



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基础研究 : 第I報 種間雑種 Melilotus alba×M. hirsuta の細胞遺伝
Author(s)	喜多, 富美治; KITA, Fumiji
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 4(1), 67-74
Issue Date	1962-07-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11719
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(1)_p67-74.pdf



Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究

第 I 報 種間雑種 *Melilotus alba* × *M. hirsuta* の細胞遺伝

喜多富美治

(北海道大学農学部附属農場実習部)

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

I. Cytogenetical Studies of the Interspecific Hybrid, *Melilotus alba* × *M. hirsuta*.

By

Fumiji KITA

(University Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

緒 言

Melilotus 属は SCHULZ (1901) の分類によれば 22 の種からなる。染色体数は体細胞で $2n=16$ であり、全て 2 倍体として存在していると看做されている。種の多くは 1 年生或いは 2 年生のいずれかであるが、少数の種では 1 年生並びに 2 年生が同一種内に存在する。経済的品種は全て *M. alba* と *M. officinalis* に属し乾草用、放牧用、及び緑肥作物として北米及びカナダに広く栽培されている。

育種目標としては、細茎、多葉、高窒素含量の品種育成のほか、Sweetclover の最も欠点とされる嗜好性の向上すなわち Coumarin を含まない品種の育成が急務とされている。又近年 Sweetclover weevil (*Sitona*

cylindricallia) の害が報告され、耐虫性品種の育成もまた重要な課題と言えよう。

これらの育種目標達成には他作物の場合と同様に、種間交雑による関係遺伝子の導入が最も望ましい育種方法と考えられ、既に SMITH (1943) によってその可能性が示されている。然しながら事業育種に先立って、我々は先ず解決しなければならない種間交雑に伴う多くの困難即ち交雑不和合性、 F_1 種子の発育過程における退化、 F_1 植物の葉緑素欠乏、及び種間の細胞遺伝学的異常性等多くの問題が残されている。

本研究は叙上の見地より、種間交雑に関する諸般の基礎的な問題を明らかにせんとして遂行中の研究の第 1 報をなすものであり、ここに *M. alba* × *M. hirsuta* の種間雑種について細胞遺伝学的な実験結果をとりまとめ報

Table 1. Comparison of the F_1 hybrids, *Melilotus alba* × *M. hirsuta*, with the two parents.

Morphological characters		<i>M. alba</i> ,	<i>M. hirsuta</i>	<i>M. alba</i> × <i>M. hirsuta</i>
Leaflets	Margin	serrate (20-25 teeth)	serrate (15-20 teeth)	serrate (15-20 teeth)
	Shape	lanceolate	ovate	ovate
	Color	dark green	light green	light green
Raceme		very dense	dense	medium
Flowers	Color	white	yellow	pale yellow
	Standard	longer than keel (4-5 mm)	equal to keel (5-6 mm)	longer than keel (5-6 mm)
Pods		dark brown	pale yellow	pale yellow
Seeds	Length	2 mm	2.3-2.5 mm	2.3-2.5 mm
	Width	1.5 mm	1.8 mm	1.8 mm

告する。

本報の内容の大半は Department of Genetics, University of Wisconsin において W. K. SMITH 博士及び D. C. COOPER 博士の指導のもとに行なわれたものであり、ここに記して両博士に深甚なる謝意を表す。本報の取纏めに際し、またその後の研究に於いては北海道大学教授長尾正人博士の御教示をいただいた。併せて厚く感謝する次第である。

実験材料及び方法

M. alba に属する三つの strain (Spanish N 124, Evergreen N 125, Common White N 127) を母とし、*M. hirsuta* の F 149 を花粉親として交雑をした。交配方法は当日開花の花を用い、先ず花弁を除いた後小型の真空ポンプに通ずるガラス製のノズルで花粉を吸引して除雄を行ない、次いで歯ようじ様の先端のひらいたい部分に金剛砂の布を添布したものをを用いて花粉親から花粉を

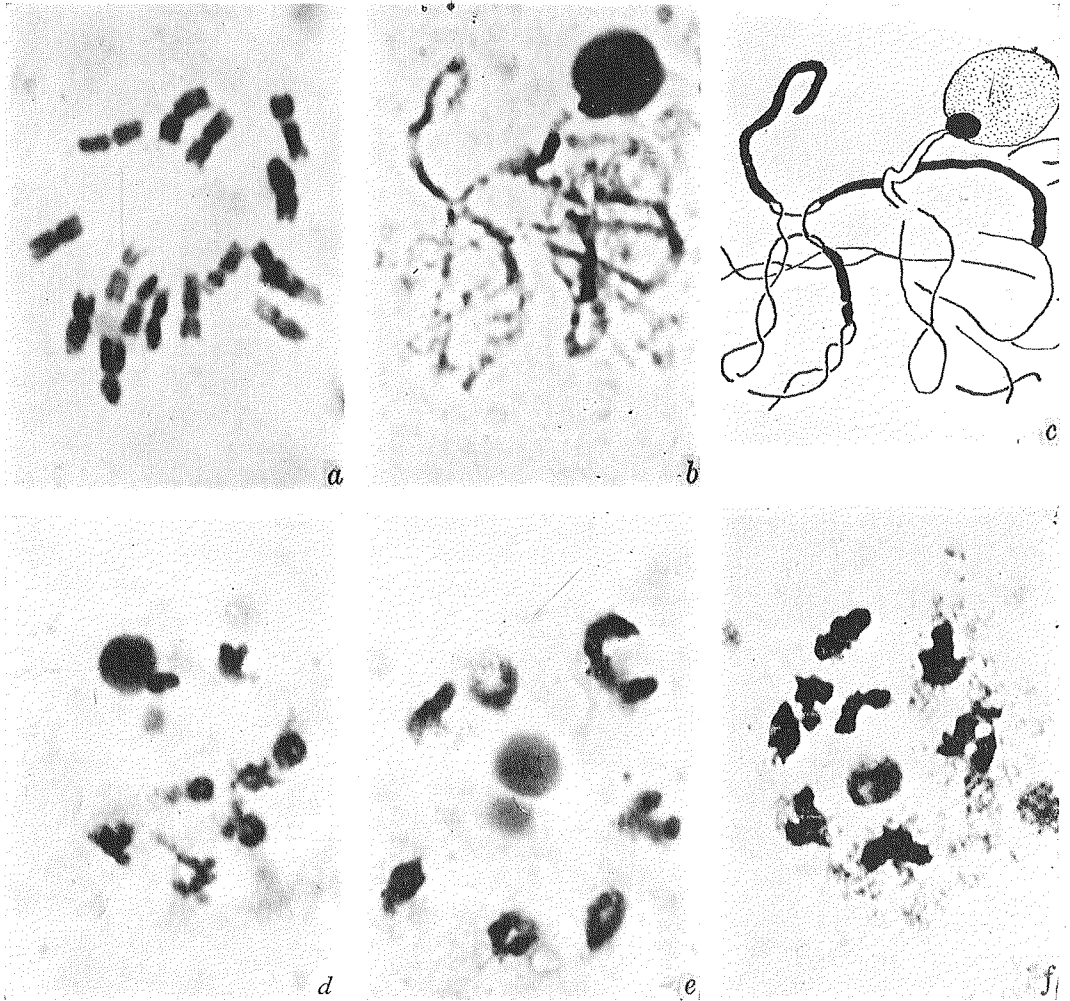


Fig. 1. a) *M. alba*. Polar view of mitotic equatorial plate with 16 chromosomes. $\times 2300$.
 b) Pachytene with a cross-shaped configuration. $\times 1600$.
 c) Camera lucida sketch of b. $\times 2100$.
 d) *M. hirsuta*. Diakinesis with 8 II. $\times 1400$.
 e) *M. alba* \times *M. hirsuta* F₁. Diakinesis with 6 II plus a chain of 4 chromosomes. $\times 1950$.
 f) *M. alba*. Diakinesis with 8 II. $\times 1700$.

とり、これを柱頭になすりつけた。

得られた種子をシャーレー中で発芽後、温室内の苗箱中で育苗した。65個体の幼苗中24個体が淡緑の葉色を示し雑種植物と推定された。これを鉢植えし、温室内で育成した。開花に及んで24個体総てが両親の中間の淡黄の花色を示し、明らかに雑種であることが確認された。花蕾における染色体の観察に当っては無水アルコールと塩基性酢酸第二鉄を飽和したプロピオン酸3:1の

混合液でこれを固定し、3~5°Cの低温で24時間放置後染色検鏡した。染色液はプロピオン酸カーミン液である。

実験結果

1. 外部形態の比較

M. alba, *M. hirsuta* 共に2年生で外部形態にも種々の相違があるが、最も顕著な点は花色で、*M. alba* の白

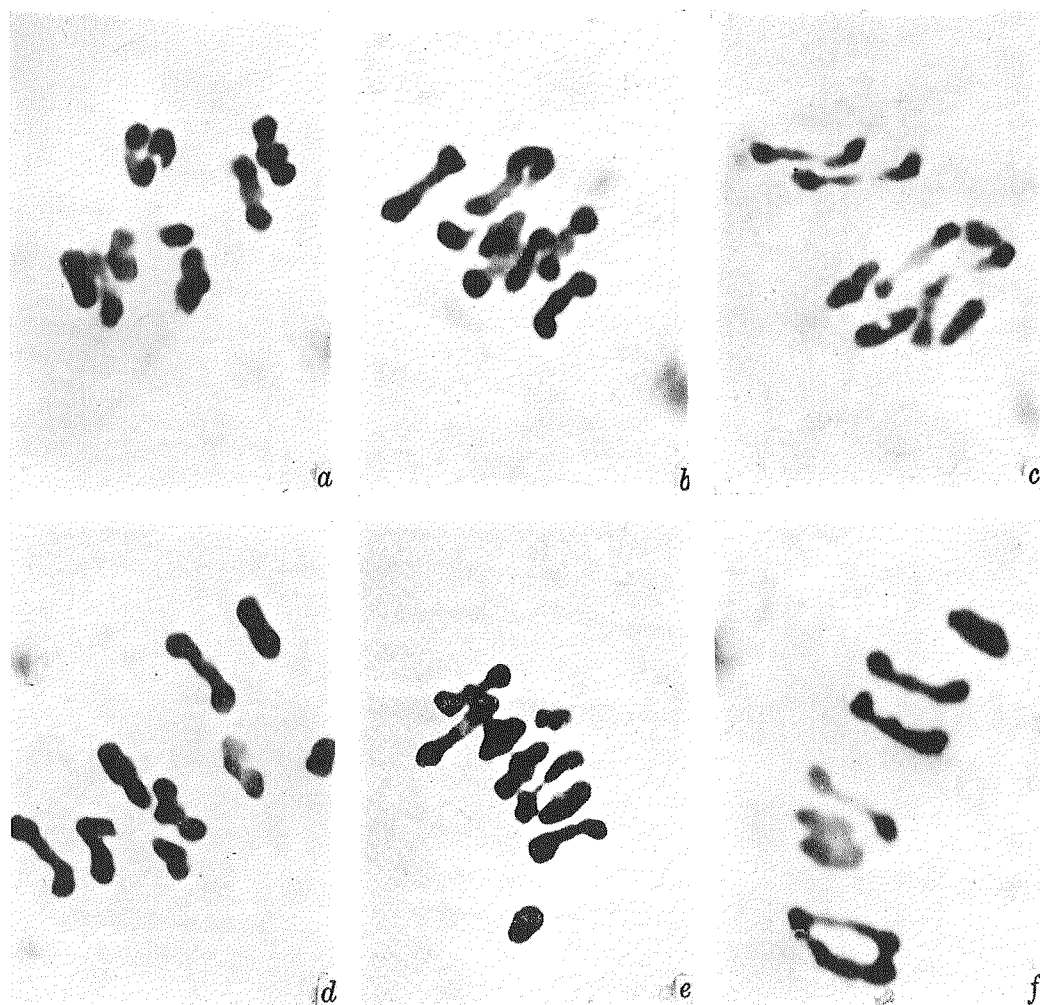


Fig. 2. Metaphase-I of *M. alba* × *M. hirsuta* F₁. ×2240.

- a) Alternate separation of members of the chain.
- b) Terminal members disjoining from the median members of the chain.
- c) Non-disjunctive chromosomes of the chain move to each pole.
- d) 1 III + 6 II + 1 I configuration.
- e) 7 II + 2 I configuration.
- f) 6 II plus a ring of 4 chromosomes.

色に対し *M. hirsuta* は黄色である。F₁ 植物の或るものは何れかの親に似るが、多くの形質は中間性を示す。いま特定の形質について外部形態の比較を示すと Table 1 の如くである。なお F₁ は軽度の葉緑素欠乏を示し生育全期を通じ葉色が淡緑であるが特に正常な生育が妨げられるという程のことはない。

2. 細胞遺伝学的観察

親植物の花粉稔性は、プロピオン酸カーミン液で染色

した結果によると、*M. alba*, *M. hirsuta* 共に約 99% の稔率を示した。その成熟分裂は常に 8 II を形成し (Fig. 1 a and f), 第 1 分裂, 第 2 分裂共に正常であった。F₁ 植物の花粉不稔率は約 56%, 着莢率は人為交配のもとで約 13% を示した。

F₁ 植物の成熟分裂は、移動期で一般に 6 II+1 IV が観察され、1 IV は多くの場合 4 連鎖状染色体として存在した (Fig. 1 e)。一つの 2 価染色体は常に仁と接続して

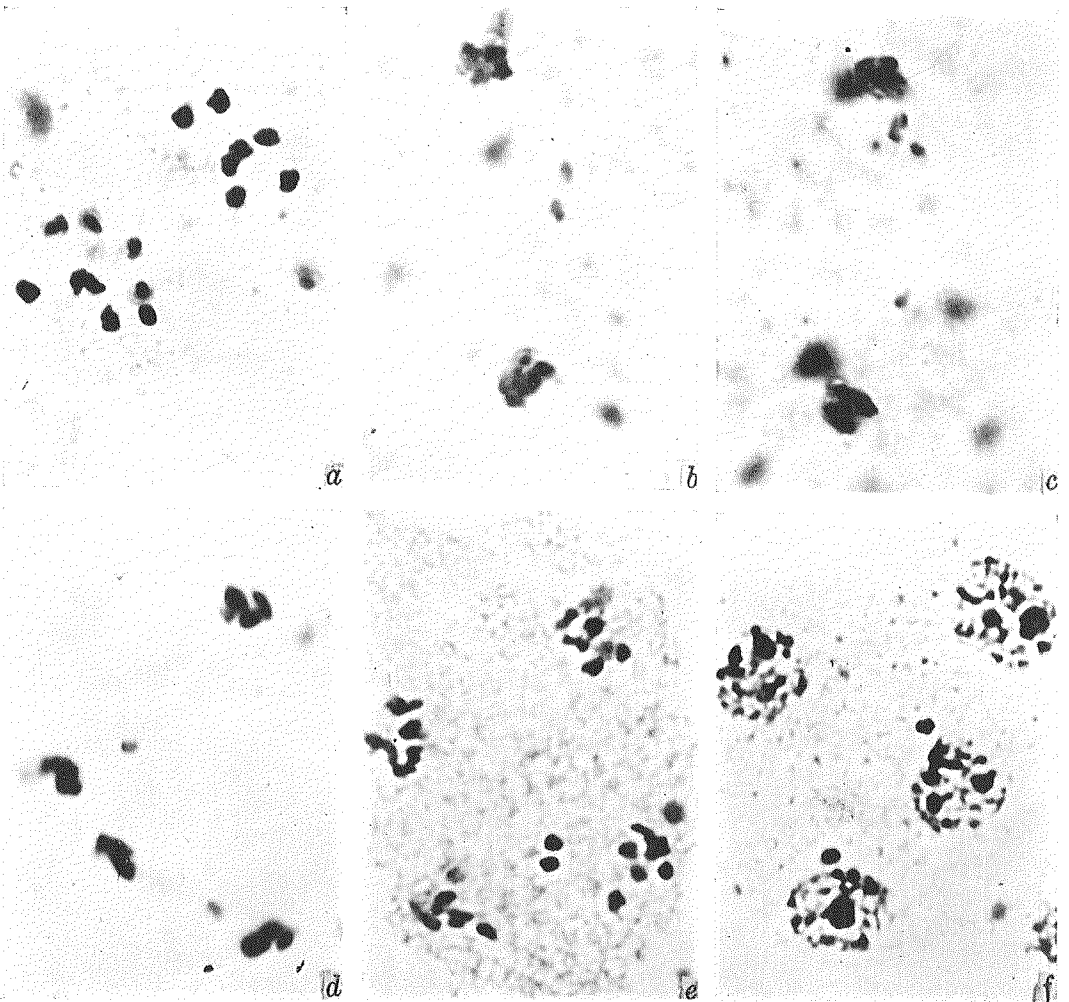


Fig. 3. *M. alba* × *M. hirsuta* F₁.

- a) Anaphase-1, 7-9 disjunction. ×1600.
- b) Late anaphase-1, chromatid separation. ×1540.
- c) Late anaphase-1 with laggars. ×1400.
- d) Late anaphase-2 with laggars. ×1750.
- e) Early telophase-2 with laggars. ×1700.
- f) Telophase-2, micronuclei. ×1500.

いるが、4連鎖状染色体と仁との接続は見られなかった。その外に1 III+6 II+1 I, 7 II+2 I, 8 IIの接合型が小頻度ながら存在した (Table 2)。第1中期では1 IV+6 II, 1 III+6 II+1 Iの接合型がほぼ同一頻度で出現し、後者は移動期に見られる4連鎖状染色体の一つの染色体が、precocious separationによって分れて出たものと考えられ、従って両接合型は同一起源を有するものと考えられる。

4連鎖状染色体について三つの分離型が観察された。すなわち第1は alternate chromosomes が同一極に向う型 (Fig. 2 a), 第2は両端の二つの染色体が中間の二つの染色体と別れて両極に向う型 (Fig. 2 b), 第3として二つの不分離染色体 (nondisjunctional chromosomes) が両極にわかれる型 (Fig. 2 c) である。後者の二つの型は染色体の重複及び欠失を起し、此の両型の出現頻度は58%に及び花粉不稔率と似た値を示した。而しながら1 III+6 II+1 Iの接合型については1個染色体の存在から分離型を決定することは不可能であった。

4価染色体は移動期及び第1中期で一般に4連鎖状染色体として存在するが、第1中期で環状型が4例観察された (Fig. 2 f)。又7 II+2 I, 8 IIの接合型が小頻度で存在した (Fig. 2 d and c, Table 2)。

これら4価染色体が相互転座によるか単純転座によるかを決定するため太糸期の観察を行なったところ、太糸

期において相互転座の代表的な cross-shape が常に観察され四つの arm は比較的長く、即ち二つの非相同染色体間の比較的長い部分の交換であると推定された (Fig. 1 b and c)。

第1後期を示す P.M.C. 中その52%において8-8の染色体分離が観察され、他は7-9の分離 (Fig. 3 a) 或いは遅滞染色体が観察された (Fig. 3 b and c)。遅滞染色体は1個以上存在する場合もしばしばあり (Fig. 3 c), 又染色体の分離が稀に観察された (Fig. 3 b)。

中間期の核には通常1個の仁が観察された、2個或いはまれに3個の場合も存在した。核の大きさは多くの場合同一であるが、時には違ったものも観察された。これは染色体数の相違によるものと推定される。遅滞染色体は極への移行が行なわれずこれによる micronuclei の形成が見られた。

第II中期の観察は困難であったが、第II後期の遅滞染色体の出現から当然不規則な行動が推定される。しばしば数個の遅滞染色体並びに micronuclei が第II後期及び第II末期の初期に観察された (Fig. 3 d, e and c)。一般に成熟分裂に引続いて4分子が形成され、2分子、3分子、或いは5分子は観察されなかった。成熟分裂における各期の接合型及び出現頻度を示すと Table 2 の如くである。

Table 2. Chromosome configurations at diakinesis and metaphase-1 and their distribution in later stages of meiosis in the F_1 hybrids, *Melilotus alba* × *M. hirsuta*.

Stage of meiosis	Frequency of PMCs with							Normal PMCs	Abnormal PMCs	Total	
	8 II	7 II+2 I	6 II+1 III+1 I	6 II+1 IV	8-8	8-7	9-7				7-7
Diakinesis	8	2	2	130				8	134	142	
Metaphase-1	7	8	46	43				7	97	104	
Anaphase-1					70	39	25	1	70	65	135
Anaphase-1								70	37	107	
Total								155	333	488	

論 議

高度の花粉不稔を示す種間雑種 *M. alba* × *M. hirsuta* の移動期及び第I中期に出現する4連鎖状染色体、並びに第I後期の染色体の分離について、いまこれととうもろこしの半不稔系統の雑種における場合と比較検討してみよう。

BURNHAM (1932) はとうもろこしの semisterile-1 系統から由来した植物に於いて第6染色体の付随体の terminal knob と最長染色体の比較的長い部分とが相互転座の交換部分であると看做される植物を見出した。これと正常植物との F_1 雑種は約25%の花粉不稔率を示し、 F_1 の太糸期の接合型は cross-shape ではなく T-shape を示し移動期に例外なく4連鎖状染色体が出現した。そ

の原因として同氏は terminal knob の対合の失敗をあげている。

CLARKE and ANDERSON (1935) は非常に短い染色体部分の相互転座について次の報告をしている。すなわち X 線処理で誘起された、トウモロコシの付随体染色体と第 3 染色体の間に付随体の一部分と、第 3 染色体の短い arm の約 25% の部分に相互転座が行なわれている植物を見出した。太糸期の接合は 56% が T-shape, 移動期で 31% が 4 連鎖状染色体を示し、残りは両時期において正常な 10 II の接合を示した。その理由として付随体の部分における不對合と、第 3 染色体もその先端で多くの場合不對合を示すと述べている。

BURNHAM (1934) は又第 8 と第 9 染色体の間で相互転座を有する semisterile-2 植物と正常植物と交雑した。F₁ の移動期では、多くの場合 4 連鎖状染色体を示し、4 連鎖状染色体は 108 の核中 7 例であった。太糸期の接合は cross-shape を示し、又四つの arm は長く、染色体の長い部分の交換であった。同氏によればこのような接合型が移動期において 4 連鎖状染色体となってあらわれるのはいずれかの arm における相同染色体の相同部分間の親和性の欠除が原因であろうと述べている。

さて、著者が観察した *M. alba* × *M. hirsuta* F₁ においては、太糸期の染色体接合型によって明らかなく、2 個の非同相染色体の、比較的長い部分の間に相互転座が生じたものと断定することが可能である。然しながらいずれの染色体に転座がおきているかは、詳細な核型の研究の不足と、marker genes の欠除から目下は不明であり今後の研究にまたねばならない。染色体の交換部分が長いにかかわらず多くの場合 4 連鎖状染色体になることは太糸期の cross-shape のいずれかの arm における相同染色体部分間の親和性の欠除によるものと考えれば一応の説明は成立つ。

4 連染色体の分離型について、COOPER and BRINK (1931) は第 1 中期の相互転座による 4 個染色体の形から分離型を alternate segregation と adjacent segregation の二つに分け、adjacent segregation は重複及び欠失を誘起し花粉不稔を結果することを明らかにした。BURNHAM (1950, 1956) は第 5 と第 6 染色体に相互転座を有するともろこしについて 4 連染色体の分離を研究し adjacent segregation を二つの型すなわち adjacent-1 segregation (disjunction of homologous centromeres, nondisjunction of the translocated pieces), adjacent-2 (nondisjunction of homologous centromeres, disjunction of translocated pieces) に分けている。又染色体的 marker を用

いることによりその出現頻度を報告し、adjacent-2 の出現頻度は極めて少ないが、adjacent-1 の頻度は alternate segregation とほぼ同一で花粉不稔率 50% に近くなると述べている。

M. alba × *M. hirsuta* F₁ の第 I 中期における接合型を検討するに、1 III+6 II+1 I については染色体の分離型を決定することは困難であったが、1 IV+6 II について観察した限りにおいては adjacent segregation の出現率は 58% を示した。これはこの F₁ の花粉不稔率 56% とよく一致する。然しこの adjacent segregation について、BURNHAM が分類した二つの型即ち adjacent-1 と adjacent-2 の頻度については細胞学的 marker がないため明らかにすることは不可能である。

第 I 中期で 1 III+6 II+1 I が約 44% の比率で出現したが、これは 4 連鎖状染色体が precocious separation によって離れたものと看做される。この 1 個染色体は第 1 後期において無作為に極に移行し 7-9 の分離となる。その後代においては当然異数体の出現が期待されるわけであり、事実これを裏付ける成績を得つつあるがその詳細は続報にゆずりたい。

種間雑種の減数分裂の研究は種の進化を論ずる上に極めて重要な意義をもつ。*Melilotus* 属の種間雑種に関する細胞遺伝学的研究については WEBSTER (1955) が *M. officinalis* × *M. alba* の F₁ 雑種について 4 個の出現を示唆したが、SHASTRY, SMITH and COOPER (1960) は同一組合せについて 4 個の出現を否定している。BRINGHUST (1951) は (*M. alba* × *M. dentata*) × *M. dentata* について相互転座を報告している。更に JARANOWSKI (1961) は *M. polonica* × *M. alba* の F₁ において同じく相互転座の存在を確認している。ここに著者の行なった組合せ、*M. alba* × *M. hirsuta* を含めて現在までに、相互転座が認められた以上の 3 組合せには、片親として常に *M. alba* が含まれている。これらに共通して認められた相互転座が、*M. alba* が転座同型接合体であって、同じ二つの非同相染色体間の同一の相互転座によるものであるか、*M. alba* の染色体間の相互転座であっても異なった相互転座によるものであるか、或いは又他方の親に存在する相互転座によるものであるかを決定するには更に多くの組合せについて研究を進めることが必要である。

更に筆者は種間のゲノムの相同性に興味をもつものであるが、本組合せにおいては 6 II については完全な相同性が認められるが、4 連染色体について第 I 中期における 1 個染色体の游離の頻度からみて相同性に関し多少の疑問があり併せて今後の研究に期待したいと考える。

摘 要

種間雑種 *Melilotus alba* × *M. hirsuta* の F₁ 雑種について、外部形態の比較及び細胞遺伝学的実験を行なった。その結果を要約すると次の如くである。

1. F₁ 植物は軽度の葉緑素欠乏を示すが、正常な生育は妨げられない。花色は両親の中間の淡黄色である。

2. 太糸期の観察により、*M. alba* × *M. hirsuta* において相互転座が明らかに存在し、この相互転座は二つの非相同染色体間の比較的長い染色体部分の交換であると認められた。

3. 多くの場合、移動期に4連鎖状染色体が観察されるが、これは太糸期の cross-shape のいずれかの arm における相同染色体部分間の親和性の欠除によるものと推定された。

4. 4連鎖状染色体の分離には三つの型が観察され、その中の二つの adjacent segregation 型の出現頻度は58%を示し、これは花粉不稔率とよく一致する。

5. 第1後期で7-9の分離が見られ、これにより後代に異数体の出現が期待される。

6. 相互転座の存在が明らかとなった三つの種間雑種の組合せ、すなわち (*M. alba* × *M. dentata*) × *M. dentata*, *M. polonica* × *M. alba*, *M. alba* × *M. hirsuta* に常に *M. alba* が含まれていることから、共通して存在する相互転座がはたして、*M. alba* が転座同形接合体であって同じ二つの非相同染色体間の同一の相互転座によるものであるか、*M. alba* の染色体間の相互転座であっても、異なった相互転座によるものであるか、或いは他の種に存在するものであるかの決定には更に多くの組合せについての研究がなされねばならない。

参 考 文 献

- 1) BRINK, R. A. and D. C. COOPER 1932. A structural change in the chromosomes of maize leading to chain formation. Amer. Naturalist 66: 310-322.
- 2) BRINGHURST, R. S. 1951. Genetic analysis of chlorophyll deficiency in *Melilotus alba* × *M. dentata* hybrids with some observations on meiotic irregularities. Summaries of Doctoral Dissertations, Univ. of Wis. 11: 96-97.
- 3) BURNHAM, C. R. 1932. An interchange in maize giving low sterility and chain configurations. Proc. Nat. Acad. Sci. 18: 434-440.
- 4) ————. 1934. Cytogenetic studies of an interchange between chromosome 8 and 9 in maize. Genetics 19: 430-447.
- 5) ————. 1950. Chromosome segregation in translocations involving chromosome 6 in maize. Genetics 35: 446-481.
- 6) ————. 1956. Chromosomal interchanges in plants. Bot. Rev. 22: 419-552.
- 7) CLARKE, A. E. and E. G. ANDERSON 1953. A chromosomal interchange in maize without ring formation. Amer. Jour. Bot. 22: 711-716.
- 8) COOPER, D. C. and R. A. BRINK 1931. Cytological evidence for segmental interchange between non-homologous chromosomes in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. 17: 334-338.
- 9) GREENSHIELDS, J. E. R. 1954. Embryology of interspecific crosses in *Melilotus*. Canadian Jour. Bot. 32: 447-465.
- 10) JARANOWSKI, J. K. 1961. Semisterility in the interspecific hybrid *Melilotus polonica* × *M. alba*. Amer. Jour. Bot. 48: 28-35.
- 11) KITA, F., M. L. MAGOON, and D. C. COOPER 1959. Simple smear techniques for the study of chromosomes of *Melilotus*. Phytion 12: 35-38.
- 12) SCHULZ, O. E. 1901. Monographie der Gattung *Melilotus*. Bot. Jahrb. 29: 660-735.
- 13) SHASTRY, S. V. S., W. K. SMITH and D. C. COOPER 1960. Chromosome differentiation in several species of *Melilotus*. Amer. Jour. Bot. 47: 613-621.
- 14) SMITH, W. K. 1943. Propagation of chlorophyll-deficient sweetclover hybrids as grafts. Jour. Heredity 34: 135-140.
- 15) ————. 1954. Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. Agron. Jour. 42: 315-322.
- 16) WEBSTER, G. T. 1950. Fertility relationships and meiosis of interspecific hybrids in *Melilotus*. Agron. Jour. 42: 315-322.
- 17) ————. 1955. Interspecific hybridization of *Melilotus alba* × *M. officinalis* using embryo culture. Agron. Jour. 47: 138-142.

Summary

The F₁ hybrids, *Melilotus alba* × *M. hirsuta*, have light green leaves due to chlorophyll-deficiency and pale yellow flowers, intermediate in color between that of the parents. They are highly sterile (ca. 56% pollen abortion) whereas both the parental lines are fertile. A chain of four chromosomes and six bivalents are present at diakinesis and metaphase-1. Analysis of pachytene configurations revealed the presence of a reciprocal translocation involving large

segments of two chromosomes. The chromatids of one arm of the cross-shaped figure are loosely associated which accounts for the chain configurations at later stages of meiosis-1. Precocious separation of one chromosome from the chain commonly occurs.

Adjacent chromosomes frequently pass to the same pole at anaphase-1, accounting in part at least for the high sterility. The presence of a reciprocal translocation in the hybrids is evidence that one parent is homozygous for such a translocation.