

RESEARCH REPORT
OF THE
OITA PREFECTURAL
FORESTRY EXPERIMENTAL STATION

No. 24

March, 1998

Arita, Hita. Oita. Japan

研 究 時 報

第 24 号

スギ、ヒノキ倍数体および自然突然変異体の
フローサイトメトリー分析

佐々木 義 則 ————— 1
石 塚 涼 子
三 柴 啓一郎
三 位 正 洋

大 分 県 林 業 試 験 場

平成10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 24 号

1998年3月

—目 次—

スギ，ヒノキ倍数体および自然突然変異体の フローサイトメトリー分析	----- 佐々木義則 ----- 1 石塚 涼子 三柴啓一郎 三位 正洋
--------------------------------------	--

RESEARCH REPORT
OF THE
OITA PREFECTURAL
FORESTRY EXPERIMENTAL STATION

No. 24
March, 1998

—CONTENTS—

Flow cytometric analysis of polyploids and natural mutants
in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*

Yoshinori S_{ASAKI}, Ryoko I_{SHIZUKA}, Keiichiro M_{ISHIBA} and Masahiro M_{II} 1

スギ, ヒノキの倍数体および自然突然変異体のフローサイトメトリー分析¹⁾

佐々木義則・石塚涼子²⁾・三柴啓一郎³⁾・三位正洋³⁾

Flow cytometric analysis of polyploids and natural mutants
in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*¹⁾

Yoshinori S A S A K I, Ryoko I S H I Z U K A²⁾, Keiichiro M I S H I B A³⁾ and Masahiro M I I³⁾

要 旨

スギ, ヒノキの倍数体 (二倍体: $2n=22=2X$, 三倍体: $2n=33=3X$, 四倍体: $2n=44=4X$) の針葉を用い, フローサイトメトリー分析を行った結果, DNA ヒストグラムにおいて, 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出現し, それぞれほぼ理論値に近い相対的核 DNA 量が得られ, 倍数性の識別が容易であることが判明した。

自然突然変異体について, 元木と枝変りのフローサイトメトリー分析を行ったところ, ヤブクグリスギおよび日出ヒノキの元木 ($2n=22=2X$) からは四倍体 ($2n=44=4X$) と推定される枝変りが出現しており, さらに, 日出ヒノキの枝変りによる四倍体からは再び突然変異により, 二倍体と推定される枝変りが発生していることが判明した。アヤスギの元木 ($2n=22=2X$) と枝変りの異数体 ($2n=23=2X+1$) の比較では, 後者の方が僅かながら核 DNA 量が多い傾向が認められた。これらのことから, 体細胞染色体の数的変異が枝変り発生の原因の一つになっているものと推察された。

以上の結果から, フローサイトメトリー分析は, 倍数性を簡便, かつ迅速に推定することができ, また, 異数性の推定も可能であることから, 今後, 林木の遺伝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た。

キーワード: スギ, ヒノキ, 倍数体, 自然突然変異体, 異数体,
フローサイトメトリー分析

1) 本報の一部は第 53 回日本林学会九州支部大会 (1997 年 10 月, 熊本市) で発表した。

2) (株) 池田理化・つくばテクニカルセンター (〒 305-0062 つくば市大字赤塚字牛ヶ淵 586-9)

3) 千葉大学園芸学部 (〒 271-0092 松戸市松戸 648)

Flow cytometric analysis of polyploids and natural mutants in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*¹⁾

Yoshinori S_{ASAKI}, Ryoko I_{SHIZUKA}²⁾, Keiichiro M_{ISHIBA}³⁾ and Masahiro M_{II}³⁾

SUMMARY

Using needles of polyploids (diploid: $2n=22=2X$, triploid: $2n=33=3X$, tetraploid: $2n=44=4X$) in *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*, the flow cytometric analyses were performed and the results showed that peaks were recognized at about 1.5 times of diploid in triploid and about 2 times of diploid in tetraploid on DNA histogram in both tree species. Therefore, identification of the polyploidy was easily proved because relative amounts of nuclear DNA were obtained with closely theoretical values, respectively.

On the natural mutants, when flow cytometric analyses were performed with original trees and bud variation trees, bud variation trees presumed as tetraploid ($2n=44=4X$) were observed from original trees ($2n=22=2X$) of Yabukuguri-sugi (*Cryptomeria japonica*) and Hiji-hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). Furthermore, on the tetraploid of the bud variation in Hiji-hinoki, the bud variation presumed as diploid by the repeated mutation was found. Comparisons between the original tree of Aya-sugi (*Cryptomeria japonica*, $2n=22=2X$) and the bud variation ($2n=23=2X+1$) of the aneuploid showed that a tendency of a little bit much amount of nuclear DNA was recognized in the latter one. For the results of those observations, it was presumed that the numerical differences in the chromosomes of somatic cells brought a reason of the development in the bud variation.

For the reasons mentioned above, the flow cytometric analysis should be contributed to the big step for the fundamental informations on forest tree breeding in the future, because the polyploidy can be presumed simply and rapidly, and also possibility in presumption of the aneuploidy is existed.

Key words : *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa*, Polyploids,
Natural mutants, Aneuploid, Flow cytometric analysis.

-
- 1) A part of this report was submitted to the 53th. Trans. Meeting Kyushu Br. Jpn. For. Soc. (Oct., 1997, Kumamoto, Japan)
 - 2) Tsukuba Technical Center, I_{KEDA} Scientific Co., Ltd. (586-9 Ushigafuchi Akatsuka Tsukuba, 305-0062, Japan)
 - 3) Faculty of Horticulture, Chiba Univ. (648 Matsudo Matsudo-shi, 271-0092, Japan)

I はじめに

フローサイトメトリー (Flow Cytometry: FCM) とは, 細胞あるいは染色体等の成分を浮遊液の状態にして, 液体系の中を高速で通濾過させ, 各細胞から検出部を通して得られる光学的, 電気的信号により, 各細胞の生物学的特徴を研究, 解明していく分野である。このための装置は総称してフローサイトメーター (Flow Cytometer) と呼ばれている^{1,3)}。

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, 正確, しかも簡便に核DNA量, 細胞周期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^{1,3)}。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.²⁾の Mechanical Chopping といった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^{1, 3~7, 9~11, 14, 17~23)}。

今回, スギやヒノキ等の倍数体および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。

II 材料および方法

FCM分析に用いた倍数体を表-2, 自然突然変異体を表-1に示した。また, 自然突然変異体の葉形を写真-1, 写真-2, 写真-3, 写真-4に示した。自然突然変異体では, 元木(A), 枝変り(B), さらにヒノキの1個体においては枝変りからの再枝変り(C)についても分析を行った。なお, 自然突然変異体の分析にあたっては, 元木あるいは枝変りの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 (Celltrics filter, Partec社製)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, ピークの位置は相対的な核DNA量に相当する。FCM分析においては, 同一材料からの試料を用いても, 実験の日時, 機器の微調整などにより僅かながら異なった結果が得られる場合がある。これを防止するため, 単独試料の場合, 分析の直前あるいは直後に対照としてスギ精英樹の国東3号(2n=22=2X)の分析を行い, これとの比較で未知試料の相対的核DNA量を求めた。自然突然変異体においては, 元木を対照として枝変りの相対的核DNA量を算出した。

III 結 果

倍数性既知のスギ, ヒノキ倍数体について, それぞれ単独試料を用いてFCM分析を行った結果を図-1, 図-2に示した。また, これらのヒストグラムのピーク値に基づいて相対的核DNA量を算出した結果を表-2に示した。スギ, ヒノキの両樹種ともに, 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認められ, それぞれほぼ理論値に近い相対的核DNA量が得られた。

表-1 フローサイトメトリー分析に用いた自然突然変異体

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	大分県耶馬溪町	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.
カイヅカイブキ	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）

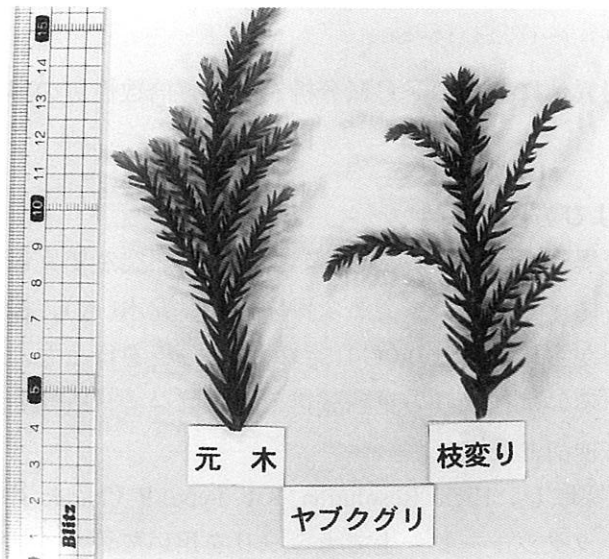


写真1 ヤブクグリスギ自然突然変異体の葉形



写真-2 アヤスギ自然突然変異体の葉形

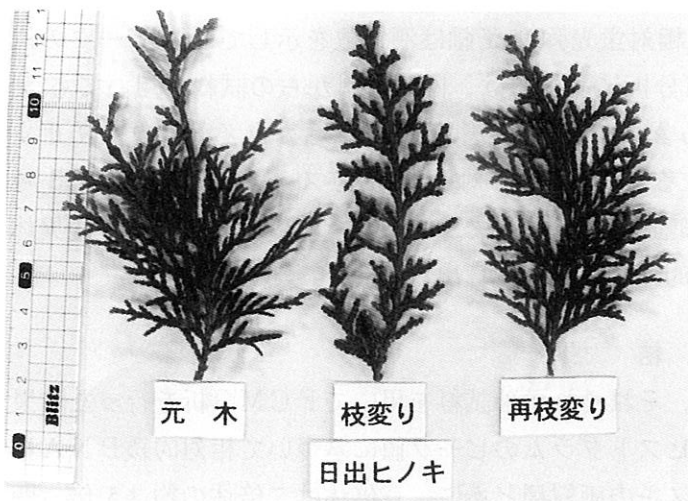


写真-3 日出ヒノキ自然突然変異体の葉形



写真-4 カイヅカイブキ
自然突然変異体の葉形

表-2 スギ, ヒノキ倍数体の相対的核DNA量の比較

樹種	名称	選抜地	倍数性	相対的核DNA量
スギ	国東3号	大分県	2X	1.00
	宇陀4号	奈良県	3X	1.49
	木津2号	京都府	3X	1.61
	神川スギ	大分県	4X	1.86
ヒノキ	佐伯17号	大分県	2X	1.05
	富士2号	静岡県	3X	1.54
	三次4号	広島県	3X	1.65
	三光ヒノキ	大分県	4X	1.83

(注) 相対的核DNA量は国東3号を基準(1.00)として算出した。

自然突然変異体について、単独試料を用いてFCM分析を行ったところ、ヤブクグリスギおよび日出ヒノキの枝変りは、それぞれ元木の約2倍の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。カイヅ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(図-3, 図-4, 図-5, 図-6)。

自然突然変異体について、混合試料(元木+枝変り)を用いて分析を行った場合、ヤブクグリスギおよび日出ヒノキでは、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2倍の位置にピークが認められた。アヤスギ(元木+枝変り)、日出ヒノキ(元木+再枝変り)、カイヅカイブキ(元木+枝変り)においてはピークの分離は観察されず、一つのピークのみが認められた(図-7, 図-8, 図-9, 図-10)。

自然突然変異体について、単独および混合試料のDNAヒストグラムに基づいて相対的核DNA量を算出した結果を表-3に示した。

表-3 元木および枝変りの相対的核DNA量の比較

樹種	単 独			混 合		
	A	B	C	A+B	A+C	
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.
カイヅカイブキ	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。

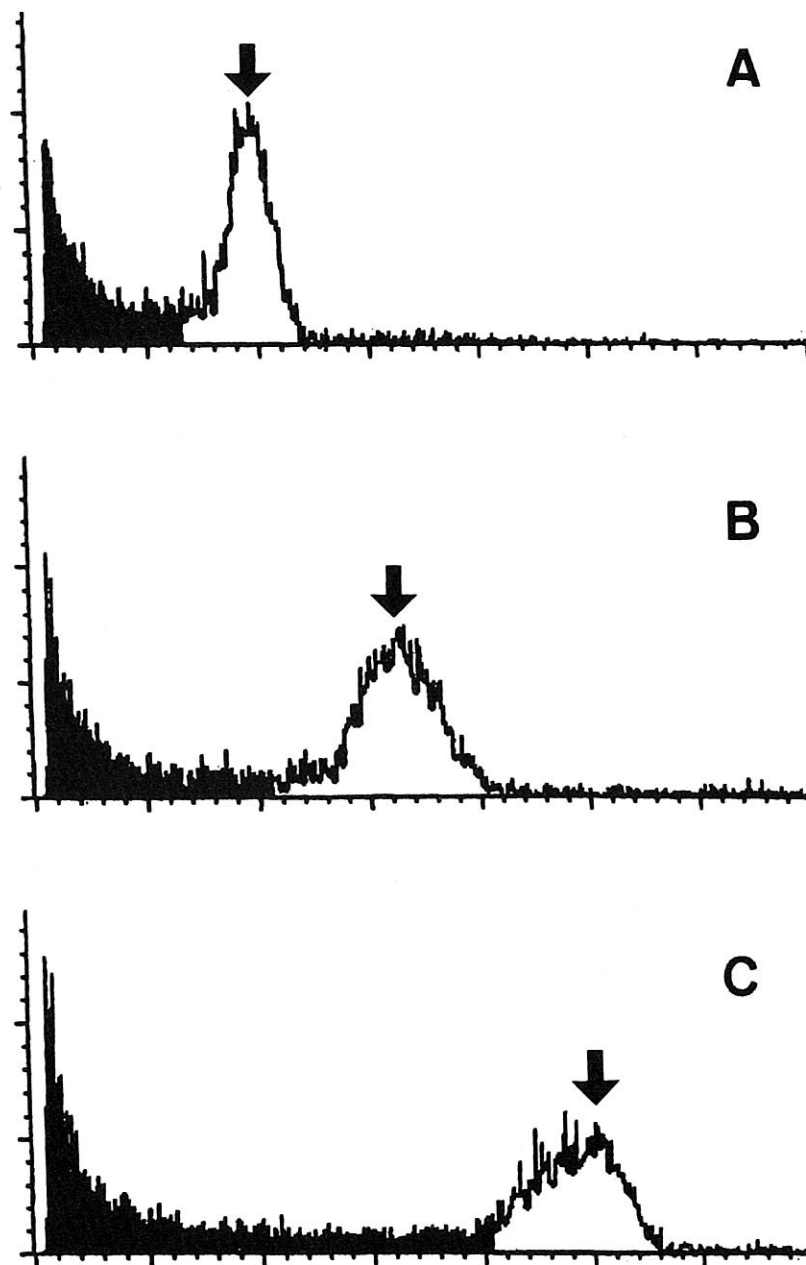


図-1 スギ倍数体のFCM分析におけるDNAヒストグラム
A：2X（国東3号），B：3X（木津2号），C：4X（神川スギ）
X軸：相対蛍光強度，Y軸：測定数，矢印はピークの位置を示す。
（以下の図のX軸，Y軸，矢印は同様）

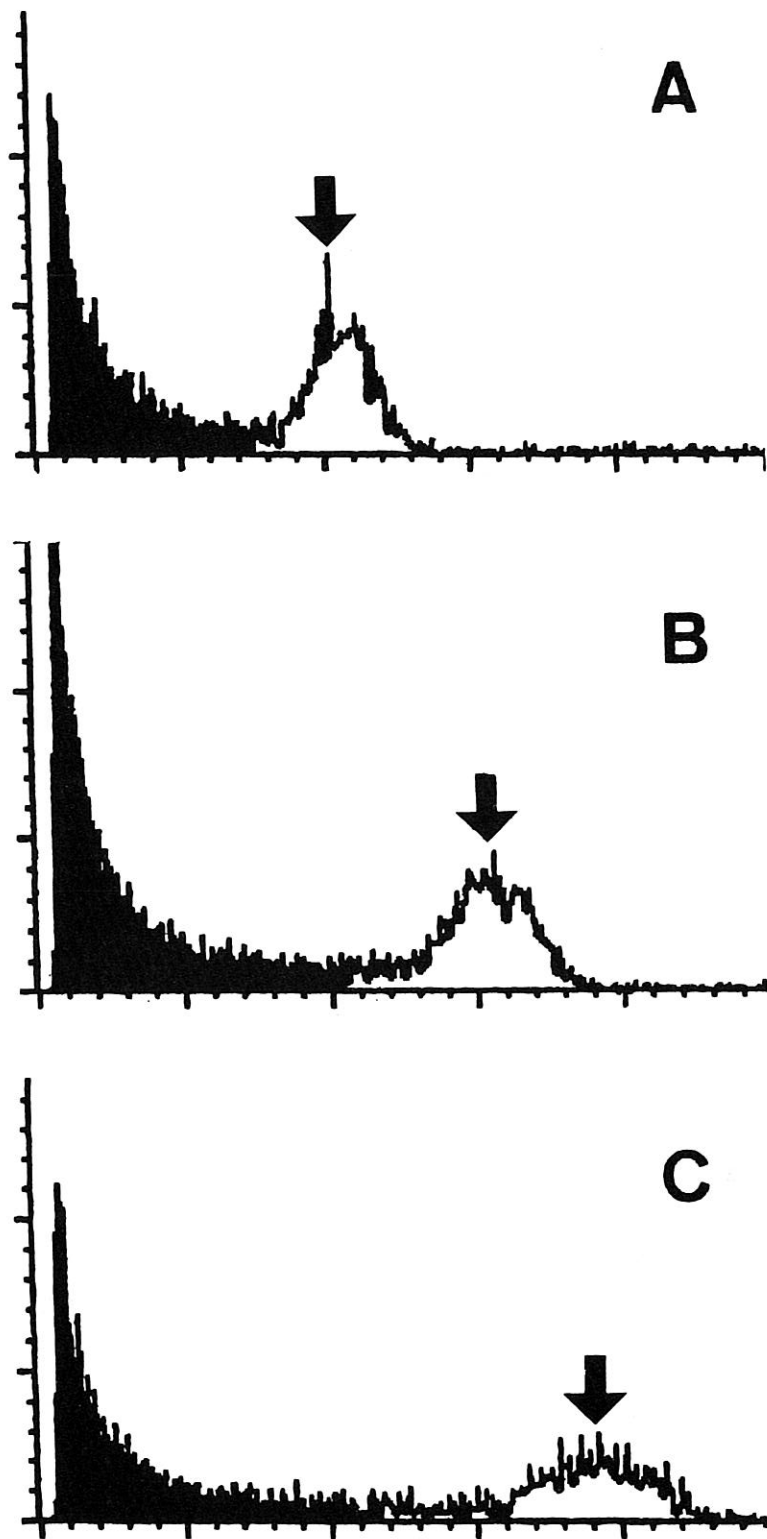


図-2 ヒノキ倍数体のFCM分析におけるDNAヒストグラム
A: 2X (佐伯17号), B: 3X (富士2号),
C: 4X (三光ヒノキ)

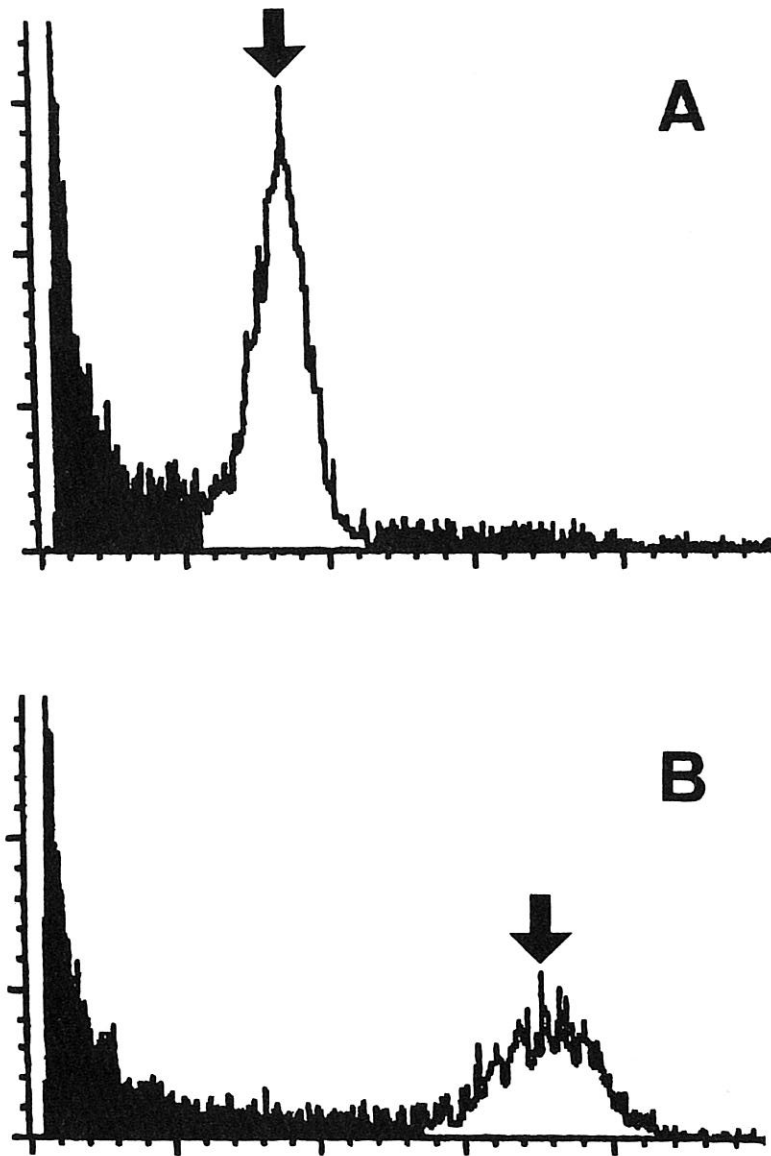


図-3 ヤブクグリスギ自然突然変異体のFCM分析におけるDNAヒストグラム
A：元木 ($2n=22=2X$)，B：枝変り

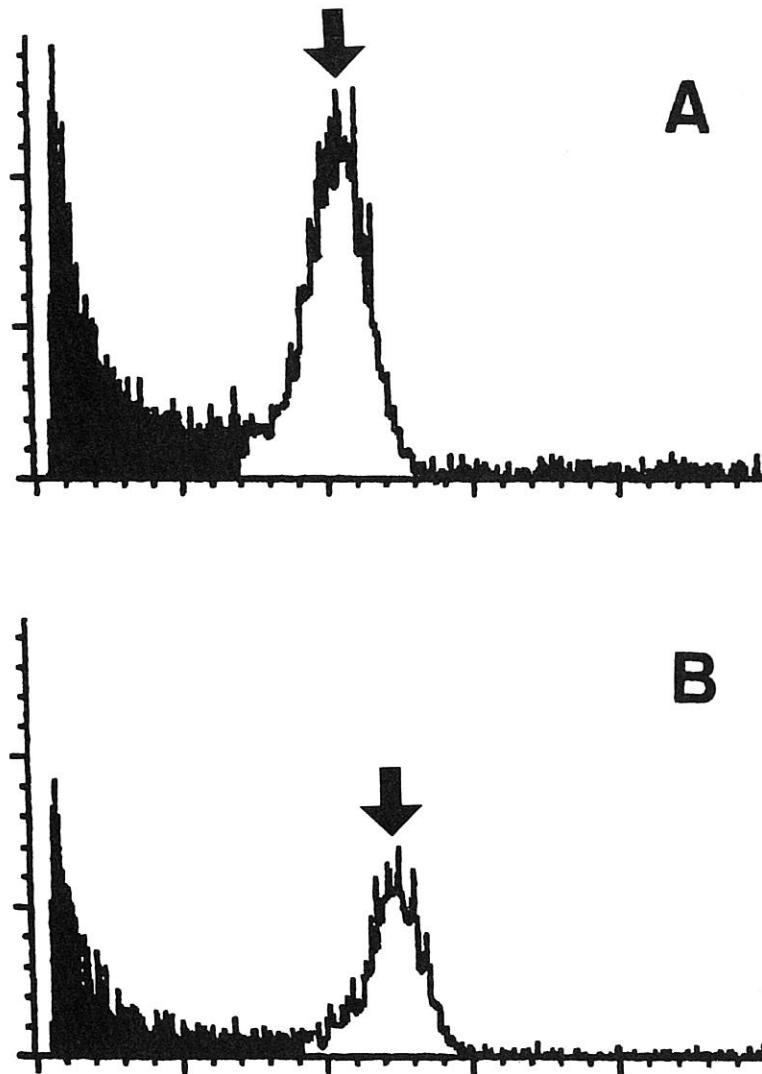


図-4 アヤスギ自然突然変異体のFCM分析における
DNAヒストグラム
A : 元木 ($2n=22=2X$), B : 枝変り ($2n=23=2X+1$)

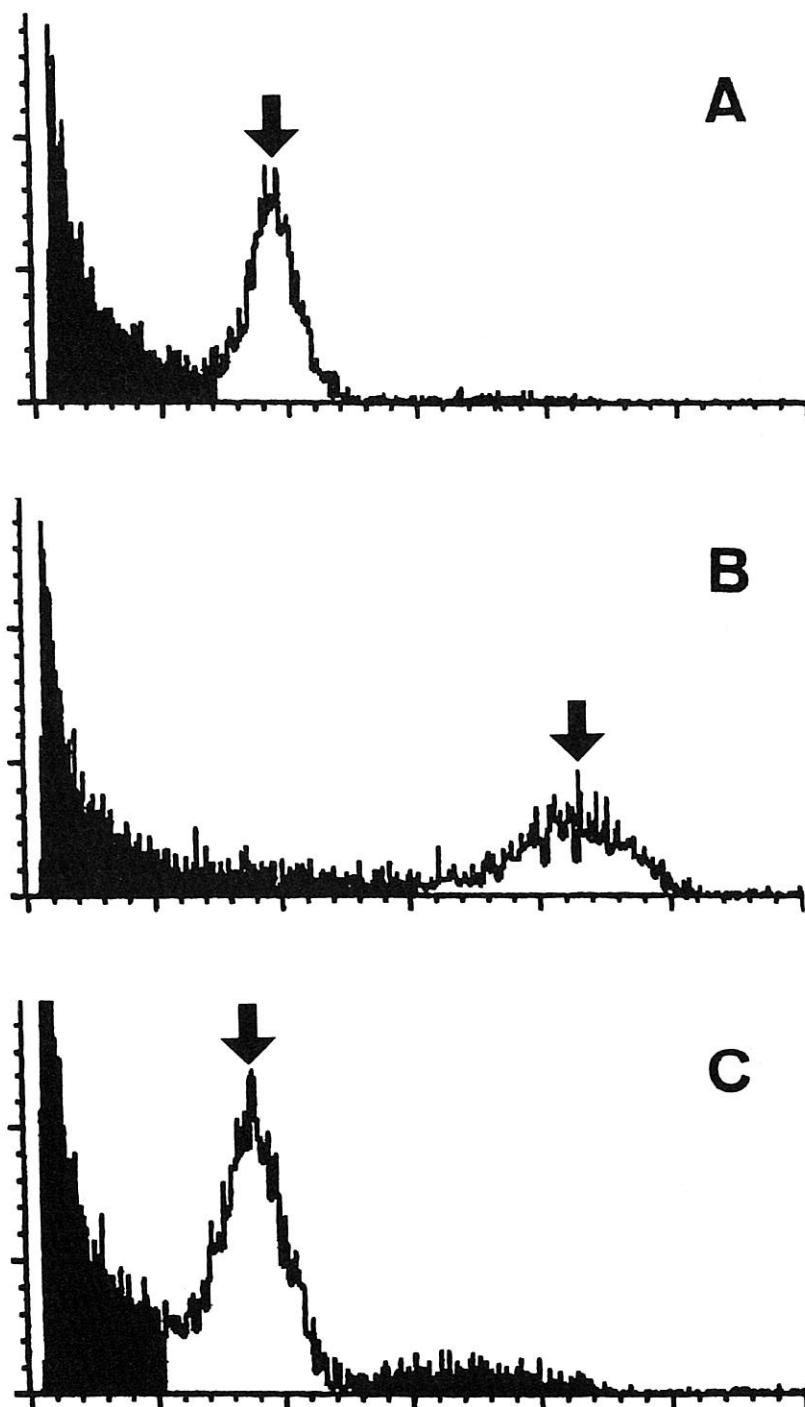


図-5 日出ヒノキ自然突然変異体のFCM分析におけるDNAヒストグラム
A：元木 ($2n=22=2X$)，B：枝変り，C：再枝変り

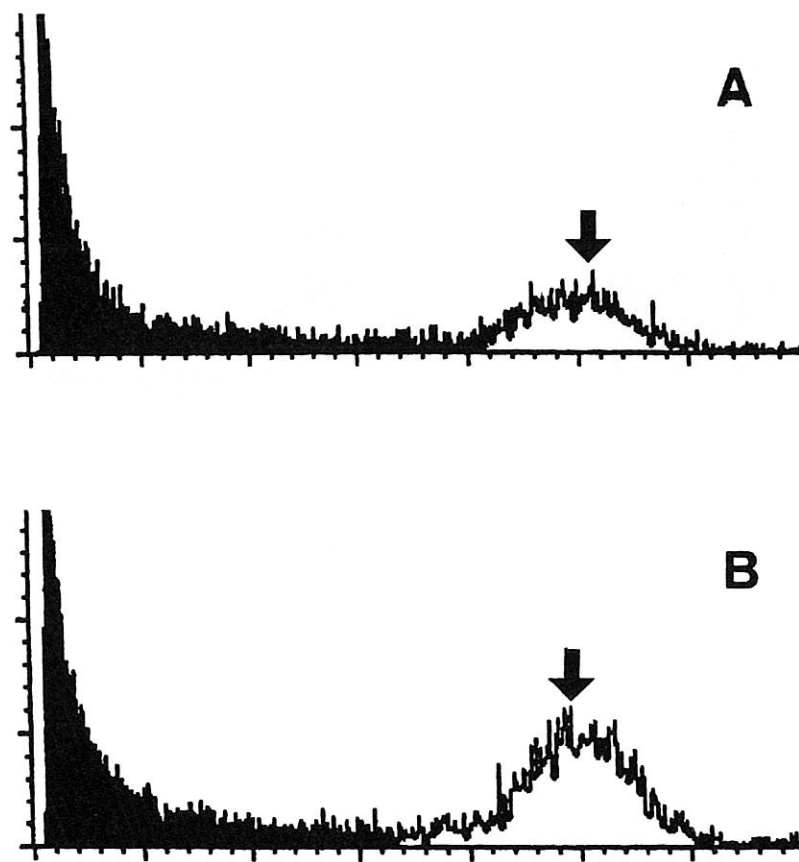


図-6 カイツカイブキ自然突然変異体のFCM分析におけるDNAヒストグラム
A: 元木 ($2n=44=4X$), B: 枝変り

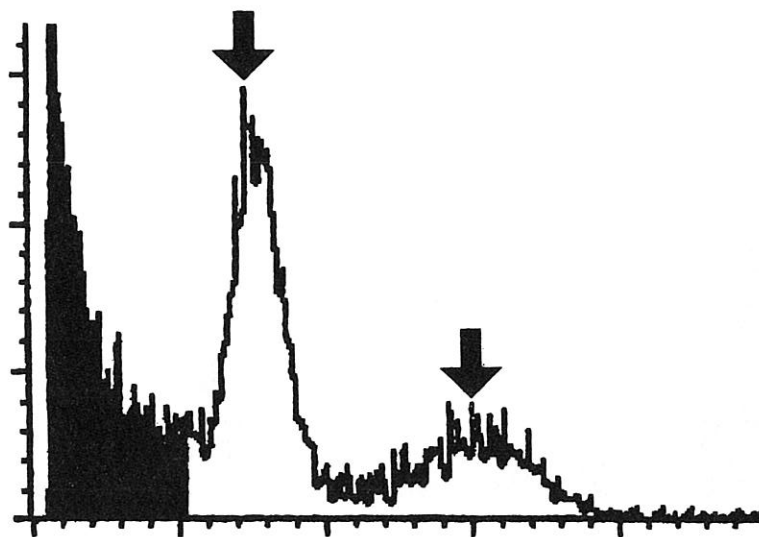


図-7 ヤブクグリスギ（元木+枝変りの混合試料）のFCM分析におけるDNAヒストグラム

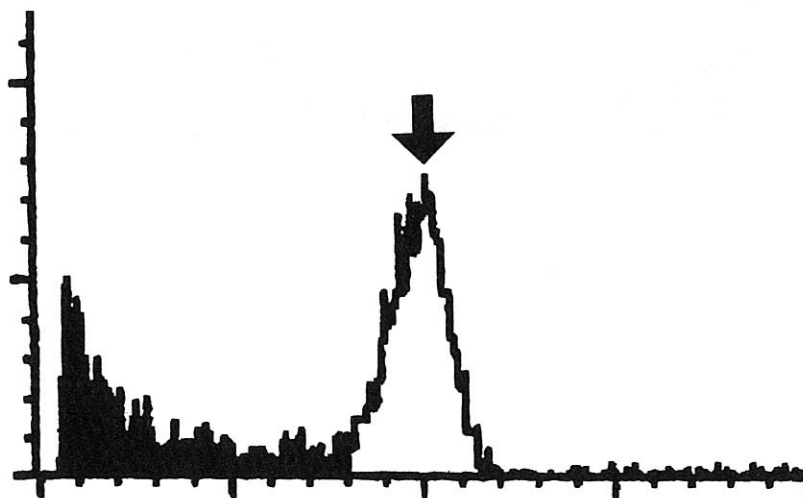


図-8 アヤスギ（元木+枝変りの混合試料）のFCM分析におけるDNAヒストグラム

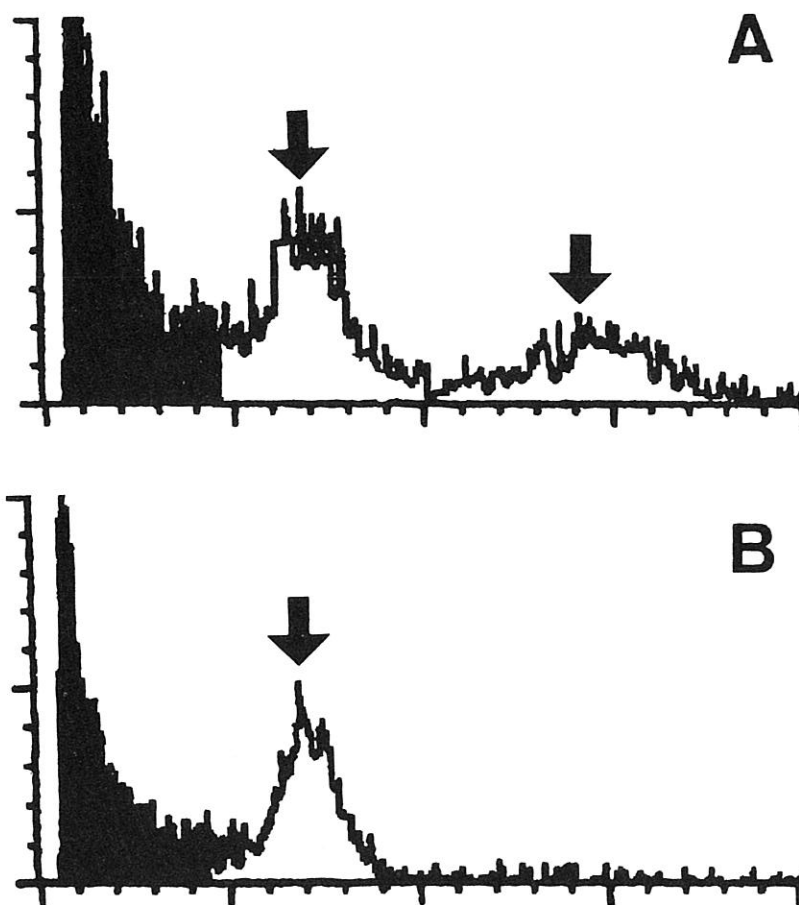


図-9 日出ヒノキ (元木+枝変りの混合試料) のFCM分析
におけるDNAヒストグラム
A : 元木+枝変り, B : 元木+再枝変り

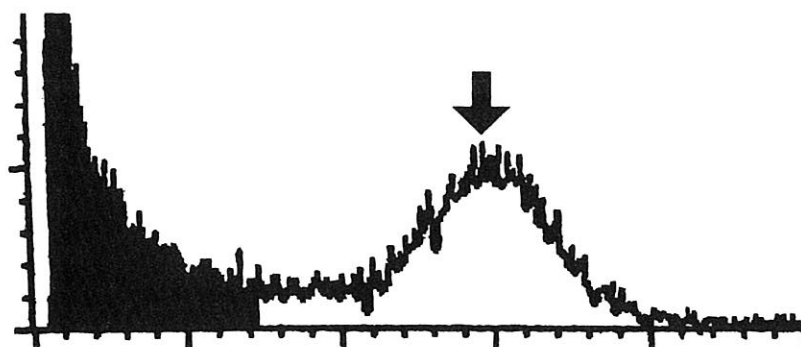


図-10 カイツカイブキ (元木+枝変りの混合試料) のFCM分析
におけるDNAヒストグラム

IV 考 察

植物のFCM分析の研究は、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等である⁸⁾。植物の倍数性レベル等での研究において、FCMを利用した外国での報告例としては、種間雑種の倍数性の検定³⁾、体細胞雑種の決定²¹⁾、半数性細胞の培養変異の測定¹⁾、倍数性細胞の割合の測定¹⁴⁾、細胞核の複製の活性測定⁵⁾、半数体植物の薬剤処理による倍数化の測定²³⁾、組織培養による再生植物体の倍数性の測定⁴⁾等があげられる。我国においては、村上ら¹⁰⁾が果樹の倍数性およびゲノムサイズの測定、三位ら⁶⁾がコショウランの体細胞多倍数性および倍数性の識別、三柴ら^{7, 9)}がサクラソウの倍数性の測定、マツバボタンの倍数性および体細胞多倍数性の解析、高柳ら²²⁾がタマネギの倍数性判別にそれぞれFCMを利用している。林木においては、O'BRIEN et al.¹¹⁾がマツのゲノムサイズの測定、筆者ら^{17~20)}がスギやヒノキの倍数性の判別にFCMを利用しているが、農園芸作物に比べて研究例が少ないのが現状である。

今回、倍数性既知のスギ、ヒノキ倍数体¹⁶⁾について、FCM分析を行ったところ、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出現し、倍数性の識別が容易であり、前報^{17~19)}と同様な結果が得られた。

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のFCM分析の結果、二倍体のヤブクグリスギおよび日出ヒノキの元木からは、四倍体と推定される枝変りが発生し、さらに、日出ヒノキの四倍体と推定される枝変りからは、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 ($2n=23=2X+1$)¹⁵⁾ においては、二倍体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。カイヅカイブキの元木と枝変りは、ピークの位置に差異がなかったことから、同じ倍数性と考えられる。自然突然変異体の元木と枝変りのFCM分析においては、単独試料および混合試料の検討を行ったが、倍数性レベルの差異があれば両試料ともに十分に識別できたが、異数性レベルの差異では混合試料での分析は困難である傾向が認められた。医学分野のFCM分析においては、腫瘍特異的マーカーとしてのDNA異数体 (DNA aneuploidy: DA) の検索が盛んに行われており、この場合、未知試料 (検体) と試料内標準試料 (Internal standard: IS) の混合試料を用いることにより、異数体を明確に分離することが可能となっている¹³⁾。従って、植物の異数体においてもこのような技術開発が望まれる。混合試料は同時測定といった条件設定ができることから、単独試料よりは正確な相対値が得られやすいものと考えられる。

V おわりに

以上の結果から、FCM分析は倍数性を簡便、かつ迅速に推定することができ、また、異数性も推定が可能であることから、今後、林木の遺伝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。

今回のスギ、ヒノキ等のFCM分析におけるDNAヒストグラムにおいては、園芸植物等^{6, 7, 9, 10, 22)}に比べて、ピークが明瞭に発現しにくい傾向が認められたが、これは、細胞破碎物等による

ノイズに原因があると考えられるため、今後、試料の調製法等を検討する必要がある。また、正確な相対的核DNA量を求めるためには、今後、試料内標準試料（IS）の検索および開発がきわめて重要と考えられる。FCM分析により核DNA量に差異が認められなかった枝変り等については、PCR等による核DNAの質的分析も必要であろう。

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¹²⁾や筆者¹⁵⁾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び二倍体の枝変りが発生した事例も見あたらないことから、これらはきわめて珍しい現象といえよう。

引用文献

- (1) BEAUMONT, V.H. and WIDHOLM, J.M.(1993) Ploidy variation of pronamide-treated maize calli during long term culture, *Plant Cell Reports* 12:648 ~ 651.
- (2) GALBRAITH, D.W. et al.(1983) Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues, *Science* 220:1049 ~ 1051.
- (3) JAAP, M. et al.(1989) Identification of 2n-Pollen Producing Interspecific Hybrids of *Lilium* Using Flow Cytometry, *Cytologia* 54:737 ~ 745.
- (4) JACQ, B. et al.(1992) Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris L.*) hypocotyls cultured *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants, *Plant Cell Reports*, 11:329 ~ 333.
- (5) LIU, Y et al.(1994) Nuclear replication activities during imbibition of abscisic acid and gibberellin-deficient tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds, *Planta* 194:368 ~ 373.
- (6) 三位正洋ら (1997) コチヨウランの Polysomaty と倍数体の識別, 育学雑47 (別2) : 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) 三柴啓一郎・三位正洋 (1997) マツバボタン (*Poleulaca grandiflora* Hook.) における倍数体の作出とフローサイトメトリーによる Polysomaty の解析, 育学雑47 (別2) : 374.
- (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) O'BRIEN, I.E.W. et al.(1996) Flow cytometric determination of genome size in Pinus, *Plant Science* 115 : 91 ~ 99.
- (12) 岡村政則 (1973) ヒノキ人工林において発見した変異個体, 24 回日林関西支講 : 63 ~ 64.
- (13) 太田和夫 (監修) (1994) フローサイトメトリー, 手技と実際, pp.824, 癌と化学療法社, 東京.
- (14) ROCHER, E. J. et al.(1990) Developmentally Regulated Systemic Endopolyploidy in Succulents with Small Genomes, *Science* 250 : 99 ~ 101.
- (15) 佐々木義則 (1986) スギ, ヒノキ等の自然突然変異体の細胞遺伝学的研究, 大分県林試研究時報12 : 5 ~ 12.

- (16)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，大分県林試研報 13：1～14.
- (17)佐々木義則ら (1997a) 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，林木の育種（特別号）：51～54.
- (18)佐々木義則ら (1997b) 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，大分県林試研究時報23：1～8.
- (19)佐々木義則ら (1997c) フローサイトメトリー分析によるスギ，ヒノキの伴数性の判別，日林九支研論50：55～56.
- (20)佐々木義則ら (1997d) スギ，ヒノキ，カイヅカイブキ自然突然変異体のフローサイトメトリー分析，日林九支研論51：投稿中（1998年 刊行予定）.
- (21)S CHOENMARKERS, 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.
- (22)高柳りから (1997) フローサイトメーターによるタマネギの倍数性判定方法の確立,育学雑 47 (別2) : 375.
- (23)T OSCA, A. et al.(1995) Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*, Plant Cell Reports 14:455～458.

大分県林業試験場研究時報, No.24, 1998

平成10年3月2日 印刷

平成10年3月20日 発行

編集 大分県林業試験場・編集委員会

〒877-1363 大分県日田市大字有田字佐寺原

TEL 0973(23)2146

FAX 0973(23)6769

印刷 尾花印刷有限公司

〒877-0026 大分県日田市田島本町8-8

TEL 0973(23)0123

FAX 0973(22)4972
