



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間差異に関する遺伝学的研究
Author(s)	哈, 森; Ha, Sen
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 18(2), 67-107
Issue Date	1993-03-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12148
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(2)_p67-107.pdf



Melilotus 属の種間差異に関する遺伝学的研究*

哈 森

(北海道大学農学部植物育種学講座)

(平成4年8月31日受理)

Genetical Studies on Interspecific Differentiation in the Genus *Melilotus*

Sen HA

(Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目 次

I 緒 論	67
1. 研究史および研究目的	67
II <i>Eumelilotus</i> 亜属の9種間の細胞学的関係	68
1. 緒言	68
2. 材料および方法	69
3. 結果	70
4. 考察	72
III 転座染色体の同定と F ₂ 集団における転座染色 体と昆虫訪花に関する遺伝子との関係	74
A. Gバンド分染法による転座染色体の同定	74
1. 緒言	74
2. 材料および方法	75
3. 結果	75
4. 考察	77
B. F ₂ 集団における転座染色体と昆虫訪花に関す る遺伝子との関係	80
1. 緒言	80
2. 材料および方法	80
3. 結果	81
4. 考察	84
IV アイソザイムと種子タンパク質における種間の 遺伝的差異	84
1. 緒言	84
2. 材料および方法	84
3. 結果	85
4. 考察	98
V 総合討論	99
摘 要	100

謝 辞	102
引用文献	102
Summary	105

I 緒 論

1. 研究史および研究目的

マメ科牧草のスイートクローバを含む *Melilotus* 属は *Medicago* 属および *Trigonella* 属と近縁で、2 亜属 (*Eumelilotus* と *Micromelilotus*) 19 種からなる¹⁾ *Melilotus* 属におけるスイートクローバとして最も重要な栽培種は *Eumelilotus* 亜属の *M. alba* と *M. officinalis* である。この2種は地中海沿岸に起源し、現在ではユーラシア大陸から新大陸、オーストラリアまで広く栽培されている^{2,3,4)} スイートクローバは適応性が広く、砂質土壌、乾燥地域によく生育し、乾物収量も高いため、今世紀初頭から、牧草・緑肥作物・蜜源作物等として広く経済的に利用されてきた。しかしながら、2年生で茎が太く粗剛になりやすく、また苦味物質であるクマリンを含み家畜の嗜好性を低下させるため、牧草としての利用にあたっては低クマリン品種の育成が早くから試みられてきた。低クマリン品種育成に関しては、野生種である *M. dentata* の系統中にクマリンをほとんど含有しないものが見出され^{5,6)} *M. dentata* の低クマリン遺伝子を導入するために、*M. alba* および *M. officinalis* と *M. dentata* 間の種間交雑が多くの研究者によって試みられた。しかし、*M. alba* × *M. dentata* の交雑種子は得られるが、F₁ は強度のクロロシスを示し、子葉展開後まもなく枯死した。

* 本報は北海道大学大学院農学研究科審査学位論文の一部である。

Smith^{7,8)}はクロロシスによる雑種致死を克服するため、*M. alba* × *M. dentata* F₁を*M. officinalis*に接ぎ木して初めてF₁を育成した。さらに、このF₁に*M. alba*を戻し交雑して、その後代より低クマリン含量の品種‘Denta’を育成した。その後、この品種を基に‘Cumino’および‘Acumar’の低クマリン品種がカナダおよびドイツでそれぞれ育成された³⁾。一方、*M. officinalis*でも低クマリン品種を育成するために、*M. alba*の低クマリン品種からの遺伝子導入が試みられた。しかし、Kirk⁹⁾が指摘したように、*M. officinalis*と*M. alba*との種間雑種F₁は蜜蜂による自然交雑で11400分の1の低頻度でしか交雑種子が得られず、両種間の雑種を得ることは極めて困難であった。このような実際育種場面での必要性を背景に、*Eumelilotus* 亜属の種間関係に関する研究が進展した。Greenshields¹⁰⁾は*M. officinalis*と*M. alba*2種間で発芽可能なF₁種子が得られないのは雑種胚の早期退化が原因であることを明らかにし、これに基づき、Webster¹¹⁾は低クマリン含量の*M. alba*系統と*M. officinalis*との種間雑種F₁を胚培養で育成し、*M. officinalis*に*M. dentata*の持つ低クマリン遺伝子を導入することに成功した。

一方、*Eumelilotus* 亜属の種間雑種に関する細胞遺伝学的研究については、多数の研究報告^{11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23)}があり、*Eumelilotus* 亜属各種の染色体数は2n=16で一致しているものの相互転座の有無について見解を異にした。Sano and Kita²⁴⁾は一連の細胞遺伝学的研究に基づき、*Eumelilotus* 亜属の9種のうち、*M. altissima*を除く8種間に相互転座のあることを検証し、相互転座に関して3群に分類した。すなわち、*M. alba*と*M. officinalis*、*M. hirsuta*、*M. polonica*および*M. suaveolens*4種(*officinalis*群)との間に1個の相互転座が、また、*M. alba*と*M. dentata*、*M. taurica*および*M. wolgica*3種(*dentata*群)との間にも同様に1個の相互転座が存在する。しかしながら、これら2個の相互転座が同一起源か否かは、*officinalis*群と*dentata*群との間の種間雑種F₁を得ることができない^{10,17,19,25,26)}ため、不明であった。そこで、Maekawa et al.^{27)**}は(*M. alba* × *officinalis*群)

F₁ × *dentata*群の三系交雑を行って、*M. alba*と*officinalis*群との間の相互転座と、*M. alba*と*dentata*群との間の相互転座は同一起源であることを証明した。一方、*M. altissima*については、他種との交雑F₁が強度のクロロシスを示し、生育初期に枯死する^{10,17,19,25,26)}ため、他の8種との関係は全く不明である。*Eumelilotus* 亜属全9種間の細胞学的関係が明らかになると、*Eumelilotus* 亜属の種形成および系統分化に関する重要な基礎知見が得られると期待される。また、染色体の相互転座が*Eumelilotus* 亜属の種形成に大きな役割を果たしていることはこれまでの一連の研究から明白であるが、しかし、相互転座染色体および転座点に関してはまだ判明されておらず、ただクロロシスをおこす遺伝子が転座点と連鎖することが報告されているにすぎない²⁸⁾。相互転座と種形成の関係について、Sano and Kita²⁹⁾の如く遺伝的变化の面からも検証できれば、より詳細な種形成の様相が明らかになる。さらに、種の分類は従来、形態形質に基づいている³⁰⁾が、佐野・喜多³¹⁾は77種の形態形質を基に数量分類学的手法により*Melilotus*属の分類を試みたが、種内系統間での形態的差異が大きく、種間差を明瞭にすることは出来なかった。一方、遺伝子の一次産物であるタンパク質は直接的間接的に遺伝子の分化を反映するので、種形成あるいは系統分化の過程についても重要な知見を提供する。かかるタンパク質としてはアイソザイム³²⁾と種子タンパク質がある³³⁾。アイソザイム変異は進化的に中立であるということ³⁴⁾が明らかになるにつれ、より保存性の高いものとして種子タンパク質の分析による研究が進展した。特に、牧草では、実際には種子を収獲物の対象としないため、種子タンパク質の保存性は他の作物に比べて良好と推定される。本研究では、染色体の構造差、それに伴う遺伝子の変化、そしてタンパク質変異の3点から*Eumelilotus* 亜属の種間の遺伝的差異を明らかにし、*Eumelilotus* 亜属の種分化の様相を明らかにすることを目的とした。

II *Eumelilotus* 亜属の9種間の細胞学的関係

1. 緒 言

Eumelilotus 亜属9種間には交雑不和合性やF₁植物のクロロシスによる雑種致死や雑種弱勢などの遺伝的隔離機構が発達している^{10,17,19,25,26,28,29)}さらに、特定の種間には相互転座がみられ、*M. altis-*

* * 27) も学位論文の一部であるが、重複を避けるため本報から除外してある。

sima を除く 8 種では相互転座に関して 3 群に分けられた^{19,24,26)} その後, Maekawa *et al.*²⁷⁾ によって *M. alba*, *officinalis* 群と *dentata* 群を用いた三系交雑が行われ, *M. alba* と *officinalis* 群との間の相互転座と, *M. alba* と *dentata* 群との間の相互転座は同一起源であることが明らかとなった。一方, *M. altissima* については他種との種間雑種 F_1 が強度のクロロシスを示し, 育成初期に枯死して開花までに生育した例がない。^{10,17,19,25,26)} そのため, *M. altissima* と他の 8 種間の細胞学的関係は全く不明である。*Eumelilotus* 亜属の種形成や有用遺伝子の利用といった育種面からも全 9 種間で作成した雑種について細胞遺伝学的特性を解明することが重要である。ところで, タバコでは, 種間雑種がクロロシスを生じ枯死してしまう場合に, 組織培養に使う基本培地上で発芽させ高温条件下で生育させるとクロロシスが回復して開花した報告がある^{35,36)} そこで, 本研究では, *Eumelilotus* 亜属全 9 種の細胞学的関係を明らかにするために, *M. altissima* と他の 8 種との間の交雑で得られた F_1 雑種の試験管内栽培を試みると同時に, *officinalis* 群と *dentata* 群との間の交雑で得られた F_1 雑種の試験管内栽培も試みた。

2. 材料および方法

本実験の供試材料は表 1 に示す *Eumelilotus* 亜属の 9 種 51 系統である。

実験は 1989 年に北海道大学農学部附属農場および温室 (札幌市, 北緯 43 度) で行われた。

交雑親の栽培方法は次の通りである。4 月下旬ごろ, 各供試系統の種子を硬実打破のため種皮に傷をつけ, 濾紙を敷いたシャーレに置床し, 25℃の恒温器で催芽させた後, 育苗箱に播種した。第 2 本葉展開後, 直径 15 cm の素焼鉢に個体植えし, 蜜蜂などの昆虫による他花受粉を防ぐために寒冷紗で覆ったハウス内で栽培した。圃場より採取した土 (pH 6.5–7.5) を使用したが, 各系統とも根粒菌の着性は良好で, 正常に生育した。*Eumelilotus* 亜属には 2 年生の系統が多いため, 各系統ともハウス内を 24 時間日長にして開花を促進させた。

交雑については, まず, 真空ポンプで葯および花粉を吸引して除雄を行い, ただちに花粉親から小さな薬匙に花粉を取り, 除雄した花の柱頭に擦り付けて受粉を行った。

Table 1. List of strains of *Eumelilotus* species used in the experiment

Species	Strain
<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾ (Australia) ²⁾
	Bdn 633 ¹⁾ (Australia)
	Hubam ¹⁾ (USA) ³⁾
	F. C. 40076 ¹⁾ (USA) ³⁾
	Arctic (Canada) ³⁾
	Bdn 660 (Sweden)
	Bdn 647 (England)
	Bdn 664 (Germany)
	Bdn 928 (Leningrad)
	Cumino (Canada) ³⁾
	Denta (USA) ³⁾
	Spanish (Spain)
	Common White (Canada)
	Evergreen (USA)
	Brandon Dwarf (Canada) ³⁾
<i>M. officinalis</i>	P 197-1 ¹⁾
	P 198-1 ¹⁾
	P 200-1 ¹⁾
	P 200-2 ¹⁾
	P. I. 178985 (Turkey)
	P. I. 314385 (USSR)
	Bdn 62-1 (Hungary)
	Bdn 62-13 (Iran)
	F. C. 40001 (Caucasus) ³⁾
	F. C. 40032 (Madrid)
<i>M. altissima</i>	Bdn 58-259 (Hungary)
	Bdn 58-262
	Bdn 636 (Germany)
	894
	58-4
<i>M. hirsuta</i>	P. I. 314096 (USSR)
<i>M. polonica</i>	P. I. 314386 (USSR)
<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾
	var. annual ¹⁾
	Golden Annual ¹⁾ ³⁾
	Redfield Yellow ³⁾
	Bdn 60-59
<i>M. dentata</i>	Biennial
	P 783-2 ¹⁾ (USA)
	P 784-3 ¹⁾ (USA)
	Bdn 58-190 (USSR)
	Biennial
<i>M. taurica</i>	70
	134-1(×)
	Bdn 58-253 (Czecko)
<i>M. wolgica</i>	P. I. 314094 (USSR)
	Bdn 59-50 (Hungary)
	Bdn 60-58
	Bdn 58-254
	Bdn 1022 (Copenhagen)
	P. I. 314095 (USSR)

¹⁾ Annual.

²⁾ The origin of strain is given in parentheses.

³⁾ Cultivated variety.

種間雑種 F_1 の種子を得るために、*M. altissima* と他の8種との間で正逆交雑を行った。同様に、*officinalis* 群と *dentata* 群との間でも交雑を行い、 F_1 植物の試験管内栽培に供した。

F_1 植物の試験管内栽培にあたっては、まず種皮に傷をつけた F_1 種子を70%エタノールに数秒間浸漬した後、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素5.0%以上）の15%水溶液に10分間浸漬して滅菌した。滅菌処理後、 F_1 種子を改変 White 培地 'YE-3'¹³⁷⁾ に置床した。この 'YE-3' 培地は胚培養用の培地であるが、White³⁸⁾ の $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 2.5 mg/l を Na_2EDTA 18.6 mg/l と $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mg/l へ換えたものを基本培地とし、それにショ糖 30 g/l、イースト抽出物 (YE) 1 g/l を加え、pH=5.5 に調節した。試験管内でクロロシスがやや回復し、本葉や根が比較的良好に伸張したものについてはパーミキュライトを入れた鉢に移植し、気温 25℃、湿度 90%、24 時間照明下のグロースチャンパー内に置いた。栽培期間中、平均週3回ハイポネックス水溶性肥料を施した。減数分裂の観察は Kita¹⁷⁾ の方法にしたがい、適期の花蕾を塩基性酢酸第2鉄を飽和

した酢酸液数滴を混入した Farmer 液（99%エタノール3：氷酢酸1）に入れ、2~4℃で24時間固定した。固定後、解剖顕微鏡下で葯を取り出し、アセトカーミンで染色し、通常の押しつぶし法によって花粉母細胞を検鏡した。

花粉稔性は、アセトカーミン液で十分に染色し、形態的に異常のない花粉を稔、その他の花粉を不稔として、1000粒以上を検鏡して花粉稔性を算出した。

3. 結 果

最初に、*M. altissima* と他の8種との間の F_1 を得るために多数の正逆交雑を行った。その結果、これまでに報告されていない新たな交雑組合せも成功した（表2）。*M. altissima* と他の8種の間ではすべて交雑が成功したものの、交雑和合性には大きな種間差異がみられた。また、*M. hirsuta* × *M. altissima* と *M. taurica* × *M. altissima* の交雑を除いて、*M. altissima* を雌性親にした場合の方が雄性親にした場合より高い交雑成功率が認められた。正逆交雑間で交雑成功率に顕著な差を生じた場合もあった。

Table 2. Summarized data of interspecific crosses between *M. altissima* and eight species of the subgenus *Eumelilotus*

Cross combination	No. of flowers pollinated (A)	No. of F_1 hybrids obtained (B)	Cross-fertility (A/B×100) (%)	Color ¹⁾ of F_1 hybrids	No. of F_1 plants reached to flowering stage
<i>M. altissima</i> × <i>M. alba</i>	736	77	10.5	1-4	0
× <i>M. officinalis</i>	482	4	0.8 ²⁾	1-4	0
× <i>M. hirsuta</i>	78	11	14.1	1-3	0
× <i>M. polonica</i>	58	18	31.0	2-4	0
× <i>M. suaveolens</i>	315	14	4.4 ²⁾	1-2	0
× <i>M. dentata</i>	216	4	1.9 ²⁾	2-3	0
× <i>M. taurica</i>	235	21	8.9 ²⁾	1-5	2
× <i>M. wolgica</i>	276	17	6.2	1-5	0
<i>M. alba</i> × <i>M. altissima</i>	1086	78	7.2	2-5	3
<i>M. officinalis</i> ×	476	0	0.0	—	—
<i>M. hirsuta</i> ×	80	40	50.0	2-3	0
<i>M. polonica</i> ×	70	0	0.0	—	—
<i>M. suaveolens</i> ×	394	3	0.8 ²⁾	2-4	0
<i>M. dentata</i> ×	240	1	0.4 ²⁾	1	0
<i>M. taurica</i> ×	193	28	14.5 ²⁾	1-4	0
<i>M. wolgica</i> ×	206	10	4.9	—	0
Total	5141	326	6.3	1-5	5

¹⁾ Color of seedling by *in vitro* culture was classified into 1-very pale~6-normal green.

²⁾ Cross combinations in which F_1 hybrids were newly obtained.

すなわち, *M. altissima* × *M. polonica* では 31.0% の交雑成功率があったが, その逆交雑では F_1 種子が得られなかった。また, *M. hirsuta* × *M. altissima* の場合には 50% の高い交雑成功率であったものの, その逆交雑では 14.1% とかなり低くなった。これらの F_1 個体すべて無菌的に試験管内で育成した。クロロシスを生じて試験管内で枯死するものも多かったが, 比較的回復して馴化の段階で枯死するものもあった。しかし, *M. altissima* × *M. taurica* と *M. alba* × *M. altissima* の F_1 ではクロロシスが比較的回復し, 馴化も順調で, 前者の交雑から 2 個体, 後者の交雑から 3 個体が開花に至った。これらの種間雑種 F_1 はやはり葉がかなり黄色でクロロシスを示し, 両親 (*M. altissima* は黄花, *M.*

alba と *M. taurica* は白花) の中間の花色を示した。交雑に用いた *M. altissima* 4 系統中, Bdn 636 と 894 の 2 系統だけが開花に至った F_1 の親系統に含まれていた (表 4)。

以上の実験から, 強度のクロロシスを示す F_1 を試験管内条件で育苗すると, その一部分の個体はクロロシスがある程度回復して開花へ至ることが示された。従来, *officinalis* 群と *dentata* 群を交雑した F_1 の中には強度のクロロシスにより致死する場合が知られている^{10,17,19,25,16)} ため, 両群間交雑 F_1 についても試験管内での栽培を試みた。まず, 表 3 に *officinalis* 群と *dentata* 群との正逆交雑の結果を示したが, 交雑種子の得られた組合せは *M. hirsuta* × *M. wolgica*, *M. suaveolens* × *M. dentata*

Table 3. Summarized data of interspecific crosses between *officinalis* group and *dentata* group of the subgenus *Eumelilotus*

Cross combination	No. of flowers pollinated (A)	No. of F_1 hybrids obtained (B)	Cross-fertility (A/B×100) (%)	Color ¹⁾ of F_1 hybrids	No. of F_1 plants reached to flowering stage
<i>M. hirsuta</i> × <i>M. dentata</i>	64	0	0	—	—
× <i>M. taurica</i>	60	0	0	—	—
× <i>M. wolgica</i>	82	15	18.3	2	0
<i>M. officinalis</i> × <i>M. dentata</i>	49	0	0	—	—
× <i>M. taurica</i>	31	0	0	—	—
× <i>M. wolgica</i>	45	0	0	—	—
<i>M. polonica</i> × <i>M. dentata</i>	30	0	0	—	—
× <i>M. taurica</i>	32	0	0	—	—
× <i>M. wolgica</i>	42	0	0	—	—
<i>M. suaveolens</i> × <i>M. dentata</i>	85	6	7.1	1—2	0
× <i>M. taurica</i>	63	0	0	—	—
× <i>M. wolgica</i>	64	16	25.0 ²⁾	4—5	2
<i>M. dentata</i> × <i>M. officinalis</i>	41	0	0	—	—
× <i>M. hirsuta</i>	37	0	0	—	—
× <i>M. polonica</i>	19	0	0	—	—
× <i>M. suaveolens</i>	31	0	0	—	—
<i>M. taurica</i> × <i>M. officinalis</i>	23	0	0	—	—
× <i>M. hirsuta</i>	19	0	0	—	—
× <i>M. polonica</i>	17	0	0	—	—
× <i>M. suaveolens</i>	24	0	0	—	—
<i>M. wolgica</i> × <i>M. officinalis</i>	27	0	0	—	—
× <i>M. hirsuta</i>	26	0	0	—	—
× <i>M. polonica</i>	11	0	0	—	—
× <i>M. suaveolens</i>	25	0	0	—	—
Total	947	37	3.9	1—5	2

¹⁾ Color of seedlings by *in vitro* culture was classified into 1-very pale~6-normal green.

²⁾ Cross combinations in which F_1 hybrids were newly obtained.

および *M. suaveolens* × *M. wolgica* の3交雑であり、最後の交雑は今回初めて成功したものである。これらの F_1 はいずれも通常の栽培条件では1~2程度のクロロシスを示し完全致死であった。しかし、試験管内で栽培したところ、*M. hirsuta* × *M. wolgica* と *M. suaveolens* × *M. dentata* F_1 はいずれも通常栽培条件と同じクロロシスにより枯死したが、*M. suaveolens* × *M. wolgica* の F_1 ではクロロシスが4~5程度まで回復し、2個体は開花に至った(表3)。なお、 F_1 の花色は両親の中間であった。

試験管内栽培により開花までに達した F_1 の花粉稔性を調査し、減数分裂の観察を行った。花粉稔性については、*M. alba* × *M. altissima* の F_1 は約50%であったが、*M. altissima* × *M. taurica* および *M. suaveolens* × *M. wolgica* ではいずれも30%以下

であった(表4)。減数分裂では、*M. alba* × *M. altissima* の F_1 では Diskinesis と MI において、1 IV + 6 II および 1 III + 6 II + 1 I の接合型が高頻度に出現した(表5)。また、Pachytene において十字型の造形像を観察した(図1)。これらのことから、*M. alba* × *M. altissima* の F_1 は1個の相互転座ヘテロ接合体であると推定された。一方、*M. altissima* × *M. taurica* および *M. suaveolens* × *M. wolgica* の F_1 では、減数分裂の全時期を通じてほとんど異常がみられなかった(表5)。これらのことから、*M. altissima* と *M. taurica* および *M. suaveolens* と *M. wolgica* の間にそれぞれ染色体の構造差は存在しないと思われる。

4. 考 察

Eumelilotus 亜属ではいくつかの種間で、交雑不和合性やクロロシスなどの生殖的隔離が発達しており、^{25,26,29)} 開花まで生育できる種間雑種 F_1 植物を得ることが困難な場合がある。そのため、 F_1 の減数分裂の染色体対合観察により全9種間の細胞学的関係を調べるのが困難であった。*M. altissima* については交雑種子は出来てもいずれも強度のクロロシスを示し幼苗の段階で枯死したため、Maekawa *et al.*²⁷⁾ が相互転座の同一起源の証明のために行った三系交雑の手法を応用することが不可能であった。ところで、丸橋ら³⁵⁾ と須田・丸橋³⁶⁾ はタバ

Table 4. Pollen fertility of viable F_1 hybrids

Cross combination	Pollen fertility (%)
<i>M. alba</i> Bdn 631 × <i>M. altissima</i> Bdn 636	46.5
Bdn 664 × 894	51.0
Spanish × 894	41.6
<i>M. altissima</i> Bdn 636 × <i>M. taurica</i> Bdn 58-253	22.1
894 × Bdn 58-253	28.9
<i>M. suaveolens</i> G. Annual × <i>M. wolgica</i> P. I. 314095	18.1

Table 5. Chromosomal configurations at diakinesis and metaphase-I and distributions in anaphase-I and II in the F_1 hybrids *M. alba* × *M. altissima*, *M. altissima* × *M. taurica* and *M. suaveolens* × *M. wolgica*

Cross combination	stage	Frequency of PMCs with						Total
		1IV+6II	1III+6II+1I	8II	7II+2I	Normal	Abnormal	
<i>M. alba</i> × <i>M. altissima</i>	Diak. ¹⁾	56	45	31	13			145
	Met-I	26	81	20	10			137
	An-I					96	6	102
	An-II					112	7	119
<i>M. altissima</i> × <i>M. taurica</i>	Diak.			82	7			89
	Met-I			150	23			173
	An-I					130	6	136
	An-II					110	4	114
<i>M. suaveolens</i> × <i>M. wolgica</i>	Diak.			51	2			53
	Met-I			88	6			94
	An-I					94	2	96
	An-II					102	3	105

¹⁾ Diak.=Diakinesis, Met-I=Metaphase-I, An-I=Anaphase-I, An-II=Anaphase-II.

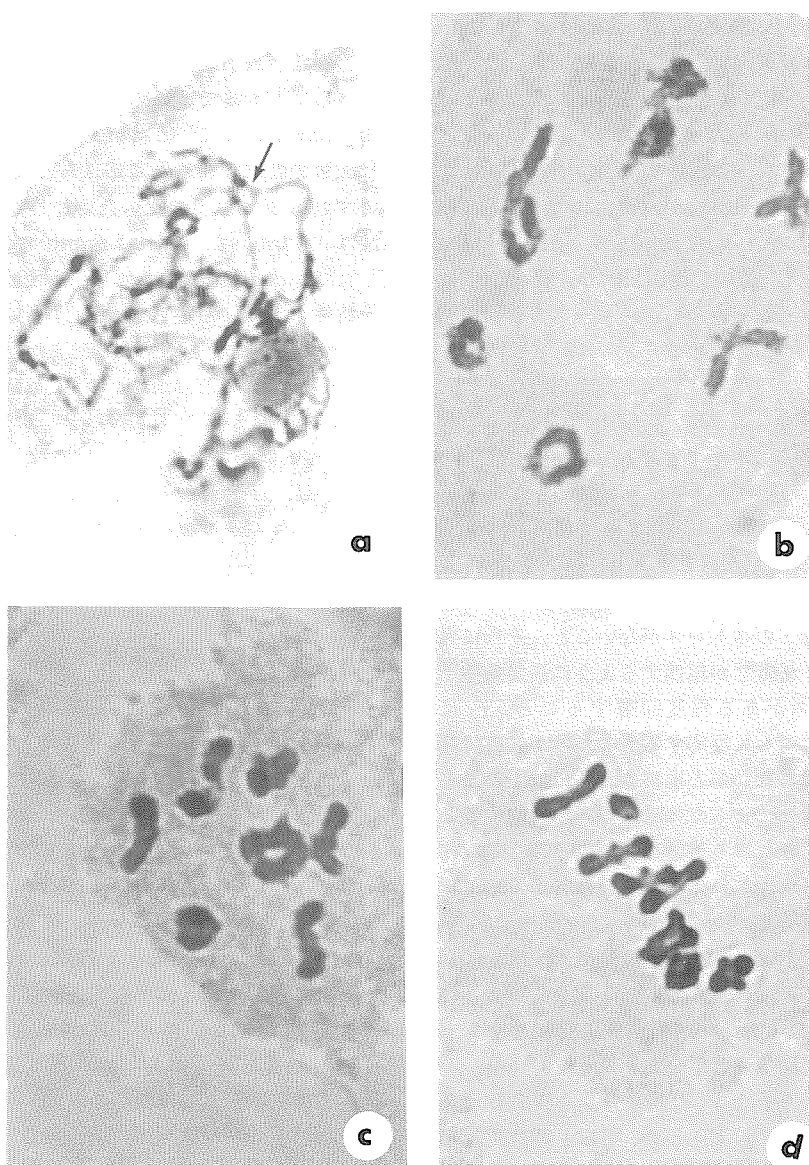


Fig. 1. Chromosome configuration at different stages in meiosis of F_1 hybrid, *M. alba* Bdn 664 $\times$ *M. altissima* 894. ($\times 2000$)

- a. Pachytene with a cross-shaped configuration (arrow).
- b. Diakinesis with 11V + 6II.
- c. M I with 11V + 6II.
- d. M I with 11III + 6II + 1I.

この種間雑種がクロロシスを生じ枯死してしまう場合に、組織培養に使う基本培地上で発芽させ高温条件下で生育させるとクロロシスから回復して開花することを明らかにした。そこで、*M. altissima* と他種との交雑で得られた F_1 種子を試験管内で発

芽、生育させたところ、多くはやはり強度のクロロシスを示して枯死したが、一部はクロロシスから徐々に回復し旺盛な生育を示した。開花させるためにグロースチャンパー内の鉢に移植したところ、ほとんどは馴化過程で枯死したが、*M. alba* $\times$

M. altissima の F_1 3 個体と *M. altissima* × *M. taurica* の F_1 2 個体は順調に生育して開花に至った。開花に成功した交雑組合せをみると *M. altissima* の系統としては供試した4系統のうち Bdn 636 と 894 が含まれていて、これら2系統は他の2系統より互いに近縁である可能性が示唆された。本実験の成功から、*M. altissima* の Bdn 636 と 894 系統は、*Eumelilotus* 亜属の種間交雑に橋渡し系統として役立つことが期待され、さらにクロロシスを示す種間雑種 F_1 の雑種致死を克服するには試験管内で生育することが1つの重要な方策と考えられた。

この手法の有効なことは、従来クロロシスのため雑種植物を得ることができなかった *officinalis* 群と *dentata* 群との交雑 F_1 (*M. suaveolens* × *M. wolgica*) の開花に成功したことによって明らかであった。無菌条件下で培養時にクロロシスを示す F_1 の生育が回復してくるのは、1つには無菌条件であるために病気などのストレスがないこと、それに丸橋ら³⁵⁾と須田・丸橋³⁶⁾が指摘するように高温条件下でクロロシスがある程度回復すること、 F_1 によっては高温に対して反応するものだけが無事開花まで至ったのではないかと推察される。以上のことから、交雑組合せによっては試験管内で栽培することでクロロシスによる雑種致死を克服できることが明らかとなった。これは、たとえば胚が早期退化する場合でも胚培養さえ成功すれば、たとえ F_1 がクロロシスを示したとしても高温条件で保護することにより F_1 植物体を開花まで育成できることにつながるわけで、*Melilotus* 属の種間交雑を行う上での重要な知見を提供している。

この手法で得られた F_1 の減数分裂を観察したところ、*M. altissima* と *M. alba* の間に1個の相互転座があり、*M. altissima* と *M. taurica* との間の染色体対合は正常であった。このことは、*M. altissima* が *M. alba* を除く7種と同じ染色体構造を有していることを意味している。また、*M. suaveolens* と *M. wolgica* の F_1 も染色体対合が正常であったことは三系交雑による *officinalis* 群と *dentata* 群との間に染色体の構造差がないことの間接的な証明²⁷⁾を検証した。結局、*Eumelilotus* 亜属全9種間の細胞学的関係は、*M. alba* だけが1個の相互転座で他の8種と異なっていた。多くの経済品種を含む *M. alba* だけが1個の相互転座を有していることは、この相互転座が *M. alba* の種形成に重要な役割を果

たしてきたものと考えられ、染色体の転座に付随して重要な遺伝子変化が生じたものと推定される。

さらに本実験ではじめて育成した *M. altissima* × *M. taurica* および *M. suaveolens* × *M. wolgica* F_1 は減数分裂において異常がみられなかったものの、いずれも30%以下の低い花粉稔性を示し、種子稔性は0%であった。これは Smith²⁵⁾ が接ぎ木で育成した *M. alba* × *M. dentata* F_1 が相互転座による花粉稔性の低下よりさらに低い20%以下の花粉稔性と0%の種子稔性を示すこと、また佐野²⁸⁾の育成した *M. dentata* × *M. taurica* の F_1 も減数分裂に異常がみられなかったものの、やはり花粉稔性が2~40%と低かったことと符合する。本実験で育成した *M. altissima* × *M. taurica* および *M. suaveolens* × *M. wolgica* の F_1 の花粉稔性の低下は染色体の構造差によるのではなく、雑種不稔性によるものと考えられる。

III 転座染色体の同定と F_2 集団における転座染色体と昆虫訪花に関する遺伝子との関係

前章では *Eumelilotus* 亜属9種のうち、*M. alba* だけが相互転座染色体を有していることが明らかになった。かかる染色体の構造変化が種形成に重要な役割を演じていることは Grant³⁹⁾の指摘するところであるが、多くの場合複数の染色体について構造変化を生じていることが多い。1個の相互転座が生じたのみで種形成に大きく貢献したとは考えにくく、むしろ相互転座に伴う遺伝的变化によることが大きいのではないかと推察される。Sano and Kita²⁹⁾によると転座染色体上に生殖的隔離機構に係わる遺伝子があれば、その転座が種形成に強く影響することが予想される。そこで、*M. alba* 種の形成機構を明らかにするにあたっては、転座染色体に含まれる遺伝子を検討する必要がある。第1節ではまずギムザ染色によるG分染法を用いて転座点と転座染色体を同定し、第2節では転座染色体と昆虫訪花に関する遺伝子との関係を調べた。

A. Gバンド分染法による転座染色体の同定

1. 緒言

染色体の構造差を明確にするためには、染色体の構造の検出に役立つ各種の分染法が有効である。植物ではこれまで明確なGバンドを検出できないためCバンド⁴⁰⁾あるいはNバンド^{41,42)}に基づく同定

法がよく用いられている。しかし、Cバンドは構成的異質染色質 (Constitutive heterochromatin) を示す⁴³⁾ のでバンド数が少なく、またNバンドは仁形成部位を特異的に染め分ける⁴⁴⁾ 特徴を有し、詳細な染色体の構造差を特定するにはCバンドやNバンドの適用に限られる。近年、植物の染色体でも動物と同様にGバンドを検出できるようになった^{45,46,47)} もし転座染色体を特定の標識で判別できれば、転座染色体上の遺伝子マッピングに役立てることが可能である。そこで、本節では *Eumelilotus* 亜属種の染色体でのGバンドの検出法を考究し、*M. alba* と他の8種との間にある相互転座染色体の同定を試みた。

2. 材料および方法

本実験の供試材料は、表6に示した *M. alba* と *M. suaveolens* の交雑の F_1 、 F_2 とその両親系統である。

体細胞染色体の観察にあたっては、25℃の恒温器内で発芽させた種子の根端を用いた。染色体標本の作成は以下の手順にしたがった。

- 1) 前処理：0.01% コルヒチン溶液による50分間処理 (室温)
- 2) 固定：酢酸メタノール固定液 (3メタノール：1酢酸) による2時間固定 (室温)
- 3) 洗浄：蒸留水で洗浄
- 4) 酵素処理：Nishibayashi and Kaeriyama⁴⁸⁾

Table 6. List of F_1 hybrids and F_2 population of the cross *M. alba* × *M. suaveolens* used in the experiment

F ₁ hybrids		
<i>M. alba</i> Bdn 633	×	<i>M. suaveolens</i> Golden Annual
Hubam	×	Redfield Yellow
	×	var. annual
	×	Golden Annual
	×	Redfield Yellow
Arctic	×	var. annual
	×	Golden Annual
Evergreen	×	Golden Annual
	×	Redfield Yellow
Brandon Dwarf	×	Redfield Yellow
F ₂ population		
<i>M. alba</i> Brandon Dwarf	×	<i>M. suaveolens</i> Redfield Yellow

の酵素液 (4% セルラーゼ・オノヅカ RS, 1% ペクトリアーゼ・Y-23, 7.5 mM KCl, 7.5 mM EDTA, pH=4.0) での25分間処理 (37℃)

- 5) 標本作成：酵素処理終了後、根端周囲の酵素液を吸い取り、3回水洗後固定液を滴下して押しつぶし標本を作り、24時間自然乾燥させる。

G分染については、0.01% SDS 溶液 (2×SSC で溶かす) で10~30秒間処理後、5%ギムザ溶液 (1/15 M リン酸緩衝液で希釈, pH=6.8) で2~3分間染色し、水洗後、風乾した。

減数分裂の観察は第2章の方法にしたがった。

3. 結 果

図2のAとBは *M. alba* Arctic の中期と前中期の染色体で、CとDは *M. suaveolens* var. annual の中期と前中期である。いずれも中期では染色体の全体が濃染しバンドが検出できなかったものの、前中期では染色体の末端部が解離して染色が不鮮明であったが、動原体付近には多数のバンドが認められた。そこで、中期の染色体像から染色体長を求め、前中期の染色体像と合わせて核型を決めた。いずれも最短の第8染色体は付随体染色体であり、*suaveolens* 種の付随体が *alba* 種よりかなり大きかった。また、長腕の長さは *alba* 種が *suaveolens* 種より長かった (表7, 8)。他の7本の染色体はいずれも中部動原体的であり (表7, 8)、染色体の識別はほとんど不可能であった。次に F_1 の体細胞染色体のGバンドを調べた。両親の場合と同様に中

Table 7. Length and arm ratio of somatic chromosomes in *M. alba* Arctic at metaphase

Chromosome	Length (μm)	Arm ratio	Centromeric position ¹⁾
1	6.5=3.7+2.8	1.3	m
2	6.4=3.3+3.1	1.1	m
3	6.1=3.6+2.5	1.4	m
4	6.0=3.4+2.6	1.3	m
5	5.8=3.2+2.6	1.2	m
6	5.6=2.8+2.8	1.0	m
7	5.4=2.8+2.6	1.1	m
8	5.0=3.0+1.5+0.5 (sat.)	2.0	sm

¹⁾ m: median, sm: submedian.

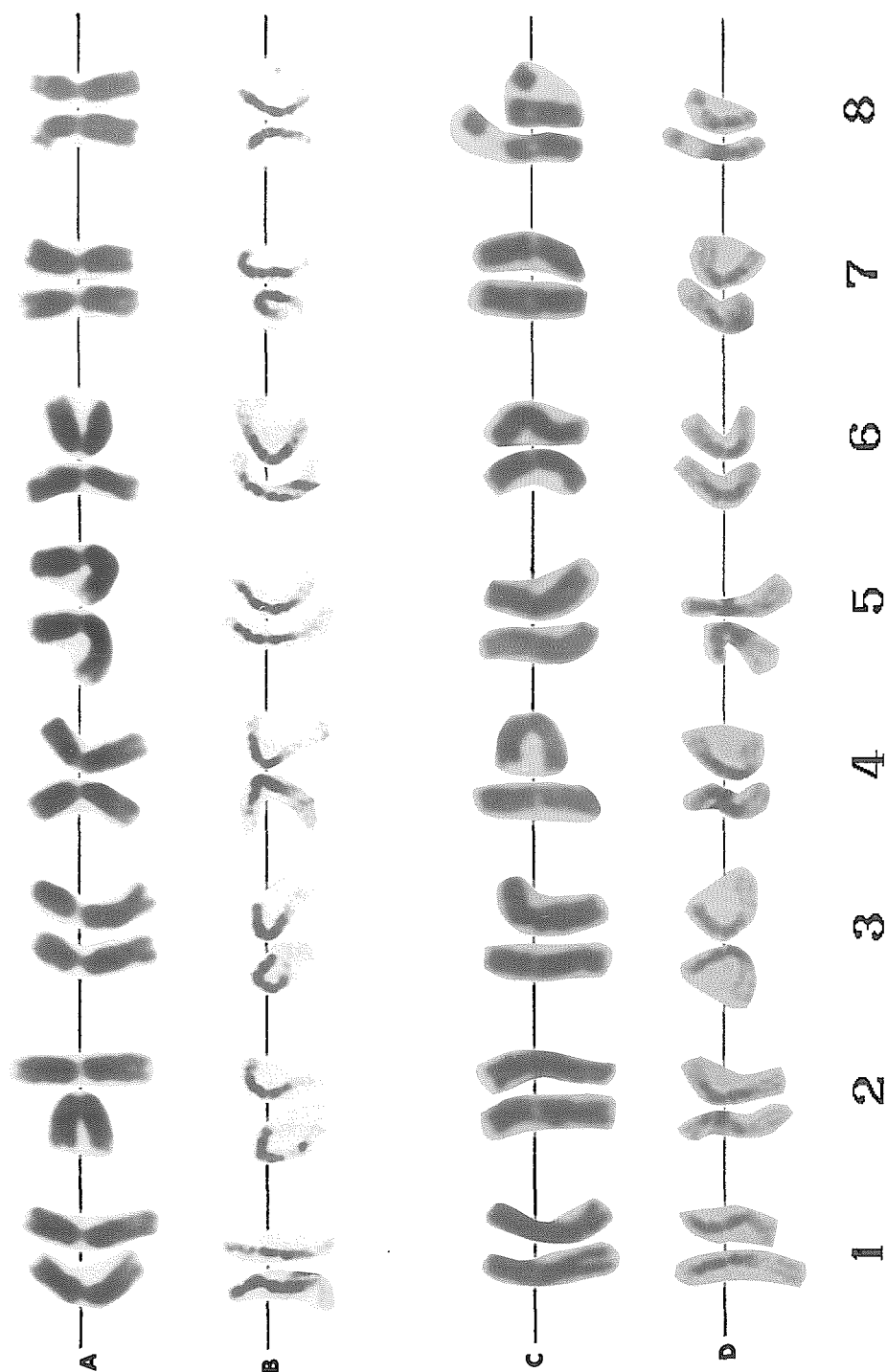


Fig. 2. Somatic chromosomes of *M. alba* and *M. suaveolens*.

A. Somatic chromosomes of *M. alba* Arctic at metaphase. ($\times 3600$)

B. Somatic G-banded chromosomes of *M. alba* Arctic at prometaphase. ($\times 2700$)

C. Somatic chromosomes of *M. suaveolens* var. annual at metaphase. ($\times 3600$)

D. Somatic G-banded chromosomes of *M. suaveolens* var. annual at prometaphase. ($\times 2700$)

Table 8. Length and arm ratio of somatic chromosomes of *M. suaveolens* var. annual at metaphase

Chromosome	Length (μm)	Arm ratio	Centromeric position ¹⁾
1	6.4=3.8+2.6	1.5	m
2	6.3=3.8+2.5	1.5	m
3	6.0=3.6+2.4	1.5	m
4	5.9=3.2+2.7	1.2	m
5	5.8=3.2+2.6	1.2	m
6	5.6=3.1+2.5	1.2	m
7	5.3=2.7+2.6	1.0	m
8	4.9=2.5+1.4+1.0 (sat.)	1.8	sm

¹⁾ m: median, sm: submedian.

Table 9. Relations between SAT-chromosomes and reciprocal translocations in the F_2 *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

SAT-chromosome ¹⁾	Reciprocal translocation		
	Homo. ²⁾	Hetero.	Total
AA	27	0	27
AS	0	29	29
SS	13	0	13

¹⁾ SAT-chromosome types; A and S were derived from *M. alba* and *M. suaveolens*, respectively.

²⁾ The plants possessing non-translocated chromosomes are included in homozygote.

期と前中期の染色体を長さの順に並べ、前中期の分染像に基づいてイディオグラムを作成した(図3)。その結果、両親の核型と同様に F_1 でも付随体染色体の長腕の端部側に顕著な差異がみられ、そのほかに m と n 染色体の長腕の端部側にも差異が見出された。このことは付随体染色体が転座を起こしていることを示すもので、 F_1 の減数分裂の Pachytene で4価染色体が仁に付着していたことでも裏付けられた(図4)。さらに、*M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow の F_2 の各個体について付随体染色体と転座の関係を調べたところ、付随体染色体をホモに有する個体は例外なく転座ホモであり、*alba* 型と *suaveolens* 型の付随体染色体を有する個体はすべて転座ヘテロであった(表9)。この事実も付随体染色体が相互転座に関係していることを示している。また、図3で示すように F_1 の染

色体には明らかな構造差がみられることから、m と n 染色体も相互転座に関連すると考えられる。付随体染色体については付随体の大きさや長腕の長さから o が *alba* 由来、p が *suaveolens* 由来であることは明白で、o を *alba* の第8染色体、p を *suaveolens* の第8染色体とした。n 染色体は、付随体染色体を除いて最も短く、また形態的にも *alba* の第7染色体に類似していたので、n を *M. alba* の第7染色体とした。一方、m 染色体は、長さが9番目で *M. suaveolens* の第5染色体に類似していたため m を *suaveolens* の第5染色体とした。その結果、*suaveolens* 型の第5染色体と第8染色体の長腕で真正染色質と異質染色質の境界に切断を生じ、第5染色体と第8染色体の間で転座が起こり *suaveolens* 型の第5染色体が *alba* 型の第7染色体に、*suaveolens* 型の第8染色体が *alba* 型の第8染色体になったと推定した。

4. 考 察

染色体の構造差を明らかにするためにはギムザ染色によるG分染法が有効で、植物の場合も近年になって種は限られるもののGバンドが安定して検出できることが明らかになった。^{45,46,47)} 本実験ではSDS処理によるG分染を行ったが、中期の染色体ではGreilhuber⁴⁸⁾が指摘するように、染色体の凝縮が強くバンドは検出されなかった。しかし、染色体の凝縮前の前中期では、SDS処理で安定的なGバンドが得られた。ただし、*Eumelilotus* 亜属種の場合前中期の染色体では、染色体の末端部が解離して不鮮明になった。これが人為的なものか否かを明らかにするため、*Astragalus adsurgens* の染色体を同じ手法で分染したところ、染色体の末端まで明確なバンドが得られた。このことから、*Eumelilotus* 亜属種の染色体の末端が解離して不鮮明になるのは、処理法によるのではなく種特有な性質であると考えられる。両親とその F_1 の体細胞染色体では中期と前中期の染色体像から核型を決めた。両親では付随体染色体の長腕の端部に明らかな差が認められたが、他の染色体では明瞭でなかった。これは、濃染したバンドが動原体付近に多く、端部の染色が不鮮明なためであった。そこで、 F_1 の染色体のG分染から図3のように核型を同定し、*suaveolens* 型の第5染色体と付随体染色体の長腕の端部で切断が起こり、相互転座を生じたことを証明した。このこと

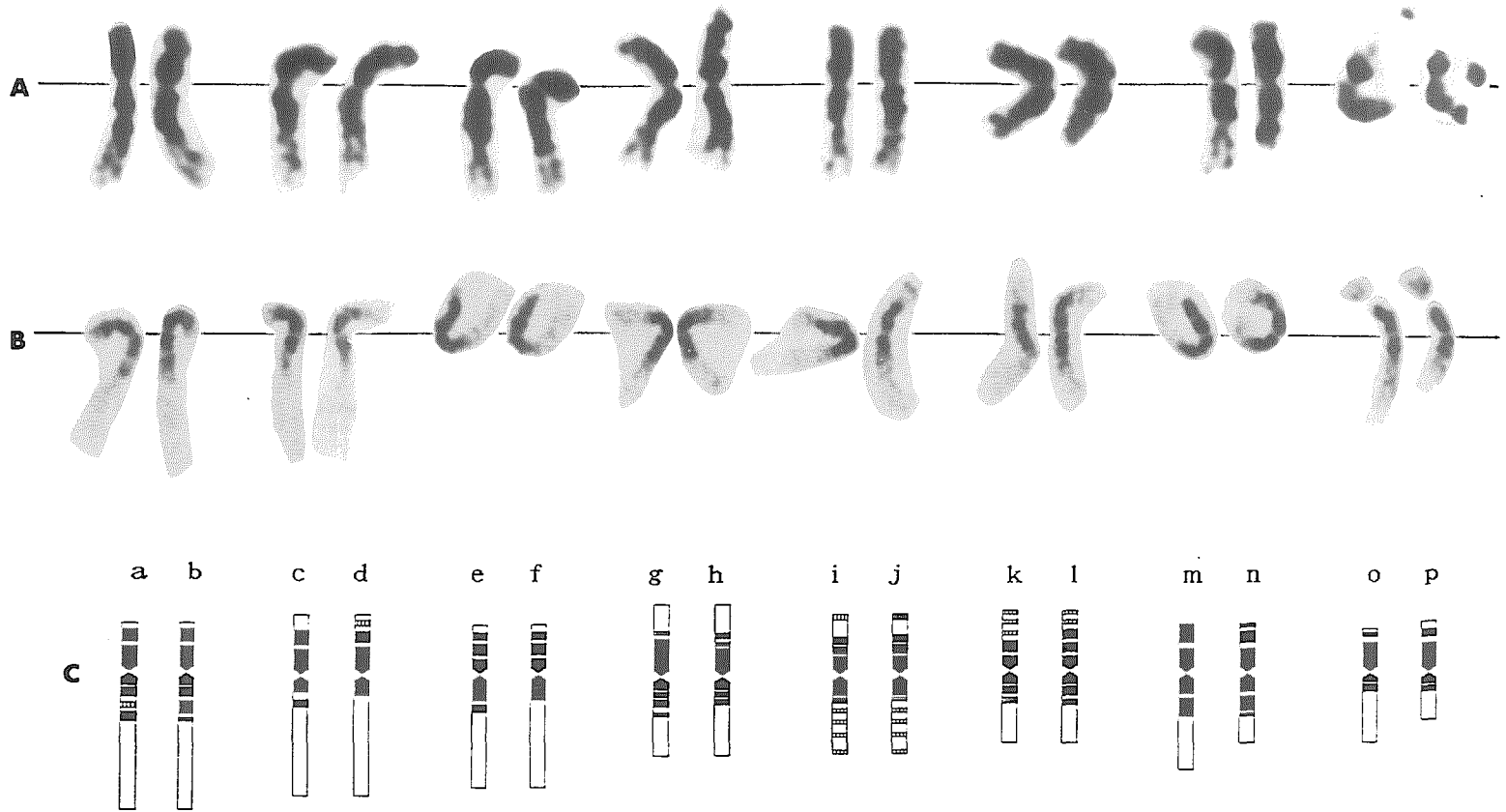


Fig. 3. Somatic chromosomes of F_1 (*M. alba* Arctic $\times$ *M. suaveolens* var. annual).
 A. Somatic chromosomes (not well banded) at early metaphase. ($\times 3600$)
 B. Somatic chromosomes (well G-banded) at prometaphase. ($\times 2700$)
 C. Schematic representation of B.

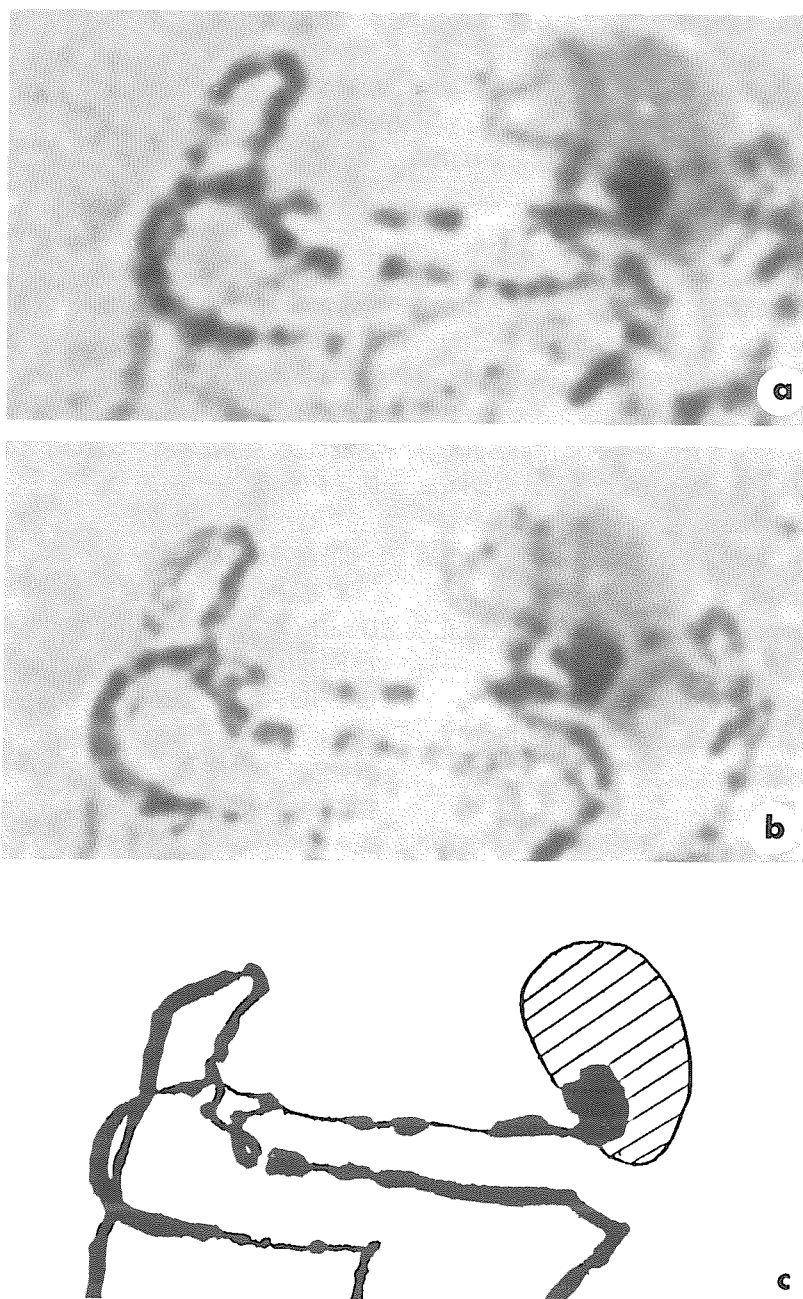


Fig. 4. Cross-shaped R. T. chromosomes of F_1 (*M. alba* $\times$ *M. suaveolens*) at Pachytene. ($\times 4000$)
 a. Cross-shaped configuration attached to the nucleolus.
 b. The same as a) in different focus.
 c. Illustration of b).

は、 F_1 の Pachytene で十字像を形成する染色体が仁に付着していること (図4) と *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow の F_2 個体における付随体染色体の接合型と相互転座のホモ型やヘテロ型の関係が一致することからも裏付けられた。Schlarbaum *et al.*⁵⁰⁾ や喜多⁵¹⁾ は *Melilotus* 属種の付随体染色体に着目し、その形態変化から *Melilotus* 属の進化経路を類推したが、本実験の結果から *M. alba* の種形成にもやはり付随体染色体の相互転座が係わっていることが明らかとなった。付随体染色体の構造変異が種形成に大きな影響をもたらした例としてはアブラギクとリュウノウギク⁵²⁾ やネギ属⁵³⁾ がある。また、人為的に作出された *Petunia parodii* と *P. parviflora* の体細胞雑種は、*parodii* 種の付随体染色体と *parviflora* 種の染色体の間で転座を生じ、1本の付随体染色体を消失していた⁵⁴⁾ これらのことから、付随体染色体には重要な遺伝子が座乗していて、付随体染色体の構造変化が種形成に貢献した可能性が考えられる。

B. F_2 集団における転座染色体と昆虫訪花に関する遺伝子との関係

1. 緒 言

種の分化には大きく2つの要素が関与している。1つは、遺伝子レベルの分化によるもので、もう1つは染色体レベルでの分化である。後者の分化はさらに2つの面に分けられる。1つは染色体の構造差による場合、他の1つは染色体数の変化である。染色体数の変化が種形成をもたらした例としては、*Bromus* 属⁵⁵⁾ ワタ属⁵⁶⁾ コムギ属⁵⁷⁾ などが知られており、染色体の構造差が種形成に関係したものとしてはネギ属⁵³⁾ *Clarkia* 属⁵⁸⁾ などがある。

Melilotus 属 *Eumelilotus* 亜属には9種があつて¹⁾ 2種の栽培種 (*M. officinalis*, *M. alba*) のうち

M. alba は他の種との間で1個の相互転座により異なることが第II章で明らかとなった。相互転座と遺伝的变化について Roberts⁵⁹⁾ は、トウモロコシの自殖系統 C 20 の X 線照射した花粉を C 20 へ受粉して作出した相互転座系統を用いて各種の農業形質における遺伝的差異を見出した。さらに、相互転座をヘテロに有する個体が生存に有利であるという事実もある^{26,60,61,62)}

本実験では、*M. alba* において転座と関連して如何なる遺伝子レベルにおける変化を伴っているかを明らかにするため、交雑組み合わせ *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow²⁹⁾ を選んで、昆虫訪花に関する遺伝子と転座染色体との関係を調べた。

2. 材料および方法

本実験に供試した F_2 集団は、*M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow を交雑した F_1 の自殖種子に由来する。供試種子は、種皮に傷をつけ、25℃の恒温器内で催芽させた。約1cm伸長した種子根を染色体観察に用いた。種子根の先端を切断した後そのまま播種床に播種し、約3週間後に鉢に移植した。供試材料は、いずれも寒冷紗を張ったビニールハウス内で栽培した。また、24時間日長処理をして播種当年での開花を促進させた。調査形質を表10に示した。付随体染色体は、ギムザ染色法にしたがって顕微鏡下で1系統当たり約10細胞を観察した。図5に示すように、*suaveolens* 種では *alba* 種に比較して大きな付随体と短い染色体を特徴としており、*suaveolens* 種と *alba* 種の付随体染色体は明瞭に区別でき、それぞれ S 型と A 型とした。相互転座のホモ型とヘテロ型の区別は、Pachytene でヘテロ型に特有の対合型により判定した。ネクターガイド (Nectar guide) の判定には、

Table 10. Type of SAT-chromosome and reciprocal translocation and nectar guide of parents and the F_1 hybrids in the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

Character	<i>M. alba</i> Brandon Dwarf	F_1	<i>M. suaveolens</i> Redfield Yellow
Type of SAT-chromosome	AA (<i>M. alba</i> type)	AS	SS (<i>M. suaveolens</i> type)
Type of reciprocal translocation	Homo.	Hetero.	Homo.
Nectar guide	Light gray	Dark gray	White with dark



Fig. 5. Chromosome configuration at metaphase in F_1 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow. ($\times 3600$)
 A(*M. alba* type); SAT-chromosome derived from
M. alba Brandon Dwarf.
 S(*M. suaveolens* type); SAT-chromosome derived from
M. suaveolens Redfield Yellow.

ブラックガイド (ナショナル FL 20 S・BLB, 20 W) を照射したときの花の写真を用いた。⁶³⁾ このネクターガイドはハニーガイド (Honey guide) と呼ばれ、蜜蜂の認識できる花色を示す。⁶⁴⁾ 図 6 に示した写真のように、*alba* 種は花全体が灰色となり、*suaveolens* 種は、花全体が白くなり、中心の竜骨弁の後側が黒くなる。一方、 F_1 は花全体が *alba* 種より濃灰色を示し、*suaveolens* 種の黒く見える部分が同様に濃く見える。

組換え価の算出は Hanson and Kramer⁶⁵⁾ の最尤法によった。

3. 結 果

M. alba Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens*

Redfield Yellow の F_2 集団における各個体の染色体数を調べたところ、 $2n=17$, 18 の異数体が 115 個体中 17 個体 (14.8%) あった。この中、ほとんどは $2n=17$ で $2n=18$ は 1 個体のみであった。2 倍体について相互転座に関する分離を調べたところ、表 11 に示すように転座ホモ型が 40 個体、転座ヘテロが 29 個体となり、期待比 1:1 に適合した。転座点とネクターガイド遺伝子との関係を調べるため、表 12 にネクターガイド遺伝子の分離を示した。*alba* 型: F_1 型: *suaveolens* 型 = 1:2:1 に適合する分離が得られたものの、*alba* 型と F_1 型の間は連続的に変異するため両者の明確な判定がむずかしかった (図 6)。そこで、*alba* 型と F_1 型をまとめたところ、*alba* 型を優性とする単遺伝子分離に適合

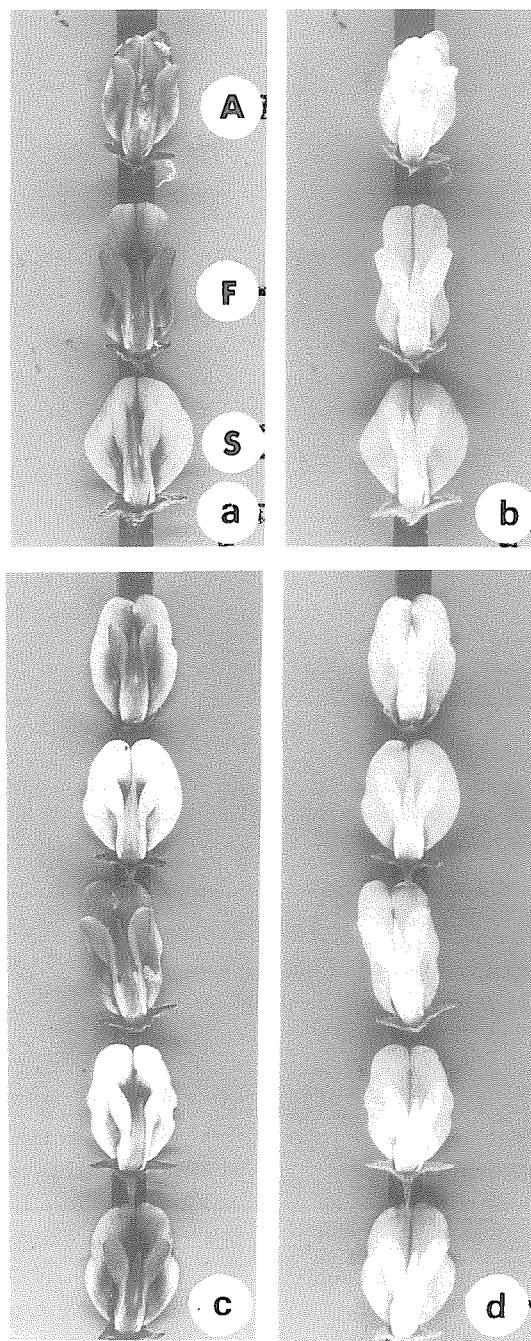


Fig. 6. Nectar guide of *M. alba* Brandon Dwarf(A), *M. suaveolens* Redfield Yellow(S), F₁(F) and F₂ plants of the cross *M. alba* Brandon Dwarf × *M. suaveolens* Redfield Yellow.
 a. Flowers of A, F and S under ultraviolet light.
 b. Monochromatic flowers of A, F and S under day light.
 c. Flowers of F₂ plants under ultraviolet light.
 d. Monochromatic flowers of F₂ plants under day light.

Table 11. Segregation of homozygotes and heterozygotes for reciprocal translocation in F_2 plants of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

Reciprocal translocation		Total	Goodness of fit(1:1)	
Homozygote ¹⁾	Heterozygote		χ^2	P
40	29	69	1.75	0.10-0.25

¹⁾ The plants possessing non-translocated chromosomes are included in homozygote.

Table 12. Segregations of *Ncg* gene in F_2 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

F_2 segregation				Total	Goodness of fit(1:2:1)	
<i>Ncg</i>	<i>Ncg</i>	<i>Ncg</i> +	++		χ^2	P
13	40	12	65	3.49	0.10-0.25	
	53 ¹⁾	12	65	1.48 ²⁾	0.10-0.25	

¹⁾ Plants with *Ncg* *Ncg* and *Ncg* + are pooled.

²⁾ Chi-square value for 3:1.

した。このネクターガイドに關与する遺伝子に *Ncg* (*Nectar guide*) なる記号を与えた。さらに、*Ncg* と転座点との複合分離を調べたところ(表 13)、*Ncg* と転座点との間には $9.5 \pm 5.3\%$ なる組換価で連鎖關係が見出された。

前節で付随体染色体が転座を含むことが明らかになったが、図 5 に示した F_1 の体細胞分裂中期の染色体像からは明瞭に *alba* 型と *suaveolens* 型の付随体染色体を識別できた。そこで、 F_2 で 2 倍体正常個体について付随体染色体型と転座ホモ型、ヘテロ型との關係を調べた。表 14 に示すように、*alba* 型の付随体染色体 (A 型) をホモに有する個体と *suaveolens* 型 (S 型) をホモに有する個体は、例外無く転座ホモか正常型で花粉稔性はいずれも正常であった。一方、付随体染色体をヘテロに持つ個体 (AS) はすべて転座ヘテロ型で花粉稔性が半不稔

Table 14. Relations between SAT-chromosomes and reciprocal translocation or pollen fertility(%) in F_2 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

SAT-chromosome type ¹⁾	Reciprocal translocation		Pollen fertility (%)	Difference
	Homo. ²⁾	Hetero.		
AA	27	0	88.7 ± 12.64	34.8***)
AS	0	29	53.9 ± 8.37	34.8**
SS	13	0	85.2 ± 10.41	

¹⁾ SAT-chromosome types; A and S are derived from *M. alba* and *M. suaveolens*, respectively.

²⁾ The plants possessing non-translocated chromosomes are included in homozygote.

³⁾ **; Significant at the 1% level.

Table 15. Combined segregations of SAT-chromosomes and *Ncg* gene in F_2 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

Genotype	SAT-chromosome ¹⁾			Total	Homogeneity	
	AA	AS	SS		χ^2	P
<i>Ncg</i> <i>Ncg</i> , <i>Ncg</i> +	25	27	1	53	46.17(2)	<0.01
++	1	1	10	12		

¹⁾ SAT-chromosome types; A and S were derived from *M. alba* and *M. suaveolens*, respectively.

²⁾ Degree of freedom is given in parentheses.

(54%)を示した。また、付随体染色体の分離については $AA:AS:SS=1:2:1$ と期待されたが、表 14 からは AA 型を過剰に生じることが明らかとなった。

付随体染色体型と *Ncg* との間の複合分離をみると (表 15)、均一性検定で有意となり付随体染色体と *Ncg* 遺伝子が互いに關連のあることが示唆された。

Table 13. Combined segregation of reciprocal translocation (R. T.) and *Ncg* gene in F_2 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow

R. T. homozygote		R. T. heterozygote		Total	Goodness of fit		
<i>Ncg</i> (<i>Ncg</i> , +)	++	<i>Ncg</i> (<i>Ncg</i> , +)	++		R. C. V.	χ^2	P
26	11	27	1	65		7.67 ¹⁾	0.05-0.10
(19.04)	(13.46)	(29.71)	(2.79)		9.5 ± 5.3	4.39	0.10-0.25

¹⁾ For 3:1:3:1.

4. 考 察

相互転座が種の分化に関係する場合、遺伝子レベルでの変化や連鎖関係の変化も付随する³⁹⁾ Sano and Kita²⁸⁾ は *M. alba* と *M. suaveolens* の交雑を用いて交雑 F₂ で生じる雑種弱勢と雑種クロロシスが共に転座点と連鎖することを見出した。Grant³⁹⁾ は転座染色体には種間の形態的差異の決定に影響する遺伝子が座乗する場合を示している。

相互転座染色体に座乗する遺伝子を検索するにあたり、昆虫の訪花と重要な関係があるネクターガイド^{64,66)} と付随体染色体の関係を調べた。これまでネクターガイドの遺伝については全く報告例がなく、本実験での1個の優性遺伝子(*Ncg*)の関与していることが明らかとなった。*Ncg* 遺伝子と相互転座の複合分離を調べると、*Ncg* 遺伝子は転座点と9.5%で強く連鎖していて(表13)、*Ncg* 座が *suaveolens* 種の付随体染色体の長腕部にあると推定された。ネクターガイド遺伝子の有無は昆虫の訪花頻度に関係し、他殖か自殖かの相対頻度にも重要な影響を与えられ⁶⁷⁾ きわめて重要な遺伝子が転座染色体に座乗していることが明らかとなった。

IV アイソザイムと種子タンパク質における種間の遺伝的差異

1. 結 言

遺伝子産物であるタンパク質の変異を調べることで、種の進化過程を類推できる。高等植物においてもアイソザイム³²⁾ や種子タンパク質³³⁾ について系統発生あるいは種の類縁関係を解析した例が多くなった。特にアイソザイムや種子タンパク質は形質発現が安定していることや、多型性を検出しやすいといった利点により、よく利用される。そこで、本実験ではゲル電気泳動法による緑葉のアイソザイム分析及び SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による種子タンパク質の分析を行い、*Eumelilotus* 亜属における種間の遺伝的差異を検討し、系統分化への適用を試みた。

2. 材料および方法

供試材料は表1に示した9種51系統であり、これらはいずれも自殖系統である。

アイソザイムの電気泳動は主に Endo⁶⁸⁾ の方法を参考にした。粗酵素液の抽出にあたっては、成熟葉100 mg から200 mg をリン酸緩衝液⁶⁹⁾ 40 μ l へ入れ乳鉢ですりつぶした後、その浸出液を2 mm×10 mm の濾紙(東洋 No. 3)片に吸着させた。この濾紙片を水平式デンブングル電気泳動装置上のゲルに挿入し、泳動を行った。デンブングルは3%のショ糖と13%のデンブンを含むゲル(ショ糖と加水分解した100%バレイショデンブンをゲル緩衝液(表16)に加え、湯煎加熱してゲル化し、24時間固化したもの)を用いた。泳動は、5℃の低温恒温器内で25 mA の定電流下で1時間行った後、濾紙片を取り除き、さらに5時間行った。泳動後、カッターボード上でゲルを1.0~1.5 mm にスライスし、染色した。アイソザイムの種類は、イソクエン酸脱水素酵素(IDH)、フォスフォグルコースイソメラーゼ(PGI)、フォスフォグルコムターゼ(PGM)、ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)、パーオキシダーゼ(POX)およびエステラーゼ(EST)の6酵素である。各酵素の染色方法を表17に示した。

種子タンパク質に関する SDS 電気泳動用試料液の調整は以下に示す方法にしたがった。各系統の完熟種子10粒を冷した乳鉢中で磨砕し、10 mg を秤量して1.5 ml のサンプルチップにサンプル緩衝液(0.0625 M Tris-HCl, 10% Glycerol, 5% BME, 23% SDS, pH 6.8 に調整)100 μ l と共に入れ、懸濁液とした。10分間放置した後、10,000 g×30分間、4℃で遠心分離を行った。つぎに上澄液5 μ l を0.5 ml のサンプルチップにいれ、緩衝液10 μ l と0.01% BPB 2.5 μ l を加えて5分間煮沸し試料液とした。試料の調整はいずれも4℃で行った。

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は Phast System (ファルマシア社, スウェーデン)にしたがって Phast Gel (Gradi-

Table 16. Electrophoretic buffer systems used in the experiment

Buffer system	Electrode buffer		Gel buffer		Assayed enzyme
	Component	pH	Component	pH	
Tris-Histidine	0.4 M Tris	7.5	0.009 M Tris	7.5	IDH PGM PGI
	0.124 M Citric acid H ₂ O		0.015 M Histidine		LAP EST POX

Table 17. Staining solutions and buffer used for isozyme assays

Enzyme	Staining recipes
Isocitrate dehydrogenase (IDH)	50 ml/ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 20 mg DL-Isocitric acid, trisodium salt 10 mg NADP ¹⁾ 5 mg MTT ²⁾ 1 mg PMS ³⁾ 50 mg MgCl ₂ 10 mg Na ₂ CO ₃
Phosphoglucose isomerase (PGI)	50 ml/ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 20 mg F-6-P 20 mg NAD ⁴⁾ 5 mg MTT 1 mg PMS 50 mg MgCl ₂ 20 units Glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD)
Phosphoglucomutase (PGM)	50 ml/ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 20 mg α -D-Glucose-1-phosphate disodium salt 20 mg NAD 5 mg MTT 1 mg PMS 50 mg MgCl ₂ 20 units Glucose-6-phosphate dehydrogenase (NAD)
Leucine aminopeptidase (LAP)	50 ml/ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 30 mg L-Leucine- β -naphthylamide HCl dissolved in 5 ml/ dimethyl formide 50 mg Fast Garnet GBC
Peroxidase (POX)	50 ml/ 0.2 M Acetate buffer (pH 5.0) 50 mg 3-Amino-9-ethylcarbazole dissolved in 5 ml/ dimethyl formide 0.25 ml/ 3% H ₂ O ₂
Esterase (EST)	50 ml/ 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0) 20 mg 2-Naphthyl acetate dissolved in 100% aceton 50 mg Fast Blue RR 1 ml/ N propanol

¹⁾ NADP: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.

²⁾ MTT: Tetrazolium thiazolyl blue.

³⁾ PMS: Phenazine methosulfate.

⁴⁾ NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide.

ent 10-15) を用い、泳動後の染色は濃度クーマシーブルーで行った。染色後、空気乾燥したゲルをコンピュータ画像処理システム (ASPECT, MITANI 社製) でバンドの位置を算出して模式化した。また、分子量マーカーとしては、標準タンパク質 (BIO-RAD 社製) 5 μ l をサンプルチップ (0.5 ml) に入れ、緩衝液 7.0 μ l、0.01%BPB 2.5 μ l および蒸留水 9.0 μ l を加えて 5 分間煮沸して用いた。

3. 結 果

1) アイソザイム変異

Eumelilotus 亜属 9 種 51 系統について、6 種のアイソザイム (LAP, PGM, EST, IDH, PGI, POX) において変異が見出され、LAP で 4 本、BGM と PGI で 5 本、EST, IDH と POX で 3 本のバンドが検出された。アイソザイムバンドは原点を基準に陽極側 (POX は陰極側) へ向かって 1, 2,

Table 18. Leucine aminopeptidase (LAP) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Leucine aminopeptidase (LAP)			
			1	2	3	4
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	1	0	0	0
2		var. annual ¹⁾	1	0	0	0
3		G. Annual ¹⁾	1	0	0	0
4		Redfield Yellow	1	0	0	0
5		Bdn 60-59	1	0	0	0
6		Biennial	1	0	0	0
7	<i>M. hirsuta</i>	58-4	0	1	0	0
8		P. I. 314096	0	1	0	0
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	0	0	0	1
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	0	1	0	0
11		P 784-3 ¹⁾	0	0	1	0
12		Bdn 58-190	0	0	1	0
13		Biennial	0	0	1	0
14	<i>M. taurica</i>	70	0	0	1	0
15		134-1(×)	0	0	1	0
16		Bdn 58-253	0	0	1	0
17		P. I. 314094	0	0	1	0
18	<i>M. wolgica</i>	Bdn 59-50	0	1	0	0
19		Bdn 60-58	0	1	0	0
20		Bdn 58-254	0	1	0	0
21		Bdn 1022	0	1	0	0
22		P. I. 314095	0	1	0	0
23	<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾	0	1	0	0
24		Bdn 633 ¹⁾	0	1	0	0
25		Hubam ¹⁾	0	1	0	0
26		F. C. 40076 ¹⁾	0	1	0	0
27		Arctic	0	1	0	0
28		Bdn 660	0	1	0	0
29		Bdn 647	0	1	0	0
30		Bdn 664	0	1	0	0
31		Bdn 928	0	1	0	0
32		Cumino	0	1	0	0
33		Denta	0	1	0	0
34		Spanish	0	0	0	0
35		Common White	0	1	0	0
36		Evergreen	0	1	0	0
37		Brandon Dwarf	0	1	0	0
38	<i>M. officinalis</i>	P 197-1 ¹⁾	0	1	0	0
39		P 198-1 ¹⁾	0	1	0	0
40		P 200-1 ¹⁾	0	1	0	0
41		P 200-2 ¹⁾	0	1	0	0
42		P. I. 178985	0	1	0	0
43		P. I. 314385	0	1	0	0
44		Bdn 62-1	0	0	0	1
45		Bdn 62-13	0	1	0	0
46		F. C. 40001	0	1	0	0
47		F. C. 40032	0	0	0	1
48	<i>M. altissima</i>	Bdn 58-259	0	0	0	1
49		Bdn 58-262	0	0	0	1
50		Bdn 636	0	0	0	1
51		894	0	0	0	1

¹⁾ Annual.

Table 19. Phosphoglucumutase (PGM) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Phosphoglucumutase (PGM)				
			1	2	3	4	5
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	0	1	1	1	0
2		var. annual ¹⁾	0	1	1	1	0
3		G. Annual ¹⁾	0	1	1	1	0
4		Redfield Yellow	0	1	1	1	0
5		Bdn 60-59	0	1	1	1	0
6		Biennial	0	1	1	1	0
7	<i>M. hirsuta</i>	58-4	0	1	1	1	0
8		P. I. 314096	0	1	1	1	0
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	0	1	0	1	1
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	0	1	0	1	0
11		P 784-3 ¹⁾	0	1	1	1	0
12		Bdn 58-190	0	1	1	1	0
13		Biennial	0	1	0	1	1
14	<i>M. taurica</i>	70	0	1	0	1	1
15		134-1(×)	0	1	0	1	1
16		Bdn 58-253	0	1	0	1	1
17		P. I. 314094	0	1	0	1	1
18	<i>M. wolgica</i>	Bdn 59-50	0	1	1	1	0
19		Bdn 60-58	0	1	1	1	0
20		Bdn 58-254	0	1	1	1	0
21		Bdn 1022	0	1	1	1	0
22		P. I. 314095	0	1	1	1	0
23	<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾	0	1	0	1	0
24		Bdn 633 ¹⁾	0	1	1	1	0
25		Hubam ¹⁾	0	0	1	1	0
26		F. C. 40076 ¹⁾	0	0	1	1	0
27		Arctic	0	0	1	1	0
28		Bdn 660	0	1	0	1	0
29		Bdn 647	0	1	0	1	0
30		Bdn 664	0	1	0	1	0
31		Bdn 928	0	1	1	1	0
32		Cumino	0	1	0	1	0
33	<i>M. officinalis</i>	Denta	0	1	1	1	0
34		Spanish	0	1	0	1	0
35		Common White	0	1	0	1	0
36		Evergreen	0	0	1	1	0
37		Brandon Dwarf	0	1	1	0	0
38		P 197-1 ¹⁾	0	1	1	0	0
39		P 198-1 ¹⁾	0	1	0	1	0
40		P 200-1 ¹⁾	0	1	0	0	0
41		P 200-2 ¹⁾	0	1	1	1	0
42		P. I. 178985	0	1	1	0	0
43	<i>M. altissima</i>	P. I. 314385	0	1	1	1	0
44		Bdn 62-1	1	0	1	1	0
45		Bdn 62-13	0	1	1	0	0
46		F. C. 40001	0	1	1	1	0
47		F. C. 40032	1	1	0	0	0
48		Bdn 58-259	0	1	1	1	0
49		Bdn 58-262	0	1	1	1	0
50		Bdn 636	0	1	1	1	0
51		894	0	1	1	1	0

¹⁾ Annual.

Table 20. Esterase (EST) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Esterase (EST)		
			1	2	3
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	0	1	0
2		var. annual ¹⁾	0	1	0
3		G. Annual ¹⁾	0	1	0
4		Redfield Yellow	1	0	0
5		Bdn 60-59	1	0	0
6		Biennial	0	1	0
7	<i>M. hirsuta</i>	58-4	0	1	0
8		P. I. 314096	0	0	1
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	1	0	0
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	0	1	0
11		P 784-3 ¹⁾	0	1	0
12		Bdn 58-190	0	1	0
13		Biennial	0	1	0
14	<i>M. taurica</i>	70	0	1	0
15		134-1(×)	0	1	0
16		Bdn 58-253	0	1	0
17		P. I. 314094	0	1	0
18	<i>M. wolgica</i>	Bdn 59-50	0	1	0
19		Bdn 60-58	0	1	0
20		Bdn 58-254	0	1	0
21		Bdn 1022	0	1	0
22		P. I. 314095	0	1	0
23	<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾	1	0	0
24		Bdn 633 ¹⁾	0	1	0
25		Hubam ¹⁾	0	1	0
26		F. C. 40076 ¹⁾	0	1	0
27		Arctic	1	0	0
28		Bdn 660	0	1	0
29		Bdn 647	0	1	0
30		Bdn 664	0	1	0
31		Bdn 928	0	1	0
32		Cumino	1	0	0
33		Denta	1	0	0
34		Spanish	1	0	0
35		Common White	1	1	0
36		Evergreen	1	0	0
37		Brandon Dwarf	0	1	0
38	<i>M. officinalis</i>	P 197-1 ¹⁾	0	1	0
39		P 198-1 ¹⁾	0	1	0
40		P 200-1 ¹⁾	0	1	0
41		P 200-2 ¹⁾	0	1	0
42		P. I. 178985	0	1	0
43		P. I. 314385	0	1	0
44		Bdn 62-1	0	1	0
45		Bdn 62-13	1	0	0
46		F. C. 40001	0	1	0
47		F. C. 40032	0	1	0
48	<i>M. altissima</i>	Bdn 58-259	1	0	0
49		Bdn 58-262	1	0	0
50		Bdn 636	1	0	0
51		894	1	0	0

¹⁾ Annual.

Table 21. Isocitrate dehydrogenase (IDH) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Isocitrate dehydrogenase (IDH)		
			1	2	3
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	1	1	0
2		var. annual ¹⁾	1	1	0
3		G. Annual ¹⁾	1	1	0
4		Redfield Yellow	1	1	0
5		Bdn 60-59	1	1	0
6		Biennial	1	1	0
7	<i>M. hirsuta</i>	58-4	1	1	0
8		P. I. 314096	0	1	0
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	1	1	0
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	1	1	0
11		p 784-3 ¹⁾	1	1	0
12		Bdn 58-190	1	1	0
13		Biennial	1	1	0
14	<i>M. taurica</i>	70	1	1	0
15		134-1(×)	1	1	0
16		Bdn 58-253	1	1	0
17		P. I. 314094	1	1	0
18	<i>M. wolgica</i>	Bdn 59-50	1	0	1
19		Bdn 60-58	1	0	1
20		Bdn 58-254	1	0	1
21		Bdn 1022	1	0	1
22		P. I. 314095	1	0	1
23	<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾	1	1	0
24		Bdn 633 ¹⁾	1	1	0
25		Hubam ¹⁾	1	0	1
26		F. C. 40076 ¹⁾	1	1	0
27		Arctic	1	1	0
28		Bdn 660	1	1	0
29		Bdn 647	1	1	0
30		Bdn 664	1	1	0
31		Bdn 928	1	1	0
32		Cumino	1	1	0
33		Denta	1	0	1
34		Spanish	1	1	0
35		Common White	1	1	0
36		Evergreen	1	1	0
37		Brandon Dwarf	1	1	0
38	<i>M. officinalis</i>	P 197-1 ¹⁾	1	1	0
39		P 198-1 ¹⁾	1	1	0
40		P 200-1 ¹⁾	1	1	0
41		P 200-2 ¹⁾	1	1	0
42		P. I. 178985	1	1	0
43		P. I. 314385	1	0	1
44		Bdn 62-1	1	1	0
45		Bdn 62-13	1	1	0
46		F. C. 40001	1	1	0
47		F. C. 40032	1	1	0
48	<i>M. altissima</i>	Bdn 58-259	1	1	0
49		Bdn 58-262	1	1	0
50		Bdn 636	1	1	0
51		894	1	1	0

¹⁾ Annual.

Table 22. Phosphoglucose isomerase (PGI) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Phosphoglucose isomerase (PGI)				
			1	2	3	4	5
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	0	0	1	0	0
2		var. annual ¹⁾	0	0	1	0	0
3		G. Annual ¹⁾	0	0	1	0	0
4		Redfield Yellow	0	0	1	0	0
5		Bdn 60-59	0	0	1	0	0
6	<i>M. hirsuta</i>	Biennial	0	0	1	0	0
7		58-4	0	0	1	0	0
8		P. I. 314096	0	0	1	0	0
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	0	0	1	0	0
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	0	1	0	0	0
11		P 784-3 ¹⁾	0	0	1	0	0
12		Bdn 58-190	0	0	1	0	0
13		Biennial	0	0	1	1	0
14	<i>M. taurica</i>	70	0	1	0	0	0
15		134-1(×)	0	1	0	0	0
16		Bdn 58-253	0	1	0	0	0
17		P. I. 314094	0	0	1	0	0
18		Bdn 59-50	0	0	1	0	0
19	<i>M. wolgica</i>	Bdn 60-58	0	0	1	0	0
20		Bdn 58-254	0	0	1	0	0
21		Bdn 1022	0	0	1	0	0
22		P. I. 314095	0	0	1	0	0
23	<i>M. alba</i>	Bdn 631 ¹⁾	0	1	0	0	0
24		Bdn 633 ¹⁾	0	0	1	0	0
25		Hubam ¹⁾	0	0	1	0	0
26		F. C. 40076 ¹⁾	0	0	1	0	0
27		Arctic	0	0	1	0	0
28		Bdn 660	0	0	1	0	0
29		Bdn 647	0	0	1	0	0
30		Bdn 664	0	0	1	0	0
31		Bdn 928	0	0	1	0	0
32		Cumino	1	1	1	0	0
33	<i>M. officinalis</i>	Denta	0	0	1	0	0
34		Spanish	0	1	0	0	0
35		Common White	0	0	1	0	0
36		Evergreen	1	1	0	0	0
37		Brandon Dwarf	0	0	1	0	0
38		P 197-1 ¹⁾	0	0	1	0	0
39		P 198-1 ¹⁾	0	0	1	0	0
40		P 200-1 ¹⁾	0	0	1	0	0
41		P 200-2 ¹⁾	0	0	1	0	0
42		P. I. 178985	0	0	1	0	0
43	<i>M. altissima</i>	P. I. 314385	0	0	1	0	0
44		Bdn 62-1	0	0	1	0	0
45		Bdn 62-13	0	0	1	0	0
46		F. C. 40001	0	0	1	0	0
47		F. C. 40032	0	0	1	0	0
48		Bdn 58-259	0	0	0	0	1
49		Bdn 58-262	0	0	0	0	1
50		Bdn 636	0	0	0	0	1
51		894	0	0	0	1	0

¹⁾ Annual.

Table 23. Peroxidase (POX) patterns in *Eumelilotus* species

No.	Species	Strain	Peroxidase (POX)		
			1	2	3
1	<i>M. suaveolens</i>	18-4 ¹⁾	1	0	1
2		var. annual ¹⁾	1	0	1
3		G. Annual ¹⁾	1	0	1
4		Redfield Yellow	1	0	1
5		Bdn 60-59	1	0	0
6		Biennial	1	0	0
7	<i>M. hirsuta</i>	58-4	1	0	1
8		P. I. 314096	0	0	1
9	<i>M. polonica</i>	P. I. 314386	1	0	1
10	<i>M. dentata</i>	P 783-2 ¹⁾	0	1	0
11		P 784-3 ¹⁾	0	1	0
12		Bdn 58-190	0	1	0
13		Biennial	0	1	0
14	<i>M. taurica</i>	70	0	1	0
15		134-1(×)	0	1	0
16		Bdn 58-253	0	1	0
17		P. I. 314094	0	1	0
18	<i>M. wolgica</i>	Bdn 59-50	1	0	1
19		Bdn 60-58	1	0	1
20		Bdn 58-254	1	0	1
21		Bdn 1022	1	0	1
22	<i>M. alba</i>	P. I. 314095	1	0	1
23		Bdn 631 ¹⁾	0	1	0
24		Bdn 633 ¹⁾	1	0	1
25		Hubam ¹⁾	0	0	1
26		F. C. 40076 ¹⁾	0	0	1
27		Arctic	0	0	1
28		Bdn 660	0	0	1
29		Bdn 647	1	0	1
30		Bdn 664	0	0	1
31		Bdn 928	1	0	1
32		Cumino	0	0	1
33		Denta	1	0	1
34		Spanish	0	1	0
35		Common White	0	0	1
36		Evergreen	1	0	1
37		Brandon Dwarf	0	0	1
38	<i>M. officinalis</i>	P 197-1 ¹⁾	1	0	1
39		P 198-1 ¹⁾	1	0	1
40		P 200-1 ¹⁾	1	0	1
41		P 200-2 ¹⁾	1	0	1
42		P. I. 178985	1	0	1
43		P. I. 314385	1	0	1
44		Bdn 62-1	1	0	1
45	<i>M. altissima</i>	Bdn 62-13	1	0	1
46		F. C. 40001	1	0	1
47		F. C. 40032	1	0	1
48		Bdn 58-259	0	1	0
49		Bdn 58-262	0	1	0
50		Bdn 636	0	1	0
51		894	0	1	0

¹⁾ Annual.

3……と番号を付した(表18-23)。各アイソザイムの変異について得られた結果を以下に示した。

ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP, 表18): バンド数は4本であったが, 系統間での均一性が極めて高く, 種間差は明瞭であった。しかしながら, *alba* 種と *officinalis* 種間では *alba* 種の Spanish と *officinalis* 種の Bdn 62-1 と F.C. 40032 を除いてほとんど差異がみられず, 2番のバンドを有していた。*alba* 種の Spanish は LAP のバンドを示さなかった。一方, *officinalis* 種の Bdn 62-1 と F.C. 40032 は4番を有していて, *polonica* 種と *altissima* 種のバンドと一致した。また, *dentata* 種の P 783-2 は2番のバンドを有し, 他の3系統と異なっていた。

フォスフォグルコムターゼ (PGM, 表19): 5本のバンドが観察されたが, *alba* 種の Hubam, F.C. 40076, Arctic, Evergreen と *officinalis* 種の Bdn 62-1 を除いて2番は共通していた。また, 4番も *alba* 種の Brandon Dwarf と *officinalis* 種の半数の系統を除いて共通性がみられた。さらに, 3番も比較的共通していたが, *taurica* 種と *alba* 種の約半数の系統には観察されなかった。*taurica* 種は3番を有さぬ代わりに, 5番を有していた。また, *officinalis* 種の Bdn 62-1 と F.C. 40032 だけは1番が観察された。

エステラーゼ (EST, 表20): 2番のバンドに比較的共通性がみられた。3番のバンドは, *hirsuta* 種の P.I. 314096 と *altissima* 種の 894 に特異的であった。1番は, *altissima* 種の全系統, *alba* 種の約半数, *polonica* 種と *suaveolens* 種の一部でみられた。また, 各系統はほとんどが1本のバンドを有していたが, *alba* 種の Common White は, 1番と2番の2本のバンドを有していた。

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH, 表21): 3本のバンドが観察されたが, 種間差異は比較的小さく, 1番と2番が共通していた。しかし, *wolgica* 種では2番がなく, 3番が観察された。3番は他に *alba* 種の Hubam と Denta, *officinalis* 種の P.I. 314385 で観察された。また, *hirsuta* 種の P.I. 314096 では2番が特異的に観察された。

フォスフォグルコースイソメラーゼ (PGI, 表22): 5本のバンドが検出されたが, 3番が共通であった。しかし, *taurica* 種では2番が主で, *altissima* 種では5番が主であった。1番は, *alba* 種の

Cumino と Evergreen で観察され, 2番は *taurica* 種以外に *dentata* 種の P 783-2 と *alba* 種の一部で認められた。4番は *dentata* 種の Biennial と *altissima* 種の 894 で観察された。

パーオキシダーゼ (POX, 表23): 3本のバンドが検出されたが, 1番と2番を共通に有するのが *suaveolens* 種, *wolgica* 種および *officinalis* 種であった。*alba* 種では1番と2番を共に有するもの(5系統), 3番と2番を1本ずつ有するものに分かれた。*dentata* 種, *taurica* 種, *altissima* 種は2番のみを有していた。

得られたバンドのすべてについて主成分分析を行い, 抽出した2種の主成分(累積寄与率37.1%)の固有ベクトルで各系統の散布図を示した(図7)。第Iおよび第II主成分による散布図からは, *altissima* 種, *taurica* 種および *dentata* 種を他の種と区別できたが, 残りの6種の分布は重複していた。また, *taurica* 種と *dentata* 種も一部が重複していた。

次に, 23バンドをすべて用いてクラスター分析を行った(図8)。種が明瞭に区別できたのは *suaveolens* 種, *wolgica* 種, *taurica* 種だけで, 特に, *officinalis* 種と *alba* 種は種々のクラスターに分かれた。しかしながら, *officinalis* 種や *alba* 種のクラスターへ他種が重複することはほとんどなかった。

2) 種子タンパク質変異

Eumelilotus 亜属の9種51系統について種子タンパク質の SDS-PAGE による変異を調べたところ, 極めて多数のバンドを検出した。これらのバンドは分子量マーカーとの相対位置の計算により, 総数54に分けられた。そして, 分子量の大きい順に各バンドに1, 2, 3, ……と番号を付すと, 44番, 47番, 50番, 53番および54番のバンドは共通であった。得られたバンドの総数54は, 同時に泳動したダイズの13バンド(図11, 17レーン)に比較して格段に多かった。それぞれの種の特徴を以下に述べる。

M. alba (図9, 1~15レーン): 15系統は互いに異なる独自のバンドパターンを示し変異が大きかった。他の種と比較して, 34番から39番までのバンドを欠くものが多かった。種内では26番の有無が半々であった。さらに, Denta (5レーン) だけは特異的に40番のバンドを欠失していた。

M. hirsuta (図9, 16~17レーン): 比較的均一性

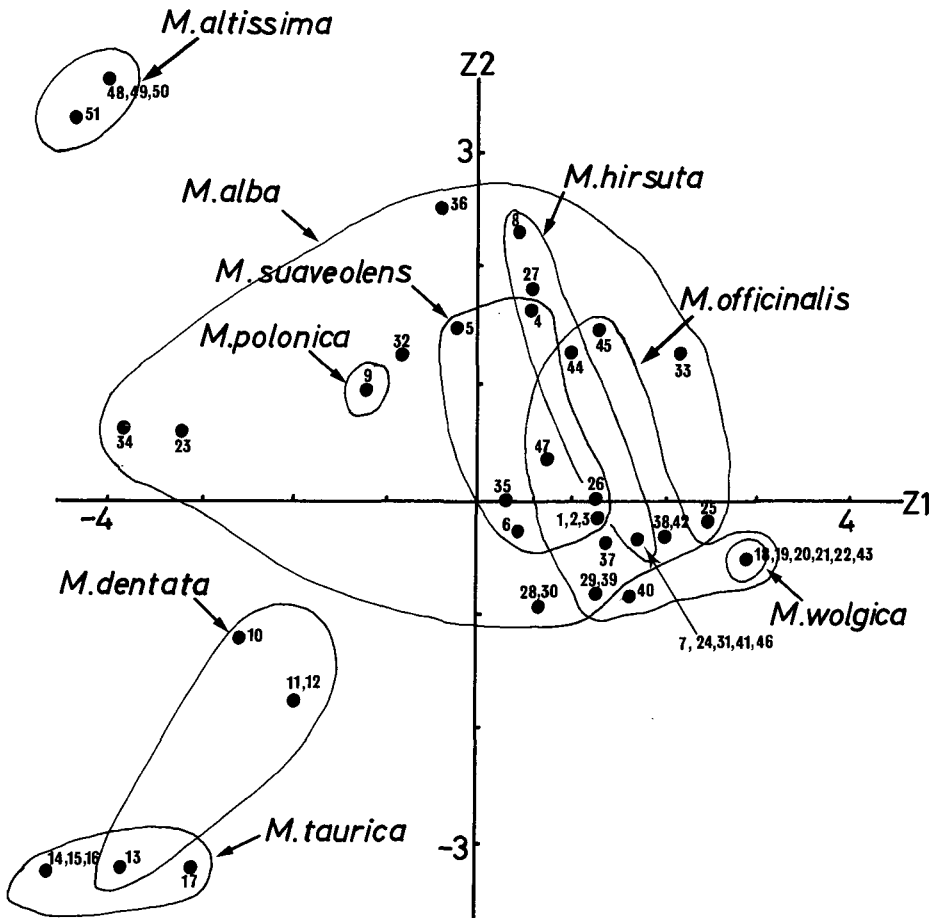


Fig. 7. Scatter diagram of *Eumelilotus* species in the first and second eigen vectors (Z1 and Z2) obtained from the principal component analysis.

が高く、33番から40番にかけて薄いバンドがあった。また、Bdn 58-4(16 レーン)は他種には見られぬ高分子のバンドを有していた。

M. altissima (図 10, 1~4 レーン)：4 系統間の均一性は高かったが、894 (3 レーン)は35番のバンドを欠失していた。

M. dentata (図 10, 5~8 レーン)：系統間の均一性は高く、45番のバンドを欠き、26番と49番を有するのが特徴的であった。また、P 787-3 (6 レーン)では、高分子のバンドがなく11番のバンドが濃かった。

M. taurica (図 10, 9~12 レーン)：均一性は高かったが、134-1 (×) (10 レーン)では、24, 25番のバンドを欠失し、26番のバンドが出現した。Bdn 58-253 (11 レーン)では、*dentata* 種と同じく

45番のバンドが欠失し、30番のバンドの濃いのが特徴的であった。

M. wolgica (図 10, 13~17 レーン)：種内の均一性は極めて高かった。しかし、P. I. 314095 (17 レーン)だけは高分子部位で他の4種と異なっていた。

M. officinalis (図 11, 1~10 レーン)：種内変異は大きかった。特に、高分子のバンドと、42.7 KD 付近のバンドに異変が大きかった。

M. suaveolens (図 11, 11~16 レーン)：種内の均一性は極めて高かった。系統間差では43番のバンドの有無によって6系統が2型に分けられた。

総数 54 のバンドから、5 種の共通バンドを除いた 49 バンドについて主成分分析を行い、2 種の主成分 (累積寄与率 25.6%) の固有ベクトルで各系統の散布図を作成した (図 12)。第 I および第 II 主成

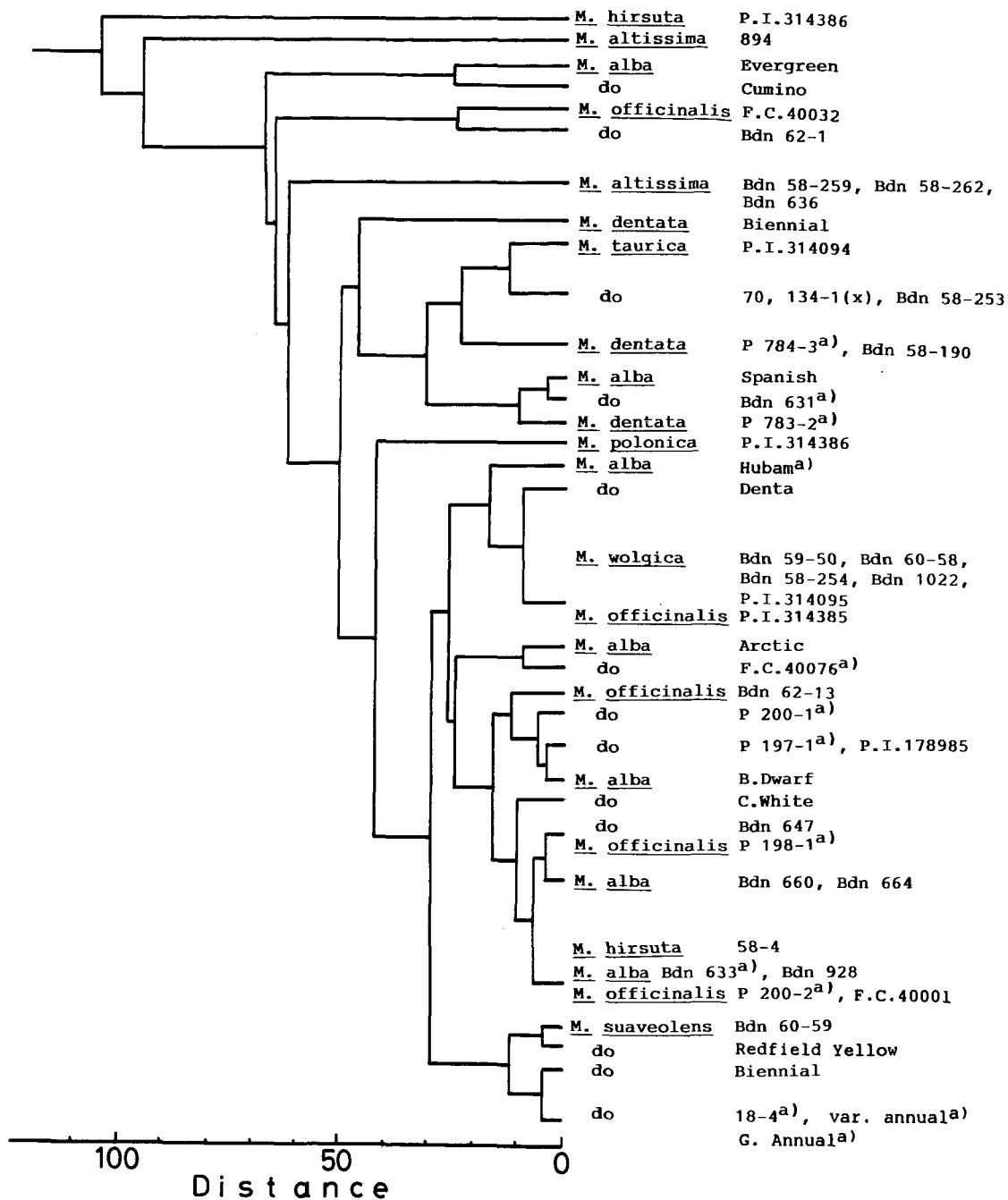


Fig. 8. Dendrograms of *Eumelilotus* species based on clustering procedure (group average method) of 23 isozyme phenotypes.

^a); Annual.

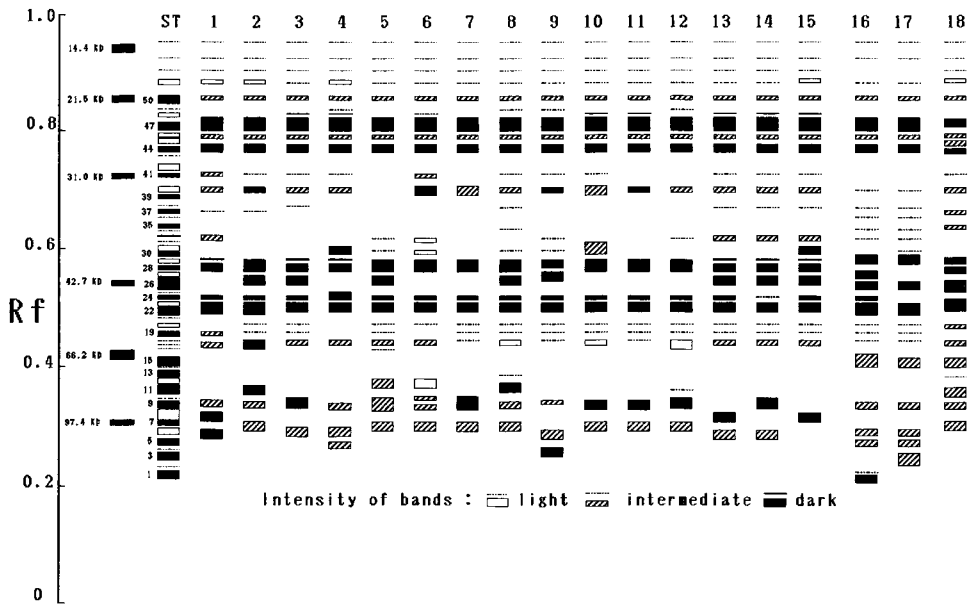


Fig. 9. SDS-PAGE patterns of seed proteins of *M. alba*, *M. hirsuta* and *M. polonica* strains. *M. alba*; 1, Bdn 631, 2, Bdn 633, 3, Hubam, 4, F.C.40076, 5, Denta, 6, Cumino, 7, Evergreen, 8, Bdn 660, 9, Bdn 928, 10, Bdn 647, 11, Bdn 664, 12, Spanish, 13, Brandon Dwarg, 14, Arctic, 15, Common White. *M. hirsuta*; 16, Bdn 58-4, 17, P.I.314096. 18, *M. polonica*. ST; Total bands of seed proteins of *Eumelilotus* species.

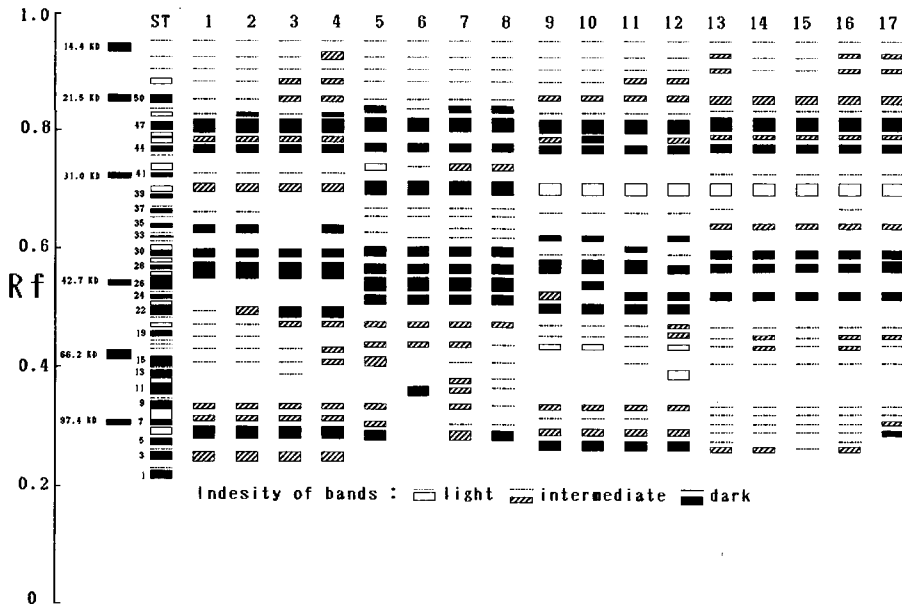


Fig. 10. SDS-PAGE patterns of seed proteins of *M. altissima*, *M. dentata*, *M. taurica* and *M. wolgica* strains. *M. altissima*; 1, Bdn 58-262, 2, Bdn 58-259, 3, 894, 4, Bdn 636. *M. dentata*; 5, P 783-2, 6, P 784-3, 7, Bdn 58-190, 8, Biennial. *M. taurica*; 9, 70, 10, 134-1(×), 11, Bdn 58-253, 12, P.I.314094. *M. wolgica*; 13, Bdn 1022, 14, Bdn 59-50, 15, Bdn 60-58, 16, Bdn 58-254, 17, P.I.314095. ST; Total bands of seed proteins of *Eumelilotus* species.

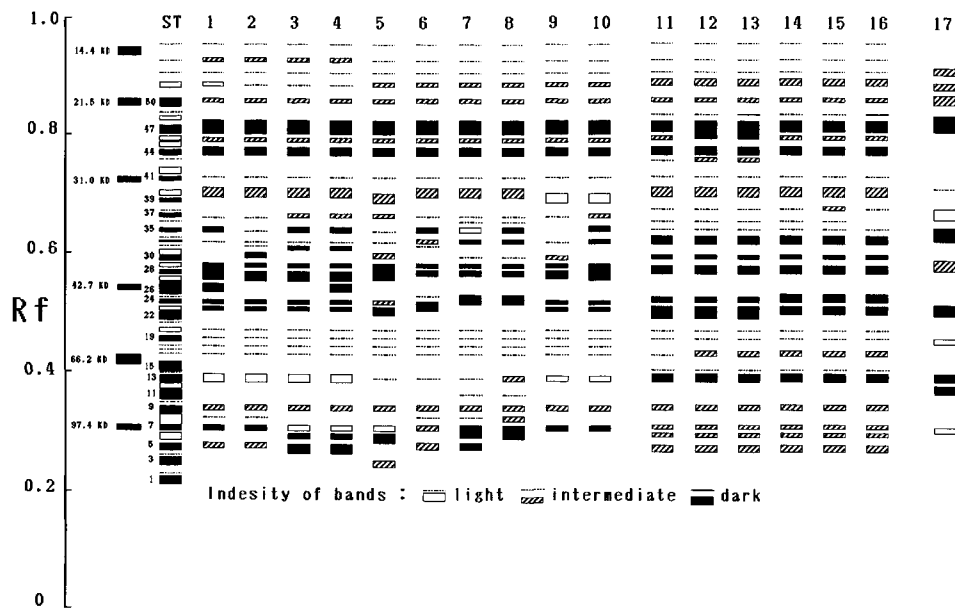


Fig. 11. SDS-PAGE patterns of seed proteins of *M. officinalis* and *M. suaveolens* strains and soybean. *M. officinalis*; 1, P. 197-1, 2, P 198-1, 3, P 200-1, 4, P 200-2, 5, P. I. 314385, 6, P. I. 178985, 7, F. C. 40032, 8, Bdn 62-1, 9, Bdn 62-13, 10, F. C. 40001. *M. suaveolens*; 11, Redfield Yellow, 12, Biennial, 13, Golden Annual, 14, var. annual, 15, Bdn 60-59, 16, 18-4, 17, Soybean. ST; Total bands of seed proteins of *Eumelilotus* species.

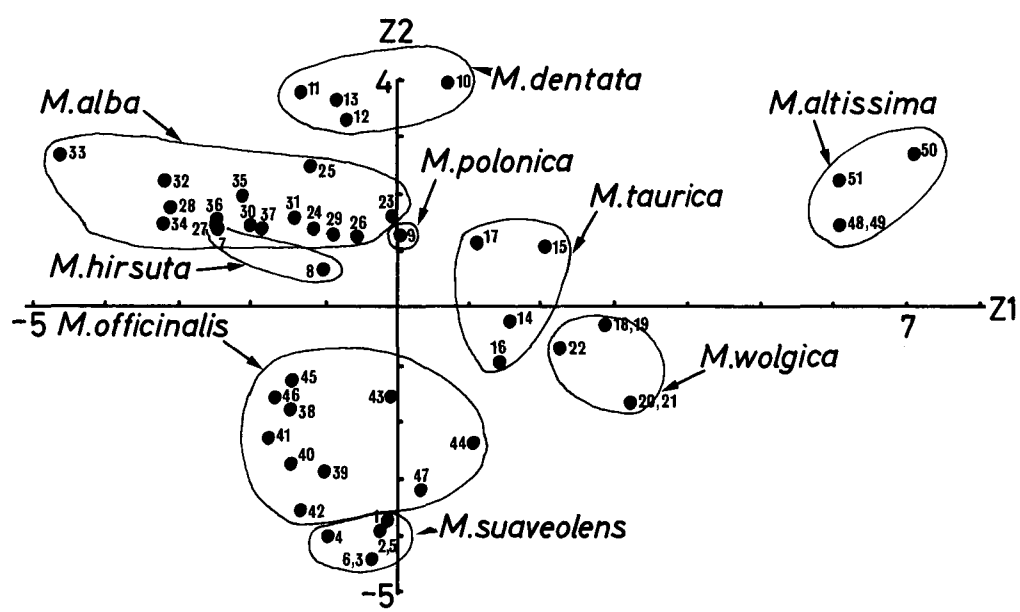


Fig. 12. Scatter diagram of *Eumelilotus* species in the first and second eigen vectors (Z1 and Z2) obtained from principal component analysis.

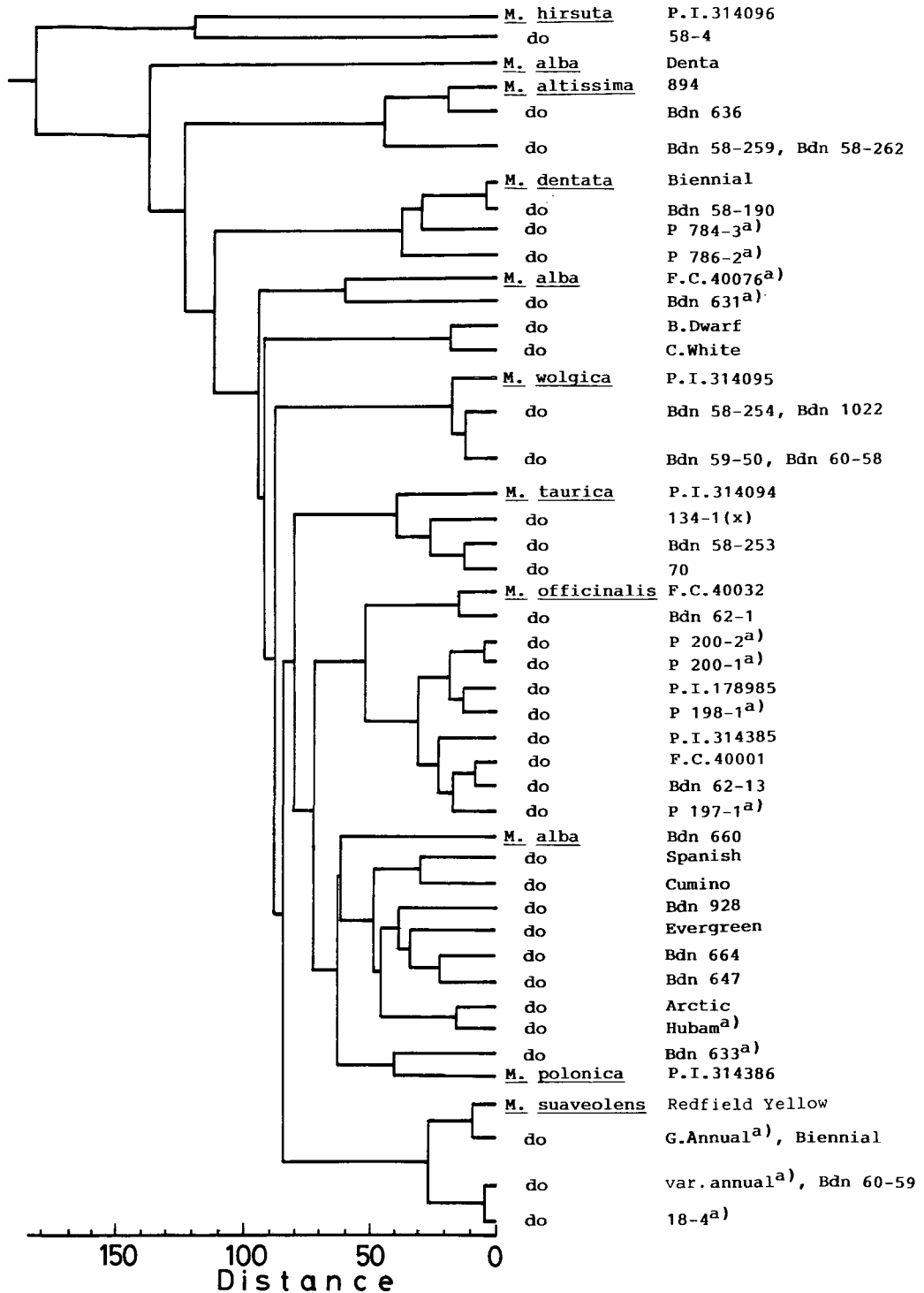


Fig. 13. Dendrogram of *Eumelilotus* species based on clustering procedure (group average method) of 49 bands for seed proteins.

^a); Annual.

分による散布図から、*hirsuta* 種の 58-4 (7 番) が *alba* 種と重複する以外は各種を明瞭に区別できた。さらに、49 バンドのクラスター分析 (群平均法) を行ったところ、種内での類似度は高かった (図 13)。しかし、*alba* 種だけは 3 群に分かれた。また、*M. alba* I 群と *M. officinalis* は近縁で、*M. hirsuta* だけは別のクラスターを形成した。

4. 考 察

遺伝子の一次産物であるアイソザイムや種子タンパク質は種の進化を調べる上で、重要なマーカーである。アイソザイムをマーカーに用いて *Oryza sativa* 種の分類を行った例はある⁷⁰⁾ものの、アイソザイム変異のほとんどは進化に中立であることが明らかにされつつあり³⁴⁾アイソザイムより種子タンパク質の方が有効であるという報告がある。⁷¹⁾ 一方、アイソザイム変異と種子タンパク質における変異を比較して系統分化の方向性が同じ場合もあった。⁷²⁾ 種子タンパク質は栄養体のタンパク質より進化において保存性が高い⁷³⁾ので、種形成あるいは系統分化の研究に関して多くの植物種で用いられてきた。³³⁾ しかし、*Melilotus* 属に関してはわずかに *Medicago* 属と *Trifolium* 属との関連で *M. alba* の種子タンパク質が分析されているにすぎない。⁷⁴⁾ 本実験では *Eumelilotus* 亜属の 9 種 51 系統についてアイソザイム 6 種と種子タンパク質を分析した。アイソザイムについては LAP を除いて種間の変異が小さく、また種内の均一性も高かった。6 種のアイソザイムで 23 バンドを検出したが、種を超越して同一のパターンを示した場合もあって明瞭な種間差は認められなかった。

一方、種子タンパク質についてみると、全部で 54 バンドが出現し、主成分分析では *M. hirsuta* 58-4 が *M. alba* と重複する以外は明瞭にそれぞれの種を群別できた。さらに、クラスター分析では *M. alba* が明瞭に 3 群に分かれた以外はすべて同一種が 1 つのクラスターを形成した。*M. alba* は I 群 (Bdn 660 はじめ 10 種)、II 群 (F. C. 40076 はじめ 4 種) と III 群 (Denta) に分かれたが、アイソザイムの場合と同様に *M. alba* Denta は特異的で、主成分分析でも他系統とは異なる位置を占めた。また、*M. suaveolens* はアイソザイムの場合と同様に 1 つのクラスターを形成し、主成分分析では *M. officinalis* 群に隣接していた。

アイソザイムと種子タンパク質を併せて考えると、まずアイソザイムについては全体に種間変異が小さく、佐野・喜多³¹⁾が 77 種の形態形質を用いて数量分類を行った結果と同様に明瞭な種の類縁関係を明らかにすることはできなかった。一方、種子タンパク質については *M. alba* が 3 群に分かれた以外はすべて Stevenson³⁰⁾ の分類と同じく明瞭にそれぞれの種が分かれていた。アイソザイムによる分類が従来の分類と異なったのは調査した酵素数が少なかったためとも考えられるが、一方では、岡³⁴⁾が指摘するように *Eumelilotus* 亜属の場合にもアイソザイムが進化に関係していないことを示唆している。アイソザイムと種子タンパク質による分類で *M. suaveolens* だけが特異的に 1 つのクラスターを形成したことは大変興味深い。Stevenson³⁰⁾によれば、*M. suaveolens* は形態的に区別できないほど *M. officinalis* に類似し、しかも *M. alba* と非常に近縁であったことから、Cooper⁷⁵⁾は *M. suaveolens* が *M. alba* と *M. officinalis* との交雑 F_1 から生じたと推定した。しかし、*M. suaveolens* は *M. officinalis* と子房内の胚珠数については明らかな差があり³⁰⁾ *M. alba* とも花色などで異なっていた。また、*M. alba* と *M. officinalis* との間で自然交雑の起こる可能性は非常に低く^{9,76)}たとえ自然交雑で雑種種子ができたとしてもその交雑後代で黄花個体が出現する頻度は低い。⁷⁷⁾ これらと本実験の結果とを併せて、*M. suaveolens* は *M. alba* と *M. officinalis* との交雑後代より生じたとは考えにくい。また、種子タンパク質のクラスター分析から *M. alba* I 群と *M. officinalis* が近縁なことが判明した。

M. alba と *M. officinalis* のアイソザイムや種子タンパク質のクラスター分析からの類縁関係と交雑和合性とは一致する場合があった。すなわち、アイソザイムでの *M. alba* の Evergreen と Cumino, Spanish と Bdn 631 および *M. officinalis* の F. C. 40032 と Bdn 62-1, 種子タンパク質での *M. alba* II 群の F. C. 40076 と Bdn 631, Brandon Dwarf と Common White および *M. officinalis* の F. C. 40032 と Bdn 62-1 であった。特に *M. officinalis* の F. C. 40032 と Bdn 62-1 はアイソザイムでも種子タンパク質でも同一のクラスターを形成し近縁であると推定された。さらに、*M. altissima* を含む交雑で *M. altissima* の 894 と Bdn 636 を用いた交雑 F_1 の

みが試験管内栽培で生育が進んだが、この両者は種子タンパク質クラスター分析で同じクラスターを形成し、近縁であることを示唆していた。

V 総合討論

種の形成には、遺伝子変化とその保持機構が協働して起こる。保持機構としては、遺伝子そのものが適応的である場合、または適応的な遺伝子と連鎖している場合、あるいは生殖的隔離機構に係わる遺伝子との連鎖などが考えられる。種の形成過程を理解するには如何なる遺伝子変化や組換えにより多様性を生じたか、また、その保持機構が如何なるものかを知る必要がある。したがって、種形成に係わる要因を明らかにするために、細胞遺伝学的あるいは比較遺伝学的手法を用いて種間の遺伝的差異を明らかにしなければならない。本研究では、*Melilotus* 属 *Eumelilotus* 亜属の種形成を理解する上で、まず9種間の細胞学的関係を明らかにし、転座染色体の同定を行い、転座染色体に座乗する遺伝子を明らかにした。さらに、アイソザイムと種子タンパク質の変異を明らかにし、タンパク質レベルからも種の類縁関係を推定した。9種間の細胞学的関係については、*M. alba* だけが他の8種と1個の相互転座で異なることが判明した。Kita¹⁸⁾によれば、*Eumelilotus* 亜属内で核型の変異はみられなかったことから、*M. alba* 種の形成には1個の相互転座が極めて重要な役割を果たしていたことになる。Suvorov²⁾が明らかにした *Melilotus* 属各種の分布域をみると、*M. alba* はポルトガルから中国に至る最も広範囲に分布していた。また種内の変異も多く、生態型の分化がみられた。栽培種として利用されたために多くの生態型を分化したとも考えられるが、一方の栽培種である *M. officinalis* の分布が *M. alba* より狭いことを考えると、*M. alba* は分化する際に広域適応性を獲得したと推定され、それは染色体の転座によった可能性が考えられる。Sano and Kita²⁸⁾ は転座染色体に雑種弱勢、雑種クロロシスあるいは交雑和性に関する遺伝子が座乗することを明らかにして、*M. alba* と他種の間にはかなり多くの隔離機構が作用していることを示唆した。この様な強い隔離機構が存在するにも拘らず、アイソザイム変異を調べてみると種間の変異はそれほど大きくなく、また *M. alba* に特異的なアイソザイムは見出されなかった。調べたアイソザイムが6種と少

なかったことにもよると考えられるものの、このことは *M. alba* の種形成が Lewis⁷⁸⁾ の提示した相互転座による "Saltational" であったことを示唆している。一方、*M. alba* を除いた8種間には染色体の構造差がみられなかったことから、これらの種の形成には遺伝子レベルの変化が関与していたことになる。

1個の相互転座が "Saltational speciation" を引き起こすためには、例えばモモアカアブラムシの有機リン剤高度抵抗性が1個の相互転座により生じたという報告⁷⁹⁾ のように、相互転座が遺伝子変化を誘導し、その変化が環境ストレスによく適応しているという状況が考えられる。相互転座が遺伝子変化を引き起こした例としては外に Hakansson⁸⁰⁾ の *Godetia* の花卉のスポットに係わる遺伝子がある。本研究でも、他殖性に関して重要な意味を有するネクターガイド (Nectar guide) 遺伝子が *M. alba* と他種の染色体間による転座染色体に座乗していたことが、*M. alba* と *M. suaveolens* の交雑 F₂ 集団の分析から判明した。ネクターガイドは訪花昆虫に蜜の所在を明らかにする花の模様であって、紫外線下ではじめて人の目に映る。つまり、ネクターガイドが明瞭であればあるほど昆虫は訪花しやすいので、このことは他殖性を高めることを意味する。*M. alba* と *M. suaveolens* のネクターガイドを比較すると、*M. alba* の花が全体に濃く明瞭であった。また *M. alba* 型のネクターガイドが優性で、ネクターガイド遺伝子 (*Ncg*) は転座点と連鎖していた。しかも G 分染法によって染色体を特定できたため *Ncg* 座が *M. suaveolens* の付随体染色体にあることが判明した。Sano⁶⁷⁾ によれば *M. alba* は他殖性が高く、*M. suaveolens* は低かった。他殖性に影響する遺伝子が転座染色体上にあって、種間差異が明瞭であったことを考えると、転座によって *Ncg* 遺伝子が増加した可能性が考えられる。ところで、*Melilotus* 属各種の花色は黄色と白色に分かれ、しかも白花は *Eumelilotus* 亜属の *M. alba*, *M. taurica*, *M. wol-gica* と *Micromelilotus* 亜属の *M. speciosa* に限られている³⁰⁾ さらに花色の遺伝は非常に複雑で、Kirk⁷⁷⁾ によれば3遺伝子が関与し各遺伝子間には相加的效果や上位性がみられた。花の色とネクターガイドが全く異質であることは Harborne and Smith⁸¹⁾ が指摘する通りで、本研究でも花色とネク

ターガイドとは無関係であった。これらのことから、花色は種の進化とは独立的であったと考えられる。

種の形成過程を理解するためには、タンパク質レベルでの変異の利用が有用である。本研究では、基質特異性は同じであるが電荷が異なるアイソザイムと種子タンパク質を用いた。アイソザイムについては、調べたのが6種と少なく、また、LAPを除いて各酵素の種間変異も小さかった。得られた6酵素23バンドを基に主成分分析あるいはクラスター分析を行ったが、明瞭な類縁関係は得られなかった。しかし、クラスター分析では *M. suaveolens* は1つの明瞭なクラスターを形成した。これは、*M. suaveolens* が特異的に LAP-1 を有していたためと考えられる。LAP は比較的種特異的であり、*M. suaveolens* は LAP-1 を、*M. hirsuta*, *M. wolgica*, *M. officinalis* と *M. alba* は LAP-2 を、*M. dentata* と *M. taurica* は LAP-3 を、そして *M. polonica* と *M. altissima* は LAP-4 をそれぞれ有していた。

一方、種子タンパク質について類縁関係を調べたところ、明瞭な種間差が得られた。特に、アイソザイムと同様に *M. suaveolens* が1つのクラスターを形成し、クラスター分析では *M. alba* が3群に分かれた。結局、種子タンパク質の変異は Stevenson³⁰⁾ が花や種子等の形態で分類した結果と平行的であった。一方、佐野・喜多³¹⁾ は77種におよぶ形態形質を対象にして数量分類学的手法による類縁関係を調べたが、この場合種内の異変が大きく明瞭な類縁関係は得られなかった。これらは、花器形質は他殖性のために重要で種内での保守性が強いことを示唆している。さらに各種間で発達している生殖的隔離機構が他の花器形質の移入を妨げているのであろう。花器形質を中心とした分類と種子タンパク質による類縁関係が一致したことは、種子タンパク質の保存性が高いことを考慮するならば、種子タンパク質も何らかの適応的性質を有している可能性が考えられる。本研究では、従来成功していなかった交雑組み合わせからも雑種が得られたが、それらの特異性を見るとアイソザイムでの類縁関係と一致する場合もあったが、種子タンパク質での類縁関係と一致する場合(表2の *M. alba* × *M. altissima* における *M. altissima* の Bdn 636 と 894 (図13))もあった。アイソザイムと種子タンパク質の分析から、*M. alba*

は *M. officinalis* と近縁なことが裏付けられた。さらに、*M. suaveolens* が特異的な進化をたどった種であることが示唆され、*M. suaveolens* がシベリヤ東南部から中国北部辺りに分布域が限られていること²⁾とも関連があると推察された。

本研究では、転座染色体がG分染法によって特定できることが実証された。染色体の転座が種の進化にいかなる役目を果たしたかは転座染色体に座乗する遺伝子の変化と共にほとんど不明であり、本研究で得られたネクターガイドの遺伝子や少数の例に限られている。今後、種々の形質について遺伝子分析を行い転座との関連を明らかに出来れば、転座と種の進化についてのより詳細な知見が得られるものと期待される。

摘 要

Melilotus 属は *Eumelilotus* と *Micromelilotus* の2亜属に大別され、特に *Eumelilotus* 亜属にはスイートクローバの重要な栽培種である *M. alba* と *M. officinalis* をはじめ9種が含まれる。*Eumelilotus* 亜属の種間には種々の生殖的な隔離が発達しているため交雑が困難で、全9種間の細胞学的関係は、*M. alba* と *M. altissima* を除く他の7種間に相互転座が存在していること以外はほとんど解明されていない。スイートクローバ育種のためには *Eumelilotus* 亜属の全9種間の細胞学的関係を解明し、9種間の遺伝的差異を明らかにすることが重要である。そこで、本研究では *Eumelilotus* 亜属の全9種間で細胞学的関係を解明し、染色体の構造差異とそれに座乗する主要な遺伝子について調べた。さらに、9種間にみられる遺伝的差異をタンパク質レベルでも調べて、種形成の様相について検討した。本研究で得られた主な結果は以下のように要約される。

1. *Eumelilotus* 亜属の9種間の細胞学的関係

1) *M. altissima* と他種との交雑による F_1 は強度のクロロシスを示して枯死するため、*M. altissima* と他の8種間の細胞学的関係は不明であった。本研究ではクロロシスによる雑種致死を克服するため F_1 の試験管内栽培を試みた。まず、 F_1 を得るために *M. altissima* と他の8種間で正逆交雑を行った結果、新たな交雑和合性が見出された。正逆

交雑間や種間で和合性の差異が認められる場合もあったが、*M. altissima* は他の 8 種すべてと交雑和合性を有することが明らかになった。得られた F_1 を試験管内栽培したところ、クロロシスの回復がみられたものの、ほとんどの F_1 は生育途中で枯死した。しかし、*M. alba* × *M. altissima* F_1 3 個体と *M. altissima* × *M. taurica* F_1 2 個体が開花に至った。これらの F_1 について花粉稔性を調査し減数分裂を観察した結果、*M. alba* × *M. altissima* の F_1 は花粉稔性が半不稔で、減数分裂において 1 個の 4 価あるいは 3 価染色体が観察された。このことから 2 種間には 1 個の相互転座が存在していることが判った。一方、*M. altissima* × *M. taurica* F_1 は低い花粉稔性を示したものの、減数分裂における染色体行動は正常であった。したがって、*M. altissima* と *M. taurica* との間には染色体の構造差がないと考えられた。

2) *officinalis* 群と *dentata* 群間の交雑である *M. suaveolens* × *M. wolgica* で新たな和合性が見出され、得られた F_1 を試験管内栽培したところ、クロロシスが回復し、2 個体が開花に至った。これらの個体の花粉稔性は低かったものの、減数分裂における染色体の行動は正常であった。したがって、*M. suaveolens* と *M. wolgica* との間には染色体の構造差はないと考えられた。このことは *officinalis* 群と *dentata* 群との間に染色体の構造差がないという三系交雑による結果を直接的に検証したことになる。

3) 以上の結果から、*Eumelilotus* 亜属の全 9 種間の細胞学的関係は *M. alba* だけが 1 個の相互転座により他の 8 種と異なることが明らかになった。

2. 転座染色体の同定と F_2 集団における転座染色体と昆虫訪花に関する遺伝子との関係

1) *M. alba* の転座染色体および転座点を同定するため、*M. alba* × *M. suaveolens* の F_1 およびその両親を用いて SDS 処理による G 分染を行ったところ、中期の染色体にはほとんどバンドがみられなかったものの、前中期では動原体付近に明瞭なバンドがみられた。

2) *M. alba* と *M. suaveolens* の G 分染法による核型の比較から、付随体染色体は共に最も短いものの、付随体の大きさと長腕の長さに差異が認められた。しかし、両種の核型では転座染色体を同定する

ことはむずかしかった。次に、 F_1 の G 分染で核型を作成したところ、付随体染色体に差異が認められた以外に付随体染色体に次いで短い染色体にも差異が認められた。

3) F_1 の核型と両親の核型を総合して、*suaveolens* 型の 5S と 8S の長腕の端部側に切断が起こり、5S と 8S の間で転座を生じ、それぞれ *alba* 型の 7A と 8A になったと推定された。

4) 付随体染色体が転座に関係していることは、*M. alba* × *M. suaveolens* F_1 の Pachytene で十字型を形成する染色体が 2 本に付着していたことと、*M. alba* × *M. suaveolens* F_2 で付随体染色体と相互転座のホモ型あるいはヘテロ型とが一致したことから裏付けられた。

5) *M. alba* × *M. suaveolens* の F_2 では、相互転座ホモ型とヘテロ型を 1 対 1 の期待比に分離した。また、転座点とネクターガイド遺伝子 (*Ncg*) との連鎖関係を調べた結果、*Ncg* と転座点との間には $9.5 \pm 5.3\%$ なる組換え価による連鎖関係が明らかとなった。

6) 転座染色体断片を有する付随体染色体型と *Ncg* 遺伝子との間での複合分離を調べた結果、S 型付随体染色体で *Ncg*⁺ 遺伝子が過剰となり、均一性の χ^2 検定では有意となった。このことは付随体染色体と *Ncg* 遺伝子が互に関連のあることを示唆した。

3. アイソザイムと種子タンパク質における種間の遺伝的差異

1) *Eumelilotus* 亜属における種および系統間でのアイソザイムと種子タンパク質における変異を調べた。

2) アイソザイムは LAP, PGM, EST, IDH, PGI および POX の 6 種で、LAP で 4 本、PGM と PGI で 5 本、EST, IDH と POX で 3 本のバンドをそれぞれ検出した。LAP を除いて、*Eumelilotus* 亜属 9 種におけるアイソザイムの変異は少なかった。また、各アイソザイムの種内における均一性は高かった。

3) 23 本のバンドについての主成分分析の結果、*altissima* 種、*taurica* 種および *dentata* 種は他の種と区別できたが、残りの 6 種は重複していた。また、*taurica* 種と *dentata* 種間にも一部重複があった。

4) 23 のバンドについてのクラスター分析の結果, *suaveolens* 種, *wolgica* 種および *taurica* 種だけは明瞭に区別できた。 *officinalis* 種と *alba* 種は様々なクラスターに分かれたものの, 他種とは重複しなかった。

5) SDS-PAGE 電気泳動法により種子タンパク質を分析した結果, *Eumelilotus* 亜属 9 種 51 系統において総数 54 本のバンドを検出し, 種間に大きな変異がみられた。また, *alba* 種と *officinalis* 種の種内変異も大きかった。一方, *suaveolens* 種と *wolgica* 種は種内の均一性は極めて高かった。

6) 総数 54 バンドから共通バンドを除いた 49 バンドについて主成分分析を行った結果, *hirsuta* 種 1 系統が *alba* 種と重複する以外明瞭に各種を区別できた。さらに, 49 バンドについてのクラスター分析の結果, 主成分分析と同様に種内での類似度が高かった。しかし, *alba* 種だけは 3 群に分かれ, そのうちの I 群は *officinalis* 種と近縁であった。

7) アイソザイムと種子タンパク質のクラスター分析の結果から, *suaveolens* 種だけは明瞭な一つのクラスターを形成した。このことは *suaveolens* 種が独自の進化をたどったことを示唆していた。

謝 辞

本研究は 1987 年 4 月から 1991 年 3 月までの 5 年間に, 課程博士の学位請求論文として, 北海道大学大学院農学研究科に在学中に行ったものである。研究の全般にわたって終始懇切な御指導と御校閲の労をとられた北海道大学農学部教授・木下俊郎博士に対し謹んで感謝の意を申し上げる。同様に研究の全般にわたり終始懇切な御指導をいただき, 本論文の作成にも多大な御協力と論文の御校閲をいただいた北海道大学農学部助教授・前川雅彦博士に対して衷心より御礼を申し上げる。さらに, 本研究の遂行に対し懇切な御指導と有益な御助言をいただいた北海道大学名誉教授・喜多富美治博士に対して謹んで感謝の意を申し上げる。また, 本論文の御校閲をいただいた北海道大学農学部教授・島本義也博士, 同教授・中世古公男博士に対して謹んで謝意を申し上げる。実験遂行にあたり有益な御助言をいただいた国立遺伝学研究所助教授・佐野芳雄博士, 北海道大学農学部助教授・森宏一博士, 同教授・三上哲夫博士, 同助手・阿部純博士, 同助手・高牟禮逸朗修士さらには砂川徹氏に対しても謹んで感謝の意を申し上げ

る。

なお, 実験遂行にあたり多大な便宜を図り多大な御協力をいただいた北海道大学農学部附属農場文部技官・飛渡正夫氏, 同文部技官・角田貴敬氏をはじめ, 北海道大学農学部作物育種学教室大学院諸氏に対しても心より感謝の意を申し上げる。

引用文献

1. ISELY, D.: Keys to sweet clover (*Melilotus*). Proc. Iowa Acad. Sci., **61**: 119-131. 1954
2. SUVOROV, V. V.: Sweetclover-*Melilotus* (Tourn.) Adans. Em. In Flora of cultivated plants of the USSR. E. N. Sinskaya, ed. **13**(1): 426-627. Trans. from Russian as OTS 60-51198. U. S. Dep. Commerce, Washington, D.C., 1950
3. SMITH, W. K. and GORZ, H. J.: Sweetclover improvement. *Adv. Agron.*, **17**: 164-231. 1965
4. 喜多富美治: *Melilotus* 属の起源と分化. 育種学最近の進歩 **26**: 32-42. 1985
5. SUVOROV, V. V.: *Melilotus*. *Rasteniievodstvo S. S. S. R.*, **1**: 431-436. 1993
6. BRINK, R. A.: A non-bitter variety of *Melilotus*. *Sci.*, **79**: 301. 1934
7. SMITH, W. K.: Propagation of chlorophyll-deficient sweetclover hybrids as grafts. *J. Hered.*, **34**: 135-140. 1943
8. SMITH, W. K.: Transfer from *Melilotus dentata* to *M. alba* of the genes for reduction in coumarin content. *Genet.*, **39**: 124-125. 1948
9. KIRK, L. E.: Natural crossing between white flowered and yellow flowered sweetclover. *Sci. Agr.*, **9**: 313-315. 1929
10. GREENSHIELDS, J. E. R.: Embryology of interspecific crosses in *Melilotus*. *Canad. J. Bot.*, **32**: 447-465. 1954
11. WEBSTER, G. T.: Interspecific hybridization of *Melilotus* using embryo culture. *Agron. J.*, **47**: 138-142. 1955
12. WEBSTER, G. T.: Fertility relationships and meiosis of interspecific hybrids in *Melilotus*. *Agron. J.*, **42**: 315-322. 1950
13. BRINGHURST, M. S.: Genetic analysis of chlorophyll deficiency in *Melilotus alba* × *M. dentata* hybrids with some observations on meiotic irregularities. Summaries of Doctoral Dissertations, Univ. of Wisconsin, **11**: 96-97. 1951
14. SHASTRY, S. V. S., SMITH, W. K. and COOPER, D. C.: Chromosome differentiation in several

- species of *Melilotus*. *Amer. J. Bot.*, **47**: 613-621. 1960
15. JARANOWSKI, J. K.: Semisterility in the interspecific hybrid *Melilotus polonica* × *M. alba*. *Amer. J. Bot.*, **48**: 28-35. 1961
16. 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 I 報. 種間雑種 *Melilotus alba* × *M. hirsuta* の細胞遺伝. 北大農邦文紀要 **4**: 67-74. 1962
17. KITA, F.: Studies on genus *Melilotus* (sweet-clover) with special reference to interrelationships among species from a cytological point of view. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **54**: 22-121. 1965
18. KITA, F.: Studies on morphology of somatic chromosomes of the genus *Melilotus* (sweet-clover). *Jap. J. Bot.*, **19**: 149-174. 1966
19. 喜多富美治: 種間交雑によるスイートクローバ育種の問題点. 育種学最近の進歩 **18**: 117-128. 1977
20. 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 polonica* × *M. alba* および *M. polonica* × *M. hirsuta* の細胞学的研究. 北大農場報告 **15**: 38-43. 1967
21. 佐野芳雄・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 VIII 報. 種間雑種 *Melilotus alba* × *M. suaveolens*, *M. polonica* × *M. suaveolens* および *M. hirsuta* × *M. suaveolens* の細胞学的研究. 北大農邦文紀要 **8**: 411-419. 1973 a
22. 佐野芳雄・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 IX 報. 種間雑種 *Melilotus taurica* × *M. alba*, *M. taurica* × *M. wol-gica* および *M. dentata* × *M. taurica* の細胞学的研究. 北大農邦文紀要 **9**: 1-9. 1973 b
23. 佐野芳雄・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 X 報. *Melilotus officinalis* の系統間雑種に関する細胞学的研究. 北大農場報告 **19**: 1-7. 1974
24. SANO, Y. and KITA, F.: Cytological studies of several interspecific F₁ hybrids in the subgenus *Eumelilotus*. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **58**: 225-264. 1975
25. SMITH, W. K.: Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. *Genet.*, **39**: 266-279. 1954
26. 佐野芳雄: *Melilotus* 属における系統発生に関する研究. 北大農・学位論文 p. 166. 1976
27. MAEKAWA, M., HASEN and KITA, F.: Identification of reciprocal translocations observed in several *Melilotus* species (subgenus *Eumelilotus*) by interspecific triple crossings. *Euphytica*, **54**: 255-261. 1991
28. SANO, Y. and KITA, F.: Genes for reproductive isolation located on rearranged chromosomes. *Heredity*, **41**: 377-383. 1978 a
29. SANO, Y. and KITA, F.: Reproductive barriers distributed in *Melilotus* species and their genetic bases. *Canad. J. Genet. Cytol.*, **20**: 275-289. 1978 b
30. STEVENSON, G. A.: An agronomic and taxonomic review of the genus *Melilotus* Mill.. *Canad. J. Plant Sci.*, **49**: 1-20. 1969
31. 佐野芳雄・喜多富美治: 数量分類法による *Melilotus* 属の解析. 北大農邦文紀要 **9**: 286-302. 1976
32. CRAWFORD, D. J. (1983): Phylogenetic and systematic inference from electrophoretic studies. in Tanksley, S. D. and Orton, T. J. eds. *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. 257-288, Elsevier, Amsterdam, 1983
33. LADIZINSKY, G. and HYMOWITZ, T.: Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. Appl. Genet.*, **54**: 145-151. 1979
34. 岡 彦一: 集団の遺伝的構造. 酒井寛一編. 生態遺伝と進化. 110-163, 裳華房, 東京, 1982
35. 丸橋 亘・真鍋忠久・中村直美・小野沢芳郎: *Nicotiana tabacum* L. × *N. suaveolens* Lehm. に現れる雑種致死性の克服. 育種 **37**(別2): 116-117. 1987
36. 須田正樹・丸橋 亘: *Nicotiana repanda* Willd. × *N. tabacum* L. の雑種実生の生育における栽培温度と IAA の効果. 育種 **40**(別1): 58-59. 1990
37. 伊勢一男: *Melilotus* 属における種間雑種の細胞遺伝学的研究. *Micromelilotus* 亜属を中心として. 北大農学部・卒業論文 p. 97, 1981
38. WHITE, P. R.: *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. Ronald Press, New York, p. 228. 1963
39. GRANT, V.: *Plant Speciation*. p. 435, Columbia University Press, New York, 1971
40. KONISHI, T. and LINDE-LAURSEN, I.: Spontaneous chromosomal rearrangements in cultivated and wild barleys. *Theor. Appl. Genet.*, **75**: 237-243. 1988
41. 掛田克行・牧野徳彦・福井希一・山懸弘忠: オオム

- ギ相互転座系統における切断点の染色体分染法による位置決定. 育種 40(別2): 348-349. 1990
42. KAKEDA, K., FUKUI, K. and YAMADA, H.: Heterochromatic differentiation in barley chromosomes revealed by C- and N-banding techniques. *Theor. Appl. Genet.*, **81**: 144-150. 1991
 43. 吉田俊秀: 動物染色体のバンディング. 細胞 **6**: 354-362. 1974
 44. FUNAKI, K., MATSUI, S. and SASAKI, M.: Location of nuclear organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma* (Berl.), **49**: 357-370. 1975
 45. 陳 瑞陽: 高等植物数種における染色体Gバンド分染. 特に川百合において. 染色体 II-50: 1635-1651. 1988
 46. WANG, H. C. and KAO, K. N.: G-banding in plant chromosomes. *Genome*, **30**: 48-51. 1988
 47. KAKEDA, K., YAMAGATA, H., FUKUI, K., OHNO, M., FUKUI, K., WEI, Z. Z. and ZHU, F. S.: High resolution bands in maize chromosomes by G-banding methods. *Theor. Appl. Genet.*, **80**: 265-272. 1990
 48. NISHIBAYASHI, S. and KAERIYAMA, J.: Structural stability of chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from somatic tissue culture. *Plant Tissue Cult. Lett.* **3**: 31-34. 1986
 49. GREILHUBER, J.: Why plant chromosomes do not show G-bands. *Theor. Appl. Genet.*, **50**: 121-124. 1977
 50. SCHLARBAUM, S. E. JOHNSON, L. B., GORZ, H. J. and HASKINS, F. A.: Identification of chromosomes with secondary constrictions in *Melilotus* species. *J. Hered.*, **75**: 23-26. 1984
 51. 喜多富美治: スイートクローバの染色体工学に関する研究. 昭和62年度-昭和63年度文部省科学研究費一般研究C(6256002)研究成果報告書 p.36. 1986
 52. TANAKA, R.: On the speciation and karyotypes in diploid and tetraploid species of *Chrysanthemum* III. Meiosis in the F_1 -hybrids of *Chrysanthemum boreale* $\times$ *Ch. Makinoi*. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser. B Div.*, **2**: 9:31-40. 1959
 53. BRAT, S. V.: Genetic systems in *Allium*. I. Chromosome variation. *Chromosoma* (Berl.), **16**: 486-499. 1965
 54. WHITE, J. and REES, H.: The chromosome cytology of a somatic hybrid petunia. *Heredity*, **55**: 53-59. 1985
 55. STEBBINS, G. L.: Cytogenetics and evolution of grass family. *Amer. J. Bot.*, **43**: 890-905. 1956
 56. STEPHENS, S. G.: Cytogenetics of *Gossypium* and the problem of the origin of New World cottons. *Adv. Genet.*, **1**: 431-442. 1947
 57. KAGAWA, F.: A study on the phylogeny of some species in *Triticum* and *Aegilops*, based upon the comparison of chromosomes. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **10**: 173-228. 1929
 58. BLOOM, W. L.: Origin of reciprocal translocations and their effect in *Clarkia speciosa*. *Chromosoma* (Berl.), **46**: 61-76. 1974
 59. ROBERTS, L. M.: The effects of translocation on growth in *Zea mays*. *Genet.*, **27**: 584-683. 1942
 60. ERK, F. C.: Competition between chromosomal aberrations associated with curly and their wild type homologues in laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genet.*, **40**: 331-342. 1955
 61. REES, H.: The consequences of interchange. *Evol.*, **15**: 145-152. 1961
 62. BAILEY, R. J., REES, H. and JONES, L. M.: Interchange heterozygotes. *Hered.*, **37**: 109-112. 1976
 63. 砂川 徹・山田卓三: 昆虫の目(紫外線領域の光)で見る. 生物教育 **29**: 55-58. 1989
 64. DEMENT, W. A. and RAVEN, P. H.: Pigments responsible for ultraviolet patterns in flowers of *Oenothera* (Onagraceae). *Nature*, **252**: 705-706. 1974
 65. HANSON, W. D. and KRAMER, H. H.: The determination of linkage in linkage intensities from F_2 and F_3 genetic data involving chromosomal interchanges in barley. *Genet.*, **35**: 559-569. 1950
 66. THORP, R. W., BRIGGS, D. L., ESTES, J. R. and ERICKSON, E. H.: Nectar fluorescence under ultraviolet irradiation. *Sci.*, **189**: 476-478. 1975
 67. SANO, Y.: The pollination systems of *Melilotus* species. *Ecol. Plant.*, **12**: 383-394. 1977
 68. ENDO, T.: Application of zymography to sciences. *SABRAO J.*, **2**: 120-126. 1966
 69. SOLTIS, D. E., HAUFLER, C. H., DARROW, D. C. and GASTONY, G. J.: Starch gel electrophor-

- esis of ferns. A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.*, **73**: 9-27. 1983
70. GLASZMANN, J. C.: Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, **74**: 21-30. 1987
71. FERGUSON, J. M. and GRABE, D. F.: Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. *Crop Sci.*, 170-176. 1986
72. SCHEHTER, Y. and DE WET, J. M. J.: Comparative electrophoresis and isozyme analysis of seed proteins from cultivated races of sorghum. *Amer. J. Bot.*, **62**: 254-261. 1975
73. LESTER, R. N., ALSTON, R. E. and TURNER, B. L.: Serological studies in *Baptisia* and certain other genera of the *Liguminosae*. *Amer. J. Bot.*, **52**: 165-172. 1965
74. PRZYBYLSKA, J. and HURICH, J.: Disc electrophoretic study of seed proteins of various *Medicago* species, *Melilotus albus*, *Trifolium pratense*, and *T. repens*. *Acta Soc. Bot. Poland*, **40**: 681-695. 1971
75. COOPER, D. C.: Macrosporogenesis and embryology of *Melilotus*. *Bot. Gaz.*, **95**: 143-155. 1933
76. STEVENSON, T. M. and KIRK, L. E.: Studies in interspecific crossing with *Melilotus*, *Medicago* and *Trigonella*. *Sci. Agr.*, **15**: 580-589. 1935
77. KIRK, L. E.: Inheritance of flower colour in a cross between white blossom and yellow blossom sweet clover (*Melilotus albus* Desr. $\times$ *M. officinalis* (L.) Desr.). *Sci. Agr.*, **11**: 265-273. 1931
78. LEWIS, H.: Speciation in flowering plants. *Sci.*, **152**: 167-172. 1966
79. BLACKMAN, R. L., TAKADA, H. and KAWAKAMI, K.: Chromosomal rearrangement involved in the insecticide resistance of *Myzus persicae*. *Nature*, **271**: 450-452. 1978
80. HAKANSSON, A.: Contributions to a cytological analysis of the species differences of *Godeitia amoena* and *G. whitneyi*. *Heredity*, **33**: 253-260. 1947
81. HARBORNE, J. B. and SMITH, D. H.: Anthochlorins and other flavonoids as honey guides in the Compositae. *Biochem. Syst. Ecol.*, **6**: 287-291. 1978

Summary

The genus *Melilotus* is divided into two subgenera, *Eumelilotus* and *Micromelilotus*.¹⁾ The subgenus *Eumelilotus* comprises nine species including *M. alba* and *M. officinalis* which are important as forage legumes. Since several kinds of reproductive barriers are highly developed among *Eumelilotus* species, cytological relationships among the nine species in the subgenus have not been known with the exception of the presence of a reciprocal translocation between *M. alba* and the other seven species except *M. altissima*.²⁾ It is very important to establish the cytological relationships and to clarify the genetical differences among the nine species in the subgenus *Eumelilotus* for *Melilotus* breeding programs.

The present study aims at establishing the cytological relationships among the *Eumelilotus* species and revealing the structural differences of chromosomes between *M. alba* and the *officinalis* group. Furthermore, in the present study inter- and intraspecific relationships among the nine species in the subgenus *Eumelilotus* were surveyed from the viewpoint of biochemical traits.

The results obtained are summarized as follows;

A. Cytological relationships among the nine species in the subgenus *Eumelilotus*

1. Although *M. altissima* showed cross-compatibility with the other eight species in *Eumelilotus*, all F_1 plants were inviable because of heavy chlorosis. However, three and two F_1 plants of the crosses *M. alba* $\times$ *M. altissima* and *M. altissima* $\times$ *M. taurica* survived by *in vitro* culture and reached the flowering stage. F_1 plants of *M. alba* $\times$ *M. altissima* showed chromosome configuration with one quadrivalent and 6 bivalents or one trivalent, 6 bivalents and one univalent at MI stage of meiosis. On the other hand, chromosomal pairings at meiosis of F_1 plants of *M. altissima* $\times$ *M. taurica* were normal. This result indicates that *M. altissima* has the same chromosome configuration as the *dentata* group.

2. Crossed seeds of the cross *M. suaveolens* $\times$ *M. wolgica* were obtained for the first time in the experiment. Although the F_1 plants were inviable because of heavy chlorosis at a nursery bed, *in vitro* culture made them grow to the flowering stage. They showed normal pairings of chromosomes at MI of meiosis, though averaged pollen fer-

tility was 18 %. This result indicates the absence of any structural differences of chromosomes between *M. suaveolens* and *M. wolgica*. Furthermore, this result verified the result in triple crosses that the *officinalis* group and the *dentata* group have the same chromosomal constitution.

3. From these results it was concluded that only *M. alba* was differentiated from the other *Eumelilotus* species by one reciprocal translocation.

B. Identification of translocated chromosomes and combined segregation between translocated chromosomes and the gene for pollinator visitation

1. SDS method for G banding of chromosomes was applied to identify translocated chromosomes between *M. alba* and *M. suaveolens*. Although no bands were observed at metaphase because of heavy concentration, several clear bands were recognized near centromere at prometaphase. Based on the lengths, arm ratios and banding patterns of chromosomes, the karyotypes of *M. alba*, *M. suaveolens* and hybrids between them were decided.

2. *M. alba*, compared with *M. suaveolens* had a smaller satellite and a longer long-arm of SAT-chromosome. On the other hand, structural differences between SAT-chromosomes and between the shortest chromosomes were observed through analysis of karyotype of the hybrid.

3. From these results, it was concluded that subterminal segments of chromosome-5 and -8 (SAT-chromosome) of *M. suaveolens* were translocated reciprocally. Consequently, Chromosome-7 and -8 (SAT-chromosome) of *M. alba* were derived from translocated chromosome-5 and -8 of *M. suaveolens*, respectively.

4. One of the chromosomes formed cross-shape at Pachytene, which indicates reciprocal translocation attached to the nucleolus in F_1 of the cross *M. alba* $\times$ *M. suaveolens*. Homozygote and heterozygote for SAT-chromosome type were homozygous and heterozygous for reciprocal translocation, respectively, in F_2 of the cross *M. alba* $\times$ *M. suaveolens*. These results support the view that SAT-chromosome includes the translocated segment.

5. In F_2 of the cross *M. alba* Brandon Dwarf $\times$ *M. suaveolens* Redfield Yellow, segregation of homozygote and heterozygote for reciprocal translocation showed a good fitness to a ratio of 1 : 1. Com-

bined segregations between zygote type of reciprocal translocation and *Ncg* gene responsible for pollinator visitation were examined in the F_2 . *Ncg* (*Nectar guide*) gene was found to be linked with a break-point with the recombination value of 9.5 ± 5.3 %.

6. From analysis of combined segregation between *Ncg* gene and SAT-chromosome type which included translocated segment in the F_2 , excessive frequency of *Ncg*⁺ gene was observed in homozygous plants for S SAT-chromosome type. This result indicates that *Ncg* locus is located on SAT-chromosome derived from *M. suaveolens*.

C. Interspecific relationships based on biochemical characters

1. Interspecific relationships in *Eumelilotus* were examined on the basis of isozymes and seed proteins.

2. Four bands for LAP, five bands for PGM and PGI and three bands for EST, IDH and POX were obtained as isozyme markers. Variations in each isozyme were few among the species except for LAP, and each species was relatively homogeneous for each isozyme.

3. Based on principal component analysis for a total of 23 bands of 6 isozymes, *M. altissima*, *M. taurica* and *M. dentata* were discriminated from the other species, which, on the other hand, overlapped with each other.

4. Cluster analysis for a total of 23 bands for 6 isozymes distinguished *M. suaveolens*, *M. wolgica* and *M. taurica* from the other species. Although *M. alba* and *M. officinalis* belonged to several clusters, these clusters did not involve with any other species.

5. A total of 54 bands for seed proteins in *Eumelilotus* species were detected by SDS-PAGE. Large variations of seed proteins were observed among species. *M. alba* and *M. officinalis* showed large intraspecific variations. On the other hand, *M. suaveolens* and *M. wolgica* had extremely small variations.

6. Based on principal component analysis for a total of 49 bands of seed proteins, each species formed a distinctive group except that one strain of *M. hirsuta* overlapped with *M. alba*. Furthermore, cluster analysis for a total of 49 bands demonstrated high similarity of seed proteins in each species.

However, *M. alba* was classified into three types for seed proteins and No. I group of *M. alba* was related to *M. officinalis*.

7. It was clarified that only *M. suaveolens* for-

med a distinct cluster in cluster analyses of isozymes as well as of seed proteins. This result suggests that *M. suaveolens* evolved characteristically in the subgenus *Eumelilotus*.