



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histological, cytological and molecular biological analyses of the polyphenic development in the pea aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i> [an abstract of entire text]
Author(s)	小川, 浩太
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11347号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55448
Type	doctoral thesis
File Information	Kota_Ogawa_summary.pdf



博士論文

**Histological, cytological and
molecular biological analyses of the
polyphenic development in the pea
aphid *Acyrtosiphon pisum***

(エンドウヒゲナガアブラムシの可塑的な発生に関する組織
形態学的・細胞生物学的ならびに分子生物学的研究)

北海道大学大学院 環境科学院

小 川 浩 太

Contents

Summary (in Japanese)	---2
General Introduction	---4
Chapter I Establishment of the induction systems of sexual morphs using the strains producing different male wing morphs in <i>Acyrtosiphon pisum</i>	---10
Chapter II Male-specific flight-apparatus development in <i>Acyrtosiphon pisum</i> : Comparison with female wing polyphenism	---20
Chapter III Two developmental switch points for the wing polymorphisms in the pea aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i>	---54
Chapter IV The male production employed X-chromosome reduction by asymmetric maturation division in <i>Acyrtosiphon pisum</i>	---80
Chapter V Transcriptomics by LCM RNA-seq on the reproductive polyphenism in <i>Acyrtosiphon pisum</i>	---98
General Discussion	---164
References	---174
Acknowledgement	---191

Summary (in Japanese)

生物は様々な環境に適応した多様な形質（表現型）を獲得しているが、これらの表現型は遺伝情報のみで決定されるのではなく、環境要因に応じて可塑的に変化する。これは「表現型可塑性」と呼ばれ、迅速な環境適応や表現型の多様化と深く関わっていると考えられている。近年、生態発生学あるいは進化発生学分野では生物の可塑的な発生制御機構を解明することで、表現型や適応戦略に多様化をもたらした進化メカニズムを理解しようとする機運が高まってきている。本博士論文では、半翅目昆虫のエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の「翅多型」と「繁殖多型（周期性単為生殖）」をモデルに生物の環境依存的な発生調節機構について研究を行った。エンドウヒゲナガアブラムシは季節の変化を感知して胎生単為生殖と有卵生性生殖を切替える「周期性単為生殖」を行う。気候が好適な春から夏にかけては単為生殖により爆発的に増殖し、秋には低温・短日刺激に応答して有性生殖を行い卵で越冬する。また、本種はユニークな翅多型を持っている。胎生メス（単為生殖世代）は環境依存的に翅型が決定される翅多型(wing polyphenism)を、オスは遺伝情報により翅型が決定される翅多型(genetic wing polymorphism)を示す。さらに、幹母と有性生殖を行う卵生メスは無翅単型(monomorphic wingless)である。

本種の劇的な形態変化を伴う表現型多型は非常に魅力的な研究対象であるが、その多型について研究するためには各生活型を自由に誘導できることが肝要である。そこで、第 1 章では、各生活型の飼育誘導系を確立し、研究の基礎を築いた。これによってこれまで解析できなかった生活型についても解析可能となった。

クローン繁殖し、同じゲノムセットを持つにもかかわらず生活型間で制御様式が異なる本種の翅多型は、多型の進化・維持機構の研究に適した材料である。そこで、第 2 章と第 3 章では翅多型に着目し、各生活型における飛翔器官の発達・退縮様式と生活史形質を精査した。その結果、オスは有翅型・無翅型共に飛翔筋を持っており、飛翔筋量（≒移動分散能力）と成長速度がトレードオフになっていることが分った（第 2 章）。一方、胎生メスの無翅型は飛翔筋を持たず、有翅型では産仔前に飛翔筋を分解しそのエネルギーを繁殖へと投資していることが示唆された。また、環境依存的な翅多型を示す胎生メスでは将来の表現型に関わらず翅原基が形成され、無翅型へと発生することが決定されると翅原基が退縮することが明らかとなった。一方で、無翅単型の卵生メスと幹母では翅原基は全く形成されなかった（第 3 章）。原基が発生過程で形成された後に退縮する例は数多くの先行研究で報告されているが、それらは発生上の制約などに起因する非適応的な発生プロセスだと理解されてきた。しかし、同一の遺伝情報を共有する卵生メスと幹母は翅原基が形成されないことから、無翅型胎生メスで見られる翅原基の形成・退縮プロセスが発生拘束等により非適応的に生じているとは考え難い。むしろ、胎生メスでは、たとえ将来的に退縮させると

Summary (in Japanese)

しても翅原基を形成しておき、環境に応じて迅速に表現型を変化させる発生経路が進化・維持されていると考えられる（第3章）。第2章と第3章では、クローン繁殖というアブラムシの特性に着目することで、形成した原基を分解するという一見無駄な発生過程が発生プログラムの可塑的な改変を支えている、という新たなパラダイムを提唱するに至った。

第4章と第5章では繁殖多型に着目し解析を行った。有性生殖と単為生殖の両者の利点を享受できる周期性単為生殖は、アブラムシの進化的成功を支えるイノベーションであり、環境によって自分の子供の表現型を「産み分ける機構」が獲得されたことで、周期性単為生殖が進化したと言える。特にオス産出時には、他に類を見ないユニークな機構が存在する。アブラムシの性決定様式はオスヘテロ XO 型であり、2本の X 染色体を持つ母虫（胎生メス）が X 染色体を1本しか持たないオスを単為生殖で産出する。つまり、オスになる単為発生卵では、発生過程で X 染色体が1本だけ排除されることになる。アブラムシがこのような複雑かつ洗練された生活史を獲得できた進化的背景を考察するために、本博士論文では本種の繁殖多型の発生制御機構、特にオス産出機構を細胞生物学的手法（第4章）と分子生物学的手法（第5章）を組み合わせで解析した。まずは、オスの初期発生過程を詳細に観察し、オスになる単為発生卵では成熟分裂時(減数分裂に相当)に染色体の不等分配が生じ、非常に大きな極体（極核）を放出することを明らかにした（第4章）。つまり、オスは極体と一緒に X 染色体を過剰に放出し、X 染色体を半減させていると考察できた。このオス産出時の染色体放出は、母虫の胚腺から単為発生卵が排出された直後に生じていたため、母虫の胚腺内で単為発生卵が形成されている間に仔虫の発生運命が決定されると考えられる。そこで、仔虫の産み分け、特にオス産出を制御している分子発生基盤を明らかにするために、胚腺で発現している遺伝子の網羅的な解析（トランスクリプトーム解析）を行った（第5章）。本種の胚腺は直径約 30~40 μ m の微小器官であるため、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM) で正確にかつ効率的に単離した。解析の結果、重複したヒストン遺伝子の使い分けと、系統特異的に獲得・重複した新規遺伝子が環境依存的な染色体放出に寄与していることが示唆された。ヒストンやこの新規遺伝子はエピジェネティックな発生制御に深く関わっている可能性が高く、不等分配による X 染色体放出もエピジェネティックな機構によって制御されていると考察された。また、アブラムシは他の生物に比べ遺伝子数や重複遺伝子が多いことが以前から指摘されていたが、本研究によって重複遺伝子や新規遺伝子の獲得がアブラムシの複雑な生活史を支える基盤となることが強く示唆された。

形態・組織・細胞・分子レベルで多角的に解析を行い、アブラムシの表現型多型に関する新知見を提供できたことで、本論文は表現型可塑性の理解に貢献できたと考えている。本論文で得られた知見がさらなる可塑性研究の端緒となること期待している。

Chapter I

Establishment of the induction systems of sexual morphs using the strains producing different male wing morphs in *Acyrtosiphon pisum*

Abstract

To observe and compare the developmental processes of different aphid phenotypes, i.e. viviparous females, oviparous females and males, the establishment of rearing system that constantly provides nymphs that are destined to these morphs is required. However, it is difficult to identify the developmental fates at the nymphal stage. In this chapter, therefore, optimal photoperiodic and temperature conditions producing viviparous females, oviparous females and male were elucidated to establish the reliable induction systems of these morphs. Successfully, these morphs were obtained at a high certainty level when nymphs produced under a long day condition (16L/8D, 20 °C) were transferred to a short day condition (8L/16D, 15 °C) at the first instar and reared thereafter to produce wingless female progenies, which were continuously reared under a short day condition (15 °C). In addition, laboratory strains producing different wing morphs (winged and wingless) were established from Sapporo populations of *A. pisum*. Furthermore, fundatrices were successfully obtained by exposing fertilized eggs to a low temperature (4 °C) for 50 days. The development of these reliable induction systems with strains producing different morphs provides us with an opportunity to analyze the morph-specific developmental regulations in this aphid species.

Chapter II

Male-specific flight-apparatus development in *Acyrtosiphon pisum*: Comparison with female wing polyphenism

Abstract

Wing polymorphisms observed in many Insecta are important topics in developmental biology and ecology; these polymorphisms are a consequence of tradeoffs between flight and other abilities. The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, possesses 2 types of wing polymorphisms: one is a genetic wing polymorphism occurring in males and the other is an environmental wing polyphenism seen in viviparous females. Although genetic and environmental cues for the 2 wing polymorphisms have been studied, differences in their developmental regulation have not been elucidated. In particular, there is little knowledge regarding the developmental processes in male wing polymorphism. Therefore, in this chapter, the development of flight apparatuses and external morphologies were compared among 3 male wing morphs (winged, wingless, and intermediate). These male developmental processes were subsequently compared with those of female wing morphs. Developmental differences between the male and female polymorphisms were identified in flight muscle development and degeneration but not in wing bud development. Furthermore, the nymphal periods of wingless and intermediate males were significantly shorter than that of winged males, indicating the adaptive significance of male winglessness. Overall, this study indicates that the male and female wing polymorphisms are based on different regulatory systems for flight apparatus development, which are probably the result of different adaptations under different selection pressures.

Chapter III

Two developmental switch points for the wing polymorphisms in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*

Abstract

In many insect taxa, wing polymorphism is known to be a consequence of tradeoffs between flight and other life-history traits. The pea aphid *Acyrtosiphon pisum* exhibit various morphs with or without wings associated with their complex life cycle including wing polyphenism in viviparous females, genetic wing polymorphism in males, and a monomorphic wingless phenotype in oviparous females and fundatrices. While wing differentiation has been investigated in some detail in viviparous females and males, these processes have not yet been elucidated in monomorphic morphs. The ontological development of the flight apparatus, including wings and flight muscles, was therefore carefully examined in oviparous females and fundatrices and compared with other morphs. The extensive histological examinations showed that, flight-apparatus primordia were not at all produced throughout their postembryonic development in oviparous females and fundatrices, suggesting that during the embryonic stages the primordia are degenerated or not developed. In contrast, in viviparous females and males, the differentiation points to winged or wingless morphs occurred at the early postembryonic instars (first or second instar). Based on the above observations together with previous studies, I propose that there are two developmental switch points (embryonic and postembryonic) for the flight-apparatus development in *A. pisum*. Since there are multiple developmental trajectories for four wingless phenotypes (wingless viviparous females, oviparous females, fundatrices, wingless males), it is suggested that

Chapter III

the developmental pathways leading to various morphs were evolutionarily acquired independently under selective pressures specific to each morph. Especially in viviparous females, the delay of determination is thought to contribute to the condition-dependent expressions of alternative phenotypes, i.e. phenotypic plasticity.

Chapter IV

The male production employed X-chromosome reduction by asymmetric maturation division in *Acyrtosiphon pisum*

Abstract

Acyrtosiphon pisum shows thelytokous and viviparous reproduction from spring to fall as well as other temperate aphid species. In response to short day lengths and low temperatures in autumn, it produces males and oviparous females that perform sexual reproduction. Although both males and oviparous females are produced parthenogenetically from viviparous females, males have only one X chromosome whereas females have two. It is known that the reduction of one X chromosome from male-destined oocytes occurs at the maturation division. However, despite some models have been proposed, the process and mechanisms of X-chromosome specific reduction in male-destined oocytes are still poorly understood. To address this issue, chromosomal behaviors at the maturation division were observed in presumptive male oocytes by confocal microscopy. As the result, the polar body nucleus was larger than the nucleus of presumptive male oocytes. This contrasts with previous observations on presumptive female oocytes, in which the polar body nucleus was smaller than the oocyte nucleus. This suggests that the polar body released from the presumptive male oocyte has the X chromosomes excluded from the oocyte. Thus, one X-chromosome might be lost by an asymmetric maturation division in the male-destined oocyte.

Chapter V

Transcriptomics by LCM RNA-seq on the reproductive polyphenism in *Acyrtosiphon pisum*

Abstract

Most aphids show reproductive polyphenism, that is, they alternate their reproductive modes from parthenogenesis to sexual reproduction in response to short photoperiods. Parthenogenetic oocytes can develop into various morphs, including viviparous and oviparous females and males, depending on the maternal physiological states that are affected by surrounding environments. Based on my previous observations, modification of oocytes in germarium is thought to be important for the fate determination. Therefore, to provide a basis for the analysis of the regulatory mechanisms determining developmental fates of parthenogenetic oocytes depending on maternal conditions, transcriptomic analysis of the germaria was carried out in *Acyrtosiphon pisum*. As the results, in germaria in which males are produced with X-chromosome reduction, many genes were highly expressed in comparison with the other categories producing females. Furthermore, histone genes and aphid-specific duplicated (ASD) genes were identified as candidates for the fate determination based on the Gene-Ontology-based enrichment analysis and differential expression analysis. Alignment analyses and peptide second structural analyses implied that the ASD genes have a potential to affect the epigenetic modifications. Thus, gene duplication and epigenetic regulation is suggested to enable aphids to acquire the drastic polyphenism. These discoveries in this analysis will provide a platform for analyzing the developmental regulation in the context of aphid plasticity.