



Title	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
Author(s)	田丸, 典彦; TAMARU, Norihiko; 木下, 俊郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(2), 124-128
Issue Date	1980-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11946
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(2)_p124-128.pdf



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¹⁾

— 稲の交雑に関する研究 第 LXXIII 報 —

田丸典彦・木下俊郎・高橋萬右衛門

(北海道大学農学部作物育種学教室)

(昭和 55 年 4 月 30 日受理)

Observations on Pollen Development in the Cytoplasmic Male Sterile Plants Induced by the Nuclear Substitution

— Genetical studies on rice plant, LXXIII —

Norihiko TAMARU*, Toshiro KINOSHITA
and Man-emon TAKAHASHI

(Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

雄性不稔細胞質と核内遺伝子の相互作用によって生ずる細胞質雄性不稔植物は EDWARDSON²⁾ の抄録にもある如く、多くの高等植物で見られるようになった。栽培稲については新城^{9,10)} により「Chinsurah Boro II」と「台中 65 号」との交雑後代から、その育成が報告された。また、最近、中国においては細胞質雄性不稔稲を利用した一代雑種品種の実用化への方向が試みられている¹²⁾。しかし、これまでヘテロシスの利用があまりなかった稲の如き自殖性作物では、この分野の研究は他殖性作物ほどには進んでいるとは言えない。

筆者等は、栽培稲の遠縁品種間交雑に見られる雑種不稔性を調査するうちに、F₁ の相反交雑組合せで花粉稔性に有意差を生ずる場合を認めた。そこで、日本稲を反復親として連続戻し交雑を行ない、核置換系統を作成したところ、細胞質雄性不稔性を示す系統が得られた。この育成系統の不稔花粉は、CHU 等¹⁾ が *boro* 細胞質型雄性不稔稲で観察した知見と相違して、正常型とは異なるものの、3 核にまで分裂した花粉核を有することが認められた。そこで筆者等は *boro* 細胞質型雄性不稔稲の分

譲を受け、筆者等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、細胞質雄性不稔稲に見られる退化花粉の細胞学的特性を明らかにするため実験を行なった。

材料および方法

インド稲品種「Bhutimuri-36」(以下 I-44 と略称) と日本稲品種「農林 9 号」(A-133) を用いて相反交雑を行ない、それらの F₁ に A-133 を反復親として、A-133 の核に対する置換系統と還元系統を育成した。各個体は 2 l ポットに 1~2 本植とし、F₁ より B₇ 世代まで温室内で栽培した。B₈ 及び B₉ 世代と *boro* 細胞質型雄性不稔稲 (I-127) は、北海道教育大学釧路分校の自然光グロース・キャビネット内で昼 27.5°C 夜 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、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ード・ヨードカリ液を用いた。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を行なった。花粉直径の計測は、同様に酢酸カーミンにより染色したものを 1 花当たり 100 粒ずつ

1) 北海道大学農学部育種学教室及び北海道教育大学釧路分校農学研究室業績

* Agricultural Laboratory, Kushiro College, Hokkaido University of Education, Kushiro, Japan

計測した。なお、採取した材料は 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。葯壁組織の観察は第3ブチルアルコールを用いたシリーズによる脱水後、パラフィン切片を作製し、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 を用いて3重染色を行なった。なお、アズール A はいわゆる Shift 型試薬⁷⁾に調整し、PAS 反応の代用とした。

実験結果および考察

交雑組合せ I-44×A-133 の F₁ における花粉稔性は 11%、逆交雑組合せである A-133×I-44 の花粉稔性は 34% で、両交雑間に有意差が認められた。この相反交雑組合せの F₁ に A-133 を反復親として連続戻し交雑を行なった初期世代における花粉稔性を Table 1 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、花粉稔性及び種子稔性がともに完全不稔となった B₈ 置換系統と、90% 内外の高稔性にまで回復した B₈ 還元系統を用いて、それぞれ A-133 を花粉親とする交配実験を行なった。置換系 B₈×A-133 では 144 穎花中 132 粒の結実 (92%)、還元系 B₈×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。従って、置換系 B₈ の雌性器官は正常であることが認められた。還元系 B₈ 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雑種不稔性はほぼ消失したと見なされる。従って、置換系 B₈ (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花粉が完全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、いわゆる細胞質雌性不稔種が育成された。K-11 は外観的には A-133 ならびに還元系 B₈ (K-12 と略称) と同様で、葯は不裂開 (Fig. 1)、かつ、花粉は小型であり、ヨード・ヨードカリ液によっても濃染されなかった (Plate 1 a, b)。

Table 1. Pollen fertility (%) at each generation in the successive backcrossing of the substitution and restoration types

Generations	Substitution type [I-44×A-133]×A-133								Restoration type [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	—	



Fig. 1. Anthers of the substitution line K-11, showing male sterility.

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核期及び3核期の花粉を採取して、正常型における場合と比較観察した。

1核期：葯壁組織と小胞子の発育をパラフィン切片を作製して観察したところ、不稔種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、正常型との相違を識別できなかった (Plate 1 c, d)。

2核期：CHU 等¹⁾によれば、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た。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なった結果では、K-11 および I-127 の両不稔系統とも花粉核第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、発育経過は正常型と比べて全く相違が認められなかった (Plate 1 e, f)。また、3核期末でのヨード・ヨードカリ液による呈色反応でも不稔種の花の染色がやや薄いものの形態的な差異は認められなかった (Plate 1 g, h)。

3核期：不稔種においても生殖核の分裂がおこり、3核が形成された (Plate 2 a, b, c, d)。一方、正常型では開花前日には、生殖核はいわゆる楔形となって酢酸カーミンにより濃染し、栄養核は不鮮明となった。これに反して、不稔種では2個の生殖核の染色性が不良で、形もだ円形を示し、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なわれず、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 3 a, b, c, d)。

種では花粉核第2分裂期前後からでん粉等の蓄積が増加し、花粉の直径も飛躍的に増大することが報告されている^{4,14)}。そこで、花粉核第2分裂直前から開花までの花

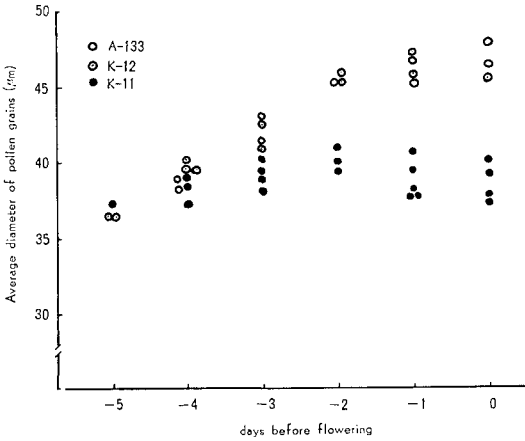


Fig. 2. Development of pollen grains both in the male fertile and male sterile lines.

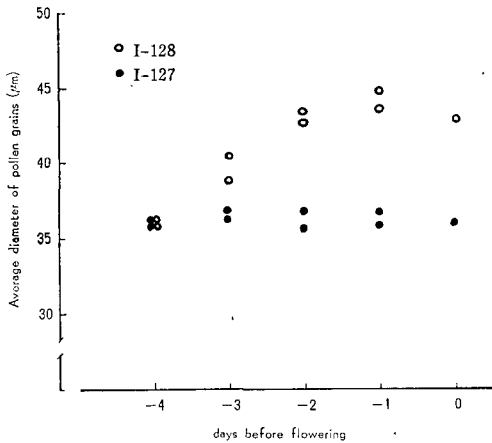


Fig. 3. Development of pollen grains in the *boro*-cytoplasm male sterile tester, I-127 and its maintainer, I-128.

粉を採取して、花粉径を計測し、正常型との比較を行なった。Fig. 2 および 3 に明らかな如く、両不稔系統共、花粉核第 2 分裂期以降から花粉径の増大はほとんど認められなかった。すなわち、不稔稲で花粉の形態的異常を生ずる時期は、花粉核第 2 分裂期以降であることが明らかとなった。従って、筆者等の観察結果は花粉の發育異常の経過について明らかに CHU 等と異なる結果となった。CHU 等が正常花粉の發育中においても見られる花粉相互の生育の多少の相違を見誤った可能性も考えられるが、むしろ、環境条件の異なったためではないかと思われる。小麦について不稔花粉の退化時期が不良環境

下で早まることが深沢³⁾により観察されているから、栽培条件の相違が、かかる花粉發育経過に影響している可能性が考えられる。

LASER and LERSTEN⁶⁾によれば、細胞質雄性不稔植物の花粉退化の機構は多様で、1核期以内に退化が生ずるものももっとも多いものの、2核にまで至るものとして大麦⁸⁾、小麦¹³⁾の例をあげている。しかし、筆者等の観察した如く、3核に至ったものはほとんど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遺伝子の共通であること⁵⁾とも一致し、おそらく K-11 と I-127 は同型の細胞質¹¹⁾を有すると考えてよい。なお、この点については isoplasmic line を育成して検討する必要があるだろう。

摘 要

Bhutimuri-36 × 農林 9 号の F₁ に、「農林 9 号」を反復親として連続戻し交雑を行ない、「Bhutimuri-36」の細胞質と「農林 9 号」の核を有する置換系統を作製したところ、完全な細胞質雄性不稔稲となった。この育成系統 (K-11) と新城の育成した *boro* 細胞質型雄性不稔稲 (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なった。

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分裂も行なわれることを観察した。しかし、それ以降は花粉径の増大が認められず、發育が停止した。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あり、かつ、生殖核はだ円形で染色性が悪く、相接することが多かった。従って、細胞質雄性不稔稲において花粉の形態的異常を生ずるのは、従来の知見と相違して、花粉核第2分裂期以降であることが明らかになった。

謝 辞

実験遂行にあたり、心よく材料の分譲に応じて下さった琉球大学教授新城長有博士のご厚意に深く感謝する。また、顕微鏡標本作製について、北海道農業試験場稲第3研究室室長佐竹徹夫博士はじめ研究室員各位から懇切なご指導ならびに有益な助言を賜わった事に厚く謝意を表す。更に、系統育成期間中に北海道大学農学部大学院生諸兄の多大の協力和援助を戴いた。ここに記して厚く感謝の意を表す。

引用文献

1. CHU, Y. E., LI, Y. S., SHINJO, C. and LI, H. W.: Hybrid rice breeding III. Cyto-histological investigation of pollen degeneration in anther of cytoplasmic male-sterile plants, *Jap. J. Genet.*, **47**: 179-183. 1972
2. EDWARDSON, T. R.: Cytoplasmic male sterility, *Bot. Rev.*, **36**: 341-420. 1970
3. 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
4. 木原 均・平吉 功：稲花粉粒の発達。農業及園芸, **17**: 685-690. 1942
5. KINOSHITA, T., MORI, K. and TAKAHASHI, M.: Inheritance studies on cytoplasmic male sterility induced by nuclear substitution—Genetical studies on rice plant LXX—*J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **60**: 23-41
6. LASER, K. D. and LERSTEN, N. R.: Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms, *Bot. Rev.*, **38**: 425-454. 1972
7. リゾン L.・今泉 正訳：組織化学および細胞化学。理論と方法, 白水社, 東京: 150-161. 1962
8. SCHOOLER, A. B.: A form of male sterility in barley hybrids. *J. Hered.*, **58**: 206-211. 1967
9. SHINJO, C.: Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, *Oryza sativa* L. II. The inheritance of male sterility, *Jap. J. Genet.*, **44**: 149-156. 1969
10. 新城長有：栽培イネにおける細胞質の雄性不稔性の研究。I. 雄性不稔と花粉稔性回復系統の育成経過, および自然環境に対するそれらの安定性, 琉球大農学術報告, **17**: 261-272. 1970
11. SHINJO, C.: Distributions of male sterility-inducing cytoplasm and fertility-restoring genes in rice. II. Varieties introduced from sixteen countries, *Jap. J. Breed.*, **22**: 329-333. 1972
12. 秦 太 辰：作物雄性不育法育种原和方法。p. 84-108, 上海科学技术社, 上海, 1978
13. WILSON, J. A.: Problems in hybrid wheat breeding, *Euphytica*, **17** Supl. 1: 13-33
14. 山田記正：水稻花粉の发育生理学的研究。I 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

Summary

1. A cytoplasmic male-sterile line, K-11 was induced by the nuclear substitution method from the cross, Bhutimuri-36×Norin-9-go. The F₁ plants of the said cross were backcrossed repeatedly with 'Norin-9-go' up to SB₈ to produce a substitution line which possessed the cytoplasm of 'Bhutimuri-36' and the nucleus of 'Norin-9-go'.

2. In order to investigate the cytological nature on the development of the pollen grains in the cytoplasmic male-sterility, the substitution line, K-11 and the *boro*-cytoplasm male-sterile tester, I-127 which was donated from Shinjo of Ryukyu University were grown in the growth cabinet conditioned with natural light at 27.5°C during the day and 20.5°C at night.

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

4. At the trinucleate stage which begins around 4 days before the anthesis, the development of pollen grains in the male-sterile plants were seen retarded to those of the male-fertile pollens and the diameter of sterile pollen grains differed from normal ones remarkably until the flowering stage.

5. One day prior to flowering, the shape of pollen nucleus in the male-sterile plants showed the following feature: Nucleolus of vegetative nucleus maintained a round shape and was stained intensively by aceto-carmin. Two sperm nuclei showed an elliptical shape and faintly stained. They were seen located adjacently.

6. On the basis of the observations, it was concluded that the development of pollen grains in the cytoplasmic male-sterile lines, proceeded normally until the binucleate pollen stage and indicated retardation of development during the accumulation of pollen reserves 2 or 3 days prior to flowering. These signs of abnormality are rare in the cases of the cytoplasmic and nuclear genic male-sterility and differed remarkably from the results of the previous report using the same material (CHU *et al.* 1972).

- Plate 1.** Comparison of pollen development between male-fertile (left) and male-sterile (right) lines.
- a, b; Pollen grains in one day prior to flowering, stained by the iodium potassium iodide solution.
 - c, d; Transverse section of anther in uninucleate pollen stage, showing a normal tapetal development in both of normal and male-sterile plants.
 - e, f; Late binucleate pollen stage, showing no difference between the both of normal and male-sterile plants.
 - g, h; Pollen grains in 4 days prior to flowering, stained by iodium potassium iodide solution.

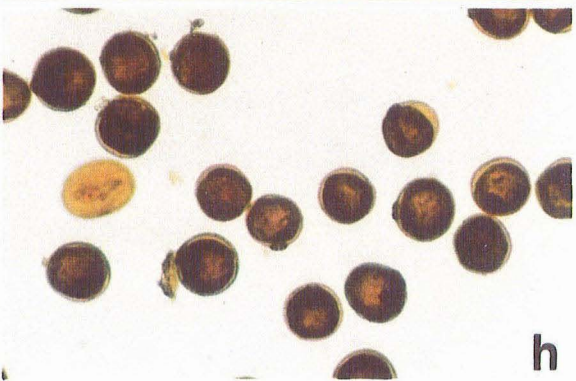
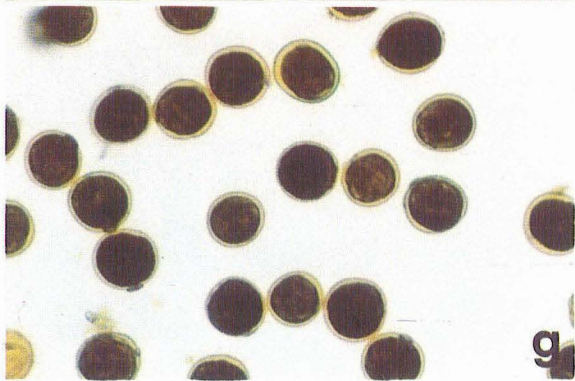
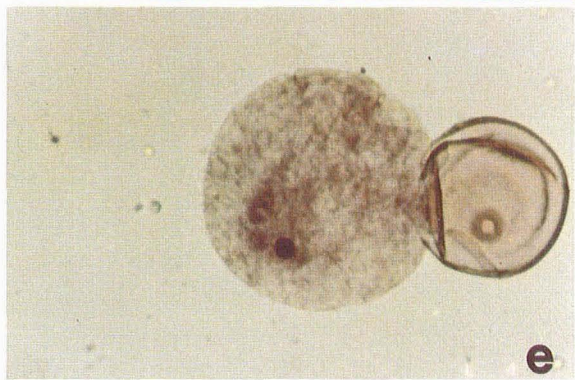
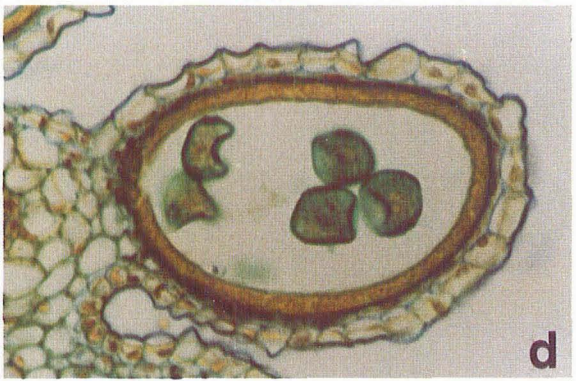
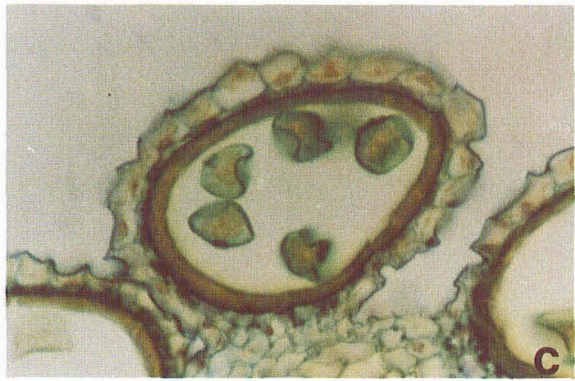
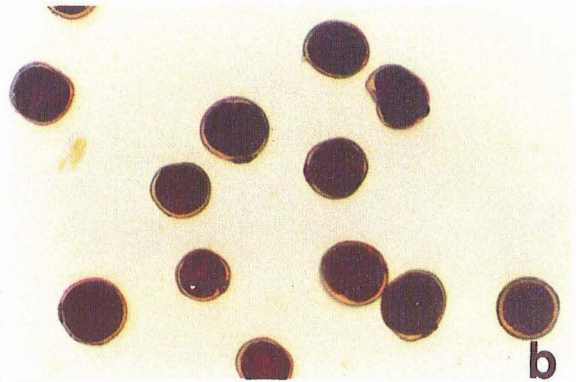
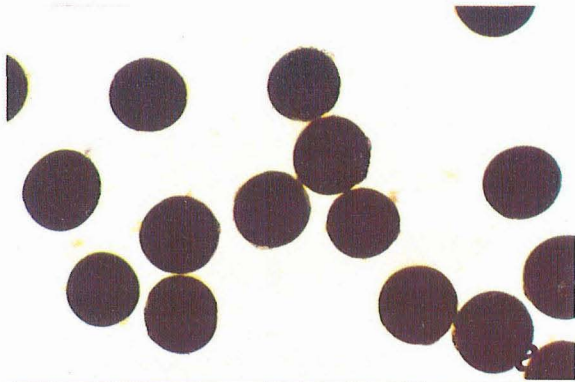


Plate 2. Comparison of pollen grains in the second mitosis between male-fertile and male-sterile lines.

- a ; Metaphase in the normal plant (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).

Plate 3. Comparison of pollen grains in the late trinucleate and mature stages between male-fertile (left) and male-sterile (right) lines.

- a, c ; Normal pollen grains possessing the two wedge-shaped sperm nuclei in K-12(a) and I-128(c) lines: note the vegetative nucleus loosing the nucleolus.
- b, d ; Abnormal pollen grains in K-11(b) and I-127(d) lines: note the abnormal sperm nuclei stained faintly and the nucleolus of the vegetative nucleus stained intensively by carmine.

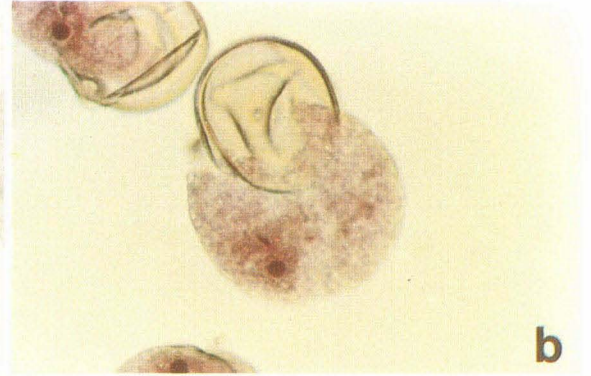


Plate III

