

キリ変異拡大法の開発
 (県単課題 平成 11 年～平成 15 年度)

古川成治

目 次

要旨

はじめに -----	2
試験方法 -----	3
1 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの分類 -----	3
(1) マーカーの開発 -----	3
(2) 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの遺伝子構成の把握 -----	4
(3) 人工交雑および自然交雑個体の核ゲノム構成およびキリの遺伝構造の解析 --	5
2 育種面での若齢枯死現象の解明 -----	6
(1) 実生苗の近交弱勢の現象 -----	6
3 変異幅を拡げる手法の確立 -----	7
(1) 交雑の可能性 -----	7
(2) 交配した実生苗の生育特性 -----	8
結果と考察 -----	8
1 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの分類 -----	8
(1) マーカーの開発 -----	8
(2) 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの遺伝子構成の把握 -----	11
(3) 人工交雑および自然交雑個体の核ゲノム構成およびキリの遺伝構造の解析 -	12
2 育種面での若齢枯死現象の解明 -----	13
(1) 実生苗の近交弱勢の現象 -----	13
3 変異幅を拡げる手法の確立 -----	15
(1) 交雑の可能性 -----	15
(2) 交配した実生苗の生育特性 -----	16
おわりに -----	18
引用文献	

受理日 平成 16 年 5 月 31 日

要 旨

本県は、キリ材の全国1位の生産県である。最近、若齢木の枯死現象が見受けられ、植栽しても健全に生育しない状況が続いている。DNA分析の結果、人為的な育種の歴史を持つ会津桐は、遺伝的な変異幅が非常に狭いことがわかった。このため、胴枯れ性病害等の多発や若齢木の枯死現象に対処するには、変異幅を広げる必要があると思われた。変異の幅が狭いことと若齢木の枯死現象が結びつくのか解明するとともに、変異幅を広げる手法を開発し、健全に育つ苗木の創出を試みた。

日本に植栽されているキリについて、変異幅の狭い理由を調査した結果、自殖による影響があることが確認された。また、幼齢木の段階での枯損原因の一つとして、分根の繰り返しによる苗の劣化現象、実生苗の近交弱勢の影響による枯損があることが明らかになった。

日本産キリは、葉緑体DNAで識別される2つの系統があり、これらを交配することにより、変異の幅が若干広がることが確認できた。さらに、これらの実生苗を用いることで近交弱勢の影響を取り除けることを確認した。

はじめに

本県のキリについて、変異の幅の狭い理由を明らかにするとともに、健全な苗の育成および諸危害に対する抵抗性を付与するために、交配、細胞選抜等による変異の幅を広げる手法を開発し、適正に管理を行えば健全に育つ苗木の創出を目的とした。

キリは分類学上、ゴマノハグサ科、キリ属 (*Paulownia* SIEB. et ZUCC.) に属している⁽³⁾。東北地方には、古くからのキリの産地があり、在来種としてニホンギリ (*Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud.) とチョウセンギリ (*Paulownia coreana* UYEKI) の2種が植えられているが、このうち会津桐を代表する種はチョウセンギリであるといわれている⁽⁹⁾。

しかし、最近では病害虫による被害及び若齢木の生育不良現象が見受けられ、良いキリ林がなくなってきている。キリの場合、土壌条件の悪いところでは生育せず、病虫害に弱いといった性質をもつため、まとまった天然林はなく^(7,8)、そのほとんどは人工林である。

そこではじめに、苗木生産の大部分が無性繁殖の分根法で行っていることによる、遺伝的に均一な構造をしているためと考えられるが、キリの遺伝的性質を明らかにする研究はほとんどない⁽¹⁰⁾。このため、キリの保全および育種を考えていく上で、現在植えられているキリの遺伝構造の把握を行った。

次に、キリは九州から本州を経て北海道にまで分布し、5月上旬から約1ヵ月間花を咲かせる。一斉に開花せず、一つの花序では大きい蕾から順番に開花し、約2週間で全部開花する。キリの花は両性花であり1個の雌ずいと4個の雄ずいからなっている。このうち、2個の雄ずいは花糸が長く、葯が雌ずいの柱頭に接している。雌ずいの柱頭は、先端に穴があり、内部には直径0.65mmの空洞(花粉室)になっている。満開期には柱頭口から受粉液が分泌し、受粉した花粉はこの穴から内部へ吸収されて花粉室で発芽するといわれている⁽⁴⁾。葯が雌ずいの柱頭に接している個体が多いが、中には雌ずいが長く葯と接していない個体も見受けられた。

両性花や雌雄同株では必ずしも他の個体から花粉を受け取る必要はなく、自殖することも可能である。広葉樹の自殖に関しては、自家不和合性の有無が問題となるが、自家不和合性を持つ種の多くは、自家不和合性が完全には機能しないために部分的に自殖を行うものと考えられている。

キリの場合には、両性花であり、雌雄同時に成熟するため、自家受粉を避ける機構はないと考えられる。さらに、チョウセンギリは柱頭と葯が接しており、高い頻度で自家受粉や隣家受粉を行っているものと考えられる。

近親交配は有用遺伝子の集積、特定遺伝子のホモ化、あるいは有害遺伝子の集団からの排除などには有効な手段である。しかし、林木では近親交配により種子の稔性、生存率、成長、その他の形質で弱勢化することが多い。

針葉樹の近交弱勢については、これまでにいくつかの樹種で弱勢の発現について報告がある。それによれば、1～3年生の幼苗期には弱勢がほとんど認められず、年次とともに弱勢が発現し、顕在化するものもあれば、比較的早くから弱勢が発現するものも観察されている。近親交配による弱勢は、温室内など生育に適した環境のもとでは発現しにくいともいわれており、近交弱勢の発現機構を知る上で、弱勢の発現と環境条件との関係を詳細に把握する必要がある。

さらに、交雑育種では種のもつ特性を有効に利用するため、それらの遺伝子の導入を図り、変異の幅を広げるとともに、諸危害に対する抵抗性種を創り出すことを可能としている。これまで、キリ属の交雑については報告がほとんどなく⁽¹⁾、種間における生殖的不和合性、すなわち、交雑の可能性を明らかにしておくことは、キリの育種を進める上で重要と考えられる。

そこで、種間交雑および系統間交雑の可能性と、創り出された雑種個体の生育状況について調査した。また、これらの変異幅を推定した。

最後に総合考察として、育種でできることの限界点について触れた。

試験方法

1 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの分類

東日本に植えられているキリの遺伝構造を明らかにするために、次に示す3種の実験を行った。

(1) マーカーの開発(RAPDマーカーの遺伝分析)実験

マーカーの開発を行うに当たりRAPDマーカーの遺伝様式を調べた。RAPDマーカーの遺伝様式を推定するために、福島県林業研究センター(以下研究センター)に植えられている6個体を交雑親として用い(表-1)、作出した3交配家系から種子を採取した。交配し得られた種子は、温室内で発芽させ、苗高10cm程度に成長した時点の葉をDNA分析用の材料とし、分析に供するまで-20℃で保存した。1交配家系につき幼植物体60個体を材料とした。

今回供試したRAPDマーカーは、オペロン社製のプライマーを用いてスクリーニングをした、表-1の14プライマー、15個の仮想的遺伝子座である。

表-1 RAPD分析に使用したプライマーと交配組み合わせおよび各供試個体のRAPD構成

交配 組み合わせ	供試個体	各プライマーによる増幅結果							
		OPS-1 950	OPS-1 1750	OPO-4 1100	OPI-1 1220	OPO-9 1040	OPQ-20 1500	OPR-19 2200	OPH19 1400
A	F - A1	+	-	+	+	+	+	+	+
	F - A2	-	+	-	-	-	-	-	-
B	F - B1	+	-	+	+	+	+	+	+
	F - B2	-	-	-	-	-	-	-	-
C	F - A3	+	-	+	+	+	+	+	+
	F - A4	-	-	-	-	-	-	-	-

交配 組み合わせ	供試個体	各プライマーによる増幅結果						
		OPR-16 750	OPJ-16 1420	OPJ-17 660	OPR-17 1650	OPR-4 1250	OPA-11 1700	OPS-3 1050
A	F - A1	+	+	+	+	+	+	+
	F - A2	-	-	-	-	-	-	-
B	F - B1	+	+	+	-	+	-	+
	F - B2	-	-	-	-	-	+	-
C	F - A3	+	+	+	-	+	-	+
	F - A4	-	-	-	-	-	-	-

+ ,バンドあり;- ,バンドなし

RAPDマーカーは、通常、優性マーカーであることから、ヘテロと優性ホモが区別できない。しかし、片方の親の遺伝子型がヘテロで、もう片方の親が劣性ホモの個体を交配した場合、両性遺伝する核DNA由来のバンドであればメンデル遺伝に従って、子供で1:1に分離することが予想される。この方法を利用し、バンドの観察された分離比と、メンデルの法則から期待される分離比(1:1)との適合性検定を²検定により行った。なお、同じバンドが分離する家系が二つ以上ある場合は、不均一性の検定を行い、家系間で観察分離比にばらつきがないことを確かめた後、それらの観察比を合計した値を用いて適合性検定を行った。また、RAPDマーカー間の連鎖分析については、バンドの観察された分離比と、独立の法則から期待される分離比(1:1:1:1)との適合性検定を、²検定により行った。なお、同じバンドが分離する家系が二つ以上ある場合は、不均一性の検定を行い、家系間で観察分離比にばらつきがないことを確かめた後、それらの観察比を合計した値を用いて適合性検定を行った。なお、OPO-4/1100、OPO-9/1040、OPQ-20/1500、OPJ-16/1420、OPJ-17/660の遺伝子座については、核DNA由来のマーカーを検索する際に、分離比が偏った1家系のデータははじめから除いた。

(2) 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの遺伝子構成の把握(実験)

東日本地域、青森県 3 市町、岩手県 5 市町村、秋田県 5 市町村、宮城県 2 町、山形県 5 市町村、福島県 9 市町村、茨城県 3 市町、栃木県 3 市町、群馬県 4 市町村、新潟県 4 市町村、合計 10 県 43 市町村 (図 - 1) から収集したキリ 820 個体の葉を材料として、葉緑体ゲノム型と核ゲノム構成を調査した。材料の収集は、人為的に植えられているものを採取し、1つの畑からは多くて2本までとした。核ゲノム構成については、遺伝子分析により明らかとなった核 DNA 由来で、かつ、それぞれ独立に遺伝する OPS-1 /1750、OPI-1 /1220、OPQ-20/1500、OPR-16/750、OPA-11/1700、OPJ-17/660、OPR-4 /1250 の 7 つの遺伝子座を用いた。さらに、葉緑体ゲノム型については、matK 遺伝子領域の PCR-RFLP 法を用いた。



図 - 1 供試個体の採取地

(3) 人工交雑および自然交雑個体の核ゲノム構成およびキリの遺伝構造の解析 (実験)

(a) 実験 により定義付けを行った核ゲノム型 11111 型と 00000 型との人工交雑個体の核ゲノム構成を調査するために、3 つの組み合わせで正逆交雑を実施し、種子を採取した。種子は温室内で発芽させ、苗高 10cm 程度に成長した時点の葉を DNA 分析用の材料とし、分析に供するまで - 20 で保存した。1 組み合わせあたり 60 個体の幼植物体を材料として供試し、核ゲノム構成を調査した。

(b) 11111 型及び 00000 型の自然受粉個体の核ゲノム構成を調査するために、核ゲノム構成 11111 型・00000 型の混在している林分において、3 林分から各型 2 個体ずつ、合計 6 個体を選出し、その個体から種子を採取した。種子は温室内で発芽させ、苗高 10cm 程度に成長した時点の葉を DNA 分析用の材料とし、分析に供するまで - 20 で保存した。1 個体につき幼植物体 30 個体を材料として供試し、核ゲノム構成を調査した。

(a) (b) 共に、各個体毎に不均一性の検定を行い、観察分離比にばらつきがないことを確かめた後、それらの観察比を合計した値を用いた。

DNA 分析方法

(a) 全 DNA の抽出

葉からの全 DNA の抽出は、CTAB 法⁽²⁾を改良して行った⁽¹⁰⁾。

(b) RAPD 分析

全 DNA を鋳型 DNA として RAPD 分析を行った。RAPD 分析における PCR の条

件等については、古川⁽¹⁰⁾の方法に従った。得られたPCR産物は、2%アガロ - スゲルとTAEバッファーを用いて50Vで1時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、UVトランスイルミネ - タ - 上で観察した。電気泳動槽は、Mupidを用いた。

(c) 葉緑体DNAのPCR-RFLP法

得られた全DNAを鋳型としてPCRにより葉緑体DNA上のmatK遺伝子を増幅した。増幅したPCR産物を用いて、Alu及びEcoRの2種類の制限酵素によりRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析を行った。PCR-RFLP分析における条件等については、古川⁽¹⁰⁾の方法に従った。制限酵素により消化したDNA断片は、2%アガロ - スゲルで50V1時間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色しUVトランスイルミネ - タ - 上で観察した。

2 育種面での若齢枯死現象の解明

(1) 実生苗の近交弱勢の現れ方

本報告では、実際にキリの人工交配を行うことにより自殖の可能性を推定した。また、近交弱勢の発現機構を知るうえで、近交弱勢の発現と環境条件との関係について調査した結果を報告する。

(a) 自殖の可能性

本研究に供試した種は、チョウセンギリで、研究センター内に植栽されている4個体(A、B、C、D)を用いた。

交雑は四組の人工自家受粉と、二組の他家受粉を実施した。二組の他家受粉はチョウセンギリAとチョウセンギリBの正逆交配である。説明の便宜上、この二組の種内交雑のうち、チョウセンギリA()×チョウセンギリB()を他殖Aとし、チョウセンギリB()×チョウセンギリA()を他殖Bとする。また、四組の自家受粉は母樹ごとに自殖A、自殖B、自殖C、自殖Dとした。交配は、2000、2001年の2回行った。なお、自殖Dについては、2000年の12月に枯損したため、2001年の試験には用いてない。

交配に用いる花粉は、チョウセンギリ4個体から5月中旬に、それぞれ雄花を採取して収集した。収集した花粉は、精選後、交配に用いるまで5の冷蔵庫で保存した。採取した花粉は、両樹種とも培養床において90%以上の発芽率であり、高い稔性を示した。

交配の方法は飯塚⁽¹⁾の報告を参考にし、5月下旬から6月中旬の間に花粉を雌しべに直接綿棒で塗るように5回行い、さく果を10月中旬に採集した。交配袋は5月下旬に袋を掛け、交配が終了し、花が咲き終わった6月下旬に袋をはずした。交配袋は、1種子親につき2袋かけた。2000年の人工交配では、自殖AからDは、雌花数32~35個ごとに1袋で計2袋、他殖Aは、雌花数35個ごとに1袋で計2袋掛けた。他殖Bは、雌花数34、35個に各1袋掛けた。2001年度の人工交配では、自家受粉AからCは、雌花数33~35個ごとに1袋で計2袋、他殖Aは、雌花数33、34個に各1袋掛けた。他殖Bは、雌花数34個ごとに1袋で計2袋掛けた。

2000年の自殖によるさく果をそれぞれ18、23、1、0個、他殖によるさく果をそれぞれ27、28個すべて採集した。2001年の自殖によるさく果をそれぞれ13、11、0個、他殖によるさく果をそれぞれ16、24個すべて採集した。さく果形成率、1さく果あたりの種子の数、成苗率は古川⁽¹⁸⁾の報告を参考にした。さく果形成率は、受粉時における雌花数と採集時におけるさく果数との比率で表した。採集したさく果は風乾して種子を収集し、

1 さく果毎に種子の生重量を測定した。100 個当たりの種子の重量を 4 回測定し、これを基準に 1 さく果あたりの種子数を推定した。種子はまきつけの直前まで、5 日の冷蔵庫で保存した。発芽数は 9 cm のシャーレに 1 % の素寒天培地を 20ml 分注し、まきつけ個数は 1 シャーレあたり 100 個とした。発芽率は播種後 21 日目の発芽数によって求めた。培養は、22 ± 2 °C の照明付き培養室内で行った。

チョウセンギリの自殖可能度は、山本ら^(12, 13)が提案している推定式を参考にして求めた。山本らが提案した式は、自殖可能度 (%) = 自家受粉結果率 / 他家受粉結果率 × 自家受粉球果あたりのタネ数 / 球果あたりのタネ数 × 自家受粉充実率 / 他家受粉充実率 × 自家受粉真正発芽率 / 他家受粉真正発芽率 × 自家受粉成苗率 / 他家受粉成苗率 × 100 のとおりである。キリの場合には、種子が細かく充実率が測定できなかったため、充実率と真正発芽率を別々に測定するのではなく、無作為に抽出した種子を用いて発芽率を求めることで代用した。また、成苗率に関しては、環境条件によって左右されるため、データに含めなかった。このことから、自家受粉のさく果形成率、1 さく果当たりの種子数、発芽率を基準として、自殖可能度を算出した。

(b) 環境条件別試験

近交弱勢の発現機構を知るうえで、弱勢の発現と環境条件との関係を詳細に把握することは重要である。そこで、温室内と温室外で管理することにより、環境条件と近交弱勢の関係を調査した。

まきつけは、2001 年 4 月 10 日、2002 年 4 月 11 日に研究センターの温室内で行った。材料は、自殖 A、自殖 B、他殖 A、他殖 B の 4 家系とし、まきつけ床には直径 3.5 cm のジフィー 9 を用い、種子を 1 粒ずつまきつけた。また、発芽した個体すべてを直径 9 cm のビニールポットに移植し、2001、2002 年ともに 6 月 22 日現在で、苗高 10cm 以上に成長している個体について試験に用いた。6 月 22 日まではすべての苗について温室内で育成した。試験区は、温室内と温室外の 2 種類にわけ、各家系 12 個体とし、3 回の反復をもうけた。生存数の調査は、2001 年は 10 月 20 日、2002 年は 10 月 15 日に行った。

3 変異の幅を拡げる手法の確立

(1) 交雑の可能性

本研究に供試した種は、キリ、型の 2 系統と台湾ウスバギリである。キリ 2 系統には研究センター内に植栽されているキリ 型には A、B の 2 個体を用い、キリ 型には C、D の 2 個体を用いた。台湾ウスバギリには群馬県勢多郡東村に植栽されている 1 個体を用いた。

交雑は一組の種間交雑と、二組の種内交雑、二組の種内 (系統間) 交雑を実施した。種間交雑はキリ 型 A × 台湾ウスバギリであり、二組の種内交雑はキリ 型 A とキリ 型 B との相互交配である。二組の種内 (系統間) 交雑はキリ 型 A × キリ 型 C とキリ 型 B × キリ 型 D である。説明の便宜上、この二組の種内交雑のうち、キリ 型 A × キリ 型 B を種内交雑 とし、キリ 型 B × キリ 型 A を種内交雑 とする。また、二組の種内 (系統間) 交雑はキリ 型 A × キリ 型 C を系統間交雑 とし、キリ 型 B × キリ 型 D を系統間交雑 とする。

交配に用いる花粉は、先に述べた台湾ウスバギリ 1 個体から 2000 年 5 月初旬に、同じくキリ 4 個体から 2000 年 5 月中旬に、それぞれ雄花を採取して収集した。収集した

花粉は、精選後、交配に用いるまで5 日の冷蔵庫で保存した。採取した花粉は、両樹種とも培養床において90 %以上の発芽率であり、高い稔性を示した。

交配の方法は飯塚⁽¹⁾の報告を参考にし、2000 年5月中旬から6月下旬の間に花粉を雌しべに直接綿棒で塗るように5回行い、さく果を10月中旬に採集した。交配袋は5月中旬に袋を掛け、交配が終了し、花が咲き終わった6月下旬に袋をはずした。交配袋は、1種子親につき2袋かけた。種内交雑 は、雌花数35 個ごとに1袋で計2袋掛けた。種内交雑 は、雌花数34、35 個に各1袋掛けた。系統間交雑 は、雌花数34、35 個に各1袋掛けた。系統間交雑 は、雌花数34 個ごとに1袋で計2袋掛けた。種間交雑には雌花数36 個ごとに1袋で計2袋掛けた。

種内交雑によるさく果をそれぞれ27、28 個、系統間交雑によるさく果をそれぞれ27、29 個、種間交雑によるさく果を30 個すべて採集した。さく果形成率は、受粉時における雌花数と採集時におけるさく果数との比率で表した。採集したさく果は風乾して種子を収集し、1さく果毎に種子の生重量を測定した。100 個当たりの種子の重量を4回測定し、これを基準に1さく果あたりの種子数を推定した。種子はまきつけの直前まで、5 日の冷蔵庫で保存した。まきつけは、2001 年4月初旬に当研究センターの温室内で行った。まきつけ床には直径3.5 cmのジフィー9を用い、300 粒無作為に抽出した種子を1粒ずつまきつけた。発芽数は数日おきに観察、記録し、発芽率は播種後30 日目の発芽数によって求めた。また、発芽した個体すべてを直径9 cmのビニールポットに移植し10 月まで生存していた個体を成苗数とし、成苗率を求めた。

種間交雑および系統間交雑の可能性を、山本ら^(12,13)が提案している推定式を参考にして求めた。山本らが提案した式は、交雑可能度(%) = 種間交雑結果率 / 種内交雑結果率 × 種間交雑球果あたりのタネ数 / 種内交雑球果あたりのタネ数 × 種間交雑充実率 / 種内交雑充実率 × 種間交雑真正発芽率 / 種内交雑真正発芽率 × 種間交雑成苗率 / 種内交雑成苗率 × 100 のとおりである。キリの場合には、種子が細かく充実率が測定できなかったため、充実率と真正発芽率を別々に測定するのではなく、無作為に抽出した種子を用いて発芽率を求めることで代用した。このことから、種内交雑のさく果形成率、1さく果当たりの種子数、発芽率、成苗率を基準として、種間交雑の相対的な交雑可能度を算出した。

(2) 交配した実生苗の生育特性

種間交雑および系統間交雑によって生産された苗木の生育状況を、種内交雑および花粉親の苗木と比較し、その特徴を調べるために発芽試験は別にジフィー9に播種した。発芽した個体を直径9 cmのビニールポットに移植し、苗高10cm 以上に成長している個体について、2001 年6月22 日に株・列間ともに1 mの植栽間隔で苗畑に定植した。対照として種内交雑(、)の2種類の苗木を用いた。種間交雑の花粉親である台湾ウスバギリの苗木は人工交雑個体ではなく、花粉を採取した個体と同一の個体から自然受粉によって得られた個体とした。調査は、2001 年の7月20 日、8月20 日、9月20 日、10月20 日に、それぞれ27 ~ 30 個体の全供試木について苗高を測定し、苗高については分散分析を実施した。

結果と考察

1 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの分類

(1) マーカーの開発(RAPDマーカーの遺伝分析)(実験)

今回供試した 3 家系ともに交配は正常に行われ、発芽率は 90 % 以上であった。また、15 個の遺伝子座のうち OPS- 3 /1050bp の 1 つの遺伝子座を除き、バンドの分離が観察された (図 - 2)。

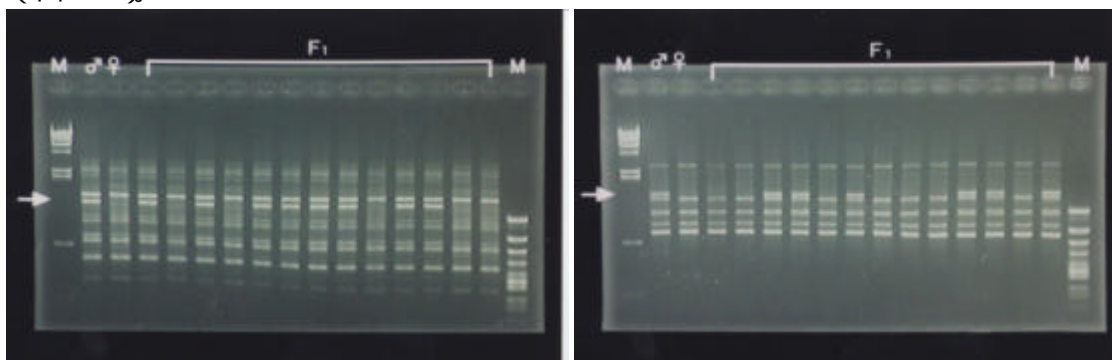


図 - 2 RAPD 分析泳動像

遺伝子分析の結果を表 - 2 に示す。OPS- 1 /950、OPI- 1 /1220、OPR-19/2200、OPH-19/1400、OPR-16/750、OPR-4 /1250 のバンドパタ - ンが 3 家系で分離し、適合性検定の結果、観察された分離比は期待分離比に適合した。

OPS- 1 /1750、OPA-11/1700 のバンドパタ - ンが 1 家系で分離し、適合性検定の結果、観察された分離比は期待分離比に適合した。OPR-17/1650 のバンドパタ - ンが 1 家系で分離し、適合性の検定を行なったところ、5 % レベルで有意な値を示し、期待分離比に適合しなかった。

OPO- 4 /1100、OPO- 9 /1040、OPQ-20/1500、OPJ-16/1420、OPJ-17/660 のバンドパタ - ンが 3 家系で分離した。これら 3 家系間の不均一性の検定を行ったところ、1 % 水準で有意な値を示した。これは、このうちの 1 家系で観察された分離比の偏りが 1 % 水準で有意であったためである。この 1 家系を除く他の 2 家系の観察値を合計した値で適合性検定を行ったところ、観察された分離比は期待分離比に適合した。OPS- 3 /1050 のバンドパターンについては母性遺伝をすることが確認され、細胞質 DNA 由来のマ - カ - であると想定された。

以上の結果、今回調査した 15 仮想的遺伝子座のうち、期待分離比に適合しなかったのは、OPR-17/1650 と OPS- 3 /1050 の 2 つの遺伝子座であった。残りの 13 遺伝子座については両性遺伝を行う核 DNA 由来のマ - カ - であると判明した。

表-2 キリ交配家系におけるRAPDマーカーの分離

プライマー	サイズ (bp)	家系数	交配 組合せ	観察分離数 + :-	2検定	有意差*
OPS-1	950	3	A+B+C	92 :88	0.09	ns
OPS-1	1750	1	A	26 :34	1.07	ns
OPO-4	1100	3	A+B+C	72 :108	7.20	P < 0.01
			B+C	54 :66	1.20	ns
OPO-9	1040	3	A+B+C	65 :115	13.90	P < 0.01
			B+C	52 :68	2.10	ns
OPI-1	1220	3	A+B+C	84 :96	0.80	ns
OPQ-20	1500	3	A+B+C	72 :108	7.20	P < 0.01
			B+C	54 :66	1.20	ns
OPR-19	2200	3	A+B+C	95 :85	0.56	ns
OPH-19	1400	3	A+B+C	95 :85	0.56	ns
OPR-16	750	3	A+B+C	95 :85	0.56	ns
OPR-17	1650	1	A	21 :39	5.40	P < 0.05
OPJ-16	1420	3	A+B+C	69 :111	9.80	P < 0.01
			B+C	53 :67	1.63	ns
OPJ-17	660	3	A+B+C	69 :111	9.80	P < 0.01
			B+C	53 :67	1.63	ns
OPR-4	1250	3	A+B+C	92 :88	0.09	ns
OPA-11	1700	1	B	35 :25	1.67	ns
			A	0 :60	-	
OPS-3	1050	3	B	0 :60	-	
			C	60 :0	-	

* ,ns : 有意差なし ; P < 0.01 : 危険率 1%水準で有意

P < 0.05 : 危険率 5%水準で有意

また、核DNA由来のマーカーであると判明した 13 遺伝子座について連鎖分析を行ったところ、OPS-1/950 と OPR-4/1250、OPJ-16/1420 と OPJ-17/660、OPO-4/1100 及び

OPQ-20/1500 と OPO-9 /1040、OPR-19/2200 及び OPH-19/1400 と OPR-16/750 という組み合わせで期待分離比に適合せず、連鎖関係が見つかった（表 - 3）。

表 - 3 RAPDマーカー間の連鎖関係

RAPDマーカー Locus A - Locus B	家系数	観察分離数				2検定 * 連鎖群
		A+B+	A+B-	A-B+	A-B-	
OPS-1 - OPR-4	3	92	:0	:0	:88	180.2 **
OPO-4 - OPQ-20	2	54	:0	:0	:66	122.4 **
OPO-4,OPQ-20 - OPO-9	2	48	:6	:4	:62	86.7 **
OPR-19 - OPH-19	3	95	:0	:0	:85	181.1 **
OPR-19,OPH-19 - OPR-16	3	95	:0	:0	:85	181.1 **
OPJ-16 - OPJ-17	2	53	:0	:0	:67	123.3 **

* ,独立遺伝を行っていると仮定した場合の期待分離比 (1:1:1:1)との適合性検定

** ,危険率 1% 水準で有意

(2) 東北およびその周辺地域に植栽されているキリの遺伝子構成の把握 (実験)

表 - 4 東北及びその周辺地域に植栽されているキリの DNA 分子マーカーによる分類

	葉緑体 DNA		核 DNA の RAPD 分析						個体数	
	PCR-RFLP		OPS-1	OPA-11	OPR-4	OPI-1	OPQ-20	OPR-16		OPJ-17
	mat K型		1750	1700	1250	1220	1500	750		660
A-1	型	-	+	+	+	+	+	+	+	124
A-2	型	+	+	+	+	+	+	+	+	84
A-3	型	-	-	+	+	+	+	+	+	20
A-4	型	+	-	+	+	+	+	+	+	8
A-5	型	+	-	-	-	+	+	+	+	6
A-6	型	-	-	+	+	+	+	+	-	1
A-7	型	+	-	+	-	+	+	+	+	1
A-8	型	+	+	+	-	-	+	+	+	1
A-9	型	-	+	+	+	-	-	+	+	1
A-10	型	+	+	-	-	+	+	+	+	1
A-11	型	-	+	-	+	-	-	+	+	1
B-1	型	+	+	-	-	-	-	-	-	264
B-2	型	-	+	-	-	-	-	-	-	148
B-3	型	-	-	-	-	-	-	-	-	104
B-4	型	+	-	-	-	-	-	-	-	56

+ ,バンドあり;- ,バンドなし

東日本に植えられているキリの遺伝子構成について調査した結果を表 - 4 に示した。会津地方の分類⁽¹⁰⁾と同様に、葉緑体 DNA 上の matK 遺伝子の PCR-RFLP 法により

識別のできる型と型の2つのタイプに分類された。制限酵素処理で2つの断片になるものを型とし、制限酵素処理で切断できず、1本のバンドのものを型とした。型が248個体、型が572個体で、全体の約70%が型であった。

次に、核DNA組成を調べるために、それぞれ独立に遺伝をしている7つの遺伝子座を用い、多型的座位におけるバンドの有無に基づき、各表現型を分類した。型ではA-1からA-11の11タイプ、型ではB-1からB-4の4タイプに分類され、合計15タイプに分類された。

7つの遺伝子座のうち、型、型に共通して出現する遺伝子座がOPS-1/1750、OPA-11/1700の2つ、型にだけ出現し、型に見られない遺伝子座はOPR-4/1250、OPI-1/1220、OPQ-20/1500、OPR-16/750、OPJ-17/660の5つである。型にだけ出現する5つの遺伝子座をすべて持っている個体を11111型とし、一つも持っていない個体を00000型、その他の型を組み替え型として整理し直してみると(表-5)、型では11111型が236

個体、00000型が0個体、組み替え型が12個体であり、全体の95.2%は11111型であった。また、型では00000型が572個体、11111型と組み替え型はまったく出現しなかった。この結果、葉緑

表-5 葉緑体ゲノム型および核ゲノム構成別の個体数

葉緑体ゲノム型	核ゲノム構成		
	11111型	00000型	組み替え型
型	236	0	12
型	0	572	0

体ゲノム型と核ゲノム構成との間には一定の対応関係があり、全供試個体の98%は、葉緑体ゲノム型と核ゲノム構成が一致していた。さらに、葉緑体ゲノム型と核ゲノム構成とが一致していない個体の出現率が2%であった。このことから、東日本には由来の違う2つの系統が植えられており、この2つの系統は、ほとんど混じり合っていないことが確認された。

(3)人工交雑および自然交雑個体の核ゲノム構成およびキリの遺伝構造の解析(実験)

では、なぜこの2つのタイプのキリは、混じり合っていないのだろうか、今回用いている核DNA上のマーカーは、それぞれ独立に遺伝することが確認されている。すなわち、11111型の遺伝子型がホモの場合には、11111型と00000型とで交配が起こっても、すべて11111型となってしまう組み替えが生じないが、11111型の遺伝子型がヘテロであれば他殖、自殖に関係なく、11101型はもちろんのこと、10101型、11001型などありとあらゆる組み合わせの組み替え型が生じるはずである。このことを確かめるために、11111型と00000型の正逆交雑を実施し、子供の表現型を調べた。さらに、11111型と00000型が混在している林分において、自然交雑種子の表現型を調査した。

11111型と00000型の正逆交雑及び自然交雑種子の分析結果を表-6に示した。まず、11111型 × 00000型 の場合には、11111型が8個体、00000型が3個体、組み替え型が169個体と組み替え型が全体の93.9%を占めた。また、00000型 × 11111型 の場合には、11111型が7個体、00000型が1個体、組み替え型が172個体と組み替え型が全体の95.6%を占めた。さらに、11111型の自然交雑種子の場合には、11111型が12個体、00000型が3個体、組み替え型が165個体と組み替え型が全体の91.7%を占めた。

また、00000型の自然交雑種子の場合には、11111型及び組み替え型が0であり、00000

型が180個体とすべて00000型であった。

人工交配の結果は、2つの系統間では遺伝的障壁はないことを示した。自然受粉下では、型から型への遺伝

表-6 人工交雑および自然交雑個体における核ゲノム構成

交配組み合わせ	調査 個体数	核ゲノム構成		
		11111型	00000型	組み替え型
11111型 × 00000型	180	8	3	169
11111型 × 00000型	180	7	1	172
11111型 自然交雑	180	12	3	165
00000型 自然交雑	180	0	180	0

子の移入が妨げられていない一方、型から型への遺伝子の移入が大きく制限されていることが明らかとなった。

また、11111型の場合には、自然交雑個体の分析結果からも明らかのように、種子による苗木の育成すなわち両性生殖をしていれば、組み替え型の出現割合が増え、11111型の出現割合が減ってくると予想される。現在植えられている11111型というキリの遺伝子構成のうち、組み替え型は4.8%出現し、11111型が95.2%出現していることから、苗木生産の大部分は無性繁殖によるものと考えられる。昔からキリの苗木育成の大部分は分根による増殖といわれてきたが、このことを裏付ける結果になった。

2 育種面での若齢枯死現象の解明

(1) 実生苗の近交弱勢の現れ方

(a) 自殖の可能性

交配組み合わせ毎のさく果形成率、種子数、発芽率の結果を表-7、8に示した。さく果形成率について見ると、2000年は、他殖Aが38.6%、他殖Bが40.6%を示しているのに対し、自殖Aが26.5%、自殖Bが33.1%、自殖Cが1.5%、自殖Dが0%を示し、他家受粉に比べ自家受粉はいずれも低い値を示した。2001年は、他殖Aが23.9%、他殖B

表-7 交配組合せとさく果形成率・発芽率

交配組合せ	さく果形成率 (%)	1さく果当たりの種子数	発芽率 (%)
自殖 A	26.5	802	69.3
自殖 B	33.1	1098	57.4
自殖 C	1.5	59	1.3
自殖 D	0	0	0
他殖 A	38.6	1227	70.7
他殖 B	40.6	996	69.4

2000年

表-8 交配組合せとさく果形成率・発芽率

交配組合せ	さく果形成率 (%)	1さく果当たりの種子数	発芽率 (%)
自殖 A	18.9	993	62.9
自殖 B	16.7	1326	65.8
自殖 C	0	0	0
他殖 A	23.9	1263	89.8
他殖 B	35.2	1116	73.4

2001年

が35.2%を示しているのに対し、自殖Aが18.9%、自殖Bが16.7%、自殖Cが0%を示し、2000年同様、他家受粉に比べいずれも低い値を示した。2000年の自殖Cでは1個だけさく果が得られたが、2000年の自殖Dと2001年の自殖Cでさく果ができず、個体によりさく果のできにくいものがあった。

1 さく果当たりの種子数を見てみると、2000 年は、他殖 A では 120 ~ 1,999 個であり平均すると 1,227 個、他殖 B では 99 ~ 2,323 個であり平均すると 996 個であった。一方、自殖 A では 195 ~ 998 個であり平均すると 802 個、自殖 B では 89 ~ 1,419 個であり平均すると 1,098 個、自殖 C では 59 個であった。2001 年は、他殖 A では 135 ~ 2,411 個であり平均すると 1,263 個、他殖 B では 198 ~ 1,877 個であり平均すると 1,116 個であった。一方、自殖 A では 110 ~ 1,083 個であり平均すると 993 個、自殖 B では 87 ~ 2,011 個であり平均すると 1,326 個、自殖 C では 0 個であった。種内交雑、自殖のいずれも 1 さく果当たりの種子の数には 100 ~ 2,000 個程度と大きなばらつきがあった。発芽率について見ると、2000 年は自殖 C を除いて 57.4 ~ 70.7 % で他殖種子と自殖種子との間には、有意差は認められなかった。2001 年は、他殖種子は 73.4、89.8 %、自殖種子は 62.9、65.8 % と他殖種子と自殖種子とでは発芽率に有意差があった (t 検定、 $P > 0.01$)。

自殖可能度について他家受粉を基準として求めた。2000 年の試験では、他殖 A を基準にした場合には、自殖 A は 44.0 %、自殖 B は 62.3 %、自殖 C は 0.003 %、自殖 D は 0 %、他殖 B を基準にした場合には、自殖 A は 52.5 %、自殖 B は 74.3 %、自殖 C は 0.004 %、自殖 D は 0 % と推定される。また、2001 年の試験では、他殖 A を基準にした場合には、自殖 A は 43.5 %、自殖 B は 53.8 %、自殖 C は 0 %、他殖 B を基準にした場合には、自殖 A は 40.9 %、自殖 B は 50.5 %、自殖 C は 0 % と推定される。2000 年、2001 年ともに個体により差がある結果となったが、母樹 D は 2001 年に枯損していること、母樹 C についても枝枯れが多く衰退していることを考えると、自殖可能度が 0 % に近かった一つの原因としては、樹勢が衰えていたのではないかとということが考えられる。

また、こうした極端に低い数値があるとはいえ、今回行ったチョウセンギリの自殖可能度の全データの平均は 30.1 % であった。また、自殖 C、D を除くと、平均 52.7 % と 50 % を超える値を示していることから、自殖による種子が多数できていることが明らかとなった。

(b) 環境条件別試験

近交弱勢の発現機構を知るうえで、弱勢の発現と環境条件との関係を詳細に把握することは重要である。そこで、温室内と温室外で管理することにより、環境条件と近交弱勢の関係を調査した。自殖により得られた苗の生存状況を種内交雑により得られた苗と比較し、環境条件別生存状況を表 - 9、10 に示した。

表 - 9 環境条件別生存状況(2001年)

	温室内 (%)	温室外 (%)
自殖 A	94.4	30.6
自殖 B	91.7	25.0
他殖 A	92.2	72.2
他殖 B	88.9	61.1

表 - 10 環境条件別生存状況 (2002年)

	温室内 (%)	温室外 (%)
自殖 A	91.7	13.9
自殖 B	88.9	5.6
他殖 A	97.2	52.8
他殖 B	86.1	38.9

2001 年の結果を見ると、温室内で管理していたものは自殖、他殖による差はなくほとんど 90 % 以上の生存率を示していたのに対し、温室外で管理したものは、自殖 A が 30.6

%、自殖 B が 25.0 %、他殖 A が 72.2 %、他殖 B が 61.1 %と、自殖と他殖の生存率に有意差があることが確認された。2002 年の結果も 2001 年と同様に、温室内で管理していたものはともに 86 %以上であり、温室外で管理したものは、自殖 A が 13.9 %、自殖 B が 5.6 %、他殖 A が 52.8 %、他殖 B が 38.9 %と、自殖と他殖の生存率に有意差があることが確認された。2001 年、2002 年ともに自殖内、他殖内に有意差はなかった。また、2002 年が 2001 年よりも低い生存率であったが、この原因としては、降水量の差が上げられる。2001 年の 7、8、9 月の降水量の合計は 415mm であるのに対し、2002 年の 7、8、9 月の降水量の合計は 496mm と 81mm 多く、特に、7 月の降水量を見ると 2001 年が 65mm であるのに対して 2002 年が 288mm と非常に多くなっている。枯損原因は炭そ病もしくはとうそう病であったため、降水量の多かった 2002 年に枯損率が高くなったものと考えられた。

温室内で管理したものについては、生存率が 90 %以上と近交弱勢の影響が見られなかったのに対し、温室外で管理した苗では、自殖苗と他殖苗で生存率に有意な差があったことから、近交弱勢による影響があるものと思われ、幼苗期における近交弱勢は環境条件により左右されるものと考えられる。

3 変異の幅を拡げる手法の確立

(1) 交雑の可能性

交配組み合わせ毎のさく果形成率、種子数、発芽率、成苗率の結果を表 - 11 に示した。

	表 - 11 交配組み合わせごとのさく果形成率、種子の数、成苗率				さく果形成率は、種内交雑では 38.6 % および 40.6 % を示し、系統間交雑では 44.8
	さく果形成率 (%)	1さく果当たりの種子数 最小～最大	平均	発芽率 (%)	
種内交雑	38.6	120 ~ 1999	1227	70.7	89.0
種内交雑	40.6	99 ~ 2323	996	69.4	93.3
系統間交雑	44.8	103 ~ 2420	1432	73.0	91.0
系統間交雑	41.0	134 ~ 1986	1056	68.9	86.3
種間交雑	41.7	98 ~ 2293	1003	71.0	86.7

%および 41.0 %を示した。種間交雑では 41.7 %で、いずれもほぼ同様のさく果形成率であった。1 さく果当たりの種子数は、種内交雑 では 120 ~ 1,999 個で平均すると 1,327 個、種内交雑 では 99 ~ 2,323 個で平均すると 996 個であった。系統間交雑 では 103 ~ 2,420 個で平均すると 1,432 個、系統間交雑 では 134 ~ 1,986 個で平均すると 1,056 個であった。一方、種間交雑では 98 ~ 2,293 個で平均すると 1,003 個であった。種内交雑、種間交雑のいずれにも、1 さく果当たりの種子の数には、100 ~ 2,000 個程度と大きなばらつきがあった。発芽率については、68.9 ~ 73.0 %で種内交雑種子と系統間交雑種子、種間交雑種子との間には、大きな差は認められなかった。さらに、成苗率についても、86.3 ~ 93.3 %であり発芽率と同様、大きな差は認められなかった。

系統間交雑、種間交雑の交雑可能度を種内交雑を基準として求めた。まず、はじめに系

統間交雑を見てみると、種内交雑を基準にした場合には、79.9、132 %、種内交雑を基準にした場合には、98.3、162.8 %と推定される。

次に、種間交雑を見てみると、種内交雑を基準にした場合には 79.9 %、種内交雑を基準にした場合には 98.0 %と推定される。

種間交雑の交雑可能度を推定したこれまでの報告によると、ヒノキ属ではヒノキとサワラの種間交雑が行われており、ヒノキを種子親にした場合には 8.8 %、サワラを種子親にした場合には 0.8 %と推定されている⁽¹³⁾。また、モミ属ではトドマツを種子親、ウラジロモミを花粉親にした場合には 3.5 %、トドマツを種子親にシラベを花粉親にした場合には 46 %と推定されている⁽⁵⁾。今回行ったチョウセンギリと台湾ウスバギリの種間交雑の交雑可能度は、平均すると 89.0 %でヒノキ属やモミ属に比較して相当に高い値となっている。この結果は、雑種家系 1 家系のみによるものなので個体による差なのか、種特性なのかは明らかではない。しかし、交雑可能度から推測すると、種間交雑による雑種の形成を妨げる要因は少なく、交雑の親和性はきわめて高いと考えられた。

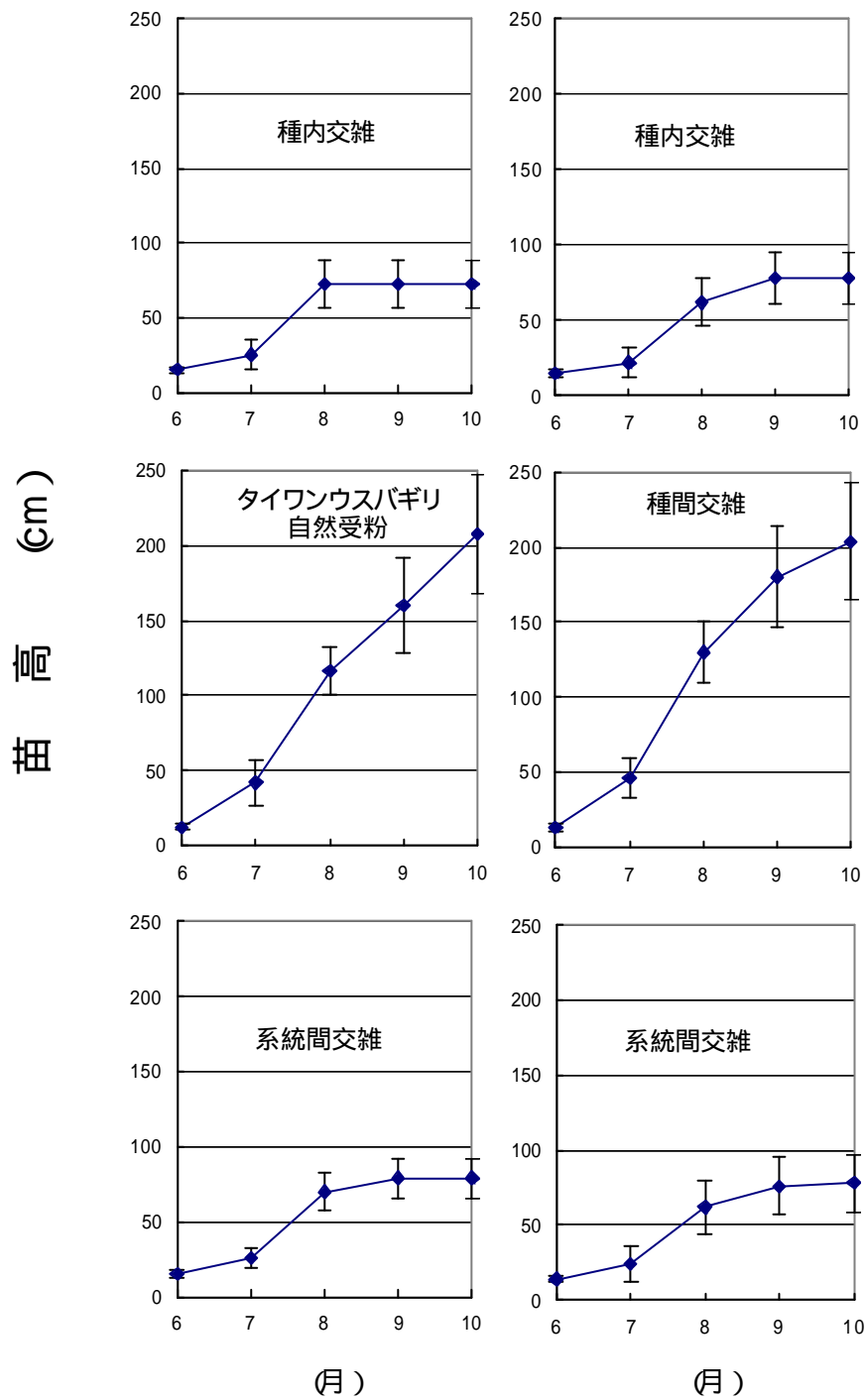
また、系統間交雑についても、雑種の形成を妨げる要因は少なく、交雑親和性はきわめて高いと推定される。

(2) 交配した実生苗の生育特性

種間交雑によって生産された苗木の生育状況を両親の苗木と比較し、その特徴を調べた。

種間交雑及び両親の当年生苗木の苗高の推移を図 - 3 に示した。1 年間の成長量を比較すると、種子親個体の種内交雑をした苗木（以下、チョウセンギリ苗木とする）30 個体の苗高（平均 ± 標準偏差）は、それぞれ 72.6 ± 15.6 cm、78.0 ± 14.7 cmであった。花粉親の台湾ウスバギリの自然受粉による苗木（以下、台湾ウスバギリ苗木とする）27 個体の苗高は 207.5 ± 32.4 cmであり、台湾ウスバギリ苗木はチョウセンギリ苗木の 2.7 ~ 2.9 倍の成長量を示した。これに対し、雑種個体苗木 28 個体の苗高は 203.7 ± 35.1cm であり、花粉親の台湾ウスバギリ苗木との差は有意ではなかった（F 値 = 0.672 : p > 0.05）。次に、平均苗高の推移を観察した。チョウセンギリ苗木が 9 月 20 日でほとんど上長成長を停止していたのに対し、台湾ウスバギリ苗木は 9 月 20 日以降も上長成長を続けていた。熊倉⁽⁶⁾の報告では、新潟市産のチョウセンギリが 9 月 16 日時点で苗高が約 105cm であり、それ以降の伸長がないのに対し、台湾ウスバギリでは 9 月 16 日時点では苗高約 155cm、10 月 6 日では苗高約 180cm と、9 月 16 日以降も上長成長を続けており、今回の試験と同様の傾向を示していた。今回得られた雑種個体苗木の平均苗高の推移をみると、9 月 20 日以降も上長成長を続けており、花粉親である台湾ウスバギリ苗木と同様の生育特性を示していた。今回の交配により得られた雑種個体苗木の生育特性は、種子親ではなく花粉親の性質を受け継いでいた。今後、この雑種がどのように生育し、かつ、諸形質がどのように発現するのか調査を続ける必要がある。

また、系統間交雑によって生産された苗木の生育状況についても、両親の苗木と比較したが、国内のキリでは、成長量、生育特性ともに種内交雑によって生産された苗木と同様の傾向を示した。



図一 3 種間交雑家系、系統間交雑家系および種内交雑家系、自然受粉家系における当年生苗木の苗木高の推移

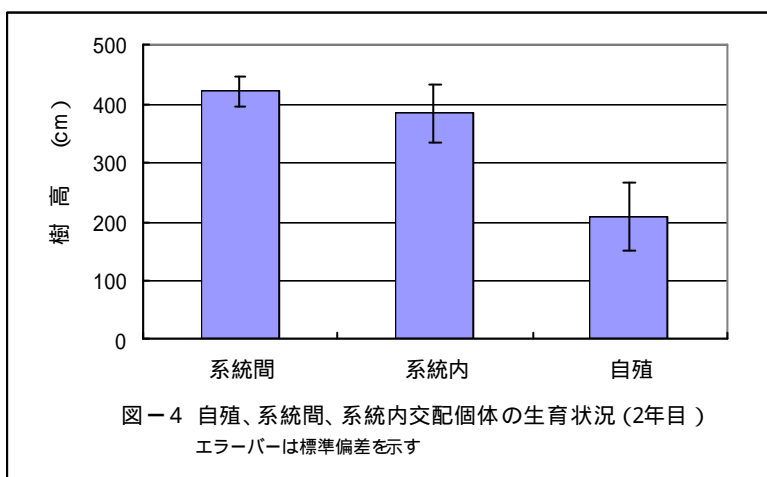
エラーバーは標準偏差を示す

おわりに

自然状態の変異の幅を、東日本地域から採取した個体をもとに推定したところ 15 になることが明らかとなり、自然状態では変異の幅が狭いことが明らかとなった。

これらの変異の幅を広げるために、葉緑体 DNA で識別される \cdot 型を交配する系統間交配を行うことにより、変異の幅は 128×2 に広がることがわかった。これは、自然状態の 10.4 倍の変異量になる。また、炭そ病やとうそう病にも若干抵抗性があり、さらに、2 年目の生育も健全であることが確認されたことから (図 - 4) 育種的な対策としては、系統間交雑は有効な方法であると思われる。

しかし、他の樹木と比較した場合、例えば、ブナの場合には、アイソザイム 11 遺伝子座のマーカーを用いたとしても、変異の幅は 2048 になり、キリはブナの変異量の $1/16$ しかないことがわかった。実用的な形質と DNA は直接的には結びつかないが、変異量に限りがあることを考えると、抵抗性育種などの選抜育種は難しいと考えられる。



引用文献

- (1) 飯塚三男 (1984) キリの交配試験 () ニホンギリとココノエギリの交配試験 . 日本林学会関東支部大会発表論文集 36 : 233-234 .
- (2) WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R. LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
- (3) 大井次三郎 (1978) 日本植物誌 (顕花篇). 1183pp, 至文社, 東京 .
- (4) 江・橋詰隼人 (1996) キリの生殖に関する研究 () 胚嚢の形成, 受粉, 受精および種子の形成 . 日本林学会関西支部大会講演集 5 : 97-100 .
- (5) 河野耕蔵・栄花 茂 (1986) モミ属の種間交雑に関する研究 () トドマツ \times ウラジロモミ・シラベの交雑可能度について . 日本林学会大会発表論文集 97 : 451-452 .
- (6) 熊倉國雄 (1978) 「ラクダギリ」の生殖器官の形態的特徴と成長力に関する研究 . 日本林学会大会発表論文集 89 : 207-209 .

- (7) 熊倉國雄 . 1979 . 日本におけるキリの種類と分布に関する研究 . 日林論 90: 357-360 .
- (8) 熊倉國雄 . 1981 . 桐栽培総論 . 21-23pp , 東洋館出版 . 東京 .
- (9) 熊倉國雄 (1981) 桐栽培総論 . 214pp , 東洋館出版 , 東京 .
- (10) 古川成治・吉丸博志・河原孝行 . 1999 . 分子マーカーを用いた会津地方のキリの分類 . 日林誌 81: 341-345 .
- (11) 古川成治 (2002) チョウセンギリとタイワンウスバギリの交雑の可能性と創り出された雑種個体の生育状況 . 東北森林科学会誌 7 (2): 74-76 .
- (12) 山本千秋 (1980) 自殖可能度および交雑可能度の表わし方 . 林業試験場研究報告 310 : 155-162 .
- (13) 山本千秋・福原檜勝 (1980) ヒノキとサワラの自然 , 自家 , 種内他家および種間受粉における球果とタネのできかた . 林業試験場研究報告 311 : 65-92 .