



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基础研究 : 第III報 種間雑種 Melilotus sulcata x M. macrocarpa の細胞学的研究
Author(s)	喜多, 富美治; KITA, Fumiji; 新関, 稔 他
Citation	北海道大学農学部附属農場報告, 13, 1-7
Issue Date	1965-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13278
Type	departmental bulletin paper
File Information	13_p1-7.pdf



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 *Melilotus sulcata* × *M. macrocarpa* の細胞学的研究

喜多富美治・新関 稔

I. 緒 言

Melilotus (Sweet clover) 属の種間雑種に関する細胞遺伝学的研究は、種間交雑による Sweet clover 育種の基礎研究としても、また本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。

筆者らは特に種間雑種 F_1 の細胞遺伝学的研究を進めつつあるが、本報においては *M. sulcata* × *M. macrocarpa* F_1 の成熟分裂で逆位の存在を確認し、その他若干の興味ある問題を観察し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. U.S.A. の W. K. SMITH 博士に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。また実験遂行と取纏めに関し種々御教示を賜わった長尾正人博士及び高橋萬右衛門博士に対し深く感謝の意を表する次第である。

また本実験は文部省科学研究費の援助に一部よったものであり、ここに記して謝意を表す。

II. 実験材料及び方法

M. sulcata N 118 を母とし、*M. macrocarpa* AC 336 を花粉親として 1963 年温室内で交配を行った。両種とも亜属 *Micromelilotus* に属する 1 年生である。交配方法は前報において報告した如くで (喜多 1962, 1964), 交配花数 12 より 4 種子が得られこれら交雑種子は全て充実種子であった。得られた種子はシャーレー内で発芽され、発芽と同時に苗箱に移植しその後は温室内で育成された。4 種子から健全な実生が発育したが本葉数葉に及んで形態的特性、特に葉の形態から 2 個体

が種間雑種であることが推定された。この 2 個体は更に素焼鉢に移植され温室内で育成され供試された。

花粉母細胞の成熟分裂の観察に当ってはカルノア 3:1 液に塩化第 2 鉄を 45% 氷酢酸に飽和した液数滴を加えて固定し、3~4°C の冷蔵庫内に約 24 時間保存後酢酸カーミンで染色検鏡した。

III. 実験結果

1. 外部形態の比較

M. sulcata, *M. macrocarpa* 及びこれらを両親とする種間雑種 F_1 植物の外部形態の比較は次のように要約出来る。*M. sulcata* の小葉は細長い槍形で濃緑色である。*M. macrocarpa* は倒卵形に近いきび形で *M. sulcata* に比し若干薄い緑色を示す。小葉の大きさは *M. macrocarpa* が大きく *M. sulcata* の約 2~3 倍の大型の葉を有している。 F_1 植物の葉形、葉面積は両親のほぼ中間であるが、葉縁歯数は両親より多く密となっている。また葉色は正常な緑色で他の種間雑種で認められた如き葉緑素欠乏の現象は認められなかった。

花に関しては、*M. sulcata* において竜骨弁 > 旗弁 > 翼弁 また *M. macrocarpa* において旗弁 > 竜骨弁 > 翼弁の関係にあり、 F_1 植物では竜骨弁 > 旗弁 > 翼弁の順位を示し *M. sulcata* に類似する。花全体の大きさを最長花弁と比較してみると *M. sulcata* は約 3.7 mm, *M. macrocarpa* は約 8.1 mm であるのに対し、 F_1 植物では 6.2 mm で両親のほぼ中間値を示す。花軸の長さ及び花数では *M. sulcata* は平均 4.8 cm の花軸に 17.4 花, *M. macrocarpa* では平均 13.0 cm の花軸に 38.1 花であるが、 F_1 植物では花軸は両親の中間の 11.0 cm

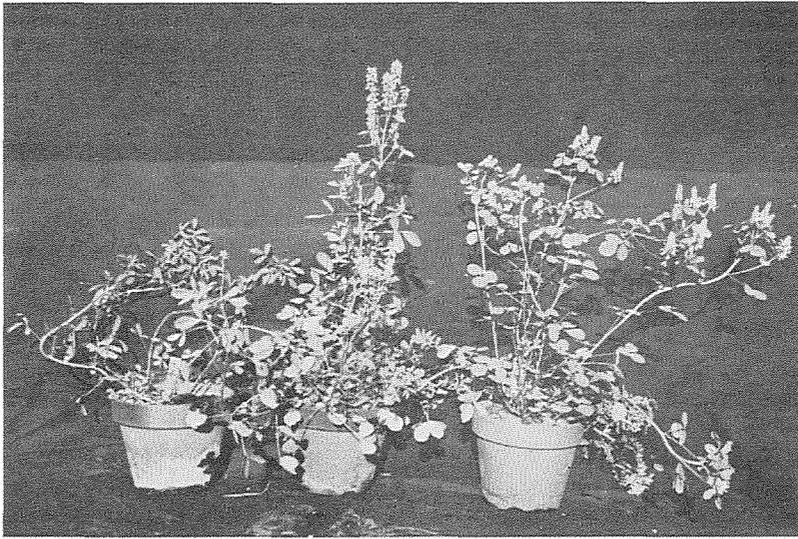


Fig. 1 Comparison of plant types between the F_1 hybrid plant and its parental species at flowering stage.

Left: *M. sulcata*. center: *M. sulcata* × *M. macrocarpa* F_1 . right: *M. macrocarpa*.

を示すが花数は 40.3 で両親より多くなっている。

種子は両親及び種間雑種 F_1 共に 1 莢 1 粒単位で、種子の大きさは *M. macrocarpa* は *M. sulcata* より大きく、 F_1 植物ではその中間であり形は *M. macrocarpa* に類似している。

2. 細胞学的観察

M. sulcata 及び *M. macrocarpa* の花粉稔率は各々 100% 及び 96.8% を示し、成熟分裂の移動期及び第 1 中期で規則的に 8 II を形成し第 1 分裂、第 2 分裂共に正常であることが観察された。 F_1 植物の花粉稔率は 51.4% で両親より極端に低く着莢率は自然授粉状態で 21.2% であった (Fig. 2-a)。

種間雑種 F_1 植物の花粉母細胞の成熟分裂を観察した結果下記のような対合及び分離を示した (Fig. 2, 3)。なお移動期、第 1、第 2 中期の接合形及び第 1 後期、第 2 後期の分離形式の出現頻度は Table 1, 2 に示した通りである。

第 1 中期で 8 の II 価染色体中 1 つが他の II 価染色体より大型でかつ、その II 価を構成する 2 つの染色体の大きさが相互に異なる接合を示し、第 1 中期の初期ではその特殊な形態は判然としないが染色体が赤道板上に並列する頃には明確に上述した特殊な接合状態が観察された (Fig. 2-e, f)。この染色体は移動期では染色体の一部を仁に付着

させた仁染色体であり、その形態は ring 状 II 価、rod 状 II 価、及び 1 つの染色体が既に分離して見えるものの 3 型に分類された (fig. 2-b, c, d)。しかしながらいづれの型においても 1 つの染色体は他に比して小さかった。この染色体は第 1 後期で分離後一方の染色体が 2~3 倍の大きさであり、また早期離反の傾向を示し第 1 中期では 46.4% が早期離反しており既に両極に移行してしまったものも小頻度ではあるが観察された (Fig. 2-g, h)。第 1 中期ではこの外 I 価染色体が観察され、7II+2I の接合型が 3 核存在した。この 2 つの I 価染色体は上述した早期離反しやすい染色体に由来するものではないことが形態的に明らかであった。

第 1 後期においては chromatid bridge 及び acentric fragment を共に有しているものが 181 の観察核中 16 観察され paracentric inversion の存在が明確となった (Fig. 3-a)。しかしここで 16 核中 3 は bridge が赤道板上で切れて両極に引かれた痕跡を残しているものであった。他に bridge を有せず fragment 1 個のみを有するものが 49 核、2 個を有するものが 6 核観察された (Fig. 3-b, c)。また bridge だけのものも 2 核存在した。第 1 後期で一方の極に他の染色体より 2~3 倍大で明らかに区別し得る染色体が 1 個観察され、第 2 期中

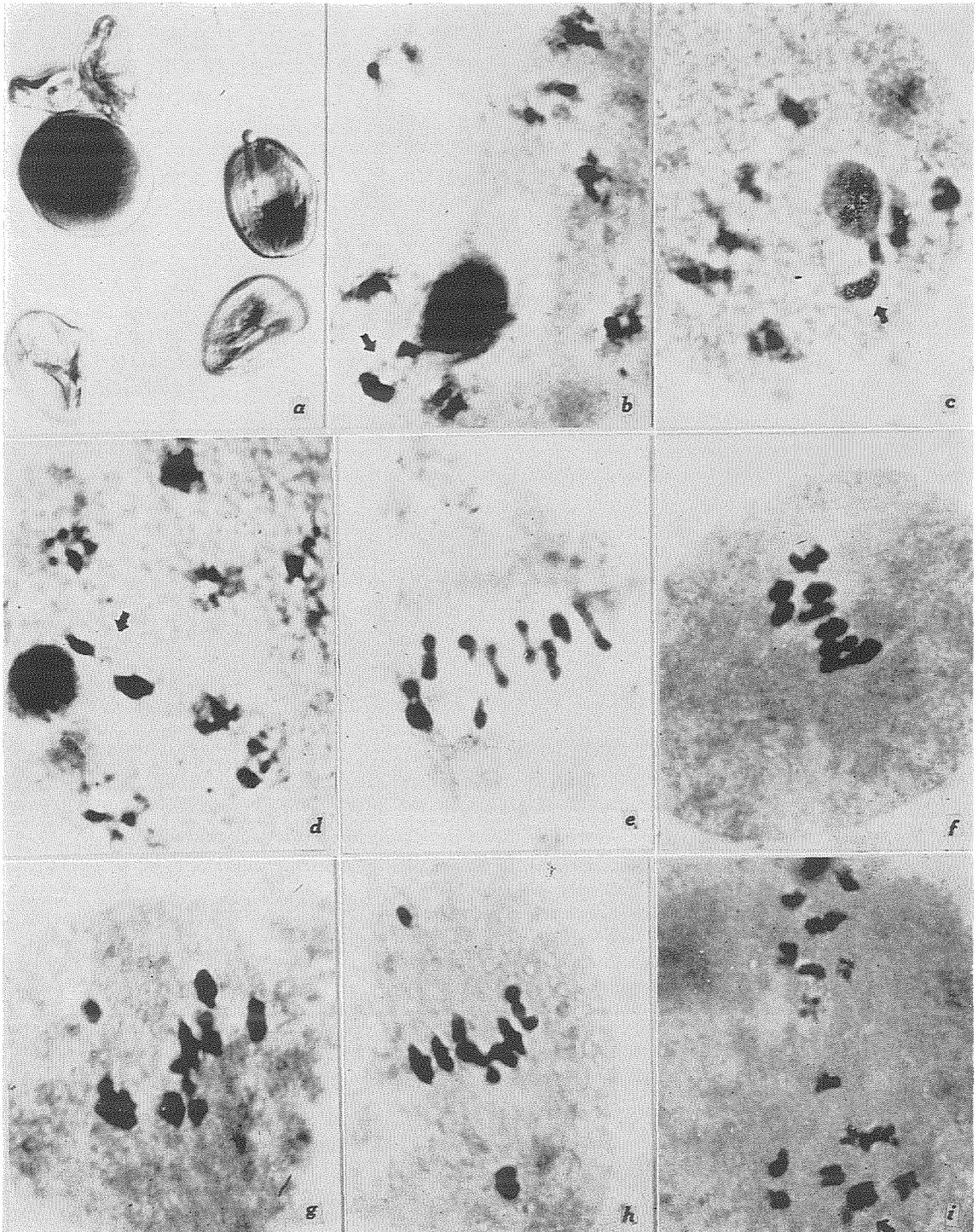


Fig. 2 Pollen grains and different stages in meiosis of the F_1 hybrid, *M. sulcata* \times *M. macrocarpa*.
 a. Normal and aborted pollen grains. b, c, d. Diakinesis with 8II. The nucleolar bivalent chromosome indicated by arrow shows unequal size of synapsis. e, f. Metaphase-1 with 8II. The biggest bivalent shows unequal size of synapsis. g. Mataphase-1. The bivalent which shows unequal size of synapsis separates precociously. One chromosome is two or three times bigger than the other. h. Metaphase-1. The precociously separated chromosomes have already moved to each pole. i. Metaphase-2. One big chromosome with particular shape indicated by arrow is observed in one pole.

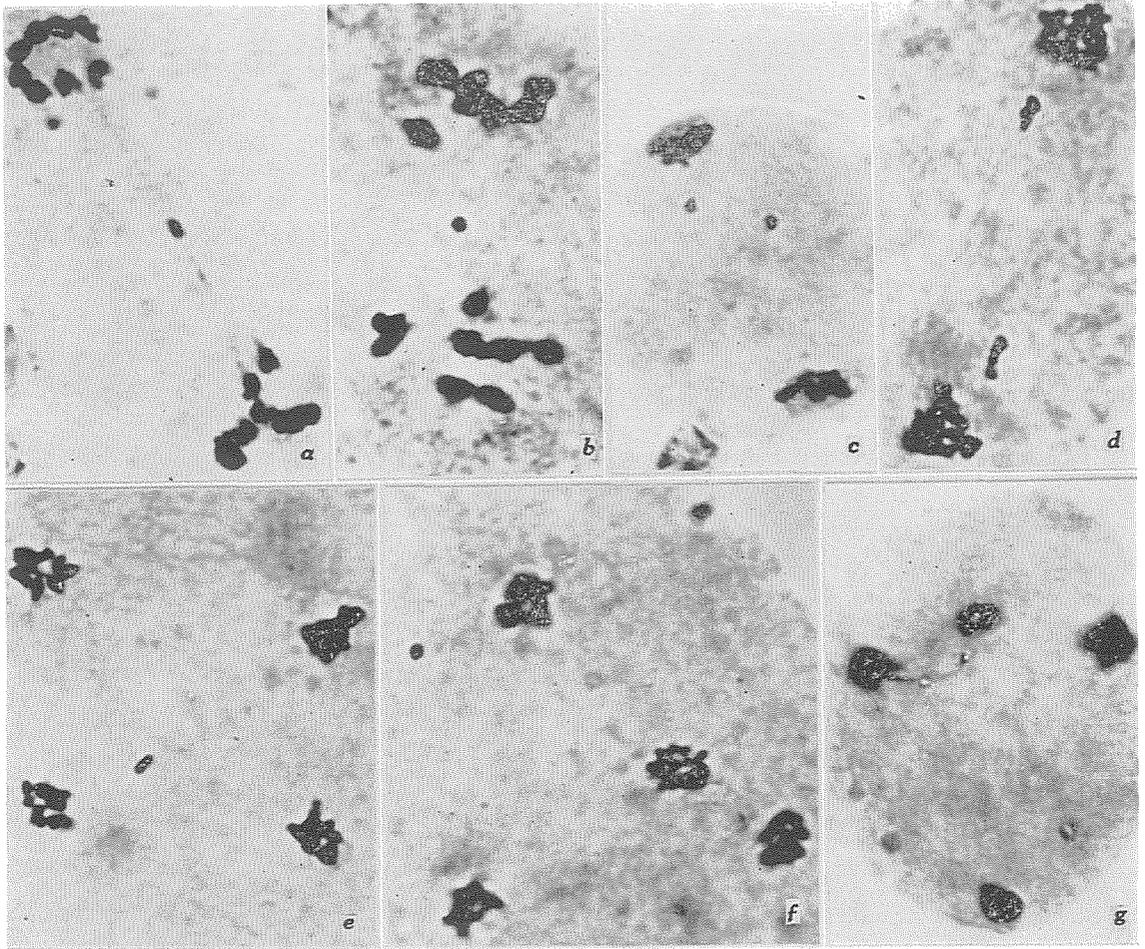


Fig. 3 Anaphase-1 and 2 in meiosis of the F_1 hybrid, *M. sulcata* × *M. macrocarpa*.

- a. Anaphase-1 with a chromatid bridge and an acentric fragment.
- b. Anaphase-1 with only one acentric fragment.
- c. Anaphase-1 with two acentric fragments.
- d. Anaphase-1 with lagging chromosomes.
- e. Anaphase-2 with an acentric fragment.
- f. Anaphase-2 with two acentric fragments.
- g. Anaphase-2 with a chromatid bridge in a member of the dyad.

ではこの染色体は他より大きいばかりでなく、Fig. 2-i で示されているように特殊な形態を示している。bridgeを生ずる染色体と大型の染色体は常に別個に存在するのが観察され、すなわち逆位を有する染色体と特殊な接合を示すII価染色体とは別個なものであることが明確である。他に第1後期で1~3個の遅滞染色体を有する核が15観察された (Fig. 3-d)。このうち遅滞染色体とacentric fragmentを共有したものが6核存在し、

fragmentは赤道板に近く遅滞染色体は極付近に観察されることから逆位を有する染色体がbridgeを生ずることにより両極への移行がおくれ、遅滞染色体として観察される場合もあると考えられる。

第2後期では75の観察核中正常四分子を形成したものが31で他はacentric fragment, chromatid bridge及び遅滞染色体等が存在した。1~2個のfragmentを有するものが24核、bridgeを

Table 1. Chromosome configuration at diakinesis and metaphase-1 in meiosis of the F₁ hybrids, *Melilotus sulcata* × *M. macrocarpa*.

Stage of meiosis	Frequency of PMCs with							Total
	8II with the following shapes:			8II with the following shapes:			7II+2I	
Diakinesis	16	36	6					58
Metaphase-1				16	66	71	3	156

Table 2. Chromosome configuration at anaphase-1, metaphase-2 and anaphase-2 in meiosis of the F₁ hybrids, *M. sulcata* × *M. macrocarpa*.

Stage of meiosis	Frequency of PMCs with								Total	
	no frag. and bridge	one frag. and bridge	one frag.	one bridge	two frag.	one frag. and laggors	laggers	nor.		abnor.
Anaphase-1	93	16	49	2	6	6	9			181
Metaphase-2	27		5							32
Anaphase-2								31	44	75

有するものが8核観察された (Fig. 3-e, f, g)。その他1~2個の遅滞染色体を有するものも若干観察された。

IV. 論 議

種間雑種の成熟分裂の研究は種の進化を論ずる上に極めて重要な意義をもつ。*Melilotus* 属の種間雑種に関する細胞遺伝学的研究について、既に BRINGHURST (1951) は (*M. alba* × *M. dentata*) × *M. dentata* について相互転座を報告している。更に SHASTRY, SMITH and COOPER (1960) は *M. officinalis* × *M. alba* の F₁ 雑種の成熟分裂は正常であるとし、また *M. messanensis* × *M. segetalis* の F₁ 雑種において移動期及び第1中期のIV価の出現と、第1後期の chromatid bridge と acentric fragment の存在を観察し F₁ 雑種は相互転座と逆位の異型接合体であることを明らかにした。その逆交雑 *M. segetalis* × *M. messanensis* F₁ において喜多 (1964) は同じく相互転座と逆位の存在を再確認し、核型分析より *M. segetalis* の付随体染色体が転座もしくは逆位に関与していることを指摘した。JARANOWSKI (1961) は *M. polonica* × *M. alba*

の F₁ において相互転座の存在を、また喜多 (1962) は *M. alba* × *M. hirsuta* の F₁ において同じく相互転座の存在を報告している。

本研究において供試した *M. sulcata* × *M. macrocarpa* の F₁ 雑種については、第1後期及び第2後期に出現する dicentric chromatid bridge 及び acentric fragment から F₁ 植物は paracentric inversion に関し異型接合体であると結論することが出来る。すなわち染色体の centromere を含まない部分に逆位がおきており、逆位部分及び interstitial segment* に起きる交叉の数と両者の組合せによって違った染色体行動が第1後期及び第2後期に期待される (McCLINTOCK 1938)。

第1後期で1つの dicentric chromatid bridge と acentric fragment を有する核が16観察されたが、これは逆位部分に1つの交叉が起きた場合または逆位部分及び interstitial segment の両部位に各々1つの交叉が起きた場合が考えられる。後者の場合交叉は2つあるいは4つの染色分体間に起きている。この両者のいずれの場合でも第2後期では bridge は形成されない。

次に、第1後期で bridge は存在せず1個の

* centromere と逆位部分との間。

acentric fragment のみを有する場合は 49 核観察されたがこれは逆位部分及び interstitial segment に各々 1 つの交叉が 3 つの染色分体間で起きた場合である。この場合 acentric fragment 及び sister centromere を有する dicentric chromatid が形成されるが、後者は sister centromere を有している為完全に一方の極に移行し bridge は出現しない。しかし第 2 後期でこの sister centromere を有する dicentric chromatid が bridge を形成することになる。本実験の観察においても第 2 後期で 1 つの bridge を有した核が 8 存在したが上述の理論より説明される。しかしこの観察において第 1 後期で 1 個の fragment のみを有している核が 21.0 %、第 2 後期で 1 つの bridge を有している核が 10.7 % で出現頻度が一致しない。これは第 1 後期で bridge が既に切れて両極に引かれている痕跡が観察されていることから、本来は bridge と fragment の両者を有するものを fragment のみを有するものとして観察した為と考えられる。

更に小頻度ながら第 1 後期で 2 個の fragment が観察された。これは interstitial segment に 1 つの交叉が起き、かつ逆位部分に interstitial segment の交叉で使われた 2 染色分体の一方を別々に含む交叉が 2 つ起きた場合である。すなわち 3 つの異なった交叉が 4 染色分体間に起きていることになる。このとき acentric fragment と sister centromere を有する dicentric chromatid が各々 2 個形成され、第 1 後期で 2 個の fragment のみが観察され第 2 後期では 2 つの bridge が形成される。本実験では第 2 後期で 2 つの bridge は観察されなかったが、これは観察数が少ない為と考えられる。

また第 1 後期で bridge のみが観察された場合が 2 核存在したが、これは fragment が両極に移行して発見出来なかった為か細胞質内に消失してしまった為と考えられる。

F₁ 植物は 48.6% の花粉不稔率を示したが、成熟分裂における逆位及び遅滞染色体の出現頻度 50.3% とだいたい一致している。このことから実験結果の初めに述べられた異常接合の II 価の仁染色体は花粉不稔には関与しておらず欠失あるいは

重複のような遺伝的異常性は有していないものと考えられる。しかしこの染色体の異常形態あるいは早期離反の現象の解明にあたっては両親に用いた種の核型及び F₁ 雑種の Pachytene analysis 等の更に詳細な検討が必要であろう。

V. 摘 要

種間雑種 *Melilotus sulcata* × *M. macrocarpa* の F₁ について外部形態の比較及び細胞遺伝学的観察を行なった。その結果を要約すると次の如くである。

1. *M. sulcata* × *M. macrocarpa* の F₁ 雑種は正常な緑色を示し、他の種間雑種に見られる葉緑素欠乏の現象はなく良好な生育をした。葉、花、種子等の諸形質について種間雑種 F₁ は両親に比較して多くは中間型を示したが特定の形質については一方の親に類似した。

2. F₁ 雑種の花粉母細胞の成熟分裂において移動期及び中期で II 価を構成する 2 つの染色体の大きさが相互に異なる接合をする II 価染色体が観察され、これは早期離反の傾向があり第 1 中期で既に 46.4% が離反していた。第 1 後期でこの II 価染色体に由来し他染色体より 2~3 倍大の染色体が一方の核中に観察された。

3. 第 1 後期で acentric fragment 及び chromatid bridge あるいは 1~2 個の acentric fragment のみの核が観察された。また第 2 後期でも acentric fragment 及び dicentric chromatid bridge が観察された。これらの事実から種間雑種 F₁ は一對の染色体において paracentric inversion に関し異型接合体であると結論出来る。

4. 逆位及び遅滞染色体の出現頻度と花粉不稔率はほぼ一致し、移動期及び第 1 中期に出現した相互に大きさの異なる II 価染色体は欠失あるいは重複のような遺伝的異常性は有しないものと推定される。

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) BURNHAM, C. R. (1962): Discussion in Cytogenetics. Burgess Pub. Comp.
 - 3) JARANOWSKI, J. K. (1961): Semisterility in the interspecific hybrid *Melilotus polonica* × *M. alba*. Amer. Jour. Bot. 48:28-35.
 - 4) KITA, F., M. L. MAGOON, and D. C. COOPER (1959): Simple smear techniques for the study of chromosomes of *Melilotus*. Phyton 12:35-38.
 - 5) 喜多富美治 (1962): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基础研究, 第 I 報. 種間雑種 *Melilotus alba* × *M. hirsuta* の細胞遺伝. 北大邦文紀要, 第 4 卷, 第 1 号:67-74.
 - 6) 喜多富美治 (1964): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基础研究, 第 II 報. 種間雑種 *Melilotus segetalis* × *M. messanensis* の細胞遺伝学的研究. 北大農場報告, 第 12 号:74-82.
 - 7) MCCLINTOCK, B. (1938): The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. Missouri Agr. Exp. Sta. Bull. 290.
 - 8) 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.
 - 9) SMITH, W. K. (1954): Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. Genetics 39:266-279.
 - 10) WEBSTER, G. T. (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

III. Cytological Study of the Interspecific Hybrid, *Melilotus sulcata* × *M. macrocarpa*.

Fumiji KITA and Minoru NIIZEKI

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

Summary

The interspecific F₁ hybrids obtained from the cross of *Melilotus sulcata* × *M. macrocarpa* were normal green in color and continued to grow to maturity vigorously. The pollen fertility of the hybrid plants was low (ca. 51.4% of stainable pollen grains), whereas that of their parents was very high (ca. 100% of stainable pollen grains in *M. sulcata* and 96.8% in *M. macrocarpa* respectively).

M. sulcata and *M. macrocarpa* differ in several morphological characters. The F₁ hybrids resemble one or the other parent as far as some characters were concerned and were intermediate for other characters.

Eight bivalents are regularly formed at diakinesis and metaphase-I of meiosis of the hybrids but one bivalent among eight shows the unequal size of synapsis of two chromosomes which were attached to nucleolus. This bivalent tends to separate precociously and does not disjoin in equal size. The size of one chromosome is two or three times bigger than the other chromosome.

At anaphase-1, a dicentric chromatid bridge with or without an acentric fragment or one or two fragments without bridge are observed. At anaphase-2, one or two fragments and a chromatid bridge are also observed. The facts lead to conclude that the F₁ hybrid plants are heterozygous for paracentric inversion.