

フローサイトメトリーを用いたシクラメン植物体 および花粉の倍数性検定

高村武二郎・吉村奈津紀

DETERMINATION OF PLOIDY LEVELS IN PLANTS AND POLLEN GRAINS OF *CYCLAMEN PERSICUM* MILL. BY USING FLOW CYTOMETRY

Takejiro TAKAMURA and Natsuki YOSHIMURA

Rapid determination of ploidy levels in cyclamen by using flow cytometry of DAPI-stained nuclei was examined. A strong positive linear correlation between DAPI fluorescent intensities of nuclei extracted from the leaf blades of cyclamen plants and the ploidy levels in diploid, triploid and tetraploid plants was confirmed. Thus, the flow cytometry of DAPI-stained nuclei in cyclamen was proven to be an effective and easy tool to determine the ploidy levels within a short time. DAPI fluorescent intensities of nuclei extracted from the pollen grains of diploid plants having and without giant pollen grains were also investigated. Three peaks of 1C, 2C and 4C were observed in the plants having giant pollen grains, whereas only 1C and 2C peaks were observed in the plants without giant pollen. The results suggested that the giant pollen grains were unreduced $2n$ pollen grains.

Key Words: $2n$ pollen, *Cyclamen persicum*, DAPI, flow cytometry, giant pollen, ploidy.

緒 言

シクラメン (*Cyclamen persicum* Mill.) には二倍体と四倍体とが存在し、それぞれの倍数性に特有の形質が存在するが、近年まで異倍数体間交雑による品種改良はほとんど行われてこなかった。しかしながら、二倍体と四倍体の交雑においては発芽能力のある種子はわずかしか得られず⁽¹⁾、その多くまたは全てが四倍体であること^(1, 2, 3, 4)、その四倍体形成は二倍体における非還元性配偶子の形成に起因すること⁽⁵⁾、接合胚の発育停止および退化により種子数が減少すること⁽⁶⁾、ならびに胚珠培養により三倍体の救出が可能であること⁽⁷⁾が明らかとなり、さらに倍加による倍数体の育成^(8, 9)や薬培養による半数体の育成⁽¹⁰⁾も可能となったことから、異倍数体間交雑や倍数性操作による有用変異の拡大が期待されている。

倍数性を利用した育種においては、育種素材や作出個体の倍数性の確認は不可欠である。しかしながら、シクラメン園芸品種では細胞および染色体が非常に小さく、染色体数も多いことから、染色体観察には多大な労力を要し、効率も悪いため、簡易かつ効率的な倍数性検定法の確立が望まれている。

フローサイトメトリーは、いくつかの作物でDNA量

や倍数性の検定法に有効な手段であることが示されており^(11, 12, 13, 14)、分析手順が簡易かつ迅速であるため、大量のサンプルの倍数性レベルを短時間で検定できる有効な手段とされている⁽¹⁵⁾。そこで本研究では、フローサイトメトリーを用いたシクラメンにおける倍数性の簡易かつ迅速な検定法の開発を試みた。また、それを用いてシクラメン二倍体個体に認められる巨大花粉^(1, 5)の倍数性の調査も試みた。

材料および方法

1. シクラメン成株の簡易倍数性検定

シクラメン二倍体5品種・系統を用いて、それぞれの個体の成葉を5mm角程度に切り取り、内部標品としてオオムギ 'Bonus' の葉を用いて核抽出用バッファー (Partec社) 中で細断した。得られた懸濁液を5分間放置した後、20または30 μ m孔径のメッシュでろ過した。ろ過した懸濁液に5倍量のDAPI染色液⁽¹⁶⁾を加え、さらに10分間放置した後、懸濁液中の核のDAPI蛍光強度を、プロイディーアナライザーPA型 (Partec社) で分析した。また、既に染色体数が確認されている四倍体園芸品種 'ボンファイア' および 'ビクトリア'、ならびに二倍体園芸品種×四倍体園芸品種の交雑により得られた三倍体

F₁ (‘アンネッケ’ × ‘ボンファイア’), F₁ (‘カゲイエロー’ × ‘ボンファイア’), F₁ (‘ピュアホワイト’ × ‘ボンファイア’), F₁ (‘ピュアホワイト’ × ‘ビクトリア’) を用い、二倍体品種と同様の手順でフローサイトメトリーにより核のDAPI蛍光強度を分析した。ただし、三倍体および四倍体の分析では内部標品にオオムギではなく、二倍体シクラメン品種のF₁ (‘ラルゴ’ × ‘ピュアホワイト’) を用い、DAPI染色液にはPartec社の核染色用B液を用いた。

2. シクラメン花粉の倍数性検定

二倍体品種‘ピュアホワイト’の巨大花粉を分離するまたは分離しない成株の花粉をそれぞれ採取し、核抽出用バッファー中で細断した。得られた懸濁液を5分間放置した後、10 μm孔径のメッシュでろ過した。ろ過した懸濁液に5倍量のDAPI染色液⁽¹⁶⁾を加え、さらに10分間放置した後、懸濁液中の核のDAPI蛍光強度を、プロイディーアナライザーPA型で分析した。なお、2Cのピーク的位置は、花粉からの核抽出液と巨大花粉を分離しない成株の成葉からの核抽出液とを混合した後に分析を行い確認した。

結果および考察

フローサイトメトリーは、染色された細胞内核DNAの蛍光強度をDNA含有量の相対値とみなして計測するものである。二倍体品種・系統の葉身から抽出された核のDAPI蛍光強度の平均値はオオムギの値を1とした場合、0.441から0.445を示し、二倍体品種・系統間では核のDAPI蛍光強度、すなわち核DNA量にほとんど差異はないものと考えられた(第1表)。第1図に二、三および四倍体の葉身から抽出した核DNAにおける蛍光強度ヒストグラムを示した。二倍体のF₁ (‘ラルゴ’ × ‘ピュアホワイト’) では、2Cレベルを示すと考えられる大きなピークが認められた。一方、二倍体園芸品種 × 四倍体園

Table 1. Relative DAPI fluorescent intensities of the prominent peak in diploid cultivars and strains to that in barley.

Cultivar or strain (F ₁)	Mean relative DAPI fluorescent intensity ^z
Standard (Barley ‘Bonus’)	1
‘Anneke’	0.441 ± 0.001
‘Largo’	0.442 ± 0.001
‘Piccolo (purple-flowered)’	0.441 ± 0.003
‘Pure White’	0.445 ± 0.004
F ₁ (‘Largo’ × ‘Pure White’)	0.441 ± 0.002

^z Mean ± SE (n = 3).

芸品種の交雑により得られた三倍体F₁系統では、F₁ (‘ラルゴ’ × ‘ピュアホワイト’) の約1.5倍の蛍光強度を示す位置に3Cレベルと考えられるピークが認められ、四倍体園芸品種では約2倍の蛍光強度を示す位置に4Cレベルと考えられる大きなピークが認められた。なお、いずれの倍数体においても、主要なピークの約2倍の蛍光強度を示す位置に小さなピークが認められたが、これらの小さなピークはアスパラガスで報告されているように⁽¹⁷⁾、主にそれぞれの倍数体におけるG₂期の細胞によるものであると推測される。

アスパラガスにおいては、フローサイトメトリーで検出される蛍光強度と倍数性レベルとの間に明白な相関関

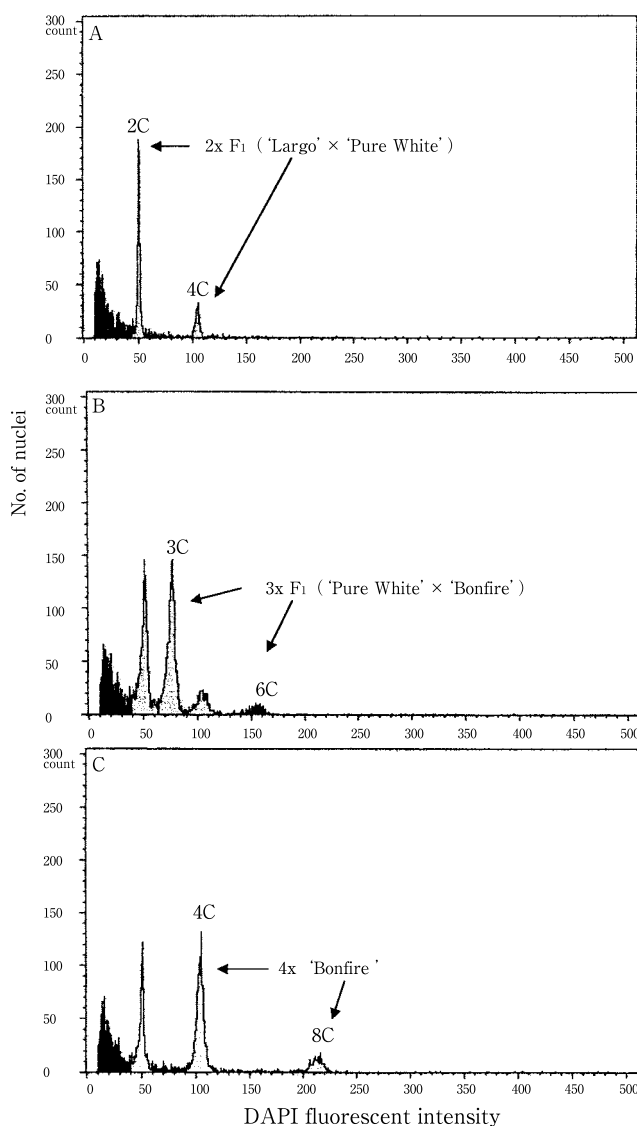


Fig. 1. Typical histograms of DAPI fluorescent intensity of nuclei extracted from the leaf blades of cyclamen. A: 2x F₁ (‘Largo’ × ‘Pure White’), B: 2x F₁ (‘Largo’ × ‘Pure White’) + 3x F₁ (‘Pure White’ × ‘Bonfire’), C: 2x F₁ (‘Largo’ × ‘Pure White’) + 4x ‘Bonfire’.

Table 2. Relative DAPI fluorescent intensities of the prominent peak in triploid and tetraploid plants to that in diploid F_1 ('Largo' × 'Pure White').

Ploidy level	Strain (F_1) or cultivar	No. of plants investigated	Mean relative DAPI fluorescent intensity ^z
2x (standard)	F_1 ('Largo' × 'Pure White')		1
3x	F_1 ('Anneke' × 'Bonfire')	2	1.502 ± 0.008
	F_1 ('Kage Yellow' × 'Bonfire')	3	1.493 ± 0.024
	F_1 ('Pure White' × 'Bonfire')	3	1.500 ± 0.017
	F_1 ('Pure White' × 'Victoria')	3	1.518 ± 0.007
4x	'Bonfire'	3	2.044 ± 0.020
	'Victoria'	3	2.076 ± 0.019

^z Mean ± SE (n = No. of plants investigated).

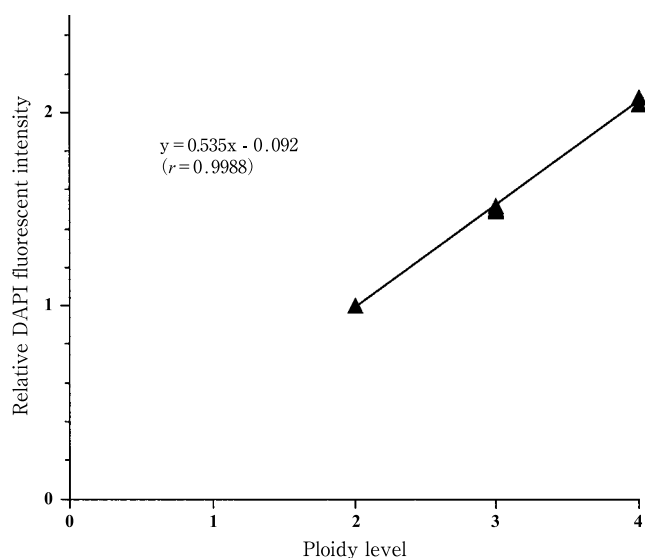


Fig. 2. Relationship between ploidy level and mean DAPI fluorescent intensity in cyclamen. Relative DAPI fluorescent intensity: The value in F_1 ('Largo' × 'Pure White') = 1.

係が認められ、倍数性レベルの検出にフローサイトメトリーが利用できると報告されている⁽¹⁷⁾。シクラメンにおいても二倍体の F_1 ('ラルゴ' × 'ピュアホワイト')の2Cピークの測定値を1とした場合、三倍体 F_1 系統における3Cピークの相対値は1.493~1.518、四倍体品種における4Cピークの相対値は2.044~2.076となり、各倍数体においては品種・系統間に大きな差異はなく、各倍数体間では、有意な差が認められた(第2表)。また、葉身から抽出された核のDAPI蛍光強度と倍数性レベルとの間に強い相関関係($r = 0.9988$)が認められた(第2図)ことから、シクラメンの簡易的な倍数性測定にフローサイトメトリーを利用できるものと考えられる。

シクラメンの花粉においても成葉と同様にフローサイトメトリーにより、核のDAPI蛍光強度の明確なピーク

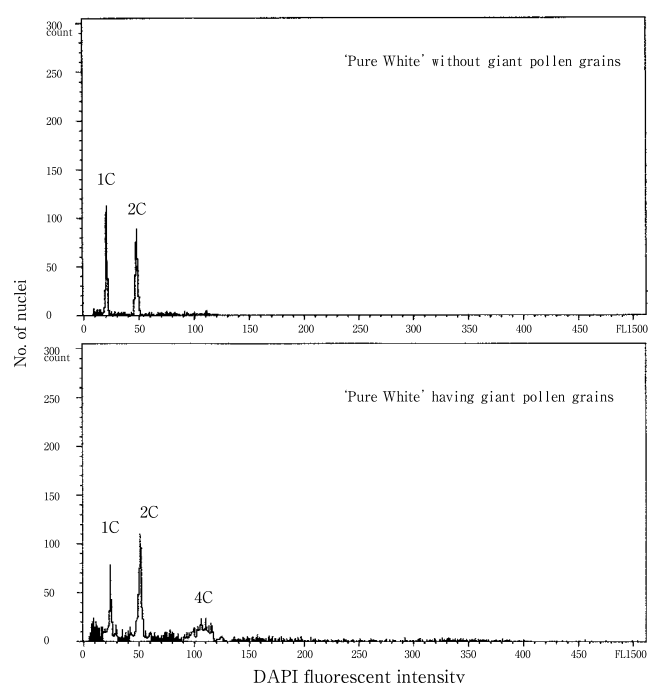


Fig. 3. Typical histograms of DAPI fluorescent intensity of nuclei extracted from the pollen grains in diploid 'Pure White' without (upper) or having (lower) giant pollen grains.

が得られ、巨大花粉をほとんど形成しない株では明確な2つのピークが、巨大花粉を有する株では3つのピークが認められた(第3図)。なお、巨大花粉は認められるものの、その割合が比較的低い株では、3つのピークのうち最も蛍光強度が高いピークが不明確になる傾向が認められた。ユリ花粉のフローサイトメトリーにおいては、非還元性の $2n$ 花粉を形成しない株では1Cと2Cの2つのピークが、 $2n$ 花粉を有する株ではそれに加えて4Cのピークが認められ、これはユリの花粉が二核性で、雄原核が精核に分裂する直前の段階でDNA量が2倍になっており、さらに $2n$ 花粉では通常の花粉に比べ

てDNA量が2倍になっていることによると報告されている⁽¹⁸⁾。シクラメンにおいても葉身からの核抽出液との比較(データ未掲載)から、巨大花粉をほとんど形成しない株の2つのピークは1Cと2C、巨大花粉を有する株における3つのピークは1C、2Cおよび4Cレベルであると考えられ、ユリの花粉と同じ現象が起きているものと示唆される。また、巨大花粉を形成しない株の花粉では、1Cと2Cレベルの核の割合はほぼ同じであるのに対して、巨大花粉を有する株の花粉では2Cレベルを示した核の割合が高くなったが、これもユリでの報告⁽¹⁸⁾と同様であった。

シクラメンの四倍体×二倍体の交雑では、花粉親の二倍体株に巨大花粉が認められるときに四倍体後代が得られ^(1,5)、その減数分裂の観察から、巨大花粉は減数分裂の失敗に起因する非還元性の花粉であると示唆されている⁽⁵⁾。本研究においても、巨大花粉が通常の花粉の2倍量の核DNAを含んでいると考えられたことから、巨大花粉は非還元性の $2n$ 花粉であることが改めて強く示唆される。

本研究の結果、シクラメンの葉身、花粉のいずれを用いてもフローサイトメトリーによる分析およびそれを利用した倍数性の推定が可能であることが示唆された。なお、花粉の分析においては核抽出液のろ過時に $20\mu\text{m}$ 以上の孔径のメッシュを使った場合に3Cと考えられるピークが認められた場合があり(データ未掲載)、これは染色された花粉管核と雄原核の蛍光発色が同時に検出された可能性があると思われた。したがって、シクラメンの花粉を用いてフローサイトメトリーを行う場合には

メッシュの孔径に注意する必要があるものと思われる。前述したように、フローサイトメトリーはDAPIやPIで染色された細胞内核DNAの蛍光強度を計測しているものであり、染色体数を分析しているものではないため、植物種によっては染色体1~2本の違いといった異数体レベルの分析まで行うことは容易ではない。しかしながら、本研究の結果、多大な労力を要する染色体観察と比較して、フローサイトメトリーを用いてDAPI染色された細胞内核DNAの蛍光強度を計測する方法がシクラメンの倍数性レベルの簡易検定として有用であることは明白であり、フローサイトメトリーによる分析は、シクラメン倍数性育種の効率化に非常に有効な手段になり得るものと考えられる。

摘 要

フローサイトメトリーを用いた、シクラメンの簡易かつ迅速な倍数性検定法の確立を試みた結果、各倍数体レベルとDAPIにより染色された細胞内核DNAの蛍光強度との間に高い相関が認められ、フローサイトメトリーがシクラメンの簡易倍数性検定に有効な手段であることが示された。また、フローサイトメトリーを用いて、巨大花粉を分離しないまたは分離するシクラメン二倍体個体の花粉分析した結果、前者では1Cと2Cのピークが認められたのに対して、後者では1Cと2Cに加えて4Cのピークが認められ、巨大花粉は非還元性の $2n$ 花粉であることが強く示唆された。

引 用 文 献

- (1) TAKAMURA, T. and MIYAJIMA, I.: Cross-compatibility and the ploidy of progenies in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **64**, 883-889 (1996).
- (2) KAPPERT, H.: Die Bedeutung der Polyploidie in der Cyclamen züchtung. *Züchter*, **13**, 106-114 (1941) (In German).
- (3) WELLENSIEK, S. J.: The genetics of diploid × tetraploid and reciprocal cyclamen crosses. *Züchter*, **25**, 229-230 (1955).
- (4) LEGRO, R. A. H. : The cytological background of *Cyclamen* breeding. *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen*, **59**, 1-51 (1959).
- (5) TAKAMURA, T. and MIYAJIMA, I.: Origin of tetraploid progenies in $4x \times 2x$ crosses of cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **71**, 638-642 (2002).
- (6) TAKAMURA, T. and MIYAJIMA, I.: Embryo development in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **65**, 113-120 (1996).
- (7) 高村武二郎, 宮島郁夫: 胚珠培養によるシクラメンの二倍体と四倍体との雑種作出, 育種学雑誌, **46** (別1), 231 (1996).
- (8) ISHIZAKA, H. and UEMATSU, J.: Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules in vitro and plants. *Breed. Sci.*, **44**, 161-166 (1994).
- (9) TAKAMURA, T. and MIYAJIMA, I.: Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their charac-

- teristics, *Sci. Hort.*, **65**, 305-312 (1996).
- (10) ISHIZAKA, H. and UEMATSU, J.: Production of plants from pollen in *Cyclamen persicum* Mill. through anther culture. *Japan J. Breed.*, **43**, 207-218 (1993).
- (11) BAIRD, W. V., ESTAGER, A. S. and WELLS, J. K.: Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **119**, 1312-1316 (1994).
- (12) MARTÍNEZ, C. P., ARUMUGANATHAN, K., KIKUCHI, H. and EARLE, E. D.: Nuclear DNA content of ten rice species as determined by flow cytometry. *Japan. J. Genet.*, **69**, 513-523 (1994).
- (13) OLLITRAULT-SAMMARCELLI, F., LEGAVE, J. M., MICHAUX-FERRIERE, N. and HIRSCH, A. M.: Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Sci. Hort.*, **57**, 303-313 (1994).
- (14) OZIAS-AKINS, P. and JARRET, R. L.: Nuclear DNA content and ploidy levels in the genus *Ipomoea*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **119**, 110-115 (1994).
- (15) DOLEZEL, J.: Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J. Appl. Genet.*, **38**, 285-302 (1997).
- (16) MISHIBA, K., ANDO, T., MII, M., WATANABE, H., KOKUBUN, H., HASHIMOTO, G. and MARCHESI, E.: Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann. Bot.*, **85**, 665-673 (2000).
- (17) OZAKI, Y., NARIKIYO, K., HIRAMATSU, M., URESHINO, K. and OKUBO, H.: Application of flow cytometry for rapid determination of ploidy levels in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **43**, 83-88 (1998).
- (18) VAN TUYL, J. M., DE VRIES, J. N., BINO, R. J. and KWAKKENBOS, T. A. M.: Identification of 2n-pollen producing interspecific hybrids of *Lilium* using flow cytometry. *Cytologia*, **54**, 737-745 (1989).

(2006年10月31日受理)