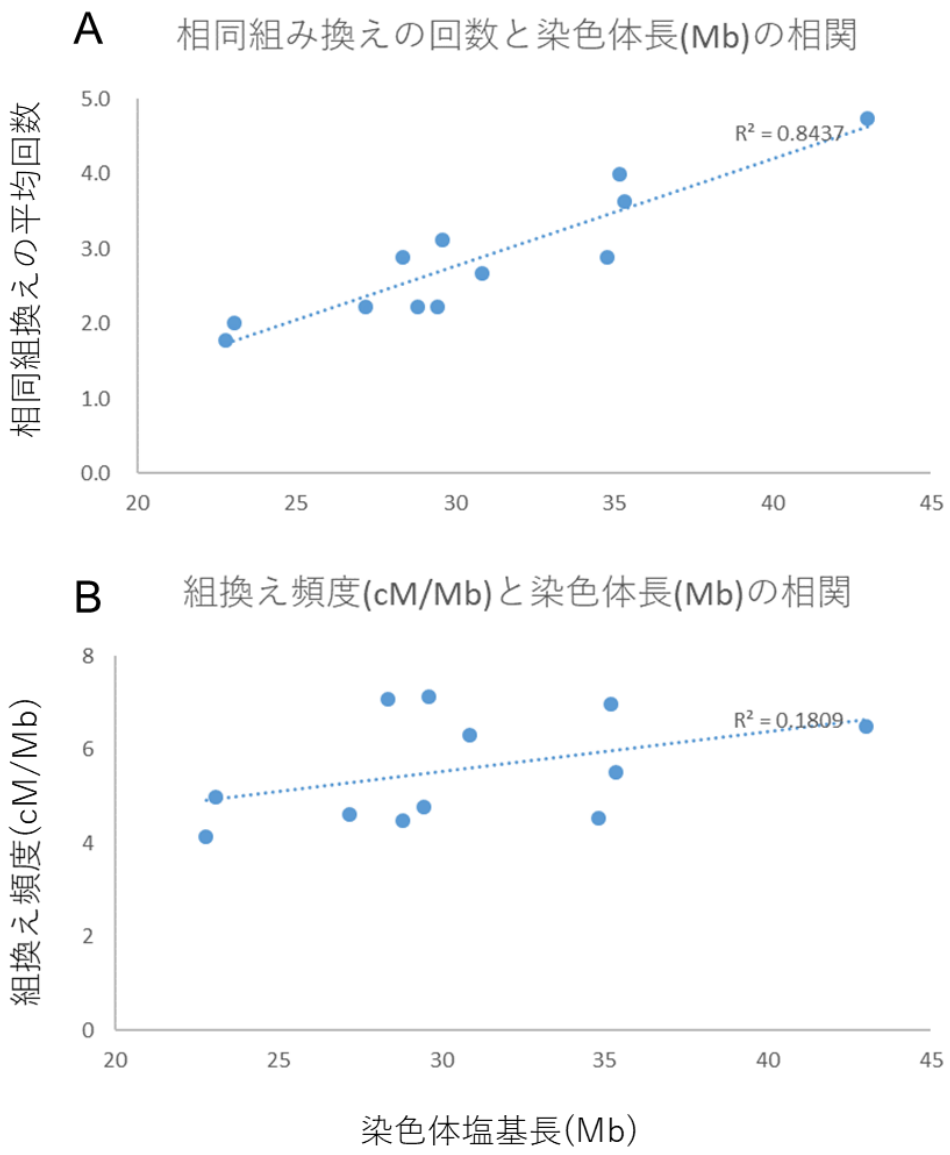


Figure 4-2　染色体塩基長と相同組換えとの相関
A　染色体塩基長と染色体あたりの相同組換えの回数の相関．染色体塩基長が長い染色体ほど，染色体辺りの組換え回数が多い傾向があった(R=0.92)．
B　染色体塩基長と組換え頻度(cM/Mb)の間の相関．染色体の長さと組換え頻度の間には正の相関(R=0.43)があった．

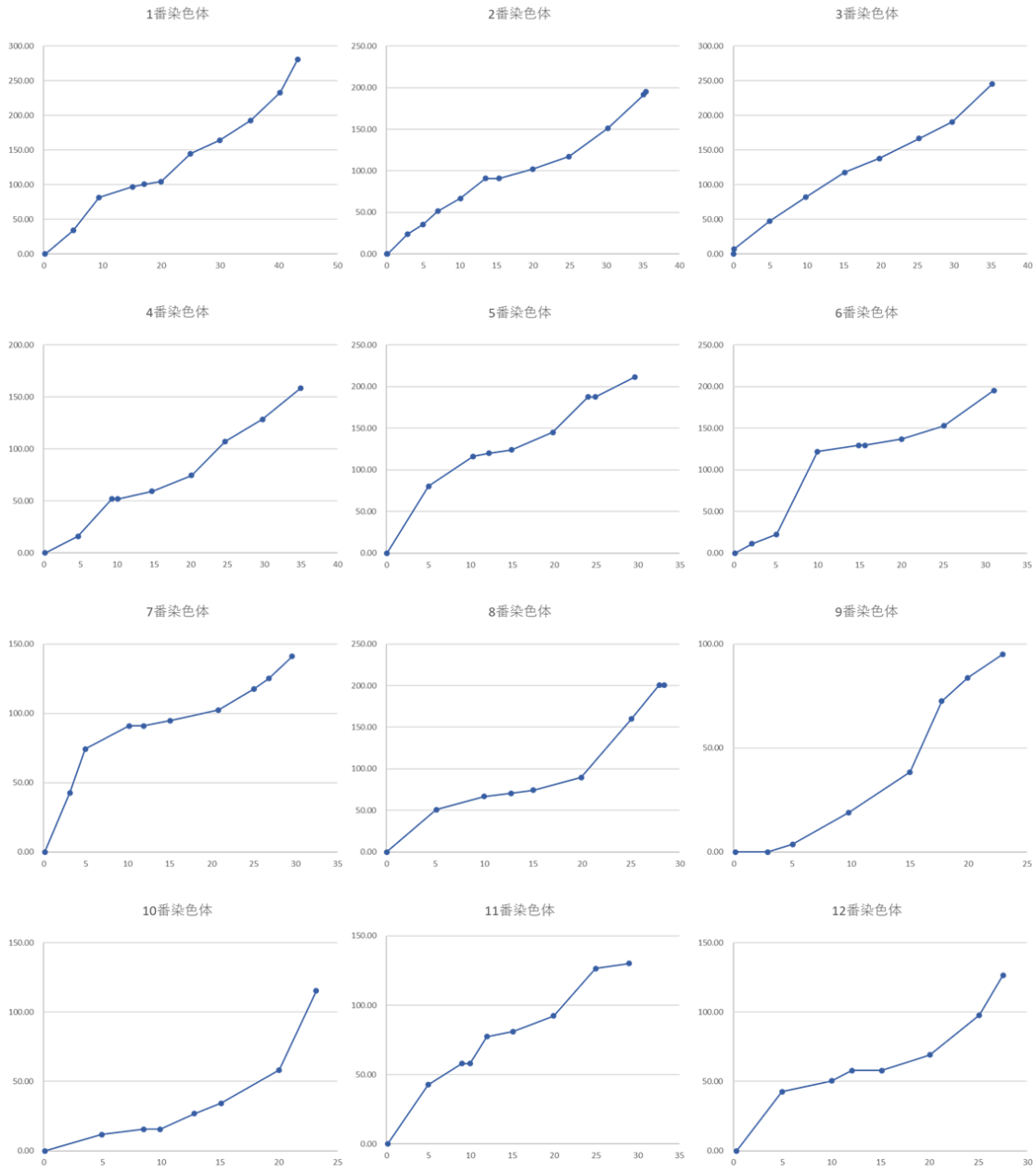


Figure 4-3　地図距離遷移と物理距離遷移の相関関係
　y軸に地図距離(cM)，x軸に物理距離(Mb)をとり，地図距離の遷移と物理距離の遷移の相関関係を表した．一般的に，染色体の両端部ではcM/Mb比が高くなり，動原体配列を含む染色体内部で低くなる傾向が見られた．

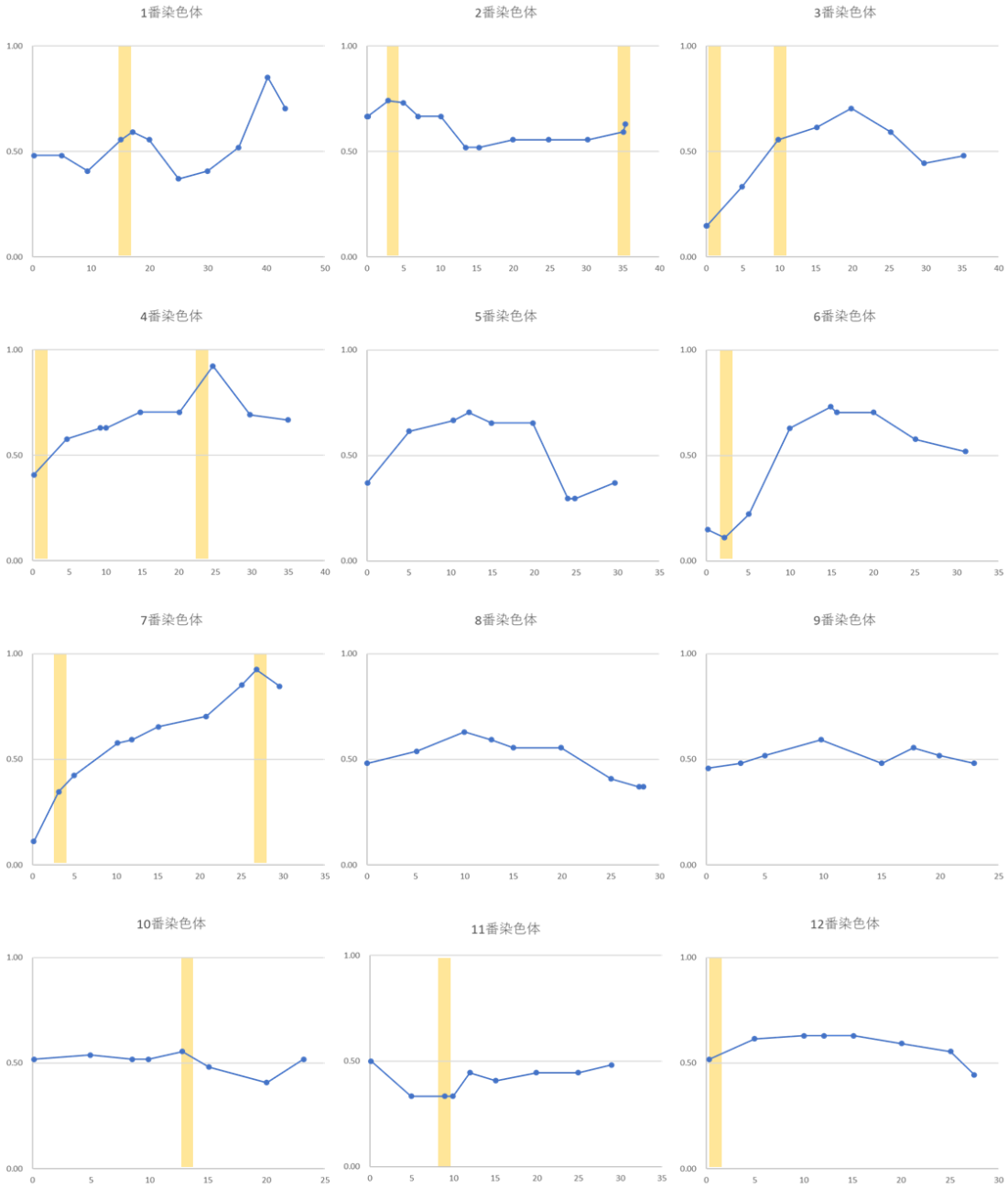


Figure 4-4　イネ12染色体における遺伝的分離歪み傾向
　全染色体における歪み程度．x軸に個々のDNAマーカーの物理位置(Mb, IRGSP-1.0準拠)，y軸にジェノタイピングした際の*sativa*型アレルの出現頻度(*sativa*型アレル数/(*sativa*型+*glaberrima*型アレルの数))をとった．*sativa*型と*glaberrima*型が同数観察された場合はy=0.5，*sativa*型アレルの頻度が多いほどy=1に近づき，*glaberrima*型アレルが多いほどy=0に近づく．黄色の帯は，既報の*HS*座が座乗しているおおよその位置を表す．

Table 4-1　葯培養由来カルス87個のゲノムの接合型に基づく分類

Centromeric regions	No. of individual	Far from centromere	No. of individual	Putative originated cell
Homo	46	Hom	27	Microspore
		Het	-	-
		Hom/Het	19	SDR gamete
Hetero	39	Hom	-	-
		Het	6	Somatic cell
		Hom/Het	33	FDR gamete
Hom/Het	2	Hom	-	-
		Het	-	-
		Hom/Het	2	Undefined
Total	87	Total	87	

ジェノタイピングの結果，Hom...すべてホモ接合型，Het...すべてヘテロ接合型，Hom/Het...ホモ接合型とヘテロ接合型が混在していたことをそれぞれ示す．

27個体は半数体の小胞子，33個体はFDR型非還元小胞子，19個体はSDR型非還元小胞子由来と推定された．6個体はF1雑種同様にすべての遺伝子座がヘテロ接合型だったため体細胞由来と推定し，残りの2個体はどの分類にも一致しないゲノムを保持していたためUndefinedとした．

Table 4-2　ジェノタイピングに用いたマーカー一覧

Marker	Chr.	Loation (Mbp, IRGSP -1.0)	Forward	Revers
c1-0.2	1	0.2	CGTCCTTGTCCGCAAACATG	TGGCAATCACAAATATAGAGATAGCA
c1-5.0	1	5.0	GCCATAAGCATCATCCTCTCTCT	GCACACCAGACAGCTAGCTA
c1-9.4	1	9.4	CAGAAACCACTTTGGCTGCG	CATCCGGCGGACACACTATC
RM449	1	15.1	TTGGGAGGTGTTGATAAGGC	ACCACCAGCGTCTCTCTCTC
UH1-d2	1	17.1	AGGTTTAGCGTCAGTACTTGGG	ACACGGTTGAATGATAGACACT
c1-20.0	1	20.0	TACACGGCAGCTAGTTGCAG	ATGGCAGCCGTATAGCTAGG
c1-25.0	1	25.0	GCCGCGTGACAACAAAGTTA	GTCGCCTTTGCCTTTAGCTA
c1-30.0	1	30.0	AGCCTGCATTTCCATGAGAT	TCGATGTAGTCCCTCCTGCA
c1-35.2	1	35.2	AGCCGATAAGTAGAGAAAGGAGT	AGAAAGCTGTACTACTGGTTAACT
RM1387	1	40.2	GTGGCTGGCTGATCGATC	AATCAACCCAGCTACCATGC
c1-43.2	1	43.2	AGCCAAGTTCTTCCCAACCT	TGGCCTAGAATTCATTGGGGA
c2-0.0	2	0.0	TCGTTGCCTCTGATTAGTGATCT	CCACTGTGATTGTATTGGGGGA
c2-0.1	2	0.1	CAAGCTTCTCCTCGAGGGTG	AGCGATCGAGTAAGCAAGCA
RM279	2	2.9	GCGGGAGAGGGATCTCCT	GGCTAGGAGTTAACCTCGCG
c2-5.0	2	5.0	ACAACACCCTTCTTGGAAGAA	AGGGCTAGTGGTGATGTTGC
RM174	2	7.0	AGCGACGCCAAGACAAGTCGGG	TCCACGTCGATCGACACGACGG
c2-10.1	2	10.1	TGAGACGACTTGTGCGTTCA	TGGCCAGACGATCTTTTGGA
UH2-u4	2	13.5	AGTTAAAAGTTAACTCGCCGACG	CAGTAAGCATCCTACGGCTCC
c2-15.4	2	15.4	TTTAGCTACGTGGTGCTGGC	AGGAGGCCAACACGTAGGTA
c2-20.0	2	20.0	ATGATGCGCATGGCTACTGT	TTTTGATGGGATCTGGCCGT
c2-24.9	2	24.9	TGCTCGATCGATCTCCGTTG	ATTGGCACGTACTTCCTCCG
c2-30.2	2	30.2	GATAAGGCTGGGCGGGGC	CACCTGCCTCCGTGAGAC
c2-35.1	2	35.1	TTTTCGCCCTCCTCCTTGTC	TGCTGAGCTACACCTACACA
RM207	2	35.4	CCATTCGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC
c3-0.0	3	0.0	ATGTCACCATTGTTGCTGCC	CAAAAGACTGAGGAGCCCCC
RM60	3	0.1	AGTCCCATGTTCCACTTCCG	ATGGCTACTGCCTGTACTAC
c3-4.9	3	4.9	CCAGAACAAGGCCACAAGGT	TCCTCAGATTCTGCACATGC
RM7	3	9.8	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTCGTTGTT
c3-15.1	3	15.1	CCAAAATCGAGACAGAGGGAGT	ACTCGAAACTAGCTCGTGGC
UH3-d1	3	19.9	TGCTGTGAGAATATGTCCACCA	AGCAAGGGAAGCTATTTACGGA
c3-25.2	3	25.2	CACTCCCTCCTCCCCTCC	TCTCAGCTCCGATGTGTTTACA
c3-29.8	3	29.8	ACCCTACTTTTATAAGCACCTCCT	TGTTCTTTTCGGCTACTTTACTGA
c3-35.2	3	35.2	TCGGGTACTCTGCTTCTGGA	AAATGACTATAGTGGACCGACAA
RM16260	4	0.2	TGCTAGTAGGAGAGGAGCGAAGC	ACTGTGAGTCGTGTCAGAGTTGG
RM6487	4	4.7	AGAAGCTGTAGACGATGGCC	CTAGACCTCATCCCCTTCCC
UH4-d1	4	9.3	TGTATGGTATTCACCCCCGG	TGGAGCTCTGAGAAATACGAATCC
c4-10.1	4	10.1	GCTATCCATCCCTCTTACCGC	TCAAACTCATAGCTAACTCCAGCA
c4-14.7	4	14.7	CTGGACACTGTCATGTTCTCT	GAGCATGCATGTGTACTGC
RM3643	4	20.1	AGCATGAGCAGGTGCTAGTG	CGTTGCATGTGTGATGGC
c4-24.7	4	24.7	CTCGTCGATGAGCTGTGACA	AGCCGCATGCAAGGAATTTG
c4-29.8	4	29.8	CCGACATAGGGAGGACATTGA	CAGCATTCCCAGGGTCCTAC
c4-35.0	4	35.0	AGAGGGACGACACAGTAGCT	TCTTGGATTTTGGTACCGTGT
c5-0.0	5	0.0	AGTTAGCCAAGAGAACAGGACA	TGTTCAGGCTACACCAGGTT
c5-5.0	5	5.0	GCAGTAGGTGATGGGGTGTC	CCATTCGCTGCACCCATAGA
c5-10.3	5	10.3	CCTCTCCCATTTCACTGATGGT	AGGAATGGATAGCAATGACTTGT
UH5-u1	5	12.2	GACAGACTAGCGAACTTTGGT	ACCTGCTGTCTCGATTACATCC
c5-14.9	5	14.9	TGCTACTCATCTCCGCGTTC	ACATTCCCTCATGATCACACAA
c5-19.8	5	19.8	CCAACCTCTCGTCACTCATT	TAGCACAACATGACCGCACA
RM421	5	24.0	AGCTCAGGTGAAACATCCAC	ATCCAGAATCCATTGACCCC
c5-24.9	5	24.9	GGCACTCGCACTTGTTCAAC	ACCTCTCGATACCCATGGTACT
c5-29.6	5	29.6	GGCGGAGGTCTTGAGTTTGA	TAGTGGCGTGTCGTCGTAAC
c6-0.2	6	0.2	ATGCAATCCAGGCTTCCACA	TGGTTGAGTTGAAAAGAGAAGATTGA
RM204	6	2.2	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC
c6-5.1	6	5.1	TAGCCCGTTTCTCTTCCTGC	GGTGGCACTGAATTGAGGGA
c6-10.0	6	10.0	TCGATCAGATTCCTGGTTGGT	GACGAACGACCGGTGAACTA
UH6-u2	6	14.9	ACCAGTTTTTCCATCTCCAAACC	CGGCCGGCTAGAAACAAGAT
UH6-d1	6	15.6	ATACCAACACCCGACCACCA	TTTAGCGGTGGAAGACGACG
c6-20.0	6	20.0	ACTAACTAAAAGGAAGCACATGCC	ATCCGAGGTGAGTGTTTGCC
c6-25.1	6	25.1	ACACCACATATGCGCTGACA	TCAACAGTGGATGACGTACTCA
c6-31.0	6	31.0	TGGCCTACATTATATTGCGTTGC	TTGGTCATGCTCCTGTCCAC
c7-0.1	7	0.1	CCACGATTAATCTGCATGCATGT	GGTTTCGATCAGCGTCTTGC
RM82	7	3.1	TGCTTCTTGTCAATTCGCC	CGACTCGTGGAGGTACGG
c7-4.9	7	4.9	GACTTCGACCATAGCCTCCG	TACGCGCTCATGCTCAGTG
c7-10.2	7	10.2	TGAACACTTCCCACAGCTCA	AGGCTGGAGCAGTTTCTCAC
UH7-u2	7	11.9	TCACCGCGGAGAATCAACAA	AGCCATACCAGCTGATGTCG
c7-15.1	7	15.1	CCCAGTGCTTATACTCTGGCA	AGGTCAGCTATAAACTTGGTGCA

RM3826	7	20.8	TTAGCTTTCCTCCAGTCTCC	ACGGGTATCTGAAACACAAC
c7-25.1	7	25.1	GCTTGGACGTCTACCGAACA	AGGGAGGCATGAGAGGCATA
RM429	7	26.8	TCCCTCCAGCAATGTCTTTC	CCTTCATCTTGCTTTCCACC
c7-29.6	7	29.6	TTCGGTCTCCACAAGTCGTG	AGTGTGCTTTGGGCCATCTT
c8-0.0	8	0.0	TTCAACGTAAAACTTTCCGGTT	TGAAAGCTCCCATTAATCCCG
c8-5.1	8	5.1	ACCACATGTATGAATGCAACATT	ATCTGAAAACGCTTCGCCCT
c8-10.0	8	10.0	ATGCTCTGCCCTGATCTTGG	GGAGGAAGATCTGACCGCAC
UH8-u1	8	12.7	TTGGGGGCATAGCTCTTGTT	GCTGTTCCCCATTTTACTGCA
c8-15.0	8	15.0	ACTTGGGAAGAGGCAGCACC	GCCTTCTGCCTTGACCTTGA
c8-19.9	8	19.9	AATTATCGCTGGGATGGCCG	CGCCGGTAGTTCCTAGCATC
c8-25.1	8	25.1	AACGGGATAGGGCGGAGAA	GCCCAACGGAAACAAATCCC
RM3155	8	27.9	AATCCACATTTGGCTTCTC	CGTGTAACTGTTTCGCTTG
c8-28.4	8	28.4	GCTGGCAGCAGCTACTACTT	CGAAGAAGCAGCAGTTGGC
c9-0.1	9	0.1	CAGAGAAGCAGCACTCCCG	CTTCCCTGCCAAACAATGCC
UH9-d1	9	2.9	GTGACAGCCAAGTCCGTCAT	GGTCAAGAAGGTGCAGGTGA
c9-5.0	9	5.0	TCGGCTGCTACGAATTAGGTC	TAGTGATGTGGCAATGGCGA
c9-9.8	9	9.8	CGTCGCGGATGGAAACGA	AATGCAACCATTGAGCGGTAG
c9-15.0	9	15.0	GCAGGACACAGGAGGACAC	TTATGACCTTGCCTGGCCTG
RM257	9	17.7	CAGTTCCGAGCAAGAGTACTC	GGATCGGACGTGGCATATG
c9-19.9	9	19.9	TGGCTGCTCTTGCACTTATCA	CCCTTTCCAATGGAAGAGAAGGA
c9-22.9	9	22.9	TTAAAGGGGTCTTTGGTCGGT	ACGAAGTACGAGACCGACTC
c10-0.1	10	0.1	AAATTAAAGGGTAACGCCAGGA	GGCAGAAGGTTCTAGGGAGT
c10-4.9	10	4.9	AGTACGTGCGCTAGTTTCTGA	TGGATGAGTGATGCATGTATACA
UH10-d3	10	8.5	ACCGAGCACTTATCTACTTGCA	GGGGATGATTTCACCCGTAG
c10-9.9	10	9.9	CGCTTGCATCCATCGTTGAA	GAGGACGGCGAGGAGGTA
RM25321	10	12.8	CACTTCTTGTCACTGTACACACTCC	CACATGCCGTATATCAACTACCG
c10-15.1	10	15.1	ACCCAGGAACCCGATCAAGA	AAAGTCCATCGTGGTGAGCG
c10-20.0	10	20.0	CATACCAATGTGCAAGGGGC	CAGACAAGAAACACTGGGGGT
c10-23.2	10	23.2	GTCCTTCCAGGTTCCAGTTATAA	TTGTGGTGTGTGGGATAGCC
c11-0,1	11	0.1	GGTGGATATTGGGGAGGAGG	AGGTCCCTCCGTATAACGCA
c11-5.0	11	5.0	TCAACAACTGCAAATTACTGGCA	TGACAAGAACCCTGACAACCA
RM536	11	9.0	TCTCTCCTCTTGTTTGGCTC	ACACACCAACACGACCACAC
c11-10.0	11	10.0	CTGGTGCTTCCCACACTGAT	AGTTGCCGGGGTCTAATGAC
UH11-u1	11	12.0	TATCTTTACTGTTACAACGCACCG	CCATCTCACGGGTGGGTG
c11-15.1	11	15.1	TGTGGTCGAACGTGTGAGAG	ATTTGATCGATCCGACGGCA
c11-20.0	11	20.0	GTTTTAATGTTCAACGCTGCCG	ACGTTTGGTCATTCACTTCATTCA
c11-25.0	11	25.0	GTCTGTGTGGATGGGCTGAT	TCTGACAACAGCAAACTCGC
c11-29.0	11	29.0	ACACTGGACAGAGAATAACCCA	ACGTACGGTAGACAGCAACG
c12-0.3	12	0.3	AGCACACCTCACTTCAGCAC	TGGGATCGACAATCATTCCAAGT
c12-5.0	12	5.0	AGCATTAGTTTCACCTCAGAGT	TCTTGGATGAACCTGTTTCTTTGA
c12-10.0	12	10.0	TCTTCAAGTTACAAGGTGTGGA	GAGATTGGAGCTTTAATAGTGGTGA
UH12-d1	12	12.1	TGATAGAGCCATGGTGACCG	TGTTGCAAATATTTTGAAGCGATAAG
c12-15.1	12	15.1	ATCCACAACTGACGCACCAT	GGAATCGGGAGAGGATGAGC
c12-20.0	12	20.0	TGCATATGCTAGCTAGTTGATCA	CCCTGCCTCGCAACATAAGA
c12-25.1	12	25.1	CCCATCGGAGTCTTATCAAGGT	AAGGACGTGCAAGCTCGAAG
c12-27.5	12	27.5	TGCCACTCGAGGGATTTTCT	GGTTGGCTAATCTAGGAGGCT

Table 4-3　AC集団から作製された連鎖地図の概要

Chr. No.	AC集団					
	染色体長(Mb)			マーカー	総延長	組換え頻度
	start	end	塩基長	数	(cM)	(cM/Mb)
1	0.23	43.23	43.01	11	280.6	6.49
2	0.04	35.38	35.34	13	195.3	5.52
3	0.01	35.20	35.19	9	245.5	6.97
4	0.18	34.99	34.81	9	158.4	4.53
5	0.04	29.65	29.61	9	211.6	7.14
6	0.16	31.03	30.87	9	195.6	6.30
7	0.12	29.58	29.46	10	141.1	4.77
8	0.02	28.38	28.37	9	200.6	7.07
9	0.15	22.93	22.78	8	95.1	4.15
10	0.12	23.19	23.07	8	115.3	4.97
11	0.14	28.97	28.83	9	130.1	4.49
12	0.33	27.50	27.18	8	126.6	4.60
		合計	368.52	112	2095.7	
				平均組換え頻度(cM/Mb)		5.69

Table 4-4　AC集団で分離の歪みが検出されたDNAマーカー(p<0.05,　False discovery rate(BH法による)補正込み)

マーカー名	染色体番号	地図位置 (cM)	物理位置 (Mb, IRGSP-1.0)	個体数	優先伝達アレル	χ^2値	p値	FDR (0.05, BH)	*HS*
RM1387	1	233.0	40.2	27	Nip	13.37	0.000	0.004	-
c3-0.0	3	0.0	0.0	27	WK21	13.37	0.000	0.004	*s19*
RM60	3	7.5	0.1	27	WK21	13.37	0.000	0.004	*s19*
c4-24.7	4	107.1	24.7	26	Nip	18.62	0.000	0.001	*s2*
c6-0.2	6	0.0	0.2	27	WK21	13.37	0.000	0.004	*s1*
RM204	6	11.3	2.2	27	WK21	16.33	0.000	0.002	*s1*
c6-5.1	6	22.6	5.1	27	WK21	8.33	0.004	0.005	*s1*
c7-0.1	7	0.0	0.1	27	WK21	16.33	0.000	0.002	*s20*
c7-25.1	7	117.7	25.1	27	Nip	13.37	0.000	0.004	*s21*
RM429	7	125.2	26.8	27	Nip	19.59	0.000	0.000	*s21*
c7-29.6	7	141.1	29.6	26	Nip	12.46	0.000	0.005	*s21*

Table 4-5　AC集団における全体的なアレル出現頻度

植物材料	個体数	*sativa*		*glaberrima*		p-value
		アレル数	比率	アレル数	比率	
AC集団	27	1604	0.535	1396	0.465	0.000

考察

組換え頻度の雌雄差

今回用いた 3 つの集団のうち，AC 集団は雄性配偶体の遺伝構成を反映しており，2 つの BC1F1 集団は雌性配偶体の遺伝構成を反映している．3 つの集団から得られた染色体地図の全長は，AC 集団が最も長く 2095.7cM であり，T65 BC1F1 集団の 1640.9cM，WK18 BC1F1 集団は 1363.5cM と続いた(Table 4-3，Ap. Table 5)．またすべての染色体において AC 集団が最も長い地図距離を示し，物理距離当たりの組換え頻度(cM/Mb)も高かった．地図距離は 2 つのマーカー間で起こる組換え現象に基づいて定められる値であり，雌性配偶体の母細胞よりも雄性配偶体の母細胞でより盛んに相同組換えが起きている可能性が示唆された．遺伝的組換えの雌雄差の存在は，ヒト等の性染色体を持つ生物では古くから知られており，性染色体を持たない生物でも示唆されている(Lenormand と Dutheil, 2005)．*Arabidopsis thaliana* では，F1 個体を雄親とした場合と雌親とした場合の 2 種類の戻し交雑集団を用いて，雌雄両方の配偶体の組換え頻度が詳細に報告されている(Giraut ら，2011)．*Arabidopsis* の場合，相同組換えの起点となる染色体の交叉頻度は，5 対すべての染色体において雄性配偶体の方が雌性配偶体よりも 1.56-1.95 倍(平均 1.67 倍)高かった．交叉が起きやすい場所には極性があり，雄性配偶体の場合は染色体の端部でより高頻度に交叉が起きることが示唆されている．

イネでは雌雄差に基づく組換え頻度の差は知られていないが，環境ストレスにより組換え頻度に差が生じることが示唆されている(Si ら，2015)．Si ら(2015)は種内雑種の F1 個体に対して各種ストレス処理を行い，対照区と比較して高温ストレス区(昼 38℃/夜 32℃)，いもち病感染区および UV-B 照射区から得られた F2 後代において，対照区よりも高頻度な交叉が確認されたことを報告した．今回用いられた AC 集団は北海道で栽培され，BC1F1 集団は九州で栽培されている．もし組換え頻度が高温ストレスにより高くなる場合，より高温下で栽培された BC1F1 集団で高くなることが期待される．しかし結果は逆であり，北海道で栽培された AC 集団において高い組換えが観察されている．上記の論文では，低温ストレスによる交叉頻度への有意な影響は観察されていない．従って，雌雄の配偶体形成時における組換え頻度の差は，統一した条件下におけるさらなる解析が必要である．

雌性配偶体と雄性配偶体で見られた遺伝的歪みの差

O. sativa と *O. glaberrima* 種間では，雑種不稔性をもたらす遺伝子座群(*HS* 座)が 13 個報告されている(Table 1-1)．*HS* 座には *sativa* 型アレルと *glaberrima* 型アレルが存在し，いずれもホモ接合型では不稔効果を持たず，ヘテロ型で保持されている場合のみ，配偶体形成時にどちらか一方のアレルが選択的に不稔となる(Figure 1-1)．最も初期に発見された *S1* 遺伝子座の場合，*S1* ヘテロ型接合個体では *sativa* 型の *S1s* アレルを運ぶ配偶体のみが

選択的に不稔となり，*S1g* 型アレルのみが後代へ継承されることから後代集団の *S1* 座の分離頻度は *S1g* 型へ大きく歪む．雌雄どちらの配偶体で不稔性をもたらすのかは *HS* 座毎に異なり，これまでに *S1*，*S2*，*S37*(t)は雌雄両方の配偶体不稔に関与し，他の *HS* 座は雄性配偶体の不稔に関与することが報告されている(Table 1-1)．*S1* 及び *S2* 座は本研究においても，AC 集団と T65 BC1F1 集団の両方で歪みが観察され，既報と一致していた(Table 4-4，Ap. Table 8)．しかし *S19* 座及び *S20* 座近傍の歪みが，雌性配偶体の遺伝構成を反映した BC1F1 集団においても同様に歪んでいることが示唆された(Ap. Table 8)．*S19* 及び *S20* 座は雄性配偶体の不稔に関与する遺伝子座とされ(Taguchi ら，1999；Doi ら，1999)，Li ら(2018)は *O. sativa* 背景下に *glaberrima* 型の *S19* アレル及び *S20* アレルが挿入されたそれぞれの NIL 系統を用いて，半不稔効果が雄性配偶体にのみ現れ雌性配偶体には現れなかったことを報告している．しかし Li ら(2008)の WAB450-16(*O. sativa*)と CG14(*O. glaberrima*)種間の BC1F1 集団(WAB450-16/CG14//WAB450-16)を用いた解析では，本研究と同様に，*S19* 座と *S20* 座近傍領域の分離歪みが同様に検出されている．従ってこれらの座による配偶体への不稔効果は，雄性配偶体の半不稔に対しては *S19* 座あるいは *S20* 座がヘテロ接合であれば現れ，雌性配偶体の半不稔に対しては，*S19* 座あるいは *S20* 座がヘテロ接合であり，かつ別の遺伝領域が *O. glaberrima* 型かヘテロ接合型になっている必要があるエピスタティックな働き方をする遺伝子座である可能性が考えられる．

花粉不稔性個体の正常な小胞子由来カルスを用いた遺伝解析

O. sativa と *O. glaberrima* 種間の F1 個体は強度の花粉不稔性を示し，ほぼすべての花粉が開花前に不稔となることから，その遺伝構成は今まで知られていなかった．本研究ではその不稔性花粉を発達段階の初期に葯培養法に供試しカルスを獲得することで，雄性配偶体の遺伝子型を解析した．結果として雌雄両配偶体の間では，遺伝的な歪みが生じる領域に違いがあり，減数分裂期における相同組み換えの頻度も異なる可能性が示唆された．イネにおける相同組換えの雌雄差は殆ど分かっていない．本結果では雌雄で相同組換え頻度に差があり，雄性配偶体形成時の方がより頻繁に相同組換えが起きることが示唆された．この結果は，例として，優良形質と不良形質の連鎖を解消したい場合にその材料を花粉親として用いることで，望ましい個体が得られる確率が上がる可能性を示唆する．

しかし本研究に用いた AC 集団と BC1F1 集団は栽培環境が異なった．相同組換えは環境ストレスにより頻度が増減することが報告されている．そのため，組換え頻度の雌雄差の詳細な解析には今後さらなる研究を要する．

第五章

総合考察

葯培養による種間雑種不稔性の克服

本研究と時期を同じくして行われた，キタアケ(*O. sativa*)と WK21(*O. glaberrima*)種間の F1 雑種を用いた葯培養では，2 倍体の固定系統が得られている(未公表データ)．この 2 系統のゲノムはいずれも，キタアケ由来のゲノムと WK21 由来のゲノムをほぼ半々ずつ継承しており，ホモ接合型で固定されていることが確認された(未公表データ)．ヘテロ接合型のときに不稔効果を示す *HS* 座もホモ接合型で固定されていた．異種ゲノムを有する 2 倍体固定系統は北海道の圃場条件で比較的高い種子稔性を示した．この結果は，種間 F1 雑種におけるほぼ完全な自殖不稔性は，多数の *HS* 座がヘテロ接合型になることでもたらされるものであり，それらを葯培養によりホモ接合型で固定することで，両種のゲノムを半々ずつ持っていても稔性がある固定系統を得られることを示す．従って，両種間の不稔性の主たる *HS* 座が倍加半数体として完全にホモ接合型になると，不稔性を示さなくなると同時に，*HS* 座以外の遺伝的影響も極めて限定的になることが推定された．

今回の葯培養では小胞子由来の稔性のある固定系統が得られなかったが，稔性のある固定されていない 4 倍体雑種が得られた．前出の 2 倍体固定系統は *HS* 座の影響を排除することによって稔性を確保できたが，私の研究では *HS* 座を固定しなくても，倍数化することで両種間の雑種不稔性を著しく減衰させることができた．4 倍体雑種が示した“ヘテロ接合性を併せ持つ”特徴は，2 倍性の非還元性小胞子に起因していた．非還元性小胞子由来の個体のうち，2 倍体からは種子は得られず，4 倍体個体のみから得られた．本研究における稔性個体獲得の鍵は，①非還元性小胞子を救済できたこと，②それらが自然倍加し 4 倍体になったこと，③4 倍体では何らかの理由で雑種不稔性を回避できたことの 3 つであったと考える．

4 倍体雑種の利用による雑種不稔性の克服

O. sativa と *O. glaberrima* 種間の F1 雑種の稔性が，4 倍体条件でのみ回復した背景としては，HS 座の効果の減衰が考えられる(Figure 2-5)．その他に本研究では，2 倍性小胞子である FDR 型非還元性小胞子の形成は，花粉母細胞における一価染色体形成の観察結果から裏付けられた(Figure 3-3 B)．相同染色体同士が対合せず一価染色体を形成し，それが原因で減数分裂が異常になるような遠縁雑種の場合，染色体倍加による解決が見込まれる(Silkova ら，2003；Rodrangboon ら，2002)．一般に，完全に相同な染色体を補完することで二価染色体が形成されるようになり，複二倍体化することで減数分裂が正常化すると言われている(西尾と吉村，2012)．*sativa-glaberrima* F1 雑種の場合では，2 倍体 F1 雑種で見られた一価染色体形成が染色体倍加に伴い正常化し，減数分裂がより安定になったことも考えられる．

sativa-glaberrima 種間の 4 倍体雑種が複二倍体であった場合，*sativa* と *glaberrima* の染色体対合は起こらず，両種間の遺伝子交換も起きないと考えられる．本研究では，2 倍体 F1 雑種では *sativa-glaberrima* 種間の頻繁な相同組換えが起きていること(Table 2-3，2-7，**4-**

3), 2 倍体 F1 雑種における一価染色体形成は部分的であること(Table 3-4)が分かっており, *sativa-glaberrima* の 4 倍体雑種の後代で形質の分離が見られたこと(山本ら, 2020)が確認されている．これらの結果に鑑み，*sativa-glaberrima* 4 倍体 F1 雑種は完全な複二倍体ではなく同質 4 倍体であると考えられる. 従って 4 倍体 F1 雑種では *sativa-glaberrima* 種間の染色体対合が起きると考えるのが自然であろう.

sativa-glaberrima 種間の雑種品種の代表例である NERICA 系統は親系統を上回る平均収量を示す(Saito，2014)が，粗放的栽培環境において有用な雑種競合性等の形質を *O. glaberrima* 親から継承できていないことが示唆されている(Ekeleme ら，2009). 遺伝資源としての *O. glaberrima* の活用には今後，同種が持つ雑草競合性等の量的形質を支配する複数の遺伝子を取り込むための技術が必要だと考える．そのためには，*sativa-glaberrima* 種間の効率的な遺伝子交換が求められ，自殖稔性のある 4 倍体 F1 雑種の利用が有効であると考える．本研究で得られた両種間の連鎖地図も見込まれる.

今後，AA ゲノム種間の遺伝子交換のために 4 倍体 F1 雑種を用いることで，交雑後代の育成も不可能ではなくなるはずである．事実，4 倍体化による稔性回復は *O. sativa* と他の AA ゲノム種の野生イネとの間でも観察されている(Zhang ら，2014). Zhang ら(2014)は，*O. longistaminata* や *O. barthii* 等の AA ゲノム種の野生イネと *O. sativa* との F1 雑種において，4 倍体化に伴い自殖稔性が回復したことを報告している．*HS* 座はこれらの野生種との間にも報告されているため，*sativa-glaberrima* F1 雑種で想定されたような 4 倍体化に基づく *HS* 座の効果の減衰が稔性回復に寄与するのかもしれない(Figure 2-5；Chen ら，2017). AA ゲノム種のイネは世界中に分布しており，多様な生物・非生物ストレス耐性を持つ(Ali ら，2010). *sativa-glaberrima* 種間のみに限らず，4 倍体雑種を利用して多様な野生種の形質を *O. sativa* へ集積することができれば，AA ゲノム種のイネの分布範囲を網羅的にカバーできる栽培適性をもつイネ集団の作出が将来的には見込まれるだろう.

4 倍体雑種の 2 倍体への還元

イネの同質 4 倍体は，同質 2 倍体より種子稔性が低い(Koide ら，2020). 本研究で用いられたイネ材料も，2 倍体系統(PL9，PUSUR，DULAR，WK21)の稔性が 91.4%-95.9%であったのに対し，それらの 4 倍体系統の稔性は 31.1%-62.2%まで低下した(Table 2-11). 他植物の同質 4 倍体植物と同様，イネの同質 4 倍体も減数分裂時の染色体対合の異常により，稔性が低下する．今までに，4 倍体でありかつ種子稔性の高いイネとして，最大で 80%超の種子稔性を示す Polyploid meiosis stability (PMeS)系統が報告されている(Cai ら，2007). しかし，4 倍体イネの実用品種としての普及には至っていない．世界中で栽培されている現行品種のイネは 2 倍体であり, 4 倍体雑種をイネ 2 倍体品種の遺伝資源として用いることは難しい.

本研究の葯培養で得られた 4 倍体雑種の後代を用いた葯培養では, 2 倍体雑種が得られた(岸(2020)，修論). 2 倍体雑種のうち 1 系統は比較的高い(43%)種子稔性を示し，その後代

も種子稔性を維持していた(0%-62%). 従って *sativa-glaberrima* 種間の雑種を 4 倍体雑種として継代し，両種の遺伝子交換を促したのち，葯培養により倍数性を 2 倍体へ還元することで，稔性のある 2 倍体雑種系統群の作出が見込まれる．現状の 2 倍体品種の育種材料として，これらの材料が *sativa-glaberrima* 種間の橋渡し種として活用できるだろう．

Hom/Het 型個体の由来と雑種不稔性のメカニズムと 4 倍体における稔性の回復

葯培養で出現する植物体は一般的に小胞子由来であり，2 倍体イネの葯培養で得られる植物体は原則的にホモ接合型のゲノムを持つが，部分的にヘテロ接合型を示す植物体の獲得が従来報告されている(Grewal ら，2011；Nguyen ら，2016； Rout ら，2016；Naik ら，2017)．それらの植物体の由来として，体細胞からのカルスの出現や培養変異によりヘテロ接合型を生じる可能性が報告されてきた．本研究では部分的にヘテロ接合性を維持した植物体が，減数分裂時の相同組換えの後，第一分裂か第二分裂における異常により出現した非還元性小胞子に由来することを明確に示した(Pinson と Rutger，1993)．遠縁雑種において非還元性の配偶体は，有性生殖時に倍加(複二倍体化)することで，倍加種の成立に寄与した事例が知られている(De Storme と Geelen，2012；Rodrangboon ら，2002)．しかし非還元性配偶体の形成に関与する紡錘体の配向性異常や一価染色体形成は，正常な半数性の配偶体形成の妨げとなることから，非還元性配偶体の形成もまた，*sativa-glaberrima* 種間の雑種不稔性を誘導するメカニズムの 1 つと考えてよいだろう（Figure 3-7).

本研究で得られた減数分裂異常の知見に基づき，*sativa-glaberrima* 種間の雑種不稔性には，大別して以下の 2 つの機構が関与すると考える(Figure 3-7).

① 複数の *HS* 座(Table 1-1)間の相互作用による配偶体致死.

② 花粉母細胞における一価染色体形成及び紡錘体の形成異常に基づく，減数分裂の異常(Figure 3-1，3-3，3-5).

これら 2 つの機構を主因として 2 種間の F1 雑種は完全な不稔性を示すだろう．しかし 2 倍体 F1 雑種が完全不稔であるにもかかわらず，4 倍体 F1 雑種は稔性を示した(Table 2-11)．稔性回復の要因の 1 つは，*HS* 座の効果の減衰だったと考える．*HS* 座による不稔性機構のモデルとして提唱された *killer-protector* システム(Yang ら，2012)に基づき，4 倍体条件における個々の *HS* 座の効果は，半不稔から四半不稔へ減衰すると想定される(Figure 2-5)．今後，倍数性と *HS* 座の効果に関する詳細な研究が求められる．

減数分裂時の一価染色体形成は遠縁雑種でしばしば観察される(Li ら，1964；Silkova ら，2003)．*O. sativa* と *O. officinalis* 種間の 2 倍体 F1 雑種では染色体対合の異常に基づく減数分裂異常が観察され不稔性を示すが，倍加した 4 倍体 F1 雑種では稔性が回復することが報告されている(Rodrangboon ら，2002)．本研究で用いられた *sativa-glaberrima* 種間の 2 倍体 F1 雑種でも一価染色体形成が観察された(Figure 3-3)ため，4 倍体 F1 雑種における稔性回復の背景には，同様の複二倍体化による減数分裂の正常化が関与する可能性がある．しかし，F1 雑種の葯培養に由来する再分化個体とカルスの解析結果(Table 2-3，4-3)および減数

分裂の観察結果(Figure 3-3)から判断して，両種間の染色体は必ずしも対合しないわけではない．4 倍体雑種の後代では形質の分離が見られた(山本ら，2020)ことからも，*sativa-glaberrima* 種間の 4 倍体 F1 雑種は複二倍体ではないと考える．従って，遠縁雑種における複二倍体化のように，4 倍体化に基づき一価染色体の形成が解消されることで減数分裂が正常化したことが，稔性回復の背景であると言い切ることは難しい．両種間の雑種不稔性を構成する機構を知り，それを克服するためには，2 倍体雑種および 4 倍体雑種における減数分裂の詳細を解析する必要があるだろう．

引用文献

1. Cai DT, Chen JG, Chen DL, et al. **The breeding of two polyploid rice lines with the characteristic of polyploid meiosis stability**. *Sci China, Ser C Life Sci*. 2007;50:356-366.

2. Chaikam V, Molenaar W, Melchinger AE, Boddupalli PM. **Doubled haploid technology for line development in maize: technical advances and prospects**. *Theor Appl Genet*. 2019;132:3227-3243.

3. Chen H, Zhao Z, Liu L, et al. **Genetic analysis of a hybrid sterility gene that causes both pollen and embryo sac sterility in hybrids between *Oryza sativa* L. and *Oryza longistaminata***. *Heredity*. 2017;119:166-173.

4. De Storme N, Geelen D. **Sexual polyploidization in plants – cytological mechanisms and molecular regulation**. *New Phytol*. 2013a;198:670-684.

5. De Storme N, Geelen D. **Cytokinesis in plant male meiosis**. *Plant Signal Behav*. 2013b;8:1-9.

6. De Storme N, Geelen D. **High temperatures alter cross-over distribution and induce male meiotic restitution in *Arabidopsis thaliana***. *Commun Biol*. 2020;3:1-15.

7. Doi K, Taguchi K, Yoshimura A. **A new locus affecting high F1 pollen sterility found in backcross progenies of Japonica rice and African rice**. *Rice Genet Newsl*. 1998;15:146-148.

8. Doi K, Taguchi K, Yoshimura A. **RFLP mapping of *S20* and *S21* for F1 pollen semi-sterility found in backcross progeny of *Oryza sativa* and *O. glaberrima***. *Rice Genet Newsl*. 1999;16:65-68.

9. Ekeleme F, Kamara AY, Oikeh SO, et al. **Response of upland rice cultivars to weed competition in the savannas of West Africa**. *Crop Prot*. 2009;28:90-96.

10. El-Hennawy MA, Abdalla AF, Shafey SA, Al-Ashkar IM. **Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique**. *Ann Agric Sci*. 2011;56:63-72.

11. Fujisawa Y, Kato T, Ohki S, et al. **Suppression of the heterotrimeric G protein causes abnormal morphology, including dwarfism, in rice**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7575-7580.

12. Fukuta Y, Konisho K, Senoo-Namai S, et al. **Genetic characterization of rainfed upland New Rice for Africa (NERICA) varieties**. *Breed Sci*. 2012;62:27-37.

13. Garavito A, Guyot R, Lozano J, et al. **A genetic model for the female sterility barrier between Asian and African cultivated rice species**. *Genetics*. 2010;185:1425-1440.

14. Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S. **Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L.** *Genetics*. 2005;169:1631-1638.

15. Germanà MA. **Anther culture for haploid and doubled haploid production**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2011;104:283-300.

16. Giraut L, Falque M, Drouaud J, Pereira L, Martin OC, Mézard C. **Genome-wide crossover distribution in *Arabidopsis thaliana* meiosis reveals sex-specific patterns along chromosomes**. *PLoS Genet*. 2011;7:1-15.

17. Gopalakrishnan R, Nayar NM, Sampath S. **Cytogenetical studies of two amphidiploids in the genus *Oryza***. *Euphytica*. 1964;13:57-64.

18. Grewal D, Manito C, Bartolome V. **Doubled haploids generated through anther culture from crosses of elite Indica and Japonica cultivars and/or lines of rice: large-scale production, agronomic performance, and molecular characterization**. *Crop Sci*. 2011;51:2544-2553.

19. Haefele SM, Nelson A, Hijmans RJ. **Soil quality and constraints in global rice production**. *Geoderma*. 2014;235-236:250-259.

20. Harushima Y, Yano M, Shomura A, et al. **A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population**. *Genetics*. 1998;148:479-494.

21. Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, Heidekamp F, van der Mark F. **Anther and microspore culture of *Hordeum vulgare* L. cv. Igri**. *Plant Sci*. 1992;86:89-96.

22. Ikeda R, Sokei Y, Akintayo I. **Seed fertility of F1 hybrids between upland rice NERICA cultivars**. *Breed Sci*. 2009;59:27-35.

23. Jauhar PP. **Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force**. *J Hered*. 2007;98:188-193.

24. Jones M, Dingkuhn M, Aluko G, Semon M. **Interspecific *O. sativa* L. × *O. glaberrima* Steud: progenies in upland rice improvement. Euphytica**. *Euphytica*. 1997;92:237–246.

25. Kanaoka Y, Kuniyoshi D, Koide Y, et al. **Anther culture in rice proportionally rescues microspores according to gametophytic gene effect and enhances genetic study of hybrid sterility**. *Plant Methods*. 2018;14:1-12

26. Kang X, Xu C, Bai F, et al. **Analysis of genetic composition and transmitted parental heterozygosity of natural 2n gametes in *Populus tomentosa* based on SSR markers**. *Planta*. 2018;247:1407-1421.

27. Koide Y, Kuniyoshi D, Kishima Y. **Fertile tetraploids: new resources for future rice breeding?** *Front Plant Sci*. 2020;11:1-6.

28. Koide Y, Ogino A, Yoshikawa T, et al. **Lineage-specific gene acquisition or loss is involved in interspecific hybrid sterility in rice**. *Proc Natl Acad Sci*. 2018;115:E1955-E1962.

29. Koide Y, Onishi K, Nishimoto D, Baruah AR, Kanazawa A, Sano Y. **Sex-independent transmission ratio distortion system responsible for reproductive barriers between Asian and African rice species**. *New Phytol*. 2008;179:888-900.

30. Lenormand T, Dutheil J. **Recombination difference between sexes: a role for haploid selection**. *PLoS Biol*. 2005;3:0396-0403.

31. Li F, Liu FH, Morinaga D, Zhao Z. **A new gene for hybrid sterility from a cross between *Oryza sativa* and *O. glaberrima***. *Plant Breed*. 2011;130:165-171.

32. Li HW, Yang KS, Ho K-C. **Cytogenetical studies of *Oryza sativa* L. and its related species VII. Non-syncronization of mitosis and cytokinesis in relation to the formation of diploid gametes in the hybrids of *Oryza sativa* L. and *O. officinalis* Wall.** *Bot Bull Acad Sin*. 1964;5:142-153.

33. Li J, Xu P, Deng X, et al. **Identification of four genes for stable hybrid sterility and an epistatic QTL from a cross between *Oryza sativa* and *Oryza glaberrima***. *Euphytica*. 2008;164:699-708.

34. Li J, Zhou J, Xu P, et al. **Neutral alleles at hybrid sterility loci of *Oryza glaberrima* from AA genome relatives in Genus *Oryza***. *Breed Sci*. 2018;68:343-351.

35. Li J, Zhou J, Zhang Y, Yang Y, Pu Q, Tao D. **New insights into the nature of interspecific hybrid sterility in rice**. *Front Plant Sci*. 2020;11:1-10.

36. McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, et al. **Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.)**. *DNA Res*. 2002;9:199-207.

37. Morinaga T, Kuriyama H. **Cytogenetical studies on *Oryza sativa* L. IX_The F1 hybrid of *O. sativa* L and *O. glaberrima* Steud.** *Jpn J Breed*. 1957;7:57-65.

38. Nagaki K, Cheng Z, Ouyang S, et al. **Sequencing of a rice centromere uncovers active genes**. *Nat Genet*. 2004;36:138-145.

39. Naik N, Rout P, Umakanta N, et al. **Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2017;128:679-689.

40. Nakamura A, Itagaki R. **Anther culture in *nicotiana* and the characteristics of the haploid plants**. *Japanese J Breed*. 1973;23:71-78.

41. Nguyen H, Chen X-Y, Jiang M, et al. **Development and molecular characterization of a doubled haploid population derived from a hybrid between *japonica* rice and wide compatible *indica* rice**. *Breed Sci*. 2016;66:552-559.

42. Niizeki H, Oono K. **Induction of haploid rice plant from anther culture**. *Proc Jpn Acad*. 1968;44:554-557.

43. Oka H. **Genic analysis for the sterility of hybrids between distantly related varieties of cultivated rice**. *J Genet*. 1957;55:397-409.

44. Oka H. **Preferential pairing of chromosomes in a tetraploid hybrid between *Oryza glaberrima* and *O. sativa***. *Can J Genet Cytol*. 1968;10:527-535.

45. Ouyang Y, Zhang Q. **Understanding reproductive isolation based on the rice model**. *Annu Rev Plant Biol*. 2013;64:111-135.

46. Pinson SRM, Rutger JN. **Heterozygous diploid plants regenerated from anther culture of F 1 rice plants**. *Vitr Cell Dev Biol*. 1993;29:174-179.

47. Powell W, Uhrig H. **Anther culture of *Solanum* genotypes**. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 1987;11:13-24.

48. Ren G, Xu P, Deng X, et al. **A new gamete eliminator from *Oryza glaberrima***. *Rice Genet Newsl*. 2006;22:43-44.

49. Rodrangboon P, Pongtongkam P, Suputtitada S, Adachi T. **Abnormal embryo development and efficient embryo rescue in interspecific hybrids, *Oryza sativa* × *O. minuta* and *O. sativa* × *O. officinalis***. *Breed Sci*. 2002;52:123-129.

50. Rout P, Naik N, Ngangkham U, et al. **Doubled haploids generated through anther culture from an elite long duration rice hybrid, CRHR32: method optimization and molecular characterization**. *Plant Biotechnol*. 2016;33:177-186.

51. Saito K, Fukuta, Yoshimichi F, Yanagihara S, Ahouanton K, Sokei Y. **Beyond NERICA: identifying high-yielding rice varieties adapted to rainfed upland conditions in benin and their plant characteristics**. *Trop Agiculture Dev*. 2014;58:51-57.

52. Sano Y. **A new gene controlling sterility in F1 hybrids of two cultivated rice species: Its association with photoperiod sensitivity**. *J Hered*. 1983;74:435-439.

53. Sano Y. **The genic nature of gamete eliminator in rice**. *Genetics*. 1990;125:183-191.

54. Sano Y, Chu Y, Oka H. **Genetic studies of speciation in cultivated rice, 1. Genic analysis for the F1 sterility between *O. sativa* L and *O. glaberrima* Steud.** *Genetics*. 1979;54:121-132.

55. Sarla N, Swamy BPM. ***Oryza glaberrima*: a source for the improvement of *Oryza sativa***. *Curr Sci*. 2005;89:955-963.

56. Si W, Yuan Y, Huang J, et al. **Widely distributed hot and cold spots in meiotic recombination as shown by the sequencing of rice F2 plants**. *New Phytol*. 2015;206:1491-1502.

57. Silkova OG, Loginova DB. **Sister chromatid separation and monopolar spindle organization in the first meiosis as two mechanisms of unreduced gametes formation in wheat–rye hybrids**. *Plant Reprod*. 2016;29:199-213.

58. Silkova OG, Shchapova AI, Kravtsova LA. **Mechanisms of meiotic restitution and their genetic regulation in wheat-rye polyhaploids**. *Russ J Genet*. 2003;39:1271-1280.

59. Taguchi K, Doi K, Yoshimura A. **RFLP mapping of *S19*, a gene for F1 pollen semi-sterility found in backcross progeny of *Oryza saliva* and *O. glaberrima***. *Rice Genet Newsl*. 1999;16:70-71.

60. Telmer CA, Simmonds DH, Newcomb W. **Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus***. *Physiol Plant*. 1992;84:417-424.

61. Watanabe Y. **Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis**. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:370-382.

62. Woo SC, Mok T, Huang JY. **Anther culture of *Oryza sativa* L. and *Oryza perennis* moench hybrids**. *Bot Bull Acad Sin*. 1978;19:171-178.

63. Woo S-C, Huang C-Y. **Anther culture of *Oryza glaberrima* Steud. and its hybrids with *Oryza sativa* L.** *Bot Bull Acad Sin*. 1980;21:75-79.

64. Xie Y, Tang J, Xie X, et al. **An asymmetric allelic interaction drives allele transmission bias in interspecific rice hybrids**. *Nat Commun*. 2019;10:1-10.

65. Xie Y, Xu P, Huang J, et al. **Interspecific hybrid sterility in rice is mediated by *OgTPR1* at the *S1* locus encoding a peptidase-like protein**. *Mol Plant*. 2017;10:1137-1140.

66. Xu P, Zhou J, Li J, et al. **Mapping three new interspecific hybrid sterile loci between *Oryza sativa* and *O. glaberrima***. *Breed Sci*. 2014;63:476-482.

67. Yamamoto N, Garcia R, Suzuki T, et al. **Comparative whole genome re-sequencing analysis in upland New Rice for Africa: insights into the breeding history and respective genome compositions**. *Rice*. 2018;11:1-16.

68. Yamamoto T, Nagasaki H, Yonemaru JI, et al. **Fine definition of the pedigree haplotypes of closely related rice cultivars by means of genome-wide discovery of single-nucleotide polymorphisms**. *BMC Genomics*. 2010;11:1-14.

69. Yamasaki M, Tsunematsu H, Yoshimura A, Iwata N, Yasui H. **Quantitative trait locus mapping of ovicidal response in rice (*Oryza sativa* L.) against whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera* Horvath)**. *Crop Sci*. 1999;39:1178-1183.

70. Yang J, Zhao X, Cheng K, et al. **A killer-protector system regulates both hybrid sterility and segregation distortion in rice**. *Science*. 2012;337:1336-1340.

71. Zhang X, Wang A, Du C, et al. **An efficient method of developing synthetic allopolyploid rice (*Oryza* spp.)**. *Genet Resour Crop Evol*. 2014;61:809-816.

72. Zhang Z, Xu P, Hu F, et al. **A new sterile gene from *Orya glaberrima* on chromosome 3**. *Rice Genet Newsl*. 2006;22:26-28.

73. Zhu Y, Yu Y, Cheng K, et al. **Processes underlying a reproductive barrier in *indica-japonica* rice hybrids revealed by transcriptome analysis**. *Plant Physiol*. 2017;174:1683-1696.

74. 池田良一. **各国における NERICA の普及状況**. お米のはなし. 2019;27:1-3.

75. 稲崎新，升水知佳，井手一夫，児玉裕也，北ノ薗涼一，小川紹文. **栽培イネ実用品種のコルヒチンによる倍加個体の選抜法**. 宮崎大学農学部研究報告. 2007;53:27-32.

76. 緒方萌衣，小出陽平. **イネ種間雑種不稔遺伝子 *S2* は第 4 染色体に座乗する**. 育種・作物学会北海道談話会会報. 2018;59:8-9.

77. 木下厚，岡本吉弘，石村櫻，佐竹徹夫. **イネの葯培養におけるカルス形成に最適の花粉発育時期の決定**. 育種学研究. 2000;2:73-79.

78. 山本敏央, 古田智敬, 小川大輔, 米丸淳一, 國吉大地, 貴島祐治. **イネ育種における遺伝的多様性を拡大するための 2, 3 のアプローチ**. 作物研究. 2020;65:83-87.

80. イネ大事典. **(2) イネ属の染色体数とゲノム**, イネ大事典上巻, 2020, 上巻 p. 31-32

81. 鵜飼保雄. **遺伝的画一化と遺伝的脆弱性**, 植物育種学, 2003, p. 67

82. 西尾剛, 吉村淳. **倍数性育種と染色体操作**, 植物育種学 第 4 版, 2012, p. 138-147

謝辞

本研究は北海道大学大学院農学院　生物資源科学専攻　植物育種科学講座　植物育種学分野にて行われました．本博士論文の執筆にあたり，修士課程から述べ 5 年の間終始研究のご指導ご鞭撻を賜り，本論文を幾度に渡りご校閲頂きました同分野教授　貴島祐治博士に，心より感謝いたします．また，本論文のご校閲を頂きました同講座　植物遺伝資源学専門分野教授　金澤章博士に，厚く御礼申し上げます．植物育種学分野講師　高牟禮逸朗博士におかれましては，本論文のご校閲及び植物材料の栽培についてのご指導，並びに北海道の自然についての幅広い知識をご教示頂きました．深く感謝の意を申し上げます．また同分野助教　小出陽平博士におかれましては，研究への熱いご指導を頂き，研究への姿勢を学ばせて頂きました．厚く御礼申し上げます．本研究を遂行するにあたり，葯培養の手法をご指導いただきました酪農学園大学　農食環境学群　循環農学類准教授の岡本吉弘博士，倍数性解析のご指導を頂きました北海道大学　北方生物圏フィールド科学センター　生物生産研究農場教授　星野洋一郎博士，減数分裂の観察手法を懇切丁寧に教えていただき，OsCenH3 の抗体を分譲頂きました岡山大学　資源植物研究所　統合ゲノム育種グループ准教授　長岐清孝博士，並びに植物体の栽培と形質調査，画像解析，ゲノム解析等で多大なご支援を頂きました同グループ教授　山本敏夫博士，同グループ助教　古田智敬博士，本研究で用いた植物材料を頂くとともに，配偶体のゲノム解析において多大なるご支援を頂きました九州大学大学院　農学研究院　資源生物科学部門　農業生物科学講座教授　安井秀博士，同講座准教授　山形悦透博士に，深く御礼申し上げます．植物材料の PUSUR(2x，4x)及び DULAR(2x，4x)は，農業生物資源ジーンバンクの植物遺伝資源配布事業を介して本研究で用いられました．関係者の方々に，この場を借りて謹んで御礼申し上げます．

本研究の遂行にあたり，植物育種学研究室で同じ葯培養チームとして共に実験を行った金岡義高君，増田到君，石原萌さん，岸(島﨑)優樹君，Oscar Malumbe さん，Elias George Balimponya さん，北島克哉君，星咲良さんを始め，研究室の方々にはとてもお世話になりました．厚く御礼申し上げます．