

## フローサイトメトリー分析によるスギ、ヒノキの倍数性の判別

大分県林業試験場 佐々木義則  
 千葉大学園芸学部 三柴啓一郎  
 千葉大学園芸学部 三位 正洋

## 1. はじめに

筆者らは、全国のスギ、ヒノキ精英樹の不稔性原因の究明過程において、多くの自然三倍体を見出し、さらにスギ、ヒノキについて二倍体と四倍体の交配により、多数の人為三倍体を作成している<sup>1)</sup>。これらの研究においては多くの個体の体細胞染色体の観察を行ったが、この場合、労力、マイクロテクニック等の問題があり、容易ではない。

フローサイトメトリー(Flow Cytometry: FCM)は、従来の細胞学的手法等と比較すると、非常に迅速に、正確に、しかも簡便に核DNA量等の測定が可能であることから、動物細胞等では早くから研究に利用されてきた。植物分野においては組織からプロトプラストを単離しなければならないという制約が存在していたが、GALBRAITH et al.<sup>2)</sup>の研究手法の開発により、簡便に測定することが可能となった。これが発端となり、果樹、園芸植物等においてもFCMを用いた研究が実施されるようになってきた<sup>3,4)</sup>。

今回、倍数性が解明されているスギ、ヒノキの精英樹等<sup>5)</sup>についてFCM分析を行い、林木における利用の可能性を検討した。

## 2. 材料および方法

FCM分析には、スギでは二倍体( $2n = 22 = 2X$ )15クローン、三倍体( $2n = 33 = 3X$ )36クローン、四倍体( $2n = 44 = 4X$ )3クローンの計54クローン、ヒノキにおいては二倍体( $2n = 22 = 2X$ )5クローン、三倍体( $2n = 33 = 3X$ )2クローン、四倍体( $2n = 44 = 4X$ )1クローンの計8クローンを用いた。これらはいずれも大分県林業試験場内のクローン集植所から採取した。各個体から当年生針葉を約0.5g取り、DAPI溶液(10mM Tris-HCl: pH7.5, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2ppm DAPI)を約5ml入れたプラスチックシャーレ上でカミソリを用いて細かく切断し、細胞核を遊離させて染色を行った。次にこの懸濁液を40 $\mu$ mメッシュで濾過を行い、5分間

静置した。その後、染色された核を含む濾液をFCM(CA II, Partec社製)で分析を行った。1検体あたりの測定数は2,000~8,000個であり、約1分間を要した。FCM分析のヒストグラムにおけるX軸は相対蛍光強度、Y軸は測定数を示しており、ピークの位置(CP値: Channel Position)は相対的な核DNA量に相当する。FCM分析においては、同一の材料を用いても、実験日、機械の微調整等により、わずかながら異なった結果が得られる場合がある。このため、実験日ごとに対照として、スギの国東3号( $2n = 22 = 2X$ )および大麦( $2C = 11.12pg$  DNA)を用いた。同一の実験条件で分析を行ったスギ、ヒノキについては、国東3号のCP値を基準(1.00)とした相対値(相対的核DNA量)で比較を行った。

## 3. 結果

FCM分析によるスギ、ヒノキの二倍体、三倍体、四倍体の代表的なヒストグラムを図-1に示した。ピークの位置(CP値)は同一の倍数性を示す個体間においても差異があり、特にスギの三倍体では変動が大きい傾向が認められた。全般的にみると、両樹種ともに三倍体は二倍体の約1.5倍、四倍体は二倍体の約2倍の位置にピークが観察された。なお、混数性組織の存在を示すようなピーク等はいずれの個体においても認められなかった。

スギ二倍体の国東3号を基準にした相対的核DNA量の平均値は、スギの二倍体が1.01、三倍体が1.46、四倍体が2.05、また、ヒノキにおいては二倍体が1.00、三倍体が1.49、四倍体が1.89であり、両樹種ともにほぼ理論値に近い値が得られた。

大麦と同一の実験条件で分析を行ったスギ二倍体の国東3号の核DNA量の概算値を算出した結果、 $2C = 13.79pgDNA$ であった。

## 4. 考察

FCMを用いた倍数性の判別に関しては、村上ら<sup>6)</sup>が果樹、三柴ら<sup>7)</sup>がサクラソウについて研究を行っており、

いずれも短時間に、正確に識別できたことを報告している。林木では顕微分光濃度計を用いての相対的核DNA量の測定例<sup>1,2,3)</sup>はあるが、FCMを使用した報告はみあたらない。

今回、スギ、ヒノキの二倍体、三倍体、四倍体の針葉を用いてFCM分析を行ったところ、いずれの個体も、倍数性の識別が容易であることが判明した。従って、FCM分析は林木においても、育種の過程における倍数体の早期検定、組織培養や人為的な倍加処理による倍数性レベルでの変化の測定等に大きく貢献できるものと考えられる。

スギ、ヒノキのFCM分析によるヒストグラムにおいては、草本植物<sup>4)</sup>に比べて細胞破砕物等によるノイズが多く観察され、ピークの位置が明瞭に認められない場

合があるため、今後、試料の調製法等を検討する必要があるであろう。

#### 引用文献

- (1) 馬場繁幸: 琉球大学農学報, 38, 77~174, 1991
- (2) GALBRAITH, D. W. et al.: Science, 220, 1049~1051, 1983
- (3) 近藤禎二: 33回日林関東支論, 79~80, 1981
- (4) 三柴啓一郎・三位正洋: 育学雑, 44(別2), 134, 1994
- (5) 向井譲ほか: 29回日林中部支講, 121~124, 1981
- (6) 村上ゆり子ほか: 園学雑, 60(別1), 64~65, 1991
- (7) 佐々木義則: 林木の育種, 172, 4~10, 1994

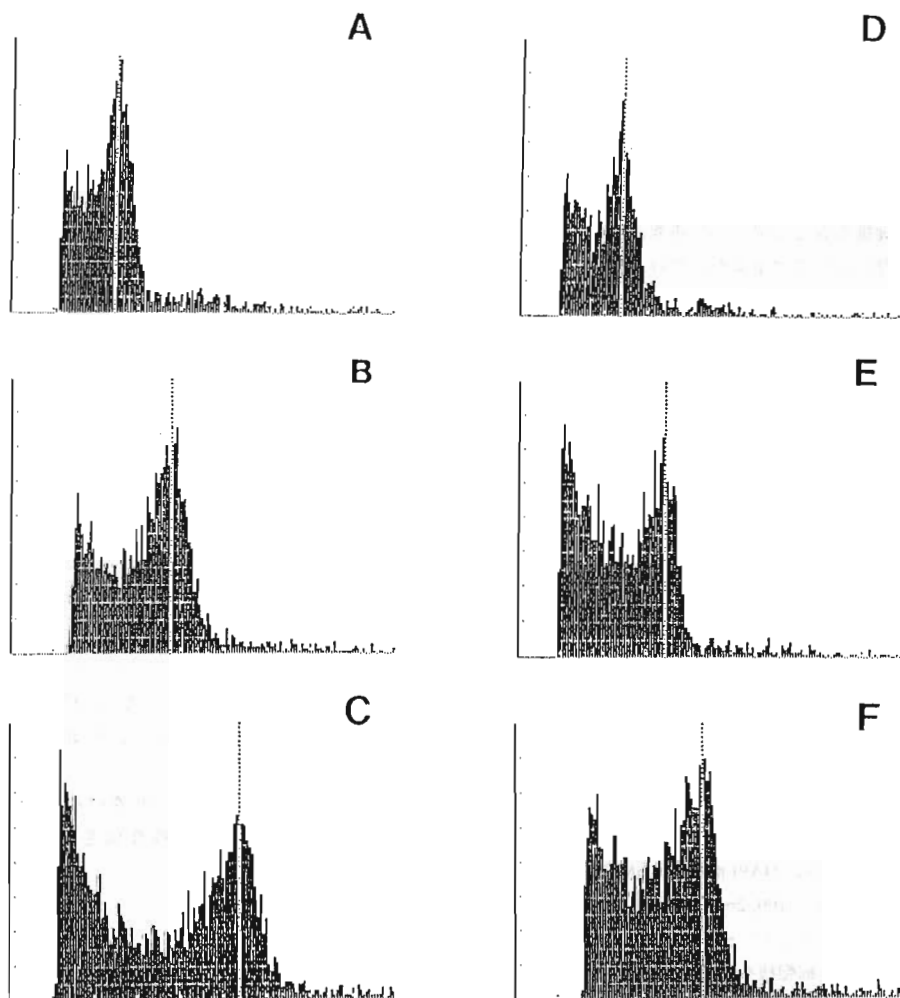


図-1 核DNA量のヒストグラム (X軸: Fluorescence intensity, Y軸: Count)

A: スギ2X(国東3号), B: スギ3X(日田16号), C: スギ4X(Cr-7)  
 D: ヒノキ2X(藤津8号), E: ヒノキ3X(富士2号), F: ヒノキ4X(三光ヒノキ)