

3 1 植物染色体の核型分析の試み

1 研究の動機

生物の授業で体細胞分裂について学習し、生物には相同染色体が2本ずつ含まれることを学んだ。このことを身近な植物について、核型分析を行って調べてみたいと思った。

2 実験方法

染色体標本を得るためには、根の先端の分裂組織（根端分裂組織）を用いた。

(1) 発根処理

ここで紹介するキク科のエンシュウハグマについては、0.01%のハイポネクス水溶液に浸し、エアープンプで空気を送りながら2～3週間放置した。キンポウゲ科のケキツネノボタンの場合は水につけても発根しなかったため、採集場所で新鮮な根を切り取り、その場でコルヒチン処理した。

(2) コルヒチン処理→固定→解離処理

上記の操作で発根したもの、あるいは直接切り取ったものを、0.002mol/l・8-オキシキノリンと0.1%コルヒチンの1:1混合液に常温で4～5時間浸した。続いてその根端をカルノア液

(エタノール:酢酸=3:1混合液)に移し、冷蔵庫(4℃)で顕微鏡観察前日まで保存した。そして実験の24時間前には解離処理のため、1mol/l塩酸と45%酢酸の1:9混合液に移し、冷蔵庫(4℃)に入れておいた。

(3) 顕微鏡観察(押しつぶし法)

解離処理した根をスライドグラス上に置き、先端から1～2mm程度のところで切り、残した先端部を柄付き針で潰した後、酢酸オルセイン液を加えてさらに潰した。続いてカバーグラスを気泡が入らないようにかぶせ、ずれないように注意しながら上から軽くたたいた。最後にろ紙をかぶせてカバーグラスの上から指で強く押した。作成した

プレパラートを顕微鏡で観察し、分裂中期の染色体がうまく散らばった細胞を探した。そして、デジタルカメラまたはフィルムカメラによる顕微鏡写真撮影装置で撮影した。

(4) 核型分析

撮影した写真をプリントアウトし、染色体の形状にそって切り取り、全体長や長腕、短腕の長さを基準に相同染色体の組み合わせをつくり、全体長の長い順に並べた。ケキツネノボタンについては、各染色体の長腕及び短腕の長さをノギスで計り、データを表計算ソフトを用いて分析した後、核型イデオグラムを作成した。

※ 私達が用いた「押しつぶし法」は、物理的な力を加えることから、染色体を変形させてしまう恐れもある。従って、相同染色体を見つける作業においてもこのことを念頭におき、一部で完全に形状が一致しない場合でも、全体とのバランスを見て止むを得ないとすることもあった。

3 実験結果

(1) キツネノボタン

(キンポウゲ科キンポウゲ属)

ケキツネノボタンは、水辺や水田の近くなどの湿った土壤に生育するキンポウゲ科の植物である。本校近くを流れる二俣川周辺にも生育するが個体数が少なく、十分な根端試料がとれなかった。磐田市内のひょうたん池(磐田市西貝塚)周辺および旧豊岡村の水田の畔に生育していたものを用いた研究結果を示す。

ア ひょうたん池周辺で採集したもの

2つの核型分析が可能な染色体標本Aおよび標

本Bを得ることができ、分析を行った。図1～図3に標本Aの結果を示す。

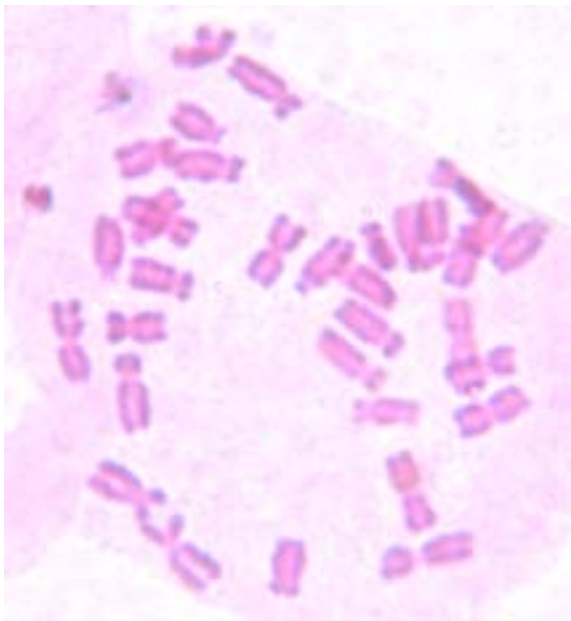


図1 ケキツネノボタン（ひょうたん池：標本A）の染色体像



図2 図1の写真に基づく核型分析結果

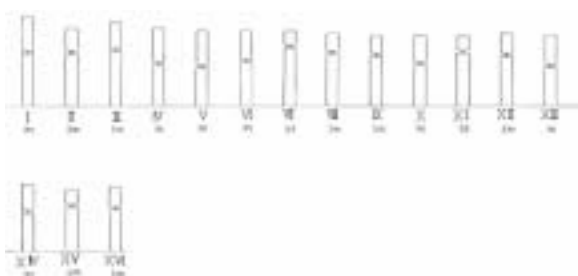


図3 ケキツネノボタン（ひょうたん池：標本A）の核型イデオグラム

図鑑などの文献には、ケキツネノボタンの染色体数は32本となっているが、今回分析した2標本とも染色体数は33本であり、私達が第IVもしくは第Vグループに分類した染色体が3本あるという異数性を示していた。（核型分析の写真やイデオグラムでは、第IVと第Vグループの染色体

の形状の差はほとんどないので、図2及び図3では暫定的に第IVグループに含めてある。）

イ 旧豊岡村で採集したもの

2つの核型分析が可能な染色体標本Aおよび標本Bを得ることができ、分析を行った。

これらの資料では、図鑑等に示されているとおり染色体数は32本であった。

なお、標本A、B以外に核型分析までは行わなかったが、2つの標本で染色体数の確認を行った。これらの試料でも染色体数は32本であった。

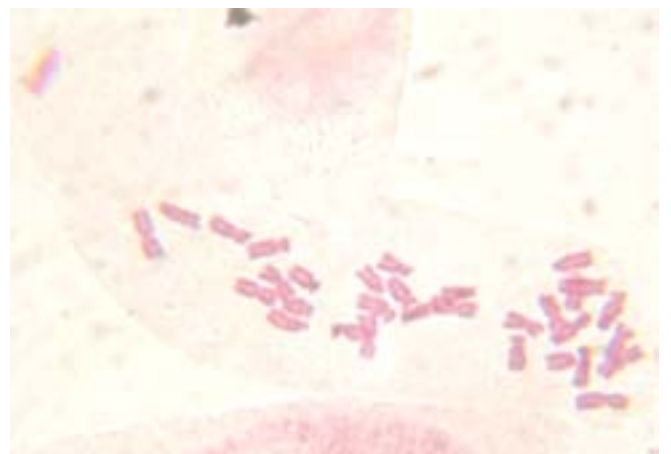


図4 ケキツネノボタン（旧豊岡村：標本A）の染色体像

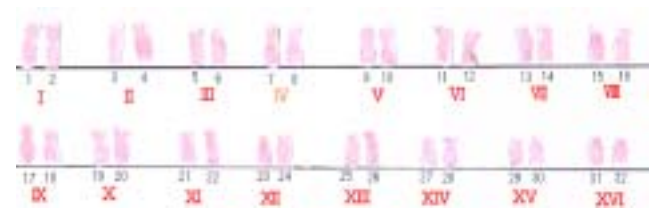


図5 図4の写真に基づく核型分析結果

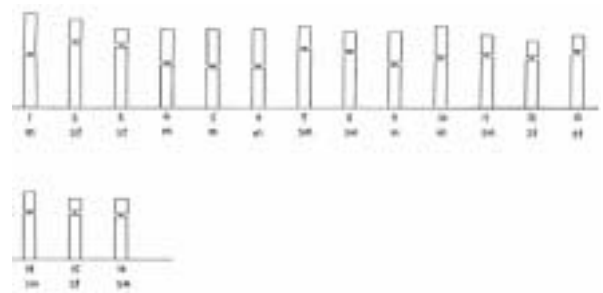


図6 ケキツネノボタン（旧豊岡村：標本A）の核型イデオグラム

ウ ひょうたん池のものと旧豊岡村のものとの形態的な差異について

ひょうたん池周辺のものとは、毛の多さ、葉の形、植物体の全体的な形態などの点で表1に示すように異なっていた。

表1 ケキツネノボタンの形態的な差異

特徴	採 集 地	
	ひょうたん池	旧豊岡村
茎の毛	長く、多い	少ない
葉の形	先がとがっている。鋸歯が深い	先がやや丸い感じ、鋸歯はひょうたん池のものより浅い
植物全体	全体にずんぐりした感じ	ひょろっとしてスマートな感じ

(2) エンシュウハグマ (キク科モミジハグマ属)

エンシュウハグマは、静岡県西部から愛知県東部にかけて多く分布する。採集は、静岡営林署の許可を得て、掛川市北部の八高山の山頂付近で行った。図7～図8にエンシュウハグマから得られた染色体標本の写真及び分析結果を示す。

この植物の染色体は先のケキツネノボタンと比較してかなり小さく、ケキツネノボタンの染色体長が3.2～5.2 μm であるのに対して、エンシュウハグマの場合は1.0～1.6 μm 程だった。また染色体の変形が大きかったり、形状判断が難しいものも多く、分析は簡単ではなかった。染色体試料の中には、22本しか見出せないもの

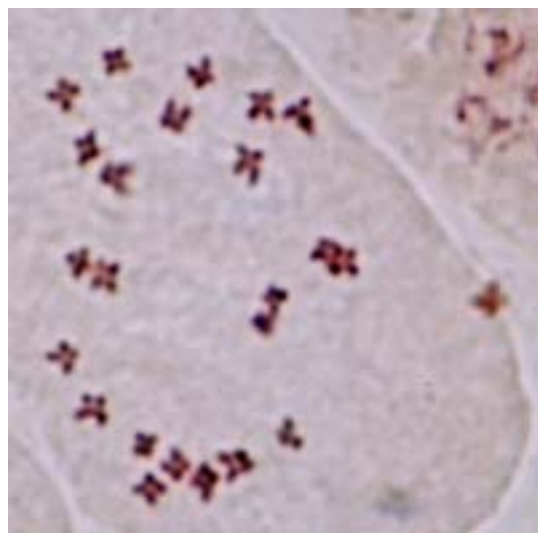


図7 エンシュウハグマの染色体標本



図8 図7の写真に基づくエンシュウハグマの核型

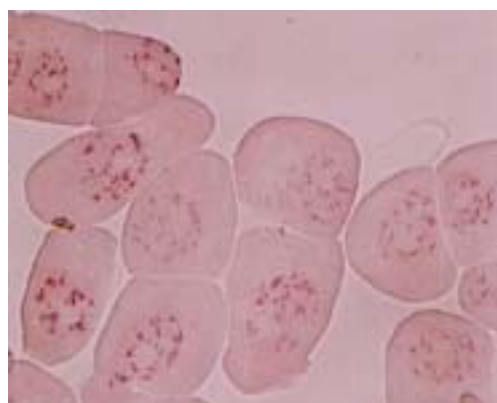


図9 エンシュウハグマの静止核

や26本が数えられるものもあったが、比較的染色体の散らばり状態がよかった3つの標本において24本と数えられたので、今回の結論としては、「染色体数は24本と思われる」とした。

また、分裂期でない静止核の状態、核の中に酢酸オルセインでよく染まる複数の斑点が見出されたのも、この植物の特徴である。上の図9にその写真を掲載した。これは染色体に似ているが、観察倍率を上げて観察することで、分裂期に現れる染色体とは異なることがわかった。

(3) その他の植物

植物の染色体の核型分析を行うにあたっては、適切な分裂組織を得るため、伸長途中の新鮮な根の先端部を用いた。最初は採集してきた植物を水につけておき、その状態で発根してくるかどうかを調べ、発根したものについて、染色体の核型分析を行うことを考えた。

しかし発根の有無は表 2 に示されるように、植物の種類によって、様々であった。

表 2 水につけた場合の発根の有無

発根した植物	タチイヌノフグリ、カキドオシ、ツユクサ、ギシギシ、スイバ、ヤブミョウガ、キュウリグサ
発根しなかった植物	オオイヌノフグリ、ヒメオドリコソウ、カラスノエンドウ、オランダミミナグサ、ホトケノザ、ノビル

そして、発根したものについても、必ずしも染色体が確認できるとは限らず、タチイヌノフグリ（ゴマノハグサ科クワガタソウ属）、カラスノエンドウ（マメ科ソラマメ属）、ギシギシ（タデ科ギシギシ属）、キュウリグサ（ムラサキ科キュウリグサ属）については、染色体が確認できなかった。観察できたものはツユクサ（ツユクサ科ツユクサ属）、ヤブミョウガ（ツユクサ科ヤブミョウガ属）、及びスイバ（タデ科ギシギシ属）であった。

4 考 察

(1) ケキツネノボタンについて

図鑑等の資料では、ケキツネノボタンの染色体数は 32 本とされており旧豊岡村から採集したものがこれにあたる。核型分析の結果から、ひょうたん池で採集したものは私達が第 IV（もしくは第 V）グループに分類した相同染色体が 3 本あり、合計 33 本の染色体数を持つ異数体であるということがわかった。核型イデオグラムを比較してみても、ひょうたん池のものも旧豊岡村のものも染色体の形状の大きな違いは見出されないので、形態的な違いは染色体数の違いによる可能性が高いと考えている。

なお、私達はケキツネノボタンの核型分析から、「ケキツネノボタンはキツネノボタンが倍数化し、4 倍体となったことから種分化したのではないか」という仮説を立てた。

それは、図 10-a に示すように、旧豊岡村の



図 10-a キツネノボタンの核型を予測するため、旧豊岡村の標本 A の核型から同じ形状のものをグループ化

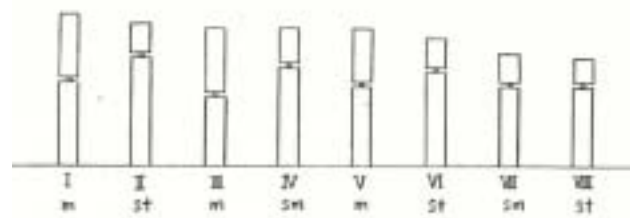


図 10-b キツネノボタンの予測核型のイデオグラム

ケキツネノボタンの標本 A について、その染色体を形状が似ているものどうしを組み合わせると、完全に一致するのではないが、ほぼ相同染色体の 2 グループ（すなわち染色体 4 本ずつ）ごとにまとまりをつくることができたからである。図 10-b は旧豊岡村のケキツネノボタンの標本 A の染色体長に関するデータを図 10-a に基づいて並び換え、表計算ソフトを用いて各染色体グループの長腕及び短腕長の平均を求めるなどして、作成したものである。表 3 にその結果を示す。

今後、キツネノボタンを採集して核型分析し、私達の予測したものと比較してみたいと考えている。

表3 表計算ソフトを用いて求めたキツネノボタンの予測核型データ

上段は染色体長、下段はグループIを100とした場合の相対長

	長腕	短腕	全体長	長腕/短腕	分類
I	11.66	9.30	20.96	1.25	m
	55.6	44.4	100		
II	15.30	4.41	19.71	3.47	st
	72.99	21.05	94.0		
III	9.94	9.04	18.98	1.10	m
	47.41	43.11	90.5		
IV	13.81	4.84	18.65	2.86	sm
	65.89	23.08	89.0		
V	11.30	7.48	18.78	1.51	m
	53.91	35.66	89.6		
VI	12.98	4.11	17.09	3.16	st
	61.90	19.62	81.5		
VII	11.34	3.96	15.30	2.86	sm
	54.08	18.90	73.0		
VIII	10.83	3.25	14.08	3.33	st
	51.64	15.50	67.1		

(2) エンシュウハグマについて

染色体が小さく、くびれ（動原体）の位置や染色体全体の大きさなどの形状の判断が難しかった。そのため相同染色体の組み合わせの判断等については細部に誤りのある可能性は否定できないが、私達は大筋では間違っていないと考えている。しかし、染色体数については図鑑等の文献を調べても載っていないうえ、インターネットで検索しても見つからない。エンシュウハグマは愛知県東部から静岡県西部という限られた地域にしか分布していないため、染色体に関しては調査研究がなされていないのではないかと考えている。そうであるならば、エンシュウハグマの染色体数についての報告は私達のこのレポートが最初のものであろう。

また静止核に見られた特徴的な構造（図9）は染色体の凝集構造が分裂期以外でも緩まないままの異質染色質である可能性があるが、これだけでは断定することはできないと考えている。

5 感想

様々な植物について核型分析を試みたが、染色体の核型分析に使えるような体細胞分裂中期の写真を得るためには、授業で行った細胞分裂の観察

実験よりも数段高いレベルの実験技術と観察力が必要だった。また、発根させるための環境設定が不十分で、分裂が盛んな根端部がなかなか得られなかった。このようなことから、はじめはなかなか良好な標本が作れなかった。

何度も標本作成を試みたが、作成した数枚のスライドの中で、良好な分裂中期染色体像を持つものが数個という程度であった。また、分析を試みても染色体の重なりや大きすぎると、形状の判断が難しくなり、分析不能となるケースも多くあった。比較的状態の良い標本ができて、その中から核型分析ができるような標本を見つけるために、根気よく顕微鏡観察を続けなければならぬこともあった。しかし、染色体標本の写真から染色体像を切り取り、相同染色体の組み合わせをつくらせて核型分析することはパズルを解いていくような面白さがあった。

実験を始めたころは根をただ水に漬けていただけだったため発根しないものが多かったが、エンシュウハグマのように0.01%のハイポネクス水溶液に浸しエアレーションすることで発根が見られるケースもあったので、これまで分析できなかった植物についてもこの方法で再度挑戦してみたい。

これまでの研究から「ケキツネノボタンに異数体がある」ということと「エンシュウハグマの染色体数はほぼ24本である」という2つの大きな発見ができた。今後はこの成果をふまえて、さらに研究を進展させていきたい。

参考文献

- 「細胞分裂と細胞遺伝」
監修：木原 均編集：山下 孝介
(裳華房)
- 「日本植物図鑑」(保育社)