

RESEARCH REPORT  
OF THE  
OITA PREFECTURAL  
FORESTRY EXPERIMENTAL STATION

No. 23  
March, 1997  
Arita, Hita, Oita, Japan

研究時報

第23号

目次

フローサイトメトリーによるスギ、ヒノキの 倍数性および核DNA量の測定	佐々木 義 則..... 1 三 柴 啓一郎 三 位 正 洋
----------------------------------------	--------------------------------------

大分県林業試験場

平成9年3月

大分県日田市大字有田字佐寺原

# 大分県林業試験場研究時報

第 2 3 号

1 9 9 7 年 3 月

## 一 目 次

フローサイトメトリーによるスギ、ヒノキの 倍数性および核DNA量の測定	佐々木 義 則 ..... 1 三 柴 啓一郎 三 位 正 洋
----------------------------------------	---------------------------------------

RESEARCH REPORT  
OF THE  
OITA PREFECTURAL  
FORESTRY EXPERIMENTAL STATION

No. 23  
March, 1997

— CONTENTS —

Determinations of Ploidy and Nuclear DNA Amount of  
Japanese Cedar and Japanese Cypress by Using Flow Cytometry

Yoshinori SASAKI , Keiichiro MISHIBA and Masahiro MII ..... 1

## フローサイトメトリーによるスギ, ヒノキの倍数性および核DNA量の測定<sup>1)</sup>

佐々木義則・三柴啓一郎<sup>2)</sup>・三位正洋<sup>2)</sup>

### Determinations of Ploidy and Nuclear DNA Amount of Japanese Cedar and Japanese Cypress by Using Flow Cytometry

Yoshinori SASAKI, Keiichiro MISHIBA<sup>2)</sup> and Masahiro MII<sup>2)</sup>

#### 要 旨

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, しかも簡便に核DNA量等の測定が可能である。しかしながら, 林木においてはFCMを用いた研究例はみあたらない。そこで, 体細胞染色体の観察により倍数性が解明されているスギ, ヒノキの精英樹 (二倍体 :  $2n=22=2X$ , 三倍体 :  $2n=33=3X$ , 四倍体 :  $2n=44=4X$ ) の針葉を材料とし, DAPI 溶液を用いた簡便法で試料を調製した後, FCM分析を試みた。その結果, 両樹種のヒストグラム (X軸 : 相対蛍光強度, Y軸 : 測定数) において, 三倍体は二倍体の約1.5倍, 四倍体は二倍体の約2倍の位置にそれぞれピークが認められた。対照に用いたスギ二倍体の国東3号を基準 (1.00) 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, ほぼ理論値に近い値が得られた。核DNA量既知の大麦 ( $2C=11.12$  pg DNA) を用いて核DNA量を推定したところ, 対照の国東3号は  $2C=13.79$  pg DNAであった。以上のことから, FCM分析により, スギやヒノキにおいても倍数性の識別が容易であり, また核DNA量の測定も可能であることが判明した。これらのことは, 林木育種の過程における倍数体等の早期検定, 組織培養や人為的な倍加処理などによる倍数性レベルの変化, ゲノムサイズの測定等において, FCMが役立つ可能性が大きいことを示唆しているものと考えられる。

1) 本課題の一部は第52回日林学会九州支部大会 (1996年10月19日, 鹿児島市) で発表を行った。

2) 千葉大学園芸学部 (Fac. of Hort., Chiba Univ., Matsudo Chiba 271)

## ABSTRACT

The determination of the amount of nuclear DNA has become very rapid and easy by using Flow Cytometry (FCM) compared to the conventional cytological methods. However, there is no report on the use of FCM in the studies of forest trees. In this study, we attempted to apply FCM for nuclear analysis of the needle leaves in Japanese cedar and Japanese cypress, the elite trees of which ploidies were already determined by observing somatic chromosomes (diploid:  $2n=22=2X$ , triploid:  $2n=33=3X$ , tetraploid:  $2n=44=4X$ ). The samples for FCM analysis were prepared according to a simple method using DAPI solution. When the results were expressed in a histogram (X-axis: relative intensity of fluorescence and Y-axis: number of subjects), the peaks for triploids and tetraploids were found in the positions about 1.5 and about 2 times far from that for diploid, respectively. The amounts of nuclear DNA in these subjects were expressed in values relative to that in Kunisaki No. 3 ( $2n=22=2X$ ), which was a Japanese cedar used as the control. The average relative value for Japanese cedar was 1.01 for diploid, 1.46 for triploid and 2.05 for tetraploid, whereas for Japanese cypress, the value was 1.00 for diploid, 1.49 for triploid 1.89 for tetraploid, showing that all these values are near the respective theoretical values. The amount of nuclear DNA of the control, Kunisaki No. 3 was estimated to be  $2C=13.79$  pg when calculated on a basis of the known value of  $2C=11.12$  pg for a barkley (*Hordeum Vulgare*). These results indicated that FCM analysis method enables to easily perform the ploidy discrimination in Japanese cedar and Japanese cypress and also the determination of their nuclear DNA amounts. Thus, it was suggested that FCM may be useful to early detect the polyploidy appearing in forest tree breeding and the ploidy changes caused by artificial treatments for chromosome doubling, tissue culture, etc. as well as to determine the genome size.

## I はじめに

筆者らは、全国のスギ、ヒノキ精英樹等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等を作成している<sup>12,13)</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、マイクロテクニク等の問題があり、容易ではない。

フローサイトメトリー (Flow cytometry : FCM) とは、蛍光染色した試料 (細胞核) に蛍光等を照射して、その蛍光強度を検出する測定機器である。染色された試料はチューブにより吸い上げられ、細いスリット上を流れる際に、励起光 (UV光またはレーザー光) が照射され、各試料から発する蛍光強度を順次測定できるような構造になっている。このため、FCMは、光学システムと流体システム、さらに検出システムやデータ処理のためのマイクロプロセッサー等のシステムにより構成されている。

FCMによる細胞核のDNA含量等の測定は、従来の細胞学的手法等と比べていくつかのメリットがあげられる。測定が迅速に行える点、正確な点、簡便に行える点等である。従来、FCMの測定対象は単細胞に限られていたため、植物においてはプロトプラストを単離して用いる必要があった。しかし、GALBRAITH et al.<sup>3)</sup>によって考案された Mechanical chopping による植物細胞核の単離法は、非常に迅速に、しかも簡便に植物組織の核DNA量等を測定することが可能であるため、それ以後の植物のFCM分析にはこの方法が主に用いられるようになった<sup>8)</sup>。

今回、体細胞染色体の観察により倍数性が解明されているスギ、ヒノキ<sup>12,13)</sup>の針葉を用いてFCM分析を行い、林木における利用の可能性を検討した。

## II 材料および方法

FCM分析に用いたスギ、ヒノキの二倍体 ( $2n=22=2X$ )、三倍体 ( $2n=33=3X$ )、四倍体 ( $2n=44=4X$ ) を表-1に示した。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とり、DAPI溶液 (表-2) を約1ml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、さらにDAPI溶液を約4ml加え、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った。その後、染色された核を含む溶液を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、測定時間は1分以内であった。

FCM分析のヒストグラム (図-1参照) におけるX軸 (横軸) は相対蛍光強度、Y軸 (縦軸) 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、実験日の違い、機器の微調整等により、わずかながら異なった測定値が得られる場合がある。このため、実験日および機器の微調整時ごとに、倍数性あるいは核DNA量既知の材料を対照とし、供試材料と同時に分析する必要がある。今回の実験においては、対照にはスギ二倍体の国東3号 ( $2n=22=2X$ ) および大麦 (*Hordeum Vulgare*,  $2C=11.12$  pg 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) で比較した。

表-1 FCM分析に用いたスギおよびヒノキ

スギ				ヒノキ
二倍体	三倍体	三倍体	三倍体	二倍体
秋田 1 号	遠田 2 号	木津 2 号	藤津 28 号	藤津 8 号
西川 2 号	大曲 1 号	京北 10 号	対馬 6 号	阿蘇 7 号
富士 2 号	東南置賜4号	綾部 3 号	日田 16 号	玖珠 6 号
一志 10 号	東南村山4号	宍粟 79 号	日田 18 号	竹田 8 号
那賀 9 号	久慈 30 号	洲本 1 号	計 36クローン	佐伯 17 号
宇陀 18 号	秩父 11 号	氷上 5 号		計 5クローン
八頭 1 号	岩船 7 号	朝来 2 号	<b>四倍体</b>	
福岡(署)2号	村上市2号	美方 1 号	C r - 7	<b>三倍体</b>
佐賀 3 号	村上市4号	宇陀 4 号	C r - 38	富士 2 号
藤津 1 号	中頸城5号	八頭 8 号	神川スギ	三次 4 号
長崎(署)2号	佐渡 1 号	真庭 5 号	計 3クローン	計 2クローン
飢肥(署)11号	輪島 10 号	阿哲 3 号		
国東 3 号	下高井9号	玖珂 1 号		<b>四倍体</b>
佐伯 10 号	下高井16号	美禰 2 号		三光ヒノキ
玖珠 7 号	大井 5 号	三好 10 号		計 1クローン
計 15クローン	東加茂1号	上浮穴6号		

表-2 DAPI 溶液の組成

種類	濃度
Tris - HCl	10 mM ; pH 7.5
TritonX -100	0.1%
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
DAPI	2 mg / l

(注) DAPI : 4,6 - diamino - 2 - phenylindole

### Ⅲ 結 果

F CM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やや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はいずれの個体においても認められなかった。

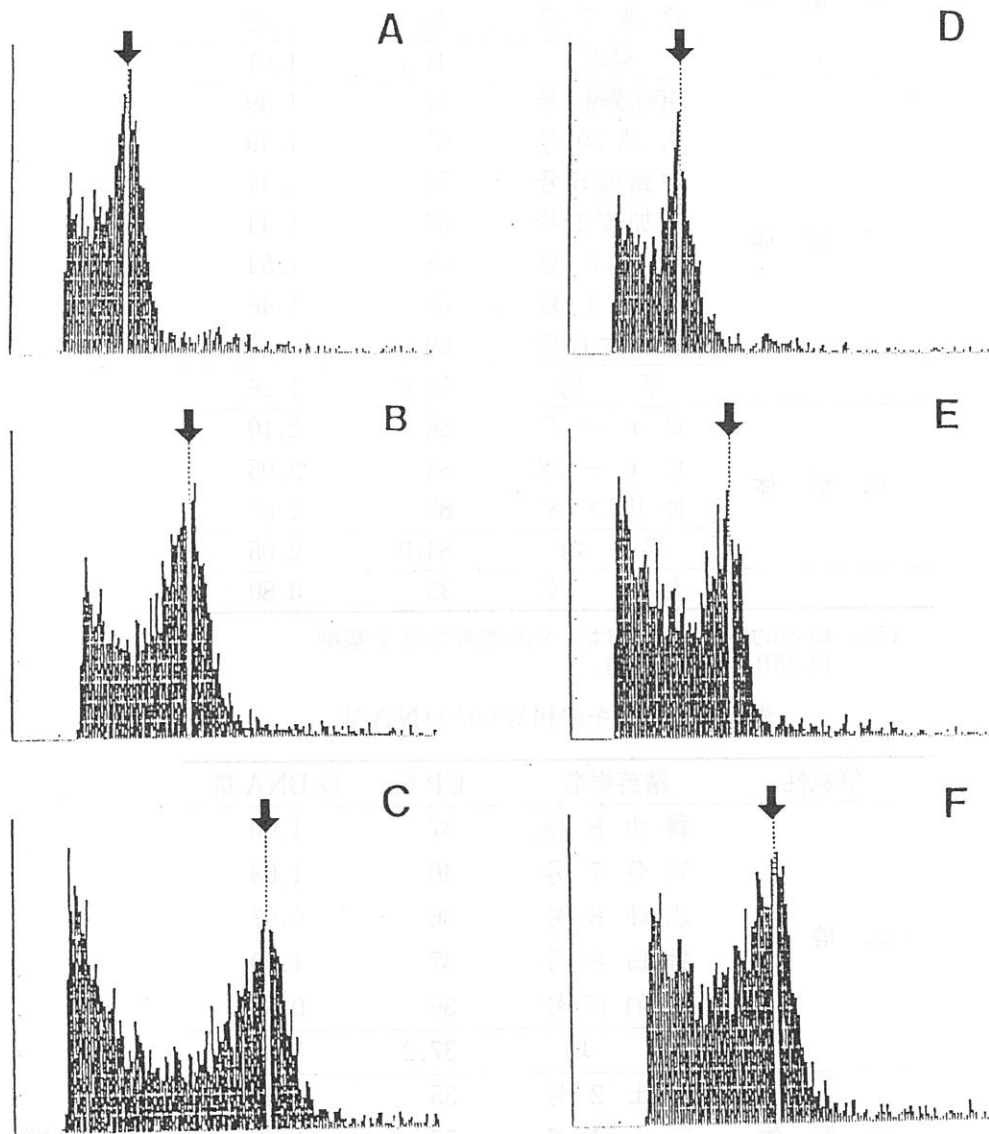


図-1 核DNA量のヒストグラム (X軸: Fluorescence intensity, Y軸: Count)  
 A: スギ2X (国東3号), B: スギ3X (日田16号), C: スギ4X (Cr-7)  
 D: ヒノキ2X (藤津8号), E: ヒノキ3X (富士2号), F: ヒノキ4X (三光ヒノキ)  
 矢印: ピークの位置 (CP値) を示す。



同一の実験条件で分析を行った個体について、国東3号を基準とした相対的核DNA量を求めた結果を表-3、表-4、表-5に示した。両樹種ともにほぼ理論値に近い値が得られ、倍数性の識別が可能であることが判明した。

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(対照)の核DNA量の概算値を求めた結果、 $2C = 13.79 \text{ pg DNA}$ であった。

表-3 スギの相対的核DNA量

倍数性	精英樹名	CP 値	核 DNA 量
二 倍 体	国 東 3 号	41	1.00
	佐 伯 10 号	42	1.02
	玖 珠 7 号	42	1.02
	平 均	41.7	1.01
三 倍 体	東南置賜4号	57	1.39
	久 慈 30 号	61	1.49
	中頸城5号	59	1.44
	東加茂1号	59	1.44
	氷 上 5 号	63	1.54
	玖 珂 1 号	60	1.46
	上浮穴6号	60	1.46
平 均	59.9	1.46	
四 倍 体	C r - 7	86	2.10
	C r - 38	84	2.05
	神 川 ス ギ	82	2.00
	平 均	84.0	2.05
	大 麦	33	0.80

(注) 相対的核DNA量はスギの国東3号を基準(1.00)とした数値。

表-4 ヒノキの相対的核DNA量

倍数性	精英樹名	CP 値	核 DNA 量
二 倍 体	藤 津 8 号	37	1.00
	阿 蘇 7 号	40	1.08
	玖 珠 6 号	36	0.97
	竹 田 8 号	37	1.00
	佐 伯 17 号	36	0.97
平 均	37.2	1.00	
三 倍 体	富 士 2 号	55	1.49
	三 次 4 号	55	1.49
	平 均	55.0	1.49
四 倍 体	三光ヒノキ	70.0	1.89
	国 東 3 号	37	1.00

(注) 相対的核DNA量はスギの国東3号を基準(1.00)とした数値。

表-5 FCM分析によるスギ, ヒノキ倍数体の相対的核DNA量の比較

樹種	倍数性	分析 個体数	M.V.	S.D.
スギ	二倍体	3	1.01 a	0.01
	三倍体	7	1.46 b	0.04
	四倍体	3	2.05 c	0.04
ヒノキ	二倍体	5	1.00 a	0.04
	三倍体	2	1.49 b	0.00
	四倍体	1	1.89 c	—

(注) 本表は表-3および表-4をまとめたもの。  
アルファベット記号の同一文字間では有意差が  
無く, 異文字間では有意差があることを示す。

#### IV 考 察

現在までに, 植物の研究においてFCMが用いられている例は, 動物分野に比べてまだ少ないのが現状であるが, ここ数年の間に報告が増えており, 今後もさらに研究が盛んになってくるものと予想される。現時点で, 植物のFCMの研究は, 大まかにいくつかのカテゴリーに分けられる。第一に, 植物の細胞核のDNA量を測定すること, 第二に, 植物体や培養細胞等の倍数性を測定すること, 第三に, 細胞周期を検討すること, 第四に, 特定の単細胞や染色体を同定することである<sup>8)</sup>。

植物の倍数性レベルでの研究において, FCMを利用した報告例としては, 種間雑種の倍数性の検定<sup>4)</sup>, 体細胞雑種の決定<sup>14)</sup>, 半数性細胞の培養変異の測定<sup>2)</sup>, 倍数性細胞の割合の測定<sup>11)</sup>, 細胞核の複製の活性測定<sup>6)</sup>等があげられる。我国においては, 村上ら<sup>10)</sup>が果樹の倍数性およびゲノムサイズの測定, 三柴ら<sup>7)</sup>がサクラソウの倍数性等の測定にFCMを利用しており, 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>1,5,9)</sup>はあるが, FCMを使用した報告はみあたらない。

今回, スギ, ヒノキ精英樹等の二倍体, 三倍体, 四倍体の針葉を材料とし, DAPI溶液を用いた簡便法で試料を調製した後, FCM分析を試みた。その結果, 両樹種のヒストグラムには倍数体特有のピークが観察され, 倍数性の識別が容易であることが判明した。また, 未知試料を倍数性および核DNA量既知の材料と同時に分析することにより, 核DNAの相対量および絶対量の概算値を求めることも可能であった。これらのことは, 林木育種の過程における倍数体等の早期検定, 組織培養や人為的な倍加処理等による倍数性レベルの変化, ゲノムサイズの測定等において, FCMが役立つ可能性が大きいことを示唆しているものと考えられる。

## V おわりに

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>7)</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。また，スギ三倍体のヒストグラムにおいては，大多数の個体が二倍体の約1.5倍の位置にピークが観察されたが，中には，二倍体または四倍体にやや類似した傾向を示すものが少数ながら認められた。従って，今後，FCM分析においてこのような傾向を示す個体が存在する場合には，体細胞染色体の観察による確認が必要と考えられる。

## 引用文献

- (1) 馬場繁幸 (1991) 核型によるスギ科樹木の種の識別とその類縁関係, 琉球大学農学部学術報告 38 : 77~174.
- (2) BEAUMONT, V.H. and J.M. WIDHOLM (1993) Ploidy variation of pronamide-treated maize calli during long term culture, Plant Cell Reports 12 : 648~651.
- (3) GALBRAITH, D.W. et al. (1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues, Science 220 : 1049~1051.
- (4) JAAP, M. et al. (1989) Identification of 2n-Pollen Producing Interspecific Hybrids of *Lilium* Using Flow Cytometry, Cytologia 54 : 737~745.
- (5) 近藤禎二 (1981) スギの核DNA量について, 33回日本関東支論 : 79~80.
- (6) LIU, Y. et al. (1994) Nuclear replication activities during imbibition of abscisic acid and gibberelin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds, Planta 194 : 368~373.
- (7) 三柴啓一郎・三位正洋 (1994) フローサイトメトリーによるサクラソウの倍数性調査, 育学雑 44 (別2) : 134.
- (8) 三柴啓一郎 (1995) 植物における Flow cytometry 研究の現状, 私信 : 1~2.
- (9) 向井譲ら (1981) 佐賀県におけるスギ精英樹の32系統の成熟花粉当りDNA量, 29回日林中 部支論 : 121~124.
- (10) 村上ゆり子ら (1991) フローサイトメトリーを用いた果樹のゲノムサイズの解析. 園学雑60 (別 1) : 64~65.
- (11) ROCHER, E.J. et al. (1990) Developmentally Regulated Systemic Endopolyploidy in Succulents with Small Genomes, Science 250 : 99~101.
- (12) 佐々木義則 (1994) スギ，ヒノキの細胞遺伝学的研究, 林木の育種172 : 4~10.
- (13) 佐々木義則 (1996) 不稔性を示すスギおよびヒノキ精英樹の体細胞染色体, 大分林試研報13 : 1~14.
- (14) SCHOENMARKERS, H.C.H. et al. (1993) Allotriploid somatic hybrids of diploid tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and monoploid potato (*Solanum tuberosum* L.), Theor. Appl. Genet., 87 : 328~336.

大分県林業試験場研究時報, No.23, 1997

---

平成9年3月12日 印刷

平成9年3月18日 発行

編集 大分県林業試験場・編集委員会  
〒877-13 大分県日田市大字有田字佐寺原  
TEL 0973(23)2146  
FAX 0973(23)6769

印刷 カワハラ企画  
〒877-13 大分県日田市水目町315-4  
TEL 0973(22)1241  
FAX 0973(22)1444

---