総説

熱帯牧草におけるアポミクシス育種とアポミクシス遺伝子単離を目指した研究の現状

中川 仁

農業生物資源研究所放射線育種場, 茨城県常陸大宮市上村田, 〒319-2293

Recent Progress of Apomixis Breeding and Isolation of Apomixis Gene(s) in Tropical Grasses

Hitoshi Nakagawa

National Institute of Agrobiological Sciences, Institute of Radiation Breeding, Hitachi-Ohmiya, Ibaraki 319-2293, Japan

キーワード

アポミクシス, 育種, 遺伝解析, 暖地型牧草, 倍数性, 分子マーカー, 連鎖解析

はじめに一植物育種におけるアポミクシスの重要性—

アポミクシスは無性生殖の一種で母株と全く同一の遺伝子型を持つ種子が形成されるので、「種子によるクローニング」とも言える。育種研究者は、アポミクシスを一代雑種に導入し、ヘテロシスが発現する雑種遺伝子型を純系品種として固定し、簡易な種子増殖を可能にするという「究極の育種技術」の確立を試みてきた (Hanna and Bashaw 1987)。例えばアポミクシスをトウモロコシ一代雑種品種に導入すると、母系の増殖、採種圃場の隔離と開花前の種子親雄穂切除作業 (detasseling) が不要になる。一方、ソルガム一代雑種品種の場合も細胞質雄性不稔 (cytoplasmic male sterility: CMS) 利用による省力的で洗練された技術であるが (Poehlman and Sleper 1995)、隔離条件下の2圃場で、CMS系統と維持系統の交配 (CMS系統の増殖) およびCMS系統と花粉親 (回復系統) の交配 (種子増殖) を行う労力は多大である。一代雑種品種にアポミクシスを導入すれば、優秀なエリート一代雑種1個体の選抜が品種育成に繋がり、アポミクシスで遺伝子型を固定した雑種植物を栽培するだけで大量増殖が可能になり、隔離圃場も必要ない。このアポミクシスで固定した一代雑種品種を我々は「パーマネントハイブリッド (permanent hybrid)」すなわち「永久雑種」と名づけている (Nakagawa and Ebina 2001)。

我が国でアポミクシス育種法に着目したのは中島卓介博士であり、「パーマネントハイブリッド」の名付け親でもある。このアポミクシス育種法が21世紀の農業に革新

的影響を与えると考える研究者は多く (Savidan 2000)、「無性生殖革命 (asexual revolution) (Calazada *et al.* 1996)」や「農業に対する社会革命 (social revolution for agriculture) (Jefferson 1994)」などと記述され、現在、世界各国で主要穀類にアポミクシスを導入する研究やアポミクシス遺伝子そのものの単離と特許化に向けた研究が推進されている。

この総説では、各種牧草類を中心にアポミクシス研究を概観する。重要な知見は、Asker and Jerling (1992) が著した、現在最も優れたモノグラフである「Apomixis in Plants」とNogler (1984) が著した「Gametophytic apomixis」を参照した。詳細な牧草類の特性については中川 (1998) を参照されたい。

1. 植物の有性生殖とアポミクシス

有性生殖の利点は、減数分裂と2配偶子の融合を経て、両配偶子の遺伝物質の交換と同一染色体数の新たな遺伝子型作出を可能にしたことであり、適者生存により進化が加速された。この有利さは明らかだが、これを欠いた無性生殖種が多数存在する。Winkler (1908) は、融合生殖 (amphimixis) から派生した、全く受精を欠く生殖様式を「アポミクシス (apomixis)」と呼んだ。

興味深い話として、近代遺伝学の父メンデルが最初にアポミクシス植物の遺伝学的研究を行ったことが記されている (Asker and Jerling 1992)。彼はミヤマコウゾリナ (*Hieracium* 属) の多くが *Pilosella* 亜属に属し、無孢子生殖であるとは知らず、この植物の遺伝解析を試みた。いくつかの材料が条件的アポミクシスで、有性生殖胚を低率ながら形成したため、*Pilosella* 亜属を用いた21交配組合せで雑種植物を得、その6個体に言及した。この結果から、「自殖による」(実際にはアポミクシスが原因) 後

代の出現頻度が高いので交配が非常に難しいと記述した。また、エンドウではメンデルの法則通り F_1 集団は均一、 F_2 個体で両親の形質分離が観察されるのに対し、この F_1 集団では形質分離が観察され、さらに F_2 集団で分離が観察されなかったため、エンドウで構築した遺伝法則の確信が薄らいだという推測は興味深い。

2. アポミクシスの細胞学的研究

広義のアポミクシスはすべての無性生殖 (asexual reproduction) を指すが、通常、栄養繁殖を切り離した無融合種子形成 (agamospermy)、すなわち無性的種子形成 (asexual seed formation) に限定して用いられる。中島 (1990) が記述したように、無融合種子形成は非還元性胚嚢が形成される配偶体アポミクシス (gametophytic apomixis) と胚嚢が形成されずに胚珠内の体細胞から胚が直接形成される不定胚形成 (adventitious embryony, nucellar embryony) に分類され、さらに、配偶体アポミクシスは複相胞子生殖 (diplospory) と無胞子生殖 (apospory) に分類される。その発生学的視点から見た分類は Savidan (2000) や Grimanelli *et al.* (2001) が図示している。Naumova (1990) は不定胚形成と配偶体アポミクシス間に分類上の明確な差異はないとしたが、作物育種での利用面では配偶体アポミクシスがまさる。その理由は、不定胚形成では胚乳形成がないため、近傍の有性生殖胚由来の胚乳が必要不可欠となることや有性生殖胚が多胚として混在する問題があることである。

1) 複相胞子生殖 (diplospory)

複相胞子生殖は *Taraxacum* 型、*Ixeris* 型、*Antennaria* 型、*Allium* 型等に分類される (中島 1990)。*Taraxacum* 型はイネ科では *Elymus rectisetus* (Nees in Lehm.) Love et Connor (*Agropyron scabrum* (R. Br.) Beauv.) (Hair 1956) や *Paspalum* 属で知られ (Asker and Jerling 1992)、*Antennaria* 型は、*Tripsacum dactyloides* (L.) L. (Burson *et al.* 1990) など知られているが、同一種内に異なる型が共存したり、識別困難な場合も多いため、これらの分類は今後課題を残している。

複相胞子生殖の研究上の問題は、多くの種で成熟胚嚢の形態が *Polygonum* 型 8 核性有性生殖胚嚢と酷似し、識別が困難な点にある。そのため、生殖様式の識別は染色体数 (Kindiger and Sokolov 1997) などの後代検定法に頼るものが多い。しかし、大胞子母細胞分裂時に細胞学的調査を行えば識別可能であり、Crane and Carman (1987) は *E. rectisetus* の胚嚢を透明化し、両者の差異を明確に示した。ただし、多数の雑種集団の初期発生過程における胚嚢分析には時間がかかる。一方、ウィーピングラブグラス (*Eragrostis curvula* (Schrad.) Nees) は *Antennaria* 型の変形で 4 核性胚嚢を形成するため、開花時の胚嚢分析で生殖様式が容易に確認できる (Brown and Emery 1958,

Voigt and Bashaw 1972)。もう一つの問題は、発生のメカニズムから *Taraxacum* 型および *Ixeris* 型の複相胞子生殖では種子の遺伝子型が親株と異なる可能性があることである (中島 1990)。

2) 無胞子生殖 (apospory)

無胞子生殖は *Hieracium* 型と *Panicum* 型に分類される (中島 1990)。*Hieracium* 型は 8 核性胚嚢で *Polygonum* 型有性生殖胚と形態的に識別できないが、多胚現象でアポミクシスと推定できる種がある (Asker and Jerling 1992 の Fig. 24)。一方、*Panicum* 型は Warmke (1954) がギニアグラスで報告し、*Panicoideae* と *Andropogoneae* の多くの熱帯牧草で確認された (Brown and Emery 1958)。この無胞子生殖胚嚢と有性生殖胚嚢や多胚現象の写真は Nakagawa (1990) と Nakagawa *et al.* (1993) に示されている。この型は、高頻度で大胞子母細胞が退化し、体細胞から 4 核性胚嚢を形成するため、8 核性有性生殖胚嚢との識別が容易で、育種や分子生物学的研究に有利である。多胚現象があり、ギニアグラスでは 1 雌ずい内 4 個以上の胚嚢の形成や有性生殖胚とアポミクシス胚の混在も多い (Nakagawa *et al.* 1993)。しかし、筆者の調査では双子種子は観察されず、筆者はこれが偽受精 (pseudogamy) と関係すると考えている。偽受精とは、胚は未受精のまま単為発生するが、胚乳発達には極核の受精を必要とする現象であり、花粉がないと種子は形成されない。観察から、最初に極核に受精した胚嚢が急速に発達し、他の受精や成長を抑制するように見える。

3) 絶対的アポミクシスと条件的アポミクシス

有性生殖胚とアポミクシス胚が同一植物あるいは同一穂や雌ずいに混在する場合を条件的アポミクシス (facultative apomixis)、有性生殖胚が混在しない場合を絶対的アポミクシス (obligate apomixis) と呼ぶ。この現象は、無胞子生殖では大胞子母細胞の退化と密接に関連する。すなわち、大胞子母細胞が退化しないと有性生殖胚の出現率が高まり、完全に退化すると絶対的アポミクシスとなる。通常、ギニアグラスアポミクシス系統の有性生殖率は 5% 以下である (中川 1991)。ところが、有性生殖系統と交配した雑種集団では有性生殖とアポミクシス個体がほぼ 1:1 に分離し、アポミクシス個体の有性生殖率は 5–90% 程度まで変異する (中島・望月 1985, 中川 1993)。また、雑種品種「ナツカゼ」の有性生殖率は約 11% と自然界のものより高い (Nakagawa *et al.* 1993)。この問題で、Savidan (2000) は、有性生殖率の差は観察時期の違いに過ぎず、時間の経過と共にアポミクシス胚が増加するとしているが、筆者らの調査ではアポミクシス系統の有性生殖率は安定している。なお、条件的アポミクシスは、複相胞子生殖にも存在する。一方、「絶対的アポミクシスは本質的に確認できない (Asker 1979).」という考え方もある。しかし、ここで重要な点は、無胞子

生殖では有性生殖とアポミクシスの胚形成は互いに独立して進行する現象で、アポミクシス遺伝子座における優性と劣性の関係ではないことである (Nogler 1984)。

また, Hanna and Bashaw (1987) は, アポミクシス品種の有性生殖率は低い必要があるとした。しかし, 「ナツカゼ」の有性生殖胚嚢出現率は自然界のものよりもやや高いが, 「ナツカゼ」しか存在しない採種圃場では有性生殖胚嚢は何らかのメカニズムで自殖が妨げられ, 有性生殖胚嚢出現率が11%程度でも後代変異が観察されずに純系が維持されていると推定されている (Nakagawa *et al.* 1993)。

4) カロース形成

カロースは β -1,3- グリコシド結合で繋がったグルカンであり, 病原菌が侵入した細胞や傷を受けた細胞の細胞壁で生成されるが, 胚発生とも関連する。通常, 被子植物の花粉母細胞 (Bhandari 1984) や胚嚢母細胞 (Bouman 1984) の減数分裂時に形成され, 減数分裂のない複相胞子生殖の胚嚢母細胞では形成されないことが *E. rectisetus* で示され, 他の種の *Antennaria* 型, *Taraxacum* 型および *Ixeris* 型でも示唆された (Carman *et al.* 1991)。また, *Poa nemoralis* (Naumova *et al.* 1993), *Eragrostis curvula* (Peel *et al.* 1997a) および *Tripsacum* 属 8 種 (Leblanc *et al.* 1995) でも確認され, *Antennaria* 型の *E. rectisetum* (Carman *et al.* 1991) や *Tripsacum* (Leblanc *et al.* 1995) の条件的アポミクシスでは有性生殖率に応じてカロース形成が観察された。一方, 無胞子生殖の *Poa pratensis* (Naumova *et al.* 1993) やギニアグラス (Naumova and Willemse 1995) の大胞子母細胞はカロースに包まれているが, 発生初期の退化と共に消滅しやすい。また, バッフェルグラスや *Pennisetum squamulatum* では珠孔 (micropyle) 周辺にのみ局在する (Peel *et al.* 1997a)。この現象は, 有性生殖胚とアポミクシス胚の識別が困難な複相胞子生殖種の生殖様式の推定に有効である。なお, カロース形成, 透明化法, フローサイトメトリー等の生殖様式推定技術は, Naumova (1997) の総説が詳しい。

3. アポミクシスの遺伝的背景

Nogler (1984) は, アポミクシス基本的要素 (減数分裂の欠如 (apomeiosis) と卵の単為発生 (parthenogenesis)) は突然変異で生じる可能性があり, アポミクシス遺伝子是有性生殖植物に潜在的に存在する可能性があるという仮説を提出した。また, Asker and Jerling (1992) は, かけ離れた植物科に同じメカニズムが分布することから, アポミクシスが多元的起源 (polyphyletic origin) であり, 原因となる突然変異が多く種類関係のない種で独立に起こったという説を提起した。そして, 重要な点として, このことは遺伝的制御が単純であることを示唆する証拠であると指摘した。

アポミクシスはいくつかの総説 (中島 1990, 中川 1991) にあるように, 1 あるいは 2 個の主働遺伝子制御を示唆する後代の分離比を示す。Savidan (1980, 1983) は, ギニアグラスの無胞子生殖が優性単一主働遺伝子制御であり, アポミクシス遺伝子型を四倍体レベルで *Aaaa*, 有性生殖が *aaaa* であるとした。その後, 中島・望月 (1985) や中川 (1993) もこれを支持し, さらに有性生殖率は他のポリジーン的遺伝子制御であるとした。前述のように, Savidan (2000) は, 有性生殖率は観察ステージの差に過ぎないと結論している。また, Valle and Savidan (1996) は, *Brachiaria* 属の無胞子生殖アポミクシスも同様に優性 1 遺伝子支配であると報告した。以下にも詳述するが, 無胞子生殖が優性 1 遺伝子支配であることはほぼ確実のようである。

4. アポミクシスと倍数性

いくつかの誤りと思われる例外を除き, 自然界の配偶体アポミクシス植物は倍数体 (polyploid) であり, 自然集団内で安定的に存在する二倍体アポミクシス植物は知られていない。一方, *Paspalum hexastachyum* (Quarin and Hanna 1980) やバヒアグラス (Quarin *et al.* 2001) の例外を除き, 通常, 二倍体有性生殖植物を倍加した四倍体植物は有性生殖であり (Nakagawa and Hanna 1992), 倍数化とアポミクシス化は無関係である。

一方, アポミクシス遺伝子は存在せず, 倍数化がアポミクシス発現の引き金であるという説 (Carman 1997) がある。これは, 倍数化で生じた相同染色体間で遺伝子読み取りのタイミングが異なり, そのずれがアポミクシス発現に至るというもので, このアポミクシス作物作出方法に特許が申請されている。しかし, 実験的証拠はなく, 統計的データ解析からの推定に過ぎない。

Asker and Jerling (1992) は倍数性がアポミクシスに有利な点として, 倍数体ではそれと同等の DNA 量を持つ二倍体より減数分裂の持続期間が短く, 減数分裂期間の短縮が, 例えば *Taraxacum* の早熟卵細胞分裂 (precocious egg cell division) 等の卵細胞の分裂を引き起こすとした。さらに, アポミクシス胚嚢形成には無胞子生殖胚嚢形成を誘起する遺伝子あるいは減数分裂を抑制する遺伝子の存在が不可欠であるが, 単為発生は特別な遺伝子を想定しなくても, 倍数性や減数分裂回避が生理学的, 発生学的変化を誘導し, 胚の単為発生が開始すると推定した。

視点を変えれば, なぜ自然界に二倍体アポミクシス個体が存在しないかという問題が重要である。Nogler (1982) は, アポミクシス遺伝子座が配偶体致死や接合体致死を伴うか, 無胞子生殖では二倍体以上の倍数性配偶体で無胞子生殖要素 (apospory factor) がヘテロ接合でのみ伝達可能等のメカニズムで遺伝子伝達が制限され, 一倍性配偶体が後代を残せず, アポミクシス種に倍数化が伴うと推定した。しかし, 交配でアポミクシスの二ゲノム性半

数体 (Dujardin and Hanna 1986) や三倍体植物 (Komatsu and Nakajima 1990) を作出できる。また, *Pennisetum setaceum* (Simpson and Bashaw 1969) の例外を除き, 無胞子生殖三倍体アポミクシス種は少ない。これは偽受精と関係し, 花粉稔性のない三倍体は近縁種の花粉がないと種子を残せないからである。

また, 倍数性の他にアポミクシスと高い相関を持つ特性として, 栄養繁殖および多年生や自家不和合性が指摘されている (Asker and Jerling 1992)。現在のアポミクシス種は, アポミクシスを獲得するまでは栄養繁殖を利用したという推定である。これに関しても, 今後の研究が必要である。

5. 作物へのアポミクシス遺伝子の導入およびマッピングと遺伝子単離

1) トウモロコシ

トウモロコシ (*Zea mays* L.) 野生種に *Tripsacum* 属があり, 耐旱性, 耐病性, 分けつ性および多年生等の有用特性を持つことから, これを導入するためにトウモロコシとの交雑が試みられた (deWet and Harlan 1974, Reeves and Bockholt 1964, Cohen and Galinat 1984)。その中で重要な形質にアポミクシスがある (Petrov *et al.* 1984)。イースタンガマガラス (*T. dactyloides*) は, まれに *Taraxacum* 型が出現する *Antennaria* 型複相胞子生殖で (Burson *et al.* 1990, Leblanc *et al.* 1995, Kindiger *et al.* 1996), 大胞子の減数分裂が完全に欠如し, 染色体対合や組換えが起こらず, 非還元性卵 ($2n$) を形成する。偽受精のため受粉は必要で, 花粉親の遺伝子型はキセニアとして発現する。

(1) トウモロコシ—*Tripsacum* 雑種に関する初期の研究

アポミクシストウモロコシの研究は, ロシアの Petrov (1957) が開始し, *Tripsacum* 属のアポミクシス遺伝子をトウモロコシに導入する可能性を示した。その後, 交配を進め, 2 遺伝子モデルを提唱した (Petrov *et al.* 1984)。すなわち, アポミクシス *Tripsacum* の遺伝子型は *AAa/NNnn* (*A*: アポミクシス発生 (apomictic development) 遺伝子; *N*: 大胞子母細胞の非減数分裂 (non-reduction) 遺伝子) であるとし, アポミクシス遺伝子が座乗する染色体同定寸前まで研究を進めたが, アポミクシストウモロコシの作出には至らなかった (Yudin and Sokolov 1989)。1993 年以後, この研究はアメリカ合衆国農務省 (USDA-ARS) との共同研究として推進された。

これまでに, アポミクシスのトウモロコシ—*Tripsacum* F_1 雑種を花粉親としてトウモロコシに戻し交雑を行って BC_1 世代にアポミクシスを導入した事例は, 上記の Petrov, CIMMYT-ORSTOM の共同研究 (Leblanc *et al.* 1996) および Russia-USDA の共同研究 (Kindiger and Sokolov 1997) の 3 例である。Petrov が作出したアポミクシス F_1 雑種 (H278) は, 四倍体トウモロコシ ($2n=4x=40$) を種子親, 四倍体 *Tripsacum* ($2n=4x=72$) を花粉親としたので染色

体数は $2n=56$, 染色体組成は $20Mz+36Tr$ (Mz はトウモロコシ染色体で数字は染色体数; 同様に Tr は *Tripsacum*) となる (Petrov *et al.* 1984)。Kindiger *et al.* (1996) は「H278」を花粉親にした二倍体トウモロコシへの戻し交雑で, アポミクシスを維持する 38 染色体 ($20Mz+18Tr$) と 28 染色体 ($10Mz+18Tr$) 植物を作出し, 戻し交雑で Mz 染色体 20–40 本と Tr 染色体 9 本を持つ種々のアポミクシス雑種を作出した。また, 転座により Mz 染色体長腕 $Mz6L$ とアポミクシス遺伝子が座乗する染色体長腕 $Tr16L$ が同一動原体に付着した染色体を持つ系統を得, 遺伝子座の特定に用いた。

(2) トウモロコシへのアポミクシス遺伝子の導入

Kindiger and Sokolov (1997) は, *Tripsacum* のアポミクシスは, Petrov *et al.* (1984) が記述したように単為発生遺伝子 (*A*) と非減数分裂遺伝子 (*N*) の 2 優性遺伝子に支配され, 同一染色体 ($Tr16$ の長腕) に存在し, シングルドースで多胚, 胚の倍数化, 不完全な減数分裂, アポミクシス胚の単為発生が起こるとした。彼等は, *Tripsacum* のアポミクシス遺伝子をトウモロコシに導入する方法に関してアメリカ合衆国で特許を取得した。しかし, 導入には成功せず, 研究は中断している。また, CIMMYT-ORSTOM 共同研究もアポミクシストウモロコシ作出に成功していない。その理由は, アポミクシスは 2 遺伝子支配だが, アポミクシス発現には Tr の 9 染色体すべてを必要とすることによる (Sokolov 私信)。そうであれば, 雑種状態は解消できず, アポミクシス遺伝子のみを導入したトウモロコシの作出は不可能に近い。

この過程で育成されたアポミクシス雑種の 39 ($30 Mz+9 Tr$) と 49 ($40 Mz+9 Tr$) 染色体植物は形態がトウモロコシに近くて湿害や干ばつに強く, トウモロコシ並の栄養価を持つ新飼料作物として有望である (Sokolov *et al.* 2002)。しかし, 両系統は雄性不稔で, 偽受精のための花粉親なしに系統増殖や種子利用ができない。結論として, アポミクシストウモロコシ作出は, 雄性不稔の克服等, 画期的な技術あるいは系統の作出なしには不可能である。

(3) 分子マーカー

トウモロコシ—*Tripsacum* 雑種第一代が最初のバルクセグリガント解析に利用可能な生殖様式が分離した集団となった (Michelmore *et al.* 1991)。また, トウモロコシと *Tripsacum* 間のゲノム相同配列保存 (colinearity of genomes) を示唆するイネ科植物のゲノムシンテニー (Paterson 1997) を利用した解析によって, 非減数分裂遺伝子の座がある染色体の遺伝子地図が作られた (Grimanelli *et al.* 1998)。ここで重要なことは, 非減数分裂の連鎖マーカーが特定され, このマーカー配列を持つトウモロコシ第 6 染色体長腕との相同性が明らかになったにもかかわらず, アポミクシスの *Tripsacum* 個体ではこの領域内の組換えが抑制されていたことである。これは, 後述する無胞子生殖の *Pennisetum* における分子解析結果 (Ozias-Akins *et al.* 1998) と同様である。さらに,

Pessino *et al.* (1997) は *Brachiaria* のアポミクシスに関係するトウモロコシの連鎖グループを特定したが、この領域の組換えも観察されていない。Leblanc *et al.* (1995) は *Tripsacum* 二倍体有性生殖個体の染色体倍加による四倍体有性生殖個体を作出し、同種内で遺伝解析を行ったが、この結果も組換えが起こらない領域があることを示した。

2) コムギ

オーストラリア自生の Australian wheatgrass (*Elymus rectisetus*; $2n=6x=42$; StStYYWW) はコムギに複相孢子生殖を導入可能な唯一の野生種である。Liu *et al.* (1994) はコムギ ($2n=6x=42$; ゲノム型 AABBDD) 品種「フクホコムギ」と「Chinese Spring」に *E. rectisetus* 花粉を交雑して属間雑種 5 個体を作出した。雑種 4 個体は染色体数 $2n=63$ の B_{III} 雑種 (あるいは $2n+n$ 雑種: 非還元性卵と還元性花粉による雑種; Bashaw *et al.* 1992) で、花粉稔性は 1% 以下であった。 B_{III} 雑種を種子親にしてフクホコムギと戻し交雑した染色体数 $2n=54$ の BC_1 は花粉稔性が 10% に向上したが、次世代が得られなかった。彼らは、 $2n$ 花粉を作る系統を利用すればアポミクシス導入が可能であるとしているが、かなり困難である。この B_{III} 雑種の生殖様式はカロス形成調査で *Elymus* と同様のアポミクシスであることが確認された (Peel *et al.* 1997b)。また、*Elymus* とライムギやオオムギの雑種も完全不稔で (Torabinejad and Mueller 1993)、交雑によるアポミクシス遺伝子導入は困難である。

3) バッフェルグラス

(1) 育種および遺伝解析

無孢子生殖の熱帯牧草バッフェルグラス (*Cenchrus ciliaris* L.) では、アポミクシス系統から 1 個体の有性生殖植物が発見され、胚嚢分析によって自殖後代に有性生殖とアポミクシス個体が生じていることが明らかにされ、このアポミクシス個体から「Higgins」が育成された (Bashaw 1980)。Taliaferro and Bashaw (1966) は、交雑結果から、アポミクシスは 2 遺伝子支配であるとしたが、彼らの有性生殖系統が条件的アポミクシスであった可能性が指摘され (Savidan 2000)、さらに、Sherwood *et al.* (1994) が交雑試験でアポミクシスが優性 1 遺伝子支配であり、有性生殖は劣性ホモ型であることを証明した。

(2) 連鎖解析

バッフェルグラスは分類上 *Pennisetum ciliare* (L.) Link とも記述されたが、近年のゲノム研究で、パールミレット野生種との近縁性が示唆された。すなわち、バッフェルグラスと *P. squamulatum* に共通のアポスポリー関連ゲノム領域は共に一染色体上に認められ、バッフェルグラスではセントロメア近く、*P. squamulatum* ではテロメア近くに存在する (Goel *et al.* 2003)。さらに Akiyama *et al.* (2005) は四倍体アポミクシス系統「B-12-9」染色体の核型図式 (ideogram) を構築し、BAC クローンをを用いた *in situ*

ハイブリダイゼーションでアポスポリー関連ゲノム領域を特定した。この領域は「Higgins」では同様に観察されるが、有性生殖系統では観察されない。

4) パールミレット

(1) 育種

パールミレット (*Pennisetum americanum* (L.) K. Schum.) (PA)、別名トウジンビエは、熱帯乾燥地帯で重要な穀物である。三次的遺伝子プールの概念 (Harlan 1975) に属するアポミクシス野生種の *P. setaceum* (Forsk) Chiov. (PSE)、*P. orientale* L. C. Rich. (POR) および *P. squamulatum* Fresen. (PSQ) が存在し、PA は二倍体有性生殖で染色体数が $2n=2x=14$ 、PSE は $2n=3x=27$ 、POR は $2n=4x=36$ 、PSQ は $2n=6x=54$ (Dujardin and Hanna 1984b) または $2n=8x=56$ (Goel *et al.* 2003) である。これらの交雑結果を以下に示す。

a) PA×PSE: 雑種の染色体数は $2n=25$ (7PA+18PSE) であり、不完全なアポミクシスを示した。しかし、完全な雄性不稔と高度な雌性不稔のために、次世代は得られなかった (Hanna 1979)。

b) PA×POR: 雑種は条件的アポミクシス、染色体数 $2n=25$ (7PA+18POR) で雄性不稔であった (Hanna and Dujardin 1982)。しかし、この雑種の有性生殖胚に PA 花粉を授粉し、 $2n=23$ (14PA+9POR)、 $2n=27$ (7PA+20POR) および $2n=32$ (14PA+18POR) の花粉稔性を持つ条件的アポミクシス植物が得られたがアポミクシス率が 20% と低く (Dujardin and Hanna 1983a)、POR は必ずしもアポミクシス導入のための最適野生種ではない。

c) PA×PSQ: PSQ を花粉親に、四倍体 PA を種子親にした交雑で花粉稔性が高い絶対的アポミクシス個体が得られた (Dujardin and Hanna 1983b)。これを四倍体 PA に戻し交雑した後代の種子稔性は 91% に達し、2,800 個体以上の BC_1 集団が得られた (Dujardin and Hanna 1985)。この BC_1 集団の染色体数は $2n=32-39$ に変動し、形態は PA に近いが BC_1 集団の 85% が花粉不稔で、花粉稔性の最高値が 7% であった。さらに、 BC_1 に F_1 花粉を交雑した結果、後代の 31% が絶対的アポミクシスを示した。また、小さな PSQ 染色体と大きな PA 染色体の対合性の確認は困難であるが (Dujardin and Hanna 1983b)、BC 個体の減数分裂期に多価染色体が出現するので種間の染色体対合の可能性があり、PSQ は 3 野生種の中で最も有望な種である。Ozias-Akins *et al.* (1998) はこの雑種集団を用いてアポミクシスの DNA 解析を行った。

d) 3 種交雑: PA 近縁種のネビアグラス (*P. purpureum* Schumach.) (PPU) の染色体数は $2n=4x=28$ (A'A'BB ゲノム) である。この花粉を PA (AA ゲノム) MS 系統に交雑して得た三倍体を染色体倍加した六倍体 (AAA'A'BB) 有性生殖個体を作出し (Hanna 1981)、これを種子親に、PA×PSQ 後代のアポミクシス 41 染色体雑種 (AASSS) を花粉親にして交雑し、2,000 個体以上の

雑種植物を得た (Dujardin and Hanna 1984a). 雑種の 90% 以上は雄性不稔であったが, 94% 以上の花粉稔性を示す個体も存在した. これを四倍体 PA に戻し交雑し, PA に酷似した, 染色体数 $2n=29$ の絶対的アポミクシス BC_3 を作出した (Dujardin and Hanna 1989). さらに Morgan *et al.* (1998) は, この BC_3 から四倍体 PA と同様の形態で絶対的アポミクシスの $2n=28$ 植物を発見したが, 種子稔実率が 4–6% と低かった. このことは, アポミクシス遺伝子の導入に成功しても種子稔性が低い場合があるという問題を提起している.

(2) 連鎖解析

最初にアポミクシスに連鎖する分子マーカーを示した Ozias-Akins *et al.* (1998) は上記の PA $\times$ PSQ の雑種を解析集団に用いた. 解析集団は 397 個体で, アポミクシスの確認は胚嚢分析法と後代検定法を併用し, 分子マーカーには RAPD を用いてバルクセグリガント解析を行った. この集団はアポミクシスと有性生殖が 1:1 に分離し, 配偶体致死を伴う四倍体遺伝のモデルに合致し, アポミクシスに特異的な 19RAPD マーカーを検出した. その 12 分子マーカーすべてがアポミクシスと完全連鎖したため, 遺伝的組換えが抑制された染色体領域が存在し, これがアポミクシスと密接に関係すると結論した. その後, 無孢子生殖に特異的な領域はかなり大きく (Roche *et al.* 2002), 後代の分離比を歪めることが示唆された (Roche *et al.* 2001a, b). 興味深いことに, *P. squamulatum* から得られた多くのアポミクシス連鎖マーカーは他の *Pennisetum/Cenchrus* 種にも存在し (Lubbers *et al.* 1994, Roche *et al.* 1999), その位置は *P. squamulatum* と *C. ciliaris* で異なることは前述したとおりである (Goel *et al.* 2003). さらに FISH 解析によってこれらの DNA 領域は単一染色体上にあり, 染色体の約 25% (約 50 Mbp) と大きく, 他の染色体には存在しないことが明らかにされた. また, 組換えが抑制されている無孢子生殖関連領域には反復配列が多く, Y 染色体や B 染色体の進化メカニズムとの類似性が指摘された (Ozias-Akins *et al.* 2003, Akiyama *et al.* 2004).

5) ギニアグラス

ギニアグラスの育種研究は 1960 年代に Combes et Pernes (1970) や Hanna *et al.* (1973) が開始した. また, 1980 年代以後, ブラジルでフランスの遺伝資源を用いた育種事業が進行している (Savidan *et al.* 1989, Jank *et al.* 1997). わが国では, 1970 年代から草地試験場で育種研究が行われ, 遺伝資源の導入 (宝示戸・堀端 1982), 有性生殖系統の単離 (Nakajima *et al.* 1979), 生殖様式の調査 (Nakajima and Mochizuki 1983) とアポミクシスの遺伝様式の推定 (中島・望月 1985) など, 最先端の成果が得られてきた. その後, 育種研究は九州農業試験場に引き継がれ, 二倍体有性生殖系統「GR297」(Nakajima *et al.* 1979) とアポミクシス系統との雑種品種「ナツカゼ」が品種登録され (佐

藤ら 1993), また, 宝示戸・堀端 (1982) の遺伝資源を素材にして「ナツユタカ」(清水ら 1993) や「ナツコマキ」(松岡ら 2001) が育成された. また, 熱帯農業研究センター沖縄支所で「GR297」のコルヒチン倍加により四倍体有性生殖中間母本「熱研 1 号 (農 1 号)」が育成された (Nakagawa and Hanna 1992, Nakagawa *et al.* 1991). この中間母本は, 連鎖解析や cDNA マイクロアレー研究で重要な役割を果たしている.

(1) 連鎖解析

アポミクシス遺伝子の分子生物学的研究材料としてギニアグラスが優れる点を Nakagawa and Ebina (2001) は, 1) 種内にアポミクシスと有性生殖系統が存在し, 同質四倍体の有性生殖系統「熱研 1 号」が得られ, 2) 胚嚢分析で簡単に生殖様式が同定でき (Nakagawa 1990), 3) 交雑で得られる雑種種子数が多いことをあげている. Ebina and Nakagawa (2001) は, 有性生殖とアポミクシス系統を材料に RAPD 解析を行い, OPC 8 など 8 種類のプライマーすべてで多型解析に十分なバンドが生じ, 各系統 8 個体の調査で生殖様式を推定できるとした. また, アポミクシスと有性生殖が 1:1 に分離する 72 個体の「熱研 1 号」 $\times$ 「ナツカゼ」雑種集団で AFLP を用いた連鎖地図を作成し, アポミクシス形質と一致する 16 マーカーと上下 10cM 以内のマーカーを特定した (Ebina *et al.* 2005). その後, 1,230 個体の雑種集団の解析で 0.6cM まで分子マーカーの位置を明らかにしている (未発表).

(2) cDNA 解析

アポミクシス発生過程で特異的に発現する mRNA から cDNA を合成し, アポミクシス発現に特異的な遺伝子を探る方法がある. Chen *et al.* (1999) は四倍体有性生殖系統 N68/96-8 とこの放任授粉後代の四倍体アポミクシス系統 N68/96-8-o-11 (Nakajima *et al.* 1979) を用い, differential screening 法によって無孢子生殖胚嚢始原細胞の出現時期に特異的に発現する数個の cDNA を単離し, その一つ ASG-1 の全塩基配列を決定した. これは 1,177bp からなり, 305 個のアミノ酸をコードし, ホモロジーサーチの結果, 既知の種子や胚発育に関与する遺伝子との類似性が認められた. また, ASG-1 の cDNA クローンを RNA に合成したプローブで上記 2 系統の小穂切片に *in situ* ハイブリダイゼーションした結果, アポミクシス胚嚢と初期の花粉粒で ASG 遺伝子発現のシグナルが認められ, アポミクシス胚嚢発生時に何らかの役割を果たしているとした (Chen *et al.* 2001). その後, この遺伝子をアグロバクテリウム法でイネ再分化系に導入した結果, 再分化植物で遺伝子導入が確認された (Seo *et al.* 2004). 今後, この遺伝子導入再分化イネの胚嚢形成が興味深い. Nakagawa and Ebina (2001) は「熱研 1 号」, 「ナツカゼ」と雑種後代を材料に, 有性生殖とアポミクシス個体の胚嚢発生 5 段階でアポミクシス特異的 cDNA クローンを約 4,000 単離し, マイクロアレー技術を用いた胚嚢発生特異的 cDNA クローンの特定を試みている.

6) *Brachiaria* 属

Brachiaria 属に含まれる約 90 種の多くはアポミクシスであるため (Clayton and Renvoize 1982), 育成品種は収集したエコタイプ選抜によるものが多い (Keller-Grein *et al.* 1996). Valle and Savidan (1996) は, 二倍体有性生殖のルジグラス (*B. ruziziensis*) を倍加した四倍体有性生殖系統を母本とし, シグナルグラス (*B. decumbens*) と交雑した雑種集団の遺伝解析の結果, アポミクシスは, 優性 1 主働遺伝子支配であるとした. また, Pessino *et al.* (1997) は RFLP や AFLP マーカーを用い, アポミクシス遺伝子周辺のマッピングを行い, このアポミクシス遺伝子はトウモロコシの 5 番染色体にマップできるプローブに連鎖し, 組換えが観察されないと報告した.

7) *Paspalum* 属

Paspalum 属はアメリカ大陸自生の約 400 種を含む (Chase 1929).

(1) バヒアグラス (*Paspalum notatum* Poir.): 二倍体有性生殖のペンサコラ (Pensacola) 型と四倍体無孢子生殖のコモン (Common) 型が存在し, Coastal Plain Experiment Station で育種が行われた (Burton 1955). Burton (1967) は, コルヒチン倍加で四倍体有性生殖系統 WSB を作出し, アポミクシス育種法の端緒を開き, 生殖様式は無孢子生殖の絶対的アポミクシスであり, 非常に少数の遺伝子支配であるとした. しかし, 実際の育種にはより多様性に富む二倍体有性生殖集団の循環選抜法を用いた (Burton 1982, 中川 2003). このように, 同種内に四倍体アポミクシスと二倍体有性生殖系統が存在する場合, アポミクシスと他殖性有性生殖の遺伝子プールの遺伝的変異に応じて育種法を決定すべきである.

一方, Chen *et al.* (2000, 2001) は, 透明化法によるアポミクシス胚の細胞学的研究を行い, 極核 2 個の *Paspalum* 型と 1 個の *Panicum* 型無孢子生殖胚嚢が出現する有性生殖率 5–14% の条件的アポミクシスで多胚現象が伴うことを示し, 珠孔に近い胚嚢の極核が受精しやすく, 受精胚嚢近傍の胚がこの胚乳を利用し, 双子や三つ子が出現すると報告した.

また, Martinez *et al.* (2001) は Burton (1967) が育成した WSB の有性生殖後代を母本とした交配と遺伝解析で, アポミクシスは有性生殖に対して優性で, F_1 集団の有性生殖とアポミクシスの分離比が 3:1 に近く, 1 主働遺伝子以外に他の 1 遺伝子が関与するとした.

(2) その他の *Paspalum* 属: *P. simplex* は四倍体 ($2n=4x=40$) がアポミクシス (Caponio and Quarin 1987), 二倍体 ($2n=2x=20$) が有性生殖で (Espinoza and Quarin 1997), 両者に形態的な差がない. Pupilli *et al.* (2001) は, 染色体倍加で四倍体有性生殖系統を作出し, 四倍体アポミクシス系統と交配した雑種集団への RFLP マーカーを用いた連鎖解析で, アポミクシスは 1 優性遺伝子支配で大きな領域にあり, イネ 12 番染色体と関連すると報告した.

8) その他のイネ科飼料作物

寒地型牧草にもアポミクシスが存在する例を示す. すでに記述したように *Poa pratensis* は無孢子生殖アポミクシスで, 細胞学的にも複雑な種である (Muntzing 1933). 染色体数は, $2n=28-154$ まで多様化し, 他の *Poa* 属と種間交雑が起こる (Clausen 1961). アメリカ合衆国では 1995 年時点で 74 品種が登録され (Anderson and Sharp 1995), 48 品種が自生集団由来の全く遺伝的改変のない品種で 26 品種が交雑によるものである. このことは, アポミクシス種が自然状態で遺伝的変異を拡大でき, 染色体数が攪乱されても種子形成が可能であることを示す. 一方, 遺伝子解析によって無孢子生殖が 5 遺伝子支配であるという説が最近報告されたが (Matzk *et al.* 2005), 今後, より精密な解析が必要である. 一方, Albertini *et al.* (2005) は *P. pratensis* で, cDNA 解析と BLAST 情報等を用いて 2 つの無孢子生殖関連遺伝子を同定し, 胚嚢発生スイッチの遺伝子と細胞死にかかわる遺伝子と推定した.

また, ソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) でアポミクシスが報告されているが (Rao and Narayana 1968, Murty *et al.* 1979), 本来自殖性であるため純系と区別がつかず, この「R473」を交配するとかなりの頻度で雑種個体が得られることから, たとえアポミクシスであったとしても, アポミクシスを導入する素材としては, 利用価値が低いと思われる (中川, 未報告).

6. その他のアプローチ

1) シンテニー情報利用

これは, イネ科穀類間で農業形質などの QTL 遺伝子が独立して保存されているという前提に立ち, 種々の興味深い情報を提供している (Paterson *et al.* 1995, Paterson 1997). この作物間の遺伝的シンテニーを利用して, アポミクシス遺伝子をマッピングする試みがある. その一つは, イースタンガマグラスとトウモロコシのゲノム比較であり, 両種間で種子稔性に関する遺伝子が保存されていることが示された (Blakey *et al.* 2001). 他の一つは, *Paspalum* 属の種間比較マッピングであり, イネ 2 番と 12 番染色体上の配列情報が *Paspalum* 属のアポミクシス遺伝子領域に保存されていることが示された (Pupilli *et al.* 2001, 2004). また, *Pennisetum squamulatum* のアポスポリー領域とイネ 11 番染色体のセントロメア近傍との相同性も報告されている (Gualtieri *et al.* 2006). 結論として, この方法の成否は, 本質的に, アポミクシス遺伝子を持たない種の配列情報を用いて, アポミクシス種に存在するアポミクシス遺伝子を特定できるかどうかにかかっている. この手法が, アポミクシス領域の解析に与える有効性は今のところ明らかでない.

2) アラビドプシス突然変異利用

全塩基配列が解読されたアラビドプシスで胚発生や胚

囊発生の突然変異体を誘発し、アポミクシスを作出する試みがある (Consiglio *et al.* 2004). 自然界のアポミクシス植物とは異なり、二倍体レベルで発現することや突然変異体の中に偽受精を回避する胚乳の単為発生も存在することが興味深い. この両遺伝子を利用すれば、二倍体で全く花粉を必要としないアポミクシス作物が作出できる. Consiglio *et al.* (2004) が結論したように、今後、自然界とは違ったアポミクシス植物を作出することが可能になるかもしれない.

6. 今後の展望

現在のところ、近縁野生種から主要穀類へのアポミクシス遺伝子導入は成功せず、アポミクシス遺伝子の単離も行われていない. 作物によっては今後の研究方向が見えないものもある. しかし、アポミクシス遺伝子単離に向けた研究は着々と進行している. 今後、交叉の起こらない巨大なアポミクシス領域が特定されている種では、大きな欠失を引き起こすことが可能な γ 線やイオンビームを利用した突然変異誘発 (Naito *et al.* 2005) とその遺伝解析がアポミクシス遺伝子の特定に有効な手段となるかもしれない.

また、特許競争はあるかもしれないが、アポミクシス遺伝子は、特に厳しい環境条件下で人口増加と食糧危機に直面する開発途上国において農業生産を増大させる品種育成に有効であり (Savidan 2000)、最大の利点は貧しい農民が優れた遺伝子型を持つ一代雑種品種を自家採種して利用できるところにある. これは、明らかに種子産業の営利目的とは相反するが、国際研究機関を中心に推進すべき課題であると筆者は考えている.

引用文献

Akiyama, Y., J.A. Conner, S. Goel, D.T. Morishige, J.E. Mullet, W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2004) *Plant Physiol.* 134: 1733–1741.

Akiyama, Y., W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2005) *Theor. Appl. Genet.* 111: 1042–1051.

Albertini, E., G. Marconi, L. Reale, G. Barcacia, A. Porceddu, F. Ferranti and M. Falcinelli (2005) *Plant Physiol.* 138 (4): 2185–2199.

Anderson, J. and W.C. Sharp (1995) *Grass varieties in the United States*. CRC Press, Boca Raton, 226–244.

Asker, S. (1979) *Hereditas* 91: 231–240.

Asker, S.E. and L. Jerling (1992) *Apomixis in plants*, CRC Press, Boca Raton, 298pp.

Bandari, N.N. (1984) In “Embryology of angiosperms” Johri, B.M. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 53–121.

Bashaw, E.C. (1980) In “Hybridization of crop plants” Fehr, W.R. and H.H. Hadley (eds.), ASA, Madison, WI, 45–63.

Bashaw, E.C., M.A. Hussey and K.W. Hignight (1992) *Intl. J. Plant Sci.* 153: 466–470.

Blakey, C.A., S.L. Goldman and C.L. Dewald (2001) *Genome* 44:

222–230.

Bouman, F. (1984) In “Embryology of angiosperms” Johri, B.M. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 123–157.

Brown, W.V. and W.H.P. Emery (1958) *Amer. J. Bot.* 45: 253–263.

Burson, B.L., P.W. Voight, R.A. Sherman and C.L. Dewald (1990) *Crop Sci.* 30: 86–89.

Burton, G.W. (1955) *J. Amer. Soc. Agron.* 40: 281–282.

Burton, G.W. (1967) *Econ. Bot.* 21: 379–382.

Burton, G.W. (1982) *Crop Sci.* 22: 1058–1061.

Calazada, J-P.V., C.F. Crane and D.M. Stelly (1996) *Science* 274: 1322–1323.

Caponio, I. and C.L. Quarin (1987) *Kurtziana* 19: 35–45.

Carman, J.G. (1997) *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 51–94.

Carman, J.G., C.F. Crane and O. Rieta-Lizarazu (1991) *Crop Sci.* 31: 1527–1532.

Chase, A. (1929) *U. S. Natl. Herb.* 28: 1–310.

Chen, L., L. Guan, A. Kojima and T. Adachi (2000) *Cytologia* 65: 333–341.

Chen, L., L. Guan, A. Kojima and T. Adachi (2001) *Cytologia* 66: 157–165.

Chen, L., C. Miyazaki, A. Kojima, A. Saito and T. Adachi (1999) *J. Plant Physiol.* 154: 55–62.

Clausen, C.L. (1961) *Euphytica* 10: 87–94.

Clayton, W.D. and S.A. Renvoize (1982) In “Flora of tropical East Africa” Polhill, R.M. (ed.), Royal Botanic Gardens, Kew, U.K., 575–600.

Cohen, J.I. and W.C. Galinat (1984) *Crop Sci.* 24: 1011–1015.

Combes, D. et J. Pernes (1970) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 270–285.

Consiglio, F., D. Carputo, L. Monti and C. Conicella (2004) *Sex. Plant Reprod.* 17: 97–105.

Crane, C.F. and J.G. Carman (1987) *Amer. J. Bot.* 74: 477–496.

DeWet, J.M.J. and J.R. Harlan (1974) *Genetics* 78: 493–502.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1983a) *Crop Sci.* 23: 156–160.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1983b) *J. Heredity* 74: 277–279.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1984a) *Theor. Appl. Genet.* 67: 59–62.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1984b) *Theor. Appl. Genet.* 67: 197–201.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1985) *Crop Sci.* 25: 59–62.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1986) *Theor. Appl. Genet.* 72: 33–36.

Dujardin, M. and W.W. Hanna (1989) *J. Genet. Breed.* 43: 145–151.

Ebina, M. and H. Nakagawa (2001) *Grassld. Sci.* 47: 251–255.

Ebina, M., H. Nakagawa, T. Yamamoto, H. Araya, S. Tsuruta, M. Takahara and K. Nakajima (2005) *Grassl. Sci.* 51: 71–78.

Espinoza, F. and C.L. Quarin (1997) *Aust. J. Bot.* 45: 871–877.

Goel, S., Z. Chen, J.A. Conner, Y. Akiyama, W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2003) *Genetics* 163: 1069–1082.

Grimanelli, D., O. Leblanc, E. Espinosa, E. Parotti, D. Gonzalez de Leon and Y. Savidan (1998) *Heredity* 80: 33–39.

Grimanelli, D., O. Leblanc, E. Espinosa, E. Parotti and U. Grossniklaus (2001) *Trends Genet.* 17(10): 597–604.

Gualtieri, G., J.A. Conner, D.T. Morishige, L.D. Moore, J.E. Mullet and P. Ozias-Akins (2006) *Plant Physiol.* 146: 963–971.

Hair, J.B. (1956) *Heredity* 10: 129–160.

Hanna, W.W. (1979) *J. Heredity* 70: 425–427.

Hanna, W.W. (1981) *Crop Sci.* 21: 123–126.

Hanna, W.W. and E.C. Bashaw (1987) *Crop Sci.* 27: 1136–1139.

Hanna, W.W. and M. Dujardin (1982) *Crop Sci.* 21: 123–126.

- Hanna, W.W., J.B. Powell, J.C. Millot and G.W. Burton (1973) *Crop Sci.* 13: 695–697.
- Harlan, J.R. (1975) *Crops and Man*. Amer. Soc. Agron. Madison, WI. pp. 295.
- 宝示戸貞夫・堀端俊造 (1982) 熱研資料 58: 1–120.
- Jank, L., S. Calixto, J.C.G. Costa, Y.H. Savidan and J.B.E. Curvo (1997) *EMBRAPA-CNPq, Documentos* 68: 53p
- Jefferson, R. (1994) *Biotechnology and Development Monitor* 19: 14–16.
- Keller-Grein, G., B.L. Maass and J. Hanson (1996) In “Brachiaria: biology, agronomy, and improvement” Miles, J.W. *et al.* (eds.), CIAT, Cali, Columbia, 16–35.
- Kindiger, B., D. Bay and V. Sokolov (1996) *Genome* 39 (6): 1133–1141.
- Kindiger, B. and V. Sokolov (1997) *Trends Agron.* 1: 75–94.
- Kindiger, B., V. Sokolov and I.V. Khatypova (1996) *Crop Sci.* 36: 1108–1113.
- Komatsu, T. and K. Nakajima (1990) *Apomixis Newsletter* 2: 49–50.
- Leblanc, O., D. Grimanelli, N. Islam-Faridi, J. Berthaud and Y. Savidan (1996) *J. Heredity* 87: 108–111.
- Leblanc, O., M.D. Peel, J.G. Carman and Y. Savidan (1995) *Am. J. Bot.* 82: 57–63.
- Liu, Z.W., R.C.C. Wan and J.G. Carman (1994) *Theor. Appl. Genet.* 89: 599–605.
- Lubbers, E.L., L. Arthur, W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (1994) *Theor. Appl. Genet.* 89: 636–642.
- Martinez, E.J., M.H. Urbani, C.L. Quarin and J.P.A. Ortiz (2001) *Hereditas* 135: 19–25.
- 松岡秀道・眞田康治・佐藤博保 (2001) 九州農試報告 38: 1–26.
- Matzk, F., S. Prodanovic, H. Baumlein and I. Schubert (2005) *Plant Cell* 17: 13–24.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 9828–9832.
- Morgan, R.N., P. Ozias-Akins and W.W. Hanna (1998) *Int. J. Plant Sci.* 159: 127–135.
- Muntzing, A. (1933) *Hereditas* 17: 131.
- Murty, U.R., K.F. Schertz and E.C. Bashaw (1979) *Indian J. Genet. Plt. Breed.* 39 (2): 271–278.
- Naito, K., M. Kusaba, N. Shikazono, T. Takano, A. Tanaka, T. Tanisaka and M. Nishimura (2005) *Genetics* 169: 881–889.
- 中川 仁 (1991) 育種学最近の進歩 第32集: 101–117.
- 中川 仁 (1993) 広島農技セ研報 58: 1–148.
- 中川 仁 (1998) 熱帯の飼料作物, 国際農林業協力協会: 1–278.
- 中川 仁 (2003) 日本草地学会誌 49: 64–71.
- Nakagawa, H. (1990) *JARQ* 23: 163–168.
- Nakagawa, H. and M. Ebina (2001) In “Molecular breeding of forage crops” Spangenberg, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 161–173.
- Nakagawa, H. and W.W. Hanna (1992) *J. Japan. Grassl. Sci.* 38: 152–159.
- Nakagawa, H., N. Shimizu, H. Sato, T. Momonoki and H. Nakano (1991) *TARC Newsletter* Vol. 2, No. 3: 4–5.
- Nakagawa, H., N. Shimizu and W.W. Hanna (1993) *J. Japan. Grassl. Sci.* 39: 374–380.
- 中島阜介 (1990) 育種学最近の進歩 第31集: 35–48.
- Nakajima, K., T. Komatsu, N. Mochizuki and S. Suzuki (1979) *Japan. J. Breed.* 29: 228–238.
- 中島阜介・望月 昇 (1985) 育種 35 (別2): 282–283.
- Nakajima, K. and N. Mochizuki (1983) *Japan. J. Breed.* 33: 45–54.
- Naumova, T.N. (1990) *Apomixis Newsletter* 2: 33.
- Naumova, T.N. (1997) *Euphytica* 96: 93–99.
- Naumova, T.N., A.P.M. Den Nijs and M.T.M. Willemse (1993) *Acta Bot. Neerl.* 42: 299–312.
- Naumova, T.N. and M.T.M. Willemse (1995) *Sex. Plant Reprod.* 8: 197–204.
- Nogler, G.A. (1982) *Bot. Helvetica* 92: 13–22.
- Nogler, G.A. (1984) In “Embryology of angiosperms” Johri, B.M. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 475–518.
- Ozias-Akins, P., Y. Akiyama and W.W. Hanna (2003) *Funct. Integr. Gen.* 3: 94–104.
- Ozias-Akins, P., D., Roche and W.W. Hanna (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5127–5132.
- Paterson, A.H. (1997) *Plant Breed. Rev.* 14: 13–37.
- Paterson, A.H., Y. Lin, Z. Li, K.F. Schertz, J.F. Doebley, S.R.M. Pinson, S. Liu, J.W. Stansel and J.E. Irvine (1995) *Science* 269: 1714–1717.
- Peel, M.D., J.G. Carman and O. Leblanc (1997a) *Crop Sci.* 37: 724–732.
- Peel, M.D., J.G. Carman, Z.W. Liu and R.R.-C. Wang (1997b) *Crop Sci.* 37: 717–723.
- Pessino, C.S., J.P.A. Ortiz, O. Leblanc, C.B. do Valle, C. Evans and M.D. Hayward (1997) *Theor. Appl. Genet.* 94: 439–444.
- Petrov, D.F. (1957) *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 112: 954–957 (in Russian).
- Petrov, D.F., N.I. Belousova, E.S. Fokina, L.I. Laikova, R.M. Yatsenko and T.P. Sorokina (1984) In “Apomixis and its role in evolution and breeding” Petrov, D.F. (ed.), Oxonian Press Ltd., New Delhi, India, 9–73.
- Poehlman, J.M. and D.A. Sleper (1995) *Breeding of field crops*. Iowa State University Press, Ames, 345–366.
- Pupilli, F., P. Labombarda, M.E. Caceres, C.L. Quarin and S. Arcioni (2001) *Mol. Breed.* 8: 53–61.
- Pupilli, F., E.J. Martinez, A. Buti, O. Calderini, C.L. Quarin and S. Arcioni (2004) *Mol. Gen. Genomics* 270: 539–548.
- Quarin, C.L., F. Espinoza, E. Martinez, S.C. Pessino and O.A. Bovo (2001) *Sex. Plant Reprod.* 13: 243–249.
- Quarin, C.L. and W.W. Hanna (1980) *Crop Sci.* 20: 69–75.
- Rao, P.N. and D.S. Narayana (1968) *Indian J. Genet. Plt. Breed.* 28 (2): 121–127.
- Reeves, R.G. and A.J. Bockholt (1964) *Crop Sci.* 4: 7–10.
- Roche, D., P. Cong, Z.B. Chen, W.W. Hanna, D.L. Gustine, R.T. Sherwood and P. Ozias-Akins (1999) *Plant J.* 19: 203–208.
- Roche, D., Z. Chen, W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2001a) *Sex. Plant Reprod.* 13: 217–223.
- Roche, D., J.A. Conner, M.A. Budiman, D. Frisch, R. Win, W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2002) *Theor. Appl. Genet.* 104: 804–812.
- Roche, D., W.W. Hanna and P. Ozias-Akins (2001b) *Sex. Plant Reprod.* 13: 343–349.
- 佐藤博康・清水矩宏・中川 仁・中島阜介・越智茂登一 (1993) 九州農試報告 27: 417–437.
- Savidan, Y. (1980) *Theor. Appl. Genet.* 57: 153–156.
- Savidan, Y. (1983) *Proc. Int. Grassl. Congr.*, 14th, Lexington, KY: 182–184.
- Savidan, Y. (2000) *Plant Breed. Rev.* 18: 13–86.
- Savidan, Y.H., L. Jank, J.C.G. Costa and C.B. do Valle (1989)

- Euphytica 41: 107–112.
- Seo, M.K., L.Z. Chen, H.Y. Lee and T. Adachi (2004) Appl. Biol. Sci. 8: 34–46.
- 清水矩宏・中川 仁・佐藤博保・中島皐介 (1993) 九州農試報告 27: 439–458.
- Sherwood, R.T., C.C. Berg and B.A. Young (1994) Crop Sci. 34: 1490–1494.
- Simpson, C.E. and E.C. Bashaw (1969) Am. J. Bot. 56: 31–36.
- Sokolov, V.A., Y. Kravtchenko, H. Nakagawa and I.V. Khatypova (2002) Grassl. Sci. 48 (extra): 342–343.
- Taliaferro, C.M. and E.C. Bashaw (1966) Crop Sci. 6: 473–476.
- Torabinejad, J. and R.J. Mueller (1993) Theor. Appl. Genet. 86: 288–294.
- Valle, C.B. do and Y. Savidan (1996) In “Brachiaria: biology, agronomy and improvement” Miles, J.W. *et al.* (eds.), CIAT Publ. 259, CIAT, Cali, Columbia: 147–163.
- Voigt, P.W. and E.C. Bashaw (1972) Crop Sci. 12: 843–847.
- Warnke, H.E. (1954) Amer. J. Bot. 41: 5–11.
- Winkler, H. (1908) Progressus Rei Botanicae 2: 292–454.
- Yudin, B.F. and V.A. Sokolov (1989) Gen. Manipulation Plants 5: 36–40.