Seiroku ONO and Hidehiro HORIO ; STUDIES ON THE INTER-SUBGENERIC HYBRIDIZATION IN GENUS *MENTHA*. I. Germination of Pollen Grains and Growth of Pollen-tubes in the Style of Different Species (With English summary, p. 271). Japan. J. Breeding Vol. 18, No. 5, 1968.

Synopsis Crossings were carried out between both subgenera of *Mentha* in order to find out histologically the cause of the cross-incompatibility between them. Pollen grains could germinate on the stigma of the species belonging to other subgenera and pollen-tubes could penetrate their style tissue. But both the germination of pollen grains and the elongation of pollen-tubes were somewhat restrained and pollen-tubes which reached the base of style diminished in number as compared with the case of crossing between species in the same subgenera.

ハッカ属の亜属間交雑に関する研究*

第 I 報 異種の花柱における花粉の発芽および花粉管の伸長について

小野 清 六・堀 尾 英 弘

(岡山大学農学部) (農林省孳恋馬鈴薯原々種農場)

I 緒 論

ハッカ属は BRIQUET (1897) により第 I 亜属 *Pulegium* (MILL.) LAMK. et DC. と第 II 亜属 *Menthastrum* COSS et GERM の 2 亜属に大別されている。この分類は形態的特徴に基づいて行われたものであるが、ハッカ属植物の育種を種間交雑によつて能率的におし進めてゆくためには、このような形態上の分類以外に各種間のゲノム関係を知ることが必要である。第 II 亜属については、すでに池田 (1961) によつて、ゲノム分析がほぼ完了し、各種の類縁関係も詳しく調べられているが、第 I 亜属内および第 I 亜属と第 II 亜属間については、種間交雑が不成功なために、いまだ相互の類縁関係は不明である。したがつて、これらの点を解明するには、交雑不成功の原因となつている交雑不和合性をまず克服しなければならない。そのためには交雑不和合の原因が花粉にあるのか、胚珠にあるのか、あるいは両者の相対関係にあるのかを明らかにすることが必要である。

筆者らは、上述の現況および観点からハッカ属の亜属間に雑種のできない原因を解析するために両亜属間で人工授粉を行ない、1) 異亜属の柱頭上における花粉の発芽および花柱組織内での花粉管の伸長状況と、2) 受精後雑種胚の生長が停止するまでの生長過程の 2 つに分けて生殖生理学的研究を行なつた。本報は、まず前者について、得られた結果を報告するものである。

* 本研究の要旨は昭和 39 年 10 月日本育種学会第 26 回講演会において発表

1968 年 6 月 29 日受領

** [] は岡山大学農学部育種学研究室登録系統番号

なお本研究の遂行にあたり指導と鞭達を賜つた恩師岡山大学教授池田長守博士、および批判、教示をいただいた京都大学教授赤藤克己博士、同助教授山県弘忠博士に対し深甚の謝意を表する。

II. 実験材料および方法

本実験に使用した材料は、第 II 亜属の *M. arvensis* L. var. *agrestis* (SOLE) SMITH [152-2]**, [152-9] $2n=72$ (R^aR^aJJSS) と *M. spicata* L. [8] $2n=48$ (RRSS) および、第 I 亜属の *M. Pulegium* L. [2] $2n=48$ (ゲノム関係不明) の 3 種 4 系統であつて、これらの系統はいずれも、稔性が高く、減数分裂は正常で、第 II 亜属の 3 系統はゲノム関係も明確にされているものである。交雑は、いずれも授粉操作の簡単な雌性不稔系統 [152-9] を雌親とし、対照の種内交雑 [152-9] $\times$ [152-2]、と種間交雑 [152-9] $\times$ [8] および亜属間交雑 [152-9] $\times$ [2] の 3 組合せについて、6 月ないし 9 月に行なつた。

なお、上記 3 交雑における結実率は、種内交雑は 89.4 %、種間交雑は 9.7% と交雑は可能であるが、亜属間交雑 [152-9] $\times$ [2] では交雑が不可能で種子は得られない。各交雑とも授粉後 10 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、8 時間、12 時間および 16 時間に柱頭上の花粉の発芽状態、花柱組織内の花粉管の伸長状態および花粉管先端の異常肥大の状態などを観察し、各形質とも 50 花柱の平均値に基づいて考察を行つた。花粉管は 0.3% と 0.5% のコットン・ブルー溶液で染色、乳酸フェーノールで適宜脱色して検鏡し、花粉管の長さは、花粉の発芽孔から花粉管の先端までの直線距離をもつて表わした。

Fig. 1. Pollen germination on the stigma of different mint species

III. 実験結果および考察

[1] 柱頭上における花粉の発芽率

授粉後の花粉の発芽状態は第1図に示すようである。第1図によれば、対照の種内交雑 [152-9] × [152-2] では授粉後10分、種間交雑 [152-9] × [8] では授粉後30分、亜属間交雑 [152-9] × [2] では授粉後1時間に、それぞれ最高またはそれに近い発芽率に達し、いずれも発芽可能の花粉はこの時間中にほとんど発芽を完了するようである。

なお、本実験では3組合せとも授粉後30分までの発芽率よりも1時間以降の発芽率の方がかえって5~6%低いのは、授粉30分までのものは授粉操作を室内で行なったのに対し、授粉1時間以後のものは圃場で行なったための操作上の誤差ではないかと思われる。

しかし、上記実験成績を通覧すると柱頭上での花粉の発芽は、対照の種内交雑が最も早く、種間交雑がこれに

Fig. 2. Growth rate, length of the longest pollen-tube in the style/length of the style × 100, the longest pollen-tube in the style and percentage of pollen-tube with abnormally thickened apex.

Fig. 3. Percentage of pistil in which the longest pollen-tube reached the base.

つぎ、亜属間交雑が最も遅い。各組合せにおける授粉後の時間内にみられる花粉管の発芽遅速の関係は、その後の花粉管の伸長速度にもかなり影響するものと推察される。

[2] 花柱組織内における花粉管の伸長速度
授粉後、時間の経過に伴う花粉管の伸長状態は第2図に示すようである。同図の花粉管伸長率とは、花柱中で最もよくのびている最長花粉管の長さを花柱長で除して100倍したもので、最長花粉管が花柱のどの辺まで伸びているかを示すものである。

第2図によれば、対照の種内交雑 [152-9] × [152-2] では、授粉後30分で60%、1時間で95%と花粉管は急速に伸び、3時間で97%を越えている。種間交雑 [152-9] × [8] では、花粉管は授粉後30分では、いまだ10%以下であるが、その後急速に伸長して1時間後には、87.7%に達している。ところが亜属間交雑 [152-9] × [2] では、授粉後30分では3%と低く1時間後には65.4%とかなり高まっているが、90%越えるには8時間近く要している。(第4図 A, B, C, D, E, F.)

授精が起こるには最長花粉管の先端が、花柱の基部を越えて子房の中に入ること、すなわち花粉管伸長率が100%以上になることが必要である。第3図はこれら花粉管伸長率100%以上の花柱が、時間の経過とともにどのように増加してゆくかを示したものである。第3図によると、花粉管伸長率100%以上の花柱が調査全花柱の50%に達するのは、対照の種内交雑 [152-9] × [152-2] では授粉後1時間以内、種間交雑 [152-9] × [8] では授粉後3時間前後であるのに対して亜属間交雑 [152-9] × [2] では授粉後8時間以上を要している。

上記のごとく花粉管の伸長速度は遠縁の交雑ほど

遅く、花粉の発芽遅延の傾向と全く平行的である。

これら花粉の発芽および花粉管の伸長抑制作用は、花粉管の伸長を停止させ受精を不可能にするほど強いものでないとしても、受精率にきわめて悪い影響をおよぼすものと推考される。

〔3〕花粉管先端の異常肥大

ハッカ属の種間交雑および亜属間交雑において見られる花粉管先端の異常肥大部は、橢円形ないし長橢円形で、管径は花粉の直径の40~60%、平均50%の太さを示し、花粉の内容物がここに集まるためにコットン・ブリューに濃染し、花粉管の他の部分よりいつそうはつきりと観察される(第4図G)。第2図に付記した異常肥大率はこのような肥大管端をもつ花粉管が、観察総花粉管中にどのような割合で存在するかを示すものであつて各数値は50花柱、500~1500の管端から得たものである。

第2図によれば、花粉管先端の異常肥大は対照の種内交雑[152-9]×[152-2]では、若干観察されるに過ぎないが、種間交雑[152-9]×[8]では、授粉後10分、30分で39%前後の異常肥大率を示し、授粉1時間後には30%に低下して、その後徐々に減少している。亜属間交雑[152-9]×[2]では、異常肥大率が種間交雑より3~5%高いが、傾向は全く同様である。

つぎに、[2]の最長花粉管の伸長率とこれら花粉管先端の異常肥大率との時間的変動の関係を第2図によつて見ると、対照の種内交雑[152-9]×[152]では、花粉管伸長率は授粉後10分から1時間に至る間に著増するが、異常肥大率は極端に低い値に止まつている。しかるに種間交雑[152-9]×[8]および亜属間交雑[152-9]×[2]では、授粉後30分までは花粉管伸長率は極めて低いのに、異常肥大率は非常に高い値を示している。

安田(1947)は、交雑不和合性のペチュニアにおいて、花粉管の先端に異常肥大の起る場合、花柱の中間部ではごく少数であるが花柱基部に近づくにつれて増大するとしている。本実験のハッカにおいては、時間の経過につれて多少減少するも授粉直後よりおこり、発現率は類縁の遠いものほど著しいことは、安田の場合とやゝ異なつている。交雑不和合性のペチュニアの花粉管先端の異常肥大の原因について、LINSKENS(1955)は管端の呼吸が増加し、遊離の糖が急激に消費されるためである

と述べている。しかしハッカの場合、肥大した部分がコットン・ブリューで濃染し原形質が集積していることが観察されるので、ハッカにあつては花粉管の先端の吸水力と膜物質の合成力との平衡が破れて、管端の膜が肥厚し原形質吐出を行うことができなくなるためではないかと考察される。

なおハッカ属においては、花粉管は花柱の細胞間隙の誘導組織を貫いて進むために花粉の柱頭上での発芽が早く、かつほとんど異常肥大をおこさない種内交雑においては、比較的短時間に多数の花粉管が花柱基部に達することになり、したがつて、受精能力のある花粉管も多いことが予想され、珠孔内侵入後の受精も正常に行われるものと思われる。これに反し花粉の発芽が遅く、異常肥大を起し易い遠縁の種間交雑および亜属間交雑では、花粉管に異常肥大がおこれば、直ちに、機械的に組織を貫くことが出来なくなり伸長はそこで停止することになる。肥大をまぬがれて伸長中の花粉管も第2図の観察結果に見られるように伸長途中で異常肥大をおこし、逐次伸長を停止するので花柱基部に到達する花粉管の数が減少するとともに到達に長時間を要し、花粉管の受精能力も弱まり、受精→胚の発達→結実の一連の過程に支障をきたすものと推察される。なお、受精は種内交雑では授粉後約20時間で完了するが、種間交雑では約32時間、亜属間交雑では40時間前後と遅延し、前述の結果と一致しているがこれらの詳細については後報で述べたい。

IV. 摘 要

1. ハッカ属の第Ⅰ亜属と第Ⅱ亜属に見られる交雑不和合の原因を追求するために、両亜属にわたる3種4系統を用い、種内交雑、種間交雑および亜属間交雑の3交配組合せについて柱頭上における花粉の発芽および花粉管の伸長状況などを調べた。

2. 第Ⅱ亜属の種内交雑においては、柱頭上での花粉の発芽および花粉管の伸長速度はともに早く、かつ多数の花粉管が花柱基部に達する。しかし亜属間交雑では、花粉の発芽および花粉管の伸長速度はともに著しく遅延し、花柱基部に達する花粉管の数も少ない。種間交雑は両交雑のほぼ中間的な様相を示す。

3. 種内交雑では、ほとんど花粉管先端の異常肥大は認められないが、種間交雑および亜属間交雑では異常肥大が授粉直後より35~40%も観察される。

Fig. 4. Pollen germination on the stigma and pollen-tube penetration in the tissue of style.

A: Germinating pollen on the stigma tissue (<i>M. arvensis</i> × <i>M. spicata</i> , 30 minutes after pollinated)	× 75
B: Penetration of pollen-tube into stigma tissue (<i>M. arvensis</i> × <i>M. Pulegium</i> , 30 minutes after pollinated)	× 360
C: Ditto (<i>M. arvensis</i> × <i>M. arvensis</i> , 10 minutes after pollinated)	× 360
D: Apex of pollen-tube in the tissue of style (<i>M. arvensis</i> × <i>M. spicata</i> , 8 hours after pollinated)	
a: normal b: swollen	× 330
E: Pollen-tubes close to the base of style (<i>M. arvensis</i> × <i>M. Pulegium</i> , 8 hours after pollinated)	× 75
F: Pollen-tubes (painted with jetblack ink) at the base of style	× 360
G: Pollen-tubes with abnormally thickened apex (<i>M. arvensis</i> × <i>M. spicata</i> , 8 hours after pollinated)	× 360
a: cannot penetrate into the stigma tissue b: penetrate into the stigma tissue but can grow no more	
c: grows abnormally on the stigma	

引用文献

1. BRIQUET, J. 1897. *Labiatae*. 117. *Mentha*. 317~324. In ENGLER und PLANTL, *Natürliche Pflanzenfamilien*. 4(3 a).
2. BENTHAM, G. 1865. *Handbook of the British Flora*. 2: 645~650.
3. 池田長宇 1961. 細胞遺伝学的方法によるハッカ属植物の育種学的基礎研究 5~55. (岡北印刷所)
4. LINNAEI, C. 1753. *Species Plantarum*. 2: 576~578.
5. LINSKENS, H. F. 1955. Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauch Hemmung selbststeriles Petunien. *Zeits. Bot.* 43(1): 1~44.
6. 志佐 誠 1960. 植物の自家不和合性について, 農業及園芸. 35: 1827~1830, 1985~1990.
7. 志佐 誠・加藤幸雄 1962. 植物生殖生理学, 136~142. (誠文堂新光社)
8. 安田貞雄 1947. 高等植物生殖生理学, 230~247. (養賢堂)

Summary

1. For the historical approach to the elucidation of the crossincompatibility between the two subgenuses of the genus *Mentha*, the germination of pollen grains and the growth of pollen-tubes were investigated in the following crosses: —

M. arvensis × *M. Pulegium*

M. arvensis × *M. spicata*

M. arvensis × *M. arvensis*

M. Pulegium belongs to the *Pulegium* subgenus, while both *M. arvensis* and *M. spicata* are among the *Menthastrum* subgenus.

2. Though the pollen grains of *M. Pulegium* could germinate on the stigma of *M. arvensis*, their germination occurred after some delay, and the growth of their pollen-tubes was slower. Consequently, fewer pollen-tubes could get to the base of the style of *M. arvensis* as compared with those of *M. arvensis* and *M. spicata*.

3. Abnormal thickening at the growing end of the pollen-tubes was observed in the three crosses mentioned above without exception. It was particularly frequent just after the pollen grains penetrated into the stigma tissue in the crossing between *M. arvensis* and *M. Pulegium*, and, to a lesser extent, in the one between *M. arvensis* and *M. spicata*. It was considered that this abnormal thickening at the growing end of pollen-tubes was responsible for the reduced elongation of pollen-tubes and finally introduce poor fertilization.

S. ONO

Faculty of Agriculture, Okayama University, Okayama 700

H. HORIO

Tsumagoi Potato Farm, M.A.F., Tsumagoi, Gunma 377-15