

二倍体と四倍体の交配によって得られたスギ，ヒノキ F_1 個体の フローサイトメトリー分析による倍数性及び異数性の推定*1

佐々木義則*2 · 三柴啓一郎*3 · 三位 正洋*3

I. はじめに

スギ，ヒノキ精英樹等の中から多くの自然三倍体が見出された事(4)に端を発し，林木においても倍数性育種が注目されるようになってきた。このような事から，筆者らは，スギ，ヒノキについて二倍体と四倍体の交配によって，多数の F_1 個体を作成し，それらの遺伝的及び造林の特性の解明を行っている(2, 3, 5, 6, 7, 8)。

今回，倍数体及び異数体のフローサイトメトリー(FCM)分析を行い，体細胞染色体数と相対的核DNA量の関係を調べるとともに，交配 F_1 個体のFCM分析値から，倍数性及び異数性の推定を試みた。

II. 材料及び方法

倍数性及び異数性既知個体のFCM分析には，ヒノキの倍数体(2n=33=3Xの3個体，2n=44=4Xの3個体)及び異数体(2n=32=3X-1の3個体，2n=34=3X+1の3個体)の4種類(計12個体)を用いた。

スギ，ヒノキの F_1 個体は，二倍体を母樹とし，四倍体を花粉親に用いて，1984年3～4月に人工交配を行って育成し，現在(2000年3月時)15年生に達している。スギでは，クモトオシ，ヨシベエ，打合，アラコの4母樹を用い，花粉親には神川スギを使用した。ヒノキにおいては，山田2号，実生由来のNo.2の2母樹を用い，花粉親には久原1号を使用した。

FCM分析における内部標準(Internal Standard: IS)として，スギでは精英樹の国東3号(2n=22=2X)，ヒノキにおいては精英樹の藤津8号(2n=22=2X)を用い，測定試料の相対的核DNA量は，ISを1.000とした比数で示した。

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(High resolution DNA staining kit type P: Solution A, Partec社製)の0.2ml中で組織をChoppingし，5分間室温下で放置した。その後，DAPI溶液(I)を約1ml加え，40 μ m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。

III. 結果

倍数性及び異数性既知のヒノキ12個体について，FCM分析を行った結果を表-1に示した。個々の相対的核DNA量の値を用いて4種類間の分散分析を行ったところ，いずれの間にも有意差が認められた。相対的核DNA量(X)と体細胞染色体数(Y)の回帰分析を行ったところ，直線回帰式 $Y=22.827X-0.942$ が得られ，相関係数は $r=0.9995$ (1%水準で有意)であり，両者間の相関が著しく高いことが判明した。

スギ，ヒノキ人工交配 F_1 個体のFCM分析結果を表-2に示した。 F_1 個体の相対的核DNA量の平均値は，スギでは母樹間にほとんど差異が無かったが，ヒノキにおいては母樹間に差異があり，No.2の方が大きな値を示した。

前述の直線回帰式を用い， F_1 個体の相対的核DNA量(X)から体細胞染色体数(Y)を推定した結果を表-3に示した。推定された体細胞染色体数は，スギの F_1 では2n=32=3X-1，2n=33=3X，2n=34=3X+1の3種類，ヒノキの F_1 においては2n=32=3X-1，2n=33=3X，2n=34=3X+1，2n=35=3X+2の4種類であった。全般的には，三倍体(2n=33=3X)の発生が多かったが，ヒノキのNo.2に由来する F_1 においては，三倍体よりも異数体(2n=34=3X+1)の方が発生率が高かった。

推定された倍数性及び異数性に基づき，成長(樹高，

*1 Sasaki, Y., Mishiba, K. and Mii, M.: Estimation of polyploidy and aneuploidy of F_1 -progeny obtained through artificial crossings between diploids and tetraploids in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa* by flow cytometric analysis.

*2 大分県林業試験場 Oita Pref. Forest Exp. Stn., Hita, Oita 877-1363

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

根元直径)を調べたところ、三倍体は異数体に比べて生育が旺盛である傾向が認められた。

IV. 考 察

筆者らは、スギ、ヒノキの二倍体、三倍体、四倍体の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り、さらに、異数体においてもFCM分析による識別の可能性を示唆した(5, 6, 8)。

今回、4種類の倍数体(3X, 4X)及び異数体(3X-1, 3X+1)の相対的核DNA量について統計分析を行ったところ、いずれの間においても有意差が認められ、FCM分析によって倍数性及び異数性の差異の検出が可能であることが分かった。さらに、相対的核DNA量と体細胞染色体数の回帰分析を行ったところ、著しく高い相関を示す直線回帰式が得られたことから、FCM分析によって未知個体の倍数性及び異数性の推定が可能と考えられた。

直線回帰式を用い、交配F₁のFCM分析値から、それぞれの体細胞染色体数を推定したところ、スギでは3種類、ヒノキでは4種類のタイプが認められ、これらの中では、三倍体が最も多く、異数体は少ない傾向が認められた。このような傾向は他の交配実験における体細胞染色体数の観察結果(2, 3)と同様であった。しかしながら、ヒノキのNo.2に由来するF₁においては、異数体が

三倍体よりも多く出現しており、前述の傾向とは全く異なった結果が得られた。これには母樹の生殖細胞分裂等が影響を及ぼしているものと推察され、きわめて興味深い現象と考えられる。

以上のことから、相対的核DNA量の測定により、倍数性及び異数性の推定が可能であり、今後、倍数性育種等を推進する上で、FCM分析は大きく貢献できるものと考えられる。今回、推定された三倍体や異数体については、体細胞染色体数の確認を行うとともに、成長、さし木発根能力等の諸特性を解明する必要があるものと考えられる。

引用文献

- (1) 三柴啓一郎ほか:育種学研究, 1(別1), 166, 1999
- (2) 佐々木義則・黒木嘉久:日林九支研論, 41, 49~50, 1988
- (3) 佐々木義則・黒木嘉久:日林九支研論, 42, 61~62, 1989
- (4) 佐々木義則:大分県林試研究報告, 13, pp.14, 1996
- (5) 佐々木義則ほか:林木の育種(特別号), 51~54, 1997
- (6) 佐々木義則ほか:日林九支研論, 51, 31~32, 1998
- (7) 佐々木義則:日林九支研論, 52, 39~40, 1999
- (8) 佐々木義則:日林九支研論, 53, 59~60, 2000

表-1 体細胞染色体数既知のヒノキのFCM分析結果

倍数性/異数性	測定数 (個体)	相対的核DNA量 M.V. ± S.D.	比率
2n = 32 = 3X - 1	3	1.443 ± 0.010a	97
2n = 33 = 3X	3	1.494 ± 0.008b	100
2n = 34 = 3X + 1	3	1.531 ± 0.008c	102
2n = 44 = 4X	3	1.963 ± 0.010d	131

(注) 平均値に付したアルファベットにおいて、異文字間では有意差があることを示す。

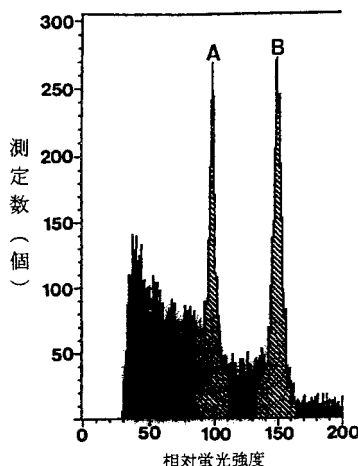


図-1 ヒノキ No.2×久原1号のF₁のFCM分析
A: 藤津8号 (IS)
B: F₁ (IS比: 1.524, 2n = 34 = 3X+1と推定)

表-2 スギ、ヒノキ人工交配F₁のFCM分析結果

樹種	母樹	測定数	相対的核DNA量
		(個体)	M.V. ± S.D.
スギ	クモトオシ	6	1.495 ± 0.019a
	ヨシベエ	5	1.493 ± 0.038a
	打合	2	1.494 ± 0.010a
	アラコ	8	1.494 ± 0.023a
	平均 (計21)		1.494 ± 0.024
ヒノキ	山田2号	18	1.490 ± 0.021a
	No. 2	39	1.507 ± 0.028b
	平均 (計57)		1.502 ± 0.027
総平均 (計78)			1.500 ± 0.026

(注) 平均値に付したアルファベットにおいて、同文字間では有意差は無く、異文字間では有意差があることを示す。

表-3 FCM分析による倍数性及び異数性の推定結果

樹種	母樹	測定数	2n = 32	2n = 33	2n = 34	2n = 35
		(個体)	= 3X-1	= 3X	= 3X+1	= 3X+2
スギ	クモトオシ	6	—	5	1	—
	ヨシベエ	5	1	2	2	—
	打合	2	—	2	—	—
	アラコ	8	—	7	1	—
	計	21	1	16	4	—
ヒノキ	山田2号	18	1	15	2	—
	No. 2	39	3	15	20	1
計		57	4	30	22	1
スギ・ヒノキ合計		78	5	46	26	1

(注) Y = 22.827X - 0.942 (r = 0.9995**) より推定。