

琉球大学学術リポジトリ

タマネギ染色体の核型分析

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): 染色体, 核型分析, Cバンド法 キーワード (En): Chromosome, Caryotype analysis, C band method 作成者: 林, 弘也, 池田, 健司, 大城, 由紀子, Hayashi, Hiroya, Ikeda, Kenji, Ohshiro, Yukiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3630

タマネギ染色体の核型分析

林 弘也*、池田 健司*、大城由紀子*

Hiroya HAYASHI, Kenji IKEDA, Yukiko OHSHIRO : Image
Analysis of Karyotype of *Allium sepa* Chromosomes

Allium sepa : 染色体、核型分析、Cバンド法

Allium sepa : Chromosome, Caryotype analysis, C band method

Summary

It was analyzed a chromosome karyotype of an onion (*Allium sepa*) which was cultivated at Saitama, using the C band method of the dyeing method and the chromosome length and arm ratio which determined the soft (made from Chantal, Leica) in the chromosome karyotype analysis for human race. The chromosome was $2n = 16$ and did not have a satellite in all chromosomes. Chromosomes were identified mainly chromosome length and arm ratio of chromosome but chromosome 2 and chromosome 3 was identified by using in combination with C band method. The karyotype of the chromosome 6 was sm type but all other chromosomes were m type and the karyotype was $7m+1sm$.

By the C band method of the dyeing method and the chromosome length and arm ratio of chromosome which was measured by the chromosome karyotype analysis software for human race, the chromosome of onion could be identified to eight pairs of chromosomes from 1 to 8.

摘 要

埼玉産タマネギ (*Allium sepa*) の染色体核型分析をヒト用染色体核型分析ソフト (Chantal, Leica 製) の染色体長、腕長比および染色体分染法の C バンド法を併用して分析した。染色体は $2n=16$ であり、サテライトを有していない。染色体の識別は、染色体 2 と染色体 3 以外の染色体は染色体長と腕長比により識別できたが、染色体 2 と 3 の識別には C バンド法を併用して識別できた。核型は染色体 6 が sm 型であるが、他の染色体は全て m 型であり、 $7m+1sm$ であった。染色体核型分析ソフトを利用した染色体長、腕長比および染色体分染法の C バンド法を併用することで、染色体を 1 から 8 までの 8 対の染色体に識別できた。

結 言

植物染色体は従来の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。経

* 琉球大学農学部生物資源科学科

験の豊富さにより分析に要する時間はもとより、染色体の形状が比較的似かよっていることもあり、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する分析方法が従来から期待されてきた。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、分析法の困難さが改善されつつある。^{3, 4, 5)}

従来の肉眼的な核型分析法が正確な分析結果を得るように技術的な改良が提案されており、その方法の一つが染色体分染法である。植物体の核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。この方法は従来の分析法を適用し、識別できない染色体を明確に識別するために補足する方法であり、染色体長やセントロメアの肉眼的な染色体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の判断基準の差異、測定位置のばらつきを少なくする点、計測実験が素早く実施できる点に利点がある。

本報告は、ヒト用の染色体核型分析プログラムを利用して、植物体の染色体核型分析に適用し、タマネギ染色体の核型を分析した。

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 cepa*) を水に10-15日浸漬して発根させ、根端を約10mm長さで切り取り試料として使用した。試料は水洗した後に0.01%のコルヒチン水溶液に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分間浸漬し、固定した。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。カバーグラス上から軽く叩き、余分な酢酸カーミンを除去した後に指を押し付け押しつぶし、染色体を分散させた。¹⁰⁾

C-バンド法はカバーグラス上で押しつぶした染色体を冷蔵庫中で凍結させ、カバーグラスを取り除いた。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、約20℃の飽和水酸化バリウムに7分間浸漬した後に水洗した。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、染色体の画像で分析、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 Bhattacharyya R¹⁾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 社のヒト用染色体分析ソフト "Chantal" を使用した。染色体画像をコンピュータに取り込み、画像の汚れを消去し、染色体の重なり除去を手動操作で行い、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 (Image-Pro PLUS, V. 3.0 IJ) によって決定し、腕長比を修正した。

実験結果および考察

タマネギの核型分析にヒト染色体分析プログラム "Chantal" を適用する前に、プログラムによる染

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

Sample	Chromosome length		Arm ratio	
	1	2	1	2
Data	6.95	5.37	1.123596	0.143885
	6.21	5.26	1.111111	0.161031
	7.05	5.26	1.315789	0.141844
	6.95	4.74	1.282051	0.143885
Average	6.79	5.1575	1.201201	0.147661
Standard deviation	0.38953	0.283122	0.105852	0.008965
t value	0	1.57E-15	1.17E-06	8.52E-07

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。Table 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 (Image-Pro PLUS, V. 3.0 IJ) によりマニュアル測定し、輝度から判定される動原体の位置は測定値による確実な判定である。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一測定例を Fig. 1 に示した。

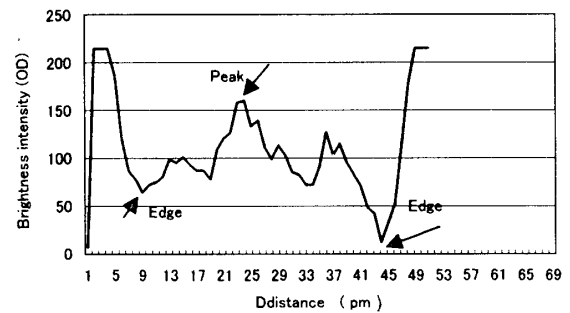


fig. 1 Brightness intensity of a chromosome

タマネギ染色体は $2n=16$ であるので、染色体長を基準にした 8 対の染色体対を "Chantal" ソフト上に構成した。12細胞の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のばらつきを t 検定により検定した。検定は平均値からの偏差を t 検定する方法によった。染色体長および腕長比は共に全ての染色体で95%の信頼範囲にあることが確認された。細胞分裂中期にある細胞の判定もほぼ妥当であった。平均値、標準偏差と共に検定結果を Table 2 に示した。

核型分析では、染色体の染色体長に従って配列し、同じ染色体長の 2 染色体を一組として染色体番号を付し、動原体の位置により識別した。識別した染色体対は染色体長を染色体対相互に t 検定して、有意差により染色体対識別の可能性を検討した。腕長比も同様に有意差検定を行い識別の可能性を検討した。Table 3 に染色体長に基づく染色体番号および腕長比の実測結果と 0.05 危険率有意差の有無を示した。全ての染色体がサテライトを有していなかった。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 と染色体 8 の間に有意差がなく識別できない。しかし染色体長と腕長比を組み合わせて検討すると次のようになる。染色体 1 と染色体 2 は染色体長に有意差がなく、また染色体 2 と染色体 3 にも有意差がないが、染色体 1 と染色体 3 には有意差がある。従って染色体長

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

Number of chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8
Chromosome length								
Average	7.244583	6.930419	6.61	6.119565	5.954167	5.58375	5.292273	4.806087
Standard deviation	0.87818	0.7603	0.7072	0.6828	0.6006	0.6733	0.6398	0.603
Coefficient of variation	0.121219	0.109705	0.106989	0.111577	0.100871	0.120582	0.120893	0.1254659
Degree of freedom	23	23	23	23	23	23	23	23
Significant difference	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Arm ratio								
Average	0.89375	0.637727	0.690909	0.707083	0.901739	0.35652	0.82782	0.648182
Standard deviation	0.086355	0.16806	0.88358	0.45647	0.13456	0.3765	0.20626	0.40543
Coefficient of variation	0.096621	0.26353	1.278866	0.645568	0.149223	1.056042	0.24916	0.6254879
Degree of freedom	23	23	23	23	23	23	23	23
Significant difference	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. : no significant difference

Table 3 t-Test on chromosome length and arm length between 8 chromosomes

Number of chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8
Chromosome length								
Number of chromosome	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	*	*	*	*	*	*	-----
Arm ratio								
Number of chromosome	1	-----	*	*	*	n.s.	*	*
	2	*	-----	n.s.	n.s.	*	*	*
	3	*	n.s.	-----	n.s.	*	*	*
	4	*	n.s.	n.s.	-----	*	*	*
	5	n.s.	*	*	*	-----	*	*
	6	*	*	*	*	*	-----	*
	7	*	*	*	*	*	*	-----
	8	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	-----

* : Significant difference at 95%

n.s. : No Significant difference at 95%

が長い3染色体の中で染色体1の腕長比が染色体2と染色体3の腕長比と有意差があるので、腕長比1.11の染色体1は染色体2、3と識別可能である。染色体2と染色体3は染色体長、腕長比とも有意差がないので両者の識別はできない。染色体2、3と染色体4は腕長比に有意差がないが、染色体長に有意差があり識別可能である。染色体4と染色体5、染色体5と染色体6、染色体6と染色体7の間は染色体長に有意差がないが、染色体4と染色体6、7の間は有意差が認められた。しかし腕長比は相互間に有意差があるので、腕長比1.01を示す染色体4、1.28を示す染色体5、2.75を示す染色体6は識別できた。染色体7と染色体8の間には染色体長、腕長比ともに有意差があり、染色体は識別可能であるが、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、両特性による識別は不可能であるので、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。Cバンドは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、染色体長と腕長比の場合と同様に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、Table 4に示した。Table 4にはA. Levan⁶⁾らが提案した核型もあわせ

て表記した。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。染色体が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。

タマネギの染色体は $2n=16$ であり、全てサテライトを持たない染色体で構成され、核型は $7m+1sm$ である。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個々の染色体を識別することが可能である。

Table 4 C-band position on chromosome

Chromosome number	Distance from centromere	Band number
1	1.830	2
	1.780	
2	5.366	1
	4.569	
3	1.708	2
	1.531	
4	3.190	1
	3.190	
5	4.141	2
	2.613	
6	3.775	4
	2.587	
7	1.543	1
	0.331	
8	2.091	2
	2.091	

Chromosome designation: $7m+1sm$

結 論

埼玉県で栽培されたタマネギを発根させ、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。核型は $7m+1sm$ であり、サテライトは確認されなかった。

引用文献

- 1) Bhattacharyya, R. 1976 Cytologia, **41**, 513-521
- 2) Endo, T. K., B. S. Gill 1984 The heterochromatin distribution and genome evolution in diploid species of *Elymus* and *Agropyron*, 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、75-86 [福井希一、芦川郁夫編 1998 クロモゾーム、東京、ユニバーサル・アカデミー・プレス]
- 4) Kanako Iijima, Kiichi Fukui 1991 Clarification of the Conditions for the Image Analysis of Plant Chromosomes, Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour., **6** : 1-58
- 5) Yasuko Kamisugi, Kiichi Fukui 1990 Automatic Karyotyping of Plant Chromosomes by Imaging Techniques, Advances in Microscopy-Part IV : 290-295
- 6) Levan, A., K. Fredga, A. A. Sandberg 1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes., Hereditas, **52**, 201-220
- 7) 中西博宥 1989 染色体の研究、21-35、東京、東京大学出版会
- 8) 常脇恒一郎 1982 植物遺伝学実験法、p174-320、東京、共立出版
- 9) 武久慎 1974 植物染色体のバンディング、細胞、**6** (12), 363-374
- 10) 宇津木和夫、玉野逸郎、吉田治 1994 生物実験法 I、p36-41、東京、培風館