



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Melilotus 属の種間雑種に関する育種学的基础研究 : 第X報 Melilotus officinalis の系統間雑種に関する細胞学的研究
Author(s)	佐野, 芳雄; SAN0, Yoshio; 喜多, 富美治 他
Citation	北海道大学農学部附属農場報告, 19, 9-15
Issue Date	1974-03-15
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/13327">https://hdl.handle.net/2115/13327</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	19_p9-15.pdf



# 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

佐野芳雄<sup>1)</sup>・喜多富美治<sup>2)</sup>

## I. 緒 論

*Melilotus* 属 (Sweet clover) は *Eumelilotus* 亜属と *Micromelilotus* 亜属に大別されるが、*Eumelilotus* 亜属には9種が分類されこれらいくつかの種間には交雑不和合性、葉緑素欠乏による雑種弱勢が見られ、さらには相互転座に由来する染色体の構造差の存在することが報告されてきた (GREEN-SHIELDS 1954, SMITH 1954, BRINGHURST 1951, KITA 1965, 等)。これらの経過の中で *Eumelilotus* 亜属に分類されまた多くの栽培品種を有する *M. officinalis* については、WEBSTER (1955) が胚培養によって種間雑種 F<sub>1</sub> を育成した以外は、他のどの種とも交雑が困難であるとされてきた (STEVENSON and KIRK 1935, SMITH 1954)。SHASTRY *et al* (1960) は WEBSTER (1955) が胚培養によって育成した *M. officinalis* x *M. alba* F<sub>1</sub> について細胞学的観察を行った結果、*M. officinalis* と *M. alba* の種間には細胞学的差異のないことを報告した。一方 LANG and GORZ (1960) は、*M. officinalis* P. I. 178985 の系統が胚培養等によることなく *M. alba* と容易に交雑出来ることを見出した。著者らは DR. H. J. GORZ より入手したこの *M. officinalis* P. I. 178985 と *M. alba* との交雑実験より、この系統と *M. alba* との種間雑種 F<sub>1</sub> が相互転座に関しヘテロ接合体であることを報告した (1972)。

本実験は SHASTRY *et al* (1960) と喜多・佐野 (1972) の相異なる結果が *M. officinalis* の系統間差異に基づくものかどうかを明らかにする目的で、一方の交雑親として P. I. 178985 を用いて *M. of-*

*ficinalis* の系統間雑種 F<sub>1</sub> を作出し細胞学的検討を加え、若干の興味ある結果が得られたのでここに取纏め報告する。

なお本実験に供試した種子は DR. H. J. GORZ より御恵送いただいたもので深甚な謝意を申し上げますとともに、本実験の遂行にあたり終始懇篤な御指導を賜った北海道大学農学部教授高橋萬右衛門博士ならびに文部教官新関稔氏に対し心より謝意を申し上げます。また試験遂行にあたり種々御援助をいただいた文部技官渡会萬治・飛渡正夫・赤川昭爾の3氏に対しても同様厚く謝意を表する次第である。

## II. 実験材料および方法

*Eumelilotus* 亜属に含まれる *M. officinalis* はヨーロッパおよびアジアにかけて広く分布するマメ科牧草で、本実験には1・2年生を含む11系統を供試した。1年生の *M. officinalis* P197-1, P198-1 および P200-2 はいずれも2年生の各系統に較べ草丈が低く細茎等の特徴をもつが、2年生の各系統間には顕著な差はない。*M. alba* および *M. hirsuta* 等と容易に交雑出来る唯一の *M. officinalis* の系統である P. I. 178985 を片親として、1972 および 1973年の両年1~3月にかけて温室内で交配を行い Table 1 に示すように各組合せとも多くの種子を得た。得られた種子はシャーレ内で発芽後播種箱に移植され、第1本葉展開後素焼鉢に個体植えされた。これらの植物は世代短縮の目的で約18時間の長日処理を行い寒冷紗で覆ったハウス内で栽培され、この条件下で極めて良好な生育を示した。

1) 北海道大学農学部作物育種学教室

2) 北海道大学農学部附属農場

**Table 1.** Number of the hybrid seedlings obtained from the crosses between *M. officinalis* P. I. 178985 and several other strains of *M. officinalis*

cross	no. of flowers	no. of seeds	no. of seedlings	
			selfs	hybrids
Goldtop x P. I. 178985	34	7(20.6)	*	*
Bdn 62-1 x "	39	28(71.8)	*	*
Madrid x "	15	4(26.7)	2(13.3)	2(13.3)
Bdn 62-13 x "	8	6(75.0)	0( 0.0)	5(62.5)
Erector x "	9	3(33.3)	0( 0.0)	3(33.3)
P 197-1 x "	7	5(71.4)	2(28.6)	2(28.6)
P 198-1 x "	18	5(27.8)	0( 0.0)	5(27.8)
P 200-2 x "	7	1(14.3)	0( 0.0)	1(14.3)
P. I. 178985 x Goldtop	45	31(68.9)	—	—
" x Bdn 62-1	57	38(66.7)	—	—
" x Madrid	17	5(29.4)	—	—
" x Bdn 62-13	7	5(71.4)	—	—
" x Erector	64	38(59.4)	—	—
" x Common Yellow	50	13(26.0)	—	—
" x P. I. 313485	17	13(76.5)	—	—

( ): Percentage to number of flowers crossed.

\* : Most of crossed seeds were hybrids, but number of selfs and hybrids was not checked.

— : Clear clasification of selfed and hybrid seedling could not be done, but most of crossed seeds were considered as hybrids.

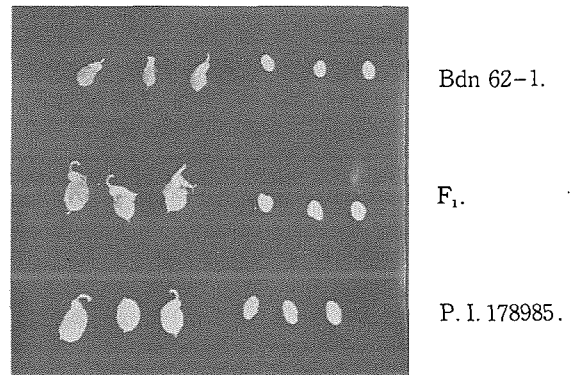
得られた植物が系統間雑種であるか自殖個体かの判定の方法については後述のごとくである。

また交配および減数分裂における観察の方法は前報 (1972) に従った。

### III. 実験結果

#### 1. 系統間雑種 F<sub>1</sub> の判定

得られた植物が系統間雑種であるとの判定は適当な標識となる形質の欠除により若干困難であった。*M. officinalis* の2年生系統は形態的に顕著な差を有さないが、本実験の交雑において片親に用いた P. I. 178985 の系統は他の系統に較べ明らかに莢および種子が大きく極早生である。この P. I. 178985 を花粉親として交雑した場合、系統間雑種 F<sub>1</sub> は自殖個体に較べ明らかに莢および種子が大きく (Fig. 1) 容易に判定出来た。さらに確認する目的で系統間雑種 F<sub>1</sub> であると判定された Bdn 62-1 x P. I. 178985 F<sub>1</sub> に *M. hirsuta* P. I. 314096 を交配



**Fig. 1.** Pods and seeds of the parental strains of *M. officinalis* and its F<sub>1</sub> hybrid.

したところ低率ではあるが種間雑種 F<sub>1</sub> が得られたことより、この個体は明らかに系統間雑種であると考えられる。

しかしながら P. I. 178985 を母親として交雑した場合系統間雑種 F<sub>1</sub> は自殖個体に較べ若干種子が

小粒となるようであったが明瞭には区別出来なかった。*M. officinalis*は温室あるいはハウス内で栽培されると種子稔性が極めて低く、この原因は蜜蜂によるトリッピングがないためと考えられる。*M. officinalis*の各系統を蜜蜂の来訪しない温室内で栽培した時の種子稔性および手で竜骨弁を裂開させ人為的にトリッピングを行った時の種子稔性を調査した結果を Table 2 に示した。手でトリッピングを行った場合でも Bdn 62-13, P 197-1 および P 198-1 を除いて種子稔性はかなり低かった。系統間で交配を行った時の種子着生率が Table 1 のごとく高いことより *M. officinalis*にはかなり自家不和合性が存在すると考えられる。また *M. officinalis* P. I. 178985 x *M. alba* および *M. officinalis* P. I. 178985 x *M. hirsuta* の交配において、得られた種子のうち自殖していた種子の割合は共に 1.8

**Table 2.** Seed fertility of the parental strains of *M. officinalis* in greenhouse

strain	seed fertility (%)	
	A	B
Goldtop	0.0	7.3
Bdn 62-1	0.0	9.5
Madrid	0.0	16.3
Bdn 62-13	0.0	47.6
Erector	0.0	15.0
P. I. 178985	0.0	27.3
Common Yellow	6.7	16.7
P 197-1	3.1	49.2
P 198-1	0.0	44.0

A: Not made tripping.

B: Made tripping by hands.

%(Table 3)と極めて低かった。これらのことより P. I. 178985 を母親とし *M. officinalis* の他の系統

**Table 3.** Number and ratio of hybrid seedlings obtained from the crosses between *M. officinalis* P. I. 178985 and other species

cross	no. of flowers	no. of seeds	no. of seedlings	
			selfs	hybrids
<i>M. officinalis</i> P. I. 178985 x <i>M. alba</i>	110	20(21.8)	2(1.8)	18(16.4)
<i>M. officinalis</i> P. I. 178985 x <i>M. hirsuta</i>	113	45(39.8)	2(1.8)	40(35.4)

( ): Percentage to number of flowers crossed.

を交配すると種子着生率が高く、したがって得られた植物の多くは系統間雑種 F<sub>1</sub> であろうと推定した。

1 年生系統を交雑親にした組合せでは、系統間雑種 F<sub>1</sub> が花粉親である P. I. 178985 に似た莢および種子の大きさや草型を示すことより、容易に判定出来た。

## 2 親系統と系統間雑種 F<sub>1</sub> の細胞学的観察

交雑親に用いた *M. officinalis* 11 系統の花粉稔率を一括して Table 4 に掲げたが、各系統はいずれも極めて高い稔性を示した。また減数分裂における染色体の観察でも diakinesis および M-1 で規則的に 8II を形成し (Fig. 2 a-c) 他の時期における異常も認められなかった。これらのことより供

**Table 4.** Pollen fertility of the parental strains of *M. officinalis*

strain	pollen fertility (%)
Goldtop	98.8
Bdn 62-1	97.6
Madrid	99.0
Bdn 62-13	99.5
Erector	94.3
P. I. 178985	99.3
Common Yellow	96.1
P. I. 313485	99.2
P 197-1	97.7
P 198-1	97.8
P 200-2	97.6

試した各系統はいずれも細胞学的に安定している

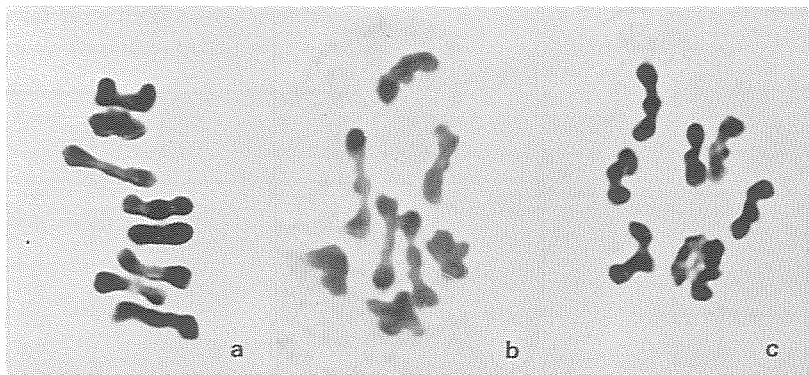


Fig. 2. Metaphase 1 in meiosis of the parental strains of *M. officinalis* (x2785).  
a. Goldtop. b. Bdn 62-1. c. P. I. 178985.

と考えられる。

次に P. I. 178985 を花粉親とした組合せより得られた系統間雑種  $F_1$  の花粉稔率は Table 5 に示すとおりいずれも極めて高かった。さらにこれらのうち Goldtop x P. I. 178985 および Bdn 62-1 x

Table 5. Pollen fertility of the intraspecific  $F_1$  hybrids of *M. officinalis*

cross	pollen fertility (%)
Goldtop × P. I. 178985	98.8
Bdn 62-1 × "	98.2
Madrid × "	94.5
Bdn 62-13 × "	90.9
Erector × "	98.5
P 197-1 × "	97.8
P 198-1 × "	97.0
P 200-2 × "	96.7

P. I. 178985 の 2 組合せの  $F_1$  について詳細に減数分裂を観察したが異常は認められなかった。すなわち、diakinesis および M-1 において規則的に 8 II の接合型が出現し (Fig. 3 a-c), 他に低頻度ながら 7 II+2 I の接合型が観察された (Fig. 3 d)。また A-1 および A-2 においても正常に分離するのが観察された (Table 6)。

P. I. 178985 を母親として交配した組合せより得られた植物の花粉稔率も調査したところ、多くは 90% 以上の高い稔性を示したが、少数の個体は約 65~75% の低い稔性を示した。これら低い稔性を示した個体については、詳しく減数分裂を観察したが染

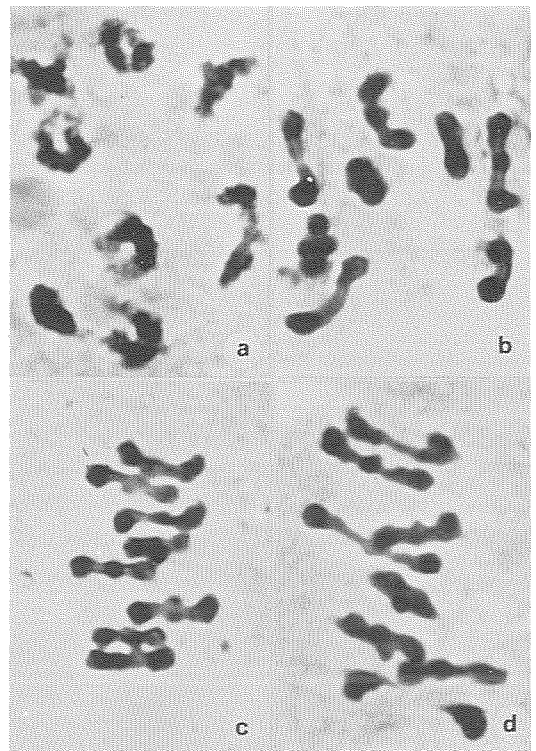


Fig. 3. Diakinesis and metaphase 1 in meiosis of the intraspecific  $F_1$  hybrids of *M. officinalis*, Goldtop × P. I. 178985 and Bdn 62-1 × P. I. 178985 (× 2785).

- Goldtop × P. I. 178985  $F_1$ . Diakinesis with 8II.
- The same  $F_1$  hybrid as a. Metaphase 1 with 8II.
- Bdn 62-1 × P. I. 178985  $F_1$ . Metaphase 1 with 8II.
- The same  $F_1$  hybrid as c. Metaphase 1 with 7II+2I.

**Table 6.** Chromosome configurations at diakinesis and metaphase-1 and their distribution in later stages in the intraspecific  $F_1$  hybrids of *M. officinalis*

cross	stage	frequency of PMCs with				total
		8II	7II+2I	normal	abnormal	
Goldtop×P. I. 178985	diakinesis	79	4			83
	metaphase-1	74	24			98
	anaphase-1			72	2	74
	anaphase-2			36	1	37
Bdn 62-1×P. I. 178985	diakinesis	113	6			119
	metaphase-1	135	15			150
	anaphase-1			81	1	82
	anaphase-2			41	1	42

色体の行動に関して異常は認められなかった。以上の結果を総合すると、*M. officinalis* P. I. 178985 と *M. officinalis* の他の系統との間には細胞学的差異はないと考えられる。

#### IV. 考 察

*Eumelilotus* 亜属 (9 種) に含まれる *M. officinalis* は胚の早期退化により他のどの種とも交雑することが出来ない (GREENSHIELDS 1954, SMITH 1954)。しかしながら WEBSTER (1955) は *M. officinalis* × *M. alba* の種間雑種  $F_1$  を胚培養により育成し、*M. officinalis* に *M. alba* がもつクーマリンを含有しない形質の導入に成功した。SHASTRY *et al* (1960) はこの種間雑種  $F_1$  について詳細な細胞学的観察を行い、この  $F_1$  雑種の染色体行動は正常であることを報告した。一方 LANG and GORZ (1960) はトルコより導入した *M. officinalis* P. I. 178985 の系統は *M. alba* Spanish と自然交雑することを見出した。またこの *M. officinalis* P. I. 178985 は *M. alba* だけでなく *M. hirsuta* および *M. polonica* とともに容易に交雑することが報告され、さらにこれらの交雑実験より *M. officinalis* P. I. 178985 と *M. alba* の種間には相互転座に由来する染色体の構造差があり、*M. officinalis* P. I. 178985、*M. hirsuta* および *M. polonica* の 3 種の間には細胞学的差異のないことが報告された (喜多・佐野 1972, 佐野・喜多 1972)。著者らが行った一連の交雑実験より、

*M. alba* の系統間には染色体の構造差はないと思われることから、当然 *M. officinalis* P. I. 178985 と *M. officinalis* の他の系統との間には相互転座に由来する染色体の構造差の存在することが推定される。しかしながら、本実験より明らかなくとく *M. officinalis* の P. I. 178985 と他の系統の間における系統間雑種  $F_1$  の花粉稔性はいずれも高く、減数分裂における染色体の行動も極めて正常であったことより、本実験に供試した 1・2 年生を含む 11 系統間には細胞学的差異はないと考えられる。このことは SHASTRY *et al* (1960) の結果とは異なるが SHASTRY *et al* が観察した材料に問題があったのではないかと考えざるを得ない。

本実験結果に、既に報告した *Eumelilotus* 亜属の種間の関係を合わせて図示すると Fig. 4 のごとくなる。*M. hirsuta*, *M. officinalis*, *M. polonica* および *M. suaveolens* 4 種は同一の染色体構造をもち、また *M. dentata*, *M. taurica* および *M. wol-gica* 3 種も同一の染色体構造をもつ。またこれら 2 群の種はいずれも *M. alba* との間には相互転座に由来する染色体構造差を有するが、これら 2 群間の細胞学的関係および *M. altissima* と他の種との関係等は交雑不和合性などの原因により現在判明していない。これら種間の関係を明らかにするにはさらに多くの実験に待たねばならないが、*Eumelilotus* 亜属に含まれる種の系統発生を考える上にも極めて興味ある問題と考える。

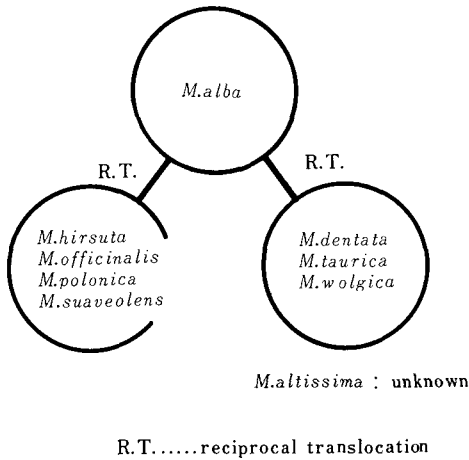


Fig. 4. Cytological relationships among species in *Eumelilotus*.

## V. 要 約

*Eumelilotus* 亜属に含まれる *M. officinalis* の系統間に細胞学的差異が存在するかどうかを明らかにする目的で、*M. hirsuta*、*M. polonica* および *M. suaveolens* と同一の染色体構造をもつ *M. officinalis* P. I. 178985 と *M. officinalis* の他の系統との間に系統間雑種  $F_1$  を作出し、その細胞学的観察結果を報告した。それらを要約すると次のごとくである。

1. *M. officinalis* P. I. 178985 は *M. officinalis* の他の系統と容易に交雑し、それら系統間雑種は極めて良好な生育を示した。
2. それら系統間雑種  $F_1$  はいずれも高い花粉稔性を示し、さらに減数分裂の観察においても diakinesis および M-1 で規則的に 8II を形成した。これらのことより、*M. officinalis* の系統間には細胞学的差異はないと考えられる。
3. したがって、*M. alba* と *M. officinalis* の種間には明らかに相互転座に由来する染色体の構造差異が存在することが明らかとなり、SHASTRY *et al* (1960) の報告とその結果を異にする。

## 参 考 文 献

- 1) BRINGHURST, R. S. (1951): Genetic analysis of chlorophyll deficiency in *Melilotus alba* x *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*. Canad. J. Bot. 32: 447-465.
- 3) JARANOWSKI, J. K. (1961): Semisterility in the interspecific hybrid *Melilotus polonica* x *M. alba*. Amer. J. Bot. 48: 28-35.
- 4) 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 I 報, 種間雑種, *Melilotus alba* x *M. hirsuta* の細胞遺伝. 北大農学部邦文紀要 4: 64-74.
- 5) KITA, F. (1965): Studies on the genus *Melilotus* (Sweetclover) with special reference to interrelationships among species from a cytological point of view. J. Fac. Agri. Hokkaido Univ. 54: 25-122.
- 6) 喜多富美治, 新関 稔 (1967): *Melilotus* 属の種間雑種に関する育種学的基礎研究. 第 VI 報, 種間雑種, *Melilotus polonica* x *M. alba* および *M. polonica* x *M. hirsuta* の細胞学的研究. 北大農学部附属農場報告 15: 38-43.
- 7) ———, 佐野芳雄 (1972): 第 VII 報, 種間雑種, *Melilotus officinalis* P. I. 178985 x *M. alba* var. Cumino の細胞遺伝. 北大農学部附属農場報告 18: 1-6.
- 8) LANG, R. C., and H. J. Gorz. (1960): Factors affecting embryo development in crosses of *Melilotus officinalis* x *M. alba*. Agrono. J. 52: 71-74.
- 9) 佐野芳雄, 喜多富美治 (1973): 第 VIII 報, 種間雑種, *Melilotus alba* x *M. suaveolens*, *M. polonica* x *M. suaveolens* および *M. hirsuta* x *M. suaveolens* の細胞学的研究. 北大農学部邦文紀要 8: 411-419.
- 10) ———, ——— (1973): 第 IX 報, 種間雑種, *Melilotus taurica* x *M. alba*, *M. taurica* x *M. wolgica* および *M. dentata* x *M. taurica* の細胞学的研究. 北大農学部邦文紀要 9: 1-9.
- 11) STEVENSON, T. M., and L. E. KIRK. (1935): Studies in interspecific crossing with *Melilotus*, in intergeneric crossing with *Melilotus*, *Medicago*, and *Trigonella*. Sci. Agri 15: 580-589.
- 12) SHASTRY, S. V. S., W. K. SMITH, and D. C. COOPER. (1960): Chromosome differentiation in several species of *Melilotus*. Amer. J. Bot. 47: 613-621.

- 13) SMITH, W. K. (1954): Viability of interspecific hybrids in *Melilotus*. *Genetics* 39 : 266-279.
- 14) WEBSTER, G. T. (1955): Interspecific hybridization of *Melilotus alba* x *M. officinalis* using embryo culture. *Agrono. J.* 47 : 138-142.

## Studies of interspecific hybrids in the genus *Melilotus* from the plant breeding standpoint.

### X. Cytological studies of the intraspecific hybrids of *Melilotus officinalis*.

Yoshio SANO and Fumiji KITA

(Plant Breeding Institute and Agricultural Experiment Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

#### Summary

The crosses between *Melilotus alba* and *M. officinalis* have not been successful without using embryo culture. The F<sub>1</sub> hybrids, *M. officinalis* x *M. alba*, grown by using embryo culture were examined cytologically, and it was reported that the course of meiosis of the F<sub>1</sub> plants was regular (SHASTRY *et al* 1960). Recently, a strain of *M. officinalis*, P. I. 178985, crossed easily with *M. alba* in natural conditions (LANG and GORZ 1960), was introduced to our laboratory. We made the F<sub>1</sub> hybrid, *M. officinalis* P. I. 178985 x *M. alba*, and examined the chromosome behaviors of meiosis in the F<sub>1</sub> interspecific hybrid plants. Our observations were different from that of the work done by SHASTRY *et al*, namely, the F<sub>1</sub> hybrid was heterozygous for a reciprocal translocation.

In order to resolve the controversial results reported and establish the cytological relationships between *M. alba* and *M. officinalis*, the intraspecific F<sub>1</sub> hybrids between P. I. 178985 and several other strains of *M. officinalis* were studied in cytological view points.

The results obtained are summarised as follows:

1. The F<sub>1</sub> intraspecific hybrids between P. I. 178985 and Goldtop, Bdn62-1, Madrid, Bdn 62-13, Erecter, P197-1, P198-1 and P200-2, were obtained easily and the F<sub>1</sub> plants were grown vigorously. The pollen fertility was higher than 90%, and the courses of meiosis were regular in all cross combinations of F<sub>1</sub> hybrids.
2. As far as examined, it was clear that there was no chromosomal changes among these strains of *M. officinalis*. Consequently, it is reasonably concluded that a reciprocal translocation exists between *M. alba* and *M. officinalis*.