HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究 : 第IX報　種間雑種、Melilotus taurica×M. alba, M. taurica×M. wolgica, および M. dentata×M. taurica の細胞学的研究
Author(s)	佐野, 芳雄; 喜多, 富美治
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 9(1), 1-9
Issue Date	1973-12-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11849
Type	bulletin (article)
File Information	9(1)_p1-9.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究

第 IX 報　種間雑種, *Melilotus taurica*×*M. alba*, *M. taurica*×*M. wolgica* および *M. dentata*×*M. taurica* の細胞学的研究[1)]

佐　野　芳　雄
(北海道大学農学部育種学教室)

喜　多　富　美　治
(北海道大学農学部附属農場)

Studies of Interspecific Hybrids in the Genus *Melilotus* from the Plant Breeding Standpoint

IX. Cytological Studies of the Interspecific Hybrids, *Melilotus taurica*×*M. alba*, *M. taurica*×*M. wolgica*, and *M. dentata*× *M. taurica*

Yoshio SANO and Fumiji KITA
(Plant Breeding Institute, and Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received, January 12, 1973

I. 緒　　言

Melilotus 属すなわち Sweetclover の種間交雑による育種の基礎研究として，著者らは種間相互の細胞学的関係を明らかにする目的で，一連の交雑実験を遂行中である。

Eumelilotus 亜属には 9 種が分類され，これらの間における種間雑種 F_1 の多くは幼苗時に葉緑素欠乏を呈し，これら種間の隔離機構の重要な要因の 1 つと考えられている (SMITH 1954)。

さらに，これらいくつかの種間には相互転座に由来する染色体構造差の存在することが報告され (BRINGHURST 1951, JARANOWSKI 1961, 喜多 1962), *Eumelilotus* 亜属の系統発生上，興味ある問題を提起しつつある。

著者らは，*Eumelilotus* 亜属に含まれる多くの系統を用いて種間交雑を行ない，いくつかの組合せにおいて種間雑種 F_1 を得開花登熟まで育成することが出来た。本報においては，そのうち 4 種 6 系統間の交雑より得られた種間雑種 F_1 について詳細な観察を行ない，これら種間の細胞学的関係に関し若干の興味ある結果が得られたのでここに取纒め報告する。

なお本実験に供試した材料は DR. H. J. GORZ[2)] および DR. G. A. STEVENSON[3)] より提供せられたもので，ここに記して深甚なる謝意を表する。また実験遂行と取纒めに関し種々懇篤な御教示を賜わった北海道大学農学部教授・高橋萬右衛門博士ならびに文部教官・新関稔氏に対し心より深く感謝の意を表するとともに，実験遂行上御協力いただいた文部技官・渡会萬治・飛渡正夫・赤川昭爾の 3 氏に心から謝意を表する次第である。

II. 実験材料および方法

Eumelilotus 亜属には 9 種が含まれるが，本実験にはそのうち 4 種 (*M. alba*, *M. taurica*, *M. wolgica* およ

1) 北海道大学農学部附属農場業績
2) Crops Research Division, ARS, USDA, Lincoln Nebr.
3) Research Station, Canada Depertment of Agriculture, Brandon, Manitoba.

Table 1. Number of seeds and seedlings obtained from crosses between pairs of species in the subgenus *Eumelilotus*

cross			no. of flowers	no. of seeds	no. of seedlings	
					selfs	hybrids
M. taurica 70	×*M. alba*	Cumino	27	10	4	6
M. taurica 70	×*M. alba*	Denta	34	3	2	1
M. taurica P. I. 314094	×*M. alba*	Cumino	8	6	3	3
M. taurica 70	×*M. wolgica*	58-254	83	27	21	6
M. dentata 58-190	×*M. taurica*	70	17	4	2	2
M. dentata 58-190	×*M. taurica*	P. I. 314094	20	5	2	2

び *M. dentata*) 6系統を供試した。これらの系統のうち，*M. alba* Cumino および *M. alba* Denta はともに (*M. alba*×*M. dentata*)×*M. alba* の戻し交雑法により *M. dentata* より 'low coumarin gene' を導入した育成品種であるが他の系統はいずれも野生系統である。

これらの系統を用い1971年および1972年の両年冬季に温室内で交配を行なった。用いた種および系統，交配花数，得られた種子数，自家受精した個体数および得られた種間雑種 F_1 の個体数を示すと Table 1 のごとくである。

得られた種間雑種 F_1 はいずれも幼苗時にかなりの程度の葉緑素欠乏を呈し，種間雑種であることが容易に判定出来た。いずれの種間雑種 F_1 も世代短縮の目的で長日処理下で栽培管理され，順調に成育し開花登熟に達した。

交配の方法および減数分裂の観察の方法は前報 (1973) に従った。

III. 実験結果

1. 親の種の細胞学的観察

各親の種の花粉稔率は Table 2 に示されたごとくいずれも極めて高かった。また花粉母細胞の減数分裂における M-I では規則的に 8II を形成し (Fig. 1)，他の時期においても異常は観察されなかった。これらのことより，本実験に供試した各親の種はいずれも細胞学的に安定していると考えられる。

しかしながら，*M. alba* Cumino および *M. alba* Denta はともに *M. dentata* より 'low coumarin gene' を導入された育成品種である。またこれら2系統と *M. taurica* との交雑において，その種間雑種 F_1 はいずれも開花登熟に達するが，*M. alba* の他の系統と *M. taurica* との交雑では既に報告されたとおり (SMITH 1954, KITA 1965) いずれも発芽後まもなく強度の葉緑素欠乏のため枯死した。

Table 2. Pollen fertility of the parental species and strains

species and strain		pollen fertility (%)
M. alba	Cumino	99.3
	Denta	97.7
M. taurica	70	98.4
	P. I. 314094	98.1
M. wolgica	58-254	99.2
M. dentata	58-190	98.7

著者らは予め *M. alba* Cumino および *M. alba* Denta の2系統と *M. alba* の他の系統とが同じ染色体構造をもつかどうかを検討するため，これら2系統を含む多くの *M. alba* の系統を用い，*M. suaveolens*, *M. officinalis*, *M. polonica* の3種との間で交雑実験を行なった。詳しくは続報に譲るが，この交雑実験の結果より染色体構造に関し系統間差異は存在しないと推定された。しかしながら厳密には，*M. alba* の系統間雑種を作出しその染色体行動を検討する必要があると考える。

2. 種間雑種の細胞学的観察

各交雑組合せの種間雑種 F_1 の花粉稔率を一括して Table 3 に示した。*M. taurica*×*M. wolgica* F_1 は 74.5% とかなり高い稔性を示したが，他の種間雑種 F_1 はいずれも著しい花粉不稔を示した。

次に減数分裂の染色体行動の観察を行なったが，*M. taurica*×*M. alba* の3組合せの F_1 はいずれも各々類似の異常を示した。すなわち，diakinesis では 1IV+6II (Fig. 2 b, c) の接合型が高頻度に出現し他に 1III+6II+1I, 8II および 7II+2I が出現した。また極めて低頻

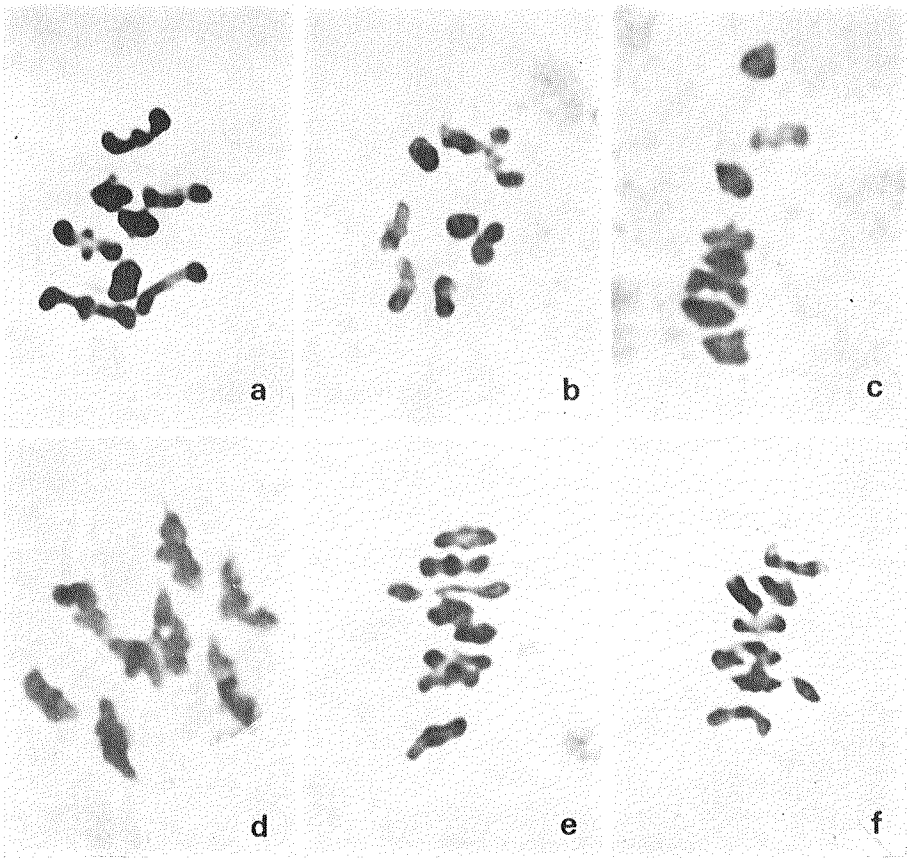

Fig. 1. Metaphase-1 in meiosis of the parental species. ×2200.
a. *M. alba* Cumino　b. *M. alba* Denta.　c. *M. taurica* 70.
d. *M. taurica* P. I. 314094　e. *M. wolgica* 58-254　f. *M. dentata* 58-190.

Table 3. Pollen fertility of the interspecific F_1 hybrids

cross			pollen fertility (%)
M. taurica 70	×*M. alba*	Cumino	—*
M. taurica 70	×*M. alba*	Denta	25.2
M. taurica P. I. 314094	×*M. alba*	Cumino	27.7
M. taurica 70	×*M. wolgica*	58-254	74.5
M. dentata 58-190	×*M. taurica*	70	42.2
M. dentata 58-190	×*M. taurica*	P. I. 314094	24.7

* No check.

度であるが 1III+5II+3I, 6II+4I の接合型も観察された。M-I でも 1III+6II+1I (Fig. 3 a), 1IV+6II (Fig. 2 d, e, f) の接合型が高頻度に出現し，他に 7II+2I, 8II さらに 1IV+5II+2I, 1III+5II+3I, 6II+4I の接合型が観察された。また An-1 および An-2 では遅滞染色体等の異常が高頻度に出現した (Fig. 3 b, c, d)。それらの出現頻度を一括して Table 4 に掲げた。

diakinesis および M-1 の染色体行動から原則的に

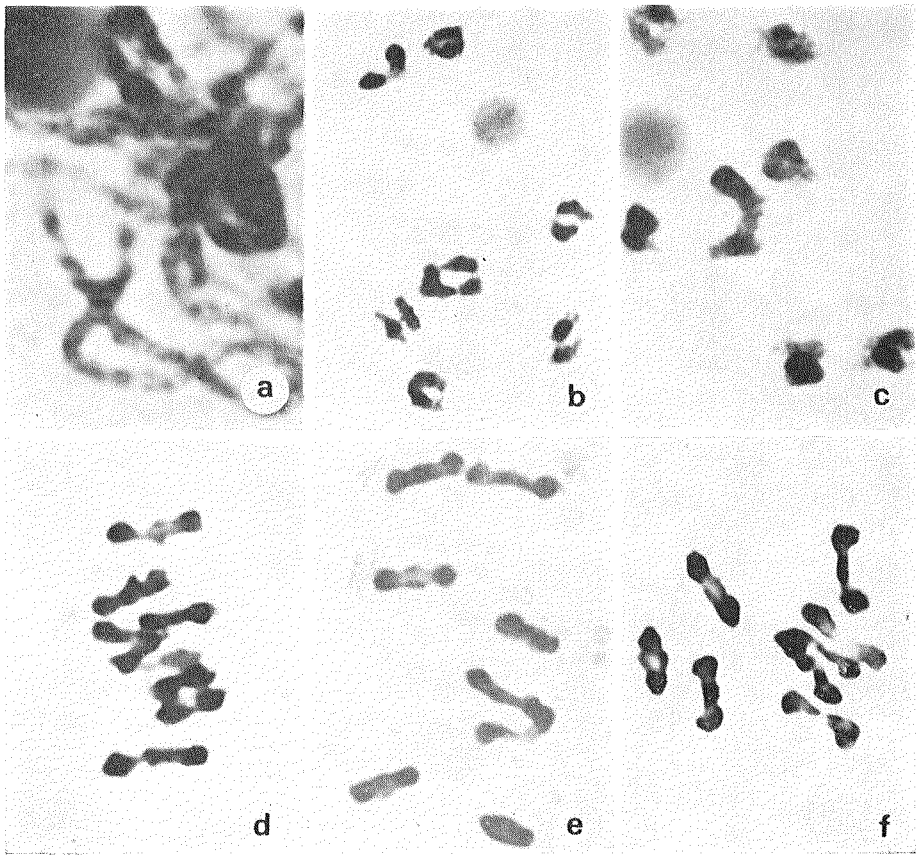

Fig. 2. Different stages in meiosis of the F_1 hybrids, *M. taurica*×*M. alba*.

a. *M. taurica* P. I. 314094×M. *alba* Cumino F_1. Pachytene with a cross-shaped configuration. ×3750.
b. *M. taurica* 70×*M. alba* Cumino F_1. Diakinesis with 6II plus a ring of 4 chromosomes. ×1650.
c. *M. taurica* 70×*M. alba* Denta F_1. Diakinesis with 6II plus a chain of 4 chromosomes. ×2200.
d. The same F_1 as b. Metaphase-1 with a chain of 4 chromosomes which show alternate separation. ×2200.
e. The same F_1 as b. Metaphase-1 with a chain of 4 chromosomes which show adjacent separation. ×2200.
f. The same F_1 as b. Metaphase-1 with IIV+6II. ×2200.

1つのIV価染色体が形成され，このIV価を形成する染色体の1本が多くの場合早期離反するためにM-1では1III+6II+1I等の接合型の出現が増加するものと考えられる。このIV価染色体の出現は，両親の種が2倍体であり減数分裂のM-1で規則的に8IIを形成することから，これら種間雑種F_1が相互転座に関しヘテロ接合体となるために生じるものと考えられる。また，pachytene の観察においても相互転座を示す 'cross shape' を観察した (Fig. 2 a)。以上のことは花粉稔率の結果とも一致する。

一方，*M. taurica*×*M. wolgica* F_1 における減数分裂の観察では，diakinesis および M-1 において規則的に 8II が形成され (Fig. 4 a, b, c)，他に低頻度ながら 7II+2I の接合型が観察された。また，An-1 および An-2 においても顕著な異常は観察されなかった (Fig. 4 d および Table 5)。

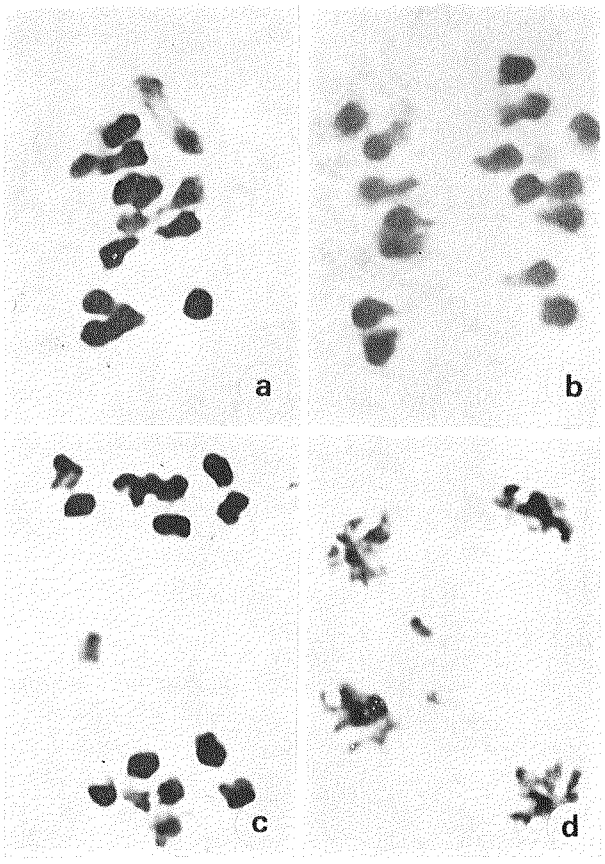

Fig. 3. Different stages in meiosis of the F_1 hybrids, *M. taurica*×*M. alba*. ×2200.

a. *M. taurica* 70×*M. alba* Cumino F_1. Metaphase-1 showing 1III+6II+1I configuration.
b. *M. taurica* P. I. 314094×*M. alba* Cumino F_1. Anaphase-1 showing 7–9 separation.
c. The same F_1 as a. Anaphase-1 showing a lagging chromosome.
d. The same F_1 as a. Anaphase-2 showing lagging chromosomes.

Table 4. Chromosome configurations at diakinesis and metaphase-1 and their distribution in later stages in the F_1 hybrids, *M. taurica*×*M. alba*

cross	stage	frequency of PMCs with									total
		1IV+6II	1III+5II+2I	1III+6II+1I	1III+5II+3I	8II	7II+2I	6II+4I	nor.	abnor.	
M. taurica 70 × *M. alba* Cumino	Diakinesis	89		10	4	20	10	2			135
	Metaphase-1	50	7	110	2	14	26	5			214
	Anaphase-1								73	77	150
	Anaphase-2								87	63	150
M. taurica 70 × *M. alba* Denta	Diakinesis	64		4		16	4				88
	Metaphase-1	15	2	19		3	3				42
	Anaphase-1								51	11	62
	Anaphase-2								29	10	39
M. taurica P. I. 314094 × *M. alba* Cumino	Diakinesis	38		4		6					48
	Metaphase-1	26	1	40	1	7	9	3			87
	Anaphase-1								58	18	76
	Anaphase-2								39	17	56

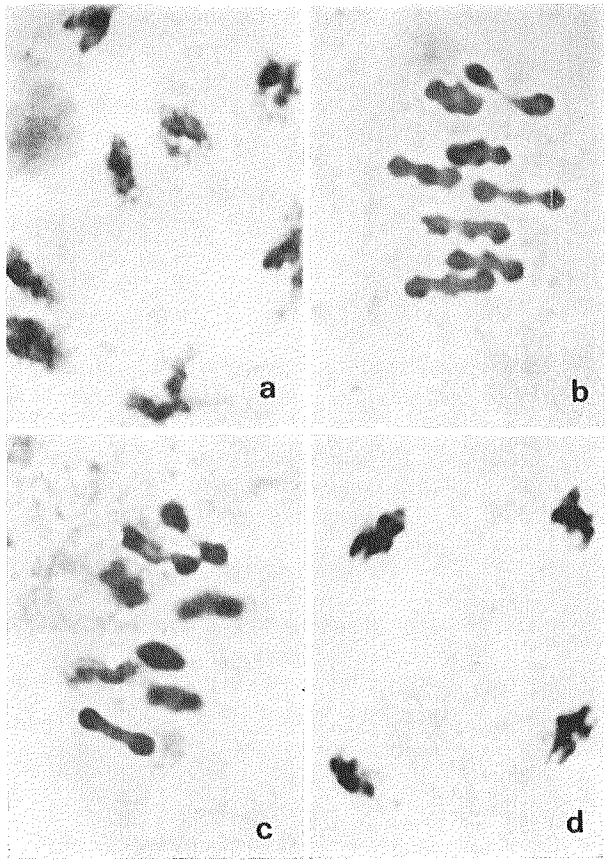

Fig. 4. Different stages in meiosis of the F_1 hybrid, *M. taurica*×*M. wolgica* 58–254. ×2200.

a. Diakinesis with 8II.
b. Metaphase-1 with 8II.
c. The same as b.
d. Anaphase-2 showing normal separation.

Table 5. Chromosome configurations at diakinesis and metaphase-1 and their distribution in later stages in the F_1 hybrids, *M. taurica*×*M. wolgica* and *M. dentata*×*M. taurica*

cross	stage	frequency of PMCs with				total
		8II	7II+2I	nor.	abnor.	
M. taurica 70 × *M. wolgica* 58–254	Diakinesis	125	3			128
	Metaphase-1	83	22			105
	Anaphase-1			89		89
	Anaphase-2			70	2	72
M. dentata 58–190 × *M. taurica* 70	Diakinesis	109	13			122
	Metaphase-1	85	38			123
	Anaphase-1			150	18	168
	Anaphase-2			64	10	78
M. dentata 58–190 × *M. taurica* P. I. 314094	Diakinesis	89	9			98
	Metaphase-1	54	14			68
	Anaphase-1			51	1	52
	Anaphase-2			43	3	46

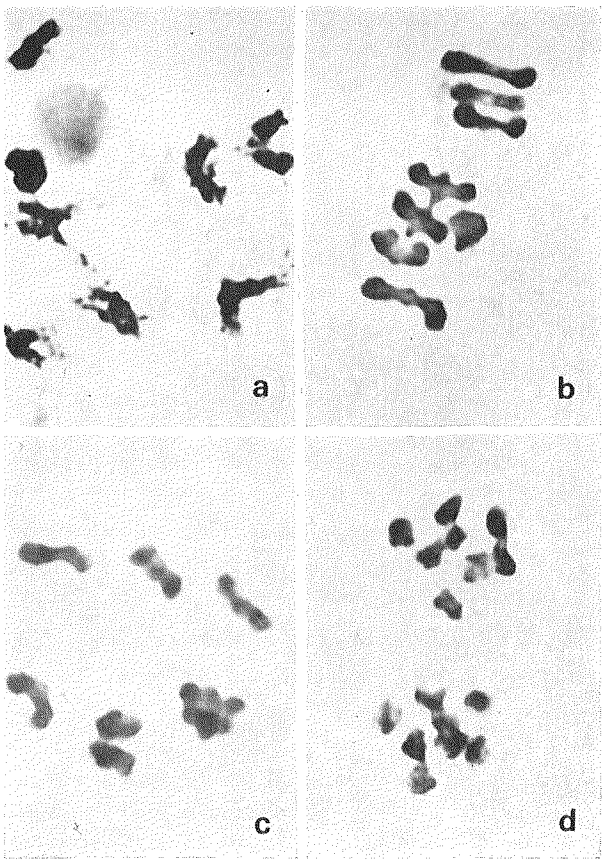

Fig. 5. Different stages in meiosis of the F_1 hybrids, *M. dentata*×*M. taurica*. ×2200.

a. *M. dentata* 58-190×*M. taurica* 70 F_1. Diakinesis showing 8II configuration.
b. The same F_1 as a. Metaphase-1 showing 8II configuration.
c. *M. dentata* 58-190×*M. taurica* P. I. 314094 F_1. Metaphase-1 showing 8II configuration.
d. The same F_1 as a. Anaphase-1 showing normal separation.

さらに，*M. dentata*×*M. taurica* の2組合せの F_1 では，花粉稔率は極めて低かったにもかかわらず減数分裂における染色体行動は概して正常であった。すなわち，diakinesis および M-1 では高頻度で 8II が出現し (Fig. 5 a, b, c), An-1 および An-2 においても正常に分離するものが多く観察された (Fig. 5 d および Table 5)。

これらのことより，*M. taurica*×*M. wolgica* F_1 および *M. dentata*×*M. taurica* F_1 の染色体行動はともに概ね正常であると考えられる。

IV. 論　　議

Eumelilotus 亜属における種間雑種 F_1 には，幼苗時に種々の程度の葉緑素欠乏が出現し，このことは *Eumelilotus* 亜属に含まれる種間に働く隔離機構のうちの大きな要因の1つと考えられる。

SMITH (1954) は，*Eumelilotus* 亜属の8種の間で広汎な交雑を行い，交雑和合性と種間雑種 F_1 に出現する葉緑素欠乏の程度によりこれら8種を GROUP A (*M. alba*, *M. polonica*, *M. suaveolens*), GROUP B (*M. altissima*, *M. dentata*, *M. taurica*, *M. wolgica*) および GROUP C (*M. officinalis*) に分類した。その後，*M. officinalis* および *M. hirsuta* はともに GROUP A に分類されるのが妥当であることが報告された (WEBSTER 1955, 喜多 1962)。

これより先，SMITH (1943) は GROUP A に含まれる *M. alba* と GROUP B に含まれる *M. dentata* の種間雑種 F_1 は著しい葉緑素欠乏を呈し発芽後まもなく枯死するが，接木によりその F_1 植物を開花登熟まで育成することに成功した。さらに BRINGHURST (1951) は，この種間雑種を供試して (*M. alba*×*M. dentata*)×*M. alba* の減数分裂における pachytene の観察より 'cross shape' の出現することを認め，*M. alba* と *M. dentata* の種間には相互転座に由来する染色体構造差の存在することを示唆した。

本実験に供試した *M. alba* Cumino および *M. alba* Denta はともに，前述したようにこの (*M. alba*×*M. dentata*)×*M. alba* の後代より作出した 'low coumarin gene' を *M. alba* に導入した育成品種であり，他の *M.*

alba の系統とは若干性質を異にしている。すなわち，*M. alba* と *M. taurica* の種間雑種 F_1 は著しい葉緑素欠乏により発芽後まもなく枯死するが，本実験より明らかなごとく *M. alba* Cumino および *M. alba* Denta 2系統と *M. taurica* との交雑において，その種間雑種 F_1 はいずれもかなりの程度の葉緑素欠乏を示すが開花登熟まで生育を続ける。このことは，*M. alba* Cumino および *M. alba* Denta 2系統が *M. dentata* より遺伝子の導入されたことに原因していると考えられる。また先に述べたように，多少の疑問は残るが，*M. alba* Cumino および *M. alba* Denta はともに *M. alba* の他の系統と同一の染色体構造をもつと考えられる。このことと本実験より得られた *M. taurica*×*M. alba* F_1 の結果を考え合せると *M. taurica* と *M. alba* の種間には2つの非相同染体間に起る相互転座に由来する染色体構造差が存在すると考えられる。さらに，*M. taurica*×*M. wolgica* F_1 および *M. dentata*×*M. taurica* F_1 の結果より，*M. taurica*, *M. wolgica*, および *M. dentata* の3種の間には細胞学的差異はないと考えられる。以上のことを総合すると，*M. alba* と *M. dentata* の間には当然相互転座に由来する染色体構造差の存在することが推定されるが，このことは BRINGHURST (1951) の報告に一致する。

しかしながら，*M. taurica*, *M. wolgica* および *M. dentata* の3種と *M. alba* の間に存在する相互転座由来の染色体構造差が同一起源のものかどうかに関しては疑問が残る。すなわち，花粉稔率の結果より *M. taurica* と *M. wolgica* に存在する *M. alba* との間の染色体構造差は同一起源であると考えられるが，*M. dentata*×*M. taurica* F_1 の花粉稔率が極めて低かったことより，*M. dentata* と *M. taurica* に存在する *M. alba* との間の染色体構造差が切断点を異にする相互転座によるものすなわち同一起源ではない可能性のあることが示唆される。しかしながら，この低稔性の原因が遺伝子支配によることも当然考えられることより，*M. dentata* の染色体構造に関しては今後さらに検討する必要があると考える。いずれにしても，*M. taurica*, *M. wolgica* および *M. dentata* の3種と *M. alba* との間には2つの非相同染色体間における1つの相互転座に由来する染色体構造差が存在すると考えられる。

V. 摘　　要

Melilotus 属 (Sweetclover) の *Eumelilotus* 亜属に含まれる4種 (*M. alba*, *M. taurica*, *M. wolgica* および *M. dentata*) 6系統間で交雑を行い，得られた種間雑種 F_1 に関し主として細胞学的な研究結果を取纒め報告した。結果を要約すると次のごとくである。

1. *M. dentata* より 'low coumarin gene' の導入された *M. alba* Cumino および *M. alba* Denta の2系統はともに *M. taurica* と容易に交雑出来，それらの種間雑種 F_1 はかなりの程度の葉緑素欠乏を呈するがいずれも開花登熟まで成育した。

2. *M. taurica*×*M. alba* F_1 の減数分裂における diakinesis および M-1 において，1つの IV 価染色体が出現した。このことより，これらの種間雑種 F_1 は相互転座に関しヘテロ接合体であることが明らかとなった。

3. *M. taurica*×*M. wolgica* F_1 および *M. dentata*×*M. taurica* F_1 の減数分裂における染色体行動はいずれも概ね正常であった。したがって，*M. taurica*, *M. wolgica* および *M. dentata* の3種の間には細胞学的差異はないと考えられる。

4. 以上のことより，*M. taurica*, *M. wolgica* および *M. dentata* の3種と *M. alba* の種間には相互転座に由来する染色体構造差が存在すると考えられる。

参 考 文 献

1) BRINGHUST, R. S. (1951): Genetic analysis of chlorophyll deficiency in *Melilotus alba*×*M. dentata* hybrids with some observations on meiotic irregularities. Summaries of Doctoral Dissertations, Univ. Wis. **11**: 96–97.

2) GORZ, H. J., and W. K. SMITH (1961): Use of diverse germ plasm in the improvement of some forage legumes. *Germ Plasm Resouces.* 149–159.

3) JARANOWSKI, J. K. (1961): Semisterility in the interspecific hybrid, *Melilotus polonica*×*M. alba.* Amer. J. Bot. **48**: 28–35.

4) 喜多富美治 (1962): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究，第I報 種間雑種 *Melilotus alba*×*M. hirsuta* の細胞遺伝. 北大邦文紀要，第4巻，第1号 67–74.

5) KITA, F. (1965): Studies on the genus *Melilotus* (Sweetclover) with special reference to interrelationships among species from a cytological point of view. J. Fac. Agri. Hokkaido Univ. **54**: 22–121.

6) 喜多富美治・佐野芳雄 (1972): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究，第VII報 種間雑種 *Melilotus officinalis* P. I. 178985×*M. alba* var. Cumino の細胞遺伝. 北大農場報告，第18号 1–6.

7) 佐野芳雄・喜多富美治 (1973): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究，第 VIII 報 種間雑種 *Melilotus alba*×*M. suaveolens*, *M. polonica*×*M. suaveolens* および *M. hirsuta*×*M. suaveolens* の細胞学的研究. 北大邦文紀要，第 8 巻，第 4 号 411-419.

8) SHASTRY, S. V. S., W. K. SMITH, and D. C. COOPER (1960): Chromosome differentiation in several species of *Melilotus*. Amer. J. Bot. **47**: 613-621.

9) SMITH, W. K. (1943): Propagation of chlorophyll-deficient sweetclover hybrids as grafts. J. Heredity **34**: 135-140.

10) ———— (1948): Transfer from *Melilotus dentata* to *M. alba* of the genes for reduction in coumarin content. Genetics, **33**: 124-125.

11) ———— (1954): Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. Genetics **39**: 266-279.

12) WEBSTER, G. T. (1955): Interspecific hybridization of *Melilotus alba*×*M. officinalis* using embryo culture. Agron. J. **47**: 138-142.

Summary

Three interspecific F_1 hydrids, *Melilotus taurica*×*M. alba*, *M. taurica*×*M. wolgica*, and *M. dentata*×*M. taurica* were studied in order to make clear the picture of the cytological relationships among the species belonging to the genus *Melilotus*. The results obtained are summarised as follows:

1. Generally, the F_1 hybrids between *M. alba* and *M. taurica* cannot grow to flowering stage due to chlorophyll deficiency. However, using two low coumarin varieties of *M. alba*, Cumino and Denta which are derivatives of the crosses of (*M. alba*×*M. dentata*)×*M. alba*, the F_1 hybrids from the crosses of *M. taurica*×*M. alba* in this experiment showed moderate chlorophyll deficient in the seedling stage and were able to grow to maturity.

2. In the interspecific hybrids, *M. taurica*×*M. alba*, a ring or chain of 4 chromosomes was observed at diakinesis and metaphase-1, which indicated that these F_1 hybrids were heterozygous for a reciprocal translocation.

3. In the two interspecific F_1 hybrids, *M. taurica*×*M. wolgica* and *M. dentata*×*M. taurica*, chromosome behaviors in the course of meiosis were regular. These observations indicate that there is no structural difference of chromosomes among three species, *M. taurica*, *M. wolgica*, and *M. dentata*.

4. Henceforce, it is considered cytologically that *M. alba* differs from the three species, *M. taurica*, *M. wolgica*, and *M. dentata* by one reciprocal translocation.