HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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 x M. messanensis の細胞学的研究
Author(s)	喜多, 富美治
Citation	北海道大学農学部附属農場報告, 12, 74-82
Issue Date	1964-02-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13267
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_p74-82.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

喜多富美治

I. 緒　　言

Melilotus alba × *M. dentata* の交雑により SMITH (1943) が Sweet clover の最も欠点とされる含有成分 coumarin を殆んど含まない品種の育成に可能性を与えてから，Sweet clover の育種に対する，種間交雑法が大きく注目されるに至った。

Melilotus 属には約 22 の種が知られているが種間の交雑はその成功が容易でなく，細胞遺伝学的にも多くの研究者によってとりあげられている。すなわち BRINGHURST (1955) は (*M. alba* × *M. dentata*) × *M. dentata* の F_1 において相互転座の存在を示唆し，WEBSTER (1955) は胚培養により *M. officinalis* × *M. alba* の F_1 の育成に成功し，この F_1 雑種について SHASTRY, SMITH and COOPER (1960) は減数分裂の移動期及び第1中期において規則的なII価の接合を観察している。又 SHASTRY, et al (1960) は *M. messanensis* × *M. segetalis* の F_1 において，逆位及び相互転座の存在を明らかにし JARANOWSKI (1961) は *M. polonica* × *M. alba* の F_1 について相互転座を，喜多 (1962) は *M. alba* × *M. hirsuta* の F_1 雑種において同じく相互転座の存在を報告している。かように種間雑種に関する細胞遺伝学的研究は育種学的基礎の上にも，また *Melilotus* 属の種の進化の究明にも極めて興味ある問題を提起しつつある。

本報においては，*M. segetalis* × *M. messanensis* の交雑 F_1 について主として細胞遺伝学的研究を行ない相互転座及び逆位の存在を確認するとともに，核型の検討により更に詳細に両種間の種の系統発生的関係を明らかにし得たのでここに取纏め報告する。

なお，本実験に使用した材料は Department of Genetics, University of Wisconsin の W.K. SMITH 博士より提供せられたもので，ここに記して深甚なる謝意を表する。また実験遂行と取纏めに関し種々御教示を賜った長尾正人博士に対し厚く感謝の意を表する次第である。なお本実験は文部省科学研究費の援助によったもので，記して謝意を表する。

II. 実験材料及び方法

用いた材料は *M. segetalis* N 80 と *M. messanensis* C 21 で共に *Micromelilotus* に属する1年生の野生種である。1960 年両種を温室内で育成し，交配は開花直前で葯が裂開していない花を用い除雄をし，除雄1日後及び2日後の2回にわたって花粉親から花粉をとり授粉を行なった。交雑の方向は *M. segetalis* を母とし *M. messanensis* を花粉親として用い，8個体の F_1 種子を得た。1961 年にこれらを温室内で育成し供試したが，他の種間雑種に見られるような葉緑素欠乏はなく正常な生育をした。除雄及び交配方法は前報 (喜多，1962) に記した方法に従った。

減数分裂の観察には，花蕾を塩基性酢酸第二鉄を 45% 酢酸で飽和した液数滴を混入したカルノア 3:1 液で固定し，冷蔵庫中に 24 時間放置後アセトカーミンで染色し検鏡した。また体細胞染色体の観察には根端を用い，材料を 0°C に近い冷蔵庫内で 14～15 時間低温処理を行ない，カルノア

3:1 液で固定後 1 N-HCl で 10 分間加水分解しホイルゲン氏核染色法により染色検鏡した。

Fig. 1 Inflorescence and leaves.
(a) *M. segetalis* (b) *M. segetalis* × *M. messanensis* F_1 (c) *M. messanensis*

III. 実験結果

1. 外部形態の比較

M. segetalis と *M. messanensis* とは外部形態的に種々の相違があるが，その種間雑種 F_1 を両親の種と比較対照して述べると次の如くである。

初期生育における節間の伸長は *M. messanensis* において極めて緩慢であり，花蕾形成の直前頃より急速に促進せられる。したがって葉が茎の下部に叢生する如き草姿を示す。これに反し *M. segetalis* は節間の伸長は生育全期を通じ平均しており，従って常にある程度伸長した状態の節間の各節から葉が伸長する。F_1 植物は *M. segetalis* 型を示す。

M. segetalis, *M. messanensis* とも総状花序であるが，その花軸の長さを同一節に生ずる複葉の長さと比較すると *M. segetalis* は花軸が葉より長く (Fig. 1-a), *M. messanensis* は花軸が葉より顕著に短い (Fig. 1-c)。F_1 植物は花軸の長さが葉の長さとほぼ同じで，すなわち両親の中間を示す (Fig. 1-b)。

小葉は両種とも鈍鋸歯状の葉縁を有し，*M. messanensis* の葉肉が *M. segetalis* のそれよりも厚い。F_1 植物の葉縁は同じく鈍鋸歯状であるが，葉肉の厚さはむしろ *M. segetalis* に近い (Fig. 1-a, b, c)。

花は両種とも黄色を呈し，F_1 植物も含めて差異はないが，旗弁と竜骨弁の長さを比較すると，*M. segetalis* では旗弁が竜骨弁より短かく *M. messanensis* では旗弁が竜骨弁とほぼ同じか若干長い。F_1 植物の花は旗弁が竜骨弁とほぼ同じかむしろ若干短い。花の全体の長さは *M. segetalis* は約 7 mm であるのに対し *M. messanensis* では約 4 mm で，F_1 植物は中間の約 6 mm である。

莢の先端は *M. segetalis* ではまるくなっているのに対し *M. messanensis* では尖っており，F_1 植物のそれは *M. messanensis* に類似する。

以上の如き形態的差異を示すが，外観的に F_1 植物は *M. segetalis* に類似する。

2. 細胞学的観察

親に用いた *M. segetalis*, *M. messanensis* の花粉稔率は両種とも約 95% を示し，PMC における染色体行動は第 1 中期で，規則的に 8_{II} を形成する (Fig. 2-a, b)。*M. segetalis* × *M. messanensis* F_1 は高度の花粉不稔を示し，花粉稔率は約 17.8% を示した (Fig. 2-f)。

F_1 植物の減数分裂においては，種々の不規則性が観察される。すなわち移動期において $1_{IV}+6_{II}$ 及び $1_{III}+6_{II}+1_I$ の接合型が観察された (Fig. 2-c,

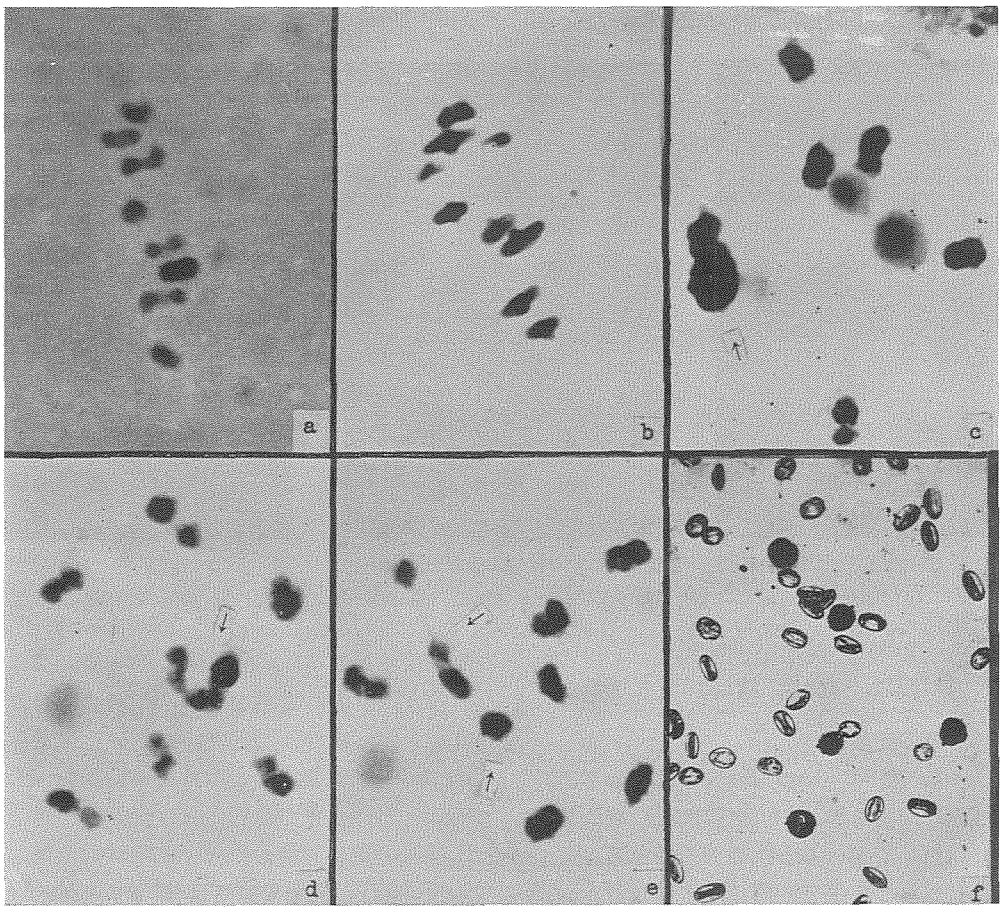

Fig. 2 (a) *M. segetalis.* Metaphase-1 with 8_{II}.
(b) *M. messanensis.* Metaphase-1 with 8_{II}.
(c) *M. segetalis* × *M. messanensis* F_1.
Diakinesis with 6_{II} plus a ring of 4 chromosomes indicated by arrow.
(d) *M. segetalis* × *M. messanensis* F_1.
Diakinesis with 6_{II} plus a chain of 4 chromosomes indicated by arrow.
(e) *M. segetalis* × *M. messanensis* F_1.
Diakinesis with $6_{II}+1_{III}+1_I$. A trivalent and a univalent are indicated by arrows.
(f) *M. segetalis* × *M. messanensis* F_1.
Normal and aborted pollen grains.

d, e)。此のIV価は4連染色体環もしくは鎖となってあらわれる。$1_{III}+6_{II}+1_I$ の接合型の出現は $1_{VI}+6_{II}$ の4連染色体の1つが早期離反することによるものと推定される。

第1中期においては大部分の核において $1_{VI}+6_{II}$ の接合型を示し，小頻度で $1_{III}+6_{II}+1_I$ 及び 8_{II} の接合型が観察された (Fig. 3-a, b, c, d, e, f)。IV 価染色体は移動期におけると同様4連染色体の環もしくは鎖になって出現し，赤道板上で alternate segregation 及び adjacent segregation に結果する種々の分離型を示した。$1_{III}+6_{II}+1_I$ の接合型は移動期におけると同様，$1_{IV}+6_{II}$ の接合型より由来したもので両接合型は同一起源を有するものと考えられる。この移動期及び第1中期に出現する IV 価は相互転座に由来すると考えるのが妥当である。

第1後期において遅滞染色体，9-7の異常分離 (Fig. 4-b, c, d, e) が観察されたが観察数55の核の

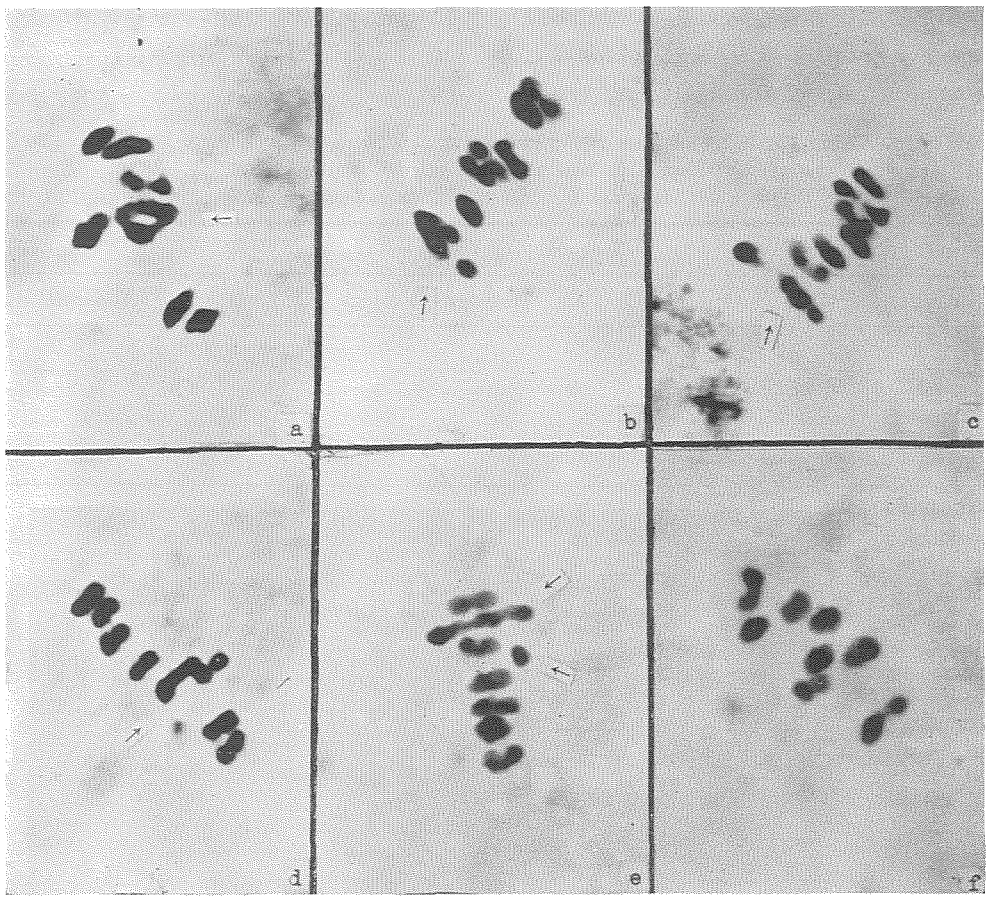

Fig. 3 Metaphase-1 of the F_1 hybrids, *M. segetalis* × *M. messanensis*.

(a) 6_{II} plus a ring of 4 chromosomes indicated by arrow.
(b) Terminal members disjoining from the median members of the chain of 4 chromosomes indicated by arrow.
(c) Nondisjunctional chromosomes of the chain move to each pole. The chain of 4 chromosomes are indicated by arrow.
(d) Alternate separation of members of the chain indicated by arrow.
(e) $1_{III}+6_{II}+1_I$ configuration. A trivalent and a univalent are indicated by arrows.
(f) 8_{II} configuration.

12の核に chromatin bridge が存在した (Fig. 4-a)。すなわち chromatin bridge と acentric fragment が観察され，これは逆位の存在を示し，その逆位は centromere を含まない部分に起きていることを示す。

第II後期においては遅滞染色体及び小核等が観察された。減数分裂における各期の接合型及び出現頻度を示すと Table 1 のごとくである。

3. 核型の比較

減数分裂に見出された相互転座及び逆位がいづれの染色体におきているかを知るため，*M. segetalis* 及び *M. messanensis* の核型を検討した。染色体が極めて小さいため細部について明確に検討することは困難であったが，両種とも $2n=16$ の染色体を有し最大の1対は共に2次狭窄を有していることを観察した。*M. segetalis* においては1次狭窄と2次狭窄との間は極めて短く，介在附随体 (DARLINGTON 1932) であると確認された。これに対し *M. messanensis* は通常の附随体染色体であり，この点に関し両種間で明瞭に識別し得る形

態的差異を示した (Fig. 5-a, b, c, d, e)。また2番目に属する各1対の染色体は比較的な大きさと centromere の位置に多少の差があると思考されるが，その他の染色体におけると同様明確に差異を断定することは困難であった。

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

	Frequency of PMCs with								
Stage of meiosis	$1_{IV}+6_{II}$	$1_{III}+6_{II}+1_{I}$	8_{II}	8-8	8-8+bridge	9-7	Normal	Abnormal	Total
Diakinesis	54	12							66
Metaphase-1	84	8	3						95
Anaphase-1				34	12	9			55
Anaphase-2							37	10	47

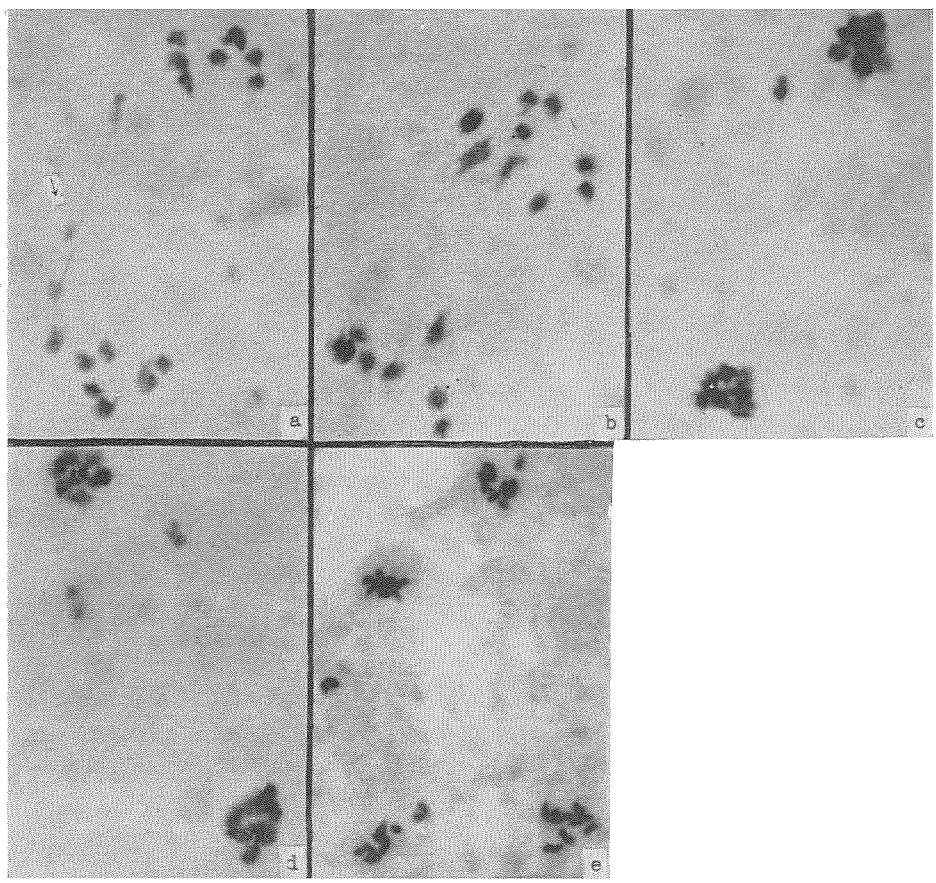

Fig. 4 Anaphase-1 and anaphase-2 of the F_1 hybrids, *M. segetalis* × *M. messanensis*.
(a) Chromatin bridge and an acentric fragment are indicated by arrow.
(b) 7-9 disjunction.
(c) Late anaphase-1 with a lagging chromosome.
(d) Late anaphase-1 with lagging chromosomes.
(e) Anaphase-2 with lagging chromosomes.

IV. 考　　察

種間雑種 *M. messanensis* × *M. segetalis* の F_1 植物の減数分裂の研究において，SHASTRY, SMITH and COOPER (1960) は相互転座及び逆位の存在を既に報告している。すなわち F_1 植物は 98～99% の極めて高度の花粉不稔率を示し，移動期及び第1中期の IV 価の出現と，第1後期の chromatin bridge の存在に加えるに Pachytene chromosome の分析により相互転座と逆位の存在を確認した。更に Pachytene analysis により，II 価染色体の接合が部分的であり，また重復或いは欠失に起因する "loop shape" の接合を観察し，両種間には相互転座及び逆位に加えてゲノム間に部分的非相同があることを指摘した。

筆者が観察した *M. segetalis* × *M. messanensis* の F_1 植物は SHASTRY らの F_1 材料と対比すれば逆交雑の関係にある。そしてその移動期及び第1中期における IV 価の出現と第1後期に観察される chromatin bridge により F_1 植物は相互転座及び逆位異型体であるということが可能であり，この点に関しては SHASTRY らと同一の結論に到達したといえる。

しかしながらII価を形成すべき染色体間の部分的非相同に関しては，移動期及び第1中期に出現するI価が明らかに4連染色体の1つから早期離反により分れて出現したこと，$1_{IV}+6_{II}$ の接合型の 6_{II} より由来したI価染色体の存在は観察されなかったことなどにより SHASTRY らが提唱する部分的非相同の存在にはなお検討すべき余地が残されているように思われる。すなわち部分的非相同があり，また SHASTRY らが Pachytene 染色体において認めたごとく，相同部分の大きなものから小さいものまであるとするならば，キアズマの不形成により或程度の頻度で $1_{IV}+5_{II}+2_I$ に類する接合型が期待されなければならない。しかしながら SHASTRY らはこの接合型の観察を報告しておらず，また筆者の観察においてもこれに類する接合型は見当らなかった。更に花粉不稔率に関して SHASTRY らは 98～99% の殆んど完全に近い不稔率を示しているのに対し，筆者の実験においては約82.2% を示し，相互転座及び逆位に加えてII価を形成すべき染色体間の部分的非相同に関してはむしろ負の結果である。しかしながら部分的非相同を筆者の実験結果から全面的に否定することは出来ない。ただ Pachytene analysis は Pachytene stage の正常な染色体行動を明確に把握した上で極めて高い精度をもって異常現象を追及しない限り，Pacnytene analysis のみの結果から直ちに結論を出すことは無理であると考える。

Melilotus 属の核型の研究は未だ報告がない。筆者は種間雑種の減数分裂に観察された相互転座及び逆位が，どの染色体に起きているかを核型の上から検討を試みた。その結果 *M. segetalis* 及び *M. messanensis* の核型は，染色体数，大きさ，附随体染色体の数等において極めて類似しているということが出来る。すなわち両種は近縁関係にあると推定される。しかしながら染色体が極めて小さく附随体染色体を除いて次中部及び中部染色体からなっているが，個々の染色体を明確に識別することは困難であり，今後の詳細な研究に待つところ大である。従って本研究においては *M. segetalis* の附随体染色体は介在附随体を有し，*M. messanensis* の附随体染色体は通常の附随体を有している点においてのみ両種間の核型に明確な形態的差異があることを指摘し得る。

敍上のことから両種のいずれかの附随体染色体に逆位もしくは転座が起きていることは明らかで逆位に関係しているか相互転座に関係しているかを決定するには附随体染色体以外の染色体の核型を更に明らかにするとともに，介在附随体染色体の生起の由来を明らかにすることが必要である。

M. messanensis は一年生の野生種であるが，coumarin を殆んど含まない種であり，また GREENSHIELDS (1954) によると北米で問題になっている Sweet clover weevil に対して他のどの種よりも強い耐虫性を有している。この2点に関して育種的見地より極めて望ましい遺伝子源であるといえる。しかしながら GREENSHIELDS (1954), JARANOWSKI (1962) は栽培品種の *M. alba* との交雑を試み，授粉後10日前後で胚の発育が停止し，F_1 雑種を得るためには胚培養が一つの方法であろうと

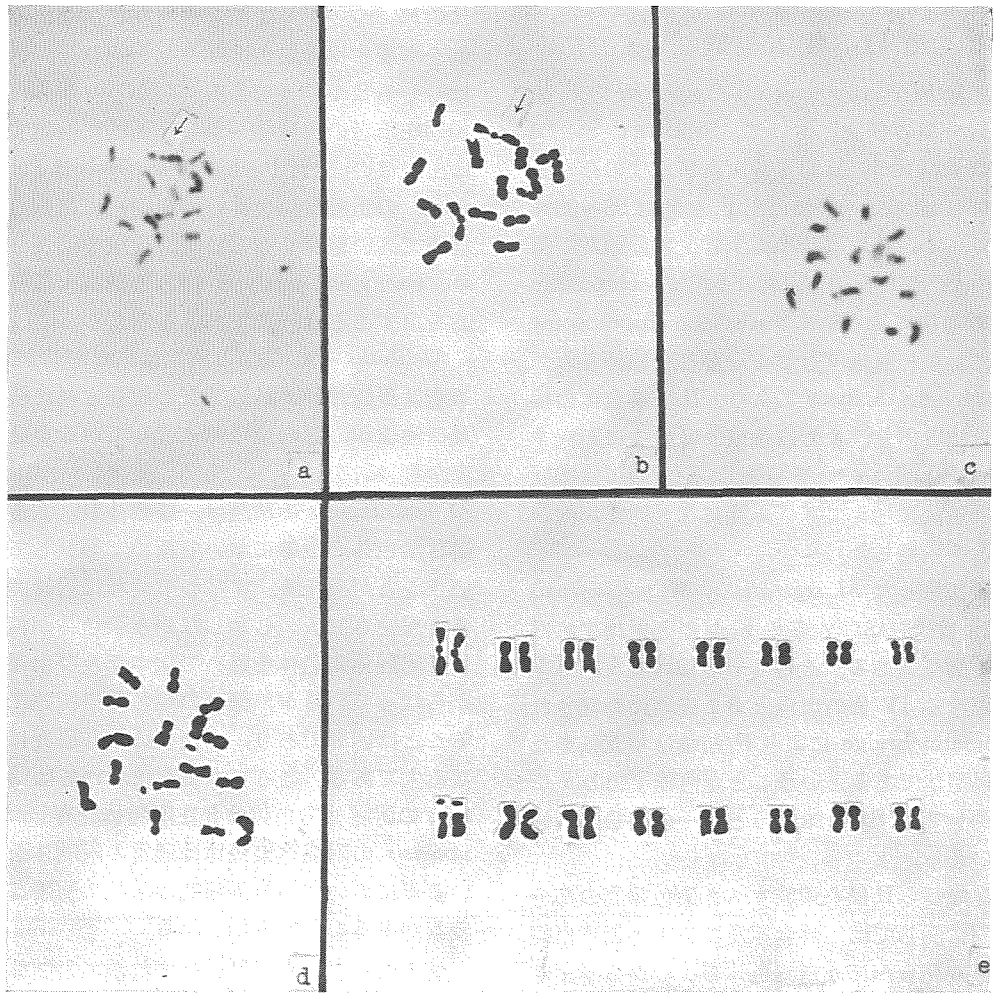

Fig. 5 Morphology of somatic chromosomes of *M. segetalis* and *M. messanensis.*

(a) Somatic chromosomes of *M. segetalis.* An intercalary chromosome is indicated by arrow.
(b) Camera Lucida sketch of (a). An intercalary chromosome is indicated by arrow.
(c) Somatic chromosomes of *M. messanensis.*
(d) Camera Lucida sketch of (c).
(e) upper: Karyotype of *M. segetalis.*
The largest pair of chromosomes are satellited chromosomes with an intercalary trabant.
lower: Karyotype of *M. messanensis.*
The largest pair of chromosomes are normally satellited chromosomes.

述べている。また SMITH (1953), GREENSHIELDS (1954) は *Melilotus* 属の種間の交雑和合性を研究し多くの組合せにおいて胚発育の過程において退化し F_1 種子が得られないことを報告している。一方種間雑種 F_1 の減数分裂の研究より BRINGHURST (1955), SHASTRY, SMITH and COOPER (1960), JARANOWSKI (1961), 喜多 (1962) らは相互転座及び逆位が *Melilotus* 属の種の分化に関与していることを報告している。これらの問題の究明にあたって *Melilotus* 属に属する種全般にわたって核型が明らかにされることが必要であろう。

V. 摘　　要

種間雑種 *Melilotus segetalis* × *M. messanensis*

の F_1 について，主として細胞遺伝学的実験を行なった。その結果を要約すると次のごとくである。

1. 移動期及び第1中期に通常1個の4連染色体環もしくは鎖が存在し，F_1 植物は相互転座異型体であることを示した。

2. $1_{III}+6_{II}+1_I$ の接合型が移動期及び第1中期に少頻度で出現するが，これは $1_{IV}+6_{II}$ の IV 価から1つの染色体が早期離反したもので，両接合型は同一起源のものである。

3. 第1後期において chromatin bridge と acentric fragment が観察され，F_1 植物は centromere を含まない部分の逆位異型体であることが確認された。

4. SHASTRY (1960) らが報告した II 価の接合が期待される染色体の部分的非相同性に関しては，IV 価と I 価が共存する接合型すなわち $1_{IV}+5_{II}+2_I$ に類する接合型が観察されなかったことより，むしろ否定的見解に到達した。

5. 相互転座と逆位がいづれの染色体に起きているかを *M. segetalis*, *M. messanensis* の核型の上から検討した。染色体が小さいため詳細な核型を明らかにすることは困難であるが，最大の1対は両種とも附随体染色体であり，*M. segetalis* のそれは介在附随体を有しこの点で明瞭な核型の差異を示した。すなわちこの附随体染色体のいづれかが転座及び逆位を起していると推定される。

参考文献

1) BRINGHURST, R. S. (1951): Genetic analysis of chlorophyll deficiency in *Melilotus alba* × *M. dentata* hybrids with some observations on meiotic irregularities. Summaries of Doctoral Dissertations, Univ. of Wis. 11: 96–97.

2) GREENSHIELDS, J. E. R. (1954): Embryology of interspecific crosses in *Melilotus*. Canadian Jour. Bot. 32: 447–465.

3) JARANOWSKI, J. K. (1961): Semisterility in the interspecific hybrid *Melilotus polonica* × *M. alba*. Amer. Jour. Bot. 48: 28–35.

4) ————. (1962): Development of embryos and seeds in certain species and species crosses in *Melilotus*. Genetica Polonica 3: 45–59.

5) KITA, F., M.L. MAGOON, and D.C. COOPER (1959): Simple smear techniques for the study of chromosomes of *Melilotus*. Phyton 12: 35–38.

6) 喜多富美治 (1962): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究 第1報 種間雑種 *Melilotus alba* × *M. hirsuta* の細胞遺伝. 北大邦文紀要 第4巻第1号: 67–74.

7) SHASTRY, S. V. S., W. K. SMITH and D. C. COOPER (1960): Chromosome differentiation in several species of *Melilotus*. Amer. Jour. Bot. 47: 613–621.

8) SMITH, W. K. (1943): Propagation of chlorophyll-deficient sweetclover hybrids as grafts. Jour. Heredity 34: 135–140.

9) ————. (1954): Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. Genetics 39: 266–279.

10) WEBSTER, G. T. (1950): Fertiiity relationships and meiosis of interspecific hybrids in *Melilotus*. Agron. Jour. 42: 315–322.

11) ————. (1955): Interspecific hybridization of *Melilotus alba* × *M. officinalis* using embryo culture. Agron. Jour. 47: 138–142.

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

II. Cytological Study of the Interspecific Hybrid, *Melilotus segetalis* × *M. messanensis*.

Fumiji KITA
(Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Summary

The interspecific hybrids between *Melilotus segetalis* and *M. messanensis* are readily secured. The F_1 hybrids (*M. segetalis* × *M. messanensis*) are highly sterile with a mean percentage of 82.2 defective pollen grains.

A ring or chain of four chromosomes and six bivalents are regularly present at diakinesis and metaphase-1 of microsporogenesis. A chromatin bridge and an acentric fragment are observed at anaphase-1. The configurations at metaphase-1 and anaphase-1 mentioned above are the evidences that the F_1 plants are heterozygous for a reciprocal translocation and an inversion.

In karyotype analysis, chromosome structural differences are clearly demonstrated between the pairs of satillited chromosomes of two parental species, accounting at least for reciprocal translocation or inversion.