

スギ, ヒノキ, カイツカイブキ自然突然変異体のフローサイトメトリー分析

大分県林業試験場 佐々木義則
 (株)池田理化 石塚 涼子
 千葉大学園芸学部 三柴啓一郎・三位 正洋

1. はじめに

フローサイトメトリー (Flow Cytometry:FCM) は従来の顕微鏡等を使用した細胞学的手法と比較すると、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、医学分野においては早くから研究に利用されてきた⁹⁾。植物においては、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.¹⁰⁾の研究手法の開発により、きわめて簡便に測定することが可能となった。これが発端となり、果樹や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²⁾。

今回、スギ、ヒノキ、カイツカイブキの自然突然変異体について FCM 分析を行い、倍数性等の早期検定の可能性を調べた。

2. 材料および方法

FCM 分析に用いた材料を表-1に示した。いずれの自然突然変異体も、元木 (A)、枝変わり (B)、さらにヒノキにおいては枝変わり (B)からの再枝変わり (C)についてもそれぞれ針葉を用いて分析を行った。なお、分析にあたっては、単独試料のみではなく、既知と未知の等量混合試料 (A+B, A+C)についても検討した。

試料の調製にあたっては、先端の針葉を約 0.5cm 採取し、High Resolution Kit Type P (Partec 社製) の A 液 (核抽出液) を約 0.5ml 入れたプラスチックシャーレー上でカミソリを用いて細かく切断した。約 10 分間放置後 50 μ m

ナイロンメッシュで濾過し、High Resolution Kit Type P (Partec 社製) の B 液 (DAPI 染色液) を約 2.5ml 加えて染色を行った後、FCM (PA 型, Partec 社製) で分析を行った。

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 (X 軸) は相対的な核 DNA 量に相当する。いずれの変異体も元木を基準 (1.00) とした相対値 (相対的核 DNA 量) で比較を行った。

3. 結果

単独試料の DNA ヒストグラムにおいて、ヤブクグリスギおよび日出ヒノキの枝変りは、元木の約 2 倍の位置にピークが認められ、日出ヒノキの再枝変りは元木とほぼ同じ位置にピークが観察された。アヤスギの枝変りのピークは元木に比べてやや右よりに出現し、核 DNA 量が僅かながら多い傾向が認められた。カイツカイブキの枝変りは、元木とほぼ同じ位置にピークが観察された。

混合試料 (元木+枝変り) の DNA ヒストグラムの場合、ヤブクグリスギおよび日出ヒノキにおいて、それぞれ二つの明瞭なピークが観察され、枝変りは元木の約二倍の位置にピークが認められた (図-1, 図-2)。アヤスギ (元木+枝変り)、日出ヒノキ (元木+再枝変り)、カイツカイブキ (元木+枝変り) ではピークの間隔は観察されず、一つのピークのみが認められた。

FCM 分析による DNA ヒストグラムに基づいて、相対的核 DNA 量 (相対値) を算出した結果を表-2に示した。

表-1 フローサイトメトリー分析に用いた材料

樹種	収集場所	元木 (A) との針葉形態の比較		体細胞染色体数		
		B	C	A	B	C
ヤブクグリスギ	大分県那馬溪町	肥厚、肉太	-	2n=22=2X	N. O.	-
アヤスギ	大分県林試構内	湾曲が大	-	2n=22=2X	2n=23=2X+1	-
日出ヒノキ	大分県日出町	肥厚、肉太	元木に似る	2n=22=2X	N. O.	N. O.
カイツカイブキ	大分県林試構内	針状葉	-	2n=44=4X	N. O.	-

(注) A: 元木, B: 枝変り, C: 再枝変り, N. O.: 未観察 (体細胞染色体数は不詳)

Yoshinori SASAKI (Ooita Pref. Forest Exp. Stn., Hita Ooita 877 - 1361), Ryoko ISHIZUKA (IKEDA Scientific Co., Ltd., Chiyodaku Tokyo 101), Keiichiro MISHIBA (Fac. of Hort., Chiba Univ., Matsudo Chiba 271 - 0092) and Masahiro MIU (Fac. of Hort., Chiba Univ., Matsudo Chiba 271 - 0092). Flow Cytometric analysis of the spontaneous mutations in *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa* and *Sabina chinensis* var. *Kaizuka*

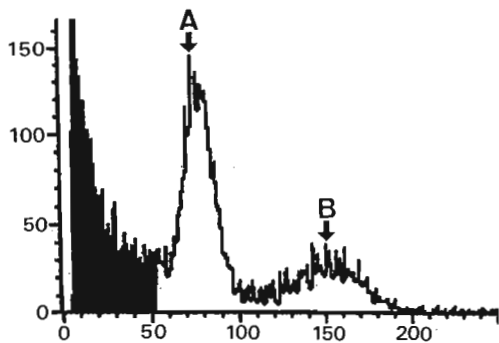


図-1 ヤブクグリスギ自然突然変異体のFCM分析

X軸：相対蛍光強度，Y軸：測定数

A：元木のピーク， B：枝変りのピーク

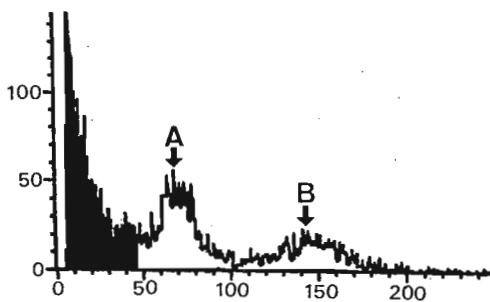


図-2 日出ヒノキ自然突然変異体のFCM分析

X軸：相対蛍光強度，Y軸：測定数

A：元木のピーク， B：枝変りのピーク

表-2 元木および枝変りの相対的核DNA量の比較

樹種	単独		混合		合計
	A	B	C	A+B	
ヤブクグリスギ	1.00	2.11	-	1.00 1.89	-
アヤスギ	1.00	1.19	-	N. D.	-
日出ヒノキ	1.00	2.23	0.92	1.00 2.11	N. D.
カイツカイブキ	1.00	0.98	-	N. D.	-

(注) A：元木， B：枝変り， C：再枝変り

N. D.：ピークの見分けができないことを示す。

4. 考 察

FCMを用いた倍数性等の判別に関しては、村上ら⁹が果樹、三柴⁷らがサクラソウについて研究を行っている。林木ではO'BRIEN et al.⁸がマツ属の種のゲノムサイズの測定にFCMを使用している。筆者ら⁹は前報でスギおよびヒノキの二倍体、三倍体、四倍体についてFCM分析を行い、倍数性等の識別が容易であることを報告した。

今回、体細胞染色体数が既知および未知の4個体の自然突然変異体について、FCM分析を行ったところ、二倍体のヤブクグリスギおよび日出ヒノキの元木から四倍体と推定される枝変りが発生し、さらに、日出ヒノキ枝変りの四倍体からは二倍体と推定される枝変りが再度発生していることが判明した。アヤスギの枝変りによる異数体⁷においては、二倍体の元木との間に僅かながら差異が認められたが、これは染色体数の1本増加を反映しているものと推察される。カイツカイブキの枝変りは元木と同じ倍数性と考えられる。

単独試料と混合試料のFCM分析においては、後者の方が同時測定といった条件設定ができることから、より正確な相対値が得られやすいものと考えられる。し

かしながら、今回の異数体の例に見られるように、混合試料でピークが分離しない場合は、単独試料で再検討する必要もあろう。

以上の結果から、FCM分析は、倍数性や異数性を容易に、かつ迅速に推定することが可能であることから、今後、林木育種の基礎的資料を得る上で大きく貢献できるものと考えられる。

二倍体からの枝変りによる四倍体の出現例は、ヒノキでは岡村⁹や筆者⁹が報告しているが、スギにおいては報告例がなく、またヒノキ枝変りの四倍体から再度二倍体の枝変りが発生した事例もみあたらず、これらはきわめて興味深い現象と考えられる。

引用文献

- (1) GALBRAITH, D. W et al.: Science, 220, 1049~1051, 1983
- (2) 三柴啓一郎・三位正洋: 育学雑, 44(別2), 134, 1994
- (3) 村上ゆり子ほか: 園学雑, 60(別1), 64~65, 1991
- (4) O'BRIEN, L. E. W. et al.: Plant Science, 115, 91~99, 1996
- (5) 岡村政則: 24回日林関西支講, 63~64, 1973
- (6) 太田和夫(監修): フローサイトメトリー, pp.824, 癌と化学療法社, 東京, 1994
- (7) 佐々木義則: 大分県林試研究時報, 12, 5~12, 1986
- (8) 佐々木義則ほか: 林木の育種(特別号), 51~54, 1997