

学位論文要旨	
氏名	八幡昌紀
題目	半数体ブンタンの形態的特徴とその生殖機能に関する研究 (Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and its reproductive function)
<p>半数体は、その染色体を倍加することによって容易に純系個体を得られることから遺伝解析や計画的育種を行う上で極めて有用である。Toolapongら(1996)は、ブンタン品種である‘晩白柚’(<i>Citrus grandis</i> Osbeck)から雌性配偶子由来の半数体を獲得した。この半数体は旺盛な成長を示し、発芽7年以降に初めて開花結実した。そこで本研究では、半数体ブンタンにおける形態的特徴と生殖機能について調査した。</p> <p>半数体の形態的特徴について調査した結果、半数体の葉、花、花粉および果実は、‘晩白柚’と比較して有意に小さかった。また、半数体の花粉稔性は、‘晩白柚’と比較して著しく低かったが、わずかながらに稔性が認められた。</p> <p>次に、半数体と種々の二倍体カンキツ単胚性品種との交雑を行った結果、半数体を種子親とした場合では全く着果しなかったが、半数体を花粉親とした場合、4つの交雑組合せで完全種子が得られた。これらの完全種子は正常に発芽し、多くの二倍体の雑種実生が得られた。このことから半数体では正常な花粉(<math>n=9</math>)が形成されていることが明らかとなった。</p> <p>さらに、半数体の雄性配偶子の稔性回復機構や雌性配偶子の形成過程について調査した。雄性配偶子の形成過程において、半数体は第一分裂と第二分裂を行っていたものの、ほとんどの分裂細胞で異常が観察された。一部の分裂細胞では、第一分裂後期においていくつかの二価染色体が両極に分配されず、赤道面付近に残るものや周りの細胞が第二減数分裂過程にもかかわらず、赤道面に9個の二価染色体が並列し、両極に分裂するものが観察された。その結果、花粉四分子期において、‘晩白柚’では99.3%が四分子であったのに対し、半数体では二分子が24.7%と、非常に高い頻度で出現していた。これらの結果は半数体の花粉が第一分裂復旧のような異常によって稔性が回復していることを示唆した。一方、半数体の雌性器官では、雌ずいの中心部で花柱溝同士が癒合しており、花粉管の伸長が阻害されていた。また、雌性配偶子形成では、胚のう母細胞が全く形成されず、いずれの時期においても正常に発達した胚のうは観察されなかった。</p> <p>最後に、半数体の倍加系統を作出するために、新梢の腋芽へのコルヒチン処理を行った。処理された新梢の腋芽から多くの細胞キメラが発生したものの、二倍体と四倍体の細胞キメラをカラタチ台に一芽接ぎしたところ、18本の染色体数を有する倍加半数体を獲得することができた。</p> <p>以上より、本研究では半数体ブンタンにおける形態的特徴や生殖機能に関する基礎的情報を得ることができた。また、倍加半数体はカンキツ類における遺伝解析や計画的育種を進めていく上で極めて重要な素材となるだろう。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Masaki Yahata
題 目	Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and its reproductive function (半数体ブンタンの形態的特徴とその生殖機能に関する研究)
<p>Haploid plants are of great value in plant breeding because they afford the opportunity to establish homozygous plants by doubling of their chromosomes. These plants are very useful materials for genetic analysis of useful traits and strategic breeding. Toolapong et al. (1996) selected a haploid plant derived from a female gamete of the 'Banpeiyu' pummelo (<i>Citrus grandis</i> Osbeck). This haploid pummelo showed vigorous growth and flowered for the first time seven years after germination. The objectives of the present study were to investigate the morphological characteristics, and to evaluate the reproductive potential of female and male gametes in the haploid pummelo.</p> <p>Leaves, flowers, pollen grains, and fruits of the haploid pummelo were significantly smaller than those of the 'Banpeiyu' pummelo. Although the haploid pummelo showed remarkably reduced pollen fertility compared with the 'Banpeiyu' pummelo, it produced slightly fertile pollen grains.</p> <p>Reciprocal crosses between the haploid pummelo and several diploid citrus cultivars were performed. In the crosses with diploid cultivars as pollen parents, no fruit set of the haploid pummelo was observed. However, developed seeds were obtained in four cross combinations in which monoembryonic diploid cultivars were pollinated with pollen of the haploid pummelo. These developed seeds germinated normally, and many diploid hybrid seedlings were obtained. These results suggest that the haploid pummelo could produce fertile pollen grains (<math>n=9</math>).</p> <p>The mechanisms of fertility restitution in male gamete and the process of female gamete formation in the haploid pummelo were examined. Although meiotic division occurred twice in the haploid pummelo, abnormal division was observed in most dividing cells. In some dividing cells, all the univalent chromosomes remained near the equatorial plate without distributing to either site of the poles at anaphase I. In some other dividing cells, 9 univalents ranged on the equatorial plate, and showed mitotic division to segregate each set of chromosomes into the direction of opposite poles during second meiosis. Consequently, at the tetrad stage, the haploid pummelo had a high frequency of dyad at 24.7%, whereas 'Banpeiyu' pummelo had normal tetrad at 99.3%. These results suggest that the production of fertile pollen grains would be caused by abnormalities in the first meiotic division such as the first division restitution (FDR). In the female organ of the haploid pummelo, elongation of the pollen tube was prevented by the adhesion of the stylar canals in the pistil. Moreover, no embryo sac mother cell was formed in the ovules, and consequently a normal embryo sac was not produced at all.</p> <p>To produce the homozygous strain, colchicine treatment was carried out on axillary buds of current shoot of the haploid pummelo. Although numerous shoots with cytochimeras arose from colchicine-treated axillary buds, a doubled haploid with 18 chromosomes was obtained from the cytochimera when cytochimeric buds of <math>2X+4X</math> were bud-grafted onto a trifoliate orange.</p> <p>In the present study, morphological characteristics and reproductive potential in the haploid pummelo were revealed. In the future, the doubled haploid will be an important material for genetic analysis and strategic breeding.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	八幡 昌紀
審査委員	主査 宮崎大学 教授 山下 研介
	副査 宮崎大学 助教授 國武 久登
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 純夫
	副査 佐賀大学 教授 田代 洋丞
	副査 宮崎大学 教授 藪谷 勤
審査協力者	
題目	半数体ブンタンの形態的特徴とその生殖機能に関する研究 (Studies on morphological characterization of a haploid pummelo and its reproductive function)
<p>半数体は、その染色体を倍加することによって容易に純系個体が得られることから遺伝解析や計画的育種を行う上で極めて有用である。本研究は、‘晩白柚’ (<i>Citrus grandis</i> Osbeck) 雌性配偶子由来の半数体が発芽7年目に初めて開花結実したことを受け、その形態的特徴と生殖機能性を調査し、コルヒチン処理によって倍加半数体を作成して、カンキツ類の遺伝・育種に新たな局面を切り拓かんとしたものである。研究成果の概要は以下のとおりである。</p> <p>1) 半数体の形態的特徴について調査した結果、半数体の葉、花、花粉および果実は、‘晩白柚’と比較して有意に小さかった。また、半数体の花粉稔性は、‘晩白柚’と比較して著しく低かったが、わずかながらに稔性が認められた。</p> <p>2) 半数体と種々の二倍体カンキツ単胚性品種との交雑を行った結果、半数体を種子親とした場合では全く着果しなかったが、半数体を花粉親とした場合、4つの交雑組合せで完全種子が得られた。これらの完全種子は正常に発芽し、多くの二倍体の雑種実生が得られた。このことから半数体では正常な花粉 (<math>n=9</math>) が形成されていること</p>	

が明らかとなった。

3) 半数体の雄性配偶子の稔性回復機構や雌性配偶子の形成過程について調査した。雄性配偶子の形成過程において、半数体は第一分裂と第二分裂を行っていたものの、ほとんどの分裂細胞で異常が観察された。一部の分裂細胞では、第一分裂後期においていくつかの一価染色体が両極に分配されず、赤道面付近に残るものや周りの細胞が第二減数分裂過程にもかかわらず、赤道面に9個の一価染色体が並列し、両極に分裂するものが観察された。その結果、花粉四分子期において、‘晩白柚’では99.3%が四分子であったのに対し、半数体では二分子が24.7%と、非常に高い頻度で出現していた。これらの結果は半数体の花粉が第一分裂復旧のような異常によって稔性が回復していることを示唆した。一方、半数体の雌性器官では、雌ずいの中心部で花柱溝同士が癒合しており、花粉管の伸長が阻害されていた。また、雌性配偶子形成では、胚のう母細胞が全く形成されず、いずれの時期においても正常に発達した胚のうは観察されなかった。

4) 半数体の倍加系統を作出するために、新梢の腋芽へのコルヒチン処理を行った。処理された新梢の腋芽から多くの細胞キメラが発生したものの、二倍体と四倍体の細胞キメラをカラタチ台に一芽接ぎしたところ、18本の染色体数を有する倍加半数体を獲得することができた。

半数体カンキツの開花と結果は、それ自体が世界的なトピックスと言えるが、本研究は、半数体晩白柚の形態的特徴と生殖機能について基礎的な調査・研究を行うと共に、その倍加半数体を作出して、カンキツ類の遺伝・育種の研究に有用な多くの知見を得ている。したがって、本論文は学位論文として十分な価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	八幡 昌紀
審査委員	主査 宮崎大学 教授 山下 研介
	副査 宮崎大学 助教授 國武 久登
	副査 鹿児島大学 教授 岩井 純夫
	副査 佐賀大学 教授 田代 洋丞
	副査 宮崎大学 教授 藪谷 勤
審査協力者	
実施年月日	平成18年 1月 7日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">口答・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成18年1月7日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連の事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑・応答がなされ、いずれも満足のいく回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

八幡 昌紀

[質問1] この半数体ブンタンの発生頻度はどのくらいだったのか。

[回答1] この半数体ブンタンは‘晩白柚’を種子親として‘ルビーレッド’グレープフルーツを交雑して得られた約 2000 個の種子から小粒種子を選抜して三倍体を獲得する過程で 1 個体が得られており、非常に低いものである。

[質問2] カンキツ類の半数体の作出効率を向上させる方法についてどのように考えているか。

[回答2] 半数体の作出効率を格段に向上させるのは難しいと思われるが、偽受精胚珠培養などを改良することによって向上できるのではないかとと思われる。

[質問3] 半数体ブンタンの稔性花粉の直径がその起源親である‘晩白柚’のそれと比較して大きくなっていったが、それらの花粉の倍数性はデータからすると二倍性ではなく半数性と考えられる。なぜ花粉の大きさに違いがでるのか。

[回答3] 調査した半数体が 1 個体であり、その理由をはっきりしていないが、遺伝子型(個々の半数体での違い)、異常な減数分裂過程、樹体の栄養状態などが影響しているのではないかと考えている。今後の検討課題としたい。

[質問4] 半数体ブンタンの稔性花粉が‘晩白柚’より大きくなっているのにたいへん興味を持った。半数体ブンタンの稔性花粉だけを拾い上げて、フローサイトメーターによる倍数性解析はできないか。

[回答4] カンキツ類における花粉のフローサイトメーター解析は技術的に難しく、ブンタン半数体の個々の稔性花粉の倍数性は不明である。

[質問5] 半数体ブンタンにおいて花柱内の花粉管伸長の状態を観察された時、その花粉親として‘ハッサク’を使用されているが、なぜこの品種を使用したのか。また、‘晩白柚’と‘ハッサク’の間には交雑不和合性はないのか。

[回答5] ‘ハッサク’は非常に高い稔性を有することから本実験の花粉親として供試した。また、‘晩白柚’と‘ハッサク’の間の交雑不和合性の有無については、実際にその 2 品種間で交雑を行い、多数の完全種子が得られたことからないものと思われる。

〔質問6〕半数体ブンタンの雌性不稔の原因として、雌ずい中の花柱の異常と胚のう母細胞の無形成によることをあげている。花粉側では減数分裂が観察され、しかも1.6%の稔性も認められているのに、何故雌ずい側では減数分裂すら行われぬのか。

〔回答6〕胚のう母細胞ができる以前の組織に異常があるものと推察されるが、本研究ではそこまで観察していない。しかしながら、雌ずい側で何故減数分裂すら行われぬのかについては非常に興味があり、今後検討していきたいと思う。

〔質問7〕半数体ブンタンの果実は単為結果性のものが1果だけ着果したようであるが、その原因は何か考えられるか。

〔回答7〕おそらく樹体が安定してきて着果したものと思われる。また、その1年後に着果しなかったのは前年に果実を着けたために、樹自体が弱ったものと推察される。この理由として、半数体ブンタンは他のカンキツ品種と比較して、樹勢が弱いためと考えられる。

〔質問8〕半数体の作出効率を上げることが今後の課題と言われたが、倍加半数体の作出効率も低い。倍加半数体の作出方法についても検討する余地があるのではないか。

〔回答8〕半数体ブンタンからコルヒチン処理により得られた倍加半数体は1個体である。今後、倍加半数体の作出頻度を上げる手法について検討したい。

〔質問9〕ほとんどのデータは統計処理されているが、供試数や標準誤差があるとデータにさらに信頼性がでてくるので、できるだけ加えていただきたい。

〔回答9〕再度全データを見直して、修正していく。

〔質問10〕半数体ブンタン果実の商品的な価値をどう考えるか。

〔回答10〕半数体ブンタンは、皮が厚いことや糖度が高いことなど、興味ある形質もあるが、着果が悪いことや果実が小さいことなど商品としては致命的な問題もあり、困難であると思われる。