HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イネの遺伝的雄性不稔性と雑種不稔性に関する育種学的研究
Author(s)	田丸, 典彦
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 19(2), 203-256
Issue Date	1994-11-09
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12162
Type	bulletin (article)
File Information	19(2)_p203-256.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大農邦文紀要 19(2)：203～256，1994

イネの遺伝的雄性不稔性と雑種不稔性に関する育種学的研究

田　丸　典　彦*
（博士論文，北海道大学大学院農学研究科）

（平成6年3月29日受理）

Breeding Studies on Genetic Male Sterility and Hybrid Sterility in Rice (*Oriza sativa* L.)

Norihiko TAMARU
(Doctoral thesis, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, JAPAN)

目　次

I　緒言 ……203
II　核遺伝子型雄性不稔
　1．緒言 ……205
　2．雄性不稔突然変異系統の由来 ……205
　3．雄性不稔系統の自殖種子稔性と人工受粉結実率 ……205
　4．遺伝様式 ……207
　5．雄性不稔遺伝子の同定実験 ……210
　6．ヨウ素ヨウ化カリ染色性花粉の出現頻度と葯の形態 ……214
　7．花粉の発育異常 ……219
　8．開花習性の変動 ……222
III　細胞質・核遺伝子型雄性不稔の細胞学的観察
　1．緒言 ……227
　2．材料および方法 ……227
　3．結果と考察 ……228
IV　雑種不稔性における花粉形態
　1．緒言 ……229
　2．材料および方法 ……230
　3．結果 ……230
　4．考察 ……233
V　総合討論 ……235
摘要 ……236
謝辞 ……239
引用文献 ……239
Summary ……242
Plate ……247

* 北海道教育大学釧路校農学研究室
〒085 釧路市城山1－15－55
Agricultural Laboratory, Kushiro Campus, Hokkaido University of Education, Kushiro 085, Japan

I　緒　言

イネの空籾は目につき易いこと，収量減に直接結びつく現象であることから，今日まで遺伝的および生理的要因による不稔性に関する研究は極めて多い。イネの不稔性を生育相からみると，幼穂分化に始まる穎花の正常な形態形成が，何等かの原因により乱され，最終的には穀粒の形成が妨げられる結果として生ずる。したがって，不稔の要因は多種多様であるが，大別すれば環境的要因と遺伝的要因に分類される[1]。

環境的要因による不稔性には，不稔発生の直接的原因が病害虫や冷温および乾燥等の外的要因により起こる不稔が含まれる。育種的には，これらの要因に対する抵抗性遺伝子源のあることから耐性遺伝子の探求と品種への導入といった育種操作が重要となる[2]。遺伝的要因による不稔性には，染色体の構造的差異によるものや，穎花の形態異常のように不稔遺伝子の形質発現によって不稔を生ずる場合，さらに雄性不稔あるいは雑種不稔のように直接配偶子の発育を支配する遺伝的要因のある場合等，これまでに多数の報告がある[3]。それらの遺伝的不稔性のうち，雄性不稔性と雑種不稔性はともに，イネの一代雑種育種に関わる重要な不稔性として注目されている。

穀類におけるヘテロシス利用の一代雑種品種は，他殖性作物であるトウモロコシにおいて1930年代に商品化され，収量を一挙に3倍以上も向上させるといった，高い収量性が認められたために，アメリカの主要トウモロコシ生産地帯では約10年以内に

旧来の品種と置き換えられた[4]。トウモロコシの一代雑種育種の成功は，その後同様な他植性作物である，テンサイ，タマネギ等にも適用され，さらに，近年では，収量性ばかりでなく品質の均一性や，両親系統の優良形質を統合させるために，野菜や花類に広く用いられるところとなった[5]。

しかし，自殖性作物であるイネやコムギ等の穀類では，その繁殖様式から，雑種種子を得ることが容易ではなく，しかも実用栽培での単位面積当たりの所用種子量が多い等の種苗生産上の困難が指摘された。したがって，イネにおけるヘテロシス利用のF_1品種の開発は，優良な交雑組合せによる収量性の増大とともに，F_1の効率的な大量採種体系の確立が不可欠となった。さらに，採種体系には他殖率を高めるための生殖器官の改良や，出穂期の同調性といった問題等も検討されねばならない[6]。

現在，イネのF_1ハイブリッド採種における花粉の遺伝的制御には，3種の方法が考えられている。

第一は，細胞質・核遺伝子型雄性不稔性の利用で，トウモロコシ等の各種の作物で用いられており，3系法と称されている。すなわち，雄性不稔系統(A)，維持系統（B），稔性回復系統（R）の3系が必要である。イネでは，SHINJHO[7]が，Chinsura Boro II と台中65号の交配から上記3系統の育成を報告した。3系法は，遺伝的制御が確実なこと，一度この系が確立されると毎年交配を繰り返し，F_1採種ができることから，その利用価値が非常に高い。中国では海南島産野生イネの細胞質（WA型）を用いて実用品種の育成が盛んに行なわれている[8]。しかし欠点としては，3系について別々の育種操作による系統育成が必要であり，雄性不稔細胞質とともに，それに対する特有の稔性回復遺伝子（*Rf*）の探索が入用となり，それを目的のR系統へ導入する必要がある。

第二は，2系法と呼ばれるもので，雄性不稔系統(A)に，日長や温度条件によって，不稔→可稔の変動が起こる環境反応型の遺伝子を導入する方法である。この場合，維持系統（B）は不用となり，雄性不稔系統（A）自体を可稔環境下において種子を生産すればよい。中国において石[9]は，13時間45分の長日条件では不稔となり，短日条件へ戻すと稔性を回復するような雄性不稔系統を報告した。その後このような変異体が相次いで見い出され，育種的利用へ有望なことが指摘されている[10,11,12]。中国では3系法から環境反応型の遺伝子型雄性不稔を利用する2系法による育種体系への移行が進められつつあるという[13]。

第三の1系法は，未完成の方法であるが，アポミクシス現象を用いて，F_1の遺伝子型をそのまま固定させる方式であり，イネ科の牧草の一部にみられる如く種子の形で無性繁殖をさせる生殖法の利用である。鳥山[14]は，イネにおけるアポミクシス育種の可能性について，まずアポミクシスを常習とする変異体を探索するか，人為誘発の突然変異により作出する試みを行うことの外に，細胞融合や組換えDNAの手法によりアポミクシスを常習とする異種からアポミクシス遺伝子を導入することが重要であることを論じている。なお，最近，GUO and MU[15]は双子の種子についての選抜からアポミクティックな変異体を報告しており，今後の育種での活用が注目されている。

一般にヘテロシス効果は遠縁間の交配で大きいとされるが，イネでは遠縁品種間交雑のF_1に不稔が生ずることが多く，組合せ能力の高い育種素材の開発の障害となっている[16]。栽培イネ品種間に見られる雑種不稔性については，今日まで極めて多くの報告がなされている。佐野[17]は，イネの雑種不稔性を支配する遺伝要因について，(1)核内遺伝子の相互作用，(2)染色体構造差，(3)細胞質と核内遺伝子の相互作用によるものが考えられるとしている。F_1不稔性に関する理論として，岡[18]は配偶子発育因子を仮定し，北村[19]は，1対立遺伝子の相互作用による不稔性を説明した。IKEHASI and ARAKI[20]は，日本型イネとインド型イネの双方に正常な種子稔性を示す広親和性遺伝子(S-5^n)をインドネシア在来種より見いだしている。一代雑種品種の実用化には，このような不稔緩和遺伝子を利用して，F_1不稔性を回避する方策が図られている。丸山[21]は雑種不稔緩和遺伝子を片親に導入することによってF_1不稔性の問題は解決され，F_1の多収性が実証されたと述べている。

さて，イネにおける雄性不稔性の研究を概観すると，細胞質・核遺伝子型雄性不稔については，中国において起源を異にするいくつかの雄性不稔細胞質が見い出されて，実際の育種場面で用いられている[8]。また，それらの葯や花粉の形態についての細胞組織学的研究も行なわれている[22]。さらに，Boro型細胞質については，ミトコンドリアDNAの分子生物学的検討[23,24,25]がなされている。核遺伝子型雄性

不稔については，雄性不稔遺伝子を活用する戻し交雑育種法が提案され[26]，更に一代雑種品種の採種への利用も図られている。そのため，各種の変異源を用いて人為的に雄性不稔突然変異を誘発させる試みが盛んに行なわれた[27]。しかも，中国では，環境反応型雄性不稔の育種への実用化が取り組まれたことから，今後育種に有効な雄性不稔遺伝子源の作出や探索が盛んになると考えられる。

核遺伝子型雄性不稔に関するこれまでの研究は，雄性不稔系統の作出と遺伝子分析についての報告は多くみられるが，個々の遺伝子の作用機構についての研究は，必ずしも十分ではない。雄性不稔遺伝子は，雄性生殖器官に特異的に作用し，葯や花粉の正常な形態形成を妨げる。したがって，花粉発育の各段階に添った細胞組織学的な研究方法が必要となる。トウモロコシ[28]やトマト[29]等多くの雄性不稔遺伝子が見い出されている作物では，このような面から個々の雄性不稔の作用性を検討し，遺伝子の同定に役立てている。イネでは，生殖器官の形態形成の面から不稔機構を明らかにしようとする研究は，遺伝的雄性不稔性よりも，むしろ，環境的要因，たとえば冷温によって生ずる不稔性の研究に多くみられる。これらの分野では，不稔発生を不良環境下におけるイネ体のストレス反応として捕らえる見地から，生殖器官の形態形成や生殖生理の異常を発育段階に添って検出しようという試みが多くなされた。酒井[30]は冷温障害によりタペート細胞の異常を生ずることを報告し，SATAKE[31]は，冷温感受性がもっとも高い時期は，従来の定説とされてきた減数分裂期ではなく，小胞子期であることを明らかにした。また，山田[32]は窒素過剰追肥による不稔発生を解明する目的で，花粉の発育に伴う基本的な物質代謝を明かにした。これらの業績は，環境要因によって生ずる，一時的な雄性不稔を花粉の形態形成の面から検討したものである。

本研究では，人為的に誘発された29種の核遺伝子型雄性不稔系統について，総当たり交配により各系統の有する雄性不稔遺伝子の異同を明らかにするとともに，上記のような観点から，雄性不稔遺伝子の作用を，雄性生殖器官の形態形成の経過に添って類別した。また，雄性不稔遺伝子の多面作用として，雄性不稔イネの開花習性の変動を明らかにした。細胞質・核遺伝子型雄性不稔性とF_1の雑種不稔性については両者を対応させて，花粉の形態形成の面から不稔性の発現機構を検討した。

II　核遺伝子型雄性不稔

1．緒　　言

イネの核遺伝子型雄性不稔は，古くから自然突然変異体として圃場において見い出された[33]。しかし，近年，雄性不稔遺伝子の育種的価値が重要視され[26,1]，各種の変異原を用いて人為的に多くの突然変異体が作出された[34,35,36,37,38,39,40]。

本実験では，ニホンマサリより人為的に誘発された29種の雄性不稔突然変異体の後代系統について，それぞれの雄性不稔遺伝子の同定と作用性を明らかにする目的で，1）雄性不稔遺伝子の遺伝様式と同定，2）葯組織および花粉の形態観察，3）開花習性の変動を調査した。

2．雄性不稔突然変異系統の由来

本実験に用いられた29種の核遺伝子型雄性不稔系統の由来を**Table 1**に示した。雄性不稔系統は，いずれもニホンマサリから放射線あるいはエチレンイミン処理により誘発された人為突然変異体の後代である。これらのうち，MS-1からMS-26の26系統についてはHIRAIWA and TANAKA[36]により，また，MS-27，MS-28，MS-29の3系統についてはFUJIMAKI et al.[35]により作出経過が報告されている。さらに，合わせて29系統の系譜について藤巻・平岩[41]により報告がなされている。筆者は，北陸農業試験場で維持されていたこれらの核遺伝子型雄性不稔系統を，1983年に株分けにより分譲を受けた。

3．雄性不稔系統の自殖種子稔性と人工受粉結実率

1）実験の目的

雄性不稔系統のなかには低稔性ではあるが自殖種子稔性を有する系統が含まれていたことから，各雄性不稔系統の自殖種子稔性を調査した。また，雌性器官の受精能力を確認するために正常花粉による交配実験を行なった。

2）材料および方法

各雄性不稔系統はいずれも5月に株分けし，2リットルポットに2本植として，温室と自然光グロースキャビネットに分植した。自然光グロースキャビネットの温度条件は昼間（7時～18時）28.5°C，夜間21.5°Cに調整した。

Table 1. List of male sterile mutant lines used

Line	Treatment	Pedigree	Gene*	Reference
MS- 1	G20	343-2-2	*ms-21* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 2	G30	273-1-1	*ms-22* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 3	G30	395-2-1	*ms-23* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 4	G20	138-3-4	*ms-24* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 5	G30	37-2-2	*ms-25* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 6	G30	219-1-1	*ms-26* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 7	G30	232-3-1	*ms-27* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 8	G30	405-2-2	*ms-28* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS- 9	G20	153-1-2	*ms-29* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-10	G30	290-1-3	*ms-30* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-11	EI2	54-2	*ms-31* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-12	EI2	73-2	*ms-32* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-13	EI2	76-4	*ms-33* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-14	EI2	133-1	*ms-34* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-15	EI2	136-1	*ms-20* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-16	EI2	176-3	*ms-35* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-17	EI2	273-1	*ms-36* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-18	EI2	366-2	*ms-37* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-19	EI2	338-3	*ms-38* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-20	EI2	363-1	*ms-39* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-21	EI2	418-3	*ms-40* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-22	EI4	12-1	*ms-41* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-23	EI4	169-2	*ms-42* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-24	EI4	181-1	*ms-43* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-25	EI4	240-3	*ms-44* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-26	EI4	270-2	*ms-45* (t)	HIRAIWA et al., 1980
MS-27	EI2	347-88-20	*ms-18* (t)	FUJIMAKI et al., 1977
MS-28	G20	56-160-31	*ms-19* (t)	FUJIMAKI et al., 1977
MS-29	G20	491-203-54	*ms-20* (t)	FUJIMAKI et al., 1977

Note: G20 and G30: Irradiated with 20kR and 30kR gamma ray of ^{60}Co, respectively.
EI2 and EI4 : Treated with 0.2 and 0.4% solutions of ethylene-imine, respectively.
* Gene symbols are tentatively named (FUJIMAKI and HIRAIWA 1986).

自殖種子稔性は，自然光グロースキャビネット内で栽培された雄性不稔系統の3個体から5穂を選び，総穎花数に対する着粒数の割合により示した。なお，着粒が認められた系統については，各穂の種子稔性をそれぞれ算出し，上位の5穂を用いて上記の算定を行った。人工受粉結実率は，開花前日あるいは当日に切穎，除雄して，正常花粉を交配した。花粉親には原品種であるニホンマサリ（系統番号A-136以下略記），農林9号(同，A-133)あるいは，各雄性不稔系統と前記2品種とのF_1を用いた。人工受粉結実率は，まず，それぞれの交配について結実率を算出し，つぎに各雄性不稔系統別に集計を行い，各系統ごとの結実率の上位5交配について結実数と切穎数を合計し，総切穎数に対する着粒数の割合を算出した。

3）結果と考察

各雄性不稔系統の自殖種子稔性と人工受粉結実率を **Table 2** に示した。29系統のうち8系統で自殖稔性が認められた。このうちMS-21は最も高く24.2%であった。他の7系統はいずれも10%未満であった。藤巻・平岩[41]の報告では，自殖稔性が認められた系統はMS-8，MS-10，MS-18，MS-21の4系統であった。本実験ではこれら4系統に加えて，

Table 2. Seed fertility of male sterile mutant lines

Line	Selfing			Crossing		
	No. of fertile seeds	No. of spikelets	Fertility (%)	No. of fertile seeds	No. of spikelets emasculated	Fertility (%)
A-136	219	235	93.2	-	-	-
MS- 1	0	286	0.0	128	132	97.0
MS- 2	0	291	0.0	126	139	90.7
MS- 3	0	236	0.0	80	130	61.5
MS- 4	0	274	0.0	61	119	51.3
MS- 5	0	378	0.0	57	121	47.1
MS- 6	0	238	0.0	126	131	96.2
MS- 7	0	328	0.0	115	120	95.8
MS- 8	14	228	6.1	114	118	96.6
MS- 9	0	324	0.0	82	158	51.9
MS-10	7	242	2.9	101	116	87.1
MS-11	0	277	0.0	114	119	95.8
MS-12	5	288	1.7	121	131	92.4
MS-13	0	333	0.0	100	103	97.1
MS-14	10	365	2.7	140	147	95.2
MS-15	0	316	0.0	64	107	59.8
MS-16	0	250	0.0	93	131	71.0
MS-17	0	241	0.0	104	114	91.2
MS-18	6	243	2.5	116	121	95.9
MS-19	0	366	0.0	149	150	99.3
MS-20	3	294	1.0	95	108	88.0
MS-21	69	285	24.2	111	119	93.3
MS-22	0	298	0.0	120	128	93.8
MS-23	26	267	9.8	87	104	83.7
MS-24	0	271	0.0	100	114	87.7
MS-25	0	299	0.0	106	130	81.5
MS-26	0	415	0.0	122	129	94.6
MS-27	0	374	0.0	87	106	82.1
MS-28	0	295	0.0	98	107	91.6
MS-29	0	323	0.0	56	93	57.0

新たにMS-12，MS-14，MS-20，MS-23の4系統で自殖稔性が認められた。

人工交配による結実率は，22系統で80%以上の高稔性がみられ，これらの系統では雌性器官は正常であったことが確認された。結実率の低かったMS-4とMS-9およびMS-15とMS-29はそれぞれ同一の雄性不稔遺伝子を有しており[42]，交配に用いた花粉は正常であったことから，これらの系統は人工授粉を妨げるようななんらかの要因があったとも考えられる。雄性不稔系統では，出穂後の開花が遅くなることや未開花穎花の出現が多い等（**Table 11**）開花習性にも変化を生じる場合のあることから，母穂の選定が難しく，種子の成熟度の推定には誤りがあったことも考えられる。しかし，これらの系統のF_2における不稔性の分離を見たところ（**Table 4**），いずれのF_2においても，3：1の分離比に適合して，不稔個体を過剰に出現しなかったことから，雌性器官は正常であったと考えられる。

4．遺伝様式

1）実験の目的

各雄性不稔系統の有する突然変異遺伝子を分析する目的で，F_1，F_2およびB_1を作成した。

2）材料および方法

各雄性不稔系統にA-133を交配してF_1植物を作成した。これらのF_1植物は，5月初旬に播種して約1月の育苗後2リットルポットに移植し，1ポットに2本植として温室内で栽培した。F_1植物の花粉稔性は2個体から5穎花を無差別に選定し，各穎花について約300粒の花粉を調査して，それぞれの穎花の花粉稔性を算出し，5穎花の平均を求めて，その交雑組合せF_1の花粉稔性とした。なお，稔性花粉の判定は，ヨウ素ヨウ化カリ（I−KI）液を用いて染色し，内容物の充実している濃染花粉粒を稔性花粉とした。F_1植物の種子稔性は，各個体から1～2穂を選び，それぞれの個体の種子稔性を算出した後，3個体の平均値を求めて，種子稔性とした。

各雄性不稔系統とA-133との交雑により得られたF_1植物の自殖からF_2集団を作成し，可稔個体と不稔個体の分離比を調査した。F_2集団は5月に縦24 cm横32 cm高さ12 cmのプラスチックポットに32個体を直播し，3葉が展開する頃に潅水して温室で栽培した。各組合せとも未発芽，弱小個体，白縞，出穂遅延，その他，病虫害等により生育不良や生育途中における枯死が散見された。殊にMS-23では枯死と欠株が合わせて10%も生じ，またMS-3では葉緑素欠乏のため3葉程度で発育が停止する白色個体が約20%程度出現した。その他の交雑組合せでは，これらの生育不良個体の総個体数に対する出現割合は1～6%程度であった。未発芽および生育不良個体はそれぞれ検定より除外した。

F_2において単遺伝子による分離比に対して適合度の低かった6組合せのうち，5組合せの母系統に，それぞれのF_1を戻し交雑してB_1集団を作成し，可稔個体と不稔個体の分離を調査した。栽培方法はF_2と同様である。

3）結果と考察

F_1植物の花粉稔性と種子稔性を**Table 3**に示した。F_1植物はすべての交雑組合せで花粉および種子稔性を回復し，ともに90%以上の高稔性となった。

このことは，各系統の雄性不稔遺伝子はすべて劣性であったことを示している。

各組合せのF_2集団における不稔個体の分離結果を**Table 4**に示した。F_2集団の29組合せのうち，23組合せにおいては可稔個体と不稔個体の割合が3：1の単遺伝子による分離比に適合した。したがって，

Table 3. Seed and pollen fertilities of F_1 plants between male sterile mutant lines and A-133

Cross combination	Pollen fertility (%)	Seed fertility (%)
MS- 1×A-133	95.7	90.6
MS- 2×do.	97.0	95.8
MS- 3×do.	95.9	97.5
MS- 4×do.	97.4	98.5
MS- 5×do.	96.1	96.1
MS- 6×do.	96.8	96.6
MS- 7×do.	96.2	94.3
MS- 8×do.	94.6	94.3
MS- 9×do.	90.2	90.0
MS-10×do.	95.5	95.1
MS-11×do.	95.3	97.0
MS-12×do.	96.2	98.4
MS-13×do.	96.8	96.5
MS-14×do.	96.6	93.6
MS-15×do.	96.0	96.0
MS-16×do.	95.4	97.9
MS-17×do.	95.9	95.7
MS-18×do.	96.2	95.1
MS-19×do.	94.3	96.3
MS-20×do.	95.8	94.6
MS-21×do.	93.2	95.9
MS-22×do.	95.5	97.9
MS-23×do.	92.0	96.8
MS-24×do.	96.6	98.5
MS-25×do.	94.3	98.4
MS-26×do.	95.7	96.1
MS-27×do.	95.0	97.9
MS-28×do.	94.9	98.2
MS-29×do.	91.4	98.1

これらの交雑組合せに用いた雄性不稔系統では1対の劣性遺伝子を有していることが認められた。適合度の低い6組合せのうち，MS-7，MS-10，MS-19，MS-23の4組合せでは，いずれも不稔個体の出現が期待数より極めて少なかった。このうち，MS-19を交雑親とした場合には15：1の2遺伝子による分離比に適合した。一方，MS-22，MS-24の2組合せでは，不稔個体が期待数より多く出現したために，3：1との適合度が低くなった。

単遺伝子による分離比に適合しなかったMS-7，MS-10，MS-19，MS-23，およびMS-24のB_1集団における可稔個体と不稔個体の分離を調べた結果を**Table 5**に示した。MS-7，MS-10，MS-23，MS-24の4組合せは，いずれも1：1の単遺伝子による分離比に適合し，F_2の場合とは異なる結果となった。

Table 4. Segregation of fertile and sterile plants in the F_2 populations from the crosses between male sterile mutant lines and A-133

Cross combination	No. of fertile plants	No. of sterile plants	No. of total plants	χ^2 value (3 : 1)	(15 : 1)	(9 : 7)
MS- 1×A-133	104	23	127	3.215		
MS- 2×do	73	25	98	0.014		
MS- 3×do	116	33	149	0.647		
MS- 4×do	77	31	108	0.790		
MS- 5×do	90	26	116	0.414		
MS- 6×do	98	28	126	0.519		
MS- 7×do	185	29	214	14.960***	19.470***	
MS- 8×do	80	37	117	2.738		
MS- 9×do	80	25	105	0.079		
MS-10×do	197	21	218	27.456***	4.258*	
MS-11×do	103	33	136	0.039		
MS-12×do	92	19	111	3.679		
MS-13×do	103	31	134	0.249		
MS-14×do	98	39	137	0.878		
MS-15×do	92	25	117	0.823		
MS-16×do	103	47	150	3.209		
MS-17×do	91	38	129	1.367		
MS-18×do	94	41	135	2.077		
MS-19×do	241	20	261	41.840***	0.889	
MS-20×do	148	49	197	0.002		
MS-21×do	143	48	191	0.002		
MS-22×do	137	62	199	4.022*		12.826***
MS-23×do	206	41	247	9.297**	45.150***	
MS-24×do	90	44	134	4.388*		6.486*
MS-25×do	100	33	133	0.003		
MS-26×do	91	36	127	0.759		
MS-27×do	107	31	138	0.473		
MS-28×do	110	25	135	3.025		
MS-29×do	97	35	132	0.162		

*, **, ***: Significant at the 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

MS-19 は戻し交雑で 3 ： 1 となる 2 遺伝子型分離比に適合し，F_2 による検定結果と一致した。

藤巻・平岩[41] は，筆者と同じ材料の雄性不稔系統にマンゲツモチを交配して得られた F_2 集団の分離結果を報告している。藤巻・平岩の実験結果と本実験結果を比べると，29 系統のうち 22 系統の F_2 では

Table 5. Segregation of fertile and sterile plants in the five kinds of B_1 populations {(male sterile mutants×F_1 (male sterile mutants×A-133)}

Cross combination	No. of fertile plants	No. of sterile plants	No. of total plants	χ^2 value (1 : 1)	(3 : 1)
MS- 7×(MS- 7×A-133)	27	25	52	0.077	
MS-10×(MS-10×A-133)	41	28	69	2.449	
MS-19×(MS-19×A-133)	24	12	36	4.000*	1.333
MS-23×(MS-23×A-133)	22	21	43	0.023	
MS-24×(MS-24×A-133)	28	24	52	0.308	

*: Siginificant at the 5% level.

両実験共に3：1の単遺伝子による分離比に適合した。適合しなかった7系統のうち，不稔個体の過小のため，単遺伝子分離比に適合しなかった系統は同じであり，MS-7，MS-10，MS-19，MS-23の4系統であった。このうち本実験ではMS-19が15：1の2遺伝子型の分離比に適合した。残る3系統は不稔性個体が過多のため単遺伝子による分離比に適合しなかった系統で，藤巻・平岩ではMS-3，本実験ではMS-22とMS-24であり，それぞれの実験結果は異なり，両実験に共通している系統はみられなかった。

本実験の結果も藤巻・平岩の結果も，雄性不稔系統の多くが単一の劣性遺伝子により支配されている場合が最も多かった。このような単一の劣性遺伝子により雄性不稔性が発現する例は，これまでにも多数の報告がある[33,37,38,40,43]。本実験においては，F_2が，3：1の単遺伝子分離比に適合しない場合が6系統みられた。このうち，MS-7，MS-23，MS-24のB_1の結果はF_2の結果と異なり，劣性の単遺伝子により支配されていることを支持した。また本実験では，MS-19についてのF_2およびB_1の分離結果は，いずれもMS-19の雄性不稔性は劣性の2種の重複遺伝子の作用によることを示した。したがって，MS-19については，藤巻・平岩の結果と比べると，不稔個体の出現が単遺伝子による分離比の期待数より過小であったことでは一致したが，分離比については異なる結果となった。核遺伝子型雄性不稔性に関するこれまでの報告では，雄性不稔性が複数遺伝子の支配を受ける例は比較的少ない。高・山縣[40]は，F_2の分離が2遺伝子分離比や単遺伝子分離比では説明できない，いわゆる異常分離を示す突然変異系統について報告している。それによればササニシキより誘発された11種の雄性不稔突然変異系統と原品種との交雑のF_2で，9組合せは単遺伝子の分離に適合し，1組合せでは2遺伝子の分離がみられ，2組合せは異常分離となった。PAVITHRAN and MOHANDAS[34]はPtb 10より人為的に誘発した雄性不稔突然変異系統と原品種との交雑のF_2では3：1の単遺伝子分離を示したが，品種7022とのF_2では45：19といった3遺伝子の関与する分離となり，F_3検定においてもこの仮説が確かめられたことを報告している。このことは，交雑親の相違により分離比の異なる場合があることを示している。MESE et al.[39]がM-101より人為的に誘発した雄性不稔系統においても，同様に交配親の相違により，単遺伝子分離に適合する場合と逸脱する場合を報告している。本実験と藤巻・平岩[41]の実験で，異なる結果となった要因については両実験に用いられた交雑親についての違いが関係する事も考えられる。

F_2で単遺伝子分離比に適合しなかった系統の関与する遺伝子が複数であるのか，あるいは，なんらかの原因により異常分離を示したのかは更に検討が必要であろう。藤巻・平岩[41]は不稔個体が過小となる原因として，雄性不稔遺伝子をもつ配偶子や接合体が受精や胚発生などで何らかの淘汰を受けた可能性を示唆している。本実験においても，MS-23では検定より除かれた枯死欠株が10%みられ，他の交雑組合せと比べて高く，これらの生育不良個体の出現が検定結果に影響したことも考えられる。しかし，不稔個体の過小は可稔個体の過多とも見なすことができる。不稔個体の過小により異常分離となった4組合せの雄性不稔系統に共通することは，いずれもヨウ素ヨウ化カリ液で濃染される充実花粉を，低稔性ではあるが生ずる(**Table 8**)。また，MS-10，MS-23では低稔性ではあるが自殖により結実が見られている（**Table 2**)。したがって，これらの交雑組合せでは，元来は不稔性を示す個体が部分稔性となったため，可稔個体とみなされて過多となった可能性も考えられる。

5．雄性不稔遺伝子の同定実験

1）実験の目的

各雄性不稔系統の有する雄性不稔遺伝子相互の異同を明らかにするため，雄性不稔系統間の総当たり交雑を行なった。

2）材料および方法

各雄性不稔系統はいずれも劣性突然変異遺伝子により不稔性となることから，各系統にA-133を交配して作成したF_1植物を花粉親として，それぞれの雄性不稔系統に戻し交雑を行うと，B_1世代で不稔個体が分離した。したがって，異なる雄性不稔系統の何れか一方の交雑組合せのF_1を花粉親として，他方の雄性不稔系統と交配して作成された雑種では，雌性親の雄性不稔遺伝子とF_1の雄性不稔遺伝子が同じ場合には戻し交雑型となり，不稔個体を分離することが予想される。逆に，雑種集団が可稔個体のみを分離する場合には，両系統はそれぞれ異なる雄

性不稔遺伝子を有していたとみなすことができる(**Fig. 1**)。

ただし，不稔個体が出現する確率は雑種集団の規模により異なるので，本実験では，1交雑組合せの実験規模を10個体以上とした。この場合，不稔個体が1個体も出現しない確率は，可稔個体：不稔個体が1：1であれば0.01%以下となり，3：1であれば5.63%以下である。29系統間の総当たり交雑数は406組合せと計算されるが，実験初年にMS-15とMS-29が同一の遺伝子を有していること，2年目にMS-4とMS-9が同一の遺伝子を有していることが判明したので，これらの系統については，その後の実験では，いずれか一方の系統を用いることとした。また，1部の交雑組合せについては，相反交雑も行った。なお，MS-4およびMS-9で重複する交雑組合せと相反交雑組合せの14組合せについては，10個体未満で調査した。したがって，本実験では合計385組合せについて不稔個体を分離するか否かの調査を行った。

栽培方法はF_2，およびB_1と同様である。

3）結果と考察

29系統間の総当たり交雑結果を**Table 6 a, b, c**および**Fig. 2**に示した。相反交雑を含めて385組合せの雑種集団のうち，365組合せでは可稔個体のみ

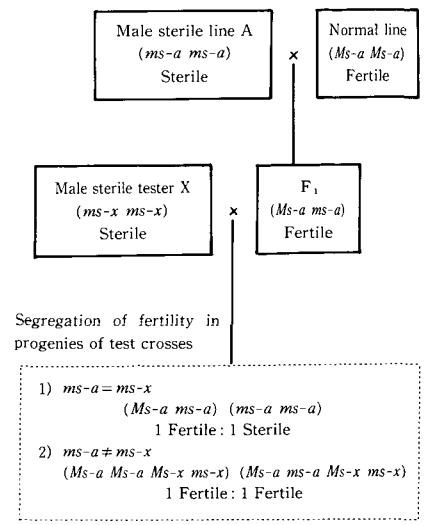

Fig. 1. Scheme of the genic identification between male sterile mutant lines by using the tester line, Male sterile X. If *ms-a* is equivarent to *ms-x*, the segregation of Fertile : Sterile = 1 : 1 should be demonstrated. No segregations occurrred, suggesting *ms-a* ≠ *ms-x*.

Line	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4	MS-5	MS-6	MS-7	MS-8	MS-9	MS-10	MS-11	MS-12	MS-13	MS-14	MS-15	MS-16	MS-17	MS-18	MS-19	MS-20	MS-21	MS-22	MS-23	MS-24	MS-25	MS-26	MS-27	MS-28	MS-29
MS-1	−	*	*	○	○	○	○	*	○	○	○	○	○	*	−	○	○	○	*	○	○	*	○	○	○	*	○	○	○
MS-2	○	−	○▽	○	○	*	*	*	○	○	*	○	○	*	−	○	*	*	*	*	○▽	*	*	○	○	○	○	○	○
MS-3	○	○▽	−	*	○▽	○▽	*	*	−	*	*	○	*	*	−	○	*	*	○	*	○	*	○	○	○	*	○	○▽	○
MS-4	*	*	○	−	○	*	○▽	*	▲▽	*	*	*	*	*	−	○	*	*	−	*	*	*	○▽	○	○	*	○	○	○
MS-5	*	*	○▽	*	−	*	○	*	*	*	○▽	○	*	*	−	○	*	*	*	*	*	*	*	○	○	*	▲	○	○
MS-6	*	○	○▽	○	○	−	○	*	○	○▽	○▽	*	○▽	○	−	○	○	○	○	○	○	○	▲	○	○	○	○	○	○
MS-7	*	○	○	○▽	*	*	−	*	−	○	*	*	*	*	−	○	○▽	*	○	*	○	*	○	○	○	○	○	○	○
MS-8	○	○	○	○	○	○	○	−	−	○	○	○	○	○	−	○	○	○	○	○	*	○	○	○	▲	○	○	○	○
MS-9	*	*	−	▲▽	○	*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	○	−	−	*	*	○	○	−	▲	○	*	○	−	○
MS-10	*	*	○	○	○	○▽	*	*	−	−	○	○▽	*	○	−	○	○	○	*	○	*	*	*	○	○	○	○	○	○
MS-11	*	○	○	○	○▽	○▽	○	*	−	*	−	○	○	○	−	○	*	○	*	*	*	*	○	○	○	○	○	○	○
MS-12	*	*	*	○	*	○	○	*	−	○▽	*	−	○	*	−	○	○	○	*	*	*	○	○	○	○	○	○	○	○
MS-13	*	*	○	○	○	○▽	○	*	−	○	*	*	−	*	−	○	○	*	○	○	○	○	○	▲	○	*	○	○	○
MS-14	○	○	○	○	○	*	○	*	−	*	*	○	○	−	−	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	▲	○
MS-15	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	▲
MS-16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	−	−	*	*	*	*	*	*	*	○▽	*	*	○	*	○
MS-17	*	○	○	○	○	*	○▽	*	−	*	○	*	*	*	−	○	−	*	*	○	▲	*	○	○	○	○	○	○	○
MS-18	*	○	○	○	○	*	○	*	−	*	*	*	○	*	−	○	○	−	○▽	○	*	*	○▽	○	○	○	○	○	○
MS-19	○	○	*	−	○	*	*	*	○	○	○	○	*	*	−	○	○	○▽	−	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
MS-20	*	○	○	○	○	*	○	*	○	*	▲	○	*	*	−	○	*	*	*	−	○	▲	*	○	○▽	○	○	○	▲
MS-21	*	○▽	*	○	○	*	*	○	*	○	○	○	*	*	−	○	*	○	*	*	−	*	○	○	○	○	○	○	○
MS-22	○	○	○	○	○	*	○	*	*	○	○	*	*	*	−	○	○	○	*	*	○	−	○	○	○	○	○	○	○
MS-23	*	○	*	▲▽	○	*	*	*	−	○	*	*	*	*	−	▲	*	▲▽	*	▲	*	*	−	○	○	*	○	○	○
MS-24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	−	○▽	*	*	*	*	*	*	*	−	*	*	○	*	○
MS-25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	−	○	*	*	*	○▽	*	*	*	○	−	*	○	*	○
MS-26	○	*	○	○	○	*	*	*	○	*	*	*	○	*	−	○	*	*	*	*	*	*	○	○	○	−	○	○▽	○
MS-27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	−	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	−	*	○▽
MS-28	*	*	○▽	*	*	*	*	*	−	*	*	*	*	*	−	▲	*	*	*	*	*	*	○	○	○	○▽	○	−	*
MS-29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	○▽	○	−

Fig. 2. Diallel crossings for the identification of 29 single genes derived from male sterile mutant lines.
○ Fertile plants only, ▲ Segregating, fertile vs. sterile, * Data of the reciprocal cross is missing,
▽ Demonstrate that the results of reciprocal crossings are equivalent.

が分離され，そのうち20組合せにおいて不稔個体の出現がみられた。不稔個体のみられた組合せを取り出して **Table 7** に示した。なお，MS-4×MS-9とMS-9×MS-4は相反交雑なので，両組合せの可稔個体と不稔個体をそれぞれ合計して表中に示した。MS-4とMS-9およびMS-15とMS-29の両交雑組合せでは，可稔個体と不稔個体を1：1の割合で生じた。従って，MS-4とMS-9およびMS-15とMS-29はそれぞれ同一の雄性不稔遺伝子を有することがわかった。他の16組合せでは，不稔個体はいずれも1個体であった。それらのうち，MS-23に関する組合せが6組合せと最も多く，次いでMS-20が4組合せ，MS-24とMS-28が2組合せで，残りはすべて1組合せであった。この16組合せに見られた不稔個体は，検定結果からも明らかな如く，両親系統間で雄性不稔遺伝子が同一のため分離により生じた個体とするよりも，別の環境的要因によって生じた少数の不稔個体と考えられる。各組合せで散見されるこのような不稔性の原因についてはなお不明であるが，MS-23やMS-24に関する交雑組合せで多かったことは，これらの雄性不稔系統には，核遺伝子型雄性不稔性の外に不稔を生ずるなんらかの要因が存在している可能性が考えられる。

本実験結果から29系統の雄性不稔突然変異体のうち，27系統ではそれぞれ互いに異なる遺伝子により雄性不稔を生じることが明らかとなった。MS-15

Table 6-a. Identification of single *ms* genes involved in male sterile mutant lines: Diallel crossings among male sterile mutants

Line	MS*-1 F:S**	MS-2 F:S	MS-3 F:S	MS-4 F:S	MS-5 F:S	MS-6 F:S	MS-7 F:S	MS-8 F:S	MS-9 F:S	MS-10 F:S
MS- 1	-	***	*	15:0	15:0	15:0	15:0	*	15:0	16:0
MS- 2	14:0	-	15:0*	16:0	14:0	*	*	*	8:0	16:0
MS- 3	17:0	6:0*	-	*	14:0*	14:0*	*	*	-	*
MS- 4	*	*	13:0	-	12:0	*	4:0*	*	4:1*	*
MS- 5	*	*	14:0*	*	-	*	10:0	*	*	*
MS- 6	*	15:0	16:0*	19:0	12:0	-	15:0	*	16:0	10:0*
MS- 7	*	10:0	20:0	9:0*	*	*	-	*	-	19:0
MS- 8	16:0	15:0	16:0	16:0	19:0	14:0	13:0	-	-	15:0
MS- 9	*	*	-	5:8*	9:0	*	-	-	-	-
MS-10	*	*	16:0	10:0	12:0	15:0*	*	*	-	-
MS-11	*	23:0	14:0	16:0	15:0*	15:0*	15:0	*	-	*
MS-12	*	*	*	21:0	*	16:0	20:0	*	-	13:0*
MS-13	*	*	14:0	18:0	16:0	16:0*	16:0	*	-	16:0
MS-14	16:0	20:0	20:0	14:0	16:0	*	15:0	*	-	*
MS-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS-16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MS-17	*	15:0	17:0	13:0	20:0	*	12:0*	*	-	*
MS-18	*	13:0	16:0	16:0	16:0	*	13:0	*	-	*
MS-19	14:0	23:0	*	-	14:0	*	*	*	16:0	15:0
MS-20	*	13:0	14:0	13:0	14:0	*	14:0	*	14:0	*
MS-21	*	16:0*	*	16:0	14:0	*	*	12:0	*	14:0
MS-22	16:0	15:0	16:0	15:0	14:0	*	16:0	*	*	19:0
MS-23	*	11:0	*	14:1*	15:0	*	*	*	-	19:0
MS-24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MS-25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MS-26	14:0	*	13:0	14:0	13:0	*	*	*	14:0	*
MS-27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
MS-28	*	*	12:0*	*	*	*	*	*	-	*
MS-29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* MS: Male parent is F_1 from the cross of male sterile mutant×A-133.
** F : No. of fertile plants. S: No. of sterile plants.
*** * : Reciprocal crosses.

Table 6-b. Identification of single *ms* genes involved in male sterile mutant lines : Diallel crossings among male sterile mutants

Line	MS-11 F:S*	MS-12 F:S	MS-13 F:S	MS-14 F:S	MS-15 F:S	MS-16 F:S	MS-17 F:S	MS-18 F:S	MS-19 F:S	MS-20 F:S
MS- 1	13:0	13:0	13:0	*	-	14:0	16:0	14:0	*	12:0
MS- 2	***	16:0	20:0	*	-	16:0	*	*	*	*
MS- 3	*	14:0	*	*	-	13:0	*	*	13:0	*
MS- 4	*	*	*	*	-	16:0	*	*	-	*
MS- 5	6:0*	13:0	*	*	-	11:0	*	*	*	*
MS- 6	16:0*	*	13:0*	23:0	-	16:0	18:0	14:0	22:0	15:0
MS- 7	*	*	*	*	-	15:0	13:0*	*	13:0	*
MS- 8	16:0	16:0	14:0	14:0	-	16:0	16:0	15:0	16:0	15:0
MS- 9	-	-	-	-	-	14:0	-	-	*	*
MS-10	13:0	14:0*	*	22:0	-	10:0	11:0	21:0	*	16:0
MS-11	-	14:0	17:0	14:0	-	15:0	*	16:0	*	*
MS-12	*	-	15:0	*	-	12:0	16:0	14:0	*	*
MS-13	*	*	-	*	-	10:0	15:0	*	16:0	16:0
MS-14	*	16:0	16:0	-	-	16:0	15:0	16:0	13:0	12:0
MS-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MS-16	*	*	*	*	-	-	*	*	*	*
MS-17	14:0	*	*	*	-	13:0	-	*	*	16:0
MS-18	*	*	13:0	*	-	15:0	13:0	-	14:0*	16:0
MS-19	15:0	14:0	*	*	-	14:0	15:0	7:0*	-	12:0
MS-20	13:1	15:0	*	*	-	15:0	*	*	*	
MS-21	16:0	15:0	*	*	-	15:0*	*	15:0	*	*
MS-22	16:0	*	*	*	-	12:0	14:0	17:0	*	*
MS-23	*	*	*	*	-	43:1	*	15:1*	*	15:1
MS-24	*	*	*	*	-	11:0*	*	*	*	*
MS-25	*	*	*	*	-	15:0	*	*	*	13:0*
MS-26	*	*	15:0	*	-	14:0	*	*	*	*
MS-27	*	*	*	*	-	*	*	*	*	*
MS-28	*	*	*	*	-	14:1	*	*	*	*
MS-29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* MS : Male parent is F_1 from the cross of male sterile mutant × A-133.
** F : No. of fertile plants. S : No. of sterile plants.
*** * : Reciprocal crosses.

とMS-29については同一の雄性不稔遺伝子を有していることが，藤巻・平岩[41]によって既に報告されており，この実験においても同様の実験結果が得られた。イネにおいてこれまでに同定された雄性不稔遺伝子は *ms-1*～*ms-18* まであり，*ms-1*，*7*，*8*，*9*，*10*，*14*，*17*，*18* については，それぞれ第6，第3，第7，第6，第9，第5，第2，第1染色体に座乗することが明らかにされている[3]。本実験により明らかとなった相互に異なる27個の雄性不稔遺伝子と上記の雄性不稔遺伝子との関係は，現在のところ不明である。藤巻・平岩[41]は，本実験に用いられた雄性不稔遺伝子に対して，*ms-18*～*ms-45* の仮名称を付したが，本実験結果から新たにMS-4とMS-9は同じ雄性不稔遺伝子であることがわかった。そこで，仮名称を付すと，MS-27，MS-28，MS-29はそれぞれ，*ms-19*，*ms-20*，*ms-21* となり，MS-1からMS-8までは，それぞれ*ms-22* から *ms-29* となる。MS-9はMS-4と同一の*ms-25* となる。同様に，MS-29とMS-15は同一の*ms-20* となる。他のMS-10～MS-26までの番号はそれぞれ *ms-30*～*ms-45* とするのが適切と思われる。

イネでは，既に多数の雄性不稔遺伝子が報告されていおり，今後も更に数を増加することが予測される。中国では，環境反応型雄性不稔遺伝子の育種的利用が盛んになっていることから，より有用な雄性不稔遺伝子の探索と突然変異誘発が行なわれること

Table 6-c. Identification of single *ms* genes involved in male sterile mutant lines : Diallel crossings among male sterile mutants

Line	MS-21 F:S*	MS-22 F:S	MS-23 F:S	MS-24 F:S	MS-25 F:S	MS-26 F:S	MS-27 F:S	MS-28 F:S	MS-29 F:S
MS- 1	14:0	*	16:0	16:0	16:0	*	32:0	31:0	14:0
MS- 2	16:0***	*	*	17:0	16:0	15:0	31:0	14:0	15:0
MS- 3	15:0	*	10:0	16:0:	13:0	*	22:0	6:0*	16:0
MS- 4	*	*	8:0*	12:0	16:0	*	23:0	20:0	16:0
MS- 5	*	*	*	13:0	15:0	*	14:1	11:0	16:0
MS- 6	15:0	15:0	13:1	15:0	14:0	16:0	32:0	25:0	16:0
MS- 7	15:0	*	16:0	11:0	16:0	13:0	15:0	14:0	32:0
MS- 8	*	17:0	14:0	16:0	20:1	15:0	16:0	15:0	30:0
MS- 9	12:0	13:0	-	21:1	10:0	*	7:0	-	23:0
MS-10	*	*	*	15:0	13:0	15:0	14:0	15:0	32:0
MS-11	*	*	15:0	16:0	15:0	17:0	32:0	31:0	14:0
MS-12	*	13:0	15:0	14:0	16:0	15:0	25:0	15:0	19:0
MS-13	20:0	15:0	15:0	13:1	13:0	*	32:0	30:0	16:0
MS-14	16:0	18:0	20:0	15:0	16:0	16:0	16:0	14:1	32:0
MS-15	-	-	-	-	-	-	-	-	11:10
MS-16	*	*	*	14:0*	*	*	16:0	*	15:0
MS-17	20:1	*	16:0	15:0	15:0	15:0	32:0	25:0	15:0
MS-18	*	*	15:0*	16:0	15:0	16:0	16:0	16:0	30:0
MS-19	16:0	14:0	16:0	13:0	14:0	13:0	16:0	15:0	32:0
MS-20	16:0	21:1*	*	15:0	6:0*	15:0	14:0	16:0	30:1
MS-21	-	*	15:0	21:0	13:0	14:0	15:0	16:0	32:0
MS-22	14:0	-	35:0	13:0	13:0	10:0	31:0	14:0	14:0
MS-23	*	*	-	16:0	16:0	*	15:0	14:0	32:0
MS-24	*	*	*	-	*	*	14:0	*	32:0
MS-25	*	*	*	14:0	-	*	24:0	*	26:0
MS-26	*	*	14:0	16:0	15:0	-	31:0	28:0*	12:0
MS-27	*	*	*	*	*	*	-	*	31:0
MS-28	*	*	*	15:0	16:0	15:0*	31:0	-	*
MS-29	*	*	*	*	*	*	31:0	32:0	-

* MS : Male parent is F_1 from the cross of male sterile mutant×A-133.
** F : No. of fertile plants. S : No.of sterile plants.
*** * : Reciprocal crosses.

が重要である。新たに見い出された遺伝子の同定は，本来，既知の遺伝子との交配実験により同定することが望ましいが，すべての遺伝子間での相互交雑には多くの時間と労力を要するので，まず，葯の形状や異常花粉の形態的特徴等により区分して，類似する系統間でのみ遺伝子の同定を行うのが適当と考えられる。

KAUL[27] によれば，核遺伝子型雄性不稔の遺伝子数はトウモロコシでは60，トマトで55，オオムギで48報告されている。研究の進展した作物ほど多くなることから，イネにおいても，いずれトウモロコシに匹敵するような，多くの雄性不稔遺伝子が見い出されるであろう。

6．ヨウ素ヨウ化カリ染色性花粉の出現頻度と葯の形態

1）実験の目的

Table 1 より，雄性不稔系統中には，授精可能な充実花粉を含み葯の裂開する系統が含まれていることが示された。そこで，各雄性不稔系統のヨウ素ヨウ化カリ（I−KI）染色性花粉の出現頻度と葯の裂開性を調査した。

2）材料および方法

I−KI 染色性花粉の調査は，グロースキャビネット内で栽培された雄性不稔系統の2個体について，

Table 7. List of crossings between different male sterile plants

Cross combination	No. of fertile plants	No. of sterile plants	χ^2 value (1 : 1)
MS- 4×MS- 9	4	1	1.800
MS- 9×MS- 4	5	8	0.692
Total	9	9	0.000
MS- 5×MS-27	14	1	11.267＊＊＊
MS- 6×MS-23	13	1	10.286＊＊
MS- 8×MS-25	20	1	17.190＊＊＊
MS- 9×MS-24	21	1	18.182＊＊＊
MS-13×MS-24	13	1	10.286＊＊
MS-14×MS-28	14	1	11.267＊＊＊
MS-15×MS-29	11	10	0.048
MS-17×MS-21	20	1	17.190＊＊＊
MS-20×MS-11	13	1	10.286＊＊
MS-20×MS-22	21	1	18.182＊＊＊
MS-20×MS-29	30	1	27.129＊＊＊
MS-23×MS- 4	14	1	11.267＊＊＊
MS-23×MS-16	43	1	40.091＊＊＊
MS-23×MS-18	15	1	12.250＊＊＊
MS-23×MS-20	15	1	12.250＊＊＊
MS-23×MS-29	31	1	28.125＊＊＊
MS-28×MS-16	14	1	11.267＊＊＊

＊, ＊＊, ＊＊＊: Significant at the 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

主として，穂の第1枝梗の第4穎花を採取し，各系統とも6穎花以上を調査した。グロースキャビネットの温度条件は，前述と同様である。葯から取り出した花粉をI−KIで染色し，球形で黒く濃染された花粉粒（**Plate I a**）を染色性花粉とした。各穎花について400粒程度を検鏡し，総調査花粉粒に対する染色性花粉の割合で示した。なお，本実験に用いたI−KI溶液は，ヨウ素2.0 g，ヨウ化カリウム0.5 gを蒸留水100 mlに溶かして作成した。

葯色，葯長，葯幅および葯の裂開性の観察には，温室内で栽培した雄性不稔系統を用いた。各系統より開穎直後の穎花を採取し，それぞれ実体顕微鏡により調査した。なお，葯の裂開性については，自殖種子稔性と染色性花粉の見られた系統については調査穎花数を多く用いた。

3）結果と考察

各雄性不稔系統におけるI−KI染色性花粉の出現程度を**Table 8**に，葯長と葯幅を**Table 9**に，葯の裂開性の調査結果を**Table 10**に示した。

実験結果は以下のようにまとめられた。

(1) 29系統のうち，10系統の葯中には花粉粒が全くみられなかった。9系統では，葯中の花粉粒に著しい減少が認められた。10系統の葯では正常系統と同程度の多数の花粉が観察された。

(2)花粉粒がみられた19系統のうち，12系統ではI−KI染色性花粉（**Plate I b**）が観察された。このうち，MS-8とMS-25では染色性花粉の出現率が高く，正常個体と同様であった。MS-21では，穎花により出現が著しく異なり，0％から85％までの変異がみられた。他の9系統では出現率が低かった。

(3)花粉粒数が正常である葯の不染色性花粉では，花粉膜が肥厚し，小型で変形した空虚花粉（**Plate I c**）が多かった。花粉粒の減少が観察された葯では花粉粒が，葯壁に癒着して取り出し難く，その多くは小型化して不染色（**Plate I d**）であった。しかし，花粉粒の減少がみられたMS-6とMS-10では染色性花粉が観察された。MS-10の2穎花では10粒以上の染色性花粉が観察された。この系統では，花粉が全く含まれない葯から，正常に近い花粉粒数の葯まで，変異幅が大きかった。

(4) 29系統の葯長の平均は1.55 mmであった。A-136の1.80 mmより長い葯を持つ系統は，MS-18，MS-24，MS-25，MS-29の4系統で，もっとも長かった系統はMS-25とMS-18の1.82 mmであった。他の25系統はA-136より短かったが，1.5 mm以上1.80 mm以下の葯を有する系統がもっとも多く，17系統であった。1.5 mm未満の系統は8系統あったが，MS-3とMS-22の葯は1.0 mm以下であった。

29系統の葯幅の平均は0.337 mmであった。A-136の0.43 mmより幅広い葯を持つ系統は，MS-7，MS-8，MS-18，MS-25の4系統で，MS-8とMS-25では裂開葯が含まれたため，大きな値となった。他の25系統はA-136より狭く，もっとも狭いのはMS-22の0.21 mmであった。

MS-18とMS-25は葯長と葯幅がともに，A-136より高い値を示した。

MS-2，MS-3およびMS-22の葯は，小型であるばかりでなく，収縮して湾曲していた(**Plate II h**)。

(5)葯の裂開が，自殖種子稔性がみられた8系統(**Table 2**)を含む10系統で観察された。そのうち，MS-25の裂開性は全く正常であった。しかし，染色性花粉の出現率が90％以上のMS-8の裂開率は低く，7.9％であった。MS-21は11.1％で，MS-8よ

Table 8. Pollen stainability with I-KI in male sterile mutant lines

Line	No. of spikelets observed	No. of spikelets having no pollen	No. of stainable pollens	No. of pollens examined	Stainable pollens (%)
A-136	3	0	791	841	94.1
MS- 1	8	8	-	-	-
MS- 2	9	9	-	-	-
MS- 3	9	9	-	-	-
MS- 4	6	0	0	589*	0.0
MS- 5	6	0	1	645*	0.2
MS- 6	6	2	0	145*	0.0
MS- 7	6	0	19	2480	0.8
MS- 8	8	0	3301	3584	92.1
MS- 9	6	0	0	139*	0.0
MS-10	6	0	38	533*	7.1
MS-11	6	6	-	-	-
MS-12	6	4	0	54*	0.0
MS-13	6	6	-	-	-
MS-14	6	0	0	393*	0.0
MS-15	6	0	59	2588	2.3
MS-16	7	7	-	-	-
MS-17	6	6	-	-	-
MS-18	6	0	341	2713	12.6
MS-19	6	0	424	2818	15.0
MS-20	6	3	0	52*	0.0
MS-21	11	0	1172	4285	27.4**
MS-22	7	7	-	-	-
MS-23	7	0	120	3025	4.0
MS-24	7	0	161	2941	5.5
MS-25	6	0	1922	2022	95.1
MS-26	7	3	0	992*	0.0
MS-27	6	6	-	-	-
MS-28	6	6	-	-	-
MS-29	6	0	7	2442	0.3

* : The total number of pollen grains decreased prominently.
**: Stainable pollens of 11 spikelets were varied ranging from 0% to 85%.

り高い値であった。他の系統の裂開率は低かった。

(6)各雄性不稔系統の葯色は，黄色葯と白色葯に大別された。しかし，黄色葯から白色葯までの変異は連続的であり，両者の中間色である淡黄色を示す葯も多く見られた。同一個体でも，採取された穎花によって，異なる葯色を示す系統があった。

(7)葯色と花粉粒の関係をると，花粉粒数の正常な葯はA-136と同様に黄色で，葯長もほぼ等しかった。これらの黄色葯には染色性花粉の出現率の高い系統ばかりでなく，ほとんど出現しない系統も含まれていた。すなわち，花粉粒数が正常な葯は，染色性花粉の含有率に関係なく，黄色葯を示し，花粉粒のみられない葯は透明な白色で，小型であった。花粉粒数の減少が観察された系統の葯の多くは淡黄色で，葯長も前者の中間型を示す系統が多かったが，穎花により変異がみられた。

以上の観察結果から開花時における葯の形態に基づき雄性不稔系統を5型に分類した。

A：正常型葯（**Plate II b**）
　MS-25
B：黄色退化型葯（**Plate II c, d**）
　MS-7　MS-8　MS-15
　MS-18　MS-19　MS-21

Table 9. Anther length and width of male sterile mutant lines

Line	No. of spikelets observed	No. of anthers examined	Anther length (mm)	S.D.	Anther width (mm)	S.D.
A-136	4	24	1.80	0.120	0.43	0.025
MS- 1	8	48	1.34	0.121	0.25	0.042
MS- 2	9	54	1.13	0.122	0.36	0.035
MS- 3	9	52	0.77	0.084	0.29	0.033
MS- 4	7	42	1.70	0.128	0.29	0.041
MS- 5	7	41	1.55	0.157	0.34	0.046
MS- 6	6	34	1.46	0.169	0.32	0.064
MS- 7	7	42	1.80	0.167	0.43	0.024
MS- 8	8*	41	1.78	0.184	0.49	0.073
MS- 9	6	36	1.64	0.115	0.30	0.045
MS-10	6	36	1.24	0.104	0.37	0.046
MS-11	6	36	1.65	0.124	0.26	0.040
MS-12	6	34	1.45	0.134	0.30	0.042
MS-13	6	36	1.56	0.152	0.28	0.046
MS-14	6	36	1.60	0.157	0.30	0.057
MS-15	7	41	1.71	0.170	0.38	0.027
MS-16	6	36	1.63	0.093	0.23	0.032
MS-17	6	36	1.50	0.123	0.25	0.054
MS-18	6	35	1.82	0.103	0.41	0.019
MS-19	6	34	1.71	0.111	0.40	0.024
MS-20	6	35	1.56	0.183	0.31	0.070
MS-21	7	42	1.61	0.176	0.37	0.051
MS-22	7	42	0.99	0.092	0.21	0.024
MS-23	7	42	1.69	0.116	0.38	0.025
MS-24	7	41	1.81	0.892	0.40	0.017
MS-25	6*	34	1.82	0.122	0.53	0.090
MS-26	7	40	1.78	0.131	0.38	0.039
MS-27	6	36	1.39	0.085	0.25	0.041
MS-28	5	28	1.55	0.137	0.31	0.049
MS-29	7	39	1.82	0.093	0.39	0.038

*: Contain dehiscent anthers.

MS-23 MS-24 MS-29

C：淡黄色退化型葯（**Plate II e, f**）

MS-4 MS-5 MS-6

MS-9 MS-10 MS-12

MS-14 MS-20 MS-26

D：白色退化型葯（**Plate II g**）

MS-1 MS-11 MS-13

MS-16 MS-17 MS-27

MS-28

E：白色小型退化型葯（**Plate II h**）

MS-2 MS-3 MS-22

SAWADA[44] は，低温障害による不結実の主要原因の一つに葯の不裂開性を指摘し，不裂開葯を障害程度の著しいものから順に，3型（c，b，a）へ分類し，正常型（d）と区分した。本実験では，核遺伝子型雄性不稔を材料としているが，冷温障害を受けた不裂開葯と極めて類似した葯の退化形態がみられた。すなわち，SAWADA[44] のc，b，aは，本実験の白色退化型，淡黄色退化型，黄色退化型にそれぞれ相当している。ただし，本実験では，SAWADA[44] の分類には無い，正常型と称する不結実となる型と，小型で湾曲する，白色小型退化型が加わって5型となった。

次に，本実験で得られた各雄性不稔系統の葯色について，花粉発育段階における異常花粉の出現時期

Table 10. Anther dehiscence of male sterile mutant lines

Line	No. of spikelets observed	No. of dehiscent anthers	Dehiscent anthers (%)
A-136	5	30	100.0
MS- 1	5	0	0.0
MS- 2	5	0	0.0
MS- 3	5	0	0.0
MS- 4	5	0	0.0
MS- 5	40	0	0.0
MS- 6	5	0	0.0
MS- 7	40	2	0.8
MS- 8	40	19	7.9
MS- 9	5	0	0.0
MS-10	40	13	5.4
MS-11	5	0	0.0
MS-12	60	5	1.4
MS-13	5	0	0.0
MS-14	60	1	0.3
MS-15	40	0	0.0
MS-16	25	0	0.0
MS-17	5	0	0.0
MS-18	63	10	2.6
MS-19	40	0	0.0
MS-20	40	1	0.4
MS-21	45	30	11.1
MS-22	5	0	0.0
MS-23	60	11	3.1
MS-24	45	0	0.0
MS-25	30	179	99.4
MS-26	25	0	0.0
MS-27	5	0	0.0
MS-28	5	0	0.0
MS-29	40	0	0.0

(**Fig. 4**) との関連によって検討すると，

(1)花粉が1核期の花粉膜の肥厚する時期まで発育した系統では，葯はすべて黄色を呈する（**Fig. 4** ⑤，⑥，⑦)。

(2)花粉膜が肥厚する以前に異常を生じた系統では開花期に花粉粒が観察されず，葯は透明な白色となる（**Fig. 4** ①，②，③，④)。

(3)これらに属する系統のうち，葯内でいくつかの花粉がなお花粉膜肥厚以後も発育する系統では，開花期における花粉粒数の減少が観察され，葯は淡黄色となる。

(4)花粉母細胞期に異常を生じた系統では，葯は小さく収縮する（**Fig. 4** ①)。

(5)各雄性不稔系統の葯色は，1核後期以降の花粉膜が肥厚した花粉を多数含む場合には黄色となり，少数であれば淡黄色となり，空虚であれば白色となる。染色性花粉は3核期花粉であり，その含有程度にかかわらず，葯色は黄色となる。

さて，イネはコムギと比べても極めてデンプン含量の多い花粉を生産することから，花粉稔性調査には，I−KIがもっとも普通に用いられている。イネ花粉のデンプン蓄積は，花粉核の第1分裂後に開始され，花粉核第2分裂が終了して3核が形成されるころに著しくなる[32,45]。正常に発育した花粉は，開花期にI−KI液を滴下すると，粳性花粉では黒色に濃染され（**Plate I a**）稔性花粉と判定される。通常は，このような染色性花粉は発芽力のある正常花粉とみなされる。

ところで，イネでは今日まで多数の雄性不稔系統が報告されているが，それらのなかには，I−KI染色性花粉を生ずる系統が多い。I−KI染色性花粉の出現頻度は，雄性不稔系統により異なり，わずかに散見される系統が最も多いが，ほとんどすべての花粉が染色性となる系統も報告されている[41,43,46,47]。

本実験では，29種の雄性不稔系統のうち12系統でI−KI染色性花粉粒が，10系統で葯の裂開性が，8系統で自殖種子稔性が観察された。I−KI染色性花粉の出現率が高かった3系統は藤巻・平岩[41]の区分による染色花粉系統と一致する。これら3系統の不結実機構は以下のように推定される。

MS-8は，染色性花粉率が92.1%で，自殖稔性が6.1%，葯の裂開率が7.9%であった。一般にI−KI染色性花粉率の低下に伴い，葯は不裂開となる。しかし，この系統では高い染色性花粉率を示しながら，葯の裂開率が極めて低く，かつ自殖稔性と葯の裂開率がほぼ等しかったことから，不結実には葯の不裂開性が関与している可能性が高い。このような不稔性は機能的雄性不稔（functinal male sterility）として分類される[27]。イネでは北村[48,49]，CHENG and HUANG[22,50]により，いずれも細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統で報告されている。

MS-21は，穎花によりI−KI染色性花粉率の変動が大きかったことから，染色性花粉の出現率の低い穎花は葯の不裂開を伴い，不結実になると推定される。しかし，染色性花粉の発芽力や葯の裂開性についてはなお検討を要する。

MS-25は，I−KI染色性花粉率，葯の裂開性とも

に正常であった。不結実は染色性花粉の不発芽によると推定される。同様な特徴を示す核遺伝子型雄性不稔について，LU and RUTGER[47] の報告がある。

本実験結果では，花粉粒が通常の穎花より著しく少ない系統が9系統見い出され，穎花によって花粉粒の出現程度の異なることがわかった。また，染色性花粉の出現率や葯の不裂開性等も穎花による変動がみられた。このような穎花による変動は，雄性不稔遺伝子の作用性から浸透率の不完全現象とみなすこともできるが，また，なんらかの原因による稔性回復作用ともみることができる。したがって，今後，雄性不稔遺伝子の作用機構を明らかにする上で，このような変動にも注目して，その要因について検討することが必要であろう。

7．花粉の発育異常

1）実験の目的

雄性不稔遺伝子の作用を，葯および花粉の発育面から明らかにする目的で，各系統の発育段階ごとに採取した葯および花粉について細胞組織学的観察を行なった。

2）材料および方法

一般に，雄性不稔変異の花粉形成に生じる異常の検出は，正常花粉の発育経過と雄性不稔個体を比較対照させる方法が適切と思われる。イネでは，等しい栽培条件下の同一品種では，同じ葉耳間長の幼穂は，ほぼ同じ生育段階にあると考えてよい。また，葉耳間長と穎花長，葯長，花粉の発達段階には，それぞれ密接な相関が認められている[31]。さらに，穎花は，穂内の位置により規則的に開花するので，開花順序が幼穂時期における各穎花の発育順序と一致する。葉耳間長と開花習性を組み合わせることにより，穂および穎花の発育程度を推定でき，生育段階ごとに，正常系統の花粉と比較できる。

そこで，本実験では，正常系統ならびに各雄性不稔系統について葉耳間長を指標として幼穂を採取し，特定の穎花（第1枝梗第4穎花）を中心に花粉の発育についての比較検討を行った。

実験材料はすべて自然光グロースキャビネット内で栽培した。自然光グロースキャビネットの温度条件と，栽植条件は前述と同様である。正常系統には原品種であるA-136を主に用い，1部にMS-27，MS-28，MS-29と原品種との交雑に由来するF_2の可稔個体も供試した。正常系統および各雄性不稔系統からそれぞれ葉耳間長を指標にして分げつ稈も含めて幼穂を採取し，FAA（フォルマリン5：酢酸5：50％エチルアルコール90）で48時間固定した。採取材料は，その後70％エチルアルコール液中に移し冷蔵庫内で保存して，随時使用した。正常系統の出穂時の平均葉耳間長は＋13.1 cm，平均穂先長（止葉の葉耳から穂の先端までの長さ）は0.8 cm，葉耳間長－5 cm前後から出穂時までの1日の平均葉耳間長の伸びは1.7 cmであった。雄性不稔系統の出穂時の平均葉耳間長は＋13.5 cm，平均穂先長は1.6 cmであり，葉耳間長－5 cm前後から出穂時までの1日の平均葉耳間長の伸びは1.6 cmで，いずれも正常系統とほぼ同じ値を示した。

正常系統における花粉の発育経過を明らかにするため，葉耳間長毎に採取した各穂の，主に第1枝梗第4穎花について，まず，外穎長と葯長を測定し，次に，花粉を酢酸カーミンにより染色して，各穎花について100粒の花粉直径を計測した。その後押し潰し法により標本を作成して，花粉の発育程度を観察した。

各雄性不稔系統は，葉耳間長0 cm前後の穂と出穂後開花前の穂を重点的に調査し，その他の穂は各系統の花粉の発育程度に応じて用いた。なお，穂間の比較には正常系統と同様に主に第1枝梗第4穎花を中心に行なった。また，染色には，酢酸カーミンを用いた。

正常系統および各雄性不稔系統の葯壁組織を観察するため3 mm～5 mmまでの穎花についてパラフィン切片（10 μ）を作製した。染色には塩基性フクシン，ナフトールイエローS，アズールAを用いたが，塩基性フクシンとアズールAはSHIFFの試薬として調整した。

3）結果と考察

(1) 正常系統の花粉形成

第1枝梗第4穎花の外穎長，葯長および花粉直径と葉耳間長の関係を**Fig. 3**に示した。外穎長は葉耳間長＋5 cm頃までほぼ直線的な伸長を示し，その後停止した（**Fig. 3 A**）。同様に葯長は葉耳間長＋10 cm頃までほぼ直線的に伸長し，その後停止した（**Fig. 3 B**）。花粉直径は葉耳間長－4 cmから同＋2 cmにかけて急速に増大し，その後緩慢となり，同＋7 cm前後にやや増大して，同＋10 cm頃から再び急速な増

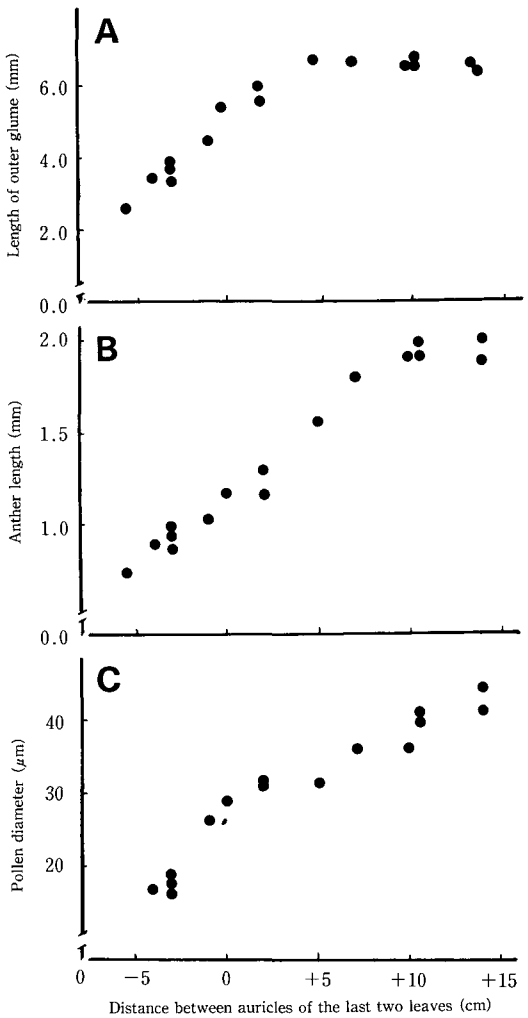

Fig. 3. Relationship between lengths of the three floral organs and the auricle distance in male fertile lines, measured at the fourth spikelet located on the first rachilla.

大がみられた（**Fig. 3 C**）。

Plate III と **Plate IV** は花粉母細胞期から成熟花粉期までの正常花粉の発育経過である。第1枝梗第4頴花の花粉の生育段階と葉耳間長，葯長，花粉直径との関係を以下に述べる。

花粉母細胞期：葉耳間長−5 cm 以下で，外頴長3 mm 未満の頴花，葯長0.8 mm 以下では花粉母細胞（**Plate III a**）がみられた。花粉母細胞は酢酸カーミンでよく濃染される大きな仁により容易に識別された。分裂を開始すると仁は消失して2分子（**Plate IV a**）を経て，同−4 cm 頃に4分子（**Plate III b**）を形成した。

1核期：4分子のカロース膜を脱出した1核の初期花粉（小胞子）は，細胞質に富み，やや変形していたが（**Plate III c**），やがて薄い花粉膜と発芽孔が見られた（**Plate III d**）。葉耳間長＋1 cm 頃になると2重の花粉膜がみられた（**Plate III e**）。細胞質は液胞に満たされるが，花粉核は花粉粒内のほぼ中央に位置した（**Plate III f**）。小胞子は葉耳間長−4 cm 頃から同＋2 cm 頃まで急速に生長した（**Fig. 3 C**）。この間葯壁最内面のタペート組織はすでに退化が始まっていた（**Plate IV**）。花粉膜の肥厚が明確に見られ花粉粒内は液胞に満たされてくる（**Plate III g**），やがて花粉核は花粉壁に遍在し1核後期花粉（**Plate III h**）となる。葉耳間長＋5 cm 頃，外頴長の伸長が止まった（**Fig. 3 A**）。

2核期花粉：葉耳間長＋5 cm から同＋7 cm 頃，第1花粉核分裂が起こった。分裂直後は栄養核と生殖核の区分が明瞭でなかったが，花粉粒内に徐々に物質が蓄積され始める頃（**Plate III i**）押し潰すと大きな栄養核と小さな生殖核が明瞭に識別できた（**Plate III j**）。葉耳間長＋10 cm 頃，葯の伸長が停止した（**Fig. 3B**）。

3核期花粉：葉耳間長＋10 cm 頃，第2花粉核分裂が行なわれ，花粉粒内にデンプン等が蓄積されて花粉核は見えにくくなった（**Plate III k**）。押し潰すと2個の生殖核が濃染されたが，栄養核は不鮮明であった（**Plate III l**）。

以上が正常花粉の発育である。基本的には木原・平吉[52]，山田[32]，SATAKE[51] の観察結果と一致する。

(2) 雄性不稔系統における花粉の発育異常

各雄性不稔系統には様々な異常が観察されたが，このような異常花粉の出現時期と形態によって29系統を7群に類別できた。以下にそれらの観察結果を述べる。

① 花粉母細胞残存型，MS-2，MS-3，MS-22 の3系統：減数分裂を始める前の花粉母細胞において分化と生長が停止した（**Plate V b**）。外頴長が4 mm 以上にまで生育していても葯中には花粉母細胞のまま止まっていた。出穂期では葯中に花粉はみられなかった（**Plate V a**）。葯は最も小さくて湾曲し，白色の小型退化型葯であった。

② 4分子−小胞子期異常型，MS-4，MS-5，MS-

9，MS-14，MS-16の5系統：4分子期直後のいわゆる自由小胞子期以後に起こる花粉膜の肥厚は見られなかった。外頴長が5mmに至っても花粉膜の肥厚がみられず小胞子は発育を停止するものが多かった。葯中には大小の小胞子がみられ，中には多核性巨大小胞子を形成していた（**Plate V c**）。出穂期には，葯中の花粉数は減少し葯壁に付着していたが，系統によってはいくつかの小胞子がその後異常に膨張し，巨大化（**Plate V d**）した。これらの異常花粉は葯壁に付着していたが，開花時の葯から一部取り出すことができた。葯は，淡黄色退化型が多かった。

③ タペート細胞異常型，MS-1，MS-6，MS-10，MS-11，MS-12，MS-13，MS-17，MS-27，MS-28の9系統：タペート細胞に風船状，丘状等の種々の異常肥大がみられた（**Plate V e, f**）。小胞子は薄い花粉膜で液胞化し，互いに癒着していた。外頴長5mm（葉耳間長＋0.5cm）で，すでに花粉が取り出せなくなる葯が多かった。これらの系統では，出穂期に葯中には花粉がみられなかったが，あっても葯壁に癒着していた。葯は小さく白色退化型となった。ただし，系統によっては，葯のタペート異常の程度が異なり，小胞子は充実花粉にまで生育する場合もあった。殊にMS-10，MS-12では，極く低稔性ではあるが，種子稔性がみられた。このような，回復型の葯は，MS-6においても観察された。開花期まで花粉粒がみられる葯では淡黄色退化型となった。

④ 小胞子中期異常型，MS-20，MS-26の2系統：タペート細胞の顕著な異常はみられなかった。小胞子は膨張した（**Plate V g**）が出穂期には収縮した薄い花粉膜を持つ退化花粉が葯中にみられ葯壁に付着していた（**Plate V h**）。しかし，頴花によっては，充実花粉を生ずる場合もあった。

⑤ 空虚花粉型，MS-15，MS-18，MS-23，MS-29の4系統：小胞子期のタペート細胞は正常で，1核期において花粉膜が厚く肥厚した頃，細胞質が花粉の内膜から遊離するような異常がみられた（**Plate VI a**）。その後細胞質は，花粉内に広まり，やがて核や細胞質が消失した。開花期の不稔花粉は，厚い発達した花粉膜を有する空虚花粉が多かった（**Plate VI b**）。系統により出現頻度は異なったが，いずれも充実花粉が散見され，葯は黄色退化型であった。

⑥ 花粉核残存型，MS-7，MS-19，MS-24の3系統：タペート細胞は正常で，花粉核第1分裂を経てから発育を停止する花粉が多かった。出穂期の葯中には，内容物を有する不稔花粉がみられ，それらの多くは，栄養核と生殖核の区分ができてた2核花粉であった（**Plate VI c**）。他に空虚花粉やデンプンなどが未充実の3核退化花粉および充実花粉がみられた（**Plate VI d**）。

⑦ 充実花粉型，MS-8，MS-21，MS-25の3系統：藤巻等[41]によりI−KIの反応から染色性として分類された系統と一致する。タペート細胞は正常で，MS-8，MS-25では1核期，2核期花粉とも正常に発育し，出穂期の葯中には充実した3核花粉がみられた（**Plate VI e, f**）。MS-21は出穂期に正常な3核花粉を形成したが，頴花により出現頻度に大きな変異がみられ，空虚花粉の多い頴花もあった。MS-25では，発芽孔の形成が異常で，花粉は不発芽となった（**Plate VI g, h**）。

以上の観察結果を基にして，29種雄性不稔系統について異常花粉の主なる出現時期を，正常花粉の発育段階にしたがって分けて，**Fig. 4**に示した。

さて，イネでは今日まで多数の核遺伝子型雄性不稔が報告されているが，花粉の発育異常についての細胞組織学的な報告は少ない。

KITADA et al.[53]は N-methy-N-nitorosourea で誘発した25種の遺伝的不稔性について花粉母細胞の減数分裂時の異常を細胞学的に観察した。それらのうち19種では解対合（desynapsis）の染色体異常がみられたが，その外に減数分裂の停止，花粉母細胞の細胞質の液胞化，不完全な細胞質分裂，花粉母細胞の融合，重複などの異常を報告している。KITADA et al.[53]の実験材料は，部分稔性を示す系統の他，完全不稔系統も交配実験により種子が結実することから，雄性不稔性が含まれていることが推定される。LU and RUTGER[54]は，M-101より誘発した雄性不稔突然変異体を，染色花粉型，部分不稔花粉型，完全不稔花粉型，無花粉型の4型に分け，それぞれについて，花粉形成を調査して13種の異常型を観察した。染色花粉型における不稔の原因は，花粉の発芽力の欠如としたが，部分不稔花粉型と完全不稔花粉型では，減数分裂期の染色体行動に異常が観察され，無花粉型では，花粉母細胞が互いに融合する異常が含まれ，染色体異常がこれらの3型に強く関連していた。さらに，最近見い出された日長反応型雄性不稔系統について WANG et al.[55]は，減数

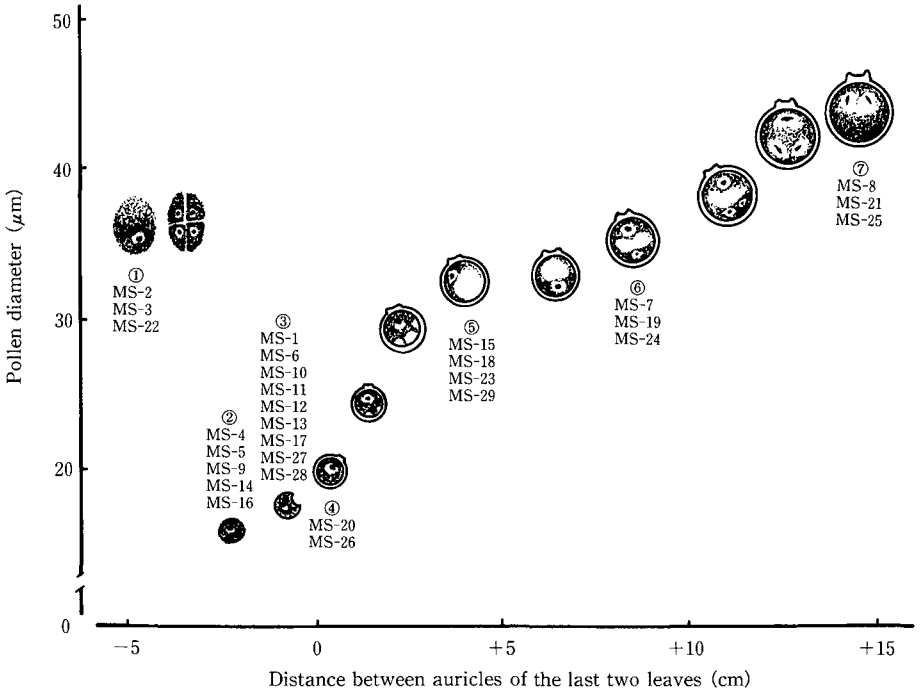

Fig. 4. Developmental stages of pollen cessation in 29 kinds of male sterile mutant lines.

分裂期の異常を観察しているが，花粉異常を生ずるのは主に1核期であり，その結果空虚花粉を生ずることを報告している。

雄性不稔植物における減数分裂の異常については，古くから多くの報告がある。RICK[29] はトマトの9種の雄性不稔遺伝子のうち，7種は減数分裂期か4分子期に異常がみられることを報告し，ALBERTSEN and PHILLIPS[28] はトウモロコシの13種の雄性不稔遺伝子のうち，3種について花粉母細胞の異常を報告している。これらの観察結果から，花粉発育の早期に異常を生じる不稔系統では，減数分裂の異常と不稔性との関連が強いことを示している。

本実験では，花粉母細胞における染色体対合については観察しなかったが，花粉母細胞残存型では，正常な花粉母細胞まで分化しなかったこと，また，4分子期－小胞子異常型では，大小異型の小胞子が形成され，多核の異常小胞子が観察されたこと等から，これらの系統では，2分子あるいは4分子における染色体の行動に異常を生じた可能性が高い。この他，花粉発育の比較的早期に異常を生じた系統では，染色体異常があったことが考えられる。

KAUL[27] によれば，雄性不稔植物では減数分裂以前の花粉母細胞期から開花期の花粉に至るまで，様々な時期に種々の異常が出現する。本実験においても雄性不稔系統を異にすると，それぞれ固有の発育異常が観察され，減数分裂以前の花粉母細胞期から1核期，2核期，3核期に至るまでの発育段階のすべてにわたって異常を生ずる場合が観察された。

8．開花習性の変動

1）実験の目的

雄性不稔系統の開花において，不稔化に伴う現象として，正常型の原系統と比べて開花日の遅延等が起こることが知られている。しかし，その詳細な報告は極めて少ない。開花習性は一代雑種種子生産に際して極めて重要な形質であるから，各雄性不稔系統について開花習性を調査した。

2）材料および方法

雄性不稔系統の開花を自然光グロースキャビネット内で調べた。グロースキャビネットの温度条件ならびに雄性不稔系統の栽培方法は前節と同様である。各雄性不稔系統について，2個体から各1穂ずつ，計58穂と正常型原系統のA-136の4個体から各1穂ずつ，合計62穂を選定し，第1枝梗から第4

枝梗までのそれぞれの穎花について，出穂後の開花開始日，日別の開花数，未開花数そして開花時刻を調査した。なお，MS-3とMS-13では調査対象に選定された2穂の内1穂は小さく，第3枝梗までしか分枝しなかった。調査期間は，8月30日から9月20日までで，開花時刻の調査は9時0分から開始し，30分毎に開花を調べて18時30分まで行なった。

29系統のうち14系統を選定し，同様にグロースキャビネット内で，穎花の開花時間を調査した。調査期間は8月23日～9月20日までで7時30分から17時30分までの間，いずれも30分毎に調査した。

3）結果と考察

各雄性不稔系統の出穂後の日別開花穎花数を**Table 11**と**Fig. 5**に，開花時刻を**Table 12**と**Fig. 6**に，開花時間を**Table 13**に示した。

実験結果は以下の如く要約される。

(1) 出穂後開花開始日：A-136では，穂の止葉からの抽出とともに開花が開始された。

雄性不稔系統では出穂日に開花のみられた系統は，MS-10, MS-21, MS-25の3系統のみであった。出穂後2日目に開花が見られたのは6系統，3日目は4系統，4日目が最も多くて13系統であり，5日目はMS-3の1系統，6日目はMS-2の1系統，最後はMS-27の7日目で1系統が開花を始めた。

(2) 開花最盛日：A-136の開花最盛日は開花開始後2日目であった。

雄性不稔系統の開花最盛日を開花開始後の日数でみると，開花初日に開花最盛日となったのは，出穂後4日目で開花の開始されたMS-15の1系統のみであった。2日目は6系統，3日目も6系統で4日目には最も多くて12系統であった。5日目はMS-7，6日目はMS-21のそれぞれ1系統のみであった。

開花最盛日を出穂日からの日数でみると，出穂後2日目が最盛日となったのはMS-25で，3日目はMS-8であり，4日目には5系統，5日目には8系統，6日目には3系統，7日目には最も多くて9系統であった。8日目はMS-3とMS-27の2系統であった。

(3) 開花期間：A-136の開花期間は7日間であったのに対して，雄性不稔系統の開花期間は，5日間が3系統，6日間が1系統，7日間が7系統，8日間が最も多くて9系統，9日間が2系統，10日間は1系統，11日間は1系統，12日間は2系統，13日間はMS-29の1系統で，14日間はMS-24の1系統，最長はMS-6の15日間であった。

なお，開花終了日を出穂日から数えると，6日目で終了したのはMS-8の1系統，7日目はMS-25の1系統，8日目は4系統，9日目は3系統，10日目は5系統，11日目は5系統，12日目は4系統，13日目は2系統，15日目2系統，16日目はMS-29の1系統で，最も遅かったのはMS-6の18日目であった。

(4) 未開花数：原系統のA-136では未開花穎花が1個しか観察されず，未開花率は1％であった。

それに対して，雄性不稔系統では，系統により未開花率は異なり，もっとも多かったのはMS-29の52％で，40％台が1系統，30％台が3系統，20％台が3系統，10％台が4系統，残り17系統が10％未満であった。全雄性不稔系統の平均は14％であった。

(5) 開花時刻：原系統のA-136では9時30分以降に開花を開始し，開花最盛時刻は11時30分～12時30分で，14時30分には開花を終了した。開花数の頻度分布は正規分布を示した。

雄性不稔系統では全系統で，早朝の9時30分以前に開花がみられた。また，開花最盛時刻が9時30分以前の系統が7系統もあった。9時30分～10時30分で開花最盛時刻となったのは7系統，10時30分～11時30分では8系統，11時30分～12時30分では6系統，12時30分～13時30分ではMS-10の1系統のみであった。

雄性不稔系統の最終開花時刻はMS-25が最も早くて13時30分までに開花を終えた。他の雄性不稔系統では15時30分までが3系統，16時30分までが6系統，17時30分までが最も多くて12系統，18時30分までが7系統であった。

(6) 開花時間：原系統A-136の穎花の開花時間をみると1時間以内に閉穎したのは3穎花で，1時間～2時間開花していたのは9穎花で，2時間以上開花していた穎花はみられなかった。

雄性不稔系統の穎花の開花時間は，1時間以内に

Table 11. Number of flowering spikelets on each day after heading of male sterile mutant lines

Line	Number of flowering spikelets (days after heading (day))													Non flowering spikelets (%)	Total no. of spikelets	Mean (day)	S.D.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13-18				
A-136	10	38	18	22	3	1	2							1 (1)	96	2.9	1.23
MS- 1				4	19	13	3	5	1					4 (8)	49	5.8	1.21
MS- 2						10	18	4	8	5	1	2		1 (2)	49	7.8	1.63
MS- 3					3	9	8	10	6	6	1			1 (2)	44	7.7	1.58
MS- 4				1	5	5	19	3	7		1	3		14 (24)	58	7.4	1.86
MS- 5				7	6	5	8	2		1	1	1		25 (45)	56	6.2	2.05
MS- 6				5	1	1	22	4	9	2	3	2	3	2 (4)	54	8.1	2.73
MS- 7			2	1	5	11	22	6	1	3		1	1	4 (7)	57	6.9	4.32
MS- 8		11	19	3	9	4								6 (12)	52	3.5	1.30
MS- 9				1	8	3	18	7	1	3	2			14 (25)	57	7.1	1.65
MS-10	2	6	6	14	2	2		1						14 (30)	47	3.6	1.46
MS-11		1	11	26	10	1	4	1	1					0 (0)	55	4.4	1.35
MS-12				4	3	8	15	6	3	3	3			5 (10)	50	7.2	1.83
MS-13		3	4	8	10	8	1	4						1 (3)	40	4.9	1.64
MS-14				11	19	7	6		3	2				2 (4)	50	5.6	1.61
MS-15				13	6	9	3	3	1	1				19 (35)	55	5.6	1.61
MS-16				4	12	13	6	2	2				2	8 (16)	49	6.3	2.16
MS-17			4	11	17	3	7		1	1				0 (0)	44	5.2	1.51
MS-18		11	8	16	1	3	1		5					1 (2)	46	4.1	2.12
MS-19			7	5	12	8	10	5	1	3				3 (6)	54	5.8	1.90
MS-20				3	5	8	17	8	7	1			1	6 (11)	56	7.1	1.66
MS-21	1	4	7	9	4	18		2	2			1		4 (8)	52	5.0	4.63
MS-22				6	17	19	10	2						3 (5)	57	6.7	1.02
MS-23		1		7	7	7		2						20 (39)	51	5.6	1.54
MS-24		6		10	13	7	2	1					1	10 (20)	50	4.9	2.19
MS-25	3	20	20	3	1	3	1							0 (0)	51	2.8	1.27
MS-26				6	20	18	2	4		3	1			1 (2)	55	5.9	1.59
MS-27							13	15	11	6	2			3 (6)	50	8.3	1.15
MS-28			1	10	12	11	5		1	2				3 (7)	45	5.6	2.74
MS-29				2	7	6	7		3				1	28 (52)	54	6.6	2.37
Total N=29	6	63	90	184	223	218	224	104	78	42	25	10	9	202 (14)	1487	5.9	2.23

閉穎する穎花がみられたのはMS-8, MS-21, MS-25の3系統であり，合計4穎花（6%）であった。1時間～2時間以内は10系統の18穎花(26%)，2時間～3時間が12系統で20穎花(29%)，3時間以上の開花時間が最も多くて11系統の26穎花(38%)であった。

(7) 以上の実験結果から，各雄性不稔系統では原系統のA-136とは異なる開花習性が見られ，それらは各雄性不稔系統に特有の開花習性であることが明らかにされた。ただし，MS-25については，開花時間を除けば正常型の原系統と開花習性が変わらなかった。

調査結果を概括すると，正常系統であるA-136の開花習性は，(1)出穂後直ちに開花が始まり，(2)2日目に開花最盛期となり，(3)1週間で開花を終えた。(4)未開花穎花の頻度は1%程度であった。(5)開花時刻は，正午頃が最盛時刻となり，早朝や夕方には開花しなかった。(6)各穎花の開花時間は2時間以内で

Table 12. Flowering time of male sterile mutant lines

Line	No. of flowering spikelets										Totale no. of spikelets	Mean (Time)	S.D.
	Flowering time												
	9:30	9:30 10:30	10:30 11:30	11:30 12:30	12:30 13:30	13:30 14:30	14:30 15:30	15:30 16:30	16:30 17:30	17:30 18:30			
A-136		10	18	45	16	6					95	11:47	1.01
MS- 1	11	9	9	2	2	5	1	3	3		45	11:22	2.28
MS- 2	12	7	13	2	3	5	4	2			48	11:08	2.05
MS- 3	7	4	6	6	4	6	3	3		4	43	12:06	2.43
MS- 4	11	8	15	4	1		2	2		1	44	10:48	2.02
MS- 5	3	10	3	9	1	2	1	2			31	11:20	1.56
MS- 6	3	14	5	6	6	7	4	4	1	2	52	12:12	2.29
MS- 7	18	9	8	9	2	2	2	2	1		53	10:45	2.06
MS- 8	1	11	6	8	2	8	4	5	1		46	12:20	2.12
MS- 9	14	10	9	3	3		3		1		43	10:34	1.54
MS-10	5	6	3	5	7	5	2				33	11:32	1.53
MS-11	5	10	15	16	1	3	2	2	1		55	11:47	1.45
MS-12	9	8	8	6		5	4	2	2	1	45	11:41	2.29
MS-13	6	12	6	1	2	4	3	5			39	11:32	2.24
MS-14	3	4	7	18	3	10	2		1		48	11:54	1.43
MS-15	8	2	12	5	5	1	2	1			36	11:12	1.45
MS-16	13	5	9	3	3	4	2		2		41	11:02	2.09
MS-17	2	2	16	11	4	3	4		1	1	44	11:52	1.53
MS-18	7		11	7	10	5	2	2	1		45	11:53	1.58
MS-19	6	6	13	5	6	8	5	2			51	11:47	1.58
MS-20	3	2	14	17	5	4	1	2	2		50	11:50	1.45
MS-21	5	9	7	11	8	1	1	3	1	1	47	11:43	2.08
MS-22	13	2	4	5	7	5	11	2	5		54	12:29	2.37
MS-23	2	3	11	9	2	2		1	1		31	11:31	1.46
MS-24	1	4	2	11	9	3	5	4	1		40	12:46	1.56
MS-25	1	14	24	6	6						51	10:48	0.54
MS-26	10	10	5	14	4	8	3				54	11:16	1.50
MS-27	11	12	2	5	6	1	4	4		2	47	11:30	2.35
MS-28	4	12	6	8	2	4	4	2			42	11:32	2.07
MS-29	5	9	3	7	1		1				26	10:31	1.24
Total N=29	199	214	252	219	115	111	82	55	25	12	1284	11:33	2.08

あった。

これに対して，雄性不稔系統では，(1)出穂後，直ちに開花する系統は少なく，したがって，開花開始日と開花終了日が遅延した。(2)開花最盛日も遅くなった。(3)多くの系統では開花期間は，ほぼ1週間で，正常系統と等しかったが，1部の系統では長期間となった。(4)多くの系統では，未開花穎花は10%未満であったが，未開花穎花が多数出現する系統もあった。(5)開花時刻は，多くが早朝から開花を始め，開花最盛時刻は原系統とほぼ同じ時刻であったが，開花が持続して，夕方にまで及んだ。(6)各穎花の開花時間は長く，2時間以上になるものが70%程度みられた。

雄性不稔系統における，このような開花習性は，現在のところ雄性不稔遺伝子の多面作用の一つと考えられている。高・山縣[40]は，コシヒカリ，トヨニシキ，ササニシキより誘発された合計10種の突然変異体について開花特性を調査し，いずれの変異体も開花期の遅延と短稈化の傾向を示すことを報告した。そして，これらの特徴は雄性不稔に随伴する現

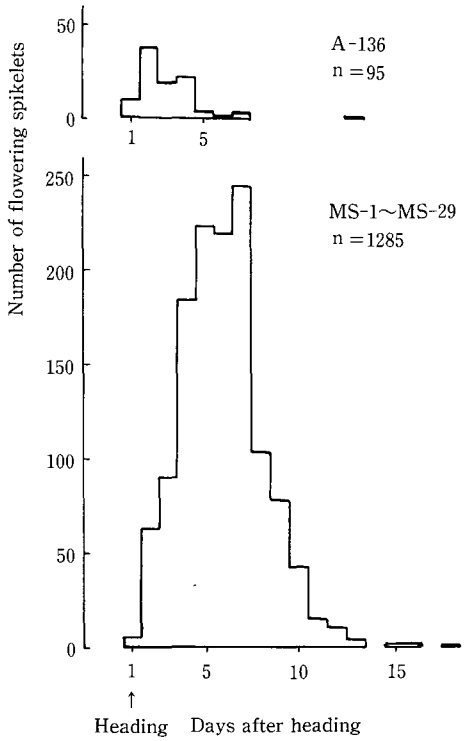

Fig. 5. Frequency distributions of flowering spikelets located on the upper four rachillae in normal and male sterile mutant lines.

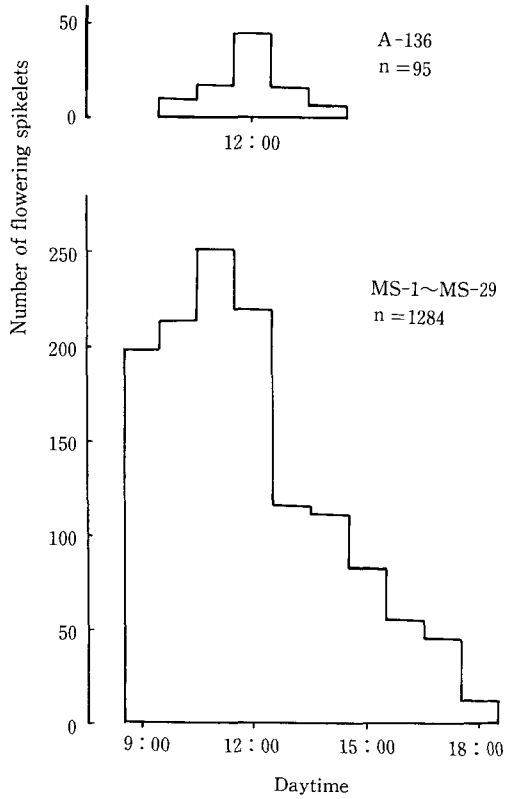

Fig. 6. Frequency distributions of flowering time of spikelets located on the upper four rachillae in normal and male sterile mutant lines.

Table 13. Flowering period of male sterile mutant lines

Line	No. of flowering spikelets				
	hours				
	0～1	1～2	2～3	over3	Total
A-136	3	9	0	0	12
MS- 1	0	2	3	0	5
MS- 2	0	1	1	3	5
MS- 3	0	1	0	4	5
MS- 4	0	1	2	1	4
MS- 5	0	1	1	2	4
MS- 8	1	4	1	0	6
MS-20	0	1	2	1	4
MS-21	2	0	1	0	3
MS-22	0	4	1	1	6
MS-23	0	2	1	2	5
MS-24	0	1	3	1	5
MS-25	1	0	3	2	6
MS-27	0	0	1	4	5
MS-29	0	0	0	5	5
Total	4	18	20	26	68

象で，雄性不稔遺伝子の二次的効果としている。高・山縣[40]の実験では，1系統を除いて，2日から5日程度の開花日の遅れがみられた。

本実験で観察された雄性不稔と正常型原系統間における開花習性の差異について，雄性不稔系統を異常花粉の出現時期によって分類した **Fig. 4** に従って類別してみると，花粉形成の最終時期に異常を生じた充実花粉型である MS-8, MS-21, MS-25 では，出穂直後から開花がみられる等，開花習性は正常型原系統に最も近い開花習性であった。一方，花粉形成の初期である花粉母細胞に異常を生じた花粉母細胞残存型に属する MS-2, MS-3, MS-22 はいずれも出穂後の大幅な開花遅延等で，原系統と大きく異なる開花習性がみられた。このことから，開花習性に関して，花粉形成の早い時期に異常を生じた系統の方が，花粉形成の遅い時期に異常を生じた雄性不稔系統より，正常な開花習性からの差異が大きくなる傾向みられた。このような観点から，各雄性不稔系

統の開花習性をみると，項目によっては必ずしも順序が一致しない場合があったが，全体としては平行関係がみられた。しかし，未開花穎花の発生率については，花粉の発育異常とは直接に関係なく，各雄性不稔系統の特有の変化である可能性が高く，今後の検討が必要である。

ところで，現在中国では細胞質雄性不稔系統が一代雑種種子生産へ実用化されているが，中国において使用している雄性不稔細胞質型について，鳥山・池橋[56]はWA型系統の開花時刻が稔性回復系統より著しく遅延し，雑種種子の稔実に十分な花粉の供給がみられないことを報告している。CHAUDHURY et al.[57]は起源の異なる3種の細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統の不稔花粉を4型に分類し，そのうちWA型系統の花粉は，不染色でかつ萎縮した不稔花粉を多く含んでおり，早い時期，すなわち，小胞子期に異常を生じることを報告している。CHAUDHURY et al.[57]の観察結果と本実験の結果とを合わせると，WA型系統の開花行動は，正常型系統の開花行動とはかなり異なることが推定され，興味深い。

イネの雄性不稔系統の開花習性が正常型原系統と異なったことは，雄性不稔研究でしばしば指摘されるいることであるが，これまでに詳細な報告はみられない。HIRAIWA and TANAKA[36]は，雄性不稔系統の開花時刻にふれ，開放受粉下で，雄性不稔系統の結実率が低いのは，正常型系統と比較して開花の均一性を欠くからであると述べている。

本実験の結果からは，雄性不稔系統の開花習性は，それぞれの雄性不稔遺伝子に特有の作用性がみられ，雄性不稔遺伝子によっては正常型に近い開花習性を示すものから，正常型の開花習性から大きく変動するものまであり，それらは，花粉の発育形態を観察することによって或程度予測ができた。

III　細胞質・核遺伝子型雄性不稔の細胞学的観察

1．緒　　言

雄性不稔細胞質と核遺伝子の相互作用によって生ずる雄性不稔植物は，ヘテロシス利用の一代雑種品種の交配母本として広く用いられていることから，育種的には極めて利用価値が高い。しかも多くの作物で自然界よりの発見，並びに連続戻し交雑による核置換法から作出されている[58]。イネにおける雄性不稔細胞質は，中国野生イネを用いた勝尾・水島[59]による核置換実験により報告された。SHINJYO[7]はChinsurah Boro IIの細胞質を連続戻し交雑により台中65号へ導入して細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統を育成するとともに，同様の交雑形式により稔性回復系統をも育成し，維持系統である台中65号と合わせて，いわゆる3系を確立した。このBoro型細胞質は，現在，中国で実用化されている日本型一代雑種品種の雄性不稔細胞質源として広く用いられている[8]。

筆者は栽培イネの遠縁品種間交雑から見い出される雑種不稔性を調査するうちに，相反交雑組合せのF_1間で花粉稔性に有意差を生ずる場合を認めた。そこで，日本型品種を反復親として連続戻し交雑を行い，核置換系統を作成したところ，雄性不稔性系統が得られた。この育成系統の不稔花粉は，CHUら[60]がBoro型細胞質雄性不稔系統で観察した知見と相違していた。すなわち，いずれも正常型とは異なるものの，3核形成に至るまで発育した花粉核を有していた。そこで筆者はBoro型細胞質雄性不稔系統の分譲を受け，筆者自身の育成した系統とともにグロースキャビネット内で栽培して両雄性不稔系統間で退化花粉の細胞学的特性を比較調査した。

2．材料および方法

インド型品種Butimuri-36（以下I-44と略称）と日本型品種農林9号(A-133)を用いて相反交雑を行い，それらのF_1にA-133を反復親として，A-133の核を有する置換系統と還元系統を育成した。各個体は2リットルポットに1～2本植えとし，F_1よりB_7F_1世代に至るまで温室内に栽培した。B_8F_1及びB_9F_1世代とBoro型細胞質雄性不稔系統(I-127)は，自然光グロース・キャビネット内で昼間27.5°C夜間20.5°Cの温度条件下で栽培した。この条件では，原品種であるI-44，A-133および台中65号(I-128)の生育はすべて良好であり，花粉稔性および種子稔性はともに90%以上の高稔性を示した。なお，花粉稔性の判定にはヨウ素ヨウ化カリ液を用いて濃染するか否かに分けて稔実花粉率とした。また，花粉核の形態的観察には酢酸カーミンを用いて染色し，常法により押し潰した。花粉直径の計測には，酢酸カーミンにより染色した花粉を1花当り100粒について計測した。なお採取材料はFAA液で24時間固定し，70%アルコールで冷所に保存したものを

使用した。葯壁組織の観察には，パラフィン切片(10 μ)を作成し，塩基性フクシン(フォイルゲン反応)，ナフトール・イエローS(蛋白反応)，アズールA(多糖類の反応)を用いて3重染色を行った。なお，アズールAはいわゆるSHIFF型試薬に調整した。

3．結果と考察

交雑組合せのI-44×A-133のF_1における花粉稔性は11%，逆交雑であるA-133×I-44 F_1の花粉稔性は34%で，相反交雑間に有意差が認められた。この相反交雑組合せのF_1にA-133を反復親として連続戻し交雑を行った初期世代における花粉稔性を**Table 14**に示した。置換系統では世代の進行とともに稔性が低下したが，還元系統では逆に向上する傾向が認められた。これらのうち，花粉稔性および種子稔性がともに完全不稔となったB_8F_1置換系統と，90%内外の高稔性にまで回復したB_8F_1還元系統を用いて，それぞれA-133を花粉親とする交雑実験を行った。置換系統B_8F_1×A-133では144穎花中132粒の結実(92%)，還元系統B_8F_1×A-133では104穎花のうち95粒が結実し(91%)，両交雑とも高い交配成功率が得られた。したがって置換系統B_8F_1の雌性器官は正常であったことが認められた。還元系統B_8F_1が高稔性を示したことから，I-44とA-133の核内遺伝要因によるいわゆる雑種不稔性はほぼ消失したと見なされた。したがって，置換系統B_8F_1(以下K-11と略称)は，I-44に由来する細胞質とA-133の核遺伝子との相互作用により雄性不稔となったもので，雌性器官には全く異常が認められず，いわゆる典型的な細胞質・核遺伝子型雄性不稔が育成された。K-11は外観的にはA-133ならびに還元系統B_8F_1(以下K-12と略称)と同様で，葯は不裂開であり，花粉は小型で，ヨウ素ヨウ化カリ液によっても濃染されなかった(**Plate VII b**)。

K-11ならびにI-127における花粉退化の機構を調べるため，1核期，2核期および3核期の花粉を採取して，正常型系統の場合と比較観察した。

1核期：葯壁組織と小胞子の発育についてパラフィン切片を作成して観察したところ，雄性不稔系統(I-127とK-11)においてはタペート細胞の肥大等の異常現象や小胞子の退化は全く認められなかった。また，各組織におけるフォイルゲン反応，蛋白反応，多糖類の反応のいずれについても，正常型系統との相違を識別できなかった(**Plate VII c, d**)。

2核期：CHU et al.[60]によればBoro型細胞質雄性不稔系統，I-127の花粉は1核期において一部に発育遅延が認められ，2核期に至ってもその約80%がなお1核にとどまることが報告されている。筆者等が酢酸カーミン染色により花粉核の形態観察を行った結果では，I-127およびK-11の両雄性不稔系統ともに花粉核第1分裂直後では，栄養核と生殖核の区分が明瞭でなかったが，やがて大きな仁を有する栄養核と小さな仁を含む生殖核とが明らかに識別されるようになり，発育経過については正常型系統と比べて全く相違が認められなかった(**Plate VII e, f**)。また，3核期末でのヨウ素ヨウ化カリ液による呈色反応においても雄性不稔系統の花粉の染色がやや薄かったものの形態的な差異は認められなかった(**Plate VIIg, h**)。

3核期：雄性不稔系統においても生殖核の分裂が起こり，3核が形成された(**Plate VIII a, b, c, d**)。一方，正常型系統では開花前日には，生殖核はいわゆる楔型となって酢酸カーミンにより濃染し，栄養核は不鮮明であった。これに反して，雄性不稔系統では2個の生殖核の染色性が不良で，形も楕円形を示し，隣接することが多かった。また，栄養核では仁の染色性が失われず，酢酸カーミンにより濃染され，円形を保持したままであった(**Plate VIII e, f, g, h**)。

イネ花粉では核の第2分裂期前後から澱粉等の蓄

Table 14. Pollen fertility (%) at each generation of the so-called substitution and restoration type of back crossings

Generation	Substitution backcross (I-44×A-133)×A-133 (%)									Restoration backcross (A-133×I-44)×A-133 (%)					
B_1	10	15	19	0	9	4	0	5	0	37	-	29	72	36	-
B_2	3	1	1	2	2	0	0	0	0	45	34	66	79	39	83
B_3	16	0	11	0	0	2	0	0	0	51	61	77	91	81	70
B_4	8	0	0	0	0	0	0	0	0	76	70	89	75	86	-

積が増加し，花粉の直径も飛躍的に増大する[32]。そこで，花粉核第2分裂直前から開花に至るまでの花粉を採取して，花粉直径を計測し，正常型との比較を行った。**Fig. 7** および **Fig. 8** から明らかな如く，両雄性不稔系統とも，花粉核第2分裂期以降から花粉直径の増大はほとんど認められなかった。したがって，筆者等の観察結果では花粉の発育異常の経過について CHU et al.[60]の結果とは明らかに異なっていた。CHU et al.[60] が正常花粉の発育中において花粉相互の生育の相違を見誤った可能性も考えられるが，むしろ，環境条件が違ったためではないかと思われる。コムギについて不稔花粉の退化時期が不良環境下では早まることが深沢[61] により観察されている。

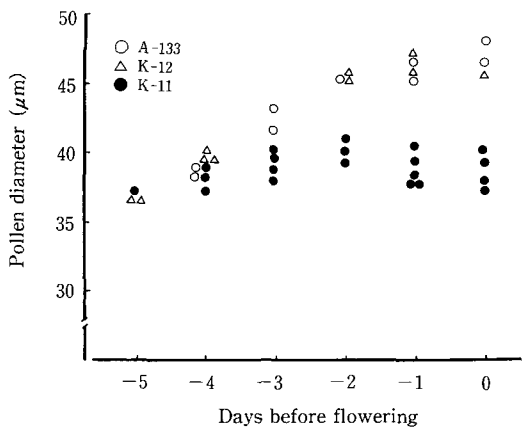

Fig. 7. Development of pollen grains both male-fertile and cytoplasmic male-sterile strains.

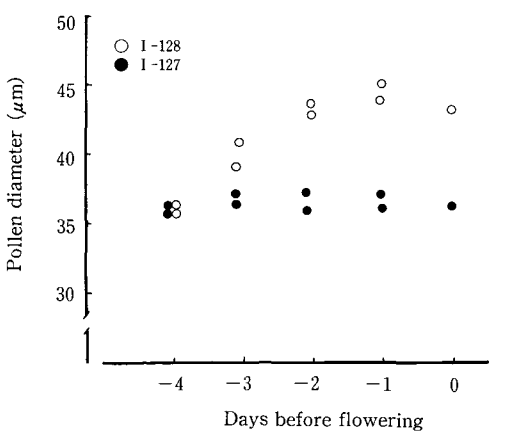

Fig. 8. Development of pollen grains in the [cms-*boro*] type male-sterile strain, I-127 and its maintainer, I-128.

いるから，環境条件の相違が，かかる花粉の発育経過に影響した可能性が考えられる。

LASER and LERSTENE[62] によれば，雄性不稔植物の花粉退化の機構は多様であり，1核期以内に退化が生ずるものがもっとも多いものの，2核にまで至るものとしてオオムギ[63]，コムギ[64] の例をあげている。しかし，筆者等の観察した如く，3核にまで至ったものはほとんどその例を見ないようである。なお，K-11 と I-127 の花粉退化が全く同じ機構によることは，両系統の細胞質に対して作用する稔性回復核遺伝子の共通であること[65] とも一致しており，おそらく K-11 と I-127 は同型の細胞質型を有すると考えられていた。ところが最近両系統からのミトコンドリア DNA を抽出して生化学的特性を調べたところ，両者は明らかにミトコンドリア DNA の性状が異なることがわかった[25]。

Ⅳ　雑種不稔性における花粉形態

1．緒　　言

日本型とインド型の如き遠縁品種間交雑の F_1 では，種々の程度の雑種不稔性を生ずることが広く知られている。かかる F_1 の不稔花粉の発生機構について多くの報告がなされているが，花粉自体の発育面から検討を加えた報告は少ない。

寺尾・水島[66] は，胚嚢と花粉の退化を観察し，花粉粒の発育過程において漸次，発育を停止した退化花粉を生ずることを報告している。OKA and DOIDA[67] は，花粉発育段階のいわゆる第2収縮期[52] 以後に，第1および第2花粉核分裂に伴って退化が起こり，F_1 の花粉成熟期に至って，退化花粉の中に2核を有し小型でデンプン蓄積の少ないものと，1核を有し全く内容物を欠くものとが見られることを報告した。田丸ら[68] は，遠縁品種間交雑から核置換法によって育成した細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統において，花粉が3核まで生長を続け，花粉の発育後期に至ってはじめて退化花粉を生ずる場合を報告した。

筆者は，遠縁品種間交雑の F_1 を材料として，不稔花粉の発生機構の解明を試みたが，不稔花粉として判定されたものの中に，大きさや染色性について様々な変異の見られること，すなわち，退化花粉粒内での物質蓄積の程度について変異がみられることを見い出した。さらに，デンプンの蓄積程度が異なる退化花粉の出現頻度は交雑組合せを異にすること

によっても相違する傾向を認めた。そこで，本報告では，開花前日のF_1個体にみられる多様な退化花粉について，細胞学的な観察により異型の退化花粉の示す頻度分布を交雑組合せ間で比較検討した。

2．材料および方法

遠縁品種間交雑F_1に生ずる部分不稔性は，インド型品種を異にする場合の方が，日本型品種を異にする場合よりも，広い変異幅を生ずる[69]。そこで，本実験では，インド型に属する5品種と日本型の1品種を用いて，日本型×インド型のF_1を作成して開花前日の花粉形態について観察した。ただし，供試したインド型品種のうち，I-44は，先に筆者等が報告した細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統を育成する場合に細胞質提供親として用いたもので，この交雑組合せについては相反交雑を作成して供試した。また，A-133×I-45では，空虚花粉の出現頻度が極めて高かったので，さらに詳細に調査するために，日本型の4系統にI-45を交配し，F_1個体の空虚花粉を調査した。供試系統，品種名，由来，花粉稔性および種子稔性を**Table 15**に示した。

各個体は2リットルポットに1～2本植とし，自然光グロース・キャビネット内で，生育の全期間にわたって，昼間27.5°C，夜間20.5°Cの温度条件で栽培した。**Table 15**から明らかな如く，この条件下ではすべての親系統の生育は良好であり，花粉稔性および種子稔性はともに90%以上を示した。なお，花粉稔性の判定にはヨウ素ヨウ化カリ液を用い，3～5穎花について1穎花当たり300～500粒を調査して，各穎花の平均をその個体の平均花粉稔性として用いた。花粉の形態観察は，採取材料を冷蔵庫内で，FAAにより24時間固定した後，70%アルコール中で保存し，随時使用に供した。染色には酢酸カーミン液を用い，まず花粉直径を計測した後，花粉核の観察のために常法により押し潰しを行った。花粉直径の計測については，親系統では，2穎花について1穎花200粒ずつ，合計400粒を調査した。F_1個体では，3穎花からの600粒を計測した。空虚花粉率は，同時に酢酸カーミン液で染色し，親系統ならびにF_1とともに3穎花ずつを用い，1穎花500粒以上を調査して，総調査花粉粒に対する空虚花粉の百分率で表示した。ただし，A-133×I-45については，年次と個体を変えて，13穎花について調査した。

3．結　　果

1）親系統の花粉形態

親系統の花粉稔性はいずれも90%以上の高稔性を示したが，それらにみられる正常花粉では，花粉粒内にデンプン等の内容物が充満して球形を呈し，ヨウ素ヨウ化カリ液によって黒く濃染した。しかし，ごく少数ではあるが，ヨウ素ヨウ化カリ液によって濃染しない小型の不稔花粉を含んでいた（**Plate IX A, B**）。

親系統の花粉直径の頻度分布を**Fig. 9**に示した。花粉直径は，固定方法や，採取時期により微妙に変化したが，日本型のA-133（農林9号）の花粉直径の平均は45.1μであり，インド型(I-系統)の5系統の平均は41.8μで，日本型A-133の方が，インド型各系統に比べて，花粉直径がやや大きいことが認められた。しかし，いずれの親系統においても，正常

Table 15. List of strains used in the experiment

Strain	Name	Origin	Pollen fertility (%)	Spikelet fertility (%)
I-34	Mushakudanti	India	93.0	95.0
I-44	Bhutmuri-36	India	94.9	96.3
I-45	Charnock	India	94.4	91.6
I-100	Chinmen-Tuomen-hongmi	China	96.6	96.4
E-48	60-nichi-kiso	China	94.6	92.0
A-133	Norin-9-go	Japan	93.0	95.0
A-5	Akamuro	Japan	93.0	91.2
A-13	Chabo	Japan	93.5	93.5
A-31	Fukoku	Japan	94.2	96.1
A-43	Hokkaimochi-1-go	Japan	93.3	94.3

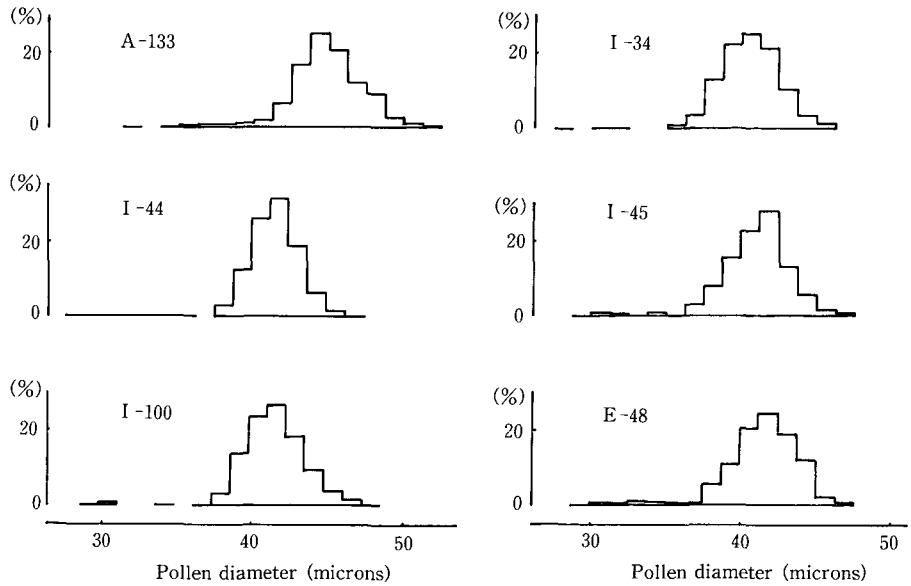

Fig. 9. Frequency distributions of pollen diameters at the stage of one day before anthesis in parental normal strains.

花粉粒の変異は正規分布を示し，さらにそれに接続して小型の退化花粉が広い分布域にわたる連続変異を示しており，分布型は系統を異にしてもほぼ同様であった。親系統では，ほとんどの花粉は正常な3核を有し，2個の生殖核は酢酸カーミンにより濃染したが，栄養核は形状がやや不鮮明であった(**Plate X A, B**)。

少数の退化花粉の中には，全く内容物の見られない空虚花粉から，内容物はかなり蓄積していて3核を形成するが，その栄養核内の仁は酢酸カーミンにより濃染して球形を保持したまま残存するものまでが見られた。未発達の不稔花粉では，花粉粒内に蓄積された内容物の程度に応じて，その発育段階が連続的であり，もし花粉発育に伴う花粉核の形態変化に基づいて区分するならば，3核退化型花粉，2核退化型花粉，1核退化型花粉および空虚花粉の4型に分類された。親系統では，これら各種の退化花粉が正常花粉中に散見された。**Fig. 9** から明らかな如く，親系統の退化花粉の発育段階は連続的であり，ほとんど特別なモードが見られなかった。上記の観察結果から，退化花粉は花粉発育の各段階において発生していることがうかがわれる。

2）F_1 の花粉形態

日本型の A-133 とインド型各系統を組み合わせた交雑 F_1 個体の花粉稔性および種子稔性を **Table 16** に示した。F_1 の稔性は，インド型品種を異にすることにより，広い幅の変異がみられ，従来の知見と一致した[69]。また，A-133 と I-44 との交雑 F_1 では，相反交雑間で差が認められ，I-44 を母本とした方が，A-133 を母本に用いた場合より稔性がより低下した。なお，A-133 に I-34, I-44 および I-45 を交配した F_1 については，今回の実験と異なる年次において，札幌の温室内で栽培して，稔性調査を報告した成績があるが，それらと比べると花粉稔性がやや高まる傾向が見られた。とりわけ，A-133×I-45 の F_1 では，その傾向が著しかった。

Table 16. Pollen and spikelet fertilities of F_1 plants between *japonica* and *indica* strains

Cross combination	Pollen fertility (%)	Spikelet fertility (%)
A-133× I- 34	85.4	98.6
A-133× I- 44	33.2	42.4
I- 44× A-133	18.3	17.6
A-133× I- 45	45.7	75.0
A-133× E- 48	11.7	13.0
A- 5× I- 45	58.4	90.1
A- 13× I- 45	26.7	-
A- 31× I- 45	33.4	-
A- 43× I- 45	22.3	-

F_1 では，正常花粉の他に，ヨウ素ヨウ化カリ液によって濃染しない，内容物の乏しい，小型で変形あるいは収縮した不稔花粉が多数見られた（**Plate IX C～H**）。これらの不稔花粉の形態は多様で，内容物の蓄積程度も連続的である。しかし，A-133×E-48 の F_1 では内容物のきわめて少ない不稔花粉が多く見られた（**Plate IX H**）のに対して，A-133 と I-44 の相反交雑からの F_1 ではA-133×E-48 より内容物の蓄積された花粉が多かった（**Plate IX D, F**）。さらに，A-133×I-45 では，内容物の全く無い収縮した不稔花粉が多数見られた（**Plate IX E**）。すなわち，交雑組合せ間で，不稔花粉におけるデンプン蓄積の程度に相違が認められた。F_1 の花粉直径の頻度分布を **Fig. 10** に図示したが，図から明らかな如く，F_1 では多数の小型花粉（退化花粉）で広い幅の連続変異を示し，交雑組合せによってそれぞれ異なる分布型を示した。高稔性を示した A-133×I-34 の F_1 では，正常花粉の占める変異域が1つのモードを有し，あたかも交雑親と相似した分布型を示した。A-133×I-44 と A-133×I-100 の交雑 F_1 では，大型の正常花粉と小型の退化花粉の2つの分布域に区別される2頂分布を生じたが，A-133×I-45 の F_1 ではモードが1つで，正常花粉から退化花粉に至る連続分布を示した。A-133×E-48 と I-44×A-133 の各 F_1 では，正常花粉域にわずかにモードが見られたものの，退化花粉域では偏った分布型を示した。これらの退化花粉の発育程度は，内容物の蓄積程度について連続的であったが，親系統と同様に，退化花粉を花粉核の形態に基づいて，3核退化型花粉，2核退化型花粉，1核退化型花粉，空虚花粉の4種類に分けた。岡[18]は，不稔花粉には2核と1核および空虚花粉が含まれることを報告しているが，この外に，内容物の比較的多い退化花粉の中には，栄養核内の仁が酢酸カーミンにより濃染し，球形のまま残存しているような3核を含む退化花粉の多く含まれることがあった（**Plate X C, D**）。2核退化型花粉では，栄養核（大）と生殖核（小）の識別が可能なまでに発育したもの（**Plate X F**）が多く，2核初期の形態（**Plate X E**）は比較的少なかった。1核退化型花粉（**Plate X G**）は，各交雑ともごくまれであった。空虚花粉（**Plate X H**）中には，花粉直径の計測の不能なほど収縮したものが多かった。

開花前日の F_1 個体には，正常花粉とこれらの各種の退化花粉が種々の割合でみられた。しかし，交雑組合せ間で，これら退化花粉型の出現頻度に相違がみられたので，各交雑組合せの F_1 ごとに記すこととする。

A-133×I-34：80%以上の高稔性を示し，正常花粉粒が多かったが（**Plate IX C**），花粉直径の変異分布から明らかなごとく，退化花粉の多くは正常花

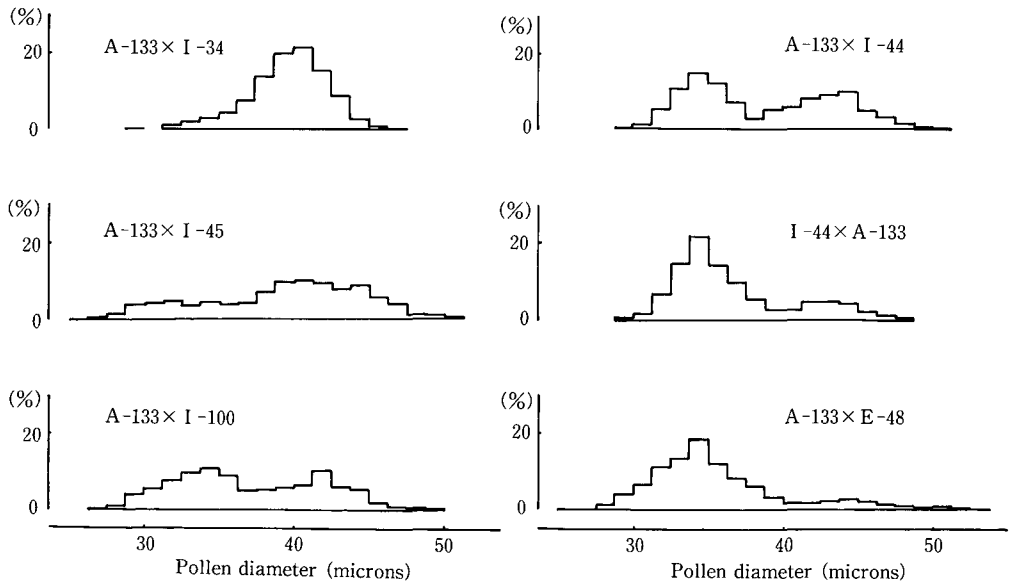

Fig. 10. Frequency distributions of pollen diameters at the stage of one day before anthesis in the F_1 hybrids between *japonica* and *indica* strains.

粉に連続した変異を示し，退化花粉中には比較的内容物に富むものが多く，2核退化型も見られたが，退化花粉の多くは3核退化型であった。

A-133×I-44：小型の不稔花粉でも内容物の蓄積が見られ（**Plate IX D**），退化花粉の多くは3核を形成した（**Plate X C, D**）。

I-44×A-133：前記の如く，I-44の有する細胞質はBoro型で，A-133からの核遺伝子との相互作用により雄性不稔性を示した。したがって，この逆交雑であるA-133×I-44と比べて稔性が著しく低下した。花粉直径の頻度分布をみると，A-133×I-44より小型の花粉が多く，相対的に正常花粉の減少する分布を示した。不稔花粉における内容物の蓄積程度はA-133×I-44における不稔花粉とほぼ同様であった（**Plate IX F**）。退化花粉の形態では3核退化型が多かった。

A-133×I-45：花粉直径の頻度分布をみると正常花粉から退化花粉に至るまで多様な形態の花粉が出現した。内容物が種々の程度に蓄積する不稔花粉がみられ（**Plate IX E**），ヨード・ヨードカリ液を用いた花粉稔性の調査では，稔と不稔の判定の困難なものが多数含まれていた。3核退化型花粉も多かったが，他の交雑組合せより，空虚花粉（**Plate X H**）が極めて多く出現する特徴がみられた。

A-133×I-100：A-133×I-44と同様に正常花粉と退化花粉の両域にそれぞれモードを有する2頂分布を形成する傾向がみられた。内容物の少ない不稔花粉と内容物がかなり蓄積された不稔花粉の両者が混在していて（**Plate IX G**），退化花粉の形態は，3核退化型の外に，2核退化型（**Plate X E, F**）もみられた。

A-133×E-48：高不稔性を示し，不稔花粉では内容物の蓄積が乏しく（**Plate IX H**），退化花粉の形態は，2核退化型がもっとも多かった。

3．空虚花粉の出現頻度

空虚花粉は親系統においてもごく少数みられたが，F_1個体では，A-133×I-45にとりわけ多くの空虚花粉が観察された。空虚花粉で計測可能なものを見ると，他の退化花粉より一般に小型のものが多く，花粉の発育段階の早い時期に，何らかの原因で発育停止を生じたと考えられる。コムギの花粉についての報告[61]によれば，不稔花粉の退化時期は不良環境下では，早まることが観察されている。したがって，A-133×I-45に見られる空虚花粉の多発は，何らかの環境要因によって生じた可能性も考えられる。空虚花粉は，他の退化花粉よりも識別が容易であったので，空虚花粉の発生が多くみられたF_1個体の交雑親に用いたインド型系統(I-45)に日本型4系統を交配して，10組合せのF_1とその親系統について空虚花粉の出現割合を調査した結果を**Table 17**に示した。

親系統における空虚花粉の出現頻度は，もっとも高かったものでも，A-133の3.73%であり，I-44が0.33%で，もっとも低かった。一般に日本型の方がインド型より多くの空虚花粉を生ずる傾向がみられたが，インド型内では，I-45が一番高い値をを示し，日本型5系統の平均(2.78%)とほぼ等しい値であった。

A-133×インド型系統のF_1では，A-133×I-45が著しく高い値を示し，次いで，A-133×I-100が日本型のA-133よりわずかに高い値を示した。A-133×I-44とI-44×A-133の相反交雑のF_1では，Boro型細胞質を有するI-44×A-133の方が，空虚花粉の出現がやや高い値を示したものの，両交雑ともにA-133における出現率を下回っていた。なお，A-133×I-45については，年次と個体を変えて13穎花について調査したが，各穎花について平均した値は18.37%であり，総調査花粉粒に対する空虚花粉の割合とほぼ等しかった。穎花ごとでは，最小の6.80%から最高の23.90%までの変異がみられた。

日本型系統×I-45の4種の交雑組合せのF_1では，いずれも親系統より高い値を示したものの，A-5×I-45では，もっとも低く，A-133とほぼ同様な値を示した。4組合せの平均では16.77%であり，日本型系統×I-45のF_1では，比較的空虚花粉が多く出現するものの，組合せや穎花によって大きな変異が見られた。

以上の実験結果から，遠縁品種間交雑のF_1では，交雑組合せを異にすることにより，花粉発育の種々の段階で発育停止した退化花粉を多様な割合で含み，それらの各退化花粉型の出現頻度は，交雑組合せを異にすることにより，それぞれ相違が認められた。

4．考　　察

イネの遠縁品種間交雑のF_1に見られる不稔性の機構に関して，今まで多数の報告がある。最初に栽

Table 17. Frequency of empty pollen grains in parents and F_1 plants

Strain or cross combination	No. of spikelets	No. of pollen grains observed	No. of empty pollen grains	Empty pollens (%)
I - 34	3	1,533	9	0.59
I - 44	3	1,528	5	0.33
I - 45	3	1,591	44	2.77
I -100	3	1,540	13	0.84
E - 48	3	1,573	13	0.83
A - 5	3	1,613	43	2.67
A - 13	3	1,582	44	2.78
A - 31	3	1,534	22	1.43
A - 43	3	1,590	52	3.27
A -133	3	1,553	58	3.73
A -133× I - 34	3	1,537	6	0.39
A -133× I - 44	3	1,608	23	1.43
I - 44×A -133	3	1,710	41	2.40
A -133× I -100	3	1,538	64	4.16
A -133×E - 48	3	1,589	30	1.89
A -133× I - 45	13	6,804	1,227	18.03
A - 5× I - 45	3	1,606	65	4.05
A - 13× I - 45	3	1,576	204	12.94
A - 31× I - 45	3	1,609	422	26.23
A - 43× I - 45	3	1,551	370	23.86

培稲品種をインド型と日本型へ分類したKATO[70]によれば，F_1 では減数分裂を終える4分子期まで異常が認められないことを報告している。さらに，加藤は，花粉の発育を初期，中期，成熟期に分け，不完全花粉の発生は初期に少なく，中期と開花期においてほぼ等しい割合で出現することを報告している。加藤の初期，中期，成熟期の3期の区別は，必ずしも明確ではないが，F_1 の減数分裂が正常に行われ，その後，退化花粉が漸次出現するという観察結果は，寺尾・水島[66]や，その他の研究者によっても支持された。一方，HENDERSON et al.[71]は，F_1 の減数分裂第一分裂後期において染色体橋がみられたのは，逆位を示唆するものであり，栽培稲の遠縁品種間で染色体の構造差異が存在するという見解を示した。CHAN[72]は，総説の中で，2つの(品種)群間における染色体の潜在的(cryptic)な構造差異に基づく雑種不稔性の存在は，多くの研究者により受け入れられていると述べている。このような品種間の構造差異について，岡[73]，OKA[74]は否定的であり，もし存在するとしても僅少であり，品種の分化は主として遺伝子型の変化に基づいているとの考えに立ち，F_1 に出現する種々の程度の不稔性を，配偶子発育因子(gametic-development gene)と呼ぶ重複遺伝子組の作用により説明した。一方，池橋[75]は遠縁品種間の交雑 F_1 の不稔性を説明するには，2つの理論的モデルがあるとして岡の説を便宜的に二座位説，北村[19,76]の説を一座位説とし，日印雑種の F_1 の種子不稔性を一座位説から説明するとともに，日本型とインド型の双方に親和性を示す広親和性遺伝子 S^n の存在を報告した。

さて，本実験で観察された交雑組合せの F_1 は，あまり多くなかったが，A-133とI-44との相反交雑ではともに3核退化型花粉が，A-133×E-48では2核退化型花粉が，またA-133×I-45では空虚花粉がそれぞれ多い傾向がみられた。これらの多様性は，花粉退化の時期が交雑組合せにより異なることを示唆している。トウモロコシの雄性不稔性では，核遺伝子の種類に対応して，それぞれ特有の退化花粉を生ずることが報告されている[28]。イネでも減数分裂後12日目で成熟花粉となり，その間2度にわたって花粉核の分裂を繰り返すので，もし，不稔性が染色体の構造差異に基づくものであれば，それに特有の退化花粉型を示すであろうし，その他の遺伝的な原因によっても，それぞれに固有の退化花粉形態を生ず

ると考えられる。このような見地から，さらに多くの交雑組合せのF_1を作成して，花粉を発育段階ごとに採取し，花粉退化の発生機構を検討する必要があろう。もし，岡[18]の仮説にしたがうとすれば，高不稔性を示すF_1では，多数の配偶子発育因子組が関与している。また，SINJYO[77]の作出した細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統ではBoro型細胞質に，配偶体的作用を有する*Rf*なる稔性回復遺伝子が作用している。さらに，前川[78]によればBoro型細胞質には複数の花粉稔性回復遺伝子が関与している場合もあり，それらはすべて配偶体的に作用する。岡による配偶子発育因子の如く，補足遺伝子として2対ずつ組をなして作用する。かかる見解に基づくならば，稔実あるいは不稔花粉を生ずるのは，花粉の有する遺伝子型によって決まると考えられる。

筆者らは，イネにおいて花粉核の分裂を比較的明瞭に観察することに成功した。第1花粉核分裂では，トウモロコシや*Agave attenuate*にみられるごとく，栄養核と生殖核の染色質配分は明らかに異なってみえる。さらに，第2花粉核分裂で，2個の雄核を生ずる頃より退化花粉が多発し，特にこの時期において，不稔花粉では炭水化物その他の物質の蓄積が著しく抑制される。

今後は，これらの花粉発育に関して，組織化学的，あるいは生化学的方法をも用いて，解析を進めねばならない。

V 総合討論

イネの核遺伝子型雄性不稔は，育種場面に応用できる有用形質として，その利用法が提案されている[26,1]。しかし，一般に核遺伝子型雄性不稔を利用する場合には，雄性不稔系統の維持と増殖を，株わけや組織培養によるような無性繁殖や，稔性系統との交雑による分離から選別する方法などが考えられている。しかし，現在，前者は経済的に不可能であり，後者は稔性個体の分離を，例えば幼苗期に雄性不稔遺伝子に連鎖する標識形質を用いて不稔個体を選別したり，開花前に稔性個体を識別して，抜き取らねばならないという困難な作業を抱えている。しかし，最近見い出された環境反応型の雄性不稔系統では，日長あるいは温度といった環境条件を変えることにより，雄性不稔性を制御することが可能となり，採種上の難点が一応解決された。そこで，中国ではむしろ細胞質・核型雄性不稔に代わっての利用が広まっている。普通の品種はすべて稔性回復遺伝子を優性で持っていることから，稔性回復遺伝子の探索や導入も特に必要とならず，遺伝様式も簡単で取扱い易いことから，一代雑種品種の採種に広く用いられ，いわゆる2系法と称されている。ところが，環境反応型の雄性不稔遺伝子の利用については，丸山・粉川[13]によれば，日長反応型の雄性不稔遺伝子を他の品種にへ移すと温度反応型の品種になったり，通常不稔となる長日条件下でも気温が低いと稔性が回復し，自家受粉が行われるといった問題点が指摘されている。しかし，この点に関して，今後は臨界温度の低い系統の選抜をすることにより解決されるであろう。ところで，雄性不稔性が環境によって変動することは，予期せぬ気象の影響を受ける危険性がある点を強調せねばならないので，環境反応型雄性不稔系統を育種に利用するに先立って，雄性不稔性の安定した形質発現が課題となる。

現在，イネの核遺伝子型雄性不稔は，育種的利用への期待が高まるなかで，トウモロコシやトマトに匹敵する数ほど，多数の変異体が見い出されている。しかし，個々の遺伝子の作用性についての組織的な研究は，未だほとんど見当たらない。

雄性不稔系統では，葯および花粉の可視的異常に伴うか，あるいはそれに先行して正常系統と異なるなんらかの生化学的変化を生じていると考えられる。IZHAR and FRANKEL[79]は，ペチニアの細胞質・核遺伝子型雄性不稔と核遺伝子型雄性不稔について，葯内のpHの変化と，花粉母細胞をとりまくカロス膜を溶かす酵素活性や小胞子の崩壊関係などを比較している。イネではこの方面の研究は，未だきわめて少ない。LU and ZHANG[80]は花粉膜を構成するスポロポレニンとタペート細胞について観察し，M-101より生じた雄性不稔系統と正常系統間では差が認められなかったことを報告している。

イネにおける，葯内の生理的変化や物質代謝に関する異常は，環境によって生じる雄性不稔について多くの報告がある。すなわち，障害型冷害での雄性不稔や，窒素過多による不稔についても多くの報告がある[32,81,82]。例えば，冷温処理を行なったイネの葯では，プロリンの減少が大きく，逆にアスパラギンの増加がみられ，他の多くの雄性不稔植物と同じ様な結果が得られている[83]。障害型冷害では，タペート組織の異常等，遺伝的雄性不稔に類似した現象がみられている[31]。タペート細胞の異常については，その

他ジベレリンの処理[84]やオーキシン処理[85]によっても誘発することが報告されており，今後はこれらを関連づける研究が望まれる。

さて，本研究から明らかな如く，雄性不稔系統と正常系統を比較すると，一般に，花粉発育，開花等の遅延が観察され，生育全般についての不調を生じる傾向を示す。例えば，正常系統では，穂を抽出しながら開花するのに対して，雄性不稔系統では，穂の抽出を終えてから開花する系統が多い。環境反応型雄性不稔系統では穎花分化期から花粉母細胞形成期あるいは出穂期までを日長処理することにより，花粉の稔と不稔が変動する[55]。すなわち，環境反応型の雄性不稔では，花粉分化以前に日長あるいは温度処理することにより雄性不稔性の発現が抑制される。このことは，雄性不稔遺伝子の作用性を解明するに当たって雄性生殖器官との直接的な結び付きだけでなく，生殖生長の全過程で，この現象を捕らえる必要のあることを示唆する。

本実験では，核遺伝子型雄性不稔，細胞質・核遺伝子型雄性不稔および雑種不稔性について，花粉の形態形成の面から遺伝子の発現や作用性を検討した。雄性生殖器官の花粉母細胞から出穂開花に至るまでの約2週間，小胞子は目ざましい生長を遂げ，2回の核分裂や花粉膜の形成を完了して，成熟花粉に至るわけで，この間，雄性生殖器官は，内的にも外的にも，きわめて感受性の高い時期を通過すると考えられる。花粉の形態形成に関与する雄性不稔遺伝子は，本研究では少なくとも27種の差異が同定されており，それぞれ固有の作用性を示して，不稔を生じる発育段階が異なっていた。しかし，イネの生殖生長という複雑な機構に係わる点では共通である。不稔性に係わる遺伝子の研究は，育種的な価値のみならず，高等植物の生殖生長過程を解明する上でも，重要な知見となろう。

最近，タバコとナタネでTA 29-RNaseT 1やTA-29-barnaseをつないだアグロバクテリウムを用いて形質転換法により雄性不稔植物を作り上げて注目された[86]。また，TA 29-barstarを導入した稔性回復花粉親も作られ，一代雑種種子の採種へ利用される新しい途が開かれた。しかし，ここで育成される雄性不稔植物はすべて核遺伝子型雄性不稔であり，少なくともイネではこのような方法を用によらずとも，人為突然変異によってもっと多様な核遺伝子型雄性不稔の突然変異体を得ることができた。したがって，生物工学的手法のみに偏らずとも，突然変異育種法をもっと有効に利用して種々の有用な遺伝子源を作成し，その中から前記の環境変異型雄性不稔の如く，F_1の採種に最適な変異体を選ぶような育種が重要と思われる。

本研究はかかる雄性不稔変異体の多様性についての基礎知見を明らかにしたことで大きな意義を持つであろう。

摘　　要

本実験では，ニホンマサリより人為的に誘発された29種の雄性不稔突然変異系統について，雄性不稔遺伝子の同定と作用性を明らかにするため，(1)雄性不稔遺伝子の遺伝様式，(2)遺伝子同定，(3)葯の形態，(4)花粉の発育異常，(5)開花習性を調査した。さらに，(6)細胞質・核遺伝子型雄性不稔および(7)雑種不稔性についても，花粉の発育形態を細胞組織学的に観察した。

1．核遺伝子型雄性不稔

29系統の核遺伝子型雄性不稔系統は，いずれもニホンマサリから放射線あるいはエチレンイミン処理により誘発された人為突然変異体から由来している。筆者は藤巻・平岩[41]の材料を受け継ぎ，1983年から株分けにより，増殖，維持して遺伝子分析に供した。

1）各雄性不稔系統に農林9号（以下A-133と略記）を交配して得られたF_1植物では，すべての交雑組合せで，花粉稔性と種子稔性が回復し，90%以上の高稔性となった。このことから，各系統の雄性不稔遺伝子はすべて劣性であることがわかった。

2）29組合せのF_2集団のうち，23組合せにおいては可稔個体と不稔個体の分離を生じ，いずれも3：1の単遺伝子による分離比に適合した。したがって，これらの雄性不稔突然変異系統には1対の劣性遺伝子が関与していた。3：1との適合度が低かった6組合せのうち，MS-19を交雑親とした場合には15：1の重複遺伝子による分離比に適合した。

3）単遺伝子による分離比に適合しなかったMS-7，MS-10，MS-19，MS-23，およびMS-24のB_1集団において，可稔個体と不稔個体の分離を調べた結果，MS-7，MS-10，MS-23，MS-24の4組合せでは，いずれも1：1の単遺伝子による分離比に適合し，F_2とは異なる結果となった。MS-19では

3：1に適合しF_2での重複遺伝子の仮説を支持した。

4）各雄性不稔系統の有する，雄性不稔遺伝子間相互の異同を明らかにするため，雄性不稔系統間の総当たり交雑を行なった。その次代では20組合せにおいて不稔個体の出現がみられた。しかし，MS-4, MS-9, MS-15およびMS-29以外の16組合せでは，不稔個体はいずれも1個体のみであった。しかし，MS-4とMS-9ならびにMS-15とMS-29の両組合せでは，可稔個体と不稔個体を1：1の比に生じた。遺伝子仮説の図解(**Fig. 1**)から明らかな如く，このような分離を生ずるのは核遺伝子が互いに同一の場合に限られる。したがって，MS-4とMS-9間，MS-15とMS-29間には，それぞれ同一の雄性不稔遺伝子が関与していることが判明した。

2．葯組織および花粉の形態観察

1）29系統のうち8系統で自殖稔性が認められた。このうちMS-21は最も高く24.2%であった。他の7系統はいずれも10%未満であった。

2）各雄性不稔系統へ，正常花粉を交配して雌性器官の結実率を調査したところ，いずれも高稔性となり，各雄性不稔系統の雌性器官は正常であることが認められた。

3）29系統のうち，10系統の葯中には花粉粒が全くみられなかった。しかし，9系統では，葯中の花粉粒が著しく減少していた。10系統の葯では正常花粉と同程度の多数の花粉が観察された。

4）花粉粒がみられた19系統のうち，12系統ではヨウ素ヨウ化カリ(I−KI)で染色される花粉が観察された。このうち，MS-8とMS-25では染色性花粉の出現率が高く，正常型個体とほぼ同様であった。MS-21では，穎花によりその出現頻度が著しく異なり，0%から85%までの変異がみられた。しかし，他の9系統ではその頻度が低かった。

5）29系統での葯長の平均は1.55 mmであった。A-136の1.80 mmより長い葯を持つ系統が4系統あった。29系統の葯幅の平均は0.337 mmであった。A-136の0.43 mmより幅広い葯を持つ系統は4系統で，MS-8とMS-25では裂開性葯が含まれていたため，大きな値を示した。

6）葯の裂開が，自殖種子稔性がみられた8系統(**Table 2**)を含む10系統について観察された。そのうち，MS-25の裂開性は全く正常であった。しかし，染色性花粉の出現率が90%以上のMS-8の裂開率は低く，7.9%であった。MS-21では11.1%で，MS-8より大きい値であった。他の系統の裂開率は小さかった。

7）葯色と花粉粒数の関係をみると，花粉粒数が正常な葯はA-136と同様に黄色を呈し，葯長もほぼ等しかった。花粉粒のみられない葯は透明な白色で，小型であった。花粉粒数の減少が観察された系統の葯の多くは淡黄色を呈し，長さも前者の中間系統が多かった。すなわち，各雄性不稔系統の葯色は，1核期後期以降の花粉膜が肥厚した花粉を多数含むと黄色となり，少数であれば淡黄色となり，全く含まぬ時は白色となった。染色性花粉はいずれも3核期花粉であり，その含有の程度にかかわらず，葯色は黄色となった。

以上の観察結果から開花時における葯の形態から雄性不稔系統を5型へ分類した。

A：正常型葯（**Plate II b**）
　1系統
B：黄色退化型葯（**Plate II c, d**）
　9系統
C：淡黄色退化型葯（**Plate II e, f**）
　9系統
D：白色退化型葯（**Plate II g**）
　7系統
E：白色小型退化型葯（**Plate II h**）
　3系統

8）正常型個体ならびに各雄性不稔系統について，葉耳間長を指標として幼穂を採取し，特定の穎花（第1枝梗第4穎花）を中心に花粉の発育について比較検討した。以下の実験はすべて自然光グロースキャビネット内（昼間28.5°C，夜間21.5°C）で栽培し，原品種であるA-136を正常型個体とした。

各雄性不稔系統には，様々な花粉の発育異常が観察され，異常花粉の出現時期と形態によって29系統を以下の7群へ類別した。

① 花粉母細胞残存型(3系統)：花粉母細胞において発育が停止した（**Plate V a, b**）。葯は白色小型退化型葯となった。

② 4分子−小胞子期異常型(5系統)：4分子期直後のいわゆる自由小胞子以後に起こる花粉膜の肥厚がみられなかった。大小の小胞子が葯中に含まれ，中には多核性巨大小胞子の形成がみられ（**Plate V c, d**），葯は淡黄色が多かった。

③　タペート細胞異常型(9系統)：タペート細胞に風船状，丘状等の異常肥大がみられた(**Plate V e, f**)。小胞子は薄い花粉膜で液胞化し，互いに癒着していた。外穎長5mm(葉耳間長＋0.5cm)で，すでに花粉の退化した穎花が多かった。系統によっては，葯のタペート異常程度が異なり，小胞子が充実花粉にまで生育する場合もあった。殊にMS-10, MS-12では，極く低稔ではあるが，種子稔性もみられた。このような葯はMS-6においても観察された。葯は白色退化型が多かったが，開花期まで花粉粒がみられる葯では淡黄色退化型となった。

④　小胞子中期異常型(2系統)：タペート細胞の顕著な異常はみられなかった。小胞子は膨張した(**Plate V g**)が，出穂期には収縮した薄い花粉膜を持つ退化花粉が葯中に残存し葯壁に付着していた(**Plate V h**)。葯は淡黄色退化型となった。

⑤　空虚花粉型；(4系統)：小胞子期のタペート細胞は正常で，1核期において花粉膜が厚く肥厚した頃に，細胞質が花粉の内膜から遊離する異常を生じた。(**Plate VI a**)。開花期の不稔花粉は，厚い発達した花粉膜を有する空虚花粉が多かった(**Plate VI b**)。葯は黄色退化型であった。

⑥　花粉核残存型(3系統)：タペート細胞は正常で，花粉核第1分裂を経てから発育が停止する花粉が多かった。出穂期の葯中には，内容物を有する不稔花粉がみられ，それらの多くは，栄養核と生殖核の区分ができた2核花粉であった(**Plate VI c**)。他に空虚花粉やデンプンが未充実の3核退化花粉および充実花粉がみられた(**Plate VI d**)。葯は黄色退化型であった。

⑦　充実花粉型(3系統)：タペート細胞は正常で，MS-8, MS-25では1核期，2核期花粉とも正常に発育し，出穂期の葯中には充実した3核期花粉がみられた(**Plate VI e, f**)。MS-21は出穂期に正常な3核期花粉を形成したが，穎花により出現頻度に大きな変異が見られ，空虚花粉の多い穎花もあった。MS-25では，発芽孔の形成が異常となり，花粉は不発芽となった。

以上の観察結果から，29種の雄性不稔系統について異常花粉の出現時期を，花粉の発育段階に従って，**Fig. 4**に示した。

3．開花習性

雄性不稔植物の開花は，不稔化に伴う現象として開花習性に変動を生じた。

各雄性不稔系統について，第1枝梗から第4枝梗までのそれぞれの穎花について，出穂後の開花開始日，日別の開花数，未開花数そして開花時刻を調査した。

1）正常個体であるA-136の開花習性は，(1)出穂後直ちに開花が始まり，(2)2日目に開花最盛期となり，(3)1週間で開花を終えた。(4)未開花穎花の出現率は1％程であった。(5)開花時刻は，正午頃が最盛時刻となり，早朝や夕方には開花しなかった。(6)各穎花の開花時間は2時間以内であった。

2）雄性不稔系統では，(1)出穂後，直ちに開花する系統が少なく，開花開始日と開花終了日が遅延した。(2)開花最盛日も遅くなった。(3)多くの系統では開花期間は，ほぼ1週間で，正常個体と等しかったが，1部の系統では長期間にわたった。(4)多くの系統では，未開花穎花率は10％未満であったが，未開花穎花が多数出現する系統もあった。(5)開花時刻は，多くが早朝から始まり，最盛時刻は正常型個体とほぼ同時刻であったが，開花が夕方まで持続した。(6)各穎花の開花時間は長く，2時間以上になるものが70％程度あった。

3）花粉形成の最終時期に異常を生じる充実花粉型であるMS-8, MS-21, MS-25では，出穂直後から開花が見られ，開花行動は正常個体に最も近かった。一方，花粉母細胞に異常を生じる花粉母細胞残存型に属するMS-2, MS-3, MS-22では出穂後からの大幅な開花遅延等がみられ，正常型個体と大きく異なった。このことから，開花習性に関して，花粉形成の早い時期に異常を生じる系統の方が，花粉形成の遅い時期に異常を生じる系統より，開花習性の正常型からの変動が大きかった。しかし，未開花穎花の発生率については，花粉の発育異常とは直接関係なく，各雄性不稔系統の特有の形質である可能性が高かった。

4．細胞質・核遺伝子型雄性不稔

Bhutimueri-36×農林9号のF_1に農林9号を反復親として連続戻し交雑を行い，Bhutimueri-36の細胞質と農林9号の核を有する置換系統を作成したところ，完全な雄性不稔系統となった。この育成系統(K-11)と新城の育成したBoro細胞質型雄性不

稔系統(I-127)をグロースキャビネット内で栽培し，花粉退化の機構に関して細胞学的検討を行った。

両不稔系統の花粉は，1核期から2核期に至るまで異常が全く認められず，花粉核第2分裂も正常に行われた。しかし，それ以降は花粉径の増大が認められず，発育が停止した。花粉粒は開花日に至るまで，栄養核内の仁が酢酸カーミンにより濃染し円形を保持したままで，生殖核はだ円形で染色性が悪く，相接する場合が多かった。したがって，花粉の形態的異常を生じたのは，従来の報告と相違して，花粉核第2分裂期以降であることが明らかになった。

5．雑種不稔性

イネの遠縁品種間交雑のF_1では，種々の程度の不稔性を示す場合が多い。このようなF_1個体にみられる退化花粉の発生機構について，交雑組合せ間で比較検討を行った。

供試材料としては，インド型に属する5品種と日本型1品種を用い，日本型×インド型のF_1を作成し，とくにBoro型細胞質を有するインド型品種であるI-44を用いた交雑では，相反交雑F_1をも作成して，合計6種の交雑組合せのF_1個体について花粉形態を調査した。

1）不稔性の高かったF_1個体では，小型で内容物の蓄積に乏しい退化花粉が多数見られた。それらの花粉核の形態としては，栄養核内の仁が酢酸カーミンによって濃染する3核退化型および2核退化型に加えて，ごくまれではあるが1核退化型および空虚花粉の4種類を含んでいた。

2）交雑組合せを異にすると，3核退化型が多いもの，2核退化型が多いもの，空虚花粉の多く出現するものなどがあり，交雑組合せ間でこれらの退化花粉型の出現頻度が相違していた。

3）花粉径を測定した結果，F_1個体では多数の小型花粉（退化花粉）が広い幅の変異域に連続分布を示した。さらに交雑組合せ間でもそれぞれ相違する分布型となったが，稔性花粉と不稔花粉の2頂分布型を示す場合と，稔性花粉から不稔花粉まで一連の連続分布型を示す場合がみられた。

4）以上の結果から，遠縁品種間交雑のF_1では，花粉発育の種々の段階で発育停止した退化花粉が多様な割合で含まれており，それらの異型退化花粉の出現頻度は，交雑組合せを異にすることによって相違した。

謝　辞

本研究の端緒を与えられ，終始懇篤なる御指導を賜った北海道大学名誉教授高橋萬右衛門博士，論文の御校閲と研究全般に亘り御指導と多大な援助を頂いた北海道大学農学部教授木下俊郎博士に謹んで深甚の謝意を表する。また，本稿の校閲の労をとられた，同学部教授中世古公男博士，同教授島本義也博士にも心から感謝申し上げる。

本研究に供試した核遺伝子型雄性不稔系統は，農林水産省農業生物資源研究所長藤巻宏博士の御厚意により提供して頂いた。銘記して深く感謝の意を表する。Boro細胞質型雄性不稔系統は琉球大学農学部教授新城長有博士の御厚意により分譲して頂いた。深く感謝申し上げる。また，顕微鏡標本の作成には，拓殖大学北海道短期大学教授佐竹徹夫博士の御指導を得た。深く感謝申し上げる。

本論の取りまとめに際しては，北海道大学農学部育種学教室の方々に実験遂行上多大な御協力を頂いた。また，実験材料の管理や，資料の取りまとめ等，本論を遂行するに当たっては，多数の方々からのご支援を頂いた。いずれも衷心より感謝申し上げる。

引用文献

1．木下俊郎：作物の遺伝的不稔性(1)．化学と生物 **24**(9)：612-617．1986

2．山本隆一：新時代への稲育種．農業技術 **43**(10)：472-476．1988

3．KINOSHITA, T. and M. TAKAHASHI : The one hundredth report of genetical studies on rice plant. -Linkage studies and future prospects-. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **65**(1): 1-61. 1991

4．SPRAGUE, G. F. : Heterosis in maize : Theory and practice. *In* "Monographs on theoretical and applied genetics, vol.6 Heterosis" FRANKEL, R. (ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg : 47-70. 1983

5．住田敦：野菜のF_1育種とヘテロシスの利用．育種学最近の進歩 **31**：26-34．1990

6．加藤浩・生井兵治：日本型イネのF_1採種効率を高めるための花器形質の品種間差異．育雑 **37**：75-87．1987

7．SHINJYO, C. : Cytoplasmic-genetic male sterility in culivated rice, *Oryza sativa* L. II. The inheritance of male sterility. *Jpn.J.Genet.* **44**(3) : 149-

156. 1969
8. 鳥山國士：ハイブリッド稲の現状と将来. 遺伝 **42**(5)：4-7. 1988
9. 池橋宏：日印交配ハイブリッド品種と光周感応性雄性不稔の利用. 遺伝 **42**(5)：13-17. 1988
10. LI, W. M., C. M. CAI and Y. C. ZHOU : A photoperiod-sensitive genic male-sterile rice newly discovered. *Rice Genet.Newsl.* **5** : 89-90. 1988
11. SUN, Z. X., S. K. MIN and Z. M. XIONG : A temperature-sensitive male-sterile line found in rice. *Rice Genet.Newsl.* **6** : 116-117. 1989
12. MARUYAMA, K., H.ARAKI and H.KATO : Thermosensitive genetic male sterility induced by irradiation. *Rice Genetics II* : 227-235. 1991
13. 丸山清明・粉川聡：中国における二系法ハイブリッドライス開発の現状. 農業技術 **46**(4)：160-165. 1991
14. 鳥山國士：自殖性イネ科作物のアポミクシス育種. 農業および園芸 **62**(10)：1123-1126. 1987
15. GUO, X. X. and X. J. MU: A new genetic material : Apomictic rice C1001. *Rice Genet.Newsl.* **9** : 77-80. 1992
16. 荒木均：穀類におけるヘテロシス育種の現状と問題点. 育種学最近の進歩 **31**：3-13. 1990
17. 佐野芳雄：不稔性変異体の遺伝. "稲学大成"第3巻 遺伝編, 松尾孝嶺他編 農文協, 東京. 270-277. 1990
18. 岡彦一：栽培稲における品種間雑種不稔性の機構. 栽培稲の系統発生的分化(第6報)育雑 **2**(4)：217-224. 1953
19. 北村英一：稲の日本型と印度型との交雑における雑種不稔性の遺伝学的研究. 育種学最近の進歩 **2**：53-64. 1961
20. IKEHASHI, H. and H. ARAKI : Varietal screening of compatiblity types revealed in F_1 fertility of distant crosses in rice. *Japan.J.Breed.* **34** : 304-313. 1984
21. 丸山清明：ハイブリッド稲育種. 農業技術 **44**(4)：183-188. 1989
22. CHENG, Y. K. and C. S. HUANG : Studies on cytoplasmic-genetic male sterility of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) I. Effect of different cytoplasm sources on male abnormalities at anthesis. *J.Agric.Associ.China, New Series* **106** : 1-22. 1979
23. YAMAGUCHI, H. and H. KAKIUCHI : Electrophoretic analysis of mitochondrial DNA from normal and male sterile cytoplasms in rice. *Jpn.J.Genet.* **58** : 607-611. 1983
24. KADOWAKI, K. T. ISHIGE, S. SUZUKI, K. HARADA, and C. SHINJYO : Differences in the characteristics of mitochondrial DNA between normal and male sterile cytoplasms of japonica rice. *Japan.J.Breed.* **36** : 333-339. 1986
25. KINOSHITA, T. and K. MORI : A new source of cytoplasmic male sterility found in *boro* varieties of Indica rice. *Rice Genet.Newsl.* **9** : 62-66. 1992
26. 藤巻宏：戻し交雑法による有用遺伝子の導入に関する研究. II. 自殖性作物における雄性不稔遺伝子利用による戻し交雑システムの提案. 育雑 **25**(5)：275-282. 1975
27. KAUL, M. L. H. : Male sterility in higher plants. Springer-Verlag: 1-1005, Berlin. 1988
28. ALBERTSEN, M. C. and R. L. PHILLIPS : Developmental cytology of 13 genetic male sterile loci in maize. *Can.J.Genet.Cytol.* **23** : 195-208. 1981
29. RICK, C. M. : Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *Hilgardia* **18**(17) : 599-633. 1948
30. 酒井寛一：冷害におけるイネ不稔性の細胞組織学的並びに育種学的研究特に低温によるタペート肥大に関する実験的研究. 北海道農試報 **43**：1-46. 1949
31. SATAKE, T. : Determination of the most sensitive stage to sterile-type cool injury in rice plants. *Res.Bull.Hokkaido Natl.Agr.Exp.Stn.* **113** : 1-35. 1976
32. 山田記正：水稲花粉の発育生理学的研究. 第1報 花粉の構造変化とその物質代謝について. 日作紀 **41**：320-334 1972
33. 石川潤一：稲に於ける male-sterility の遺傳に就いて. 遺雑 **4**(3)：156-157. 1929
34. PAVITHRAN, K. and C. MOHANDAS : Genetics of male sterility in rice. *J.Hered.* **67** : 252. 1976
35. FUJIMAKI, H., S. HIRAIWA, K. KUSHIBUCHI and S. TANAKA : Artificially induced male-sterile mutants and their usage in rice breeding. *Japan.J.Breed.* **27**(1) : 70-77. 1977
36. HIRAIWA, S. and S. TANAKA : Induction of male sterile mutation in rice. *Gamma Field Symposia* **19** : 103-115. 1980
37. KO, T. and H. YAMAGATA : Studies on the utility of artifical mutations in plant breeding. XII. Induction and gene analysis of male-sterile mutants in rice. *Japan.J.Breed.* **30**(4) : 367-374. 1980
38. SINGH, R. J. and H. IKEHASHI: Monogenic male-sterility in rice : Induction, identification and inheritance. *Crop Sci.* **21** : 286-288. 1981

39. MESE, M. D., L. E. AZZINI and J. N. RUTGER : Isolation of genetic male sterile mutants in a semidwarf japonica rice cultivar. *Crop Sci.* **24** : 523-525. 1984
40. 高泰保・山縣弘忠：水稲における誘発雄性不稔突然変異の遺伝子分析（人為突然変異の利用に関する育種学的研究XVI）. 育雑 **37**：192-198. 1987
41. 藤巻宏・平岩進：人為突然変異によって育成されたイネ雄性不稔系統の遺伝的解析. 育雑 **36**：401-408. 1986
42. 田丸典彦：遺伝子雄性不稔突然変異イネの性状について. 育雑 **38**(別1)：226-227. 1988
43. TREES, S. C and J. N. RUTGER : Inheritance of four genetic male steriles in rice. *J.Hered.* **69** : 270-272. 1978
44. SAWADA, S. : Anther indehiscence in rice plants as a cause of sterility when induced by low temperatures. *Res.Bull.Obihiro Univ*, 8 : 629-536. 1974
45. 星川清親：幼穂の分化と発育. "稲学大成"第1巻形態編，松尾孝嶺他編，農文協，東京. 243-263. 1990
46. 笹原健夫・勝尾清：稲の細胞質差異に関する研究. III 野生稲細胞質をもつ栽培稲の不稔花粉について. 育雑 **15**(3)：191-196. 1965
47. LU, Y.and J. N. RUTGER : Cytological observations on induced genetic male sterile mutants in rice (*Oriza sativa* L.). *Sientia Sinica* **27**(5) : 482-493. 1984
48. 北村英一：稲の遠縁品種間交雑における細胞質的不稔性に関する研究. I. フィリピン稲と日本稲との交雑による育成系統と日本稲との正逆交雑F_1の稔性. 育雑 **12**(2)：81-84. 1962
49. 北村英一：稲の遠縁品種間交雑における細胞質的不稔性に関する研究. II. 細胞質的不稔性に関与する日本稲核内遺伝子の分析. 育雑 **12**(3)：166-168. 1962
50. CHENG, Y. K. and C. S. HUANG : Studies on cytoplasmic-genetic male sterility of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) II. Morphological-histological investigation on functional male sterility. *J.Agric.Res.China.* **29**(2) : 67-80. 1980
51. SATAKE, T. : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. IX. Revision of the classification and terminology of pollen developmental stages. *Proc.Crop Sci.Soc.Japan.* **43**(1) : 31-35. 1974
52. 木原均・平吉功：稲花粉粒の発達. 農業及園芸 **17**(6)：685-689. 1942
53. KITADA, K., N. KURATA, H. SATOH and T. OMURA : Genetic control of meiosis in rice, *Oryza sativa* L. I. Classification of meiotic mutants induced by MNU and their cytogenetical characteristics. *Jpn.J.Genet.* **58** : 231-240. 1983
54. LU, Y. G. and J. N. RUTGER : Anther and pollen characteristic of induced genetic male sterile mutants in rice (*Oryza sativa* L.). *Env.and Exp. Bot.* **24**(3) : 209-218. 1984
55. WANG, X., M. WANG G. MEI, H. WU, W. DUAN and W. WANG : Photoperiod-conditioned male sterility and its inheritance in rice. *Rice Genet.* II : 217-226. 1991
56. 鳥山國士・池橋宏：中国のハブリッド・ライス育種の新展開. 農業技術 **43**(1)：1-6. 1988
57. CHAUDHURY, R. C., S. S. VIRMANI and G. S. KHUSH : Patterns of pollen abortion in some cytoplasmic-genetic male sterile lines of rice. *Oryza* **18** : 140-142. 1981
58. EDWARDSON, J. R. : Cytoplasmic male sterility. *Bot.Rev.* **36** : 341-420. 1970.
59. 勝尾清・水島宇三郎：稲の細胞質差異に関する研究. I. 栽培稲と野生稲との間の雑種および戻交雑後代の稔性について. 育雑 8(1)：1-5. 1958
60. CHU, Y. E., Y. S. LI, C. SHINJYO and H. W. LI : Hybrid rice breeding III. Cyto-histrogical investigation of pollen degeneration in anther of cytoplasmic male-sterile plants. *Jpn.J.Genet.* **47**(3) : 179-183. 1972
61. 深沢広祐：細胞質による雄性不稔の発現機作. 育種学最近の進歩 **10**：42-44. 1969
62. LASER, K. D. and N. R. LARSTEN : Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperm. *Bot.Rev.* **38**(3) : 425-454. 1972
63. SCHOOLER, A. B. : A form of male sterility in barley hybrids. *J.Hered.* **58** : 206-211. 1967
64. WILSON, J. A. : Problems in hybrid wheat breeding. *Euphytica* Suppl. **1** : 13-33. 1968
65. KINOSHITA, T., K. MORI and M. TAKAHASHI : Inheritance studies on cytoplasmic male sterility induced by nuclear substitution. -Genetical studies on rice plant, LXX-. *J.Fac.Agr.Hokkaido Univ.* **60**(1) : 23-41. 1980
66. 寺尾博・水島宇三郎：東亜各地域及び米洲における栽培稲の類縁関係について. 科学 **12**：437-441. 1942
67. OKA H. and Y. DOIDA : Pnylogenetic differentiation of cultivate rice, XX Analysis of the genetic basis of hybrid breakdown in rice *Jpn.J.Genet.* **37**(1) : 24-35. 1962

68. 田丸典彦・木下俊郎・高橋萬右衛門：核置換によって育成した細胞質雄性不稔稲における花粉退化の細胞学的観察．稲の交雑に関する研究 第LXXIII報．北大農邦文紀 **12**(2)：124-132．1980
69. JENNINGS, P. R. : Evaluation of partial sterility in *Indica* × *Japonica* rice hybrids. *IRRI Tech.Bull.* **5** : 1-63. 1966
70. KATO, S. : On the affinity of the cultivated varieties of rice plants, *Oryza sativa* L. *J.Agr.Kyushu Univ.* **2**(9) : 241-276. 1930
71. HENDERSON, M. T., B. P. YEH and B. EXNER : Further evidence of structural differentiation in chromosomes as a cause of sterility in intervarietal hybrids of rice, *Oryza sativa* L. *Cytologia* **24** : 415-422. 1959
72. CHANG, T. T. : Present knowledge of rice genetics and cytogenetics. *IRRI Tech.Bull.* **1** : 24-29. 1964
73. 岡彦一：栽培稲における雑種不稔性の機構．育種学最近の進歩 **4**：34-43．1962
74. OKA, H. : Analysis of genes controlling F_1 sterility in rice and by the use of isogenic lines. *Genetics* **77** : 521-543. 1974
75. 池橋宏：イネの遠縁交配のF_1稔性に関する理論と応用．農業および園芸 **60**：(9)1099-1104．1985．
76. 北村英一：稲遠縁品種間雑種の不稔性に関する遺伝学的研究．中国農試報告 A 8：141-205．1962
77. SHINJYO, C. : Genetical studies of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice, *Oryza sativa* L. *Sci.Bull.Coll.Agr.Univ.Ryukyus* **22** : 1-57. 1975
78. 前川雅彦・木下俊郎・高橋萬右衛門：'boro' 型雄性不稔細胞質に係わる新しい花粉稔性回復遺伝子．稲の交雑に関する研究，第LXXII報 北大農邦文紀 **12**(2)：89-100．1980
79. IZHAR, S. and R. FRANKEL : Mechanism of male sterility in *Petunia*: The relationship between pH, callase activity in the anthers, and the breakdown of microsporogenesis. *Theor.Appl.Genet.* **41** : 104-108. 1974
80. LU, Y. G. and G. Q. ZHANG : Observations on the sporopollenin behavior during the process of tapetal distegration of GMS pollenless mutant in rice. *Rice Genet.Newsl.* **5** : 95-98. 1988
81. ITO, N. : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XVI. Changes in carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers after cooling treatment. *Proc.Crop Sci. Soc.Japan.* **47**(2) : 318-323. 1978
82. ITO, N. : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XVII. Changes in carbohydrates, nitrogenous and phosphorous compounds in rice anthers during cooling treatment. *Proc.Crop Sci.Soc.Japan.* **47**(2) : 324-329. 1978
83. ITO, N. : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. VIII. Free amino acids in anther. *Proc. Crop Sci.Soc.Japan.* **41**(1) : 32-37. 1972
84. 清水正治：ジベレリンにより誘発される水稲花器官の諸異常について．育雑 **15**(2)：53-59．1965
85. 清水正治・久野勝治：オーキシンによる水稲のタペート異常肥大の誘発，とくに低温によるそれとの関連について．日作紀 **37**：217-223．1968
86. 木下俊郎：植物の雄性不稔性の遺伝と育種．〝開花・結実の分子機構〟原田宏監修，秀潤社，東京．107-139．1992

Summary

1. Nuclear genic male sterility

Genetic and cytological studies on genic male sterility and hybrid sterility in rice were made by the use of 29 kinds of male sterile mutants induced by gamma irradiation or ethylene imine treatment and donated by Dr.Fujimaki, National Institute of Agrobiological Resources.

The results obtained may be summarized as follows:

A. Genic analysis

1. A single recessive gene was responsible for most of the male sterile mutants showing an F_2 segregation ratio of 3 : 1 in monohybrids.

2. F_2 segregation caused by duplicate genes was also demonstrated in the crosses involving MS-19, showing digenic ratio of 15 : 1 and 3 : 1 in F_2 and B_1 populations, respectively.

3. Distorted segregation ratios occurred in both F_2 and B_1 populations derived from the crosses involving MS-19, while monogenic inheritance was examined only in B_1 populations in the crosses involving MS-7, MS-10, MS-23 and MS-24. There is the possibility that selective fertilizations between *Ms* and *ms* pollens are responsible for various distorted ratios in F_2 populations.

4. Genic identifications were carried out following

the scheme shown in **Fig. 1**. Allelic relations between male sterile genes were demonstrated in the test crosses between MS-4 and MS-9, and between MS-15 and MS-29. Excepting two genes for which symbols were given by Dr.Fujimaki, 27 kindsof single genes were newly named according to the order of the male sterile mutants.

B. Anther and pollen morphology

1. Among the male sterile mutants, selfed seeds were obtained in 8 lines. Of these, M-21 indicated the highest seed fertility (24.8%), while the others remained below 10%.

2. Female fertility was perfect in all of the male sterile lines showing high seed fertilities when pollinated with normal pollens from the original strain.

3. Discrimination of pollen grains was made by the use of the stainability by iodium potassium iodide (I-KI). Furthermore, pollen numbers varied among the male sterile lines. It was noted that 10 lines contained a nearly normal number of pollen grains, and in 3 lines stainable pollen predominated. In contrast, 10 lines had no pollens, and reduction in pollen numbers was noted in 9 lines.

4. Anther shape was compared between the normal and the male sterile lines. Anther length and width averaged 1.55 mm and 0.34 mm, respectively, in the 29 male sterile lines, while anthers in the original strain were 1.80 mm in length and 0.43 mm in width.

5. Dehiscences of anthers were observed in 10 lines. Among these only MS-25 showed normal dehiscency, and the rest were low.

6. Anther color was affected by the presence of fertile pollens. White and transparent anthers contained no pollen, while normal plants showing high pollen fertility had yellow and plump anthers. Various color shades and shapes of anthers were classified into five types from A to E as shown in Plate II.

C. Cytological observations

1. The cytological nature of the development of pollen grains was investigated in the 29 male sterile lines which were cultivated in the growth cabinet under natural light at 28.5°C during the day and 21.5°C at night. In order to estimate anther development, the distance between auricles of the last two leaves was used as a standard, and spikelets were collected from the upper fourth rachilla in the primary rachis.

2. In terms of retardation of pollen development, 7 types of male sterility were found in the 29 male sterile lines.

(1) Abnormality at sporogeneous stage (found in 3 lines): Sporogeneous or pollen mother cells did not proceed to meiosis and remained for a while in anther loculi (Plate V b). Anthers at anthesis were of a white and shrunken type (Plate II h).

(2) Abnormality at microspore stage (found in 5 lines): Microspores liberated from quartets ceased development at the young pollen stage, and the formation of exine was inhibited. Multiple nucleate and/or giant microspores were observed in some anther loculi (Plate V c, d). Anthers at anthesis proved to be mostly pale yellow type-2 (Plate II e, f).

(3) Tapetal abnormality (found in 9 lines): It is well-known that tapetal abnormality causes complete male sterility in various plant species, regardless of cytoplasmic and genic male sterilities. In the mutant lines, various degrees of tapetal abnormality were observed. In some cases, tapetal plasmodium protruded prominently into the anther cavity (Plate V e), while the spread of tapetum delayed degeneration in other cases. The lack of uniformity was observed even in the different loculi of a single anther (Plate V f).

(4) Abnormality at the late stage of microspores (found in 2 lines): In this case, no tapetal abnormality was observed in 2 lines. Swollen pollen grains lacking the pollen wall and similar abortive pollens at maturation stage were observed (Plate V g). Most of the pollen grains were sticking to the anther wall (Plate V f).

(5) Abnormality of young pollens (found in 4 lines): The development of tapetum was basically normal, but most of the anthers contained aborted pollen grains characterized by thick exine (Plate VI a, b). Various amounts of fertile pollens existed in several mutant lines.

(6) Abnormality of binucleate pollens (found in 3 lines): There were numerous binucleate pollens in anther loculi just before anthesis (Plate VI c). A mixture of aborted and normal pollen grains was seen in the anthers at maturity (Plate VI d).

(7) Abnormality containing stainable pollens (found in 3 lines): Normal pollen grains stainable by I-KI were abundant. There was no apparent abnormality in tapetal disintegration and microspore development (Plate VI e). In MS-25, fertile pollens did not germi-

nate completely because of abnormal germ pore (Plate VI f, g, h). Partial seed setting occurred in the other lines. Pollen abnormality at different stages is illustrated in **Fig. 4**

D. Flowering habits

1. As shown in thermo-sensitive genic male sterility, it is recognized that male sterile plants are susceptible to environmental conditions such as temperature and photoperiodism. Furthermore, there are side effects of male sterile genes, especially in growth and flowering habits. Therefore, using the 29 male sterile lines, the modification of flowering was investigated from the standpoint of pollination related to hybrid seed production.

2. All plants were cultivated in the growth cabinet under natural light at 28.5°C during the day and 21.5°C at night. To insure synchronization of materials, 62 panicles were chosen from both male sterile and normal plants, and all spikelets collected from the first to the fourth rachis were used for surveys to determine days of anthesis after heading, number of flowering spikelets per day, number of cleistogamous spikelets and flowering time during the day.

3. Flowering habits between the normal and the male sterile lines differed remarkably depending on the pollen type aborted.

In the normal plants, flowering habit followed the standard pattern hitherto reported; that is, the initiation of anthesis began just after heading, and blossoms of spikelets appeared on the second day. The blooming period continued for nearly a week in a single plant, and the rate of cleistogamous spikelets was below 1%. Blooming time in a spikelet was just under two hours, and flowering predominated around to midday.

In contrast, prominent departure from the normal flowering habit was observed in the male sterile lines due to the peculiar nature of the genotype. In general, initiation of anthesis and completion of blooming occurred notably later than in normal plants. In most of the mutant lines, the blooming period in a single plant did not differ from that of normal plants, except in a few cases, and the rate of cleistogamous spikelets increased in a particular genotype. Daily blooming time was extended from early morning to late afternoon (18: 30), peaking slightly around noon. Therefore, the synchronization of flowering times with those of normal plants was restricted only in noon, though blooming continued for over twohours in a single spikelet.

4. It has been noted that the modification of flowering habits was related to the developmontal stage of pollen abnormality. That is to say, fluctuation of flowering dates and blooming times were prominent in male sterile lines traceable to young pollen abnormalities in the early stage, whereas flowering behavior resembled that of normal plants in those male sterile lines which showed pollen abortion at the later stages containing some stainable pollens.

II. Cytological observations on cytoplasmic-genic male sterility

1. A cytoplasmic male sterility like K-11 was induced by the nuclear substitution method from the cross Bhutimuri-36 × Nôrin-9-gô. The F_1 plants of that cross were backcrossed repeatedly with 'Nôrin-9-gô' up to B_8F_1 to produce a substitute line which possessed the cytoplasm of 'Bhutimuri-36' and the nucleus of 'Nôrin-9-gô'.

2. In order to investigate the cytological nature of the development of pollen grains in cytoplasmic male sterility, the substitute line, K-11 and the *boro*-cytoplasm male sterile tester, I-127 'Taichung 65 MS' donated by Prof. Shinjyo of Ryukyu University were cultivated in the growth cabinet under natural light at 27.5°C during the day and 20.5°C at night.

3. There were no signs of abnormal behavior in either the microspores or the anther walls containing the tapetum until the binucleate pollen stage. Pollen grains developed normally from the uninucleate to the binucleate stages, and the division of second-pollen mitosis was subsequently completed in both male sterile and male fertile plants.

4. At the trinucleate stage, which begins about 4 days before anthesis, the development of pollen grains in the male sterile plants was seen to beretarded compared to that of the male fertile pollens , and the diameter of sterile pollen grains differed markedly from normal ones up to the flowering stage.

5. One day prior to flowering, the shape of pollen nuclei in the male sterile plants showed the following characters: Nucleolus of vegetative nucleus maintained a round shape and was stained deeply by aceto-carmine. Two sperm nuclei were elliptical in shape, faintly stained, and located adjacent to one another.

6. On the basis of my obsevations, I concluded that

the development of pollen grains in the cytoplasmic male sterile lines proceeded normally until the binucleate stage, a fact which indicated retardation of development during the accumulation of pollen reserves 2 or 3 days prior to flowering. These signs of abnormality were rare noticeably in the results of a previous report using the same material (CHU *et al.*, 1972).

III. Pollen morphology of F_1 hybrid sterility

It is a well-known fact that F_1 hybrids between distantly related varieties, such as *indica* and *japonica* rice, show various percentages of pollen sterilities.

The author examined the pollen abortion of F_1 hybrids between *indica* and *japonica* varieties. F_1 hybrids from several crossings were cultivated in a growth cabinet under natural light and kept at 27.5°C during the day and 20.5°C at night. The results obtained are summarized as follows:

1. Abortive pollens observed at the stage of one day before anthesis were classified into four types.

1) Pollen abortion at the trinucleate stage.

2) Pollen abortion at the binucleate stage.

3) Pollen abortion at the uninucleate stage.

4) Pollen abortion showing empty pollen.

2. The frequencies of the four types in pollen abortion of F_1 plants were distinctly different from those found among the cross combinations. There was a predominance of the trinucleate type in crosses such as A-133 × I-44. The binucleate type was frequent in the cross A-133 × E-48, while emptypollens were abundantly seen in the cross A-133 × I-45.

3. Frequency distributions on the diameter of pollen grains were compared between parental varieties and F_1 hybrids. We observed that normal distribution in a rather narrow range was common in parental varieties such as A-133 and I-44 as well as in two kinds of F_1 hybrids (A-133 × I-44 and A-133 × I-100), a finding of which indicated a bimodal distribution separating fertile from sterile. Other crosses, however, showed a continuous variation over a wide range from sterile to fertile.

4. Based on my observations, it would appear necessary to reexamine the causes of pollen sterility in F_1 hybrid between *indica* and *japonica* varieties, with an emphasis on the pollen developmental process.

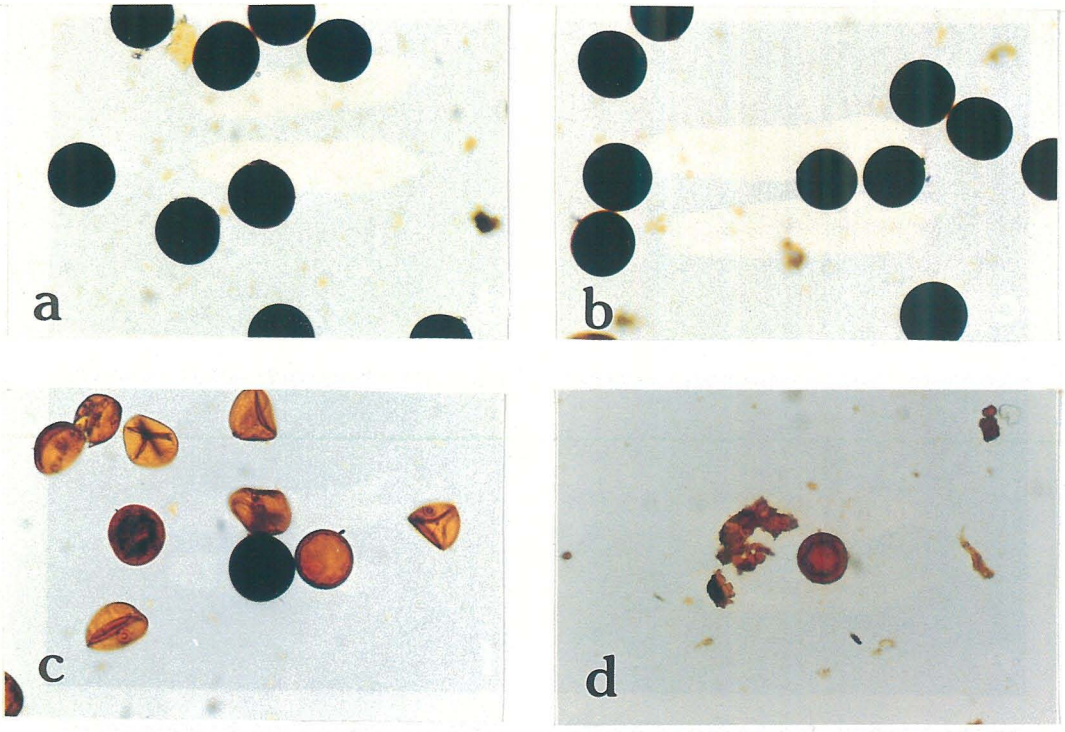

Plate I. Pollens stained with iodium potassium iodide solution.
a: Normal pollens in A-136,
b: Stainable pollens in MS-25,
c: Mixture stainable pollens and empty pollens in MS-7,
d: Abortive pollens in MS-9.

Plate II. Five types of anther color and shape, classified at anthesis in male sterile mutant lines.
a: Normal (A-136), b: Normal type (MS-25),
c: Yellow abortive type (MS-8), d: Yellow abortive type (MS-15),
e: Pale yellow abortive type (MS-9), f: Pale yellow abortive type (MS-4)
g: White abortive type (MS-27), h: White and small abortive type (MS-2).

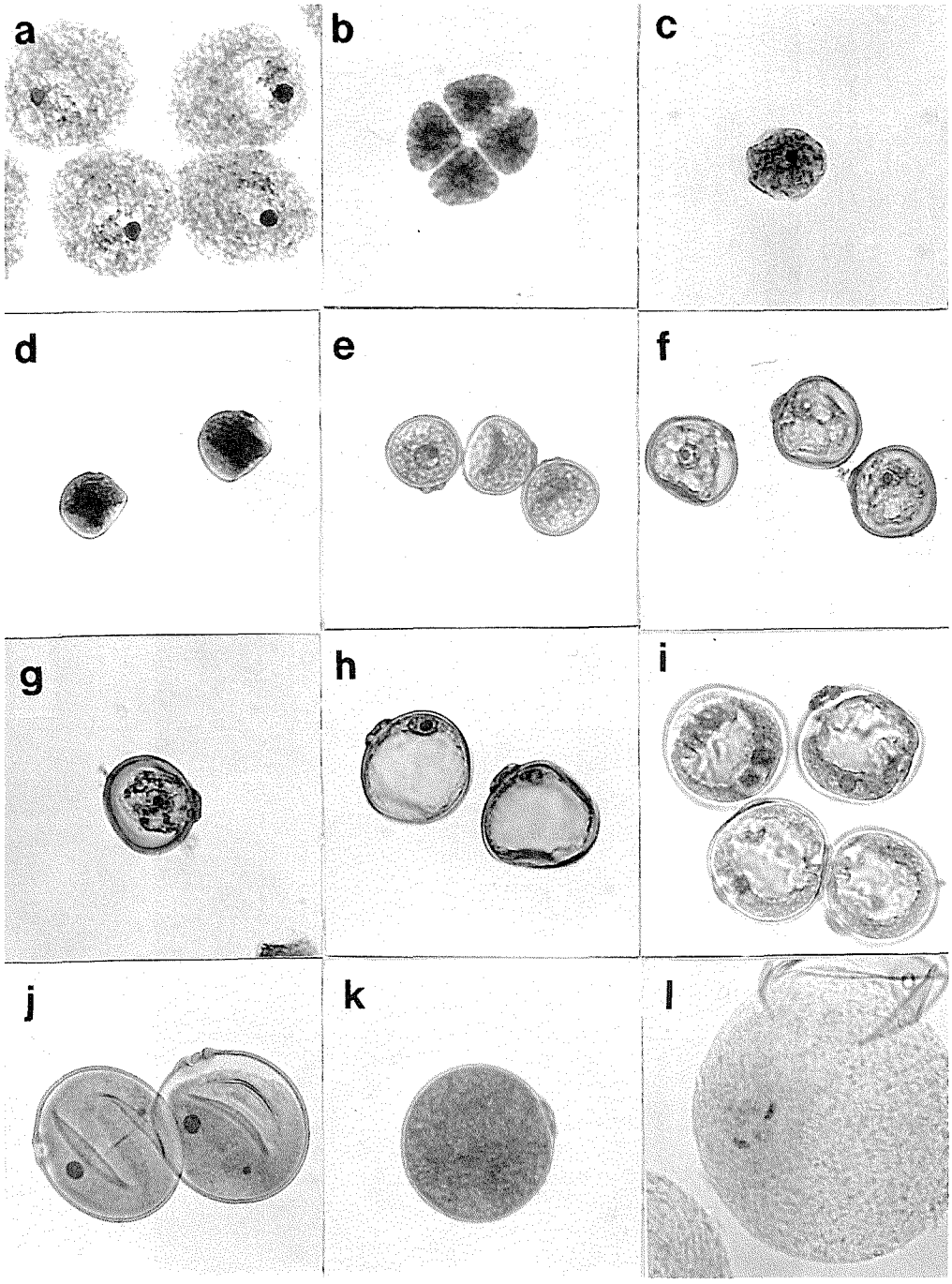

Plate III. Process from microspore to pollen grain in normal type strains.
a: Pollen mother cells,
b: Pollen tetrad,
c: Uninucleate pollen liberated from tetrads,
d～h: Development of microgamete during uninucleate stage,
i, j: Binucleate pollens,
k, l: Trinucleate pollens.

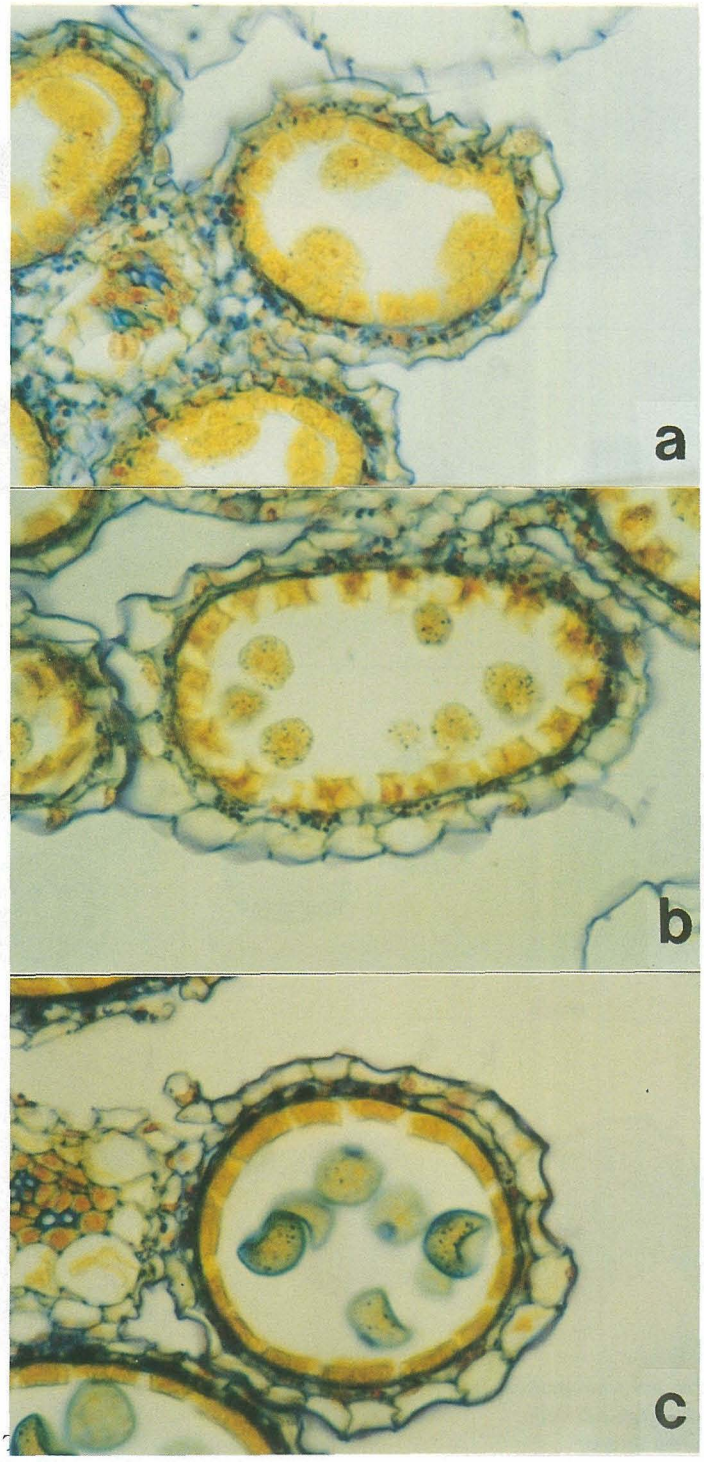

Plate IV. T

a: Dyad stage of pollen meiosis,

b: Uninucleate microspores liberated from tetrads showing the initiation of tapetal degeneration,

c: Normal microgametogenesis showing regular degeneration of tapetum.

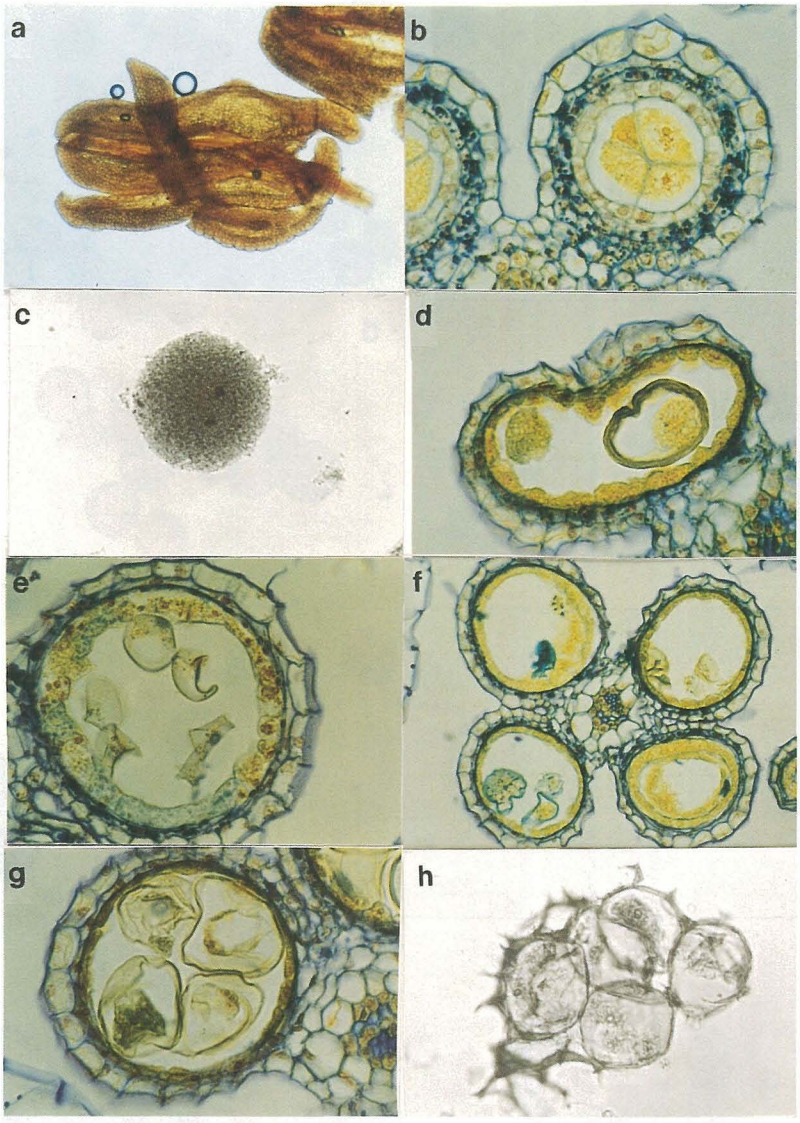

Plate V. Classification of pollen-breakdown in male sterile mutant lines. Major abnormalities occur in different stages of pollen development from a to h.

a, b Abnormality of sporogeneous tissue
- a: Showing the empty anthers at anthesis,
- b: Transverse section of young anthers showing failure of meiosis.

c, d Abnormal microspores liberated from tetrads
- c: Multi-nucleate microspore,
- d: Transverse section of anther showing the formation of giant microspore.

e, f Tapetal abnormality
- e: Transverse section of anther showing tapetal periplasmodium,
- f: Transverse section of anther showing lack of uniformity among anther loculi.

g. h Abnormality of young pollens
- g: Transverse section of anther showing swollen pollen grains lacking microspore walls.
- h: Pollen grains sticking to anther wall found in the maturated anther at anthesis.

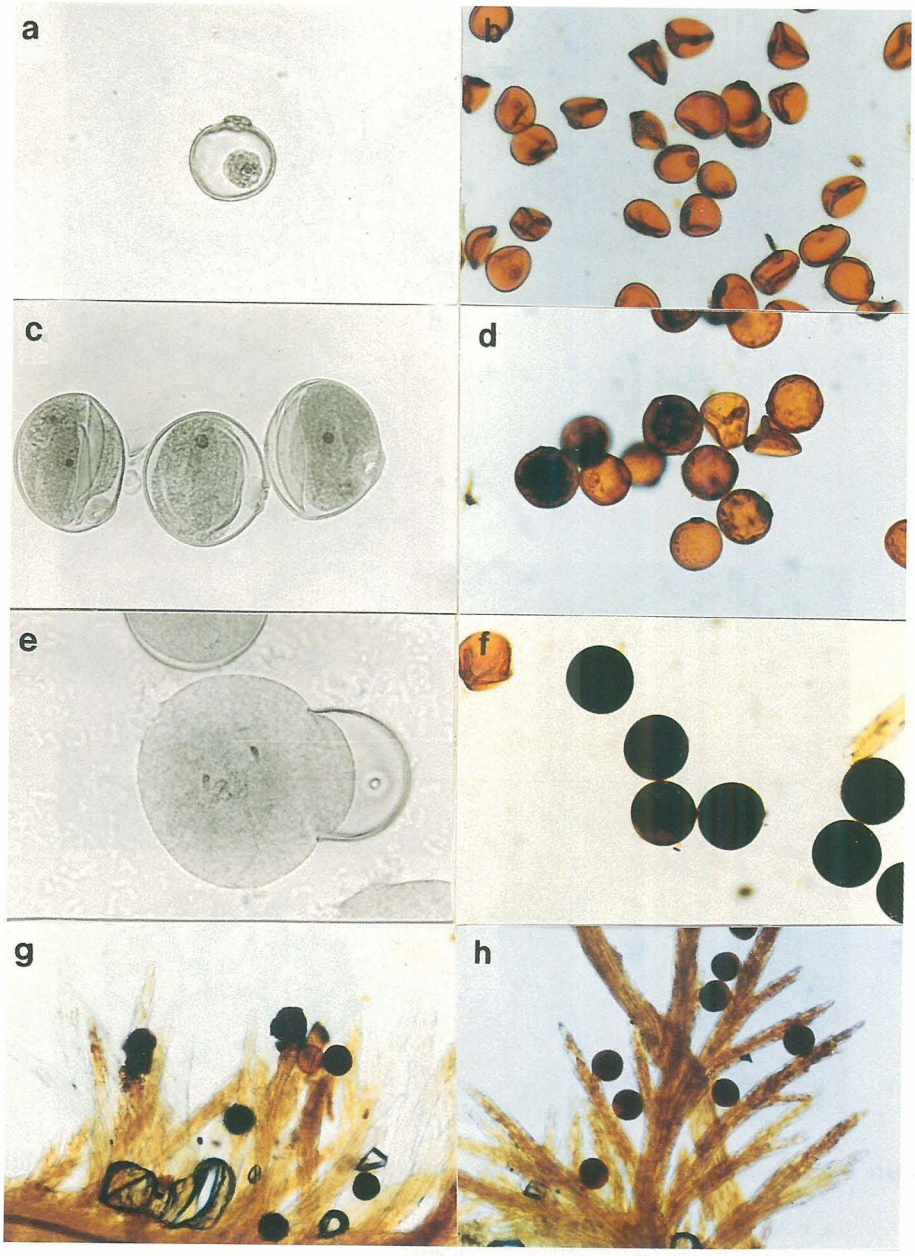

Plate VI. Breakdown of pollen grains found in the different types of male sterile mutant lines.
a: Pollen grain ceased at late uninucleate stage,
b: Unstainable abortive pollens stained with I-KI.
c: Pollen grains ceased at binucleate stage showing incomplete deposition of cytoplasmic substances.
d: Pollen grains stained with I-KI showing several stainable pollens.
e: Trinucleate pollens.
f: Pollen grains stained with I-KI showing normal accumulation of starch.
g: Normal pollen germination on the stigma (Nihonmasari).
h: Ungerminated pollen grains located on the stigma (MS-25).

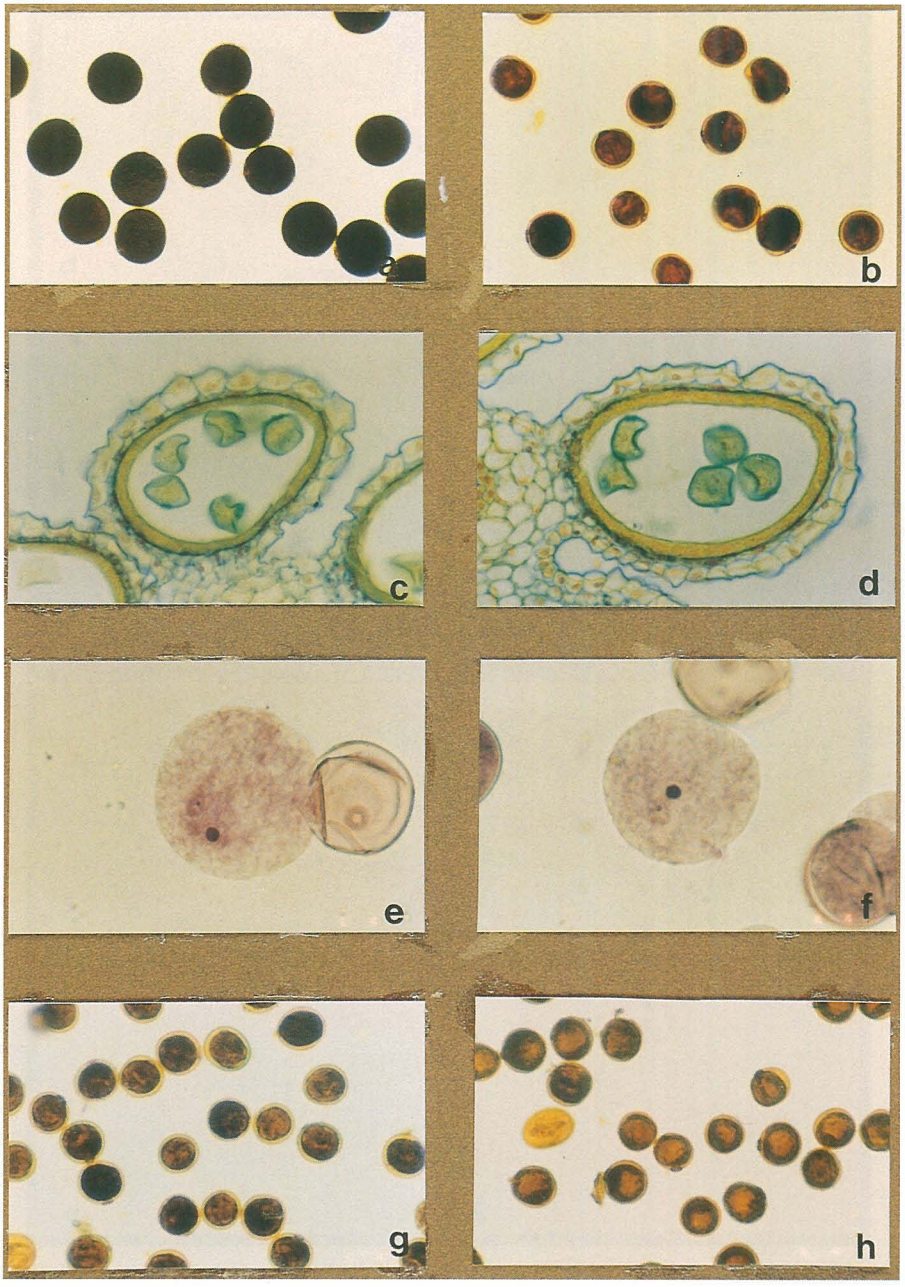

Plate VII. Comparison of pollen development between male-fertile (left) and cytoplasmic male-sterile (right) strains.

a, b: Pollen grains one day prior to flowering, stained by the iodium potassium iodide solution (I-KI).

c, d: Transverse section of anther in uninucleate pollen stage, showing a normal tapetal development in both normal and male-sterile plants.

e, f: Late binucleate pollen stage, showing no difference between the both normal and male-sterile plants.

g, h: Pollen grains in four days prior to flowering, stained by iodium potassium iodide solution (I-KI).

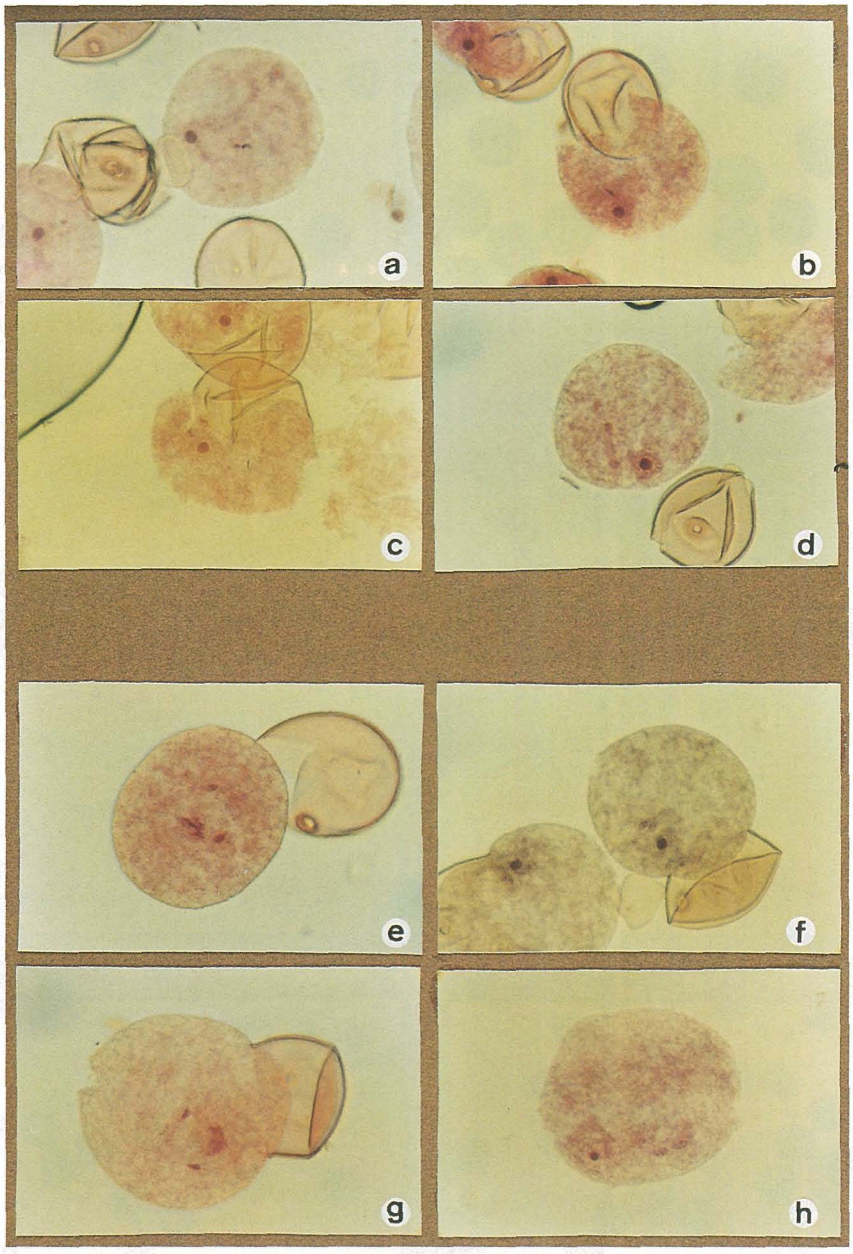

Plate VIII. Comparison of pollen mitosis between male-fertile and cytoplasmic male-sterile strains.

a: Metaphase in the normal plants (A-133).
b: Metaphase in the male-sterile plant (I-127).
c: Anaphase in the male-sterile plant (I-127).
d: Telophase in the male-sterile plant (K-11).
e, g: Normal pollen grains possesing the two wedge-shaped sperm nuclei in K-12 (e) and I-128 (g) strains: Note the vegetative nucleus loosing nucleolus.
f, h: Abnormal pollen grains in K-11 (f) and I-127 (h) strains: Note the abnormal sperm nuclei stained faintly and the nucleolus of the vegetative nucleus stained intensively by carmin.

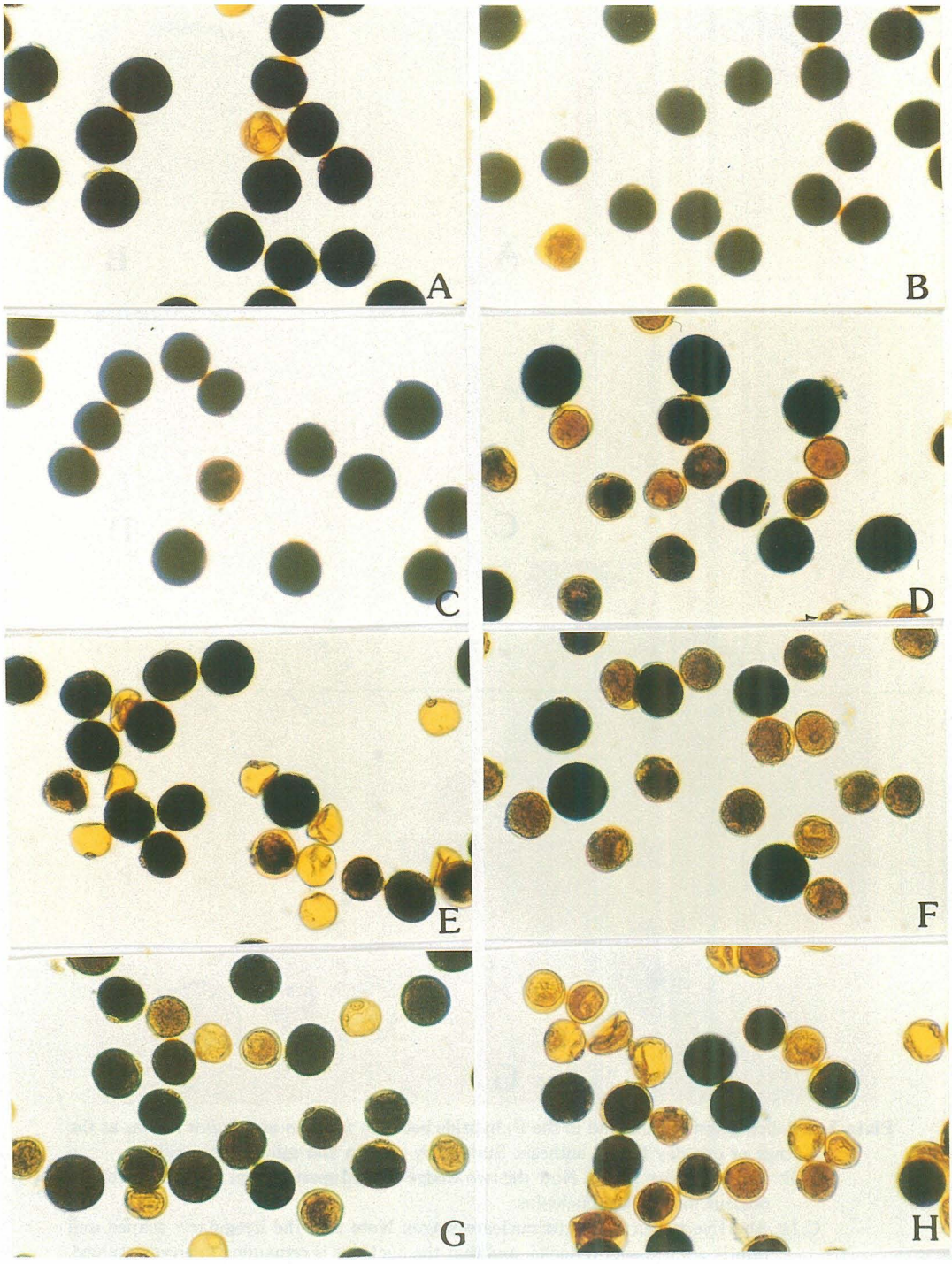

Plate IX. Pollen grains of F_1 hybrids between *japonica* and *indica* strains at the stage of one day before anthesis. Stained by the iodium potassium iodide solution (I-KI).
A: A-133 (parent), B: I-45 (parent), C: A-133×I-34, D: A-133×I-44,
E: A-133×I-45, F: I-44×A-133, G: A-133×I-100, H: A-133×E-48.

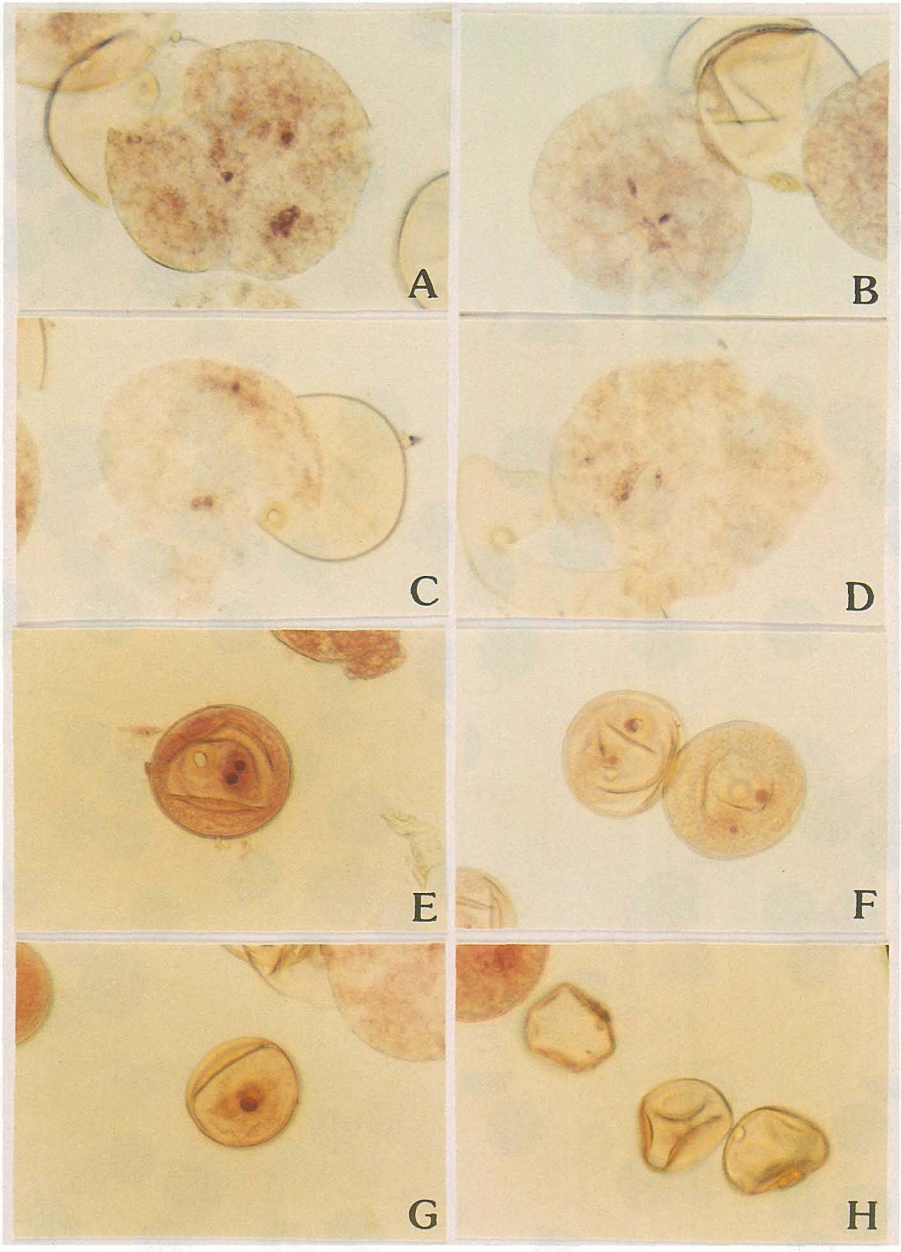

Plate X. Pollen grain types found in the F_1 hybrids between *japonica* and *indica* strains at the stage of one day before anthesis. Stained by carmin and squashed throughly.

A, B: Normal pollen grains; Note the two wedge-shaped sperm nuclei and the vegetative nucleus loosing the nucleolus.

C, D: Abortive pollen grains (trinucleate stage); Note that the irregularly shaped and faintly stained sperm nuclei, and that the nucleous is remaining intensely stained.

E, F: Abortive pollen grains (binucleate stage); Note that pollen grains ceased at the binucleate stage.

G: Abortive pollen grains (uninucleate stage); Note the small uninucleate pollen grains. Pollens of this abortion type are rare in comparison with the other types.

H: Empty pollen grains; Very small pollen grains completely aborted.