

氏 名(本籍) 小 島 昭 夫

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 4 3 2 号

学位授与年月日 平 成 3 年 6 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 Quantitative and Analytical Study of  
Apomixis in Chinese Chive  
(ニラにおけるアポミクシスの定量的及  
び解析的研究)

論文審査委員(主 査) 教 授 日 向 康 吉  
教 授 齋 藤 隆  
教 授 菅 洋  
助教授 長 戸 康 郎

# 論文内容要旨

## 緒言

アポミクシス（無融合生殖）とは、複相の雌性配偶子が形成されかつそれが雄性配偶子と融合することなく胚発生を行う、という生殖様式であり、親の遺伝子型をそのまま次代に伝えるという特徴を持つ。この生殖様式を利用すれば、ヘテロシスを示す優良個体をその形質を分離させることなく種子の形で容易に増殖できる。自家不和合性や雄性不稔性を利用した育種法に比べて、ハイブリッド品種の育成および種子生産に要する労力を大幅に低減できると期待されている。

アポミクシスを制御する遺伝的要因及び環境要因についての研究は大変遅れており、そのことがアポミクシス利用育種法の確立を妨げている。殆どのアポミクトはある頻度で両性生殖も行う条件的アポミクトであり、従って遺伝的要因や環境要因を明らかにするためにはアポミクシスを定量的に研究する必要がある。しかし胚珠あたり通常ただ一つしかない胚嚢母細胞や胚嚢の内部で起こる現象を観察することには大きな困難が伴うため、従来のアポミクシス研究は定性的な記載にとどまるが多かった。

本研究は、重要な野菜を多く含むネギ属のニラ (*Allium tuberosum*) を材料として、そのアポミクシスの種々の量的側面を明らかにしたものである。まず第一章でニラがアポミクシスを行うことを確認した。次に第二章で総体としてのアポミクシスの頻度であるアポミクシス率を推定する方法を確立した。さらに、アポミクシスをその主要な構成要素に分析して研究するための指標、即ち複相胚嚢形成率と単為発生率を推定する手法を第三章と第四章でそれぞれ確立した。これら3つの手法を用いて中国、日本及び台湾から集めた6品種 (Table 1) について各章でそれぞれの量的指標の推定を実際に行った。また、第二章と第三章を通してアポミクシスの全過程を経時的に観察した。

Table 1. Source information of the cultivars used

Cultivar	$2n$	Origin	Source
Huhehaote	32	China	Osaka Gakuin Univ.
Manchuria	32	China	Watanabe Seed Co., Ltd.
Green-Belt	32	Japan	The Musashino Seed Co., Ltd.
Kaohsiung	32	Taiwan	The Musashino Seed Co., Ltd.
Flower-Pole	32	Taiwan	The Musashino Seed Co., Ltd.
Tender-Pole	32	Taiwan	Sakata Seed Co., Ltd.

## 第一章 未受精胚珠培養において認められたニラのアポミクシス性

ニラ（四倍性、 $2n=32$ ）は複相胚嚢を形成することが知られている。そのような胚嚢から単為発生により胚が形成されることを確かめるため、未受精胚珠の培養を行って四倍性植物体が得られるかどうか調べた。蕾培養（前培養）、未受精胚珠培養（本培養）、胚培養の3段階からなる培養法により、品種グリーンベルトに由来する系統MS-6の400胚珠から107個、品種フラワーポールの508胚珠から27個の植物体を得た。これらの合計134個体のうち132個体（98.5%）は四倍性で、残りの2個体のみが二倍性半数体であった（Figs. 1, 2, 3, Table 2）。一貫してホルモンフリー培地を用いたこと及びカルス形成が全く認められなかったことから、四倍性植物体がこのように高頻度で出現した原因を培養中の自然倍加に帰することは無理である。従って、これらの四倍性植物体は複相の胚嚢から単為発生により出現したものと考えられ、これによりアポミクシスを構成する2つの要素、即ち複相胚嚢形成と単為発生の両方の存在を確認することができた。

さらに、上記の二倍性半数体のうち1個体を四倍性品種と交配し、得られた次代6個体について染色体数を調べたところ、4個体が二倍性（ $2n=16$ ,  $2x$ ）であった。これらはもとの二倍性半数体からアポミクシスにより生じたものと考えられる。また、三倍性異数体（ $2n=26$ ,  $3x+2$ ）も1個体見いだされた。この個体は両性生殖により生じたものと考えられる。



Fig. 1. Embryo protruding from an unpollinated ovule cultured for 25 days following bud-preculture.



Fig. 2. Plantlet derived from an embryo cultured for five days following ovule culture.

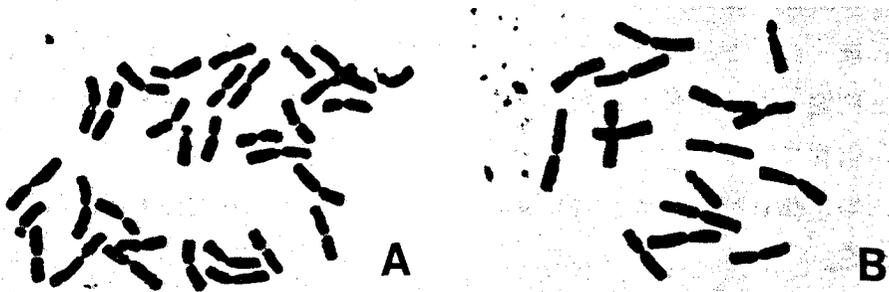


Fig. 3. Mitotic metaphase. x 1000. A: tetraploid MS-6 line ( $2n=32$ ). B: dihaploid GMD-1 ( $2n=16$ ).

Table 2. Frequency of dihaploid and tetraploid plantlets obtained through unpollinated ovule culture

Strain	No. of ovules cultured	No. (%) of embryos produced	No. (%) of plantlets obtained	
			Dihaploid	Tetraploid
Flower-Pole	508	57 (11.2)	1 (0.20)	26 (5.1)
MS-6	400	318 (79.5)	1 (0.25)	106 (26.5)

## 第二章 次代集団の電気泳動分析により推定したアポミクシス率

アポミクシス率は次代集団に占めるアポミクシス由来個体の割合として定義される。本研究ではアイソザイムの等電点電気泳動によって次代幼苗期に検定する方法を検討した。酵素種としては、バンド数が多く品種間差の認められたエステラーゼを選んだ。

6品種の間で10通りの交配を行って採種し、播種後2-4カ月の幼苗についてザイモグラムを調べたところ、いずれの組合せでも次代幼苗の90%以上が母親型のザイモグラムを示した(Fig. 4)。即ち、アポミクシス率はいずれの品種についても90%以上、特に品種HuhehaoteとManchuriaでは98-99%と推定された(Table 3)。

エステラーゼ分析に基づいた母親型及び雑種型個体の判定結果を吟味するため、花の外部形態で区別できる品種間での2組合せについてその次代集団の花の外部形態を観察した。エステラーゼ分析により母親型と判定された個体は外花被片長及び開花期について母親品種と同様の分布を示した。一方、雑種型と判定された個体は両親の中間の位置に分布し、エステラーゼによる検定法が信頼できるものであることを裏付けた(Fig. 5)。

また、染色体観察により、1016個体の実生から6個体の二倍性半数体が見いだされた。

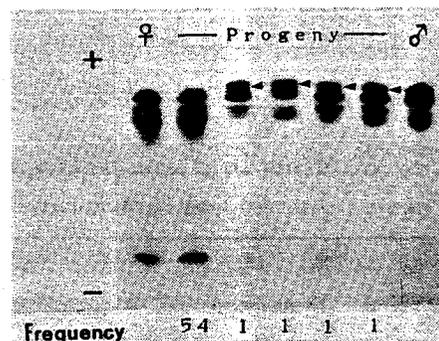


Fig 4. Esterase zymograms in the cross-progeny from Flower-Pole (♀) x Huhehaote (♂). Of 58 seedlings, 54 showed the maternal zymogram. The remaining four showed hybrid zymograms having the strong Band 1 (arrowhead), which was characteristic of the staminate parent.

Table 3. Number of seedlings showing maternal or hybrid esterase (EST) zymogram in progeny obtained from cross-pollination, and the degree of apomixis

Pistillate parent	Staminate parent	Month of poll.	EST zymogram		Degree of apomixis (%)
			Maternal	Hybrid	
Huhehaote	Flower-Pole	June	86	2	98
	Tender-Pole	June	90	1	99
Manchuria	Tender-Pole	July	59	1	98
Green-Belt	Kaohsiung	August	81	3	96
Kaohsiung	Huhehaote	June	81	9	90
	Green-Belt	August	63	1	98
	Tender-Pole	August	68	2	97
Flower-Pole	Huhehaote	June	54	4	93
Tender-Pole	Huhehaote	June	52	2	96
	Manchuria	July	55	3	95

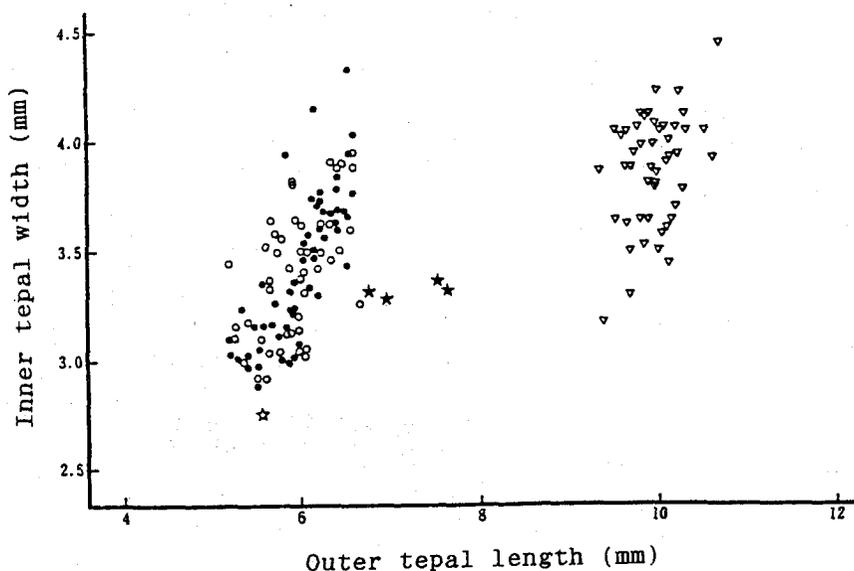


Fig. 5. Scatter diagram of inner tepal width and outer tepal length of the cross-progeny from Flower-Pole x Huhehaote (● and ★), and of the self-progenies of Flower-Pole (○ and ☆) and Huhehaote (▽). ●, ○ and ▽, plant showing maternal esterase zymogram; ★, plant showing hybrid one; ☆, plant showing non-maternal one.

### 第三章 胚嚢母細胞減数分裂の細胞学的分析により推定した複相胚嚢形成率

複相胚嚢形成率は、複相の胚嚢もしくは大胞子を持つ胚珠の割合として定義される。これは胚嚢母細胞の減数分裂を観察することにより求められるが、効率的に検定するためには減数第一分裂中期にある胚嚢母細胞のみを的確にとらえる必要がある。従来のパラフィン切片法や押しつぶし法では、プレパラートが出来上がるまで胚嚢母細胞のステージを知ることができないので、多大の労力を要した。

本研究ではこれに替わる手法として、透明化-染色-押しつぶし法を考案した。この方法はノマルスキ微分干渉顕微鏡下での胚嚢母細胞の予備観察を従来の押しつぶし法に組み合わせたものである。即ち、透明化处理した胚珠をノマルスキ微分干渉顕微鏡下で観察し、第一中期の胚嚢母細胞を持つ胚珠を選び出した (Fig. 6A)。選んだ胚珠を酢酸カーミンで染色し、押しつぶしたところ、観察に適した第一中期像を確実に得ることができた (Figs. 6B, 7)。

この透明化-染色-押しつぶし法を用いて6品種の複相胚嚢形成率を調べたところ、最高はHuhehaote 及びManchuria の98%、最低はKaohsiung の76%で、比較的大きな品種間差のあることが明らかとなった (Table 4)。低頻度ではあるが通常の減数分裂を行う胚嚢母細胞の存在も確認された (Fig. 7)。

複相胚嚢形成の機構を知るため、減数分裂の全過程を同法により観察した。その結果、減数分裂直前もしくは第一分裂前期の極めて早い時期の染色体核内倍加により  $4n$  の胚嚢母細胞が生じ、第一中期に  $2n$  組の二価染色体が形成され (Fig. 6B)、その後の減数分裂により  $2n$  即ち複相の大胞子、次いで複相の胚嚢が形成されることが明かとなった。このような二価染色体は遺伝的に全く等価の姉妹染色体間の対合によって形成されると考えられるので、キアズマ形成が遺伝的組替えをもたらすことがない。従って、他の多くのアポミクトと同様、ニラにおいても母親の体細胞と全く同じ遺伝組成を持つ卵細胞が生ずるものと考えられる。

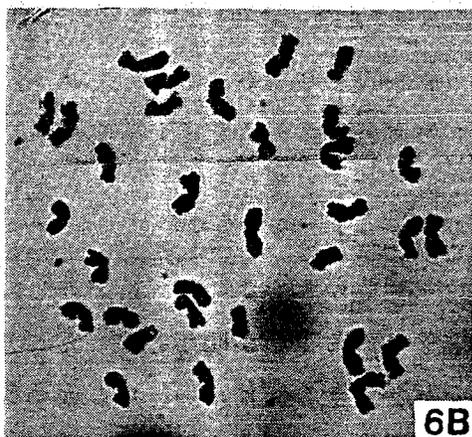


Fig. 6. Endoreduplicated  $4n$  embryonic sac mother cell (EMC) at first metaphase.  $\times 500$ . EMC in a cleared ovule was observed with Nomarski DIC optics (A). Subsequently, the EMC was stained and squashed (B). The  $2n$  number of bivalents ( $32_{II}$ ) are shown in B.



Fig. 7. Normal  $2n$  EMC at first metaphase.  $2_{II}+7_{IV}$ .  $\times 500$ .

Table 4. Degree of diplospory

Cultivar	No. of EMCs		Degree of diplospory (%)
	$2n$	$4n$	
Huhehaote	1	49	98
Manchuria	1	49	98
Green-Belt	7	43	86
Kaohsiung	12	38	76
Flower-Pole	11	39	78
Tender-Pole	10	40	80

#### 第四章 胚発生過程の分析により推定した単為発生率

授粉花と無授粉花のそれぞれから胚珠を切り出して透明化处理し、ノマルスキ微分干渉顕微鏡下で胚発生を観察して比較した。授粉花と無授粉花の間で胚の頻度と発生の過程に殆ど違いがなかった(Tables 5, 6)。授粉花と無授粉花における胚をFig. 8とFig. 9にそれぞれ例示した。また、透明化—染色—押しつぶし法による観察から、発生開始の時期が花粉管からの精核放出以前であることが明かとなった(Fig. 10)。従って、ニラの単為発生は花粉の影響を全く受けない極めて自律的なものであると考えられ、無授粉花における胚発生の頻度を調べることにより単為発生率を推定できることが分かった。

今まで単為発生を定量的に研究した例がほとんどなく、単為発生率の定義はなかった。本研究では単為発生率を、自発的に分裂を開始する卵細胞を持つ胚珠の割合、と定義した。

上記の方法により6品種について推定した単為発生率は、いずれの品種でも第三章で求めた複相胚嚢形成率にほぼ等しい、高い値となった(Table 7)。従って、複相卵細胞の殆ど全てが単為発生能を持つと考えられた。

品種間交配(Kaohsiung x Huhehaote)により得た種子を発芽させ、胚と胚乳とを分けて取り出し、エステラーゼの等電点電気泳動像を調べたところ、胚は母親型であったが胚乳は雑種型を示した。このことから、胚乳形成は自律的なものではなく極核の受精を必要とするものであることが分かった。即ち、ニラが偽受精を要するアポミクトであることが明らかになった。

なお、反足細胞に由来する胚が、授粉、無授粉にかかわらず卵細胞由来の胚とほぼ等しい頻度で観察された。また、珠皮に由来する胚も希に生じた。

Table 5. Frequency of the number of cells in egg-embryos in 50 ovules in Tender-Pole flowers self-pollinated three days after anthesis

Days post-anthesis	No. of cells in egg-embryo							Mean <sup>2)</sup>
	0 <sup>1)</sup>	1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	
4	3	8	11	20	8			4.1
5	8	2	1	3	22	12	2	9.3
6	12	4	1		2	18	13	17.0

1) Ovules in which neither egg cell nor egg-embryo was seen. 2) Calculated for embryos comprising two or more cells.

Table 6. Frequency of the number of cells in egg-embryos in 50 ovules in unpollinated Tender-Pole flowers

Days post-anthesis	No. of cells in egg-embryo							Mean <sup>2)</sup>
	0 <sup>1)</sup>	1	2	3-4	5-8	9-16	17-32	
1	4	42	4					
2	4	30	12	4				
3	8	5	24	12	1			2.7
4	6	9	7	24	4			3.7
5	6	2	2	13	21	6		6.8
6	11	2	2	2	9	23	1	11.5

1) Ovules in which neither egg cell nor egg-embryo was seen. 2) Calculated for embryos comprising two or more cells.

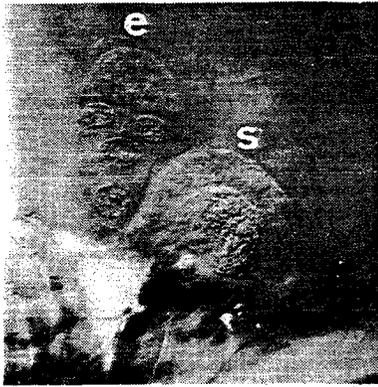


Fig. 8. Egg-embryo (e) in pollinated flower. Four days after anthesis. s, synergid. x 250.



Fig. 9. Egg-embryo (e) in unpollinated flower. Six days after anthesis. x 250.

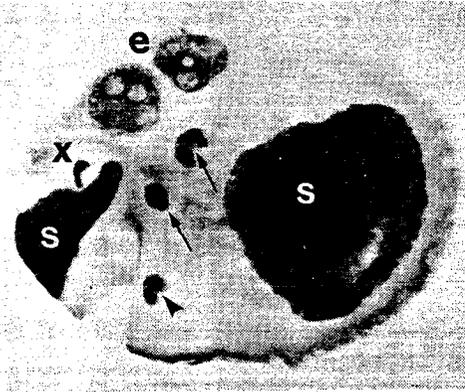


Fig. 10. Discharged sperm nuclei (arrows) unable to be fertilized with egg cell due to precocious embryogenesis. Four days after anthesis. One day after pollination. Arrowhead, vegetative nucleus; e, egg-embryo, 2-celled; s, synergid; x, x-body. x 250.

Table 7. Degree of parthenogenesis<sup>1)</sup>

Cultivar	No. of ovules containing egg-embryo	Degree of parthenogenesis (%)
Huhehaote	47	94
Manchuria	47	94
Green-Belt	43	86
Kaohsiung	31	62
Flower-Pole	42	84
Tender-Pole	42	84

<sup>1)</sup>Based on the observation of 50 day-5 ovules in unpollinated flowers of each cultivar.

## 結語

アポミクシスは胚珠内で生起する現象であるため、従来は主にパラフィン切片法による観察が行われてきた。しかしこの方法は多大の労力を要する。アポミクシスの量的側面を理解するためにはより効率的な観察手法の開発が不可欠である。本研究はアポミクシス性を評価するための3つの手法、即ち、次代検定、細胞学的観察及び発生学的観察について効率的な方法をそれぞれ確立し、ニラにおけるアポミクシスの全過程を経時的かつ定量的に観察した。

さらにこれらの手法を用いてアポミクシス性の3つの量的指標を推定し、6品種の間でアポミクシス率が90-99%、複相胚嚢形成率が76-98%、そして単為発生率が62-94%に変異することを認めた。100%近いアポミクシス率を持つ品種が見いだされたことは、ネギ属作物におけるアポミクシス利用育種の素材としてニラが有望であることを示す。また第一章で確立した未受精胚珠培養法は、種間交配後の胚珠の培養に応用すれば、アポミクシス性の他種への導入にも役立つものと期待される。

現在までに知られているアポミクトの殆どは四倍体などの倍数体であり、このことがアポミクシスの研究、特に遺伝様式の解明を困難にしているもう一つの大きな要因である。しかし本研究のなかで、ニラでは未受精胚珠培養や実生からの選抜により二倍性半数体の得られることが分かった。さらに、二倍体にもアポミクシス及び両性生殖の両方の存在することが示された。これらのことから、ニラは二倍体(2x)レベルでアポミクシスの遺伝様式解明の研究を行える極めて有望な研究素材であることを指摘した。

## 審査結果の要旨

アポミクシスとは、複相の雌性配偶子が形成され、それが雄性配偶子と融合することなく胚発生をする生殖様式である。この生殖様式を利用すればヘテロシスを示す優良個体を種子の形で増殖できるので、育種への利用価値が高い。しかし、この性質は胚珠にただ一つしかない胚嚢母細胞や胚嚢の中で起こる現象であるため、従来のアポミクシスの研究は定性的な記載にとどまり、育種に利用された例は多くない。本研究はアポミクシスの種々の定量的形質の測定法を考案し、ネギ属のニラ (Allium tuberosum) を材料にして、そのアポミクシスの定量的側面を明らかにしたものである。

第1章では、未受精胚珠の培養を行って、四倍性植物体が高頻度に得られることを示し、その複相胚嚢から単為発生によって胚が形成されることを確証した。

第2章では、アイソザイム分析に注目し、次代植物集団に母親型の植物が出現する「アポミクシス率」を推定した。6品種の間で10通りの交配を行い調査した結果、いずれの品種でも90%以上のアポミクシス率を示すことがわかった。

第3章では、胚嚢母細胞の減数分裂を細胞学的に容易に観察する方法を考案し、その方法を使って「複相胚嚢形成率」を推定した。従来このような観察は専らパラフィン切片法でしか観察できず、多大の労力を要するために、少数例でしかデータが得られていなかった。本実験では透明化—染色—押しつぶし法を用いて、ノマルスキ微分干渉顕微鏡下で予備観察を行い、観察に適した時期の胚嚢だけを選び出して詳細な観察を行うものである。この方法を適用することによって、まず胚嚢母細胞の減数分裂の全過程を明らかにして、減数分裂直前もしくは第一分裂前期のきわめて早い時期に  $4n$  の胚嚢母細胞が生じることを示した。そして、複相胚嚢形成率は品種によって98%から76%まで大幅に変異し、アポミクシス率に比べて大きく変異することを明らかにした。

第4章では、胚の発生頻度を計測し、「単為発生率」を求めた。受粉した花と無受粉の花の間で、単為発生率に殆ど差が無いことを示し、ニラの単為発生は花粉の影響を受けない、自立的なものであることを明らかにした。

以上本論文は、これまでに殆ど検討されなかったアポミクシスの量的な側面をニラを材料にして明らかにしたものであり、農学の研究に大きな貢献をしたものである。よって本論文は農学博士を授与するに値するものと判断した。