

レンゲ4倍体の不稔機構に関する研究

I. 胚のう形成について

林 喜 三 郎

Studies on the mechanism of partial sterility in induced autotetraploids of renga (*Astragalus sinicus* L.).

I. Embryosac formation.

by Kisaburo HAYASHI

緒 言

レンゲはわが国の水田裏作において、古くより緑肥作物として地方の保持増進に貢献しているのみならず、近年畜産の振興にともなって飼料作物としての価値も著しく高まりつつある。このような利用価値の増大に伴ない、育種学的研究も盛んとなって来たが(赤藤・川端 1957, 1961, 北陸農試 1961, 末次その他 1960, その他), なかでも人為4倍体の旺盛な初期生育, 生草重, 乾物重および飼料成分含量の増加等の優れた諸特性に着目し, 高杉・ニツ寺(1959)が4倍体実用系統の育成に成功したことは, レンゲの倍数性育種の有望性を示唆している。しかしながら, レンゲの場合にも人為4倍体に共通の欠点とされる稔性の低下が著しいことは, 優れた4倍体系統を育成する上の大きな障害であり, 今後に残された重要な課題である。

従来, 人為4倍体不稔の原因については, (1) 成熟分裂の異常にもとづく配偶子致死, (2) 遺伝子不平衡あるいは高いホモチゴシチーによる配偶子, または接合体致死の二つが考えられている(Müntzung, A. 1936, 真島・内山田 1955, Rajan, S. S. 1956, Smith, W. E. 1958, その他)。しかして, レンゲの場合には高杉・ニツ寺(1959)は, 成熟分裂において不均等な染色体分配が比較的少なく, 形態的に無能と考えられる花粉もきわめて少ないことを, また筆者(1955)は寒天培養基上の実験ではあるが, 形態的に正常な花粉でも発芽能力のあるものは60%程度に過ぎないことを指摘しておいた。したがって, レンゲの4倍体の低稔性は上記(1)の原因による配偶子致死よりも, (2)の原因にもとづく生殖生理的な障害によるところが大きいと予想される。そこで, 低稔性の原因を究明する基礎として, 配偶子の形成より種子成熟に至るまでの諸過程について, 解剖組織学的に詳細な検討を加えることは, きわめて意義あることと考え本研究に着手した。本報は, その端緒として胚のう形成過程の異常と低稔性との関係について考察を行なったものである。なお, 研究に当り終始懇切なる指導を頂いた京都大学赤藤克己教授に衷心より深謝する。

実験材料および方法

2倍体には1951年以来岐阜大晩生種のなかから選抜固定した系統を, 4倍体には前記系統育成途中1956年秋コルヒチン処理によって育成した系統を用いた。これらの両系統を, 1959年秋圃場に1株植えとし, 翌春生育良好な個体を各20個体宛選び, それら個体について, 5月7日に蕾の大きさより推定して, 開花前9~10, 7~8, 5~6, 3~4, 2, 1日および開花当日の蕾と開花一日後の花を採集し, 蕾のまま, または雌蕊のみとしてカルノアの液で固定した。固定後は普通のパラフィン法によって10~20 μ の連続切片とし, ハイデンハインの鉄ヘマトキミリンで染色して検鏡および測定を行なった。

なお、本実験の実施はおおよそ開花末期に相当したため、レンゲの開花期としては、比較的高温時に材料を採取したことになる。したがって、胚のう形成の各過程所要時間は、開花最盛期に比べかなり短縮されているものと考えられるが、組織分化には悪影響はなかったものと考えられる。第1表は参考までに実験前後数旬の気温を示したものである。

Table 1. Temperature during the experiments

Date	Temperature (°C)			Date	Temperature (°C)		
	Mean	Max.	Min.		Mean	Max.	Min.
Apr. 11	14.9	22.7	12.2	Apr. 26	21.5	24.0	15.6
12	12.6	16.1	10.7	27	17.0	19.0	14.6
13	16.0	22.5	11.7	28	18.9	23.5	13.7
14	22.3	24.4	14.4	29	20.5	23.5	15.0
15	17.3	19.5	11.7	30	17.1	22.7	15.7
16	16.9	20.8	8.7	May 1	19.4	23.7	13.6
17	10.4	19.9	7.0	2	21.0	24.2	14.7
18	13.3	19.2	6.4	3	22.7	24.0	12.5
19	12.1	19.5	7.6	4	17.6	23.0	15.7
20	18.6	23.4	11.6	5	22.8	21.7	15.4
21	16.7	22.1	7.3	6	22.8	23.2	19.1
22	17.0	23.0	7.8	7	15.9	19.4	15.3
23	19.8	23.3	9.3	8	19.1	23.4	9.0
24	21.8	23.3	10.3	9	15.4	19.2	11.6
25	17.3	21.5	14.3	10	16.0	18.7	11.6

実験結果および考察

1. 2倍体の胚のう形成の一般過程

レンゲの胚のう形成については末次・田中(1960)が花芽の發育過程中に簡単な観察を行なっているが、詳細な研究はなされていない。そこで、まず2倍体について胞原細胞の形成より開花期にいたる胚のう形成の全過程を、組織形態的に顕著な差異が見られる時期別につきの七つの分化期に分け、4倍体との比較を容易にした。

I. 胞原細胞分化期 (図版 I, 第1図)

子房腔内に生じた胚珠始源体が半球状からやや細長く伸長して来ると、その球心部に他の細胞よりやや大きい角張った形の濃染される胞原細胞が多数生じる。

II. 胚のう母細胞分初化期 (図版 I, 第2図)

胞原細胞はいずれも大きく丸くなるが、それらのうち珠心表皮直下にある1個は急激に伸長し、他と区別し得るようになる。しかし、まだ充分 E. M. C. にまで發育していない。この時期には胚珠全体が伸長して反対側の子房壁にぶつかるので、胚珠の先端は柱頭の方に曲り、同時に珠心基部より珠皮の原基が生じる。

III. 胚のう母細胞分化期 (図版 I, 第3図)

充分發育した E. M. C. では、初期の胞原細胞の約5倍の長さを有し、細胞内には大きな核とともに空胞が存在する。このように E. M. C. が大きくなるため珠心内のほとんど全域を占め、他の胞原細胞は退化して端の方に押しやられる。また、この時期には珠心基部の内外珠皮の原基はそれぞれ2層の細胞層で珠心を包むように伸長する。

IV. 胚のう母細胞減数分裂期 (図版 I, 第4図)

E. M. C. はやがて減数分裂を行ない、縦に並んだ4分子を形成するが、同時に頂部の大孢子より順次退化を始め、最下部の大孢子のみが残り、胚のう細胞となる。この時期には内外2層の珠皮

は珠心をほとんど包み、珠孔を形成しつつある。

V. 胚のう形成前期 (図版 I, 第 5~7 図)

胚のう細胞の核は引続いて第 1 回目の均等分裂を行ない、2 核となる。この 2 核のうち、1 個は珠孔側の、他はカラザ側の端に移動し、中央部には空胞が出来始める (第 5 図)。続いて第 2 回目の分裂を開始するが、この際、珠孔側に位置する核の方がわずかに早く、胚のう細胞の長軸と直角方向に、続いてカラザ側の核が長軸方向に分裂して 4 核胚のうとなる。この時期には、中央部に大きな空胞を生じ、細胞質は珠孔側とカラザ側に分れた 2 群の核の周囲のみで、これら細胞質は胚のう細胞の周囲にそった細長い細胞質で結ばれている (第 6 図)。ほどなく第 3 回目の分裂を行なって 8 核期に入るがこの時も珠孔側の 2 核はわずかに早く分裂を始める (第 7 図)。

VI. 胚のう形成中期 (図版 I, 第 8 図)

8 核胚のう期を過ぎると核の移動が行なわれる。すなわち、珠孔に近い部分に 3 個の核が集ってそれぞれ細胞膜を形成するがそのうち中央が卵細胞、両側が助細胞で、卵装置を形成する。カラザ側には 3 核が細胞膜を形成して、それぞれ反足細胞となる。珠孔側とカラザ側のそれぞれ残りの 1 核は胚のう周辺の細胞質にそって中央部に近づき、相並んで極核となる。この時には極核周囲には多くの細胞質を伴っている。

VII. 胚のう形成後期 (図版 I, 第 9 図)

以上のように一応その形を整えた胚のうは、やがて中央部の 2 個の極核が融合して、1 個の大きな核となり卵核も次第に大きさを増すが、助細胞と反足細胞は、核が小さくなるとともに、細胞膜がくずれ退化崩壊のきざしをみせる。この頃は開花 1, 2 日前で胚のう全体も急激に大きくなり組織的に完成、開花、受粉をまつ。完成した胚のうは内外珠皮に由来する 4 層の細胞層に包まれ、最内層は胚のう膜に直角に発達したタペート細胞となっている。

2. 4 倍体の胚のう形成過程の特異性

a. 組織形態的差異

4 倍体の胚のう形成の一般過程は図版 II, 第 11~18 図に示すとおりである。各分化期別にみた場合、先に記述した 2 倍体の一般過程とよく似ており、後述するような形成過程の遅延以外特別な異常はみられない。したがって、筆者 (1955)、高杉・ニツ寺 (1959) の報告による花粉稔性の高いことと考え合せ、従来人為 4 倍体の低稔性の原因の一つとされている配偶子致死はレンゲの 4 倍体においては、花粉側にも、胚のう側にも認め得ないことになる。

なお、参考までに推定調査日別に、蕾・雌ずい・胚珠の長さを測定し、これら花器の發育状況を示したのが第 2 表である。すなわち、同一開花前日では 4 倍体は 2 倍体に比べ常に大きく、いわゆ

Table 2. Length of bud, pistil and ovule before anthesis

Ploidy	Number of days before anthesis	Bud	Pistil	Ovule
2x	9 — 10	1.5 mm	0.9 mm	—
	7 — 8	2.1	1.1	—
	5 — 6	2.4	1.4	ca. 80 μ
	3 — 4	3.6	1.9	140
	2	—	6.0	200
	1	—	7.5	300
	0	—	13.1	400
4x	9 — 10	2.3	1.0	—
	7 — 8	3.0	1.6	—
	5 — 6	4.5	2.5	110
	3 — 4	5.5	4.1	220
	2	—	8.5	250
	1	—	9.0	450
	0	—	15.2	500

る巨大化現象を示し、正常な発育を示している。

b. 胚のう形成の分化速度

胚のう形成の時間的推移を明らかにするため、各推定開花前日別に観察した分化期の割合を%で示したのが第3表である。

Table 3. Differentiation of embryosac before anthesis

Ploidy	Number of days before anthesis	Stage *)							Number of ovules observed
		I	II	III	IV	V	VI	VII	
2x	9 — 10	10.7	28.6	60.7					28
	7 — 8			93.1	6.9				29
	5 — 6				43.7	56.3			16
	3 — 4					44.6	55.4		56
	2						10.5	89.5	19
	1						4.0	96.0	25
	0							100.0	63
4x	9 — 10	26.5	57.2	16.3					49
	7 — 8			100.0					39
	5 — 6			7.1	19.0	73.9			42
	3 — 4					68.4	31.6		19
	2						65.2	34.8	23
	1						46.2	53.8	13
	0						40.0	60.0	40
	1 day after anthesis						43.3	56.7	30

*) Stage I : Archesporial cell differentiation
 II : Early E. M. C. differentiation
 III : E. M. C. differentiation
 IV : Megasporogenesis
 V : Early megagametogenesis
 VI : Middle megagametogenesis
 VII : Late megagametogenesis

すなわち、同一調査日で比較すると、4倍体においては2倍体よりも、若い発育段階の割合が常に高い。換言すると4倍体の胚のう形成は2倍体に比べ遅れ勝ちなことを示している。しかもこの遅延傾向は開花日に近づくに従って著しくなるようである。すなわち、第3表によると2倍体においては開花2日前にはすでに9割が、また開花当日には全ての胚のうがVII期の状態であるにもかかわらず、4倍体では開花時においても、VII期への移行を完了しているものは、6割程度に過ぎない。さらに開花1日後の胚のうにおいてもこの割合は変わらず、4割程度がまだVI期の状態にあることは、これらの胚のうでは2極核の融合しないまま受精期を迎えているものと考えられる。

従来4倍体の胚のう形成については、Einset, T. (1944)のレタス、埴 (1951)のゴマ、Rajan, S. S. & Ahuja, Y. R. (1956)およびRajan, S. S. (1956)のBrassica toriaおよび亜麻等の報告があり、発育遅延または異状胚のうの形成されることが観察されているが、多くの場合、胚のう形成過程における退化現象である。ただRajan, S. S. (1956)の亜麻の場合は本実験結果と非常によく似ており、2倍体が開花6~9時間前には全胚のうで極核が融合するのに反し、4倍体では極核の融合したものは開花時でも約55%であることが観察されている。Rajan, S. S.はこの現象について、不融合極核は融合極核と比べ核質量がたとえ同じであっても、生殖生理的には重複受精の際に悪影響のあるものと考えている。レンゲの場合にもこの考え方が適用出来るものと考えられるが、今後、受精、ならびに胚の発育諸過程の観察をまって、さらに検討を加えたい。

摘 要

1. レンゲ4倍体の低稔性の原因を究明する端緒として、胚のう形成—種子成熟間の解剖組織学的な観察を行なっているが、本報では受精前の胚のう形成過程について報告する。
2. 胚のう形成の全過程を次の7分化期に分けて考察した(図版I・II, 第1~18図)。
 - I. 胞原細胞分化期(第1, 10図)
 - II. E. M. C. 分化初期(第2, 11図)
 - III. E. M. C. 分化期(第3, 12図)
 - IV. E. M. C. 減数分裂期(第4, 13図)
 - V. 胚のう形成前期(第5~7, 14~16図)
 - VI. 胚のう形成中期(第8, 17図)
 - VII. 胚のう形成後期(第9, 18図)
3. 4倍体の胚のう形成はI~VI期は多少遅延するが、組織学的には異常は認められない。しかし、VI→VII期の移行すなわち、2極核の融合が行なわれ難く、約4割の胚のうでは開花時においても2極核のままである(第2, 第3表)。
4. 極核の不融合は受精生理の面より、正常な受精現象に障害の起ることが予想され、ひいては4倍体の稔性が低下する一原因ではないかと推定される。

引 用 文 献

1. Einset, T. 1944: Cytological basis for sterility induced autotetraploid lettuce (*Lactuca sativa* L.). Amer. J. Bot. 31: 336-342.
2. 埴 順 1951: ゴマ倍数体における胚嚢及び胚の形成. 遺伝学雑誌 26: 234.
3. 林 喜三郎 1955: 4倍体紫雲英に於ける花粉の生理学的研究. 育種学雑誌 4: 238.
4. 北陸農業試験場 1950: 同試験場報告 第一号.
5. 真島勇雄・内山田博士 1955: 高稔性4倍体稲の育成に関する研究. 農技研報告 D 第5号: 104-136.
6. Müntzung, A. 1936: The evolutionary significance of autotetraploidy. Hereditas. 21: 263-378.
7. Rajan, S. S. 1956: Seed sterility in induced auto-tetraploids. Int. Gen. symposia 1956 (Abst): 20.
8. Rajan, S. S. & Ahuja, Y. R. 1956: Seed development in colchicine-induced autotetraploids of toria. Indian J. Gen. 16: 63-76.
9. Smith, W. E. 1958: Fertility studies in autotetraploid barley varieties and their hybrids. Proc. Gen. Soc. of Canada 1958: 3: 49-50.
10. 末次勲・伊東達雄・宮本松太郎・山崎信藏・土屋茂 1960: レンゲの自然交種率に関する実験. 育種学雑誌 10: 69-74.
11. 末次勲・田中考幸 1960: レンゲ花芽の発育. 北陸農試報告 第一号: 21-30.
12. 赤藤克己・川端習太郎 1961: レンゲにみられる雑種強勢とその利用について. 育種学雑誌 11: 199-205.
13. 高杉喜一・二ツ寺勉 1959: 4倍性レンゲの育成とその実用化に関する研究. 育種学雑誌 9: 145-153.

(昭和36年9月30日受理)

Summary

In order to find out the mechanism of partial sterility in autotetraploids induced by colchicine methods in renga, which is the most important forage and manuring crop cultivated in paddy fields during winter season in Japan, an anatomical study was made on the embryosac formation in the diploid and tetraploid plants. The results are summarized as follows:

1. The whole processes of embryosac formation during differentiation of young ovules to anthesis in the diploid and tetraploid plants were classified into the following seven

stages.

I. Stage of archesporial cell differentiation (Fig. 1, 10).

Many archesporial cells appear in the young ovule.

II. Early stage of E.M.C. differentiation (Fig. 2, 11).

One of the archesporial cells in the layer of cells beneath the epidermis of nucelus increases in size and becomes to be distinguishable from the other archesporial cells.

III. Stage of E.M.C. differentiation (Fig. 3, 12).

The large archesporial cell elongates and becomes embryosac mother cell. The other archesporial cells degenerate.

IV. Stage of megasporogenesis (Fig. 4, 13).

Meiosis occurs in the E.M.C. and leads to a linear arrangement of four megaspores. The innermost cell becomes the functional megaspore.

V. Early stage of megagametogenesis (Fig. 5-7, 14-16).

Three successive mitotic divisions of functional megaspore nucleus give rise to eight nuclei.

VI. Middle stage of megagametogenesis (Fig. 8, 17).

The eight nuclei differentiate and develop into the egg cell, polar nuclei, synergids and antipodals.

VII. Late stage of megagametogenesis (Fig. 9, 18).

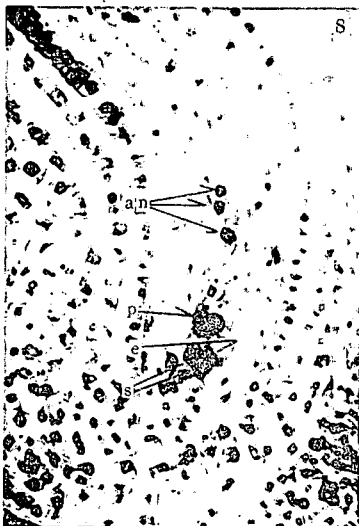
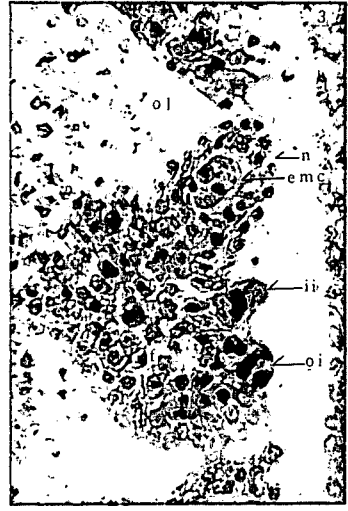
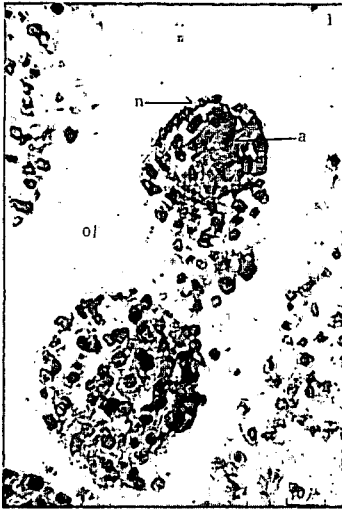
Two polar nuclei fuse and become a large nucleus. The synergids and antipodals begin to degenerate.

2. The anatomical observation of each developmental stages in the tetraploid were similar to that in the diploid and the degeneration of ovules, which are frequently observed in the induced autotetraploids of other crops, was not recognized in this case. However, the earlier stages of differentiation in the tetraploid than the diploid were always observed in the same days before anthesis (Table 3).

3. In the diploid, the two polar nuclei of all ovules were found fused one to two days before anthesis. In the tetraploid, however, the polar nuclei in about 40 % of ovules were not fused at the time of fertilization. In view of the physiology of fertilization, the nonfusion of polar nuclei suggests the failure of double fertilization in the induced autotetraploids of renga.

Explanation of Plates

- Pl. I. Embryosac formation in diploid plants.
 Pl. II. Embryosac formation in tetraploid plants.
 Fig. 1, 10. Stage of archesporial cell differentiation.
 Fig. 2, 11. Early stage of E.M.C. differentiation.
 Fig. 3, 12. Stage of E.M.C. differentiation.
 Fig. 4, 13. Stage of megasporogenesis.
 Fig. 5-17, 14-16. Early stage of megagametogenesis.
 Fig. 5, 14. Megaspore with two nuclei.
 Fig. 6, 15. Megaspore with four nuclei.
 Fig. 7, 16. Megaspore with eight nuclei.
 Fig. 8, 17. Middle stage of megagametogenesis.
 Fig. 9, 18. Late stage of megagametogenesis.
 Fig. 1-3, 8-12, 17, 18. ca. \times 260
 Fig. 4-7, 13-16. ca. \times 390



Explanation of abbreviation in the figures

- a. Archesporial cell.
- an. Antipodal cell.
- e. Egg cell.
- emc. Embrosac mother cell.
- f. Funiculus.
- ii. Inner integument.
- n. Nucellus.
- oi. Outer integument.
- ol. Ovarian locule.
- p. Polar nuclei.
- s. Synergid.

