

雄性不稔スギ新大1号・新大5号の小孢子形成過程における形態学的特性

二村典宏・古川原聡（森林総研）・斎藤真己（富山県森林研）・樋口有未（元新潟県森林研）・渡部公一（山形県森林研）・篠原健司（森林総研）

要旨: 雄性不稔スギ新大1号と新大5号の不稔性はそれぞれ異なる一対の核内劣性遺伝子に由来する形質である。どちらも小孢子形成過程において核の消失や小孢子同士の癒着や塊状化、小孢子の変形が認められるとの報告がある。本研究では、雄性不稔スギ新大1号と新大5号の小孢子形成過程における異常発生の様態を明らかにするために、それぞれ小孢子嚢内の細胞（小孢子）の密度変化と小孢子的外壁発達に着目して形態学的特性を調べた。野生型の正常個体と比較して、新大1号では小孢子数が多く、且つ小孢子嚢面積の拡大が抑制されるために花粉母細胞期から小孢子期にかけて小孢子密度が異常に高くなることが分かった。その結果、小孢子は小孢子嚢内で互いに押し潰し合って圧縮変形した。新大5号では四分子から遊離した後の小孢子的外壁内層が正常個体よりも薄く、ラメラ構造の数も少なかった。四分子から遊離した小孢子は内部から崩壊した。小孢子的外壁発達はタペート組織からの物質供給に依存しているが、新大5号ではこの過程に異常が生じている可能性が考えられる。
キーワード: スギ, 雄性不稔, 花粉, 小孢子形成, タペート組織

Abstract: Male-sterility of Shindai 1 and Shindai 5, male-sterile trees of *Cryptomeria japonica*, is controlled by different nuclear recessive genes, respectively. It has been reported that both types showed agglomeration of microspores accompanied with deformation, and often nuclear atrophy. In this study, we investigated morphological traits of microsporangia and microspore to collect details of maldevelopment in microsporogenesis. In comparison with fertile wild-type, Shindai 1 generated more numbers of microspore and showed less expansion of microsporangia, resulting in abnormally high density of microspores. Then, they crushed one another and are subjected to compressive deformation. In Shindai 5, microspores liberated from tetrads had thinner endexine and less numbers of lamellae than that in fertile wild-type. Furthermore, ruptures of microspores were observed after liberation from tetrads. Development of microspore exine depends on materials derived from tapetum, the process of which is possible to have disorder in Shindai 5.

Keywords: *Cryptomeria japonica*, male-sterility, pollen, microsporogenesis, tapetum

I はじめに

近年、スギ花粉症患者の増加が社会問題化している中で、花粉の飛散量を減少させるための花粉発生源対策が重要な課題となっている。主要な取り組みとして少花粉スギや無花粉スギの導入が検討されており、雄性不稔個体の探索と選抜が各地で進められている(3)。これと同時に、既に選抜された個体について、雄性不稔の発現様式や原因遺伝子を明らかにすることが新たな個体の選抜や品種管理、また交配を計画的に進める上で重要である。

雄性不稔スギの新大1号と新大5号では、富山不稔1号を含めた交配実験の結果から、それぞれ異なる一対の核内劣性遺伝子が雄性不稔形質を支配していることが分かっ

ている(4)。光学顕微鏡による観察では、どちらの個体においても四分子期までの花粉の発達に正常個体との明確な差は認められないが、四分子から遊離した後では小孢子的成熟過程に異常が発生すると報告されている(4)。新大1号では、一核期の小孢子同士が癒着し、また核が消失した様子が観察されている。新大5号においても、核の消失した小孢子が部分的に存在し、正常個体と比較して小さな小孢子が観察されている(4)。新大1号、5号ともに花粉飛散期には小孢子的癒着が進行して塊状化することが分かっている(4)。本研究では、新大1号と新大5号の小孢子形成過程における異常発生の様式を詳しく調べるために、それぞれ小孢子嚢内の小孢子的密度変化と小

Norihiro FUTAMURA, Satoshi KOGAWARA (For. Forest Prod. Res. Inst., Ibaraki 305-8687, Japan), Maki SAITO (Toyama Pref. Agricultural, Forestry & Fisheries Res. Center, Toyama 930-1362, Japan), Yumi HIGUCHI (Niigata Pref. For. Res. Inst. Niigata 958-0264, Japan), Koichi WATANABE (Yamagata Pref. For. Res. Instruction Center, Yamagata 991-0041, Japan), Tsuyoshi E. MARUYAMA, Kenji SHINOHARA (For. Forest Prod. Res. Inst.) Morphological characteristics of pollen grains in Shindai 1 and Shindai 5, male-sterile trees of *Cryptomeria japonica* during microsporogenesis

胞子の外壁発達に着目して形態学的特性を調べた。

II 材料と方法

新大1号は戻し交配苗(3年生)の雄性不稔個体と正常個体、新大5号はF₁苗同士の交配によってできたF₂苗(3年生)の不稔個体を材料とした。花芽形成を促進させるために7月末に100 ppmのジベレリン(GA₃)水溶液を散布した。雄花分化初期の8月中旬から成熟花粉を形成する11月中旬にかけて、1週間ごとに雄花を採取した。雄性不稔個体と正常個体の雄花の一部はFAA(エタノール50%, 酢酸5%, ホルマリン10%)で固定した。固定したサンプルは、エタノール上昇系列で脱水後パラフィン包埋し、マイクロトームで厚さ約6 μmの切片を作成した。キシレン・エタノール下降系列で切片を脱パラフィンし、ヘマトキシリン及びエオジンで染色した後、デジタルマイクロスコープ(KH-7700, ハイロックス)で切片を観察した。新大1号の雄性不稔個体と正常個体について、小孢子囊の横断面内にある細胞数を計測し、またデジタルマイクロスコープ付属のソフトウェア(Ver. 2.00)を用いて小孢子囊の横断面積を測定した。発達段階(花粉母細胞期, 減数分裂期, 小孢子前期, 小孢子後期)ごとに30断面を測定の対象とした。別の一部の雄花は透過型電子顕微鏡(TEM)(JEM-1200EX, 日本電子)による観察用に固定した。細切りにした雄花の切片を固定液(4%パラホルムアルデヒド, 2%グルタルアルデヒド, 0.05 M カゴシル酸緩衝液: pH7.4)に浸し、4°Cで一晩保存した。固定したサンプルは、エタノール上昇系列で脱水後にエポキシ樹脂で包埋し、ウルトラマイクロトームで作成した厚さ約1.5 μmの切片を1%トルイジンブルーで染色した。さらにウルトラマイクロトームで処理して厚さ約70 nmの超薄切片を作成し、これを2%酢酸ウラニル水溶液と鉛染色液によって電子染色した後、カーボン真空蒸着によりコーティングしてからTEM観察に用いた。

III 結果と考察

正常個体では、花粉母細胞期から減数分裂期にかけて細胞数がほぼ一定のまま小孢子囊が拡大することによって細胞密度が減少した(図-1)。同様に新大1号でも小孢子囊内の細胞密度が減少したが、小孢子囊の拡大が比較的小さいために正常個体よりも減数分裂期の細胞密度は高かった(図-1)。この後、減数分裂期から四分子期を経て小孢子期に至るまでに、正常個体では葯室内の細胞密度が1000-2000個/mm²の範囲で推移したのに対して、新大1号では5000個/mm²まで急激に上昇した(図-1)。この差は、新大1号において正常個体よりも細胞数の増加が大きく、また小孢子囊の拡大が抑制された結果であった。小孢子期

の新大1号では小孢子が小孢子囊内に充填された状態になり、小孢子同士が密着して変形する様子が観察された(図-2, 図-3B)。新大1号と同様に小孢子的数が異常に増加するシロイヌナズナ突然変異体として*ems1*が報告されている(5)。しかし、*ems1*ではタペート組織が発達しないのに対し、新大1号ではタペート組織が正常に発達する。また*ems1*の小孢子囊は野生型と同様に拡大する。このことから、新大1号と*ems1*では異なる機構で雄性不稔が発現していると考えられる。新大1号では、小孢子囊を取り囲む側壁細胞層のうち、タペート組織以外の中間層や内被に異常が発生して垂層分裂が停止するために小孢子囊が拡大しないと推測される。

四分子から遊離した小孢子的外壁構造をTEMによって観察したところ、新大5号の外壁内層は正常個体のそれよりも薄く、ラメラ構造の発達が抑制されていた(図-3C, 図-4)。雄性不稔すぎ新大11号、新大12号についても小孢子的外壁内層の発達異常が報告されているが、これらは四分子期に発生し、また小孢子的遊離が起きない現象を伴う

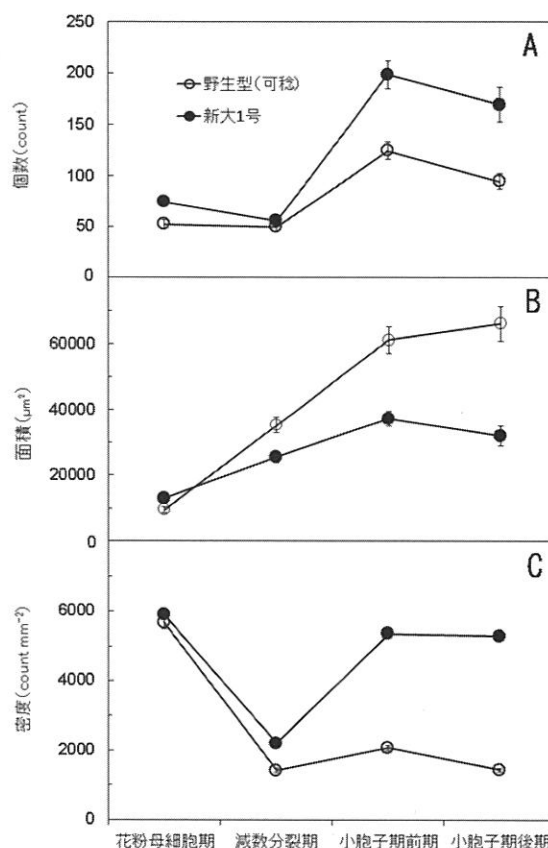


図-1. 新大1号の小孢子囊内の細胞密度

Fig.1 Cell density in microsporangia of Shindai 1

(A) 小孢子囊内の細胞個数 (B) 小孢子囊の断面積 (C) 小孢子囊内の細胞密度。値は平均値 (N=30), 誤差棒は標準誤差。Cでは誤差棒がマーカーのサイズより小さい。

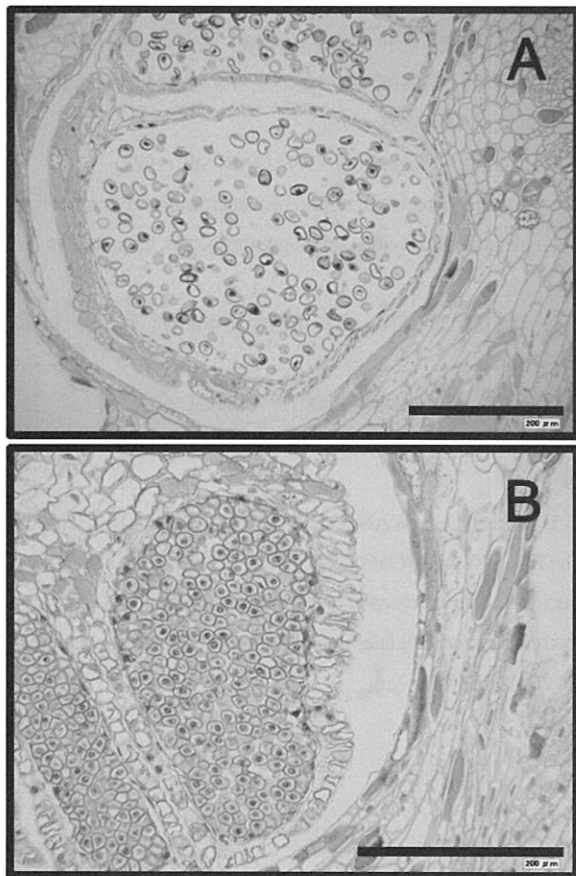


図-2. 小孢子期後期の新大1号における細胞の密集
 Fig.2 Agglomerated microspores in microsporangia of Shindai 1
 (A) 野生型(可稔), (B) 新大1号, スケールバーは200μm

ことが分かっている (1)。

小孢子的発達過程においてタペト組織はスピロポレンなどの様々な外壁構成成分を供給する役割を担っている (2)。新大5号では、小孢子が四分子から遊離した後、タペト組織に異常が発生している可能性がある。

IV おわりに

花粉飛散期になると新大1号と新大5号のどちらにおいても小孢子同士が癒着して塊状化すると報告があるが、その最終状態に至るまでの過程ではそれぞれ異なる要因で小孢子的発達異常が引き起こされることが示唆された。新大1号では、小孢子嚢内で小孢子的密度が過度に高まり、小孢子同士が互いに押しつぶし合って変形するために正常に発達できないと考えられる。新大5号では、四分子から遊離後の小孢子において外壁の発達が正常に進行しないために構造が保てなくなると考えられる。

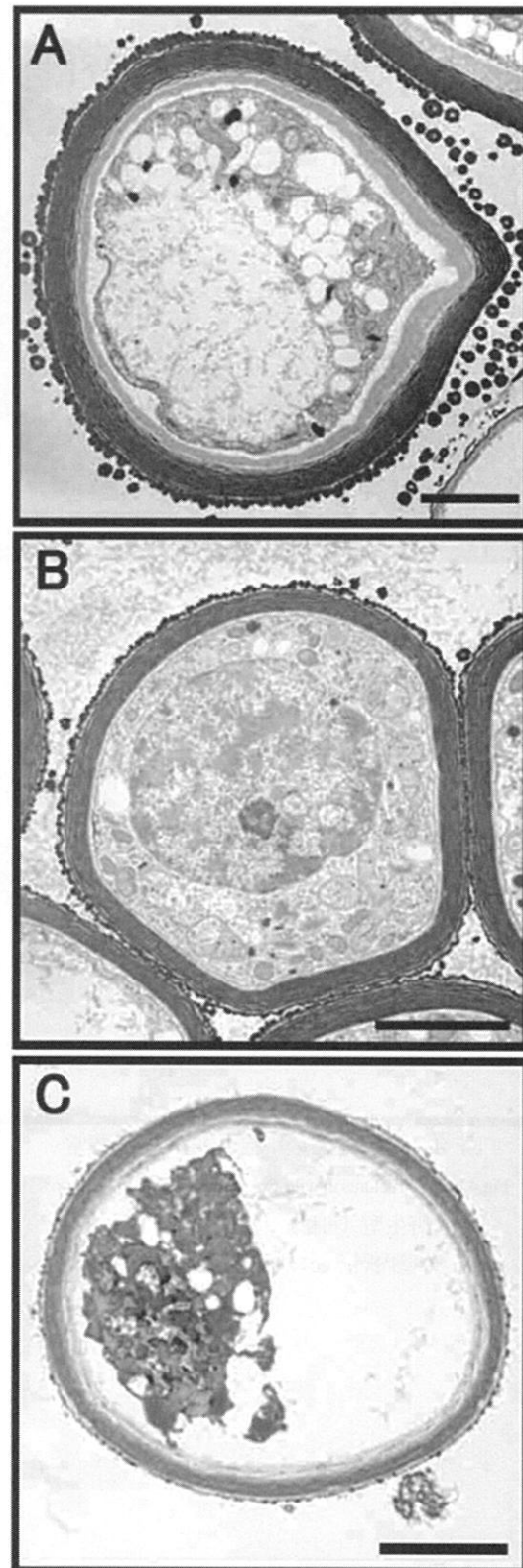


図-3. 小孢子期後期の小孢子
 Fig.3 TEM images of microspores
 (A) 野生型(可稔), (B) 新大1号, (C) 新大5号
 スケールバーは 5 μm

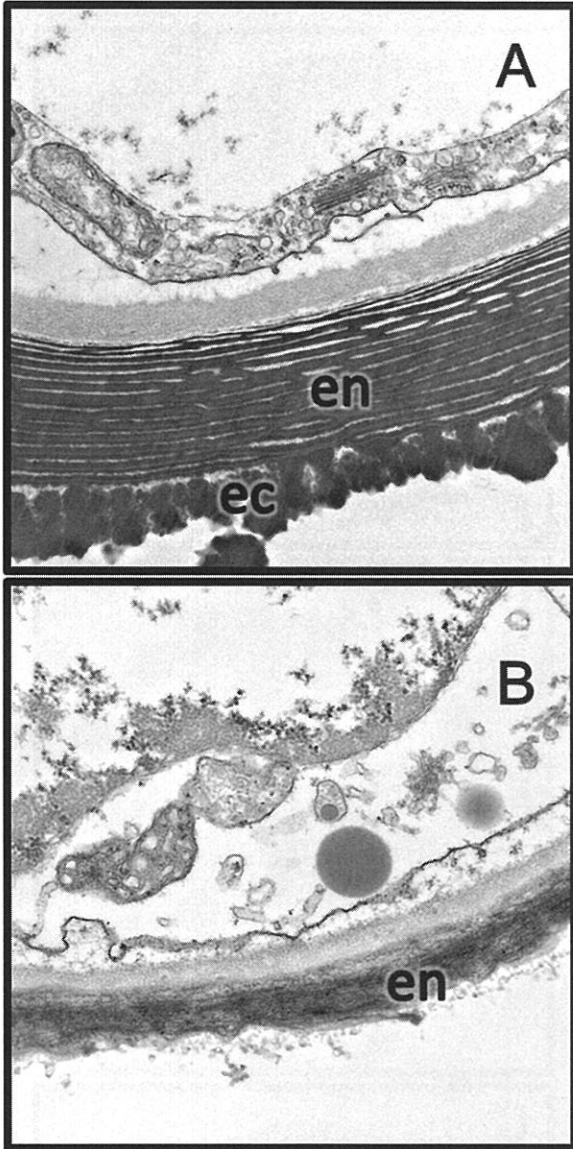


図-4. 新大5号の小孢子外壁の発達異常

Fig.4 Exine structures in wild-type and Shindai 5 microspores

(A) 野生型 (可稔), (B) 新大5号

en:外壁内層, ec:外壁外層

引用文献

(1) 三浦沙織・行田正晃・山本格・五十嵐正徳・平英彰 (2011) 四分子期に異常が発生するスギ雄性不稔4系統の発現過程. 日林誌 **93**: 1-7.

(2) MOITRA, A. and BHATNAGAR, S.P. (1982) Ultrastructure, cytochemical, and histochemical studies on pollen and male gamete development in gymnosperms. *Gamete Res.* **5**: 71-112.

(3) 斎藤真己 (2010) スギ花粉症対策品種の開発. 日林誌 **92**: 316-323.

(4) 吉井エリ・平英彰 (2007) 「新大1号」「新大5号」におけるスギ雄性不稔性の発現過程と遺伝的特性. 日林誌 **89**: 26-30.

(5) ZHAO, D.Z., WANG, G.F., SPEAL, B. and MA, H. (2008) The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev.* **16**: 2021-2031.