

スギ・ヒノキ異数体のフローサイトメトリー分析^{*1}佐々木義則^{*2}・三柴啓一郎^{*3}・三位 正洋^{*3}

I. はじめに

著者らは前報(8, 9)でスギ, ヒノキの倍数体のフローサイトメトリー(Flow cytometry: FCM)分析を行い, 非常に迅速に, かつ簡便に倍数性の識別が可能であることを報告した。

今回, スギ, ヒノキの異数体についてFCM分析を行い, 異数性の推定の可能性を検討した。

II. 材料および方法

FCM分析に用いたスギの異数体は, 1986年に大分林試験構内で発見したアヤスギの枝変わり($2n = 23 = 2X + 1$)(7)であり, 対照として元木($2n = 22 = 2X$)を用いた。ヒノキの異数体は1982年4月に二倍体($2n = 22 = 2X$)と四倍体($2n = 44 = 4X$)の人工交配を行って作出した2種類($2n = 32 = 3X - 1$, $2n = 34 = 3X + 1$)(10)であり, 対照として人為三倍体($2n = 33 = 3X$)を用いた。

内部標準(Internal Standard: IS)として, スギでは大麦(品種名: New Golden, $2n = 14 = 2X$, $2C = 10.40\text{pg}$), ヒノキでは精英樹の藤津8号($2n = 22 = 2X$)を用いた。

試料の調製にあたっては, 枝の先端の若い針葉を約0.5cm採取し, 市販の核単離溶液(Partec社, High resolution DNA staining kit type P: Solution A)の0.2ml中で組織をChoppingし5分間室温で放置した。その後, DAPI染色液(2)を1ml加え, 40 μm のメッシュで濾過し5分間放置後, FCM(PA型, Partec社製)で測定を行った。測定試料の相対的核DNA量はISを基準(1.000)とした比数で示した。

III. 結果

スギの二倍体およびその異数体の測定結果を表-1に示した。異数体は二倍体に比べて3.5%増の核DNA量を示し, 1本の染色体数増加を裏付ける結果が得られた。

ヒノキの三倍体およびその異数体の測定結果を表-2,

また代表的なDNAヒストグラムを図-1, 図-2, 図-3に示した。表-2のISに基づき3種類の間の分散分析を行った結果, いずれの2種類間においても5%以上の水準で有意差が認められた。三倍体に比べて $2n=32=3X-1$ の異数体は平均3.4%減, 一方, $2n = 34 = 3X + 1$ の異数体は平均2.5%増の核DNA量を示し, ± 1 本の染色体数の増減を反映した結果が得られた。

IV. 考察

LEE, J. H. et al.(1)はコムギ品種のモノソミックシリーズのFCM分析を行い, 各染色体のDNA量を推定したところ, 0.58~1.12pgであったと述べている。中島ら(4)はネギの異数性判別にFCM分析を利用しており, 増加した染色体の大きさにより, DNAヒストグラムのピークに差異が認められたことを報告している。

PFOSSE, M. et al. (6)はコムギ, ライムギ等のFCM分析を行い, 異数体と倍数体間で最小1.84%のDNA含量の差が検出可能と述べている。林木ではO'BRIEN, I. E. W. et al. (5)がFCM分析によりラジアータマツのトリソミックを報告している。

今回, 体細胞染色体数既知のスギおよびヒノキ異数体を供試材料とし, それぞれ内部標準との混合試料を調製し, FCM分析を行った。その結果, スギの異数体では, 染色体数1本の増加を示唆する核DNA量が認められ, これは核型分析における相対長の測定報告(3)とほぼ類似する結果であった。ヒノキの三倍体と比較した場合, $2n = 3X - 1$ の3個体における核DNA量は2.7~4.3%の減少, 一方, $2n = 3X + 1$ の3個体における核DNA量は2.0~3.3%の増加を示したが, %値の大きい個体は, 相対長が長い染色体, 一方, %値の小さい個体においては相対長が短い染色体がそれぞれ染色体数の増減に関与しているものと推察される。

以上のことから, スギ, ヒノキの異数体においても他

^{*1} Sasaki, Y., Mishiba, K., and Mii, M.: Flow cytometric analysis of the aneuploids in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*.

^{*2} 大分県林業試験場 Ooita Pref. Forest Exp. Stn., Hita Ooita 877-1363

^{*3} 千葉大学園芸学部 Fac. of Hort., Chiba Univ., Matsudo Chiba 271-8510

の植物(1, 4, 5, 6)と同様に, FCM分析により異数性の推定が可能であることが判明し, 今後, 異数体のスクリーニング等において大きく貢献できるものと考えられる。

引用文献

- (1) LEE, J. H. et al. : Theor. Appl. Genet., 95(8), 1300~1304, 1997
- (2) 三柴啓一郎ほか: 育種学研究, 1(別1), 166, 1999
- (3) 中村未樹ほか: 九州東海大農紀要, 10, 67~74, 1991
- (4) 中島寿亀ほか: 九州農業研究成果情報, 13 (下巻), 519~520, 1998
- (5) O'BRIEN, I. E. W. et al. : Plant Sci., 115(1), 91~99, 1996
- (6) PFOSSER, M. et al. : Plant Breed., 114(6), 555~557, 1995
- (7) 佐々木義則ほか: 大分林試研究時報, 12, 5~12, 1986
- (8) 佐々木義則ほか: 林木の育種(特別号), 51~54, 1997
- (9) 佐々木義則ほか: 日林九支研論, 51, 31~32, 1998
- (10) 佐々木義則: 日林九支研論, 52, 39~40, 1999

表-1 スギ異数体のFCM分析結果

| 個体 | 異数性/倍数性 | 大麦比 | 比数 |
|----------|--------------------|-------|-------|
| アヤスギ元木 | $2n = 22 = 2X$ | 2.921 | 100.0 |
| アヤスギ枝変わり | $2n = 23 = 2X + 1$ | 3.024 | 103.5 |

(注) 大麦: New Golden (*Hordeum vulgare*)
 $2n = 14 = 2X$, $2C = 10.40pg$

表-2 ヒノキ異数体のFCM分析結果

| 個体No. | 異数性/倍数性 | 藤津8号比 | 比数 |
|-------|--------------------|--------|-------|
| A-8 | $2n = 33 = 3X$ | 1.502 | 100.5 |
| C-2 | $2n = 33 = 3X$ | 1.497 | 100.2 |
| C-6 | $2n = 33 = 3X$ | 1.484 | 99.3 |
| 平均 | | 1.494b | 100.0 |
| A-41 | $2n = 32 = 3X - 1$ | 1.445 | 96.7 |
| A-58 | $2n = 32 = 3X - 1$ | 1.453 | 97.3 |
| A-68 | $2n = 32 = 3X - 1$ | 1.430 | 95.7 |
| 平均 | | 1.443a | 96.6 |
| A-2 | $2n = 34 = 3X + 1$ | 1.527 | 102.2 |
| A-44 | $2n = 34 = 3X + 1$ | 1.524 | 102.0 |
| C-148 | $2n = 34 = 3X + 1$ | 1.543 | 103.3 |
| 平均 | | 1.531c | 102.5 |

(注) 平均値に付したアルファベットは異文字間では5%以上の水準で有意差があることを示す。
 比数は三倍体($2n = 33 = 3X$)の平均値を100.0として求めた。

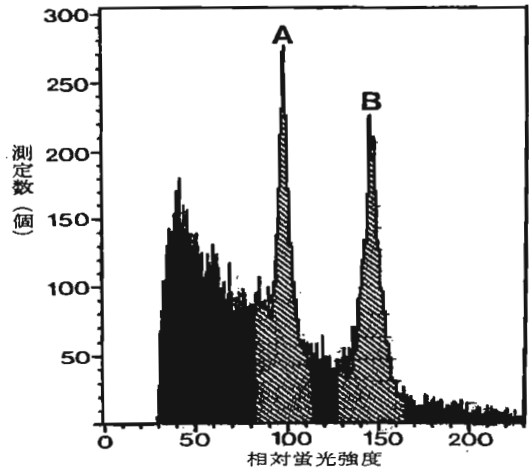


図-1 ヒノキ三倍体($2n = 33 = 3X$)のFCM分析
 A: 藤津8号(IS), B: C-2

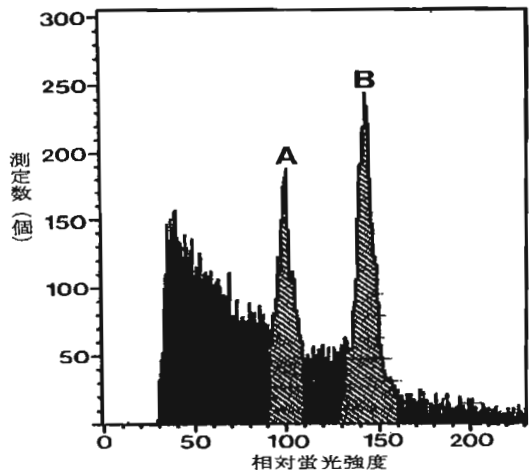


図-2 ヒノキ異数体($2n = 32 = 3X - 1$)のFCM分析
 A: 藤津8号(IS), B: A-68

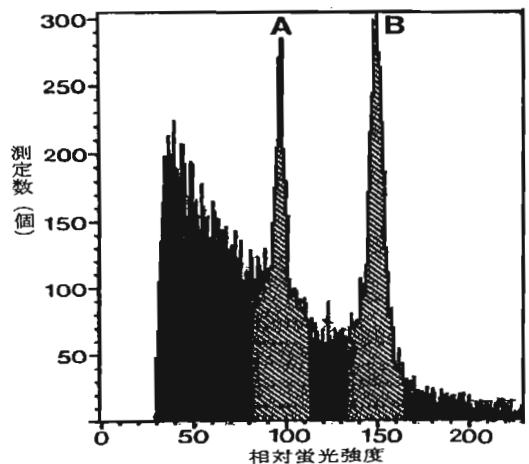


図-3 ヒノキ異数体($2n = 34 = 3X + 1$)のFCM分析
 A: 藤津8号(IS), B: C-148