

論文

Allium sepa 染色体の核型分析*1

林 弘也*2 · 池田健司*2 · 大城由紀子*2

林 弘也・池田健司・大城由紀子：*Allium sepa* 染色体の核型分析 九州森林研究 56：62-65, 2003 染色体の核型分析は熟練した判読技術を要し、判読の個人差がある。画像解析ソフトを応用した核型分析ソフトは判読技術や個人差の影響が少ない分析方法である。本報告はヒト染色体分析ソフトを *Allium sepa* の染色体に適用し、分析した。根端細胞を採取、固定し、押潰し法でプレパラートを作成し、顕微鏡により観察し、ソフトにより分析した。染色体は $2n=16$ であり、サテライトは有していなかった。染色体1と4-8は染色体長と腕長比で識別できたが、染色体2と3は識別できなかった。両染色体はCバンド分染法により、染色体2は1バンド、染色体3は2バンドを有することにより識別できた。染色体は $2n=16$ であり、核型は $7m+1sm$ であった。

キーワード：*Allium sepa*, 染色体, 核型分析, Cバンド法

Hayashi, H., Ikeda, K. and Ohshiro, Y.: Chromosome Karyotype of *Allium sepa* Kyushu J. For. Res. 56: 62-65, 2003 Karyotype of *Allium sepa* cultivated at Saitama was studied by the root tip cells in the mitotic metaphase. The chromosome analysis soft for humankind (Chantal, Leica) and the C-banding technique of the chromosome dyeing method were used for analysis. The chromosome was $2n=16$ and a satellite did not confirm in all chromosomes. The chromosome 1 and the chromosomes from 4 to 8 were distinguished by the full length and the arm length ratio of chromosome. However, chromosome 2 and chromosome 3 were not distinguished by the full length and the arm length ratio of the chromosome, so that the C-banding technique of the dyeing method was applied to identify the two chromosomes. For the karyotype, only the chromosome 6 was sm type and the other chromosomes were m type. The karyotype of *Allium sepa* was shown in $7m+1sm$.

Key words: *Allium sepa*, Chromosome, Caryotype analysis, C-bannding technique

I. はじめに

植物染色体は従来の肉眼に依る核型分析法によって識別することはかなり難しく、多くの経験が必要である。染色体の形態が比較的似かよっていることもあり、経験の豊富さによって分析に要する時間はもとより、分析結果が異なることさえもある。これらの困難さを克服した分析方法が期待されてきた。近年コンピュータを利用した分析法がヒト染色体分析に応用されつつあり、分析法の困難さも改善されつつある (3, 4, 5)。

正確な核型分析結果を得るには形態的な方法だけでは難しく、技術的な改良が提案されている。その一つの方法が染色体分染法である。植物体の染色体に適用される分染法はC-バンド法, G-バンド法, N-バンド法である (7, 9)。しかしこれらの分染法はすべての染色体を識別できるわけではなく、植物体の染色体の部分的な識別に適用され、単一の方法として染色体分析に応用される方法ではない。この方法は従来の形態的分析法と併用し、識別できない染色体を明確に識別するための補足的な方法であり、基本的な形態因子である染色体長やセントロメアの識別および計測の困難さを避けることができない。

核型分析プログラムは染色体長やセントロメアの位置を顕微鏡画像の黒化度を基準にしてコンピュータを利用して判定する方法であり、肉眼的な計測、識別の困難さを回避できると共に測定者による判断基準のばらつきすなわち測定値のばらつきを少なくする点、形態計測が効率よく実施できる点に利点がある。

本報告は、ヒト染色体核型分析プログラムをタマネギサンプルの植物体の染色体核型分析に適用し、核型を分析した。

II. 実験材料および方法

核型分析は根端分裂組織中の分裂中期にある細胞核について行った。実験試料は埼玉産の栽培されたタマネギ (*Allium sepa*) を発根させ、根端を約10mmの長さで切り取り試料とした。試料は水洗した後に0.01%のホルヒチン水溶液に20℃で3時間浸漬処理した (9)。水洗後にエチルアルコール：酢酸 = 3 : 1 の固定液に20℃で20分間浸漬固定し (8), 1N 塩酸：45%酢酸 = 1 : 1 の混合液に60℃で30秒処理した。水洗後に清浄なスライドグラスにのせ、酢酸カーミンを2-3滴添加した。2-3分間放置乾燥させ、カバーグラスをかけた。指でカバーグラスを押し付け、核

*1 Hayashi, H., Ikeda, K. and Ohshiro, Y.: Image Analysis of Karyotype of *Allium sepa* Chromosomes

*2 琉球大学農学部 Fac. Agric., Ryukyu Univ., Okinawa, 903-0231

表-1. 同一染色体の染色体長および腕長比の t 検定

Table 1 t-Test on chromosome length and arm ratio of the same chromosomes

試料番号	染色体長 (pm)		腕長比	
	1	2	1	2
測定値	6.95	5.37	1.123	0.143
	6.21	5.26	1.111	0.161
	7.05	5.26	1.315	0.141
	6.95	4.74	1.282	0.143
平均値	6.79	5.015	1.201	0.147
標準偏差	0.389	0.283	0.105	0.008
t 値	35.981	36.430	22.820	32.940

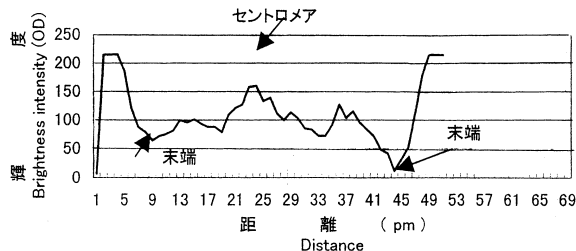


図-1. 染色体の輝度

Fig. 1 Brightness intensity of a chromosome

表-2. 各染色体群内の染色体長および腕長比の t 検定

Table 2 t-Test on chromosome length and arm ratio of 8 chromosomes in 12 cells

染色体番号	1	2	3	4	5	6	7	8
染色体長 (pm)								
平均値	7.240	7.240	7.240	7.240	7.240	7.240	7.240	7.240
標準偏差	0.878	0.878	0.878	0.878	0.878	0.878	0.878	0.878
変動係数	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121	0.121
自由度	23	23	23	23	23	23	23	23
有意差	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
腕長比								
平均値	0.893	0.893	0.893	0.893	0.893	0.893	0.893	0.893
標準偏差	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086	0.086
変動係数	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096	0.096
自由度	23	23	23	23	23	23	23	23
有意差	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

ns: 95%レベルで有意差無し no significant difference at 95%

を押しつぶし、染色体を分散させた (10)。

C-バンド法はカバーガラス上で押しつぶした染色体を冷蔵庫中で凍結させ、カバーガラスを取り除いた。固定の為に20℃のエチルアルコールで12時間処理した。室温で風乾し、20℃の飽和水酸化バリウムに7分間浸漬した後水洗した。SSCで60℃1時間処理した (2)。ギムザ液を2-3滴添加して30分間放置し観察に供した。

観察は生物顕微鏡 (Leica) の倍率1000倍で行い、デジタルカメラでパーソナルコンピュータに取り込み、画像の修正と適切な画像処理を行い、染色体の画像を分析、解析した。染色体の命名は Albert Levan ら (6) に依った。

染色体核型は Battacharyya R (1) の報告による $2n = 16$ に従い、分析した。染色体の画像修正や区分は Leica 社のヒト染色体分析ソフト "Chantal" を使用した。染色体画像をコンピュータに取り込み、染色体長および腕長比を自動的に測定した。染色体長を基準に長い染色体から順番に番号を付し配列し、腕長比に基づいて2本を1対に組み合わせ8対の染色体対を構成した。染色体の動原体位置は輝度測定結果によって決定し、腕長比を修正した。

III. 実験結果および考察

最初にタマネギ染色体の分析ソフトによる染色体長、腕長比測定値のばらつきを検討した。同一細胞の各染色体の染色体長と腕

長比を染色体画像読み込み段階から連続して4回測定し、測定値間の有意差を検定した。表1に測定結果および測定値のt値を示した。t検定により0.01レベルの有意差を確かめたが、全ての測定値に有意差は認められず、測定の再現性は高く、ばらつきはないと認められた。また同じ根端試料に含まれた12細胞の染色体長と腕長比について測定し、t値と測定値の標準偏差から95%信頼区間を求め測定値を検定した。この結果、染色体長の測定値は95%信頼区間内であったが、腕長比は染色体の約75%に95%信頼区間外の測定値が認められた。このことは "Chantal" ソフトによる動原体の位置判定が不安定であることを示し、測定値を修正する必要性を暗示した。動原体は染色体中で最も明るいという特性によりその位置が判定可能である。染色体幅の中心部輝度を画像解析ソフトによりマニュアル測定し、この輝度測定による動原体の位置と長腕長、短腕長の測定から腕長比を求め、ソフトによる腕長比測定値を修正することにした。染色体輝度分布測定の測定例を図1に示した。

タマネギ染色体は染色体長を基準にした8対の染色体対を "Chantal" ソフト上で構成した。12細胞の各染色体について染色体長と腕長比を測定し、各染色体測定データをt検定により検定した。全ての染色体で染色体長および腕長比は共に95%の信頼範囲にあることが確認された。従って細胞分裂中期にある核の選択もほぼ妥当であった。平均値、標準偏差と共に検定結果を表2に示した。

核型分析では、染色体長の長さ順に配列し、染色体番号を付し、

表-3. 染色体間の染色体長と腕長比の t 検定
Table 3 t-Test on chromosome length and arm ratio among 8 chromosomes

染色体番号	1	2	3	4	5	6	7	8
染色体長								
1	-	n.s.	*	*	*	*	*	*
2	n.s.	-	n.s.	*	*	*	*	*
3	*	n.s.	-	*	*	*	*	*
4	*	*	*	-	n.s.	*	*	*
5	*	*	*	n.s.	-	n.s.	*	*
6	*	*	*	*	n.s.	-	n.s.	*
7	*	*	*	*	*	n.s.	-	*
8	*	*	*	*	*	*	*	-
腕長比								
1	-	*	*	*	n.s.	*	*	*
2	*	-	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
3	*	n.s.	-	n.s.	*	*	*	n.s.
4	*	n.s.	n.s.	-	*	*	*	n.s.
5	n.s.	*	*	*	-	*	*	n.s.
6	*	*	*	*	*	-	*	n.s.
7	*	*	*	*	*	*	-	n.s.
8	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-

* : 95%レベルで有意差あり Significant at 95% level
ns : 95%レベルで有意差あり No significant at 95% level

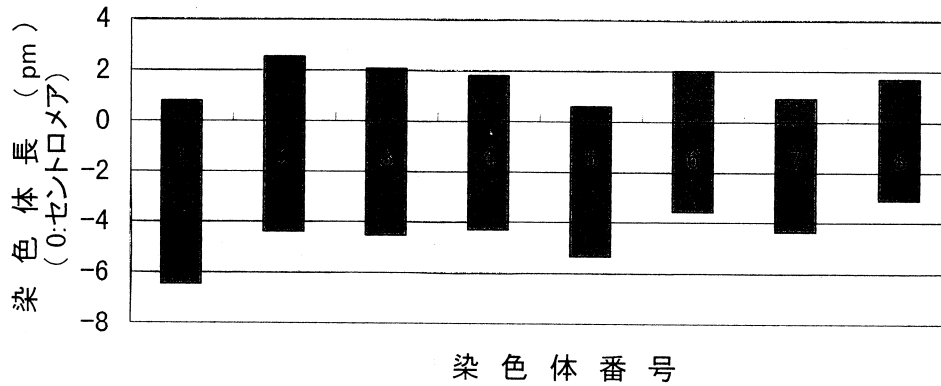


図-2. 染色体のイデオグラム
Fig.2 Idiograms of somatic metaphase chromosomes

全ての染色体にサテライトが認められなかったため、動原体の位置により染色体を識別した。識別した12細胞の染色体対は染色体長および腕長比の有意差検定を行い、識別した。表3に染色体番号、染色体長および腕長比の実測結果と有意差の有無を示した。染色体長は染色体1と染色体2、染色体2と染色体3、染色体4と染色体5、染色体5と染色体6および染色体6と染色体7の間には有意差がなく識別できなかった。腕長比は染色体1と染色体5、染色体2と染色体3、染色体4および染色体8、染色体3と染色体4および染色体8、染色体4、染色体5、染色体6および染色体7と染色体8の間に有意差がなく識別できない。しかし染色体8の染色体長は他の全ての染色体と有意差があり、識別可能である。染色体長と腕長比を組み合わせると、染色体3、染色体4、染色体5、染色体6および染色体7の腕長比は前後の染色体と有意差があり識別可能である。染色体2と染色体3は染色体長、腕長比共に有意差が認められず、識別は不可能であるため、識別には他の方法を併用することが必要になる。本研究では、染色体分染法のCバンド法によるバンドのパターンによって識別した。バ

表-4. Cバンドの位置
Table 4 C-band position on chromosome

染色体番号	バンド数	セントロメアからの距離 (pm)	
1	2	1.830	1.780
2	1	5.366	
3	2	4.569	1.708
4	1	1.531	
5	1	3.190	
6	2	4.141	2.613
7	4	3.775	2.587
		1.543	0.331
8	2	2.584	3.530

染色体核型 Chromosome karyotype : 7m + 1sm

ンドは18細胞の染色体について検出確認した。バンドの位置は同一染色体の18データについて、t検定を行い有意差がないことを確かめ、バンド発現に細胞間および処理法による影響がないことを確認した。Cバンドの本数とセントロメアからの距離を計測し、表4に示した。Cバンドは全ての染色体で確認され、染色体3、染色体6と染色体8は2バンド、染色体7は4バンドが確認され、その他の染色体は全て1バンドが確認された。染色体長と腕長比により識別できなかった染色体2と染色体3は、染色体2に1バンド、染色体3に2バンドが認められ、Cバンドの本数から識別可能であることを確認した。Table4にはA. Levanら(6)による核型をあわせて表記し、染色体のイデオグラムを図2に示した。

IV. 結論

埼玉県で栽培されたタマネギの根端分裂細胞を採取し、核型分析を行った。分析は染色体長と腕長比の計測およびCバンド法に

よるバンド検出により染色体を識別できた。サテライトは全ての染色体で確認されなかった。核型は $7m + 1sm$ であった。

引用文献

- (1) Bhattacharyya, R. (1976) *Cytologia* 41 : 513-51.
- (2) Endo, T. K. and B. S. Gill (1984) *Can. J. Genet. Cytol.* 26 : 669-678.
- (3) 広瀬玉紀・加藤成二 (1998) 植物染色体研究における画像解析法と細胞情報学 (クロモゾーム, 179pp, 福井希一・芦川郁夫編, ユニバーサル・アカデミー・プレス, 東京), 75-86.
- (4) Iijima, K., Fukui, K. (1991) *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 6 : 1-58.
- (5) Kamisugi, Y., Fukui, K. (1990) *Automatic Karyotyping of Plant Chromosomes by Imaging Techniques, Bio Tech.* 8 : 290-295.
- (6) Levan, A. *et al.* (1964) *Hereditas* 52 : 201-220.
- (7) 中西博宥 (1989) 染色体の研究, 21-35, 東京大学出版会, 東京.
- (8) 常脇恒一郎 (1982) 植物遺伝学実験法, 174-320, 共立出版, 東京.
- (9) 武久慎 (1974) *細胞* 6 (12) : 363-374,
- (10) 宇津木和夫ほか (1994) 生物実験法 I, 36-41, 培風館, 東京.

(2003年1月6日 受理)