



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基础研究 : 第X I 報 種間雑種 Melilotus messanensis × M. macrocarpa F1 の細胞学的研究
Author(s)	喜多, 富美冶; KITA, Fumiji; 前川, 雅彦 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 13(3), 235-241
Issue Date	1982-11-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11976
Type	departmental bulletin paper
File Information	13(3)_p235-241.pdf



Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究

第 XI 報 種間雑種 *Melilotus messanensis* ×
M. macrocarpa F₁ の細胞学的研究

喜多富美治・前川雅彦

(北海道大学農学部附属農場)

伊勢一男

(農林水産省農業研究センター作物第一部)

新関稔

(弘前大学農学部)

(昭和 57 年 1 月 14 日受理)

Cytological Study of the Interspecific F₁ Hybrid, *Melilotus messanensis* × *M. macrocarpa*

Fumiji KITA and Masahiko MAEKAWA

(Agricultural Experiment Farm, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

Kazuo ISE

(Central Agricultural Experiment Station, Ministry of Agriculture,
Forestry, and Fishery, Konosu 365, Japan)

Minoru NIIZEKI

(Faculty of Agriculture, Hirosaki University, Hirosaki 036, Japan)

緒言

Melilotus 属 (sweetclover) は *Eumelilotus* と *Micromelilotus* の 2 亜属に分類されている。*Eumelilotus* 亜属には 9 種が含まれ、*M. altissima* を除く 8 種は相互転座に関し 3 群に群別出来ることが明らかにされている¹²⁾。*Micromelilotus* 亜属には 11 種が含まれ、*M. messanensis* × *M. segetalis* およびその逆交雑の F₁ は相互転座と逆位に関し^{4,13)}、*M. sulcata* × *M. macrocarpa* F₁ は逆位に関し⁶⁾、*M. segetalis* × *M. macrocarpa* F₁ は相互転座と逆位に関し⁷⁾、*M. sulcata* × *M. infesta* F₁ は逆位に関し⁸⁾ それぞれヘテロ接合体であり、*Micromelilotus* 亜属の種の分化に相互転座と逆位が何らかの役割を果していることが示唆される。

本研究は *M. messanensis* を雌性親とし *M. macrocarpa* を花粉親とする種間雑種 F₁ が新たに得られ、これについて細胞学的な検討を加えたので、その結果を取

纏め報告する。本研究の遂行に当り文部技官飛渡正夫、八嶋康広および渡会万治の 3 氏にご協力を戴いた。ここに記して深く謝意を表する。

実験材料および方法

本実験に供試した材料は *Micromelilotus* 亜属に属する *M. messanensis* と *M. macrocarpa* の種間雑種 F₁ である。1978 年の 9 月下旬に播種し温室内で育成した両親植物は 1979 年の 2 月～3 月にかけて開花期を迎え交配を行った。交配の方法は開花前日の花を用い花弁を取除いた後サクシオンポンプで葯および花粉を吸引して除雄を行い、翌日花粉親からの花粉を柱頭になすりつけて受粉を行った。交配花数 34 中 11 粒の種子が得られ 1979 年 4 月に播種した。寒冷紗で囲ったハウス内で育成したが 11 個体中 1 個体が形態的に種間雑種 F₁ と判断され、13.4% の花粉稔性を示した。その交雑組合せは *M. messanensis* PI 231233 × *M. macrocarpa* Bdn 61-

97である。

さらに、1979年9月に温室内で播種育成し、翌年2～3月に同様交配を行い、145の幼胚を培養しうち21がカルス化し、このうち1幼胚起源のカルスから再分化した個体を育成した。形態的に種間雑種 F₁ と判断され花粉稔性は26.7%を示した。胚培養は WHITE (1963) の

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5 mg/l を $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 18.6 mg/l と $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mg/l に代えた培地を基礎培地に蔗糖 30 g/l と酵母抽出物 1,000 mg/l を加えたものである。この組合せは *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 である。

花粉母細胞を用いて減数分裂における染色体行動を観

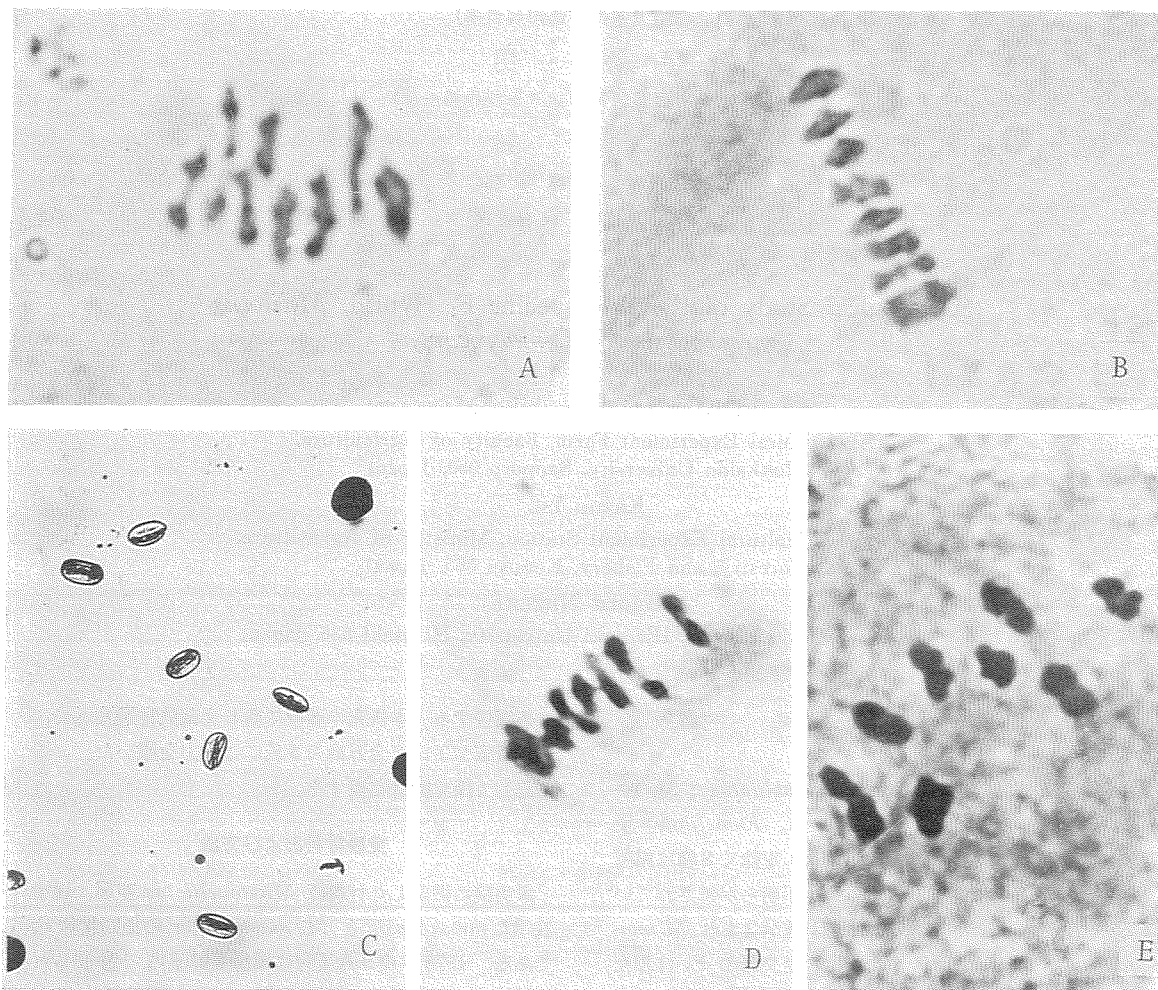


Fig. 1. Chromosome configuration at metaphase I in the parental species and the interspecific hybrids, and pollen grains of the hybrids

- A: Metaphase I of *M. messanensis* Bdn 60-34. 8II.
- B: Metaphase I of *M. macrocarpa* Bdn 61-97. 8II.
- C: Pollen grains of the F₁ interspecific hybrid, *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97.
- D: Metaphase I of the interspecific F₁ hybrid, *M. messanensis* PI 231233 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97. 8II.
- E: Metaphase I of the interspecific F₁ hybrid, *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97. 8II.

察したが、固定染色および検鏡方法は前報⁵⁾で報告した通りである。

実験結果

交配親に用いた *M. messanensis* PI 231233, *M. messanensis* Bdn 60-34, および *M. macrocarpa* Bdn 61-

97 は花粉稔性は 95% 以上で種子稔性も良好である。PMC の減数分裂は各期とも正常に推移し (Fig. 1. A, B) 細胞学的に安定した種および系統であると言える。

両組合せの種間雑種 F_1 の花粉稔性 (Fig. 1. C) は前述の通り高度の不稔であるが、減数分裂における Diakinesis および Metaphase 1 の接合型が Fig. 1. D, E な

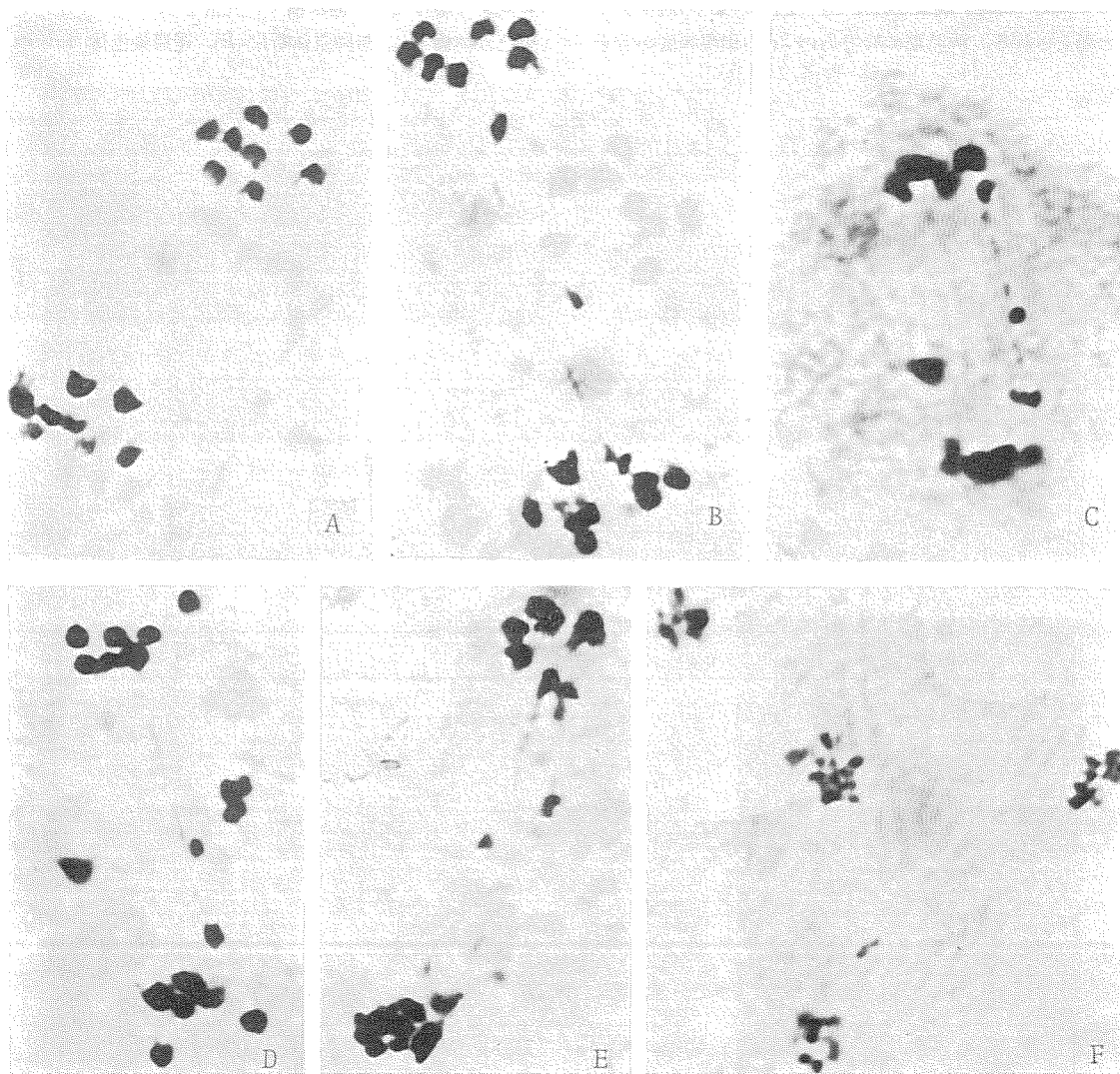


Fig. 2. Chromosome behaviors at anaphase in the interspecific F_1 hybrid, *M. messanensis* PI 231233 \times *M. macrocarpa* Bdn 61-97

- A: Anaphase 1. 8-8 disjunction.
- B: Anaphase 1. 1B+1F.
- C: Anaphase 1. 1B+1F+1Ld.
- D: Anaphase 1. 1B+1F+2Ld.
- E: Anaphase 1. 2B+2F.
- F: Anaphase 2. 1Ld.

らびに Table 1 に示されている。すなわち、Diakinesis で 8_{II} の接合型がそれぞれ 72.3% および 80.0% を占め他は $7_{II}+2_I$ であった。Metaphase 1 に於ては 8_{II} がそれぞれ 77.0% および 94.7% で $7_{II}+2_I$ の出現頻度が 23.0% および 3.8% であった。また $1_{IV}+8_{II}$ の接合型が *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 で 2 細胞 (1.5%) 観察されたが、これはむしろ観察誤差と考えられる。両時期に於て $7_{II}+2_I$ の出現頻度が若干

高いが、これは特定な II 価染色体が早期離反し易いことによると考えられる。

Anaphase 1 に於て両組合せとも種々の異常が観察された。Fig. 2. A, B, C, D, E および Table 2 に示したごとく、*M. messanensis* PI 231233 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 に於て、8-8 の正常分離が全観察細胞数の 42.8% であったが、他は種々の異常を示した。すなわち染色分体橋 (B)、無動原体断片 (F)、遅滞染色体 (Ld) の

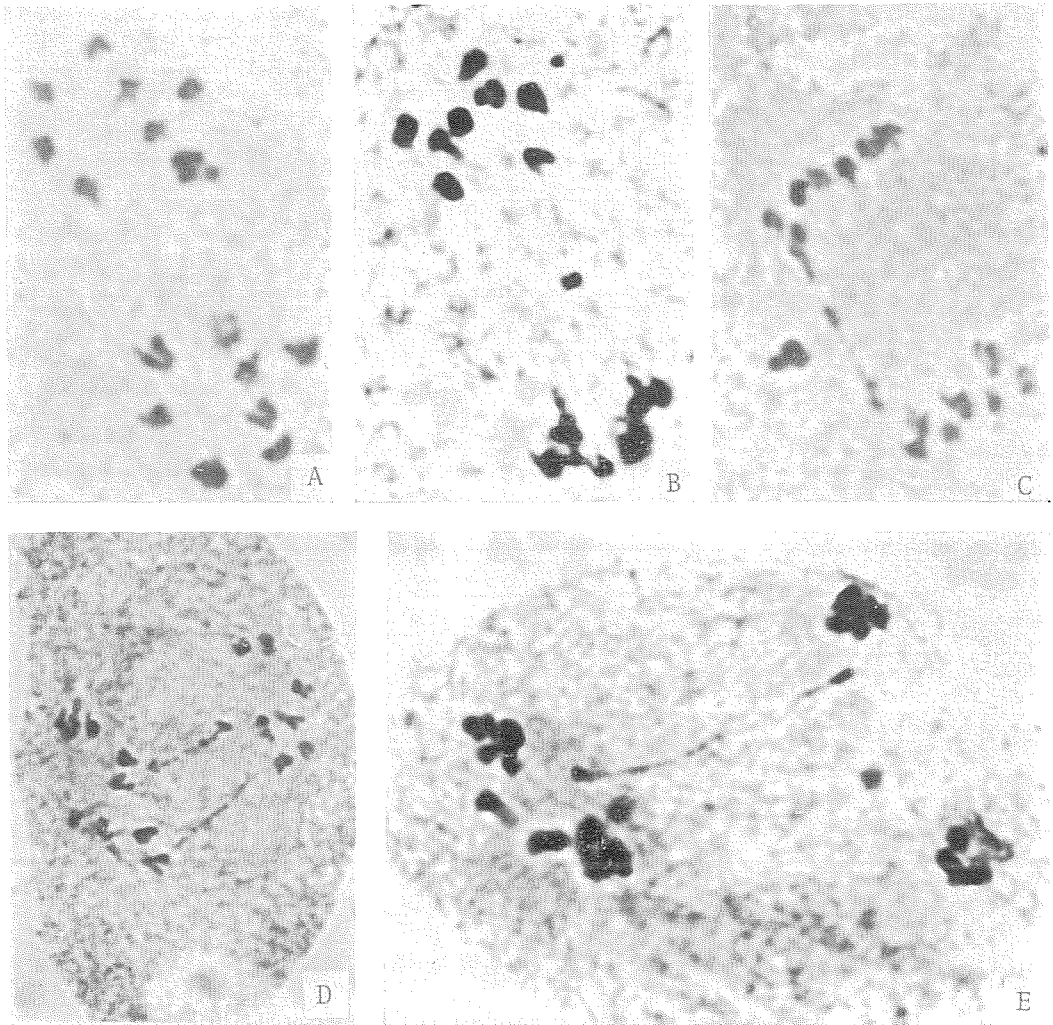


Fig. 3. Chromosome behaviors at anaphase in the interspecific F_1 hybrid, *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97

- A: Anaphase 1. 8-8 disjunction.
- B: Anaphase 1. 1B+1F.
- C: Anaphase 1. 1B+1F+1Ld.
- D: Anaphase 1. 2B+1F.
- E: Anaphase 2. 1B+1Ld.

出現および 9-7 の分離等である。染色分体橋および断片の出現頻度は、1B+1F (25.0%), 2B+2F (16.0%), 1B (5.4%), 1B+1F+1Ld (3.6%) および 2F (1.8%) であった。

M. messanensis Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 に於ても、Fig. 3. A, B, C, D および Table 2 に

示したように概ね同様な異常が観察された。とくに染色分体橋、無動原体断片ならびに遅滞染色体に関し種々の異常が存在し、115 の観察細胞のうち 1 細胞ではあるが 3B+2Ld を観察している。

Anaphase 2 に於て、Fig. 2. F, Fig. 3. E および

Table 1. Chromosome configurations at diakinesis and metaphase 1 in the F₁ hybrids, *M. messanensis* × *M. macrocarpa*

Cross combination	Stage	Frequencies of cells with			
		1IV+6II	8II	7II+2I	Total
<i>M. messanensis</i> PI 231233 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Diakinesis	—	34	13	47
	(%)	—	(72.3)	(27.7)	(100.0)
	Metaphase 1	—	104	31	135
	(%)	—	(77.0)	(23.0)	(100.0)
<i>M. messanensis</i> Bdn 60-34 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Diakinesis	—	20	5	25
	(%)	—	(80.0)	(20.0)	(100.0)
	Metaphase 1	2	123	5	130
	(%)	(1.5)	(94.7)	(3.8)	(100.0)

Table 2. Chromosome behavior at anaphase 1 in the hybrids, *M. messanensis* × *M. macrocarpa*

Cross combination		Frequencies of cells with														Total		
		Nor.	9-7	1B + 1F 1F	1B+ + 1F+ 1Ld	1B + 3F	1B + 1Ld	1F + 1Ld	1F + 2Ld	2F + 1Ld	2B + 2F	2B + 1F	2B + 2B	3B + 2Ld				
<i>M. messanensis</i> PI 231233 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Obs.	24	3	14	2		3			1		9			56			
	%	42.8	5.4	25.0	3.6		5.4			1.8		16.0			100.0			
<i>M. messanensis</i> Bdn 60-34 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Obs.	50	4	15	1	1	1	1	29	1	1	4	1	2	1	2	1	115
	%	43.3	3.5	13.0	0.9	0.9	0.9	0.9	25.2	0.9	0.9	3.5	0.9	1.7	0.9	1.7	0.9	100.0

B: Bridge, F: Fragment, Ld: Laggard.

Table 3. Chromosome behavior at anaphase 2 in the F₁ hybrids, *M. messanensis* × *M. macrocarpa*

Cross combination		Normal	Frequencies of cells with Abnormal					Total
			1B	1B+F	2B	F+or Ld	M. N.	
<i>M. messanensis</i> PI 231233 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Obs.	27	53					30
	%	33.7	66.3					100.0
<i>M. messanensis</i> Bdn 60-34 × <i>M. macrocarpa</i> Bdn 61-97	Obs.	99	28	22	1	158	11	319
	%	31.1	8.8	6.9	0.3	49.5	3.4	100.0

B: Bridge, F: Fragment, Ld: Laggard, M. N.: Micronucleus.

Table 3 に示したごとく、両組合せともそれぞれ 33.7% および 31.1% の細胞が正常と見られたが、他は 1B, 1B + F, 2B, F 或は Ld, および小核形成等の異常が認められた。この場合 F および Ld は 1 個から数個までの変異があった。

考 察

Melilotus 属に含まれる種は $2n=16$ の 2 倍体で存在し、*Micromelilotus* 亜属に属する種間の細胞学的関係については緒言で述べたごとく今日まで若干の報告がある。

本実験に供試した *M. messanensis* × *M. macrocarpa* F_1 に於ては、Metaphase 1 で $7_{II}+2_I$ がやや高頻度で出現する。これは恐らく特定の II 価染色体が早期離反し易いことに起因するものと考えられ、*Micromelilotus* 亜属の他の種間たとえば *M. segetalis* を一方の親とする *M. messanensis*^{4,13)} および *M. macrocarpa*⁷⁾ との 2 種間雑種 F_1 に観察された IV 価の形成はないものと考えられる。したがって、染色体の極く微細な構造差については不明であるが両種間には相互転座による構造差は存在しないと考えられる。

Anaphase に出現する種々の異常すなわち、染色分体橋および断片、遅滞染色体の出現等が本組合せの種間雑種 F_1 の高度の花粉不稔に結果することは明らかである。とくに Anaphase 1 で観察される染色分体橋と断片は偏動原体逆位で説明されるが、しかしながら、染色分体橋と断片の出現から直ちに偏動原体逆位であると結論することは出来ないとするいくつかの報告がある^{1,2,3,9,10,11,14,15)}。すなわち、恐らくは自然発生的な染色分体又は半染色分体の切断と再結合に加えてキアズマの介在により染色分体橋と断片が出現することが立証的に明らかにされている。したがって、本種間雑種の Anaphase 1 および Anaphase 2 に観察された染色分体橋と断片は偏動原体逆位によるのか他の要因によって起こるかを、本実験の結果から結論することは困難と考えられる。

Melilotus 属の染色体は比較的小さく、また各染色体に特定の標識も見当たらないので、詳細な細胞学的検討を行うことは必ずしも容易ではない。しかし、Pachytene 分析が部分的に可能であり逆位の接合型を確認すること、もし偏動原体逆位であれば出現する断片の大きさがキアズマの位置に関係なく一定であること、および Anaphase 1 と Anaphase 2 に 4 つの接合型が出現するがその出現頻度が一致することになる。以上の 3 点を中心に、本組合せの種間雑種については勿論、従来偏動

原体逆位と報告した他の種間雑種についても検討する必要があると考える。

摘 要

Melilotus 属は *Eumelilotus* と *Micromelilotus* の 2 亜属に分類され、前者には 9 種後者には 11 種が含まれる。後者の *Micromelilotus* 亜属に分類されている *M. messanensis* × *M. macrocarpa* の種間雑種 F_1 が得られ、これについて細胞学的な検討を行った。その結果を要約すると次のごとくである。

1. F_1 の花粉稔性は得られた 2 組合せの種間雑種 F_1 についてそれぞれ 13.4% および 26.7% で高度の不稔を呈した。

2. PMC の減数分裂の Diakinesis および Metaphase 1 で 8_{II} と $7_{II}+2_I$ の接合型が観察された。2_I の出現は特定の II 価染色体の早期離反によるものと考えられた。

3. Anaphase 1 および Anaphase 2 に於て、染色分体橋と断片、遅滞染色体の出現、7-9 の分離、小核の形成等の異常が観察された。出現した染色分体橋と断片は、本実験の結果から偏動原体逆位に由来するか或は他の要因によるかを明らかにすることは出来なかった。しかしながら、これら Anaphase に出現する異常が本種間雑種の高不稔と密接に関連すると考えられた。

引用文献

1. BRANDHAM, P. E.: Inversion heterozygosity and sub-chromatid exchange in *Agave stricta*, *Chromosoma* (Berl.), **26**: 270-286. 1969
2. HAGA, T.: Meiosis in *Paris*. II. Spontaneous breakage and fusion of chromosomes, *Cytologia*, **18**: 50-66. 1953
3. JONES, G. H.: Further correlations between chiasmata and U-type exchange in rye meiosis, *Chromosoma* (Berl.), **26**: 105-118. 1969
4. 喜多富美治: *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究. 第 II 報 種間雑種 *Melilotus segetalis* × *M. messanensis* の細胞学的研究, 北大農場報告, **12**: 74-82. 1964
5. KITA, F.: Studies on the genus *Melilotus* (sweetclover) with special reference to interrelationships among species from a cytological point of view, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **54**: 23-122. 1965
6. 喜多富美治・新関 稔: *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究. 第 III 報 種間雑種 *Meli-*

lotus sulcata × *M. macrocarpa* の細胞学的研究,
北大農場報告, 13: 1-7. 1965

7. 喜多富美治・新関 稔: *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究. 第 IV 報 種間雑種 *Melilotus segetalis* × *M. macrocarpa* の細胞学的研究, 北大農場報告, 14: 21-26. 1966
8. 喜多富美治・新関 稔: *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究. 第 V 報 種間雑種 *Melilotus sulcata* × *M. infesta* の細胞学的研究, 北大農場報告, 14: 27-31. 1966
9. LEWIS, K. R. and B. JOHN: The meiotic consequences of spontaneous chromosome breakage, *Chromosoma* (Berl.), 18: 287-304. 1966
10. MATSUURA, H.: Chromosome studies on *Trillium kamschaticum* Pall. and its allies. XIX. Chromatid breakage and reunion at chiasmata, *Cytologia*, 16: 48-57. 1950
11. NEWMAN, L. J.: Bridge and fragment aberrations in *Podophyllum peltatum*, *Genetics*, 53: 55-63. 1966
12. SANO, Y. and F. KITA: Cytological studies of several interspecific F₁ hybrids in the subgenus *Eumelilotus*, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, 58: 225-246. 1975
13. SHASTRY, S. V. S., W. K. SMITH and D. C. COOPER: Chromosome differentiation in several species of *Melilotus*, *Amer. J. Bot.*, 47: 613-621. 1960
14. STUTZ, H. C.: Genetically controlled chromosome breakage as an isolation barrier in the origin and maintenance of *Secale ancestrale*, *Can. J. Gene. Cytol.*, 18: 105-109. 1976
15. WALTERS, M. S.: Spontaneous breakage and reunion of meiotic chromosome in the hybrid *Bromus tritici* × *B. naritimus*, *Genetics*, 35: 11-37. 1950

Summary

The interspecific F₁ hybrids, *Melilotus messanensis* PI 231233 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 and *M. messanensis* Bdn 60-34 × *M. macrocarpa* Bdn 61-97 were newly obtained by means of the ordinal hand pollination only in the former cross combination and following embryo culture in the latter cross combination. The basic medium used for embryo culture was a modified medium of WHITE (1963) in such a way of the substitution 18.6 mg/l of Na₂-EDTA and 13.9 mg/l of FeSO₄·7H₂O for 2.5 mg/l of Fe₂(SO₄)₃, and 30 g/l of sucrose and 1000 mg/l of east extract were added to the basic medium.

The cytological observations of the meiosis of the both parents and the interspecific F₁ hybrids were carried out. The results obtained are summarized as follows:

1. Both parental species (2n=16) used for interspecific crosses showed high pollen fertilities, more than 95%, and meiosis of their microspore mother cells were completely normal. Pollen fertilities of the F₁ hybrids were low, 13.4% and 26.7% respectively. At diakinesis and first metaphase of the F₁ hybrids, chromosome pairing was almost normal.

2. Various abnormal chromosome behaviors were observed at first and second anaphases, such as dicentric bridges, acentric fragments, lagging chromosomes, micronuclei, and unequal disjunctions. These anomalies might be attributed to the heterozygosity for paracentric inversions, or other cytological disturbances such as spontaneous chromatid breakage and reunion or some genic disharmony. It was, however, not clear in detail what a factor or factors caused the abnormal chromosome configurations at first and second anaphases at the present study.