オオバナノエンレイソウの還元分裂 染色体に及ぼす低温処理の影響

劉 逸 民 ・ 松 浦 一

北海道大学理学部植物学教室

Received August 30, 1966

THE EFFECT OF LOW TEMPERATURE TREATMENT ON MEIOTIC CHROMOSOMES IN *TRILLIUM KAMTSCHATICUM* PALL.

I-MIN LIU AND HAJIME MATSUURA

Botanical Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo

ABSTRACT

As the result of a low-temperature treatment (0°C) of *Trillium kamtschaticum* through full cycle of meiosis, the following facts were obtained.

Interstitial chiasma frequency was seen to increase remarkably at metaphase I, and the rate of increase was in proportion to the arm length among individual chromosome arms.

As for the chromosomal aberrations observed at metaphase I, there was a frequent appearance of univalents, fragments and chiasma breakages. The bridges appeared at anaphase I were apparently caused by chiasma breakages.

The increase of interstitial chiasmata, and the relationships between the frequency of chiasma breakages and that of the appearance of bridges are explained on the basis of Matsuura's Neo-two-plane theory.

オオバナノエンレイソウの還元分裂における第一前期の極く早い時期に高温処理を行うと, precocious, mitotic, supra-mitotic, その他種々の型の異常分裂が誘起される (Matsuura 1937, Matsuura and Haga 1940, Liu 1965). また 接合期～太糸期にある個体を 20°C に移した場合, その第一中期におけるキアズマ頻度は, 自然条件下にある個体よりも増加する (Matsuura and Haga 1942, 劉 1963).

著者らは先の高温処理の研究に引続き, 低温処理の還元分裂に及ぼす影響について観察を行ったが, その結果をここに報告する.

材 料 と 方 法

実験に用いたオオバナノエンレイソウ (*Trillium kamtschaticum*, $2n=10$) は, 中小屋に自生する一自然集団より集められたものである. 処理方法は, 9月30日即ち, 自然条件下で花粉母細胞がちょうど premeiotic division を完了した時期の植物体を 0°C に移し, そのまま低温条件下で第一中期, 第一後期及び第一終期にそれぞれ達するのを待って固定染色した. 標本は, 染色体のラセン構造を明確にするために低濃度の塩溶液 (1M KCl : 1M NaNO_3 : 水 = 1 : 3 : 8) で40秒前処理した後, アセトカーミンおしつぶし法によって作成した.

第一中期での観察にあたっては、染色体組成（長さの順にA, B, C, D, E）が完全に解析でき、かつ染色分体のラセン構造が平行化した細胞だけを対象に記録した。キアズマに関しては、著者らは新二面説に基き、複糸期における染色分体の開裂の様式によって起るものと解釈する。即ち、介在キアズマ (Xi) は、複糸期において4本の染色分体が2本ずつに開裂するとき、同一腕上で異なった面に開いた場合に生じ、一方末端キアズマ (Xt) は、開裂が腕内で介在的に起きて、末端部の染色体基質の粘着力が開裂力よりも強い場合に生ずるものと解釈する (Matsuura and Haga 1942 参照)。従って Xi は染色分体の乗り換えとは関係なく、また Xt は Xi の末端化とは考えない。それ故本実験でのキアズマ統計は、Xi と Xt を区別して取扱った。なお二次キアズマ (Matsuura 1941 参照) については、形成された染色体上での位置によりそれぞれ Xi または Xt に加えた。なおこの植物では、中期まで動原体は対合の状態を保つ。従ってこの動原体接合は、キアズマとは全く別のものと見なし、キアズマ統計には含めなかった。

観 察 結 果

1. 第一中期におけるキアズマ頻度

自然条件下に生育した個体（対照区：Control）と低温処理下の個体（低温区：Low Temp.）での Xi 及び Xt の頻度は、Table 1 に示した如く、いずれも低温区で増加を示した。それは Xi で約6.9倍、Xt で約2.4倍である。しかし Xt 頻度は Xi 頻度に比べると非常に低いので、低温処理によるキアズマの増加は、おもに Xi によるものである。また1細胞で見られる Xi 数の最高は、対照区では2、低温区では5であった。

Table 1. Frequencies of interstitial (Xi) and terminal chiasmata (Xt) at metaphase I

Comparison	Plants obs.	Cells obs.	Xi obs.	Xi per cell	Xt obs.	Xt per cell
Control	3	1208	98	0.081	22	0.018
Low Temp.	3	667	365	0.547	29	0.043

染色体腕別の Xi 頻度については、対照区低温区共に腕の長さに比例して増加する波動的な曲線を示した (Table 2, Graph 1)。また対照区に対する低温区の Xt 頻度は一部の腕で増加を見なかったが、Xi 頻度は全ての腕で増加が見られ、その増加率は腕の長さによって増大を示した。本観察では、第一中期染色体の長さを実際に測定しなかったが、低温区ではやや短縮する傾向が見られた。

Table 2. Frequency of interstitial chiasmata in individual chromosome arms

Comparison		D ₁	C ₁	A _{1/2}	B ₁	E ₁	B _s	E _s	C _s	D _s *	Total	Arm pairs obs.
Control	obs.	26	16	16	8	7	4	4	1	0	98	1208
	freq.	0.022	0.013	0.013	0.007	0.006	0.003	0.003	0.001	—	0.081	
Low Temp.	obs.	82	65	62.5	49	25	12	5	2	0	365	667
	freq.	0.123	0.097	0.094	0.073	0.037	0.018	0.007	0.003	—	0.547	
Relative length**		15.6	15.1	14.8	12.7	8.8	7.5	5.5	4.3	0.9	100.0	

* Subscript l and s indicate long and short arms respectively. A_{1/2} means that the total number of chiasmata formed on both arm pairs of A-chromosome was divided by 2, since the two arm pairs are of nearly equal length and cannot be distinguished from each other.
** Accorded to Matsuura and Takizawa (1946).

Graph 1. The relation between interstitial chiasma (Xi) frequency per pair of arms and individual arm-length (relative length). Control=field-condition. Low Temp.=low-temperature treatment.

2. 第一中期における染色体異常

正常な第一中期染色体は、動原体接合によって、または動原体とキアズマによって二価染色体を構成している (Figs. 1—2)。異常としては、一価染色体 (Figs. 3—4)、染色体断片やキアズマ切断 (Figs. 3—8) が見られた。それらの異常細胞頻度は、Table 3 に示した如く、一価染色体が4.2倍、染色体切断が30倍、キアズマ切断が62.5倍と何れも対照区に比べて低温区で増大している。その他、低温区では、染色糸のラセン化が不完全なもの (Fig. 9)、伸びたもの (Fig. 10) と著しく染色体切断を起したもの (Fig. 11) が各1細胞ずつ見られた。

Table 3. Frequencies of aberrant cells at metaphase I

Comparison	Cells obs.	Cells with			Total cells aberrant **
		univalents	fragments	Xbr *	
Control	1208	30 2.48%	1 0.08%	1 0.08%	32 2.65%
Low Temp.	667	70 10.49	16 2.40	33 5.00	113 16.94

* Xbr=chiasma breakages.

** Among all the aberrant cells, some contained two different kinds of aberrations within a cell.

キアズマ切断 (Xbr) は、常にキアズマにおける染色分体の切断と再結合により生ずる 現象である。この現象は、染色体がまだ相関ラセンを構成している前中期では見られないが、その後染色分体が平行化した時に初めて見出される (Matsuura 1950)。観察された Xbr の数は、対照区で1、低温区で40あった。この頻度は、それぞれの区の Xi 頻度の1%と11%に当り、低温区の方が11倍も高かった (Table 4)。なお Xbr は何れの染色体にも見られ、その数は El とA染色体の腕でやや高いほかは腕の長さとは大体比例的關係を示した。Xbr の形像については後に記すが、観察ではX型がもっとも多く (Figs. 3-4 のE染色体, Figs. 5-8 のA染色体)、またし

Fig. 1. A normal PMC at metaphase I in the control material.
Fig. 2. A normal PMC at metaphase I in the low-temperature treated material.
Figs. 3-11. Abnormal PMCs at metaphase I in the low-temperature treated materials. 3-4, Xbr in bivalent A (showing broken ends still open); Xbr of X type in bivalent E; two univalents of chromosome D. 5-6, Xbr of X type in bivalent A and of O type in bivalent D. 7-8, Xbr at a proximal chiasma in bivalent A. 9-10, Abnormalities of chromonema coiling. 11, Numerous fragments and interchanges due to the extensive fragmentation of chromosomes.

Table 4. Frequencies of interstitial chiasmata (Xi) and chiasma breakages (Xbr) in individual chromosome arms at metaphase I

Comparison		D ₁	C ₁	A ₁ / ₂	B ₁	E ₁	B ₃	E _s	C _s	D _s	Total	Xbr/Xi
Control	Xi	26	16	16	8	7	4	4	1	0	98	1.0%
	Xbr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Low Temp.	Xi	82	65	62.5	49	25	12	5	2	0	365	11.0
	Xbr	9	6	9	2	4	1	0	0	0	40

Figs. 12-16. Abnormal PMCs at anaphase I and telophase I in the low-temperature treated materials. 12, A bridge and a fragment. 13, An akinetic fragment. 14, A univalent laggard. 15, Two isomorphic laggards. 16, Three laggards. Figs. 17-19. Abnormal PMCs at interkinesis in low-temperature treated materials. Fig. 20. A PMC with six micronuclei at late second division.

Table 5. Frequencies of aberrant cells at anaphase I and telophase I

Comparison	Cells obs.	Cell with				Total cells aberrant	
		b	+ f *	laggards**			
Control	1000	2	0.20%	12	1.20%	14	1.40%
Low Temp.	679	25	3.68	72	11.19	101	14.87

* b + f = bridge and fragment.

** Include univalent laggards, chromatid laggards and akinetic fragments.

ばしば切断点の未融合状態のものが見られた (Figs. 3-4 の A 染色体).

3. 第一後期以降における異常

第一後期～終期では、“染色体の橋と断片” (Fig. 12), 無動原染色体断片 (Fig. 13), 一価染色体 または染色分体の遅滞 (Figs. 14-16) などの異常が見られた. それらの異常細胞頻度は, Table 5 に示した如く, 対照区に比べ低温区では“染色体の橋と断片”を有する細胞が 18.4 倍, 遅滞染色体を有する細胞が 9.3 倍, 全体で 10.6 倍も高かった. 低温区の間中期では小核を有する細胞が多く見られるが (Figs. 17-19), その第二分裂ではさらに多くの小核を有する細胞が多数見られた (Fig. 20). なお第二後期においても染色体橋が若干認められた.

考 察

温度処理によるキアズマ頻度の変化についてはこれまで諸種の植物で報告されているが, そのパターンは種類によって異なる. 例えば, *Allium* (Poliakova 1940) では低温 及び高温においてキアズマ頻度が増加する. それに対して, *Oenothera* (Oehlkers 1935, 1936) では異常高温 及び異常低温で減少する. また *Tradescantia* (Swanson 1942, Dowrick 1957) や *Hyacinthus* (Elliott 1955) では温度の上昇に従って増加し, *Antirrhinum* (Ernst 1938) *Vicia* (Straub 1937), *Endymion* (Wilson 1959a) などでは逆に減少することが報告されている (Wilson 1959b 参照). 本実験材料であるオオバナノエンレイソウでは, 自然条件下におけるキアズマ頻度は非常に低い. 27°C の如き極端な高温処理の場合では, 相同染色体の対合が阻害されてキアズマは見られない (Liu 1965), しかし 20°C 処理 (Matsuura and Haga 1942, 劉 1963) や 2°C 処理 (Dyer 1964) では著しく増加する. さらに本実験により 0°C 処理でも対照区に比べて増加することが明らかとなった. この観察結果は次に述べる分裂初期の温度条件の違いに起因したものであって, キアズマ形成に関する染色体行動を推測するに役立つ一資料と言える.

オオバナノエンレイソウの花粉母細胞における還元分裂は, 札幌の自然条件下では10月上旬から翌年の3月下旬に至る長期間を要する. そのうち第一前期は10月から2月下旬までで, 分裂期間の大半を占めている. 全分裂期間を通して植物体が受ける温度の変化は, 10月上旬 平均気温 15°C から徐々に低下し, 積雪の 見られる 12月上旬で大体 0°C となるが, その後は雪に埋もれるため, 気温とは関係なく 3月下旬の融雪時まで全く 0°C である. 従って本実験の低温区と対照区の温度条件の違いは, 細糸期接合期に当る10月上旬から12月上旬の期間だけであって, キアズマ形成期の複糸期では 両区ともに全く同条件の 0°C にある. キアズマ形成に関しては, 先に述べた如く, 著者らは複糸期における染色分体の開裂の様式によって起るものと解釈してきた. 複糸期に起る 4 染色分体の 2 本ずつへの開裂は, 一般に末端部から起り動原体に向かって進行するが, 条件によっては腕の中間部からも始まりうる (以下開裂の 始まる部分を仮に開裂点と記す). この時, 同一腕上で起った相隣接する 2 個の開裂点とが, 異なる面に開けば Xi を形成し, もし同じ面に開けば Xi を形成しない. しかし後者の場合でも 2 開裂点間の基質のある一部が開裂を阻止するならば, そこに二次キアズマを形成する. また開裂が中間部から起って末端部が何らかの原因で開きえなければ Xt となる. 従ってキアズマ頻度は, 腕上に起る開裂点の数と密接な関係があると言える. だが本実験の低温区及び対照区では, 太糸期～複糸期での温度条件が等しいため, 低温区

にだけ開裂点の増加があったとは考えられない。低温区での Xi 頻度の増加は、接合期における低温の影響によるものと判断される。その結果は、染色体が太糸期に達してもなお部分的に非対合部を残し、この非対合部が複糸期においてはそのまま開裂に進むからであろうと考えられる。非対合部からの開裂と元来複糸期で起る末端または中間部開裂が異なる面であれば、Xi を生ずること明らかである。以上の推察によりキアズマ頻度は、開裂点の数に関連する問題であるが、それには太糸期における非対合部の数も重要な要因になりうると考えられる。

Hyacinthus (Elliott 1955), や *Oenothera* (Oehlkers 1935, 1936) の低温処理では一価染色体が高頻度に見られているが、これは低温が染色体対合に阻害効果を示した証拠である。その様な対合への著しい阻害は、当然キアズマ頻度を低下させる。しかし本実験の低温区では、一価染色体頻度の増加にもかかわらず、なお Xi 頻度の増加を示した。この事実は注目すべき現象で、太糸期における二価染色体上に多数の非対合部が存在していたことを示唆するものである。

キアズマ切断 (Xbr) については、オオバナノエンレイソウでは Xi 頻度が全般的に低いため、これまで極く稀にしか見られなかった。しかし同属のシラオイエンレイソウ (*T. hageae*) とヒダカエンレイソウ (*T. miyabebeanum*) では、それがしばしば観察されている (Matsuura 1950, Matsuura and Takizawa 1946, Kurabayashi and Saho 1957)。Xbr の生ずる機構については、染色体のラセン系の変換と関係づけられている (Matsuura 1940, 1950)。即ち、中期における 2 染色分体の相関ラセンが平行ラセンに変換する際、半ラセンごとに切断と融合の連続的過程を経るものと考え、各腕ではそれが独立に進行するから一般にキアズマはキアズマとして残る。しかし稀に切断がキアズマ部で同時に起った場合、8 切断端が同一基質内で自由に相手を選んで融合して Xbr の特有の像を生ずる。Xbr の形像には、切断端の組合せにより Fig. 21 に示した 5 型が考えられ、実際にもそれらは観察されている。しかし各型の出現頻度については、基質の分裂がラセンの平行化と同時に進行して融合の相手が一定の制限を受けるため、ある特定の型が多く生ずる。本実験の場合にも、またすでに発表されている諸報告においても、X 型が最も高頻度である。(Table 6)。

Table 6. Frequency of various types of chiasma breakages in *Trillium* spp.

Species	2n	Type of Xbr						Total	Investigators
		X	Y	Y'	XX	O	open		
<i>T. hageae</i>	15	18	3					21	Matsuura, 1950
<i>T. hageae</i>	15	7	5			1	1	13	Matsuura & Takizawa, 1946
<i>T. miyabebeanum</i>	20	301	44	7	7		10	369	Kurabayashi & Saho, 1957
<i>T. kamtschaticum</i>	10	37				1	2	40	Liu & Matsuura

* Y' = inverted Y

なお第一後期で見られた染色体橋は明らかに Xbr に由来したもので、染色体の逆位部における乗換えの結果ではない。次の観察結果がそれを立証する。1) 染色体橋の頻度が Xi 頻度と比例し、かつ Xbr 頻度と全く一致した (後述)。2) 染色体橋形成が染色体組成の全ての要員で見られた。3) 染色体橋と共に見られる染色体断片の長さが非常に変化していた。4) Xbr はみな対称的形像であり、不對称的形像のものは見られなかった。

Fig. 21 に示した Xbr 型のうち、O 型を除いてはすべて染色体橋を形成しうるものである。し

Fig. 21. Diagrammatical illustration of the various types of chiasma breakage. (cf. Matsuura 1950, Kurabayashi and Saho 1957).

かし染色体橋が第一後期、第二後期のいずれで生ずるかは、二価染色体における4個の動原体の分離如何によるものである。本観察で最も多く見られたX型を例にあげると、動原体が同伴分離した場合は常に第一分裂で染色体橋を生じ、異伴分離した場合は第一分裂、第二分裂ともそれぞれ $\frac{1}{2}$ ずつ生ずる。即ち、第一分裂では全体の $\frac{1}{2}$ を生ずることになる。本実験の低温区で見られた Xbr をもつ細胞の頻度 (5.00%) と第一分裂で染色体橋をもつ細胞の頻度 (3.68%) の関係は、上記の期待値と正に一致している。

要 約

オオバナノエンレイソウの還元分裂の全期間を低温処理 (0°C) した結果、次の事柄が観察された。

1) 第一中期における介在キアズマ頻度が、対照区に比べて著しく増加した。そして染色体腕別でのその頻度は、長さに従って増加率が大きであった。

2) 染色体の異常としては、第一中期において一価染色体、染色体断片及びキアズマ切断が多数観察された。なお後期において出現した染色体橋は、明らかにキアズマ切断によるものであった。

介在キアズマの増加、及びキアズマ切断頻度と染色体橋の出現頻度の関係は、新二面説にもとづいて説明した。

終りにあたり、実験上の便宜を取り計らってくださった北大低温科学研究所・酒井昭教授に厚く御礼申し上げる。

文 献

- Dowrick, G. J., 1957 The influence of temperature on meiosis. *Heredity* **11**: 37-49.
- Dyer, A. F., 1964 Heterochromatin in American and Japanese species of *Trillium*, III. Chiasma frequency and distribution and the effect on it of heterochromatin. *Cytologia* **29**: 263-279.
- Elliott, C. G., 1955 The effect of temperature on chiasma frequency. *Heredity* **9**: 385-398.
- Kurabayashi, M., and T. Saho, 1957 Evolution and variation in *Trillium*. XI. Mechanism of chromosomal isolation in Japanese *Trillium*. *Cytologia* **22**: 273-286.
- 劉 逸民, 1963 還元分裂前期の各時期における高温処理のキアズマ頻度への影響. 日本植物学会第28回大会発表: P. 65.
- Liu, I., 1965 The effect of high temperature treatment on meiotic division in *Trillium kamtschaticum* Pall. *Japan. J. Botany* **78**: 312-318.
- Matsuura, H., 1937 Chromosome studies of *Trillium kamtschaticum* Pall. V. Abnormal meiotic divisions due to high temperature. *Cytologia Fujii Jub. Vol.* 20-34.
- Matsuura, H., 1940 Do. XII. The mechanism of crossing-over. *Cytologia* **10**: 390-405.
- Matsuura, H., 1941 Do. XIV. Primary and secondary chiasmata. *Cytologia* **11**: 380-387.
- Matsuura, H., 1950 Do. XIX. Chromatid breakage and reunion at chiasmata. *Cytologia* **16**: 48-57.
- Matsuura, H., and T. Haga, 1940 Do. VIII. On the mitosis-meiosis relationship. *Cytologia* **10**: 382-389.
- Matsuura, H., and T. Haga, 1942 Do. X. On the origin of chiasma. *Cytologia* **12**: 397-417.
- Matsuura, H., and S. Takizawa, 1946 Do. XX. A statistical analysis on the chromosome association in a triploid species, *T. Hagae*. *J. Fac. Sci., Hokkaido Univ. Ser. V*, **6**: 37-55.
- Swanson, C. P., 1942 Meiotic coiling in *Tradescantia*. *Botan. Gaz.* **103**: 457-474.
- Wilson, J. Y., 1959a Temperature effect on chiasma frequency in bluebell *Endymion nanscriptus*. *Chromosoma* **10**: 337-354.
- Wilson, J. Y., 1959b Chiasma frequency in relation to temperature. *Genetica* **29**: 290-303.