

## 植物プランクトン核内 DNA 量評価のための DAPI 染色法の改良

松本 和彦・古谷 研・小達 恒夫

三重大学生物資源学部水圏環境学講座

### Improved Staining Method of DAPI for Evaluating DNA Content in Phytoplankton Nucleus

Kazuhiko MATSUMOTO, Ken FURUYA and Tsuneo ODATE

Faculty of Bioresources, Mie University  
1515 Kamihama, Tsu, Mie Japan 514

#### Abstract

An improved method for staining DNA in phytoplankton nucleus is proposed. The method is for use in microfluorometry of fluorescence emitted from DNA stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Tris buffer composed of Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 2-mercaptoethylamine hydrochloride, NaCl and EDTA-2Na yields low decay of the fluorescence under excitation light and stable intensity of fluorescence for 14 to 30 hours after staining. The low decay and the stability results in low variances in DAPI fluorescence. Suitable concentration of DAPI seems to be variable according to species. The method was applied to a natural population, and confirmed that cohorts were resolved well enough for cell cycle analysis of phytoplankton.

**Key words:** phytoplankton · DNA · 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) · microfluorometry · cell cycle

#### 序 論

植物プランクトンは海洋生態系で生産される有機物の90%以上を担う重要な一次生産者である (WHITTAKER)<sup>1)</sup>。従って、植物プランクトンの増殖速度を精度良く見積もり、それを制御する要因を解明することは基本的な課題である。従来、植物プランクトンの増殖速度は炭酸固定速度 (STEEMANN NIELSEN)<sup>2)</sup>、あるいは酸素発生速度 (GAARDER and GRAN)<sup>3)</sup> に基づいて得た光合成速度と生

物量から、または現存量の経時的な変化から見積もられてきた。光合成を測定する方法は培養瓶中における全生物活動、即ち、植物プランクトンの光合成および呼吸だけではなく、共存する従属栄養者の呼吸活性の影響を受けるため、必ずしも光合成活性のみを表わすものではない (古谷)<sup>4)</sup>。また、培養すること自体、閉鎖系内の植物プランクトンが本来の活性を示さず、群集組成が変化することが指摘される (VENRICK et al.)<sup>5)</sup>。

一方、個体群内に占める分裂中の細胞の割合 (Frequency of Dividing Cells; FDC) により増殖速度を見積もる方法が提示されている (HAGSTRÖM et al.)<sup>6)</sup>。FDC

法は1世代以上にわたり、特定の個体群を経時的に採集し、その後核を染色し、核の分裂頻度の時系列分布から増殖速度を求めるので、培養の必要がなく、人為的な影響を受けない利点を持つ。即ち、現場海域では試料海水を適当な時間間隔で24時間以上連続して採取し、それを持ち帰るだけで良い。さらに、顕微鏡観察をしながら測定を行えるため、種の同定を同時に進めていくことができるといった利点がある。

しかし、FDC法では得られる増殖速度の精度は、観測頻度に大きく依存する。すなわち、有糸分裂時間に対して、十分に時間分解能を持つほど頻繁な採集を必要とする。また、適用が明瞭な有糸分裂像を与える種類に限定される。これを克服する方法として細胞周期解析による増殖速度測定法が提示された(CARPENTER and CHANG<sup>7)</sup>, CHANG and CARPENTER<sup>8)</sup>)。この方法では核の分裂頻度を求める代わりに、DNAの時系列的な定量分析から、細胞周期のG2+M期の細胞の割合を求めてFDCを当てはめるのである。これにより、1~2時間程度の採集間隔で精度良く増殖速度を見積もることが可能である。しかし、この方法ではDNAの定量の精度が重要となる。CARPENTER and CHANG<sup>7)</sup>, CHANG and CARPENTER<sup>8)</sup>はDNAの定量に4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いた。DAPIは340~380 nmの励起光下で480 nmを中心とした青色蛍光を発する蛍光染料であり、DNAのA-T塩基対に特異的に結合し、多くの生物試料においてDNA含量とDAPI蛍光強度との間にはきわめて良い直線関係が認められている<sup>9)</sup>。

DNA量を精度良く見積もるためには、DAPI染色による顕微蛍光分析で、測定中の蛍光の減衰や蛍光強度の経時変化による誤差などの問題を考慮しなければならない。CARPENTER and CHANG<sup>7)</sup>, CHANG and CARPENTER<sup>8)</sup>の方法では励起光下でのDNA蛍光の減衰があり、また、染色後の蛍光強度が不安定であり、測定結果に誤差を与える。植物プランクトンについてはDAPI染色の適用事例が少ないため、顕微蛍光分析のためには染色方法の検討が必要である。このため我々は精度良い測定を行うための条件として、励起光照射下での蛍光強度の減衰が小さい、強度が時間的に安定している、細胞周期の各相の抽出を容易にするために変動係数(CV)が小さいことをあげ、染色条件に検討を加え、天然植物プランクトン群集への応用と、その細胞周期の各相の抽出を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 染色方法

DNA合成がG1期で停止しており、全ての核内DNA量が一定である、粉末状のChicken Red Blood Cells (C-RBC) (SIGMA CHEMICAL)を標準試料として、染色条件の検討に用いた。微細藻類細胞として渦鞭毛藻の*Gymnodinium mikimotoi*の培養株を用いた。また、天然植物プランクトンは、1992年4月に岩手県の大槌湾で春季ブルームの群集を採取した。

C-RBCは蒸留水で洗浄した後、トリス緩衝液(20 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 20 mM 2-mercaptoethylamine hydrochloride, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA-2Na, pH 8.2) (HAMADA and FUJITA<sup>10)</sup>を改変)に置換した。これを保存溶液として暗所に5°Cで保管した。トリス緩衝液はTris (hydroxymethyl) aminomethane及び2-mercaptoethylamine hydrochlorideの作用によって、蛍光の減衰を抑制する効果があることが特徴である(HAMADA and FUJITA<sup>10)</sup>)。トリス緩衝液の濃度を変える実験ではTris (hydroxymethyl) aminomethaneと2-mercaptoethylamine hydrochlorideの濃度比を1:1になるように変化させ、NaClおよびEDTA-2Na濃度は上記を保った。このため緩衝液濃度を変えるとpHも変化した。緩衝液濃度はTris (hydroxymethyl) aminomethane濃度で表わした。

*G. mikimotoi*はf/2培地(GUILLARD and RYTH<sup>11)</sup>)でのバッチ培養で定常期に到達後十分時間が経過して、ほとんどの細胞がG1期にあると判断された培養を2% glutaraldehyde (v/v)で固定した。細胞は染色前にメタノールで光合成色素を抽出した後、蒸留水で洗浄した。これは、クロロフィルの吸収波長とDAPIの蛍光波長が重なっており、クロロフィルによるDAPI蛍光の消光を防ぐためである。

C-RBCと*G. mikimotoi*の染色方法をFig. 1に示す。C-RBC保存溶液5  $\mu$ lとクロロフィル抽出後の*G. mikimotoi*細胞粒にトリス緩衝液850  $\mu$ lを加え、DAPI (POLYSCIENCES)を加えた。細胞膜の透過性を増し、細胞の凝集を防ぐため、Triton X-100 (SIGMA CHEMICAL)を1%になるように加えた(TAYLOR and MILTHORPE<sup>12)</sup>)後、染色溶液は使用までの間、暗所に5°Cで保存した。天然植物プランクトンの染色方法はG.

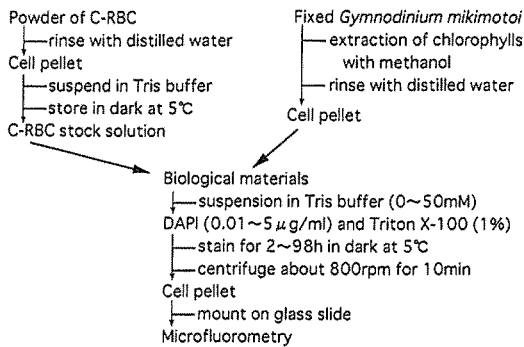


Fig. 1 Staining method for measuring nuclear DNA contents using microfluorometry.

*mikimotoi* のそれと同じである。

ここで行った染色条件は、トリス緩衝液濃度を 0 ~ 50 mM, 染色時間は 2 時間から 98 時間, DAPI の最終濃度 0.01 ~ 5 µg/ml である。染色時間の検討には C-RBC を用い、緩衝液濃度と DAPI の最終濃度の検討には、C-RBC と *G. mikimotoi* を用いた。染色溶液は約 800 rpm, 10 分間で遠心分離し、得た細胞粒をスライドグラスにのせ、カバーグラスをかぶせて乾燥を避けるためマニキュア封入し、試料とした。

## 2. 顕微蛍光分析

核内 DNA 量の測定には、落射型蛍光顕微鏡 (Nikon VFD-TR), TVカメラ (池上通信機 CTC-2600), TVモニター (池上通信機 PM-123T), 画像解析装置 (浜松ホトニクス株式会社 DVS-3000) からなる装置を用いた。測光フィルタとして、励起フィルタ IF 365 nm, 蛍光側フィルタ IF 480 nm, 吸収フィルタ LP 420 nm とダイクロイックミラー 400 nm (DM 400) を組み合わせた。励起光は 200 W の水銀ランプ (ウシオ, USH-200D) で得た。計測は 1 サンプルにつき 50 細胞とし、計測時間は 1 細胞あたり 2 から 3 秒で行った。

## 結 果

### 1. 緩衝液

0.5 µg/ml DAPI, 染色時間 24 時間における、蛍光強度は *G. mikimotoi* において C-RBC よりも約 30 倍であった (Fig. 2)。0 ~ 50 mM でのトリス緩衝液濃度範囲

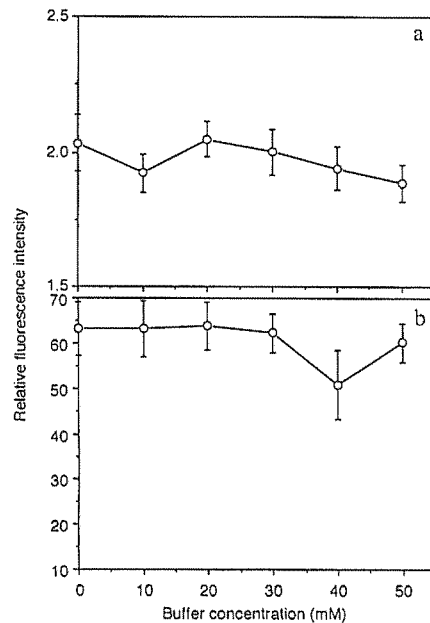


Fig. 2 Variation in DAPI-fluorescence intensity as a function of concentrations of Tris buffer in chicken blood cell (a) and *Gymnodinium mikimotoi* (b). Error bars denote two SDs. Cells were stained with 0.5 µg/ml of DAPI for 24 h.

では、C-RBC の蛍光強度は 20 mM で高く、CV では 0 mM でやや大きい (5.1%) が、それ以外は CV は小さく (3.3 ~ 4.3%), 調べた濃度間で大きな差は見られなかった (Fig. 2 a)。一方、*G. mikimotoi* では 40 mM 以上の濃度で蛍光強度が下がり (Fig. 2 b), *t* 検定の結果、30 mM と 40 mM では  $p < 0.01$ , 30 mM と 50 mM では  $p < 0.05$  で有意に低かった。

UV 励起光を連続して受けたときの蛍光強度の減衰は、C-RBC では 20 ~ 50 mM の濃度において小さく、特に 20 mM においては 10 秒間で 2.7% の減衰に過ぎず、60 秒後でも 20% の減衰であった (Fig. 3 a)。*G. mikimotoi* では C-RBC の結果と異なり、濃度間の差がほとんど見られず、10 秒後では蛍光の減衰はおきなかった (Fig. 3 b)。以上から、トリス緩衝液の濃度として 20 mM (10 ~ 30 mM で良好) が適当と判断された。

### 2. 染色時間

0.5 µg/ml DAPI, 20 mM トリス緩衝液における、C-RBC の染色時間の違いによる蛍光強度の変化を Fig. 4

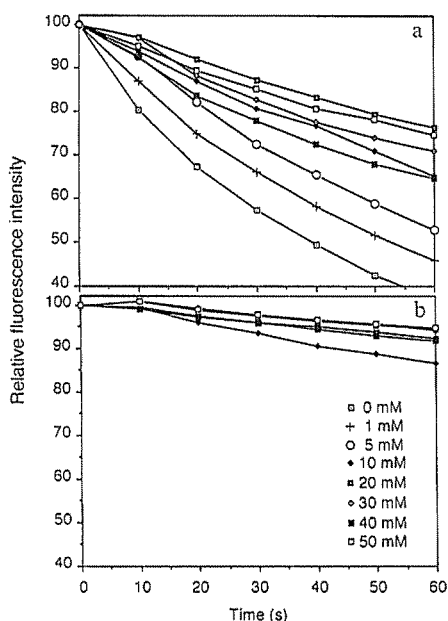


Fig. 3 Decay of DAPI fluorescence with time in chicken red blood cell (a) and *Gymnodinium mikimotoi* (b). Concentrations of Tris buffer was varied from 0 to 50 mM. Numbers indicate the concentrations in mM. Cells were stained with  $0.5 \mu\text{g/ml}$  of DAPI for 24 h.

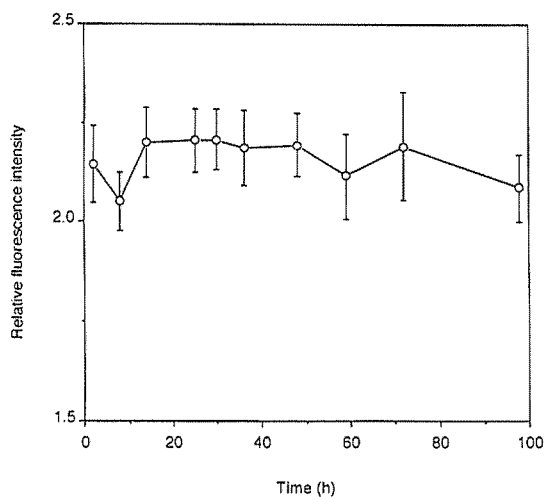


Fig. 4 C-RBC. Time course of DAPI fluorescence with staining time. Error bars denote two SDs. Cells were stained with  $0.5 \mu\text{g/ml}$  of DAPI and 20 mM of Tris buffer.

に示す。染色後14時間までは強度の増減が激しいが、その後一定した値を保ち、染色後48時間を過ぎると再び強度の増減が見られた。染色後14時間から30時間の間においては安定した値を示し ( $F_s=0.15 \text{ ns}$ ,  $P>0.05$ ), 高い強度が得られ, CV も小さかった (4.1~3.6%)。 *G. mikimotoi* でも同様に約10時間後から30時間までは蛍光強度は安定した。以上から, 染色時間は24時間とした。

### 3. DAPI 濃度

20 mM トリス緩衝液, 染色時間24時間において蛍光強度は DAPI 濃度に対して飽和型の濃度依存性を示した (Fig. 5a)。C-RBC では  $0.01 \mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度では核の蛍光が弱く, TV モニターに明瞭な像を写すことが困難であった。このため, 蛍光強度の CV は25.9%と大きかった。蛍光強度の変化は,  $0.5 \mu\text{g/ml}$  までは DAPI 濃度が増すにつれて急激に高くなったが,  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/ml}$  でやや緩やかになり,  $1 \sim 5 \mu\text{g/ml}$  の間では強度の増加は

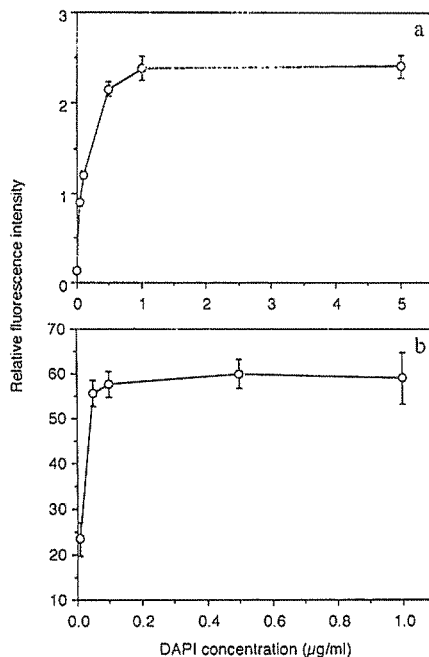


Fig. 5 Intensity of DAPI fluorescence as a function of DAPI concentration in chicken red blood cell (a) and *Gymnodinium mikimotoi* (b). Error bars denote two SDs. Cells were stained in 20 mM of Tris buffer for 24 h. Note scales of Y-axis are different between the two panels.

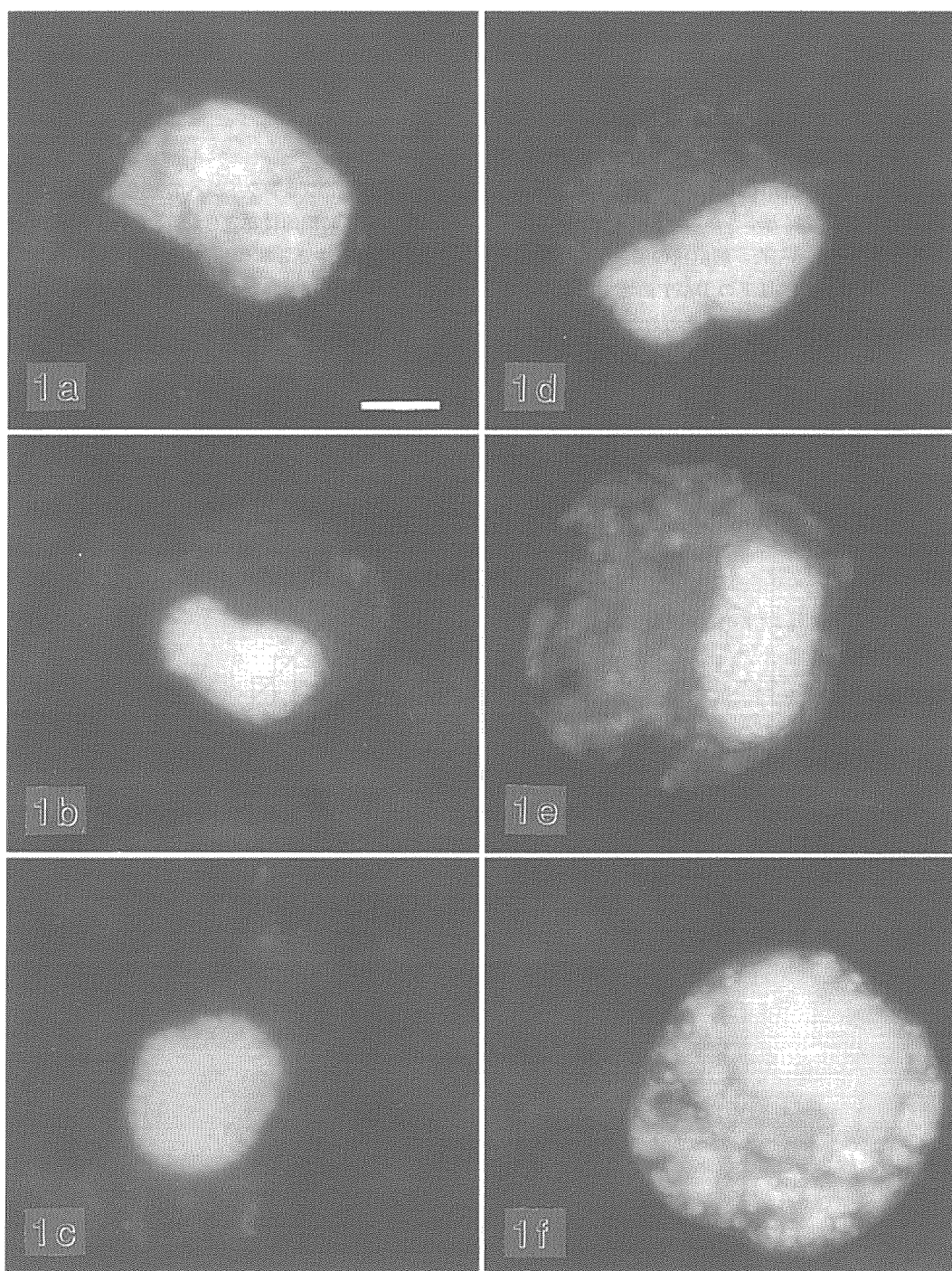


Photo 1. DAPI fluorescence of *Gymnodinium mikimotoi* stained in 20 mM of Tris buffer for 24 h with various concentrations of DAPI. The concentrations were 0.01 µg/ml (a), 0.05 (b), 0.1(c), 0.5(d), 1(e) and 5(f). Scale bar=10 µm.

見られなかった。0.01  $\mu\text{g/ml}$  以外の DAPI 濃度では CV は 3.8~5.5% と小さい値を示した。

*G. mikimotoi* では 0.01  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度でもはっきりとした像を得られたが、CV が 15.7% と大きかった (Fig. 5b)。蛍光強度の変化は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度では大きな変化は見られなかった。CV は 0.05~0.5  $\mu\text{g/ml}$  では 5.0~5.3% と小さかったが、1  $\mu\text{g/ml}$  では、9.8% と大きな値を示した。細胞核の染色状態をみると (Photo. 1), 0.5  $\mu\text{g/ml}$  以下の DAPI 濃度では測定上問題となるほどの蛍光が細胞質に認められないが (Photo. 1a~1d), 1  $\mu\text{g/ml}$  以上では細胞質に顕著な染色があり、

測光の際の背景閾値をあげる必要が生じ、このため大きな誤差の原因となった (Photo. 1e~1f)。5  $\mu\text{g/ml}$  に至っては細胞質と核の蛍光が分離できなくなり、測定不可能であった。

#### 4. 天然植物プランクトンへの適用

上記から、時間的に安定した蛍光強度を与え、減衰も少ない染色条件である 0.1  $\mu\text{g/ml}$  DAPI, 20 mM トリス緩衝液, 染色時間 24 時間で大槌湾より得た天然群集に対して染色を行った。優占種である中心目珪藻 *Thalassiosira hyalina* (Photo. 2) からえた蛍光強度ヒストグラ

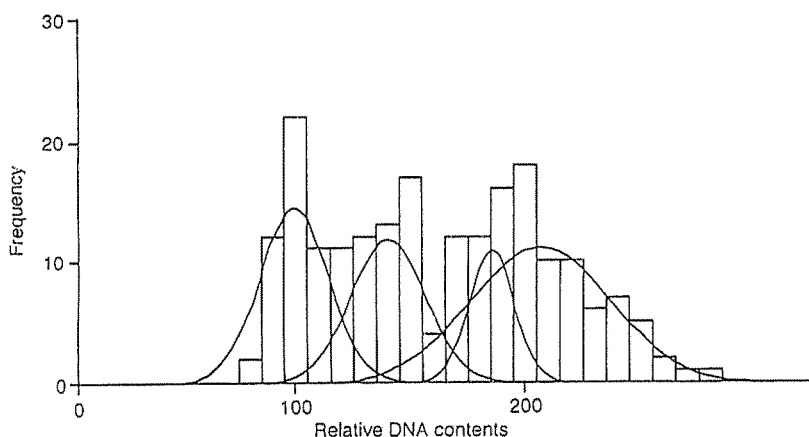


Fig. 6 Histogram of relative nuclear DNA contents of natural population of *Thalassiosira hyalina*. Four cohorts were identified, one at G1 phase, another at G2+M phase and the others at S phase.

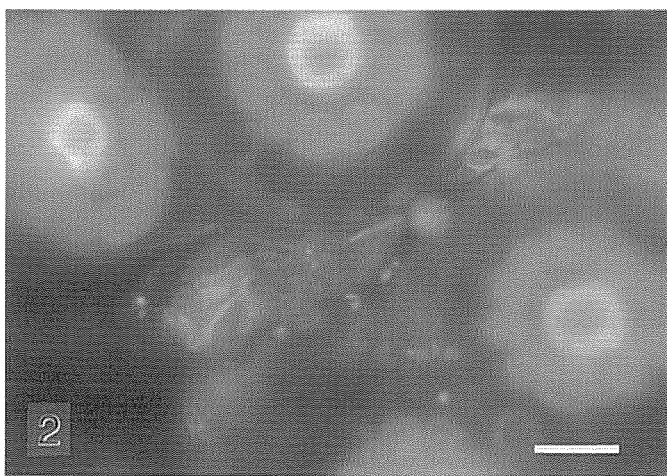


Photo 2. DAPI fluorescence of *Thalassiosira hyalina* (bright circles) stained with 0.1  $\mu\text{g/ml}$  of DAPI in 20 mM of Tris buffer for 24 h. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

ムに対して田中・堤のコホート解析プログラム<sup>13)</sup>を用いて細胞周期の各相の抽出を試みた (Fig. 6)。その結果 4 つのコホートが抽出された。各細胞長区間からえられた  $\chi^2$  値の合計は 13.85 ( $df=12$ ) であり、この抽出は有意な抽出であった ( $p<0.05$ )。当て嵌められた各ピークの細胞数の割合は全体に対して、DNA 含量の小さいほうから 25.3, 22.3, 13.0, 39.6% であり、そのピークの CV はそれぞれ 15.9, 12.0, 5.6, 15.1% であった。

## 考 察

DAPI 蛍光の測定には、落射型蛍光顕微鏡の UV 励起光を用いるが、連続した UV 光下では蛍光の減衰が起き、数秒間の画像の取り込みの際に蛍光強度が変化することが問題となる。このために、UV 光の照射時間の違いによって、DNA 量の測定に誤差が生じることが指摘される。CHANG and CARPENTER<sup>8)</sup> では McIlvaine 緩衝液を用いたが、彼らの方法では蛍光の減衰が著しく、C-RBC で、励起光照射後 60 秒で約 50% に低下した。この問題を克服するために、HAMADA and FUJITA<sup>10)</sup> のトリス緩衝液を用いた。この緩衝液は Tris (hydroxymethyl) aminomethane と 2-mercaptoethylamine hydrochloride に含まれる SH 基の作用により、蛍光の減衰が著しく抑えられると考えられている。HAMADA and FUJITA<sup>10)</sup> の試料はラットの肝細胞であり、本実験では試料の違いのためか同様な 2-mercaptoethylamine hydrochloride 添加の効果は得られなかったが、実際の測定に要する時間である数秒間では、C-RBC では緩衝液濃度が 20~50 mM、*G. mikimotoi* では全ての濃度で蛍光の減衰はほとんど無視できることが確かめられた。特に C-RBC で 20 mM の濃度においては、10 秒間でも 2.7% の減衰に過ぎず、強度の CV も 4.1% と小さい値が得られ、また *G. mikimotoi* でも安定した蛍光が得られたので、トリス緩衝液濃度は 20 mM が適当とした。HAMADA and FUJITA<sup>10)</sup> ではラットの肝細胞で 10 mM トリス緩衝液で良好な結果を得たが、植物プランクトン試料ではそれよりも高濃度が良いことになる。

DAPI 染色による蛍光強度は染色時間によって変動したが、染色後 14 時間から 30 時間の間では安定した蛍光が得られた。これは、YAMAGUCHI<sup>14)</sup> の得た結果 (24 時間) を支持する。CHANG and CARPENTER<sup>8)</sup> は染色後 1 時間後

の測定がよいとの結論を得たが、追試した結果、蛍光強度は不安定で 13 時間後で安定した。この違いの原因として用いた試料が異なることもあるが、我々の予備実験の結果では用いた緩衝液の組成と pH の違いが指摘される。本研究で得た染色法により長時間安定した蛍光が得られることから、種の同定をしながらの測定になるためより多くの時間を要する、天然植物プランクトン群集の DNA 量測定も本研究の方法で充分可能となる。

DNA 染色を行うにあたり、C-RBC では 0.01  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度で核の蛍光が弱く、TV モニターに明瞭な像を写すことが困難であり、このために蛍光強度の CV も大きくなる。このことから DNA 染色に要する DAPI 濃度は、0.05~5  $\mu\text{g/ml}$  が適当である。一方、*G. mikimotoi* では 0.01  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度で、CV は大きい明瞭な像が得られた。しかし、核以外の細胞質からの蛍光が見られ、1  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度ではそれがより強くなり、このため CV が大きくなったと考えられる。特に、5  $\mu\text{g/ml}$  の DAPI 濃度においては、細胞質が核と同程度の蛍光強度で染色され、細胞質と核の蛍光を分離することができなくなった。以上から、*G. mikimotoi* では、DNA 染色に要する DAPI 濃度は、0.05~0.5  $\mu\text{g/ml}$  が適当であると思われる。このような違いが得られた一因として、DAPI に対する細胞の特性、とくに細胞質の組成と、用いた細胞核の大きさの違いが考えられる。C-RBC の核は 5  $\mu\text{m}$  と小さく、*G. mikimotoi* の核は 20~30  $\mu\text{m}$  とかなり大きい。*G. mikimotoi* のように、植物プランクトンには細胞質が染色される細胞があり、こうした細胞では DAPI 濃度を上げて蛍光強度を高めると精度良く DNA を測定することが困難となる。また、細胞核の大きな細胞では、弱い蛍光でもはっきりとした像を得ることができるが、細胞核の小さな細胞では、蛍光が弱いとその像をはっきり捉えることが困難になる。*G. mikimotoi* のような渦鞭毛藻では比較的核が大きい、赤潮植物プランクトンとして重要な珪藻の *Skeletonema costatum* や、*Nitzschia pungens* などは、核が数  $\mu\text{m}$  と小さいので、高濃度の DAPI が必要となる。したがって、天然植物プランクトン群集を扱う場合、優占する種あるいは対象とする種の核の大きさにより、また細胞質の染色の程度により、DAPI 濃度を変えることが必要である。ただし、*Dinophysis* や *Gonyaulax* など鎧板の厚い種では、核の蛍光が鎧板に反射・散乱し、その程度が核からの蛍

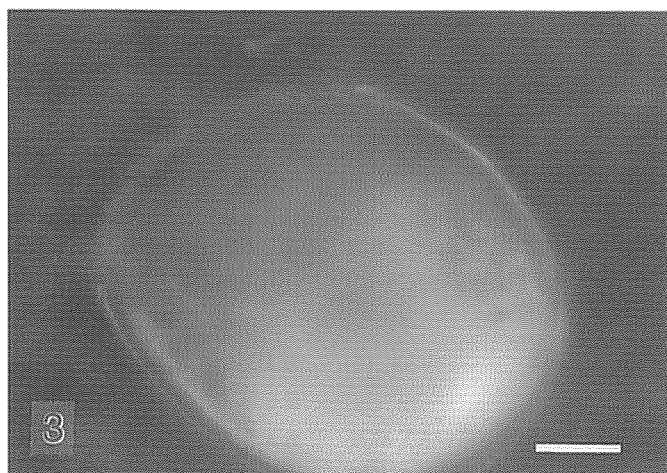


Photo 3. DAPI fluorescence of *Dinophysis* sp. Staining procedure was the same as Photo 2.  
Scale bar=10 $\mu$ m.

光に比べて無視しえないため、核からの蛍光を精度良く測定を行うことが難しい種もある (Photo. 3)。この点是对象とする種ごとに解決すべき問題点である。

*T. hyalina* では Photo. 2 に見られるように、核の周りの細胞質の染色の程度が大きいため、DAPI 濃度は 0.1  $\mu$ g/ml と低めに設定して行った。このときの *T. hyalina* の DNA 量分布からは、四つのコホートが抽出された (Fig. 6)。G2 期と M 期の DNA 含量はともに G1 期の 2 倍であることから、DNA 含量からでは両期を分離することはできないので両者を G2+M 期とする。DNA 量がもっとも小さいコホートが G1 期であることから、その倍の含量のコホートは G2+M 期に相当する。両コホートの間の 2 コホートは S 期にあった。以上から、Fig. 6 の *T. hyalina* 個体群では 25.3% の細胞が G1 期に、35.3% が S 期に、39.6% が G2+M 期にあったことになる。天然植物プランクトンは同調分裂していると考えられるので、このようなコホート抽出を 1~2 時間おきに 24 時間以上行うことで、その個体群の細胞周期ならびに増殖速度を求めることができる。

## 要 約

DAPI 染色による核内 DNA 量の測定を行うために、最適な DAPI 染色法を確立することを目的として、緩衝液、染色時間、DAPI 濃度に対する検討を行い、天然植

物プランクトン群集への応用を試みた。主要な結果は以下の通りである。

1. トリス緩衝液 (20 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 20 mM 2-mercaptoethylamine hydrochloride, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA-2Na, pH 8.2) を用いることで、励起光下での蛍光の減衰が抑えられることが確認された。
2. 14 時間から 30 時間の間に測定を行うことで、蛍光強度の経時変化は考慮する必要がなくなった。
3. 対象とする種によって、DAPI 濃度を変える必要がある。
4. 本研究で得た染色条件によって天然植物プランクトン群集に対して、細胞周期解析を行うことが可能である。

## 謝 辞

*Gymnodinium mikimotoi* 培養株は東京水産大学資源育成学科の石丸隆博士から分与して頂いた。大槌湾の採集では東京大学海洋研究所大槌臨海研究センターの皆様のご助力を頂いた。これらのかたがたに深く感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) WHITTAKER, R. W. (ed.) Communities and ecosys-



- tems, 2nd ed., Macmillan, New York, (1975).
- 2) STEEMANN NIELSEN, E. The use of radioactive carbon ( $C^{14}$ ) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 18: 117-140 (1952).
  - 3) GAARDER, T. and H. GRAN. Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord Rapp. et Prod-Verb., 42: 3-10 (1927).
  - 4) 古谷 研. 生物生産は何で決まるか. *科学*, 62: 669-674 (1992).
  - 5) VENRICK, E. L., J. R. BEERS, and J. F. HEINBOCKEL. Possible consequences of containing microplankton for physiological rate measurements. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 26: 55-76 (1977).
  - 6) HAGSTRÖM, Å., U. LARSSON, P. HÖRSTEDT, and S. NORMARK. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. environ. Microbiol.*, 37: 805-812 (1979).
  - 7) CARPENTER, E. J. and J. CHANG. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 43: 105-111 (1988).
  - 8) CHANG, J. and E. J. CARPENTER. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. II. DNA quantification and model verification in the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44: 287-296 (1988).
  - 9) OTTO, F. and K. C. TSOU. A comparative study of DAPI, DIPI, and Hoechst 33258 and 33342 as chromosomal DNA stains. *Stain Technol.*, 60: 7-11 (1985).
  - 10) HAMADA, S. and S. FUJITA. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry*, 79: 219-226 (1983).
  - 11) GUILLARD, R. R. L. and J. H. RYTHER. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8: 229-239 (1962).
  - 12) TAYLOR, I. W. and B. K. MILTHORPE. An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry. I. Unperturbed cell populations. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 1224-1232 (1980).
  - 13) 堤 裕昭・田中雅生. 体長頻度分布データからの世代解析, PROGEAN. BAS (MS-DOS N 88 BASIC). 東海区水産研究所数理統計部編「パソコンによる資源解析プログラム集」, p. 189-207 (1988).
  - 14) YAMAGUCHI, M. DNA synthesis and cell cycle in the noxious red-tide dinoflagellate *Gymnodinium nagasakiense*. *Mar. Biol.*, 112: 191-198 (1992).