

## ヒノキ採種園の花粉管理に関する遺伝育種学的研究\*

清藤城宏

Genetic and Breeding Studies on Pollen Management  
in Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) Seed Orchard

Kunihiro SEIDO

**要旨:** 今日、ヒノキ採種園からの種苗の供給は、70%を超えるまでに至っている。しかし、採種園管理の基礎となる情報は非常に乏しいのが現状である。そこで、本論文は、採種園における優良種子生産に係わる花粉管理の基礎的情報を得ることを目的に行なった研究である。

直接的な雄親側の遺伝育種情報をえるため、葉緑体 DNA マーカーの探索を行った。精英樹 105 クローンを対象に、葉緑体 DNA 上の非コード領域を PCR-SSCP 法により分析した。その結果、*trnD* と *trnY* 遺伝子のスペーサー領域において塩基置換の変異が見られた。本研究の対象地とした山梨県採種園では、33 精英樹クローンの中で鰈沢 5 号のみが変異型ハプロタイプを示した。交配家系の F1 子供群用いてその遺伝様式を調べた結果、不完全ではあるが父性遺伝していることがわかった。

採種園内 2 カ所において花粉飛散距離を推定するため、鰈沢 5 号をマーカークローンとして、その周囲採種母樹から採種した種子を材料に調査した。その結果、マーカー木の隣接周囲木からの花粉の影響が非常に大きいことが示された。有効花粉飛散距離を任意交配の期待値を基準として求めた結果、実用的な有効花粉飛散距離は 20m 以内であることが明らかとなった。

採種園内の自然自殖率を推定するため、マーカークローン鰈沢 5 号の生産種子の自殖率を求めた。自殖率は、非常に低くほとんど無視してもよい程度であった。一方、樹冠上下位置別の自殖率は、下層より上層で高い値を示した。樹冠方位別では個体間で異なり、中でも南面が高い傾向を示したが、顕著な違いは認められなかった。

鰈沢 5 号の花粉親としての次代への寄与率を調べた結果、豊作年には期待寄与率に近い値を示したが、凶作年、並作年の寄与率は低く、いずれも期待寄与率を大きく下回った。豊作年には、並作・凶作年に比べ、採種園構成クローンの花粉親としての寄与率が平準化する可能性が示唆された。

さらに、ヒノキの選択受精の有無を明らかにするため、マーカークローンを含む、5 クローンからの等重量混合花粉を用い、これら 5 クローンを母樹として交配し、調査を行った。その結果、特定クローンの花粉が選択的に受精する現象は認められなかった。

以上の研究の結果、採種園管理技術、とりわけ花粉管理技術を開発するためのいくつかの有無な基礎的知見を得ることができた。また、このような研究に、父性遺伝する葉緑体 DNA マーカーが有効であることを示すことができた。

**キーワード:** ヒノキ、採種園、葉緑体 DNA、RCR-SSCP、花粉飛散、自殖率、花粉寄与率、選択受精

\* 本論文は、九州大学博士号（農学）学位請求論文である

## 目 次

第1章 序 論 .....	16
1.1 研究の目的 .....	16
1.2 研究の背景 .....	17
1.3 研究史 .....	18
第2章 ヒノキ採種園 .....	19
2.1 全国のヒノキ採種園の現況 .....	19
2.2 研究の対象としたヒノキ採種園 .....	22
2.2.1 概 況 .....	22
2.2.2 本採種園におけるこれまでの研究 .....	24
第3章 ヒノキの父性遺伝マーカーの探索 .....	26
3.1 DNA 分析 .....	26
3.1.1 DNA(デオキシリボ核酸) .....	26
3.1.2 PCR を用いた多型の検出法 .....	27
3.2 本実験で用いた分析法 .....	28
3.2.1 PCR-SSCP 法による葉緑体 DNA 塩基配列多型の検出 .....	28
3.2.2 C S 4 マーカーの父性遺伝の検証 .....	31
第4章 ヒノキ採種園における花粉の有効飛散距離の推定 .....	32
4.1 はじめに .....	33
4.2 材料と方法 .....	33
4.3 結 果 .....	34
4.4 考 察 .....	36
第5章 ヒノキ採種園における自殖率の推定 .....	38
5.1 はじめに .....	38
5.2 材料と方法 .....	38
5.3 結果と考察 .....	38
第6章 ヒノキ採種園における樹冠部位別自殖率の推定 .....	40
6.1 はじめに .....	40
6.2 材料と方法 .....	40
6.3 結 果 .....	41
6.4 考 察 .....	42
第7章 ヒノキ採種園構成クローンの花粉親としての寄与率の評価 .....	43
7.1 はじめに .....	43
7.2 材料と方法 .....	44
7.3 結果と考察 .....	44

第8章 ヒノキにおける選択受精の検討 .....	46
8.1 はじめに .....	46
8.2 材料と方法 .....	47
8.3 結果と考察 .....	47
第9章 総合考察 .....	48
9.1 解析マーカーの探索 .....	49
9.2 自然自殖の防止 .....	50
9.3 採種木間の交配の均等化 .....	51
9.4 園外花粉飛来の防除 .....	52
9.5 次世代の採種園 .....	52
摘 要 .....	53
1) ヒノキの父性遺伝マーカーの探索 .....	53
2) ヒノキ採種園における花粉の有効飛散距離の推定 .....	53
3) ヒノキ採種園における自殖率の推定 .....	54
4) ヒノキ採種園構成クローンの花粉親としての次代に対する寄与率の評価 .....	54
5) ヒノキにおける選択受精の検討 .....	54
謝 辞 .....	54
引用文献 .....	55
Summary .....	63

## 第1章 序 論

### 1.1 研究の目的

ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et. Zucc.) ENDL.) は日本の固有種で、本州の福島県から四国、九州におよび、南限は屋久島まで分布する。ヒノキは柱材としてすぐれた性質を持っているため、古くから建築に用いられてきた。その代表格の法隆寺は世界一古い木造建築として、また五重の塔は均整のとれた美しさで国宝建造物としてあまりにも有名であり、塔の心柱にはヒノキの柱が珍重されている。ヒノキには、特有の芳香と光沢があり、耐久性も高く、かつ長年強度を保つため、木材利用価値の優秀性では他に類をみない、林業上最も重要な樹種の一つである。

しかし、現在原生のヒノキ天然林はほとんど伐りつくされ、遺伝子保存林・学術参考林は全国で17カ所、1,019.34haが残っているにすぎない(林野庁 1986)。

一方、有用な材であるため、人工植栽によってこれを育てようというところは古くからあり、すでに11世紀に高野山でヒノキの苗を育てた記録がある(佐藤 1971)。しかし実際には、ヒノキの造林が広く行われ始めたのは、藩政時代に入ってからのもので、高知や木曾などにその例を見ることができる。そのほか、ヒノキの天然分布の北限を越えた地域である弘前藩、南部藩、仙台藩、庄内藩などでも、植林によってこれを育てようと努めてきた経緯がある。

今日、木材価格の低迷、労働費などのコストの上昇による採算性の悪化、担い手の高齢化と減少に伴い、日本の林業は停滞状態にあるものの、我が国における人工林面積10,365,000haの内、ヒノキの人工林面積は2,529,000haで約25%を占めている。年間造林面積では、1978年以降はスギの造林面積を上回ってトップとなり、北海道と東北の一部を除いて広く造林されている(林野庁 1997)。

我が国における精英樹選抜育種事業は、1957年の発足以来、全国的規模で行われた精英樹の選抜にはじまり、それらクローンの構成による採種園の造成が進められてきた。ヒノキの採種園は144カ所(林野庁 1999)あり、現在では相当量の改良種苗を供給するまでに至っている。

採種園の重要な目的は、豊富な種子の供給をはかることと同時に、遺伝獲得量を最高に発揮することにある。前者の量的な面は、ヒノキにおいては着花のコントロールがある程度可能となった(金川・勝田 1983、金川・

北川 1987、前田・西村 1985、長尾・佐々木 1985)。しかし後者については採種園構成クローンの雌雄花の次世代に対する寄与(勝田 1982)、自殖率(田島 1979、清藤 1990a)、構成クローンの遺伝変異(鈴木ら 1989、清藤 1990a、1992b)、苗木集団の遺伝変異(Tang and Ide 1998)などの研究があるが、スギの研究に比較するとその知見は不十分である。

採種園産種子の遺伝的品質と広い遺伝的変異性を併せ持つためには、次のような基準が満足されなければならない。

1. 採種園を構成している全てのクローンは、種子生産のために花粉生産と受粉において、均等に寄与すること。
2. 自殖の程度が最小限のレベルにあること。
3. 採種園外部からの花粉汚染から隔離されていること。

花粉は容易に移動する配偶子である。花粉は最適な種子生産を達成するための、また、種子の遺伝的構造を操るための強力なツールであり、このため適切な受粉管理が必要である。その前提として受粉に係わる花粉の動きを明らかにする必要がある。

これまで採種園の研究には、形態変異やアイソザイムが利用されてきた。しかしヒノキにおいては適当なマーカーが無い場合、花粉の動態を把握するのに十分な基礎的知見を欠いているのが現状である。

本研究においては、採種園における花粉動態の基礎的研究のため、近年急速に発達してきたDNAマーカーによる解析を試みた。DNAの中でも葉緑体DNAは、針葉樹では父性遺伝と言われており、父親側(花粉)の遺伝情報を明らかにすることが可能である。

本論文では、ヒノキ採種園の受粉にかかわる課題として以下の研究を行った。

- 1) 葉緑体DNAの種内変異を同定する手法を確立するため、変異の現れやすい非コード領域を解析することにより、マーカーを探索し、その父性遺伝を明らかにする。
- 2) 受粉・受精に係わる花粉の有効飛散距離、範囲を推定する。
- 3) 採種園における自殖率を推定する。
- 4) より詳細な自殖の起こり方を知るため、樹冠各部位での自殖率を調べる。
- 5) 父親として次代にどの程度寄与しているか推定する。
- 6) 被子植物では一般的な選択受精が、ヒノキで行われているかを明らかにする。

以上の研究結果をもとに、ヒノキの花粉管理について考察した。

## 1.2 研究の背景

日本における木の文化の歴史的変遷を辿ると、ヒノキは有史以前から利用され(尾中 1939)、飛鳥時代以降は神社・仏閣・仏像に用いられた。その理由として材色が好ましく、芳香性が強く、特に木材の強度が大きかったためである。その裏付けとして、ヒノキは幹の中において占める心材の割合が大きく、60年以上になると、心材の割合は80%で、辺材の割合は20%しかない。辺材の部分は腐りやすいが、心材の部分には独特の芳香を持つ成分が含まれていて腐りにくい(西岡・小原 1978)。昔からヒノキが建築に使われ、長い風雪に耐えて来たのは、伐採した丸太の周囲の僅かな辺材部分を取り除けば大きな心材部分が得られるという利点があった故と考えることができる。ヒノキの材は、飛鳥時代から平安時代には近畿地方で生産され、大いに利用されてきた。しかし資源は次第に減少し、土佐、日向、木曾など伐出範囲は拡大していった。特に木曾のヒノキは土佐のヒノキと共に有名で、江戸に入った材には木曾産が多かった(田中 1882, 1883)。しかし豊かさを誇った木曾のヒノキ原生林も寛永4年(1625)に"お留山"の制度がしかれることになったのである。俗にいう「木一本に首一つ」という罰則は、その嚴重さを物語る。留山というのは、ヒノキ、サワラ、コウヤマキ、アスヒ、ネズコの、いわゆる木曾五木についての伐採禁止の制度であり、ヒノキが混合して伐り倒されることを防ぐため、五木全体を禁止したのだといわれている。ヒノキを留木にした藩は尾州藩だけでなく、その他さらに18藩に及んでいる(藤野 1969)。このことはいかにヒノキが重要な樹種として取り扱われたかがわかる。

ヒノキは分類学上、裸子植物門、球果植物綱、マツ目のヒノキ科に属している。日本に天然分布する樹木でヒノキ科に属するものには次の種がある。

クロベ(ネズコ) (*Thuja standishii* CARR.)、アスナロ(ヒバ、アテ) (*Thujopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC.)、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* ENDL.)、サワラ (*C. pisifera* ENDL.)、ネズ(ネズミサシ) (*Juniperus rigida* SIEB. et ZUCC.)、ハイネズ (*J. conferta* PARL.)、ミヤマネズ (*J. communis* L. var. *nipponica* WILSON)、イブキ (*J. chinensis* L.)、ハイビャクシン (*J. chinensis* L. var. *procumbens* ENDL.) ミヤマビャ

クシン (*J. chinensis* L. var. *Sargentii* HENRY) などがある(牧野 1961)。

ヒノキ、サワラには園芸品種も多く、庭木としても用いられている。ネズコは分布が局限されていて、多くは岩石地、急斜地のやせ地にしか生育しないので、林業上はあまり問題にならず、ヒバは津軽、南部両藩で十分な保護政策を取ったので青森県の下北、津軽両半島部に純林状をなして残っているが、人工更新が困難なので大部分がスギの人工造林地に改植されている。ヒバやアスナロは、このほか、脊稜山脈やその他にも分布し、日本海沿岸では佐渡北部山稜に天然分布がある。

ヒノキ科の樹種は、台湾、北米大陸などにも分布し、台湾のタイワンヒノキ (*Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* (Hayata) REHD.) およびベニヒ (*Chamaecyparis formosensis* MATSUMURA) は有名である。アメリカ太平洋北西部には、ローソンヒノキ (*Chamaecyparis lawsoniana* PARL.) などヒノキ科の樹種が日本よりはるかに多く天然分布している。

我が国においては、1.1で述べたようにヒノキが天然に分布している地域はかなり広く、北は福島県から南は屋久島にまでわたっている。また垂直的な分布についていえば、標高200m~1,800mの範囲で、中でも1,000m前後の温暖帯に、もっとも良質のヒノキ林が形成されている(坂口 1952)。なお地方別でいえば、中部地方、近畿地方、四国地方などがあげられ、特に有名なのが先にふれた木曾地方である。

ヒノキの造林が広く行われ始めたのは、藩政時代に入ってからである。原生林の多くはかなり伐りつくされてしまい、現在残っている天然林も、先人が抜き伐りしながら、その下に人工補植し、保育した森林であるとの報告もある(徳川 1941)。

ヒノキ天然林で学術参考林等として林野庁が指定している林分(林野庁 1986)は、屋久島、高知県白髪山(22.89ha)、同県千本山(59.51ha)、愛媛県別子(4.47ha)、三重県大杉谷(181.11ha)、和歌山県高野山(29.95ha)、兵庫県摩耶山(33.55ha)、同県音水(48.28ha)、岐阜県御前山(406.79ha)、長野県大径木林(77ha)、同県鹿島山(1.99ha)、山梨県青木ヶ原(0.96ha)、群馬県天丸山(119.35ha)、埼玉県女形(5.0ha)、栃木県玉生(1.6ha)、同県矢野口(8.89ha)、福島県赤井岳(23ha)の17カ所、1,000ha余に過ぎない(図1.1)。

生育立地は、スギが肥沃な谷の沢沿いのBE、BD土壌が適しているのに対し、ヒノキは或る程度乾燥にも耐

える性質があり、BDd、BC、BB などスギよりも少し瘦せた山の斜面または尾根地形の山地にも造林可能であるため、その生育立地は広範囲に広がっている。我が国の人工造林といえば、スギ、ヒノキでほとんど占められてきた。ヒノキは岐阜県、高知県、静岡県、三重県、愛媛県、和歌山県、長野県を中心に北海道を除いて全国的に造林されている。戦後 1945 年以降の造林面積の推移を図 1.2 に示す。ピーク時では全体で 432,682ha、その内ヒノキの造林面積は 18% である。スギとヒノキの比率は 1967 年頃までは、ヒノキはスギの 50% 程度であったが、その後造林面積の衰退とともにスギは減り、1982 年以降は逆転し、ヒノキが首位となった。1997 年度のヒノキ人工林の造林面積は 22,936ha (林野庁 1997) であり、人工林の蓄積は高知県の 39,119ha が首位を占め、岐阜県、和歌山県、静岡県、愛媛県と続いている。

次の章で詳しくふれるが、ヒノキの育種種苗は平成 9 年度統計によると採種園産種子が全体の 73% を占め、山行苗の 68% が育種苗である (林野庁 1999)。

このような背景の下で、日本林業の低迷に伴い造林も遅々とした歩みとなってきているからこそ、造林に用いられる種苗の遺伝的質が問題にされなければならない。

### 1.3 研究史

これまでの林木における主働遺伝子の観点から遺伝育種の標識遺伝子の報告を振り返ると、マツ科、Norway spruce、Slash pine、アカマツ、クロマツ、ヒノキなどの色素体変異の白子、黄子、淡緑色、淡黄色などの劣性遺伝子 (Langner 1953、Squillace and Kraus 1963、Fowler 1965、大庭 1972a、大庭 1972b、1972c、茶屋場 1977) がある。また、スギ・ヒノキについては村井 (1986) がまとめたように、スギでは黄子、淡緑、白緑、白初生葉、目白の 6 種類に分類され、すべて単一劣性遺伝子とされている。形態変異では、20 種類ほどに分類され、わい性形質の遺伝解析では、単一劣性、優性遺伝子支配が明らかにされている。その他、ヨレスギの補足遺伝子などが解析されている。またヒノキにおいては、白子、黄子、淡緑、白緑、早春白色、冬期緑に分類され、形態変異では多初生葉、ホーキ状、多ギョウ、わい性などの遺伝解析が行われ、これらすべてが劣性遺伝子である。父性遺伝形質では、黄金スギ (Ohba *et al.* 1971)、斑入りヒノキ (実森 1992) などがある。

さらにこれらに加えて、Markert and Møller (1959) によって発見され、遺伝子の一次産物である酵素レベル

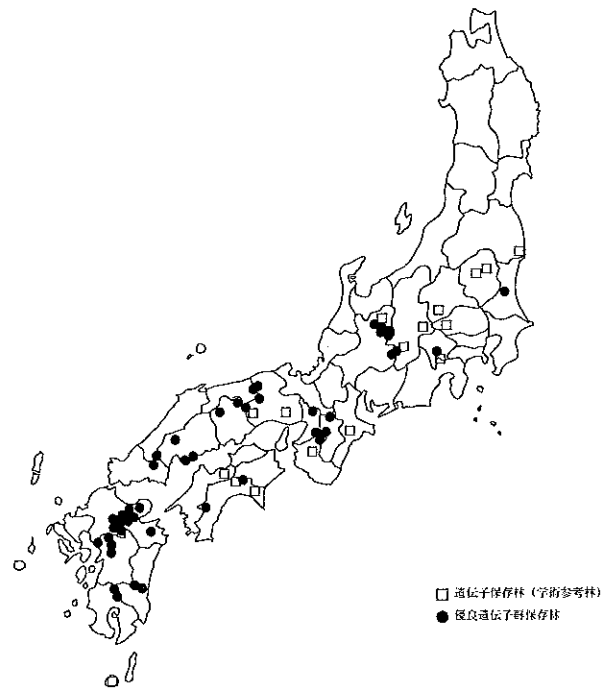


図 1.1 ヒノキ遺伝子保存林等の分布  
(林野庁 材木育種センター 1997)

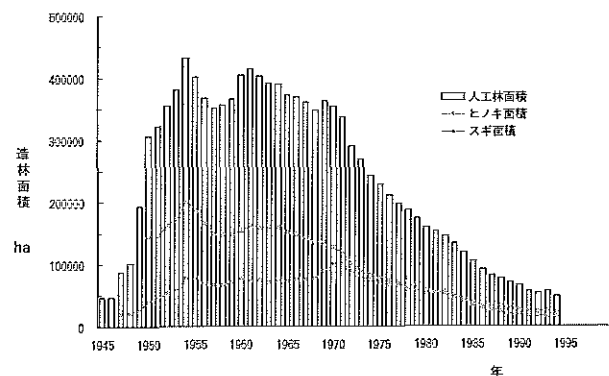


図 1.2 わが国における造林面積の推移

の多型現象である "アイソザイム (同位酵素)" が用いられるようになった。初期の頃はザイモグラム (アイソザイムパターン) の比較での遺伝的差異を調べた例がほとんどであるが、我が国では白石らにより純粋な遺伝情報のみアイソザイム (アロザイム) を用いるようになり、目覚ましい遺伝的情報の発展を遂げた (白石・上中 1983、白石ら 1986、Shiraishi *et al.* 1987、Shiraishi 1988a、1988b)。

アイソザイム利用によるヒノキの研究では、白石らはヒノキ天然 6 林分と全国的人工林 11 林分を調べ、天然林におけるクラインと人工林の遺伝的均一性を明らかにした (Shiraishi *et al.* 1987)。清藤ら (1987) および清藤 (1992a) は、富士山の天然林の遺伝変異を調べ、ま

た、繁殖構造も明らかにした(清藤 1990b)。Uchida *et al.* (1991、1993) はナンゴウヒノキのクローン構成を明らかにし、また、ヒノキ精英樹と天然林を比較し、天然林の遺伝的変異がより大きいとした(清藤 1992b)。

本研究に関連した採種園におけるアイソザイムを応用した遺伝変異、交配様式、花粉飛散、次代の遺伝変異などの研究では、Radiata pine (Moran and Matheson 1980)、Scots pine (Rudin and Lindgren 1977、Müller 1977、Shen *et al.* 1981、1982、Muona *et al.* 1987、Burczyk 1998)、Lobloly pine (Adams and Joly 1980)、Douglas fir (Fast *et al.* 1986、EL-Kassaby *et al.* 1984、1993a、1993b、Webber and Painter 1996)、ヒノキ(田島 1979、鈴木ら 1989、清藤 1990a、1992b、Tang and Ide 1998)、Eucalyptus urophylla (House and Bell 1994)、Noble fir (Siegismund and Kjaer 1997)、Black spruce (Sproule and Dancik 1996)、Larch (Buruczyk *et al.* 1997) など多くの樹種でおこなわれている。

これまで述べた形態、色素異常、アイソザイム分析手法を用いた遺伝育種研究から、最近では、目覚ましい進歩をとげている DNA 研究に移行してきている。直接的遺伝情報を取り扱う DNA レベルでの研究は、林木の遺伝育種に飛躍的成果をもたらすものと期待され、個体の識別(高田・白石 1996、後藤ら 1997)、家系分析(楢崎ら 1996、渡辺ら 1996、白石ら 1996)、QTL 解析(吉丸 1999)がおこなわれてきた。また採種園に関連した報告(宮原・後藤 1997、宮原ら 1998、Stoehr *et al.* 1998)もようやく出はじめてきた。

## 第2章 ヒノキ採種園

### 2.1 全国のヒノキ採種園の現況

我が国における林木育種の気運は、1952年にスウェーデンの林木育種の指導者・リンキスト教授が来日し、遺伝育種ならびに林木育種事業の必要性、育種成果の紹介により育種ブームがおこったと言われている。このスウェーデン方式は現在取り入れられているように、先ず優良クローン(精英樹)選抜により採種園を造成し、実用種苗を造林普及させ、その後で次代検定によって不良クローンを除去しようという手順であった。1954年には精英樹選抜による育種計画の実施についての通達となり、国有林で精英樹選抜事業が開始された。1957年から民有林も含め「林木育種事業指針」に基づき進められてきた。すなわち我が国の林木育種事業は集団選抜育種法によって

進められ、多数の精英樹クローンをランダムに採種園内に配置し、それら相互間で任意交配(ランダム交配)を行なわせる。次の世代の集団は、親とほぼ同様の遺伝的組成を保ちつつ、遺伝的な水準の向上に寄与することを目的としている。

林木育種事業の運営を推進するため5つの育種基本区と、育種基本区内において環境を同じくする区域を一まとめにした19の育種区を設定した(図2.1-1)。

採種園の利点として、①採種木は精英樹クローンであるから遺伝的に優れた素質をもつ種子が得られる、②適切な保護、管理によって充実した良質の種子が生産できる、③接木クローンを使うので結実年齢が早まる、④植栽間隔が広く、初めから枝を十分に張らせ、せん定、肥培により多量の結実量が期待できる、⑤枝を太く張らせ樹高を適宜調節して仕立てるので採種が容易である、⑥肥培、せん定など集約な施業によって、結実の調節が可能となり、したがって豊凶の差を少なくすることができる、と言われている(田島 1991)。

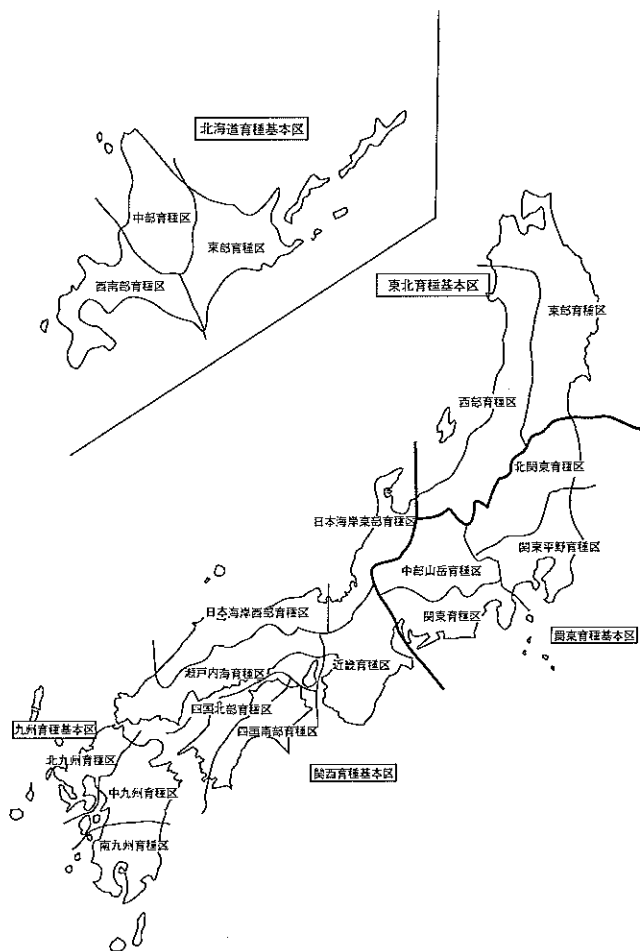


図2.1-1 育種基本区と育種区

表 2.1-1 ヒノキ精英樹の選抜と採種園

育種基本区	育種区	精英樹 選抜数	採 種 園						
			個所数	面積計	平均面積	本数	ha 当たり本数	平均クローン数/個所	設定年
東北育種基本区	東部	15	3	1.39	0.46	703	506	21	S42-S56
	合計(平均)	15	3	1.39	(0.46)	703	(506)	(21)	S42-S56
関東育種基本区	北関東	46	12	23.46	1.96	9848	420	35	S40-S61
	関東平野	184	13	19.69	1.51	16487	837	36	S40-H 3
	中部山岳	99	25	30.39	1.22	22625	744	40	S37-S56
	東海	73	12	22.77	1.90	29353	1289	51	S37-S58
	合計(平均)	402	62	96.31	(1.55)	78313	(813)	(41)	S37-H 3
関西育種基本区	日本海東部	25	3	4.16	1.39	1026	247	13	S57-H 2
	日本海西部	50	5	7.1	1.42	4932	695	21	S39-S61
	近畿	144	14	39.48	2.82	18824	477	25	S38-S55
	瀬戸内海	113	16	54.33	3.40	37380	688	25	S39-H 4
	四国北部	93	4	23.67	5.92	39215	1657	29	S38-S60
	四国南部	28	8	18.8	2.35	20033	1066	36	S36-H 2
	合計(平均)	453	50	147.54	(2.95)	121410	(823)	(26)	S36-H 4
九州育種基本区	北九州	50	14	26.98	1.93	22386	830	43	S35-S55
	中九州	31	8	19.73	2.47	16916	857	39	S39-S56
	南九州	107	10	22.67	2.27	21578	952	70	S42-H 2
	合計(平均)	188	32	69.38	(2.17)	60880	(877)	(50)	S37-H 2
総計(平均)		1058	147	314.62	(2.14)	261306	(831)	(35)	

表 2.1-2 各育種基本区における育種種子生産の推移

	育種基本区	種子総生産量 kg	育種種子量 kg	割合/総量%	割合/造林%
1985年	東 北	162	162	100	40
	関 東	4784	2492	52	27
	関 西	5197	1662	28	17
	九 州	2900	457	16	23
	合計	13043	4573	36	21
1990年	東 北	143	128	90	66
	関 東	4682	2471	53	51
	関 西	3956	1362	34	36
	九 州	1850	726	39	26
	合計	10631	4687	44	39
1995年	東 北	262	62	100	71
	関 東	1946	1525	78	53
	関 西	4252	2436	57	39
	九 州	1466	1023	70	39
	合計	7926	5248	68	43

表 2.1-1 に精英樹の選抜と採種園の設定状況について既往の資料をもとに改編し、育種基本区、育種区ごとにまとめた(林木育種センター 1994、1996a)。ヒノキの精英樹選抜は、国有林 325 個体、民有林 733 個体、合計 1,058 精英樹個体が選抜されている。都道府県別では、北海道、青森、岩手、秋田、山形、新潟、大阪、富山、福井、香川および沖縄を除く 36 都県から広く選抜され

た。精英樹選抜はヒノキ人工林が主体に行われているが、ヒノキの造林が盛んな地域から当然多く選ばれている。育種区単位では、関東平野育種区 184 個体を筆頭に、近畿育種区の 144 個体、瀬戸内海育種区 119 個体、南九州育種区 107 個体、中部山岳育種区等の順である。

採種園の設定状況は、国有林 25 カ所 57.32ha、民有林 122 カ所 257.30ha、計 147 カ所 314.62ha に及ぶ。育種事業による最初の採種園は、1961 年(昭和 35 年)の



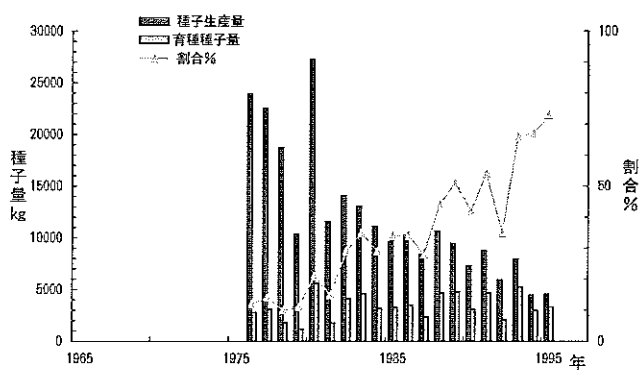


図 2.1-2 ヒノキ種子生産量の推移

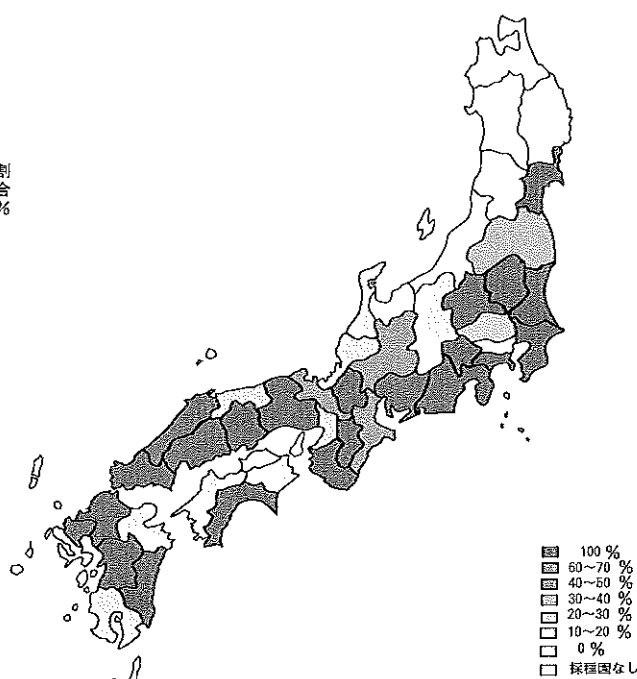


図 2.1-3 1997 年度における育種種子生産割合

表 2.1-3 ヒノキ精英林の選抜と採種園採種園におけるヘテロ接合対率

育種基本区	育種区	県名	調査採種園 カ所数	平均 Ho	平均 He	
東北育種基本区	東部	宮城県	2	0.143	0.182	
関東育種基本区	北関東	群馬県	9	0.137	0.189	
		福島県	3	0.152	0.185	
		栃木県	1	0.152	0.175	
	関東平野	茨城県	19	0.145	0.169	
		埼玉県	2	0.182	0.214	
		千葉県	3	0.136	0.166	
		東京都	1	0.171	0.189	
		長野県	5	0.144	0.180	
	中部山岳	岐阜県	3	0.146	0.191	
		山梨県	1	0.123	0.185	
		静岡県	8	0.161	0.186	
	東海	愛知県	1	0.168	0.175	
		関西育種基本区	日本海東部	福井県	1	0.162
	近畿	日本海西部	島根県	1	0.181	0.201
兵庫県			8	0.166	0.196	
鳥取県			1	0.155	0.190	
近畿		奈良県	2	0.158	0.187	
		滋賀県	2	0.176	0.198	
		三重県	7	0.189	0.190	
		兵庫県	1	0.165	0.215	
		和歌山県	2	0.155	0.190	
		瀬戸内海	広島県	5	0.184	0.192
			岡山県	3	0.143	0.162
山口県			2	0.192	0.221	
四国北部		香川県	3	0.162	0.200	
		愛媛県	2	0.165	0.208	
	四国南部	高知県	2	0.160	0.199	
徳島県		4	0.169	0.210		
九州育種基本区	長崎県	3	0.173	0.185		
	福岡県	3	0.174	0.178		
	熊本県	3	0.171	0.190		
	宮崎県	4	0.175	0.193		
	鹿児島県	4	0.171	0.191		
全平均			121	0.162	0.191	

熊本営林局佐賀の金立採種園の面積 0.3ha、構成クローン 25、2.5m 方形植、25 型の採種園であった。続いて翌年の徳島県の岩倉採種園 (0.2ha)、1963 年 (昭和 37 年) に長野営林局木曾谷の坂下 1 号採種園 (2.08ha)、愛知県下山採種園 (2.63ha) が造成されていった。一番新しい造成は、1991~1992 年 (平成 3~4 年) の山口県萩むつみ林木育種園 (0.97ha) (林野庁 1999) である。全国ヒノキ採種園の平均面積は 2.14ha (0.03~17.8ha)、採種園当たりのクローン数の平均は 35 クローン (11~109 クローン) であり、九州育種基本区は平均 50 クローンと多い。ha あたりの植栽本数は平均 831 本で、植栽間隔は平均 3.5m になる。設計方式は 25 型が多いが、その他では規則的配置法、ギルヒティ法が九州育種基本区で用いられている。

全国採種園からの育種種子生産量について、資料のある 1978 年 (昭和 53 年) から 1997 年 (平成 7 年) までの 20 年間を調べた。育種種子の生産量は最低 1981 年の年間 1,148kg から最高は 1995 年の 5,248kg、平均 3,398.3kg で種子生産量の 35.2% である。

しかし種子生産量に占める育種種子の割合を時系列的に眺めた場合、そのシェアはほぼ直線的に上がり 1997 年度では 73% になっている (図 2.1-2)。1985 年から 5 年おきに育種基本区ごとの育種種子生産量の推移を見ると、育種種子生産量はおおむね各育種基本区とも年を重ねるごとに増加している。造林に対する育種苗の割合も増加傾向にある (表 2.1-2)。1997 年における県別の育種種子の種子生産量に占める割合を図 2.1-3 に図示する。採種園のある県の 56% で育種種子が 100% を占めている。

精英樹の遺伝変異について内田 (1995) は、ヒノキ精英樹 878 個体について、11 遺伝子座によりアイソザイム遺伝子型を確定し、四国の精英樹群の遺伝的独自性があること、北関東など分布北限における精英樹に違いが見られ、遺伝子の自然選択を推測した。また、木曾の天然林と精英樹群との遺伝的な違いが無かったこと、また四国で選抜された精英樹は白髪山から採種された可能性も推測した。清藤・内田 (1996) は、Uchida *et al.* (1993) の精英樹の遺伝子型をもとに、121 カ所の採種園構成クローンの遺伝変異を調査した。その結果平均ヘテロ接合体率は 0.154 から 0.242 の範囲にあり、平均 0.191 で、8 天然林の同じ遺伝子座で調べた 0.193 (内田 1995) よりわずかに低かった。変異性の高い採種園は、近畿育種区、瀬戸内海育種区、四国北部育種区で目立ち、採種園を構成しているクローンは同一あるいは近

隣の育種区からのもので成り立っているため、精英樹の遺伝子型の変異とほぼ同様の理由により変異性を保持していると考えられる。(表 2.1-3)

## 2.2 研究の対象としたヒノキ採種園

### 2.2.1 概況

本研究を行った採種園は、山梨県にある 2 カ所の採種園の内、育種事業用として活用されている八木沢ヒノキ採種園である (図 2.2-1)。

採種園のある山梨県南部町は、森林面積が 9,841ha であり、総面積に占める割合は 88% に達する。民有林率は 86%、人工林率が 68% を占め、山梨県内でも屈指の林業経営地帯である。この南部町は、県下で最も古くからスギ・ヒノキの造林に取り組み、富士川優良木材の産地形成をはかっている中心的地域の一つである。

採種園は、山梨県南巨摩郡南部町八木沢、北緯 33°15'、東経 138°29' で、比較的静岡県に近い山梨県の南端に位置している。標高は 400~430m にあり平均傾斜 15 度、南西斜面で地形的にはゆるやかな尾根上部に位置する。表層地質は凝灰角礫岩、集塊岩である。土壌は、下部の平衡斜面は BD 型を示し、尾根にかかる凸地形では BD (d) が出現する。南部気象観測所 (北緯 33°17'、東経 138°27'、標高 141m) の 12 年間の気象データを表 2.2-1、図 2.2-2 に示す。年間降水量 2,413mm、年平均気温 14.6°C の温暖な地域である。本採種園は富士川下流域の左岸上部に位置し、花粉飛散期の 4 月は、風が河川から吹き上げ、南から北に向かって 2m 程度の風が吹いている。

本ヒノキ採種園は、1968 年から 1970 年に造成され、3 園から構成されている。総面積は 4.56 ha である (図 2.2-1)。採種園を構成する精英樹は図 2.2-3 に示したように、関東育種基本区内の精英樹からなり、長野県から 11 クローン、山梨県 9 クローン、神奈川県 7 クローン、東京都 5 クローン、茨城県 1 クローンの 33 精英樹クローンで構成されている。設計配置は 25 型を用いて、ランダムに同じクローンが隣り合わないよう植栽されている。植栽間隔は 3.5 m × 3.5 m であり、800/ha で当初植栽された。前節 2.1 で示した全国の採種園と比較するとほぼ標準的な採種園と言える。

本採種園の施業として、1983 年から 1 本おきに千鳥間伐を実施した。現在の ha 当たりの本数は、約 400 本、採種木間の距離は 5m である。また各クローンのラメート本数は、ha 当たり平均 16 本である。球果採取を容易

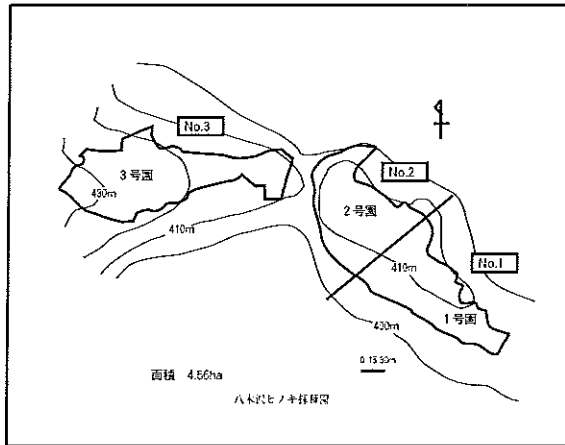
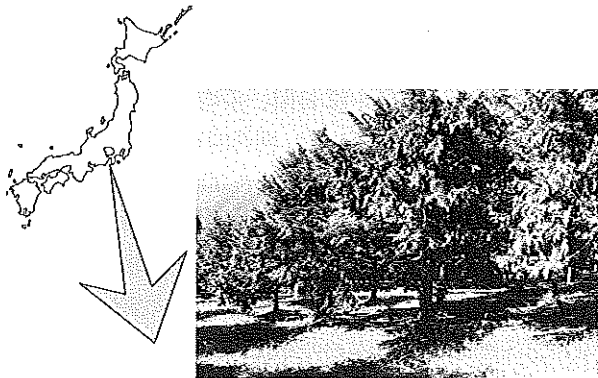


図2.2-1 実験に用いた八木沢ヒノキ採種園

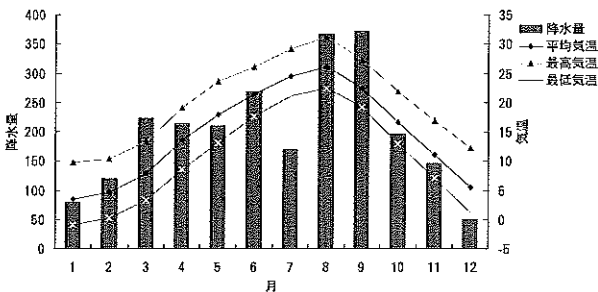


図2.2-2 八木沢ヒノキ採取園付近の気象 (1979-1990)

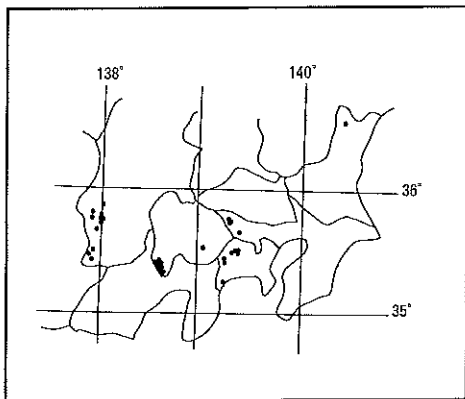


図2.2-3 八木沢ヒノキ採取園構成クローンの選抜地位置図

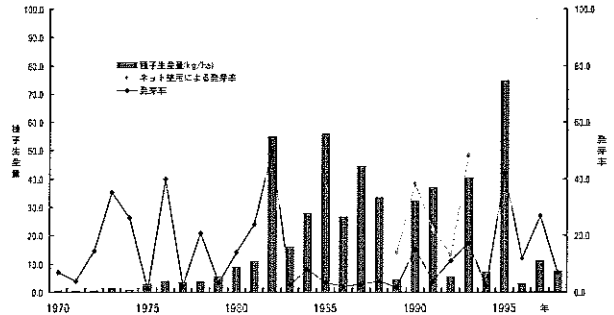


図2.2-4 八木沢ヒノキ採取園における種子生産性と発芽率

表2.2-1 八木沢ヒノキ採取園付近の気象 (1979-1990)

月	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	風速
1	79	3.5	9.8	-0.9	1.6
2	120	4.6	10.3	0.3	1.7
3	223	7.9	13.4	3.3	1.8
4	215	13.5	19.1	8.6	1.8
5	210	17.9	23.6	13.1	1.8
6	268	21.4	26.1	17.7	1.7
7	169	24.5	29.1	21.2	1.5
8	366	26.1	31.2	22.4	1.6
9	372	22.5	27.2	19.3	1.6
10	195	16.6	21.8	12.9	1.8
11	146	11.1	16.9	7.1	1.6
12	50	5.5	12.2	1.2	1.3

にするため、採種木は主幹の3~4mの位置で断幹処理している。また整枝剪定を種子採取作業と併せて実施している。施肥は1本当たり200g程度を毎年施用している。全園の採種木の平均樹高は6.0m、平均直径は22cmである。また着花促進として、2cmの枝径にジベレリン(ジベレリン3)5~10mgを標準とし、CMC(サンローズ:纖維素グルコール酸ナトリウム:山陽国策パルプ)を混ぜあわせて水を加えて団子状にした粒を、7月中旬に枝の木部が見えるか見えない程度に樹皮を剥ぎ、包埋処理している。このジベレリン処理を事業的規模で開始したのは1985年からであり、1号園と2号園において毎年交互に実施している。

本採種園からの種子生産量と発芽率について、種子採取が可能となった1970年当初から1998年までの29年間の記録を示すと図2.2-4のとおりである。種子生産は、結実当初の1970年に0.5kg/ha、最高は1995年の74.7kg/haで、平均18kg/haであった。この値は、林野庁が生産目標としたヒノキ採種園の生産量45kg/ha(林野庁1975)の半分以下である。全体の傾向としては隔年結果であるが、3~4年ごとに豊作年に見まれ、40kg/haになる。豊凶は前年の天候にかなり左右され、高温乾燥の翌年は結実良

好となる傾向が見られた。豊作年に生産された種子の発芽率は高い。発芽率の年変動をみると、最低は1975年の1%、最高は1982年の50%で、発芽率にかなりの変動がある。豊作年では発芽率が高く、凶作年では豊作年の半分以下となる(坂口1952)。豊作年には発芽率が高い傾向が認められるが、凶作年、並作年では発芽率の変動幅が大きい。この点は採種園の特殊な受粉環境によるものと推察される。

### 2.2.2 本採種園におけるこれまでの研究

着花促進：ジベレリン(ジベレリン3)によるヒノキの着花促進試験を1983年と1984年に行った。葉面散布と枝包埋処理を実施し、包埋処理の効果が高いこと、ジベレリン濃度の高い方が効果は大きい、薬害も発生することから、2cmの枝径で5~10mgが適量であることを明らかにした。ジベレリン包埋処理効果も豊凶に左右されたが、無処理にくらべ雌花は3.5倍~30倍、雄花は3.5倍~4.6倍の効果がみられた(清藤ら1989)。

各クローンの種子生産量におけるジベレリン処理と無処理の相関は低かった( $r=0.01$ )。凶作年の無処理では、0.36g/枝であったが、ジベレリン処理により7.8g/枝で著しい効果がみられ、豊作年(7.45g/枝)と同様の種子生産量能力を引き出せることがわかった。しかし種子の充実率は、豊作年は50%であったが、ジベレリン処理で1.6%、無処理で2.6%で極端に低い値を示した。種子中のNPK養分を分析した結果、凶作年にジベレリン処理した種子は、無処理の種子の3~4割程度であった(清藤1984)。

自然自殖率：1987年と1988年の2年間の自殖率をアイソザイム遺伝子型頻度から求める方法(大庭ら1971)により推定した(清藤1990a)。その結果、1987年は、10.8~24.8%、平均16.1%で、1988年は8.1~19.0%、平均12.7%であった。自殖率を低くする要因として、着花促進による花粉濃度の増大にあることが推察された。

アイソザイム変異：12酵素種14遺伝子座をもちいて採種園の構成クローン群の遺伝子型を明らかにし、遺伝変異、クローンの同定を行った(清藤1992b)。その結果、青木ヶ原天然林にくらべ本採種園の方が、平均ヘテロ接合体率が高い結果を示した。このことは、富士山麓に存在する小集団(0.96ha)よりも採種園の方が選抜母集団が広いことに起因すると考えられた。アイソザイムによるクローンの同定率は94%であった。

構成クローンの開花期：1979年と1982年の2年間、開花期調査を実施し表2.2-2の結果を得た。それぞれ最も早く開花したものを1とし、それを基準に遅れるごとに順次、

2~の数値で示した。1979年、雌花は4月1日、雄花4月2日に開花を開始し、開花期間は雌花8~14日間、平均11.4日、雄花は4日~12日間、平均8.2日であった。一方1982年の調査においては、開花開始日は、雌花は3月26日、雄花3月25日であり、開花期間は雌花11~26日間、平均18.7日、雄花は3日~14日間、平均9.6日で、1979年より雌花の変動が大きかった。雌花先熟の傾向が両年とも認められ、雄花開花期間は意外に短いことが分かった。雌花開花期間に対する花粉の飛散期間の寄与(クローン間における雌花と雄花の重なり)について検討した。その結果、1979年は667組み合わせの内、全く重ならない組み合わせが4組み(0.6%)、50%以下の重なる組み合わせは24.3%を占め、全体平均では64.7%であった。一方、1982年は、675組み合わせの内、全く重ならない組み合わせが17組み合わせ(2.5%)、50%以下の重なる組み合わせは51.8%を占め、全体平均では48.2%であった(清藤1980、1983)。

花粉密度と種子稔性：園内の採種母樹・鯉沢4号を4ラメート用い、花粉飛散期間の花粉数を積算し、種子の充実率との関係を調べた。花粉調査木の樹冠の南・北に調査台を設け1.5mの高さの位置にスライドグラスを据え付け、1cm<sup>2</sup>当たりの花粉粒数を数えた。なお、4ラメート中、2ラメートは人為的にほぼ完全に除雄した。種子稔性はソフテックスを用いて充実率を調べた。その結果を表2.2-3に示した。自家受粉のチャンスを除くため雄花を除去したラメートでは、高い充実率を示した。しかし除雄しないラメートにおいても、同様の結果を示したラメートもみられた。上層下層にわけて採種したラメートNo.3とNo.4で上層下層間の種子を比較すると除雄木で高い充実率を示し、いずれも下層の方で充実率が高かった(清藤1983)。

カメムシ被害：ヒノキ発芽率の低下の原因として、1980年代に入ってカメムシ被害が指摘されるようになった。本園ではチャバネアオカメムシの被害が明らかになり、防虫ネットによる発芽率向上効果も明らかとなった(前掲図2.2-4)(清藤・相沢1989)。

雄花量調査：1998年と1999年の雄花着花調査をジベレリン処理と無処理に分け、各クローン3ラメートずつ5段階評価で行った。1998年のジベレリン処理区の各クローン平均指数は、1.1~4.2、平均2.3、無処理区は1.0~3.0、平均1.6であり、1999年では、ジベレリン処理区のそれは1.0~3.2、平均1.8、無処理区では1.0~2.0、平均1.1であった。ジベレリン処理した場合、クローン間の偏りが大きかった。図2.2-5に示したように、雄花の積算寄与率は無処理の方がジベレリン処理より平準化]

表2.2-2 各クローンの開花日と開花期間

精英樹名	開花日				開花期間			
	雌花		雄花		雌花		雄花	
	1979	1982	1979	1982	1979	1982	1979	1982
鯉沢1号	5	9	4	9	12	14	11	12
鯉沢2号	3	8	5	8	13	15	9	7
鯉沢3号	7	2	10	5	8	21	4	9
鯉沢4号	3	5	4	8	12	20	8	8
鯉沢5号	3	9		9	15	15		8
鯉沢6号	3	9	4	9	13	17	11	11
鯉沢7号	4	6	4	9	10	23	10	14
鯉沢8号	3	9	4	9	13	18	10	9
大月3号	6	5		9	10	20		5
伊那1号	8	8	10	8	10	19	6	5
南多摩1号	5	12	6	12	13	11	5	7
下伊那1号	5		8		11		8	
野尻3号		5		9		23		9
野尻7号	1	8	7	9	14	22	6	10
上松1号	7	3		9	10	25		9
上松4号	4	2	4	1	13	20	10	16
上松8号	4		10		14		6	
上松10号	6				12			
坂下3号	13	19	4	9	8	12	12	9
久慈1号	4	8	7	9	12	15	9	19
妻籠5号	6	8	4	8	12	20	10	11
丹沢1号						18		
丹沢3号	6	9	7	8	10	23	7	10
丹沢7号	6	2	6	9	11	26	7	10
丹沢8号	6	2	6		11		8	9
東京2号	7		3		7		6	
東京4号								
東京5号	10	5		12	9	21		10
片浦5号	1	5	2	10	13	23	8	3
三保2号	3	8	6	8	12	17	8	5
三保3号	6	13	6	9	10	13	8	8
王滝102号	8				13			
東京9号		8		8		16		16
平均	5.3	7.2	5.7	8.5	11.4	18.7	8.2	9.6
標準偏差	2.56	3.83	2.24	2.00	1.95	4.05	2.03	3.64
変動係数	48.3	53.4	39.3	23.6	17.1	21.6	24.8	38.0

1979年の開花開始日 4月1日(雌花)

1982年の開花開始日 3月25日(雄花)

表 2. 2 - 3 皷沢 4号採種木の種子形質と花粉密度

No.	球果数	精選種子重	球果当たり種子重	充実率	平均積算花粉密度	備考
1	347	32.5g	0.09g	43.0%	701	雄花除雄木
2	700	56.4	0.08	23.8	2,223	
3	2274	237.4	0.10	41.6	1,747	
上層	237	20.8	0.08	19.6		
下層	947	98.3	0.10	22.1		
4	635	57.9	0.09	42.6	1,287	雄花除雄木
上層	75	7.5	0.10	36.4		
下層	45	4.1	0.09	50.3		

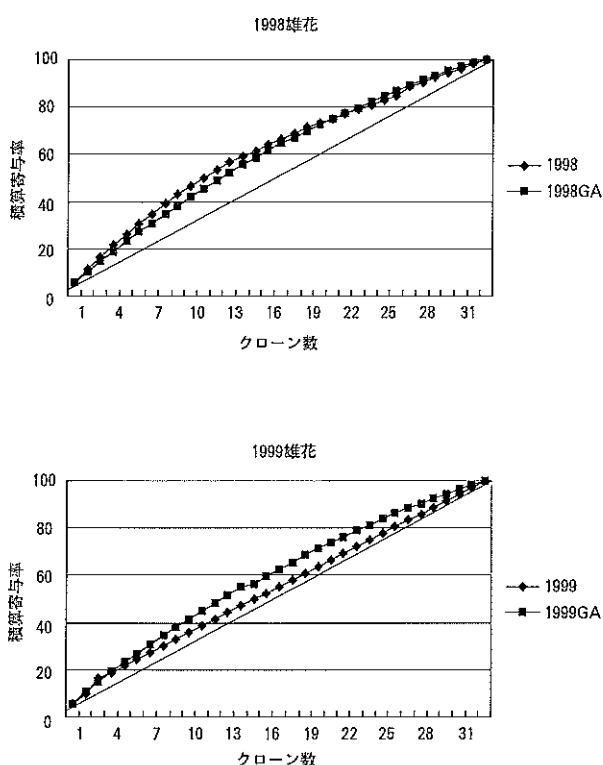


図 2. 2 - 5 雄花積算寄与率

された。しかし、自然状態（無処理）の雄花着花状況は各年、各クローンとも低かったことから、豊作年の雄花着花寄与率の検討も必要である。

### 第3章 ヒノキの父性遺伝マーカーの探索

#### 3.1 DNA 分析

##### 3.1.1 DNA (デオキシリボ核酸)

Mendel は、遺伝的形質が一定の規則をもって子孫の体内で消えることなく存在し、再び分かれて子々孫々に伝わることを発見した。そして、その規則性を説明するために、遺伝的形質を支配する因子が細胞内に存在しているとし、一つの形質を一つの因子が支配していると考

えた。この因子は、後に Johansen (1909) によって遺伝子 (gene) と名づけられた。Morgan (1911) は、染色体上に固有の座を占めていることを明らかにした。遺伝子に化学物質的基礎が与えられたのは、Avery *et al.* (1944) らが遺伝子をつかさどる物質はデオキシリボ核酸という物質 (deoxyribonucleic acid = DNA) であることを発見したことによる。

生命の要の物質としてタンパク質 (ポリペプチド) が個体のもつ多様な形質と直接・間接に関与しており、そのタンパク質の合成の設計が DNA であると考えられている。その DNA は塩基とよばれる化学物質であり、たった四つの塩基、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C) およびチミン(T) の塩基配列がすべての遺伝情報を担っている。塩基の内、AとT、CとGが塩基ペア (相補性) を形成し、二重らせん構造 (Watson and Crick 1953) を作る。DNA は多数の遺伝情報が書き込まれたテープのようなものであり、分子生物学的にみれば、狭義には、RNA (リボ核酸)、あるいはその RNA から作られるタンパク質を合成するのに必要な DNA 部分と言える。タンパク質を合成する遺伝子の場合、タンパク質の本体の構造にかかわる DNA 部分はコード領域と呼ばれている。DNA がもつ遺伝情報は、それをもとに RNA 合成される (転写) ことにより、RNA に伝達される。さらに RNA の情報は、RNA をもとにタンパク質が合成されること (翻訳) によりタンパク質へと伝わり、代謝活動を行う (田村・村松 1997)。

DNA は種により、個体によりその塩基配列が異なり、また DNA の量も異なる。したがってこの違いを比較すれば種、個体などの違いが明らかになる。DNA は、コード領域のようにタンパク質の構造に係わる保存性の高い領域から、非コード領域のように変異性が高い領域によって構成されている。

林木のような永年作物では、その生育期間は長い。し

たがって形態形質やアイソザイムでは、個体の発生・生育過程から分析使用できるまでの安定した段階に到達するまでには長い時間を必要とする。これに比べ DNA では、正確・簡便に遺伝情報を収集することが可能である。植物体には、大半を占める核 DNA と細胞小器官 (organelle) に微量な葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA が存在している。核 DNA は個体の識別に有力であり、オルガネラ DNA は家系・系統分析に威力を発揮する。

### 3.1.2 PCR を用いた多型の検出法

DNA 分析を遺伝・育種に応用する上での我々の関心は、遺伝的多型である。多型とは同一種内の正常な個体間で特定の形質について多様性が存在する状態を言い、特にそれが遺伝的な差異に基づく場合を遺伝的多型と言っている。遺伝的多型は普通、自然状態の正常な個体が有する多様性を指し、突然変異とは区別されるが、遺伝子=DNA という観点に立てば、多型・変異とは要するに DNA の一次構造の多様性のことであり、本質的には違いはない。

DNA の特定領域を迅速に単離・増幅する技術として、PCR (Polymerase Chain Reaction) が Mullis *et al.* (1986) によって発表されて以来、爆発的に発展し、遺伝的多型や突然変異を検出する技術は極めて容易かつシステムティックに行えるようになった。PCR の原理は、2種類のプライマー (特定の塩基配列) と *in vitro* で耐熱性ポリメラーゼによる鋳型特異的な DNA 合成反応を繰り返し、目的とする DNA 領域を数十万倍に増やす技術である。ここでは、林木における PCR を利用した主な多型の検出方法について、簡単に解説する。

#### 1) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)法

RAPD は、10 塩基程度の任意配列をプライマーとして用いた PCR である。これによって得られる DNA 多型を遺伝マーカーとして使うもので、少量の DNA で分析可能であり、しかも手法も簡単である。しかし優性マーカーであるので優性ホモ接合型とヘテロ接合型とを区別できないこと、また遺伝子増幅装置によりバンドパターンの再現性に乏しいなどの欠点がある。しかし育種における材料の管理には、これまでのアイソザイムに比べ、はるかに識別能力が高いため、種・品種の分類、親子鑑定に大いにその威力を発揮している (高田・白石 1996、檜崎ら 1996、後藤ら 1997)。また量的形質との連鎖した DNA、量的形質を支配する遺伝子座 (QTL) において、今後さらにその利用が期待されている (Grattapaglia

*et al.* 1995, Tuskan *et al.* 1996、近藤ら 1997、倉本ら 1999)。

#### 2) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法

AFLP は PCR により増幅された制限酵素断片の長さの差を検出比較する方法で、RFLP (後述) のようにプローブとなる DNA クローンが必要ないため、時間が短縮される。RAPD 法より多くのマーカーが得られる長所を持っている。しかし、RAPD に比較して操作性に難があるが、最近では RAPD に代わって用いられるようになってきた (Krauss and Peakall 1998、Krauss 1999、岡浦・小西 1999、原田 1999、陶山ら 1999)。

#### 3) MicrosatelliteDNA (SSR) と MinisatelliteDNA 法

マイクロサテライト DNA とは、数塩基 (2~6bp) の短い単位が、"CACACACA" のように反復している配列で、ゲノム中に多数散在している。反復数が多型性に富むため、ゲノム中にある特定のマイクロサテライト領域の両側のユニークな配列でプライマーを合成して PCR を行うことで、PCR 産物の長さの違いという形で遺伝的多型を検出することができる。マイクロサテライトが数塩基を単位に繰り返すのに対し、ミニサテライトは数 10bp を単位に繰り返すものをよんでいる。多くの生物種で、多種類のマイクロサテライト多型を検出するプライマーが販売されている。これらのプライマーによって検出されるマイクロサテライトが、染色体上のどこに位置するかがわかっているならば、注目する遺伝子がどのマイクロサテライト DNA 領域と連鎖しているかを調べることで、その遺伝子を染色体地図上に位置付けることができる。また、家系分析や野外個体群の系統関係の調査など、応用範囲は広い (深田・白石 1995、Ziegenhagen *et al.* 1998、Echt *et al.* 1999)。

#### 4) PCR-PFLP (restriction fragment length polymorphism)法

RFLP は直訳すれば制限酵素断片長多型である。DNA を特定の制限酵素で切断したときに、多型部位が制限酵素の認識部位にあると、その部位が切断されなくなる。逆に変異によって新たな制限酵素認識部位が生じることもある。通常は、complexity の高いゲノム DNA の中から RFLP を探すために、注目する領域をプローブとしたザンハイブリダイゼーションを行う必要がある。PCR 産物は既に特定の DNA 領域のみを増幅したもので、制限酵素で切断して電気泳動を行えば、すぐに RFLP の検索ができる。葉緑体 DNA の種間、種内変異

の探索に用いられている (白石・渡辺 1995、Tsumura *et al.* 1995、Kondo *et al.* 1998、陶山 1998、生方・飯塚 1999)。

#### 5) PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法

SSCP とは、1 本鎖 DNA 高次構造多型をいう。この手法は 1989 年、Orita *et al.* (1989a) によって開発された手法である。PCR 反応を用いて目的とする塩基配列を増幅し、その DNA 断片を一本鎖に変性したとき、DNA を非変性条件に戻すと、団子状 (ヘアピンループなど) の分子内高次構造を形成する。この分子内構造は 1 塩基の変異によっても大きく影響を受け、高次構造が変化する。この構造の違いは、非変性条件のポリアクリルアミドゲル電気泳動で移動度の違いとして検出できる。この手法は Hayashi (1991) によりさらに改良され、PCR-SSCP 法に発展した。サザン・ハイブリット法に比べ、微量の DNA を鋳型として塩基配列多型を検出できる手法である。サザンプロット法が制限酵素の認識塩基配列上の突然変異しか検出できないのに対し、PCR-SSCP 法は増幅した DNA 断片のどこに突然変異が起きていても検出でき、しかもこの操作が簡単で多くのサンプルを同時に処理することが可能である。林木では、種の同定 (Watano *et al.* 1995、檜崎ら 1996、Maeda and Shiraishi 1997、渡辺ら 1997)、種内変異の検出に用いられている (Shiraishi *et al.* in 2001)。

### 3.2 本実験で用いた分析法

ヒノキにおける DNA 塩基配列レベルでの遺伝情報は、これまで皆無に近い現状である。そこでより直接的遺伝・育種研究を進める上で必要となる DNA マーカーの開発研究を開始した。特に採種園内の交配実態を解析するためには花粉側の情報が必要である。そこで父性遺伝する葉緑体 DNA に着目し、多型の検出を図った。

#### 3.2.1 PCR-SSCP 法による葉緑体 DNA 塩基配列多型の検出

細胞質遺伝は、被子植物で葉緑体 DNA、ミトコンドリア DNA 両者は母性遺伝、針葉樹の葉緑体は父性遺伝する (Ohba *et al.* 1971、Neale *et al.* 1986)。Loblolly pine (Neale and Sedgwick 1989) Jack pine (Wagner *et al.* 1987) や Douglas fir (Neale *et al.* 1986)、Blue spruce (Stine *et al.* 1989)、ヒノキ属 (Kondo *et al.* 1998) では、DNA レベルで父性遺伝の検証が行われて

いる。

本研究では、父性遺伝マーカーを開発するため、葉緑体ゲノムの塩基配列多型のスクリーニングを行った。葉緑体 DNA 塩基配列多型をスクリーニングする手段として、非コード領域の PCR-SSCP 分析を用いた。

#### 1) 材料と方法

供試材料：林木育種センター九州育種場採種園から 43 ヒノキ精英樹クローン、大分県林業試験場のクローン集植所より 29 クローン、山梨県八木沢ヒノキ採種園から 33 クローン、合計 105 クローンから針葉を採集し、分析に用いた。それらは分析に供するまで冷凍保存しておいた。

全 DNA の抽出：DNA の抽出は、一般的な CTAB 法 (Murray and Thompson 1980、Doyle and Doyle 1987) を改良した白石・渡辺 (1995) の方法により行った。針葉 100mg を冷却した乳鉢に入れ液体窒素で摩砕し、それに抽出用緩衝液 1ml を加えた。抽出用緩衝液の組成 (1ml) は、100mM Tris-HCl (pH9.0)、2% CTAB (hexadecyl trimethyl ammonium bromide)、2%PVP (polyvinyl pyrrolidone)、0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol、1.4M NaCl、20mM EDTA である。ホモゲナイズした混合液を、65°C で 1 時間インキュベートした。これに等量のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加え 20 分間穏やかに混和した後、12,000×g、室温、10 分間の条件で遠心分離後、上澄み液を回収した。これを繰り返し、得られた溶液に酢酸ナトリウム 20  $\mu$ l とイソプロパノール 600  $\mu$ l を加え 10 分間放置した後、15,000×g、室温、5 分間遠心分離し、上澄みを除去した後、70%エタノールで洗浄した。それを 15,000×g、室温、5 分間遠心分離後、上澄みを完全に除去し、遠心式エバポレーターを用いて 3 分間減圧乾燥後、300  $\mu$ l の滅菌水を加え、以下の分析に用いた。DNA の精製は、THE GENECLEAN III Kit (BIO 101) を用いておこない、これを鋳型 DNA とした。

非コード領域の増幅：蛍光ラベルした PCR 産物をインナーマーカーとともに自動蛍光シーケンサーで電気泳動し、その泳動像を補正する方法を用いた。また、分析した領域は、葉緑体 DNA の転移 RNA 遺伝子間の 4 カ所における非コード領域 (*trnP-trnP* 領域 (CS2)、*trnLtrnF* 領域 (CS3)、*trnD-trnY* 領域 (CS4)、*trnP-trnW* 領域 (CS5)) である。反応溶液組成は、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、200  $\mu$ M dNTP Mixture、0.25  $\mu$ M Primer U、0.25  $\mu$ M Primer L、0.5units/ $\mu$ l



*AmpliTaQ* DNA polymerase, Stoffel Fragment, 3.0mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1ng/μl template DNA である。使用したプライマーとその塩基配列を表 3.2-1 に示した。PCR 反応の熱反応サイクルは、95°C で 60 秒間熱変性し、94°C で 30 秒間 (熱変性)・55°C で 30 秒間 (アニーリング)・72°C で 90 秒間 (伸長) の 3 ステップを 30 サイクル行い、最後に 72°C で 60 秒間伸長した。

PCR-SSCP 分析: 先ず得られた PCR 産物は、1% アガロースゲルを用い、0.5×TBE 緩衝液中で 100V・約 1 時間電気泳動し、増幅産物の確認を行った。PCR 産物が確認できたものは、滅菌水を加えて約 30 倍に希釈した。希釈液を 1μl とり、変性溶液 (96%formamide、20mM EDTA、0.05% bromophenol blue の混合物) 4μl と混合し、遠心エバポレーターで 10 分間減圧濃縮した後、94°C で 5 分間熱変性・急冷し、泳動用サンプルとした。電気泳動の条件は 5% 非変性ポリアクリルアミドゲルを用い、1200V、50mA、35W の条件で 180 分間行った。電気泳動データの解析は、Fragment Manager ver.1.2 (Pharmacia Biotech) により行った。

塩基配列分析: CS4 領域の SSCP 分析によって明らかとなった野生型(W)と、変異型(M)の個体から *TaKaRa ExTaq*<sup>TM</sup> (TAKARA) を用い、この DNA 領域を PCR 増幅した。反応溶液組成は、2mM Tris-HCl (pH 8.0)、100mM KCl、0.01mM EDTA、0.1mM DTT、0.05% Tween20、0.05% NonidetP-40、5% Glycerol、200 μM dNTP mixture、0.25 μM Primer U、0.25 μM Primer L、0.25units/μl *TaKaRa ExTaq*<sup>TM</sup>、2mM MgCl<sub>2</sub>、0.1ng/μl template DNA である。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで電気泳動し、目的の DNA 分画をゲルから切り出した。切り出したゲルの切片を QIAEX<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製し、PCR 産物を回収の後、シーケンスサンプルとした。シーケンス反応は AutoSequencer Core Kit (TOYOBO kk., LTD) を使用し、自動蛍光シーケンサー・ALF-red DNA Sequencer (Pharmacia Biotech) を用いて CS4 領域における野生型(W)と変異型(M)の塩基配列を決定した。泳動条件はシーケンスサンプル 20ng/1reaction、6% LongRanger シーケンスゲル、泳動バッファー 0.6×TBE、1200V、26mA、45W、50°C、600 分であり、ALFManager ver.2.6 でデータ収集解析を行った。

## 2) 結果と考察

転移 RNA 遺伝子間の非コード 4 領域を対象にして SSCP 分析を行った結果、PCR-SSCP 法により、簡便

にしかも迅速に葉緑体 DNA 上の種内変異をとらえることができた。*trnD-trnY* 間の非コード領域 (以下; CS4 領域と呼ぶ) において異なる移動度 (ピーク) を示す個体が認められ、その他の領域においては、用いた全てのサンプルに移動度の違いは認められなかった。本 SSCP 分析により、CS4 領域において、移動度の早い方を野生型(W)、遅い方を変異型(M)とした。図 3.2-1 にプライマー CS4-U と CS4-L の両方を蛍光ラベルしたプライマー (cyCS4U/cyCS4L) を用いて行った PCR-SSCP 分析のクロマトグラムを示した。各サンプルの移動度は、インナーサイズマーカー (IM110,IM171) によって補正した。インナーサイズマーカーと PCR 産物の相対的な位置関係は一定であるため、同一条件で分析を行えば、異なるゲルで電気泳動しても多数サンプルを簡便かつ正確に判別できる。その一例の泳動像を図 3.2-2 に示す。始良 46 号、大分 7 号、阿蘇 11 号は同一の移動度 (野生型) であるが、東臼杵 3 号のみが移動度の異なる波型 (変異型) である。そこで二本鎖 DNA のうち、どちらの一本鎖が対立遺伝子間で移動度に大きな違いが現れるかを明らかにするため、プライマー CS4U と CS4L の両方とも蛍光ラベルしたもの (cyCS4U/cyCS4L) (A) と、プライマー CS4U だけ蛍光ラベルしたもの (cyCS4U/CS4L) (B)、およびプライマー CS4L だけ蛍光ラベルしたもの (CS4U/cyCS4L) (C) の 3 種について、PCR-SSCP 分析し、その比較を行った。結果を図 3.2-3 に示す。移動度の違いは、プライマー CS4U をラベルした方が CS4L をラベルしたよりもモビリティ・シフトは大きく、cyCSU/CS4L のプライマー組合せを用いた方が解析には有効であることが明確になった。

今回用いた各採種園、集植所の構成精英樹クロンの葉緑体 DNA ハプロタイプをまとめると表 3.2-2 のようになった。その結果、九州育種場の採種園では変異型が 2 クローン 5%、大分県林業試験場集植所では 5 クローン (17%)、山梨県の採種園は 1 クローン、3% であった。全体では分析した 105 クローンのうち、8 クローンが変異型 (8%) を示した。変異型ハプロタイプは、伊佐 1 号、嘉穂 4 号、薩摩 8 号、三重 5 号、竹田 8 号、東臼杵 3 号および飯沢 5 号であった。

SSCP 分析は塩基配列に特異的な二次構造を形成するが、野生型、変異型のハプロタイプの移動度の違いはどのような塩基配列多型に起因しているのかを明らかにするため、両葉緑体 DNA ハプロタイプの塩基配列の決定を行った。結果を図 3.2-4 に示す。非コード領域の塩基

表 3. 2-1 葉緑体 DNA の 4 領域増幅に用いた PCR プライマー

DNA 領域	プライマー	
	プライマー	塩基配列 (5' to 3')
<i>trnL</i> intron (CS2)	CS2U	CGAAATCGGTAGACGCTACG*
	CS2L	GGGATAGAGGGACTTGAAC*
<i>trnL-trnF</i> spacer (CS3)	CS3U	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC*
	CS3L	ATTTGAACTGGTGACACGAG*
<i>trnD-trnY</i> spacer (CS4)	CS4U	TGACAGGGCGGTACTCTAAC
	CS4L	CGATGCCCGAGTGGTTAATG
	cyCS4U	Cy5-TGACAGGGCGGTACTCTAAC
	cyCS4L	Cy5-CGATGCCCGAGTGGTTAATG
	sCS4U	TGTAACACGACGGCCAGTTGACAGGGCGGTACTCTAAC
<i>trnP-trnW</i> spacer (CS5)	CS5U	TTGGTAGCGTGTGTTTGGG
	CS5L	TACGGCATCAGGTTTGGAGAC

表 3. 2-2 ヒノキにおいて見出された 2 つの葉緑体 DNA ハプロタイプの頻度

採種園/集植所	ハプロタイプ		
	合計	野生型	変異型
九州林木育種場採種園	43	41 (0.95)	2 (0.05)
大分県林業試験場 クローン集植所	29	24 (0.83)	5 (0.17)
山梨県八木沢採種園	33	32 (0.97)	1 (0.03)
合計	105 (100)	97 (0.92)	8 (0.08)

( ): 頻度

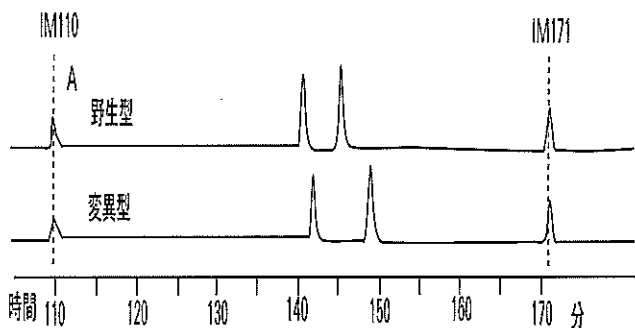
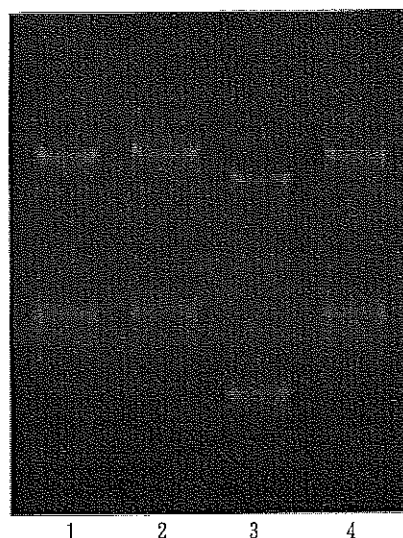


図 3. 2-1 cyCS4U/cyCS4L プライマーによる葉緑体 DNA ハプロタイプクロマトグラム



レーン 1 : 始良46号  
 レーン 2 : 大分7号  
 レーン 3 : 東白杵3号  
 レーン 4 : 阿蘇11号

図 3. 2-2 SSCP 分析による CS4 非コード領域の電気泳動パターン

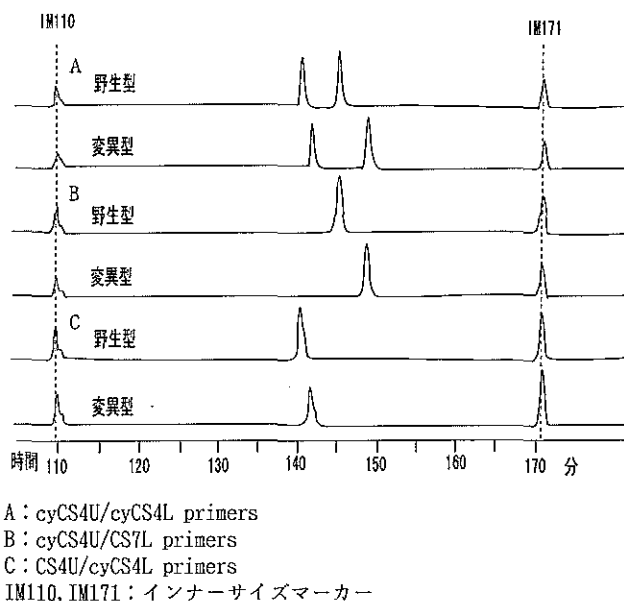


図3. 2-3 葉緑体 DNACS4 非コード領域の SSCP クロマトグラム

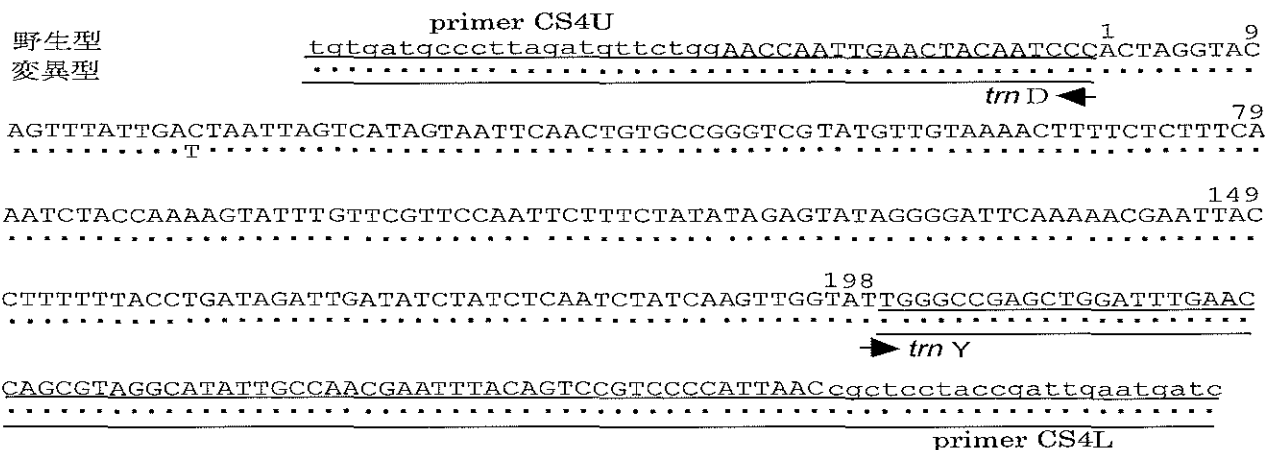


図3. 2-4 葉緑体 trnD-trnY 遺伝子間の非コード領域における塩基配列

配列の長さは、198 塩基対であった。野生型と変異型の塩基配列を比較すると、20 塩基目の C (野生型) と T (変異型) の塩基置換が認められた。他の配列は全く同一であった。以上のことから、CS4 領域に一塩基置換の多型が存在し、この塩基配列上の差異が SSCP 分析による移動度の違いとなって現れることがわかった。

以上の結果から、CS4 領域のこのマーカーは実際の分析に有用な多型マーカーとして使えることが示唆された。PCR-SSCP 分析により葉緑体 DNA の種内変異をスクリーニングすることができ、自動蛍光シーケンサー分析により多検体の分析も比較的容易に行うことができることが明らかとなった。塩基配列を決定したことによ

り、一塩基置換が一本鎖 DNA の二次構造の差異となってあらわれていたことが判明した。今後さらに分析を行っていない多くの領域についても塩基配列多型を検索することにより、さらに有用な葉緑体 DNA マーカーが開発でき、遺伝解析に利用できることが予見される。

### 3.2.2 CS4 マーカーの父性遺伝の検証

これまで針葉樹の葉緑体 DNA 研究は PCR-RFLP やサザンハイブリダイゼーションを用いて行われてきた (Neale *et al.* 1986、Tsumura *et al.* 1994、1995、白石・渡辺 1995、渡辺ら 1996、Kondo *et al.* 1998)。ここでは、PCR-SSCP 分析により、CS4 領域の塩基配列

表3.2-3 5組の交配家系における葉緑体 DNA ハプロタイプの分離

家系； 交配組み合わせ (♀×♂)	葉緑体ハプロタイプ		
	合計	野生型	変異型
家系A； 始良32号(W)×薩摩8号(M)	184	4 (2.2%)	180 (97.8%)
家系B； 伊佐1号(M)×始良47号(W)	50	49 (98.0%)	1 (2.0%)
家系C； 伊佐1号(M)×始良6号(W)	127	123 (96.9%)	4 (3.1%)
家系D； 始良32号(W)×始良6号(W)	28	28 (100%)	0 (0.0%)
家系E； 鰺沢5号(M)×鰺沢5号(M)	11	0 (0.0%)	11 (100%)

W：野生型 M：変異型

多型を DNA 分子マーカーとして利用するにあたり、ヒノキの葉緑体 DNA の父性遺伝について検証した。

### 1) 材料と方法

供試個体は、始良32号(葉緑体DNA型；W)×始良6号(W)、伊佐1号(M)×始良47号(W)、伊佐1号(M)×始良6号(W)、始良32号(W)×薩摩8号(M)および鰺沢5号(M)×鰺沢5号(M)5交配家系の母樹・花粉親およびF<sub>1</sub>個体群を用いた。DNA分析は、3.2.1の方法に準じて行った。

### 2) 結果と考察

供試した各交配家系のF<sub>1</sub>子供群の葉緑体DNAハプロタイプを表3.2-3に示した。家系Aの両親は野生型×変異型であるので、子供群は全て変異型となるはずであるが、結果は184サンプル中変異型が180サンプル(98%)であった。家系Bは変異型×野生型であるので、子供群は野生型になると期待される。結果は野生型が50サンプル中49サンプル(98%)であった。家系Cでは同じく変異型×野生型であるので、子供群は野生型となることが期待される。結果は127サンプル中123サンプル(97%)が野生型であった。家系Dは野生型×野生型であるので野生型が期待される。結果は28サンプル中すべて(100%)が野生型であった。家系Eは変異型×変異型であるので、変異型が期待され、結果は11サンプル中100%変異型であった。以上のことから、約97~100%の個体が父親の葉緑体DNAハプロタイプを示し、ヒノキにおいても葉緑体DNAはおおむね父性遺伝することが明らかとなった。これまで針葉樹において葉緑体DNAの父性遺伝を明らかにした例としては、Szmidt *et al.* (1988) の *Picea* 2種、Neal and Sedeeff (1989)

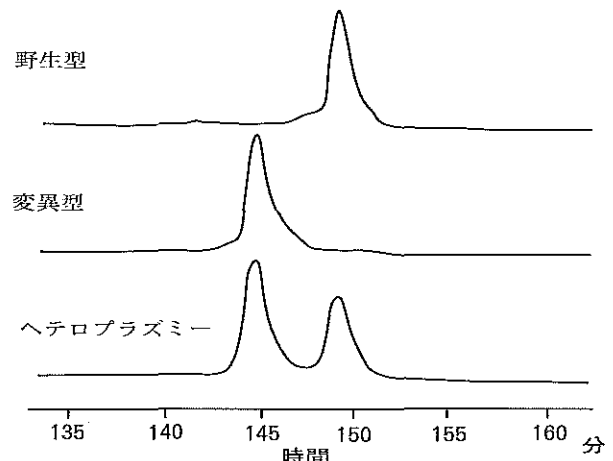


図3.2-5 鰺沢5号(TKZ5)の自然受粉による子供群で出現したCS4非コード領域葉緑体ハプロタイプのクロマトグラム

の Loblolly pine、Wagner (1989) の Jack pine、Ziegenhagen *et al.* (1995、1998) の Silver fir、Kondo *et al.* (1998) のヒノキ属種間雑種等がある。Kondo *et al.* (1998) はヒノキ×サワラの種間雑種4個体において、葉緑体DNA、ミトコンドリアDNAのサザンハイブリダイゼーション分析を行い、雑種すべてが父親型(サワラ)を示したことから父性遺伝を立証した。今回の結果において示されたように、ヒノキでは完全な父性遺伝ではなく、母親由来の葉緑体DNAハプロタイプを示すものも若干あり、葉緑体DNAが完全な父性遺伝をしている結果には至らなかった。後の章で詳しく触れるが、自然受粉の発芽種子の発芽の段階において、低頻度ではあるが同一個体内に野生型と変異型の両方を保有するヘテロプラズミー(Heteroplasmy)の例が確認された。その一例として鰺沢5号における自然受粉種子のクロマトグラムを図3.2-5に示した。これらの個体は完全な父性遺伝を行うのではなく、若干の母性遺伝を行っている可能性もある。しかし、母親の葉緑体DNAは多くの個体で消失しており、受精後に葉緑体を排除する機構が存在すると考えられる。ミトコンドリアにおいては母性遺伝が行われており、精子のミトコンドリアDNAは、受精後排除されることが明らかとなっている(金田・米川1998)。同じオルガネラDNAである葉緑体にも同様な機構が存在する可能性はあると思われる。

以上本研究の結果、ヒノキの葉緑体DNAが父性遺伝していることがDNAレベルで明らかになった。DNAマーカーは、遺伝情報を直接反映し、環境や発育段階などの要因に影響されないマーカーであり、これまでの形態形質、色素やアイソザイムなどでは困難とされてきた

分析を可能にする。DNA レベルでの検証は、サザンハイブリダイゼーション、RFLP 分析では、多数のサンプルについて分析することは困難であった。本研究で用いた PCR-SSCP 分析法は、実験操作が比較的簡便で、多数のサンプルについてより短時間で分析できる手法であるため、効率よく遺伝情報を収集するには適した手法であり、採種園の交配実態の解析には最適な方法であることが明らかとなった。

#### 第4章 ヒノキ採種園における花粉の有効飛散距離の推定

##### 4.1 はじめに

採種園は限られたクローンで構成され、その交配様式は、任意交配を前提にしている。花粉の側から見ると、構成クローンの花粉生産量が等しく、しかも外部からの花粉汚染を防ぎ、すべての構成クローンの花粉が受精に均等に寄与する条件を整えることが理想とされている。このため花粉の飛散動態を知ることは、生産される種子の遺伝的特性の把握・管理の基礎資料の一つとして重要な位置を占める。花粉の飛散距離、飛散分布を明らかにするため、これまで、孤立木の充実種子割合からの花粉飛散距離の推定 (Johnson and Critchfield 1945)、アイソトープでラベルした花粉による飛散状況の把握 (Koski 1970)、父性遺伝する色素体変異 (古越 1978)、優性遺伝子によって支配されている色素体変異 (Langner 1959)、劣性遺伝子である色素体変異 (Squillace and Kraus 1963) をマーカーとして用いた飛散範囲の推定、花粉密度からの推定 (金指ら 1984)、さらにアイソザイムマーカーを用いた例 (Shen *et al.* 1981, El-Kassaby *et al.* 1986, Burczyk *et al.* 1997) などがある。しかし、採種園の花粉飛散に関する情報はかならずしも十分ではなく、ヒノキについては見あたらない。

第3章で明らかにしたように、ヒノキ葉緑体 DNA の *trnD-trnY* 間の非コード領域 (CS4 領域) に、一つの塩基置換のあることを見いだした。PCR-SSCP 分析を用い、この種内変異 (野生型と変異型) を簡便に判定する方法を開発した。本論文の研究対象とした採種園の構成精英樹 33 クローンのうち、餓沢 5 号の 1 クローンのみの変異型である事は既に 3 章で明らかにした。

本章においては、変異型の葉緑体 DNA ハプロタイプを保有する餓沢 5 号をマーカー木として利用した。このマーカー木からの有効花粉飛散範囲と花粉濃度について推察した。

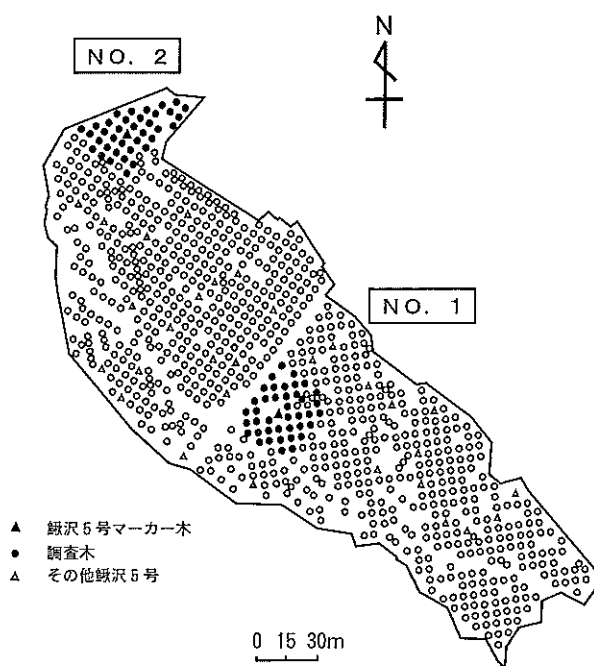


図 4.1 花粉飛散調査位置図

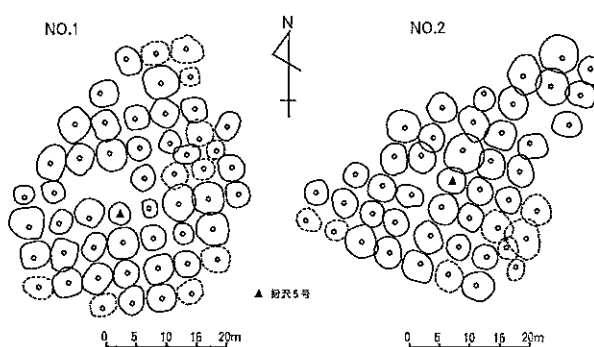


図 4.2 花粉飛散調査地の樹冠投影図

##### 4.2 材料と方法

本採種園で唯一、変異型の葉緑体 DNA ハプロタイプを持つ餓沢 5 号をマーカー木とし、同一クローンが周辺にない地点に試験区を設定した。試験区は、1 号園 (No. 1) と 2 号園 (No. 2) に各 1 ヶ所設けた (図 4.1)。試験区 No. 1 ではマーカー木の周辺 40 母樹を、No. 2 ではマーカー木周辺の 37 母樹を調査対象木とした。マーカー木の風上方向では飛散花粉の密度が低いと考え、風下方向の母樹を多く含めるようにした。この結果、マーカー木から、試験区 No. 1 では、5~26m、No. 2 では 5~29 m となった。試験区 No. 1 のある 1 号園は、前年に全個体に対し、樹冠の下部から中層部にある 5 枝を選び、枝径 2cm の位置に CMC (Sodium Carboxymethyl Cellulose) を混ぜた 5mg のジベレリンを包埋し、着花促進処理を行った。

試験区 No.2 のある 2 号園は着花促進処理を行わず、自然状態のままとした。各調査個体の平均樹高、平均胸高直径は、No.1 で 4.8 m、21.6 cm、No.2 で 5.6 m、25 cm である。各試験区におけるクローネの発達状況を図 4.2 に示す。両試験区ともほぼ閉鎖状態に近づいているが、No.1 の方が空隙は大きい。10 月にそれぞれの調査木からランダムに球果を採取し、種子を脱種して分析に供した。

DNA 分析のための供試種子は、低温湿層処理した後、発芽させた。発芽の後、胚軸（幼根の部分）が 5~10 mm 前後に伸びた段階で、子葉部分を含まないように幼根のみを摘出した。全 DNA の抽出は、抽出の迅速化をはかるため、Jhingan (1992) の方法を応用した抽出キット ISOPLANT（和光純薬）を用いて行った。DNA 分析には各個体当たりランダムに選んだ約 50 サンプルを使用した。供試分析サンプル数は、試験区 No.1 で、2,020 サンプル、No.2 で 1,850 サンプル、計 3,870 サンプルである。得られた DNA を鋳型とし、葉緑体 DNA 上の CS4 非コード領域を PCR により増幅した。ここでは CS4 領域の SSCP 分析の迅速化を図るために、新たに 2 プライマー（CS4U と CS4L2）を設計・合成した。これらのプライマーの塩基配列は、  
CS4U : 5'-TGACAGGGCGGTACTCTAAC-3'、  
CS4L2 : 5'-GGCACAGTTGAATTACTATGACTA-3' である。

プライマー CS4U の 5' 端は Cy5 (Amersham) で蛍光ラベルされている。PCR 反応は、鋳型 DNA 濃度を 0.1ng/μl とし、10 mM Tris-HCl, pH8.3、50 mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、200 μM 各 Dntp、0.25 μM 各 primer、0.5 units/μl AmpliTaq DNA polymerase (Perkin-Elmer) である。PCR 反応は、サーマルサイクラーを用い、95°C・60 秒で熱変性した後、94°C・30 秒（変性）、55°C・30 秒（アーニリング）、72°C・30 秒（伸長）の 3 ステップを 25 サイクル行い、最後に 72°C・60 秒間伸長した。

SSCP 分析は、増幅された PCR 産物を約 3 倍量の滅菌水で希釈し、この希釈溶液 1 μl に loading buffer (96% ホルムアミド、20mM EDTA、0.05% Tartrazine、Inner size marker) 4 μl を加え、10 分間遠心エバポレータで濃縮した。その後、94°C で 5 分間熱変性後、水中で急速冷却し、電気泳動用サンプルとした。電気泳動は自動蛍光シーケンサー (Pharmacia LKB, ALFred) を用い、0.6x TBE を含む 5%

Native Long Ranger™ゲルと 0.6x TBE 泳動緩衝液で行った。泳動条件は、20°C、35 W、70 分である。電気泳動データの解析には Frag-ment Manager ver.1.2 (Pharmacia Biotech) を使用した。

#### 4.3 結 果

葉緑体 DNA は、細胞質遺伝し、針葉樹では父性遺伝する (Neale *et al.* 1986、Neal and Sedeeroff 1989)。本研究で DNA 分子マーカーとして用いたヒノキの葉緑体 DNA 種内異変も、3 章で述べたように、高い確率で父性遺伝することが確認された。本採種園構成クローンのうち、鯨沢 5 号が唯一の変異型であるので、変異型の葉緑体 DNA ハプロタイプを示す種子は、鯨沢 5 号からの飛来花粉で受精したことを意味する。すなわちマーカー木周辺の調査個体の種子サンプルから変異型種子の出現状況を調査することにより、鯨沢 5 号からの花粉飛散範

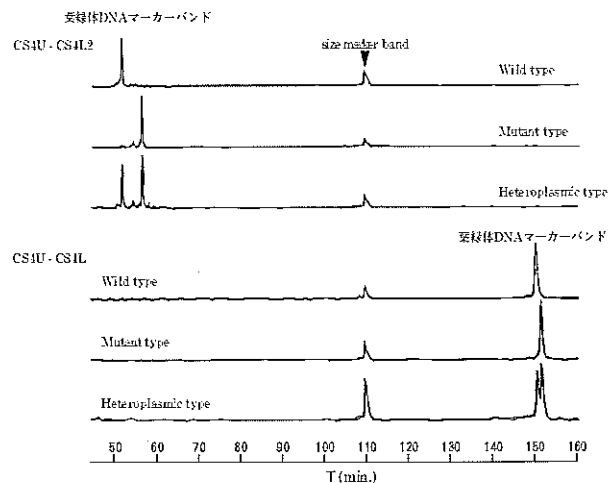


図 4.3 CS4 の 2 種類のプライマー組合せによる葉緑体 DNA ハプロタイプクロマトグラムの比較

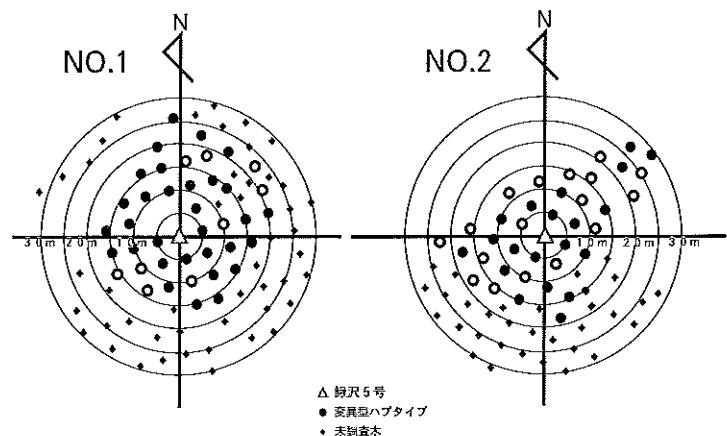


図 4.4 各調査区におけるマーカー木・鯨沢 5 号からの花粉飛散

表4.1 各プロットにおける変異型ハプロタイプ出現率とその寄与率

Plot	マーカー木からの距離	調査個体数	調査個体数当たりの変異型出現率	個体当たりの平均変異型出現率	最小～最高	寄与率	積算寄与率
No.1	0～5m	3	100%	22	10～32%	57.1%	57.1%
	5～10	7	71.4	6.9	0～26	17.9	75.0
	10～15	16	87.5	3.3	0～10	8.6	83.6
	15～20	9	66.7	3.3	0～12	8.6	92.2
	20～25	4	50	1.0	0～2	2.6	94.8
	25～30	1	100	2.0	2	5.2	100.0
	平均	40	77.5%	5.1%			
No.2	0～5m	4	75%	3%	0～6%	30.3%	30.3%
	5～10	8	75	2	0～2	20.2	50.5
	10～15	12	50	1.5	0～2	15.2	65.7
	15～20	6	33.3	1.1	0～2	11.1	76.8
	20～25	4	25	1.0	0～4	10.1	86.9
	25～30	3	66.7	1.0	0～2	13.1	100.0
	平均	37	54.1%	1.7%			

表4.2 各精英樹クローンにおけるマーカー木との受精

clone	0m	-5m	-10m	-15m	-20m	-25m	-30m
1 鯉沢1号			□			□	
2 鯉沢2号				●□■			
3 鯉沢3号			■				
4 鯉沢4号				○●□	●		
5 鯉沢5号	●■						
6 鯉沢6号		●		□■			
7 鯉沢7号		■				■	
8 鯉沢8号						□	
9 大月3号				●□			
10 伊那1号			●■	●			
11 南多摩1号					●		
12 下伊那1号					●		
13 野尻3号			■	●	●		
14 野尻7号			■	●●			
15 上松1号		●			●		
16 上松4号				●■	□		
17 上松8号					●		
18 上松10号			●□			□	
19 坂下3号				●		○	
20 久慈1号				○			
21 妻籠5号			●	●			
22 丹沢1号			●		○		●
23 丹沢3号				■	□		
24 丹沢7号		●	■		○		□
25 丹沢8号				□			
26 東京2号			●				
27 東京4号		□	○		■□		
28 東京5号							■
29 方浦5号				●●		●	■
30 三保2号		■		●■	○	●	
31 三保3号				□			
32 王滝102号			○■	●	■	○	
33 東京9号		■			□		

(注) ●: 調査区No.1の調査木に変異型ハプロタイプのみ出現  
 ○: 調査区No.1の調査木に野生型ハプロタイプのみ出現  
 ■: 調査区No.2の調査木に変異型ハプロタイプが出現  
 □: 調査区No.2の調査木に野生型ハプロタイプのみ出現

圃とその密度分布を明らかにすることができる。

PCR-SSCP 分析の効率化を図る目的で、CS4 領域を PCR 増幅する新たな 1 対のプライマー (CS4U、CS4L2) を設計した。このプライマー対によって 89bps の PCR 産物が増幅される。3 章で使用したプライマー対 (CS4U、CS4L) と今回設計したプライマー対による SSCP 分析の比較を図 4.3 に示した。新プライマーの PCR 産物は旧プライマーに比べ著しく短いために、これまで、1 回の分析に約 2 時間 30 分を要していたが、約 1 時間で分析可能となった。また、新プライマーでは、野生型ハプロタイプと変異型ハプロタイプ間のモビリティシフトが大きく、ハプロタイプの識別が極めて容易に行えるように改良された。このように、新プライマーを用いることにより、分析効率と判定の信頼性を大幅に向上することができた。

図 4.4 に、各試験区の立木位置図を示した。図上にマーカー木を中心とした 5m ほどの同心円を入れ、マーカー木からの距離を示した。各調査対象木の分析サンプル (約 50 種子) 中、1 種子でも変異型ハプロタイプが検出された個体を● (黒丸) で示した。この場合、変異型とヘテロプラスミーを合わせたものを●で記してある。○ (白丸) は変異型ハプロタイプが検出されなかった野生型ハプロタイプ個体である。

試験区 No.1 (GA 処理区) では、調査範囲においてマーカー木から最長距離 (26m) に位置する個体で、マーカー木の花粉による受精が確認された。No.2 (無処理区) でも 29m 地点の個体でマーカー木との受精が認められた。花粉飛散時期の主風は北東に向かって吹いている。しかし変異型ハプロタイプが出現した個体の分布は、マーカー木の風下方向ばかりでなく、さらに広範囲に及んでいた。

試験区 No.1 では、5m から 26m の調査範囲の全調査個体 (40 個体) のうち、マーカー木の花粉による受精が確認された個体の割合は 77.5% と高かった。また No.2 では 54.1% の個体がマーカー木の花粉で受精していた (表 4.1)。試験区 No.1 の個々の調査対象木内における変異型ハプロタイプ種子の出現頻度は、0~32%、平均 5.1% であったのに対し 試験区 No.2 では、0~6% 平均 1.7% と低かった。試験区 No.1 のマーカー木の最隣接 3 個体 (5m 以内) における変異型ハプロタイプ種子出現頻度は、それぞれ 10%、24%、32%、平均 22% でマーカー木の花粉が隣接周囲木の交配に与える影響は非常に大きいという結果が示された。一方、試験区 No.2 では、マーカー木の最隣接 4 個体 (5m 以内) における出現頻

度は、0%、2%、4%、6% であり、平均 3.0% で No.1 に比べ極端に低かった。

マーカー木からの距離を 5m ごとにまとめ、各距離範囲に含まれる個体の変異型種子出現頻度の平均値を比較した。(表 4.1) 試験区 No.1 では、周囲 5m 以内の個体に対するマーカー木の花粉親としての寄与率は、57.1% であった。さらに 10m までの累積寄与率は 75%、15m までは 83.6% となり、20m までで 90% を超えていた。一方、試験区 No.2 は、全体に頻度が低いので距離による差はそれほど大きくなかった。したがってその累積寄与率をみても緩やかな増加を示し、25m までに至ってようやく累積寄与率が 80% を超えた。いずれにしても 1 個体当たりの変異型の出現頻度は、試験区間で大きな差異が認められたが、両試験区とも距離に比例して減少する傾向が見られた。

採種圃を構成する各クローンのマーカー木との受精の有無を調べた (表 4.2)。

33 クローン中 5 クローン (15%) がマーカー木との受精に関与していなかった。試験区 No.1 では、調査範囲内にある 24 クローン中 1 クローンにおいて鯉沢 5 号の花粉による受精は認められなかった。また、試験区 No.2 では、24 クローン中、4 クローンであった。距離別では 5~10m で 1 個体、10~15m で 3 個体、20~25m で 1 個体であった。これらのクローンの内、一番マーカー木に近かった鯉沢 1 号は、マーカー木である鯉沢 5 号の風上 10m に位置していた。

#### 4.4 考 察

古越 (1978) は、スギにおいて葉緑体色素異常である黄金スギ遺伝子をマーカーとして用い、モデル採種圃における花粉飛散を調べた結果、有効飛散距離は 10m 未満であると報告している。また、同じ黄金スギ遺伝子をマーカーにして閉鎖しはじめた採種圃における調査でも、有効飛散距離は 9m、最大でも 10m から 15m 程度であると推定されている (山手・大庭 1974、1979)。このことから古越 (1978) は、スギ採種圃における実用的な有効飛散距離は 10m 以内であるとした。一方、金指ら (1984) は、スギ採種圃の雄花の着生がほとんど無いかかなり疎開した状態で、飛来した花粉の内訳は、試験木自体の花粉が 15%、隣接周囲木が 54% であり、65m から 150m 離れた遠方からの花粉も 30% を占めることを報告している。

Shen *et al.* (1981) は、Scots pine の採種圃において、



アイソザイムマーカーを用い、マーカー木からの距離、開花の同調性、風向と花粉飛散状況との関係を解析している。その結果、隣接木への寄与率は31.4%であり、10m以内の個体にはかなり寄与していることを明らかにした。10m - 20m離れた個体に対しても花粉を供給していたが、10m以内より低かった。また40m以上離れた個体や風上の個体への寄与はほとんどないことを報告している。

室内実験的に測定した無風時のヒノキの花粉の落下速度は、秒速6cmであった(清藤 未発表)。このことは無風の状態で5mの木から落下して地上にとどくまでに約1分半かかることを意味する。また飛散時期にこの採種園内で測った平均風速は、2.04m/sec、最大平均4.6m/secであった(清藤 1983)。したがって風があるときかなり遠くまで飛ぶことも予想される(岩波 1981、金指ら 1984)。両試験区の調査最長地点においても低頻度ではあるが花粉飛散が確認されたことから、花粉の拡散がさらに風下に向かって起こっている可能性が高いと思われる。試験区 No. 1 では、全調査木のうち、変異型種子が検出された個体の割合は77.5%と高い。これに対し、試験区 No. 2 では、54.1%であった。この両者の変異型種子出現個体率の違いは、試験区 No. 1 が GA 処理による着花促進処理区であることから、マーカー木の花粉生産量の違いが最も大きな原因であろう。

本採種園では、主風は北東に向かって吹いている。しかし主風の風下に偏った花粉飛散を示す明白な結果は、今回得られなかった。主風に関係なく花粉が広範囲に拡散していたことから、風がかなり乱流していると考えられる(Di-Giovanni and Kevan 1991、Webber and Painter 1996)。隣接周囲木における各個体当りの変異型種子出現率は、試験区 No. 1 で平均22%であった。一方、試験区 No. 2 ではわずか3% (平均値) であった。隣接周囲木の交配に関与する可能性は、個体の花粉生産量により異なるが、十分な雄花着花量がある場合は、接近木にはかなりの花粉濃度で飛散し、距離が離れるにつれて花粉密度は低下していくと考えられる。

本採種園構成クロウンの開花期は、2章2.2で述べたように、雌花で約2~3週間、雄花で10日間のクロウン間差があるが、ほぼすべてのクロウン間で交配が可能な条件にある。表2.2-2の1982年の開花日と開花期間のデータから明らかなように、マーカー木諏沢5号との受精に関与しなかった5クロウンは、開花期が原因とは考えにくい。考えられるのは、マーカー木の花粉飛散濃度

に原因があると思われる。その根拠として、着花促進処理を行わなかった試験区 No. 2 のクロウンがほとんどであったことから明らかである。マーカー木との受精頻度には個体間距離が影響すると思われるが、今回の調査では変異型ハプロタイプの出現率と距離との間にならずとも相関関係は認められなかった。このことから、各個体の受精は、マーカー木から飛んでくる花粉濃度ばかりでなく、周辺個体からの相対的花粉濃度が大きく影響していると考えられる(金指ら 1984)。自然着花に委ねられた試験区 No. 2 の場合は、各距離範囲での変異型出現頻度がいずれも低く、寄与率の差も小さかった。今回の解析では、マーカー木の花粉飛散を考えたが、同一クロウンの他のラメートからの影響が完全には取り除かれていない。試験区 No. 1 では、マーカー木と最も接近しているラメートとの距離は11mであったが、このラメートは風下にあるので、ほとんど影響を受けていないであろう。またマーカー木の北西12mの位置にもラメートがあった。それに隣接する調査個体の変異型出現率は2%であったので、これらのラメートの影響は非常に少ない。一方、No. 2 のマーカー木と一番近い距離にあるラメートは、風上方向に40m離れており、調査木のうち、このラメートに最も近い距離の調査木(20m)の変異型種子出現率は0%であったので影響はほとんど受けていないと考えて良いであろう。

採種園管理において必要となる情報としては、花粉がどこまで飛散するかより、受粉に係わる有効花粉飛散範囲が問題である。本採種園は33クロウンで構成されているので、任意交配がおこなわれるためにすべての構成クロウンが花粉親として等しく寄与すると仮定すれば、花粉親としての期待寄与率は1/33、すなわち3.0%になる。そこで花粉の有効飛散距離を、マーカー木との受精率がこの期待寄与率以上の値を示した地点とした。その結果、試験区 No. 1 で3%以上の出現頻度を示した地点は、20mであり、No. 2 では22.5mであった。採種母樹の樹高が当然花粉飛散に影響する(Shen *et al.* 1981、Webber and Painter 1996)。本調査結果の有効花粉飛散距離は、マーカー木の樹高のほぼ4倍を示した。花粉供給木の樹高によってもまた風の状況によっても飛散距離は変わるが、ヒノキ採種園では、断幹処理が一般的に行われているので、成熟した採種園での有効飛散距離は、実用的には20m以内と考えるのが妥当であろう。

ランダム交配を前提としている採種園において、クロウン当たりの寄与率を均一にするという視点から考えると、

人為的な着花促進により花粉濃度を高めた場合は周囲隣接木に過度の影響を与える可能性がある。したがって出来るだけ自然着花による方が結果的に理想的なランダム交配により近い種子生産が行われる可能性が示唆された。

本章では、花粉飛散の状況を葉緑体 DNA マーカーにより明らかにした。これまでは、アイソザイムによる採種園の遺伝解析が主であった (Shen *et al.* 1981, El-Kassaby *et al.* 1986)。分子生物学の進歩により、環境や生育段階の影響を受けずに、遺伝情報を比較的容易に取り出すことのできる DNA 分析技術が日進月歩で進んでいる。そして葉緑体 DNA において、その父性遺伝が、*Pseudotsuga*、*Pinus* などの針葉樹類で明らかにされてきた (Neale *et al.* 1986, Neale and Sedeeroff 1989, Ponoy *et al.* 1994, Kondo *et al.* 1998)。これまで葉緑体 DNA 分析は RFLP、サザンハイブリダイゼーションが主流であったが (Kondo *et al.* 1986, Wagner *et al.* 1987, Szmidi *et al.* 1988, Wagner 1992, Tsumura *et al.* 1994, 白石・渡辺 1995, Ziegenhagen *et al.* 1995)、今回使用した PCR-SSCP 法 (Orita *et al.* 1989ab, Hayashi 1991) は、分析が簡便・迅速であり、今回の採種園管理技術の基礎情報を得るために大量のサンプルを分析する必要がある場合には、きわめて有効であることが実証された。

## 第5章 ヒノキ採種園における自殖率の推定

### 5.1 はじめに

自然界での繁殖は、与えられた条件の中で相応し増殖の結果として種子生産が行われている。風媒花であるヒノキもヘテロ接合型の他殖性植物であるから次代の遺伝的変異を生み出す。しかし採種園においては、自然状態とは異なり、接ぎ木であるため早くから繁殖時期を迎え、また採種を容易にするため、樹高を調節し、剪定を行う。さらに人為着花促進処理により雄花・雌花着生を促す方法等が実施されてきている。

採種園の目的は種子の大量生産という目的の他に、遺伝的な質の向上という意味も持っている。このため構成する精英樹が等しく交配にあずかり、また自殖の程度を下げ、外来花粉の侵入を防がねばならない。針葉樹の受粉様式は風媒受粉 (生井 1992) で、しばしば自殖や近親交配による自殖弱勢、近交弱勢の結果を示す報告がなされている (Burtun *et al.* 1962, Eriksson *et al.* 1973, Franklin 1970, Sorensen *et al.* 1976, 古越 1978、田

島 1979)。さて自殖の程度を調べるため、充実率・発芽率から推定する方法で多くの報告がなされ (Fowler 1964, Franklin 1969, 1970, Sorensen *et al.* 1976, 古越 1978)、また、アイソトープでラベルした花粉を用いる方法 (Koski 1970)、葉緑素変異苗の発生頻度による推定 (Squillace and Kraus 1963, Koski 1970, 大庭ら 1971, 茶屋場 1977) が試みられた。さらにアイソザイムにより推定することも行われてきた (Rudin *et al.* 1974, Rudin and Lindgren 1977, Müller 1976, 田島 1979, Shaw and Allard 1982, Shen *et al.* 1981, Adam and Joly 1980, Ritland and EL-Kassaby 1985, EL-Kassaby *et al.* 1986, 清藤 1990a)。最近では DNA マーカーにより、より正確な推定が行われるようになってきた (宮原ら 1998, Stoehr *et al.* 1998)。

本章では、ヒノキ採種園における隣花交配の実態を明らかにすることを目的に、3章で述べた葉緑体 DNA マーカーを用い、自殖率のより正確な推定を試みた。

### 5.2 材料と方法

ヒノキ葉緑体 DNA の *trnD-trnY* 間の非コード領域 (CS4 領域) に、一つの塩基置換のあることを見だし、使用した採種園の構成精英樹 33 クロンのうち鰹沢 5 号 (YKZ5) の 1 クロンのみが変異型の葉緑体 DNA ハプロタイプを持つクロンであることを明らかにした。そこでこの YKZ5 をマーカークロンとし、1 号園から 2 本のラメート、2 号園から 3 本のラメート、合計 5 個体を調査木とした。

1 号園は試験前年に GA 処理により花芽分化を促した。球果採集は 10 月に各ラメートごとに行った。種子はそれぞれ自然乾燥により脱種し、小粒・扁平種子などを取り除き精選したものを DNA 分析に供した。

DNA 分析のための種子は、無菌発芽条件下 (温度 25°C ± 2°C、16 時間日長 5,000lx) で発芽させた。発芽種子 3 週間後は、胚軸 (幼根の部分) が 5~10mm 前後に伸びた段階で、幼根のみを分析サンプルとして摘出した。この幼根から、DNA 抽出キット ISOPLANT (和光純薬) を用いて全 DNA を抽出した。供試サンプル数は、各ラメート当たり 200 個を標準とした。分析したサンプル数の総計は 1,003 個である。

DNA 分析は第 3 章に述べた方法により、葉緑体 DNA の CS4 領域を CS4U と CS4L のプライマー組み合わせで PCR 増幅した。SSCP 分析は自動蛍光シーケンサー (ALFred DNA Sequencer: Pharmacia Biotech) で行っ

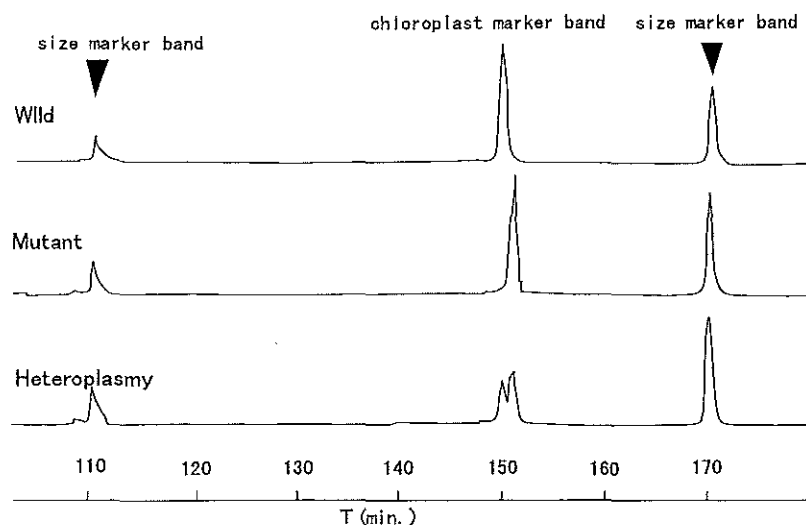


図5.1 CS4 マーカーによる八木沢ヒノキ採種園において同定された葉緑体ハプロタイプ

表 5.1 ヒノキ採種園における鯨沢5号における自殖率の推定

ラメート		分析数	葉緑体DNA ハプロタイプ			受精		自殖率
No.	樹高		野生型	変異型	ヘテロプラズミー	他殖	自殖	
1	4.6m	202	185	12	5	190	12	5.9%
2	6.5	201	196	2	3	199	2	1.0
3	6.3	199	195	3	1	196	3	1.5
4	5.6	202	199	3	0	199	3	1.5
5	5.7	199	194	3	2	196	3	1.5
合計		1003	969 (96.6%)	23 (2.3%)	11 (1.1%)	980 (97.7%)	23 (2.3%)	2.3%

た。電気泳動データの解析には、Fragment Manager ver.1.2 (Pharmacia Biotech) を使用し、得られたクロマトグラムから DNA 型を判定し、他家受精、自家受精の数をカウントした。

### 5.3 結果と考察

本採種園構成クローン鯨沢5号の自然受粉種子1,003サンプルの葉緑体DNAをSSCP分析した。この実験で得られたDNAハプロタイプのクロマトグラム例を図5.1に示した。調査した個体5ラメートの全データを表5.1にまとめた。

電気泳動の後、得られたマーカーバンドのうち、959種子のDNAサンプル(96.6%)が野生型(Wild)を示した。これらのマーカーバンドは、鯨沢5号の母樹に由来しないことを示す。すなわち、このことは受精に当たり明らかに花粉流動が起きていることを示す。この花粉流動は、SSCP分析で示された鯨沢5号以外の32クローン(野生型)によって生じたものである。一方、11

サンプル(1.1%)で、父性葉緑体DNAとともに、母性葉緑体DNAの存在を示す野生型と変異型(Mutant)バンドの両方をもつヘテロプラズミーが出現した。このことはヒノキにおいては葉緑体DNAの父性遺伝は完全なものではなく、母性遺伝する可能性を示すものである。これらの種子の花粉親は野生型であることは明らかであり、このようなヘテロプラズミーの種子は他家受精の結果として分類した(表5.1)。

一方、調査5ラメートの変異型葉緑体ハプロタイプは、それぞれ12、2、3、3および3であった。合計すると調査した1,003種子中23種子が変異型であった。この変異型は鯨沢5号の葉緑体DNAに由来しており、このことから平均自殖率は2.3%であることが示された。個々のラメートの自殖率を比較すると、特にNo.1のラメートは5.9%と他よりも高く、他のラメートは1~1.5%であった。No.1の樹高は4.6mで、全調査ラメート中最も低い。全園の採種母樹の平均樹高は5.8mである。従って樹高が低いことにより、花粉流動による他家受粉のチャンス

は他より少なかったと考えられる。

針葉樹の葉緑体 DNA は父性遺伝することは、スギで大庭ら (1971) が、Douglas fir で Neale *et al.* (1986) が、Logepole pine、Jack pine、について Wagner *et al.* (1987) が報告している。また Kondo *et al.* (1998) は、ヒノキ属において報告している。本論文第 3 章においてヒノキで父性遺伝を明らかにした。したがってヒノキにおいて次代の葉緑体ハプロタイプは、花粉の生殖細胞に由来する。鵜沢 5 号の葉緑体ハプロタイプは、採種園を構成している 33 クローン中、唯一変異型であることから、*trnD* と *trnY* 遺伝子間のスペーサー領域において認められる分子マーカーによって自家受精の割合を推定することができた。ここに述べた葉緑体遺伝子マーカー手法により、分析した 1,003 サンプルの自然受粉種子において、鵜沢 5 号の自殖率は 2.3% であった。採種園の理論的な自然自殖率は、クローン数  $n$  を持って構成される採種園においては、完全な任意交配が行なわれれば、 $1/n$  となる。したがって 33 クローンで構成されている採種園は  $1/33=0.03$ 、すなわち 3% が理論的な自殖率となる。今回の値は、それを満たした結果であり、ほとんど無視してもよいほどの小さな値である。清藤 (1990b) はアイソザイムマーカーにより、ヒノキ天然林の繁殖構造の解明を行い、任意交配を行っていることをすでに明らかにした。田島 (1979) は 12 年生の  $7 \times 7$  のクローン構成から成るヒノキ採種園において、パーオキシダーゼアイソザイムマーカーの対立遺伝子頻度から 0~29.75%、平均 16.28% と以外に高い自殖率を推定した。また勝田 (1982) は、色素異常苗の分離からヒノキ採種園の自然自殖率の推定を試み、不作年 2 年間の平均は 5% と低い値であったと報告している。清藤 (1990a) はアイソザイムの 3 遺伝子座の遺伝子頻度から 20 年生の時点で採種園の自殖率を求め、20 年生で 10.8~24.8%、平均 16.1%、21 年生で 8.1~19.0%、平均 12.5% の自殖率を推定した。Müller (1976) は 13~15 年生の Scots pine の採種園において 12~14% に自殖率を推定、Rudin and Lihdgren (1977) は 2 カ所のはなれた Scots pine 採種園で 2~5% の推定値を、さらに Adams and Joly (1980) は 1.2% を推定した。自殖率は同じ樹種であっても、クローン数、樹齢、植栽間隔、着花状況、仕立て型、立地環境など採種園の状況やまた推定方法によっても異なる。

今回の葉緑体 DNA マーカーによる自殖率の推定は、父性遺伝が花粉の動きを経由して遺伝子流動を直接的にモニターすることができるので、針葉樹の自殖率を正確

に推定している。今後より正確な自殖率の推定を行うために、さらに採種園内の他のクローンの自殖率を推定できる葉緑体 DNA マーカーの開発を進めねばならない。

## 第 6 章 ヒノキ採種園における樹冠部位別自殖率の推定

### 6.1 はじめに

針葉樹の自然着花は、本来樹冠上層に雌花が、下層に雄花が着生し、すみ分けている (佐藤 1934)。採種園においては容易に球果採集が出来るようにするため、人為的に幹を切断 (断幹) し樹高を調節している。壮齡林においては自然自殖はほとんどないが、採種園のように樹高を調節した条件下では当然雌花・雄花が混在するため、隣花交配により自殖を促す結果となっている (古越 1978)。

前章で述べたように、ヒノキ採種園における正確な自殖率の推定が DNA マーカーを用いることにより明らかになった。本章では同様の方法により、ヒノキ採種園における樹冠部位別の自殖率を調査し、ヒノキ採種木の隣花交配の実態を明らかにする。

### 6.2 材料と方法

YKZ5 をマーカークローンとし、1 号園から 1 本のラメート、2 号園から 2 本のラメートを調査木とした。調査木の形状は表 6.1 に示すとおりである。

1 号園は試験前年に高さ別に GA 処理により花芽分化を促した。球果採集は 10 月に各ラメートごとに、樹冠の上層、中層、下層の 3 段階、および東面、西面、南面、北面の 4 方位別に分けて行った。実際に分析した高さ別のサンプルは、上層と下層のみを用いた。種子はそれぞれ自然乾燥により脱種し、小粒・扁平種子などを取り除き、精選して DNA 分析に供した。

DNA 分析のための種子は、低温湿層処理した後、発芽させた。分析サンプルは胚軸 (幼根の部分) が 5~10mm 前後に伸びた段階で、幼根のみを摘出した。この幼根から、DNA 抽出キット ISOPLANT (和光純薬) を用いて全 DNA を抽出した。高さ別の供試サンプル数は、各ラメート当たり 200 個を標準とし、それに満たない場合は得られた数だけ実験に供した。分析は 2 回繰り返して行った。分析したサンプル数の合計は 2,393 個である。(表 6.2)。また、方位別の供試サンプル数は、100 個体 2 回繰り返してを基準として行った。分析したサンプル数の合計は 2,549 個である (表 6.3)。

表 6.1 調査個体の特性

ラメートNo	樹高	胸高直径	枝下高さ	樹冠長	平均樹冠直径	花芽着生位置 (着花量)		備考
						雌花	雄花	
1	4.6m	22cm	1m	3.6m	4.2m	UML (4)	UML (4)	GA処理
7	5.7m	18cm	1m	4.7m	5.2m	M (2)	M (2)	
8	5.7m	24cm	1.1m	4.6m	5.6m	M (3)	M (3)	

注：花芽の着生は、U：上層、M：中層、L：下層、全体で多い位置を示す  
着花量は5段階評価で、4：やや多い、3：中、2：小

表 6.2 樹冠高さ別自殖率と発芽率

ラメート	位置	合計数	DNA ハプロタイプ			他殖	自殖	自殖率	(範囲)	発芽率
			野生型	変異型	ヘテロプラズミー					
1	上層	400	364	29	7	371	29	7.3%	(5.5-9.0)	38.70%
	下層	400	383	8	9	392	8	2.0	(2.0-2.0)	54.8
7	上層	399	388	5	6	394	5	1.2	(1.5-1.0)	48.3
	下層	397	384	6	7	391	6	1.0	(0.5-2.5)	49.7
8	上層	400	382	4	14	396	4	1.0	(2.0-1.0)	43.1
	下層	397	383	8	6	389	8	2.0	(3.0-1.0)	42.4
合計		2393	2284	60	49	2333	60	2.5%		

表 6.3 樹冠方位別自殖率と発芽率

ラメート	位置	合計数	DNA ハプロタイプ			他殖	自殖	自殖率	(範囲)	発芽率
			野生型	変異型	ヘテロプラズミー					
1	N	250	237	8	5	242	8	3.2%	(2.0-5.0)	45.00%
	S	250	223	22	5	228	22	8.8	(9.3-8.0)	33.3
	E	250	237	5	8	245	5	2.0	(2.0-2.0)	51.3
	W	216	203	11	2	205	11	5.1	(3.4-7.0)	50.1
7	N	189	185	2	2	187	2	1.1	(1.0-1.1)	59.3
	S	198	189	4	5	194	4	2.0	(0.0-4.0)	45.6
	E	199	191	4	4	195	4	2.0	(3.0-1.0)	47.8
	W	200	197	1	2	199	1	0.5	(0.0-1.0)	41.5
8	N	200	193	2	5	198	2	1.0	(1.0-1.0)	47.0
	S	200	193	3	4	197	3	1.5	(2.0-1.0)	36.9
	E	201	189	4	8	197	4	2.0	(4.0-0.0)	45.8
	W	196	190	3	3	193	3	1.5	(3.1-0.0)	39.8

得られた全DNAを鋳型とし、葉緑体DNA上のスペーサー領域(CS4)PCRにより増幅した。DNAの分析方法は4章で述べた方法により行った。用いたプライマーはCS4UとCS4L2でPCR増幅し、電気泳動は自動蛍光センサー(Pharmacia LKB, ALFred)を用いてSSCP分析を行った。電気泳動データの解析にはFragment Manager ver.1.2(Pharmacia Biotech)を使用した。

## 6.3 結果

### 1) 樹冠の上下における自殖率の違い

樹冠の上下の位置から種子をサンプリングし、分析した結果を表6.2に示す。全分析数2,393のうち、2,284個(95.4%)は、野生型を示した。また野生型と変異型を併せ持つヘテロプラズミーが全体で2.0%出現した。これらの種子の花粉親は、マーカークローンである飯沢5号以外の野生型クローンであるので、野生型に加え他

殖として区分した。変異型は、父性遺伝するため花粉親がマーカークローンであるので、自殖である。全体では60サンプルが自殖により生産された種子であり、自殖率は2.5%であった。

各ラメートごとに自殖率を比較すると、No.1は全体で4.6%、樹冠上層で7.3%、下層で2.0%となり、明らかに上層で高い値を示した。種子の発芽率は樹冠上層38.7%、下層54.8%で、下層の発芽率が高い傾向を示した。

No.7では、全体の自殖率は1.4%、樹冠上層1.2%、下層1.0%とNo.1に比べ低い値を示し、球果の着生部位による差は認められなかった。発芽率も上層下層間に差が見られなかった。No.8においては、全体で1.5%、樹冠上層1.0%、下層2.0%であった。下層で自殖が、高い結果が示されたが、差は大きくなかった。発芽率においては、樹冠上層は下層に比べ若干高い程度であった。全調査木を平均すると、上層の自殖率は3.2%、下層は1.8%であった。

## 2) 樹冠方位別の自殖率の違い

樹冠の4方位に分けて採集した種子サンプル2,549個をDNA分析した。1)で述べたと同様にヘテロプラズミは野生型に加えて他殖に分類した(表6.3)。

調査木No.1では、南面が最も高い自殖率(8.8%)を示し、続いて西面5.1%、北面3.2%、東面2.0%の順であった。全体平均で4.8%(2.0~9.3%)であった。種子の発芽率は、自殖率とほぼ反比例した結果を示した。

No.7は、自殖率が0.5~2.0%の範囲で、南面と東面が自殖率2.0%、北面が1.0%、西面は0.5%であった。全体平均は1.4%(0.0~4.0%)の自殖率であった。種子の発芽率は北面で最も高い値を示し、以下東面47.1%、南面45.6%、西面41.5%の順であった。

No.8においては、自殖率は1.0~4.0%の範囲で、方位別では、東面が2.0%、続いて南面、西面の1.5%、北面の1.0%の順であった。全体平均では1.5%(0.0~4.0%)であった。種子の発芽率は北面で、最も高い値47.0%を示し、東面45.8%、西面39.8%、南面36.9%の順であった。

## 6.4 考 察

これまでの調査結果を見ると、Fowler(1965)は、Jack pine 採種園において、劣性遺伝子である色素変異を標識遺伝子として用い、樹冠下層の自殖率は、上層部の2倍の26%になることを示した。その原因として強度のせん定により雌花と雄花の着生が隣花接近してしま

うことにより自殖が高まると述べている。Rudin and Lindgren(1977)は、Swedish Scots pine 採種園において出現頻度のきわめて低いマーカーを用いたアイソザイム分析により自殖率を調べ、自殖率は2~5%で、樹冠上層より下層の自殖率が高いことを報告している。またShen *et al.*(1981)は、同様にScotch Pine 採種園においてアイソザイム分析し、自殖率は6%で樹冠下層で大きいことを述べている。Squillace and Goddard(1982)は、Slash pine 採種園において12のマーカーを用い、5年間にわたり調査した。その結果、平均自殖率は2.5%で、天然林より低いことを報告している。また種子の充実率は、樹冠上層81.1%、中層76.8~76.6%、下層74.1%で、樹冠下層で自殖が高いことを指摘した。またラメート間よりもラメート内の自殖率が高いことを指摘した。田島ら(1984)は、黄金スギをマーカーとして用い、自殖率の平均は19.4%、樹冠上層12.3%、中層21.7%、下層24.7%であり、やはり下層で自殖率が高いことを指摘している。またアカマツの採種園では、自殖率平均1.22%と低い値が示され、樹形が低木型の場合は高く、また高さ別では、下層で高い値になることを報告している。これらの理由として、上層に雄花が少ないこと、また、上層で風が流れること(Shen *et al.* 1981)をあげている。

本調査において得られた自殖率は、低い値であった。この原因としては、試験を行ったこの年はこれまでにない豊作年で、採種園の樹齢が25~27年と十分な成熟年齢に到達していたこと、したがって調査クローンだけでなく、まわりの構成母樹の花粉量も受粉に十分な量が十分であったこと、樹間距離は5mで隣接母樹の樹冠と樹冠間にクリアランスがあること、また同じクローンのラメートが隣り合わない配置になっていることが考えられる。

樹冠の垂直分布からみた自殖率の結果は、上層で高い場合と、上層・下層間にほとんど差のみられない場合があった。平均すると上層が高く、下層が低い値となった。3ラメートのうち、No.1の個体が高い自殖率を示した理由は、GA処理による着花促進処理をほどこした影響と考えられる。また、上層が下層より自殖率が大きかった理由の一つは、着花は全層にわたって雌雄花量が増え、上層で自家受粉が優先的に起こるだけの雄花が、上層にも着生していたこと、また樹冠形は下枝が発達し台形を呈し、小枝の先端部分(当年度伸長枝)に雌花が着生することから、下に行けば行くほど、外へ張り出し、雌花の受粉面積が増え、周囲個体からの飛来花粉を受けやす

くなっていることに起因していると考えられる。第2章の表2.2-3に示したように、採種木においても上層より下層で充実が高く、また調査採種木の除雄した場合でも下層が若干高い充実率を示した。長谷川(1943)は、老齢林で3層にわけて発芽率を調べ、上から下に向かって発芽率もあがることを報告している。また清藤(1975)も壮齢人工植栽木を用い、梢頭部から2mおきに3層に分けて採取した種子の発芽率を調べた結果、下層で高く、上層で低い値を示した。これらの結果からも上層の方が自殖率は高いことが示唆される。ヒノキの場合、花芽の分化位置を見ると、雌花は小枝の先端部分(当年度伸長枝)に着き、雄花は内部の古い小枝(前年度伸長枝)に着く(坂口1952)。スギにくらべると上層に雌花、下層雄花という着生位置の住み分け傾向が歴然としていない。菊池(1967)は45年生前後のヒノキ植栽木5個体における雌花雄花の着花量と花芽分布を詳細に調べ、その結果を福原・浅川らの分類(林野庁1966)にあてはめた。その結果、雌雄花対称上偏型が2個体、雌雄花対称中位型が1個体、雌雄花対称下偏型が1個体であったことを報告している。雄花の上偏型は、当然自殖のチャンスは高くなる。採種園における雌花・雄花の着生分布は、断幹により樹冠の高さを調節しているため、雄花が本来中間部位に着くタイプも雌雄花対称上偏型に移行する。したがって自殖は上層で高くなる可能性がある。着花位置と着花量の関係は、雌雄花が少ない場合両花とも上部に着生し、豊作年では下部が増加し全体に着生する傾向が認められた(清藤1983)。

また、風の流れを考えると、風は単に空気塊を運ぶだけでなく、さまざまな渦・乱流(turbulence)を発生させる。この渦は、平均速度が高度とともに大きくなることから、採種木上層でその運動量が大きい(Di-Giovanni and Kevan 1991)。このため上層部に雌花が着生していれば、この影響を大きく受け、自分の花粉を巻き込み受粉する機会が多くなることも考えられる。

方位別の自殖率に関しては、平均的には南面に強く自殖が現れた。Shen *et al.* (1981)はScots pine 採種園において南面が高い傾向が見られることを示し、隣接母樹との関係からの考察も行なっている。今回、方位別の着花調査は行っていないが、日の当たる面において雌・雄花が多く分布する一般的傾向(小沢1962)は、本調査において同様の傾向があり、このことからまず、南面の自家受粉のチャンスが優位に多くなることが考えらる。この場合に、隣接母樹の雄花着生量、雄花開花同調性か

ら変動が起こると考えられた。

本章では、自殖率の樹冠における分布の検討を行った。得られた結果から、実際的には自殖率を低下させることを考慮した特別な採種園管理は必要ないことが示された。

## 第7章 ヒノキ採種園構成クローンの花粉親としての寄与率の評価

### 7.1 はじめに

1992年にリオデジャネイロで開催された国連会議、地球サミットで生物多様性に関する条例(通称:生物多様性条約)が採択されて以来、各国で様々な取り組みが始まり、多様性がとくに叫ばれるようになった。生物多様性は単に生物の種の多様性だけでなく、その階層水準、組成・構造要素に、遺伝子、遺伝的組成・遺伝的構造を含む広い概念である(Noss 1990)。森林における遺伝的多様性は育種にとっても重要である。これまでヒノキ採種園における種子生産に対する親クローンの寄与率の推定は、雌雄花数から行われてきた(勝田1982、金川・北川1987)。ヒノキでは、適当な遺伝マーカーが見出されていないため、クローンの花粉によるジーンフローまで踏み込むことはできなかった。ここでは、第3章で見出した変異型の葉緑体DNAハプロタイプを保有するクローンを利用し、そのクローンが花粉親として種子生産にどの程度寄与しているかを評価した。また、3年間の調査結果から採種園管理について若干の考察を行った。

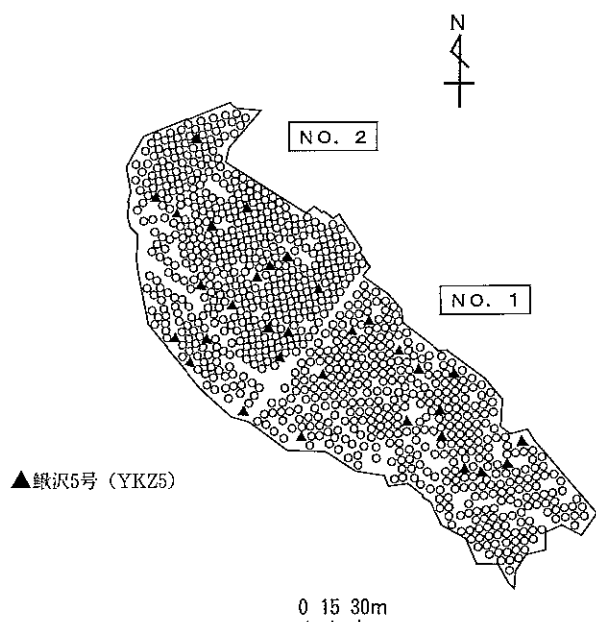


図7.1 調査に用いたヒノキ採種園

## 7.2 材料と方法

調査対象とした採種園は、八木沢ヒノキ採種園の1号園 (No.1) と2号園 (No.2) である (図7.1)。試験は1995年から1997年までの3年間実施した。1994年に1号園の採種母樹にジベレリン (GA) による着花促進処理を行った。1995年は2号園、1996年には1号園でGA処理を施した。GA処理は対象園の全採種木に対し、樹冠の下部から中層部にある5枝を選び、枝径2cmの位置にCMC (Sodium Carboxymethyl Cellulose) を混ぜた5mgのGAを包埋処理した。

種子は10月初旬に各園ごとに採取した。DNA分析のための種子は、低温湿温処理した後、発芽させた。分析サンプルは胚軸 (幼根の部分) が5~10mm前後に伸びた段階で、幼根のみを摘出した。この幼根から、DNA抽出キットISO-PLANT (和光純薬) を用いて全DNAを抽出した。供試サンプル数は、各年当たり600個 (各処理当たり200~400個)、3年間で合計1,800サンプルである (表7.1)。

得られたDNAを鋳型とし、第3章の方法により葉緑体DNA上の非コード領域CS4をPCRにより増幅した。用いたプライマーはCS4UとCS4Lである。SSCP分析は自動蛍光シーケンサー (ALFred: Pharmacia LKB) で行い、葉緑体DNAのハプロタイプを判定した。

## 7.3 結果と考察

本調査に使用した採種園構成精英樹33クローンのうち、鯉沢5号 (YKZ5) 1クローンのみが変異型の葉緑体DNAハプロタイプを持つクローンであり、残りの

32クローンは野生型である。本研究でDNA分子マーカーとして用いたヒノキの葉緑体DNA種内変異は、高頻度で父性遺伝することを既に第3章で明らかにした。したがって分析した種子の中に変異型の葉緑体DNAハプロタイプが見いだされれば、YKZ5からの飛来花粉で受粉し、受精から種子形成に至ったことを意味する。また、分析したサンプルの中には、野生型と変異型のPCR産物を併せもつヘテロプラズミーも見いだされた。このことはヘテロプラズミーの現れる交配組み合わせは、花粉親がYKZ、母樹が野生型の32クローンのいずれかである。したがってYKZ5が花粉親である種子は、変異型とヘテロプラズミーを合わせたものである。

3ヵ年間のYKZ5の花粉親としての寄与率を明らかにするため、各園から採種した種子の葉緑体DNA型を分析した。その結果を表7.1に示した。1995年は、GA処理が施された1号園で4.8%であった。一方、無処理の2号園では2.5%であった。1・2号園全体での寄与率 (平均) は4.0%であった。

1996年、無処理の1号園における寄与率は0.3%と低い値を示した。また、GA処理が施された2号園でも1.0%と低かった。1・2号園全体での平均寄与率は0.5%であった。1997年は、GA処理が施された1号園で1.7%、無処理の2号園で1.3%であった。1・2号園全体での寄与率は1.5%であった。

調査採種園におけるYKZ5クローンの位置を図7.1に示した。1号園においては425採取母樹中YKZ5が14本 (3.3%)、2号園は461本中18本 (3.9%)、全体では886本中32本、3.6%である。採種園内のすべての構成個体が花粉親として等しく寄与すると仮定した場合の

表7.1 3ヵ年における鯉沢5号の花粉寄与率

年 度	園No.	サンプルNo.	同定された葉緑体 DNA ハプロタイプ			寄与率	GA処理
			野生型	変異型	ヘテロプラズミー		
1995	1	400	381	8	11	4.80%	○
	2	200	195	2	3	2.50%	
	Total	600	576	10	14	4.00%	
1996	1	300	299	0	1	0.30%	○
	2	300	298	2	0	1.00%	
	Total	600	297	2	1	0.50%	
1997	1	300	295	4	1	1.70%	○
	2	300	296	3	1	1.30%	
	Total	600	591	7	2	1.50%	



表 7.2 採種園における種子生産量と発芽率

年度	1号園 (No.1)		2号園 (No.2)	
	種子生産量	発芽率	種子生産量	発芽率
1995	123kg	40.5%	116kg	37.0%
1996	4.6kg	9.3%	4.7kg	5.3%
1997	31kg	41.0%	5.4kg	31.0%

期待寄与率は上に述べた本数割合である。すなわち1号園では3.3%、2号園は3.9%、1・2号園全体で3.6%となる。

期待値と実測値を比較した結果、1995年はGA処理した1号園においては、期待値を上回り、2号園では若干下回った。全体ではほぼ期待値に近いことが認められた。1996年のGA処理区の2号園での実測値は、無処理区である1号園に比べ、多少高い値になるものの、期待値の1/4であった。1号園の実測値は、期待値の1/10ときわめて低かった。1997年においても各園の実測値は期待値のそれぞれ約1/2(1号園)、1/3(2号園)であり、全体でも1/2以下であった。本採種園構成クロンの開花期は、雌花で約2週間、雄花で10日間のクロン間差があるが、ほぼすべてのクロン間で交配が可能な条件にある(清藤1980)ので、開花期のずれからの寄与率の歪みへの影響は、この採種園では無視してよいであろう。

各園における種子生産とその発芽率を表7.2に示した。一般にヒノキの豊凶は2~5年(坂口1952、柳沢1955、佐藤1973)といわれている。本採種園において、1995年は大豊作、1996年は大凶作、1997は並作であった。したがってYKZ5の花粉親としての寄与は、豊凶に大きく影響されることが示された。すなわち、豊作年にはほぼ期待寄与率に沿った花粉親としての寄与を果たしているが、豊作年以外では寄与率が非常に低い。このことから、豊作年は別として、それ以外の年の採種園産種子における花粉親の構成比には大きな歪みがあることが示唆された。

ヒノキ採種園を構成するクロン間に種子生産の違いがあることは多くの報告で明らかである(勝田1982、井出1984)。また雌花・雄花数もクロン間に差が見られる(勝田1982、金川・北川1987)。しかし、清藤・相沢(1989)は、ヒノキ雄花数のクロン間差が豊作年には平準化することを報告した。この豊作年における雄花数の平準化により、今回調査した1995年には期待寄与

率に近い値が得られたと考える。

ヒノキ採種園における着花促進にGA処理が効果的であることが報告されている(金川・北川1987)。GA処理は凶作年にも効果が見られる(清藤1984、古越1985)が、しかし1996年の凶作年では種子生産に対して顕著な効果は認められなかった。一方、並作年の1997年における種子生産の結果で明らかなように、GA処理は自然着生に比べ6倍の種子生産量を示し、凶作年を除き、種子生産に効果のあることが改めて示された。しかし、GA処理によるYKZ5の花粉親としての寄与率上昇への効果は、自然着生に比べ若干(1.3倍程)認められたが、その効果はさほど大きくなかった(期待値の半分程度)。GA処理は、雄花・雌花の着生量を増大させ、自然着花時のクロン間差を改善することができるが(清藤・相沢1989)、全採種母樹に機械的にGA処理した場合は、クロン間の雄花数のアンバランスを大きく改善することはできず、その結果、花粉親としてのクロンの寄与率に大きな偏りが生じるものと推察された。採種園構成クロン間でランダム交配が行われ、全クロンが等しく花粉親として寄与することを前提としている採種園管理の視点から考えると、各クロンの生理生殖特性に沿った、きめこまかな着花促進が必要である。また、豊作年には花粉親としての寄与の平準化が期待でき、発芽率の高い多量の種子生産が行なわれるので、豊作年に種子採取し、貯蔵して使う体制の方が、豊作年以外に着花促進処理を行い、種子生産をはかるよりも望ましいと思われる。

我が国でヒノキと並ぶ有用林業樹種であるスギにおいては、黄金スギ遺伝子が父性遺伝する(Ohba *et al.* 1971)ことから、これを遺伝マーカーとして利用し、採種園における花粉の動態が調べられてきた(山手・大庭1974、1979、古越1978)。しかし、ヒノキにおいては、これまでは有効な父性遺伝マーカーがなかったために、採種園の花粉管理に必要な基礎情報はほとんど得られなかった。今回の採種園調査で、親クロンの花粉親としての寄与を評価するのに葉緑体DNAマーカーが有効であることが示された。

また結果として、豊作年には、構成クロンの花粉親としての寄与率の均一性が望めることが示唆された。しかし、これは、採種園を構成する1クロンから得られた結果に過ぎない。豊作年における花粉親としての貢献度の均一性をより確実に把握するためには、より多くの構成クロンについて調査することが望まれる。今後は、

表8.1 各クローンの人工交配における結果率 (1997)

交配組み合わせ	総雌花数	結果数	結果率 %
鯉沢5号×混合受粉	257	220	85.6
鯉沢7号×混合受粉	88	86	97.7
伊那1号×混合受粉	217	194	89.4
丹沢7号×混合受粉	158	144	91.1
三保2号×混合受粉	128	106	82.8

表8.2 各交配組み合わせにおける鯉沢5号花粉の寄与

交配年	交配様式	分析数	DNA ハプロタイプ			鯉沢5号花粉の寄与率	逆正弦変換した寄与率の割合%	逆正弦変換した期待値-変異型割合
			野生型	変異型	ヘテロプラズミー			
1997	鯉沢5号×混合受粉	156	145	10	1	6.4%	14.7	
	鯉沢7号×混合受粉	160	118	41	1	26.3%	31.1	2.0
	伊那1号×混合受粉	154	99	55	2	36.5%	37.2	8.1
	丹沢7号×混合受粉	160	124	36	0	22.5%	28.3	-0.7
	三保2号×混合受粉	153	95	57	1	37.9%	38.0	8.9
1998	鯉沢5号×混合受粉	32	30	2	0	6.3%	14.7	
	鯉沢5号×鯉沢5号	11	0	11	0	100%		0
	鯉沢5号×自然受粉	68	65	3	0	4.4%		1.4
	鯉沢7号×混合受粉	159	121	38	0	23.9%	29.3	0.2
	伊那1号×混合受粉	137	102	35	0	25.5%	30.3	1.3
	丹沢7号×混合受粉	160	130	29	1	18.8%	25.7	-3.4
	三保2号×混合受粉	160	127	30	3	20.6%	27.0	-2.1

新たな葉緑体 DNA マーカーを探索し、利用することにより、さらに詳細な採種園管理のための基礎情報を得ることが可能となると考える。

## 第8章 ヒノキにおける選択受精の検討

### 8.1 はじめに

樹木は雌雄花が開花し、受粉から受精にいたり結実して種子が生産される。採種園は構成する選抜木である精英樹クローン相互間で交配が行なわれるならば、採種母樹、花粉親とも選抜を受けているので、遺伝獲得量は次代の遺伝子プールに満度に伝えられる。受粉の段階では母樹の雌花の胚珠に自家花粉による自家受粉と他家花粉の他家受粉が行われ、両方が混合受粉し、しかも何度も反復受粉されることになる。交配様式でいえば、ヒノキの採種園も他殖+自殖の集団と見ることができる。実際にヒノキ採種園においても自殖がおこり (田島 1979、清藤 1990a)、しかも自殖弱勢の程度が大きいことが言われている (田島 1979、古越・大谷 1985)。

もし採種園を構成している精英樹の混合花粉により、

受粉から受精に至る過程において、特定のクローンが選択的に受精に授かる現象が起こるとすれば、交配様式と同様、任意交配の観点から採種園の管理上の重要な問題となる。

選択受精の研究は、被子植物のマツヨイグサ属植物の研究に端を発し (Heribert-Nilsson 1923)、配偶子選択、とくに花粉管伸張速度、花粉量、系統受粉、花粉管長、胚珠の形態、花粉と植物体における遺伝子発現の相同性、温度耐性などの物理的ストレス、塩類、酸性雨などの化学的ストレスなどかなり多くの報告がある。

一方、林木における選択受精に関する研究は、マツ属 (Squillace and Bingham 1958、Burtun *et al.* 1962、Squillace and Goddard 1982、Moran and Griffin 1985、Wiselugel and van Buutenen 1988)、スギ (大庭 1972d)、Douglas fir (El-Kassaby and Davidson 1991、Aspit *et al.* 1989、Nakamura and Wheeler 1992)などでいまだ少ない。

ここでは葉緑体 DNA の父性遺伝の現象を利用するため、葉緑体 DNA (CS4) のマーカークローンである鯉沢5号を指標としてヒノキの選択受精について、調査を行った。

表 8.3 期待値・実測値の差の分散分析

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散化	P-値	F境界値
年度	61.88	1	61.883	6.841	0.079	10.128
クローン	52.68	3	17.558	1.941	0.300	9.277
誤差	27.14	3	9.045			
合計	141.69	7				

表 8.4 交配に用いた各クローンの花粉サイズ、発芽率及び花粉管長

クローン名	花粉の大きさ	花粉発芽率	花粉管長
鯉沢 5 号	30.7 $\mu\text{m}$	96%	182 $\mu\text{m}$
鯉沢 7 号	30.8	95	186
伊那 1 号	33.5	92	180
丹沢 7 号	31.7	96	174
三保 2 号	30.7	94	180
平均	31.5	95	181

## 8.2 材料と方法

試験は 1997 年と 1998 年の 2 カ年間にわたり八木沢ヒノキ採種園内の採種木を用いて実施した。交配母樹は、採種木のうち、鯉沢 5 号、鯉沢 7 号、丹沢 7 号、伊那 1 号および三保 2 号の 5 クローン各 1 個体である。それらの個体において、試験前年に GA 処理により花芽分化を促した。花粉は母親とした 5 クローンから毎年 3 月中旬に枝を切り取り、室内で水挿し栽培して採集した。採集した花粉は、5 クローンをそれぞれ均等に等重量で混合した。交配袋掛けは、各母樹に 1997 年は 3 月 12 日に、1998 年は 3 月 26 日に行い、各交配母樹あたり 5 袋掛けた。人工交配は、各袋に 1997 年は 3 月 31 日と 4 月 4 日の 2 回、1998 年は 3 月 30 日と 4 月 3 日の 2 回、それぞれ各年の新鮮等混合花粉を用いて授粉し、袋を揺さぶり授粉を促がして実施した。袋除去は両年とも 4 月 24 日に行った。なお、1998 年は鯉沢 5 号の自殖交配と自然交配も併せて行った。球果は 10 月に各母樹ごとに採集し、自然乾燥により脱種し、小粒・扁平種子などを取り除き精選して DNA 分析の材料とした。

DNA 分析のための種子は、低温湿層処理した後、発芽させた。発芽種子は、胚軸（幼根の部分）が 5~10mm 前後に伸びた段階で、幼根のみを分析サンプルとして摘出した。この幼根から、DNA 抽出キット ISOPLANT（和光純薬）を用いて全 DNA を抽出した。供試サンプル数は、各母樹当たり 160 個を標準とし、それに満たなかった場合は得られた全数を実験に供した。2 カ年間の

各母樹で分析したサンプル数の合計は 1,509 個である。

得られた DNA を鋳型とし、葉緑体 DNA 上の非コード領域（CS4）を PCR により増幅した。PCR-SSCP 分析は 4 章の方法に準じて行った。用いたプライマーは CS4U と CS4L2 である。SSCP 分析は、自動蛍光シーケンサー（Pharmacia LKB, ALFred）を用いて行った。電気泳動データの解析には Fragment Manager ver.1.2（Pharmacia Biotech）を使用した。

また交配に用いた各クローンの花粉は、膨潤型の花粉を観察し、長径の大きさを測定した。同時にそれぞれ pH5.0、寒天濃度 1%、30°C の条件で花粉を発芽させ、72 時間後の発芽率を求めるとともに、花粉伸長量を顕微鏡下で測定した。

## 8.3 結果と考察

自然の状態では混合花粉による少量受粉が反復されて受精・結実にいたる。受粉花粉粒数の不足によって結果率が際だって低下することが知られている（Olsson 1960、生井 1992）。先ず同一混合花粉による人工受粉は必要十分な受粉量であったか、また偏りがなかったかを検討するため、1997 年の交配では結果率を調べた。結果を表 8.1 に示す。平均結果率は 90% で、82.8%~97.7% の範囲であった。したがってほぼ十分な受粉が行われたと見ることができる。

2 年間の各交配組み合わせにおける鯉沢 5 号の寄与率を表 8.2 に示した。変異型を示す鯉沢 5 号木の自家受粉のみによる受精では 100% が変異型であり、父性遺伝が再度確認された。混合花粉は交配母樹の 5 クローンの等量花粉であるから、無選択に受精が起こるとすれば 1/5、すなわち 20% ずつの寄与を示すはずである。しかし、鯉沢 5 号における混合花粉による受粉の結果は、2 カ年ともほぼ共通して 6.3% が鯉沢 5 号花粉による変異型であった。すなわち自殖により受精した 13.7% が種子生産に寄与しなかった（致死）ことになる。

これにより、 $100\% - 6.3\% = 93.6\%$  が残り 4 クローンの花粉に由来する分であり、 $93.6/4 = 23.6\%$  が期待

値ということになる。そこで鰐沢5号を除く4クローンを母樹とした場合の変異型の出現率と期待値を比較した。数値が割合(%)の場合にはその分布が二項型になるので、ここでは得られた値を逆正弦変換した。期待値23.6%は逆正弦変換すると29.06%になる。各母樹クローンにおける変異型の出現率(鰐沢5号花粉が受精した割合)は、表8.2に示したように、1997年は28.3~38%で若干のパラッキがみられ、1998年のそれは25.7~30.3%の範囲にあった。

期待値29.06%からのずれを求めると、1997年は+8.9~-0.76%、1998年は+1.27~-3.36%であった。ここで分散分析によりそれらの差を検定した結果は表8.3のとおりである。期待値と実測値には年度間、クローン間で有意な差は認められなかった。したがって、選択受精はない、もしくは無視できる程度という結論になり、大庭(1972d)の黄金ヒノキを指標として行ったスギの選択受精の試験における結論と同様であった。

1998年の鰐沢5号において、20%の自家受粉を含む混合受粉と自然受粉を比較した場合、それぞれの変異型の出現率(自殖率)は、6.3%と4.4%で、大きくは変わらなかった。Squillace and Bingham (1958)、Burtun *et al.* (1962)によるWest white pine採種園における選択受精の調査において、自家と他家の花粉を1:1で混ぜた混合花粉により交配実験を行なっている。その結果では、自殖木とその混合花粉による受粉では他家が自殖より勝っていた。このことは自殖弱勢を防ぐ意味から、自家花粉より他家花粉の方がよりよく受精に寄与していることを示す。

橋詰(1975)によれば、ヒノキの胚珠の発達には受粉が必要であるが、極端な遠縁花粉の交配では花粉が発芽しないか、発芽しても負の屈向性を示して珠心に侵入せず、胚珠は退化する。同種の死滅花粉の受粉でも胚珠は発達するので、花粉の発芽の有無、花粉の生死とは無関係に花粉の中に含まれる刺激物質によって胚珠が発達すると述べている。

交配母樹・鰐沢5号で自家受粉が起こった場合、胚珠が発達しても、不稔種子を主に形成する。自家受精での稔性が低いのは、スギの自殖不稔の主因(横山1977)で言われているように、受精の頻度が低いことによるのではなく、前胚の大部分が造卵器を形成後、崩壊することにあると思われる。これには胚致死遺伝子が関与(河崎1990)していることも考えられる。

自家受粉の確率は、チャンスとして20%である結果

率が、正常な受精と変わらない値であったことから考え、混合花粉のうち、自家花粉も他家花粉と同様に受粉チャンスを持ったことが推測される。しかし13.6%は受粉がおこなわれ胚珠が発達しても、胚致死をきたし不稔種子となったことが予想される。このことは胚形成・発達に關与する酵素が正常に合成されないあるいは働かなくなることに起因していると考えられる。

被子植物において多量受粉の場合、受粉花粉の中で発芽や花粉管速度の速い旺盛な花粉だけが受精・結実に至りやすく、その結果として次代植物における遺伝特性の均質化や成長力の向上など、植物の適応度を高めるために起こる受精競争による花粉選択を肯定する論文が多い(Ottaviano *et al.* 1988、Mulcahy *et al.* 1992、Wendel *et al.* 1987、Pederson 1988)。

飛来した花粉は珠孔液を出した胚珠に取り込まれる。花粉が取り込まれる段階での競争、さらに花粉粒が発芽し、珠心を通りぬける際の個体間の競争、あるいは選択性が考えられる。

今回用いた花粉粒の大きさは、30.7~33.5 $\mu\text{m}$ で平均31.5 $\mu\text{m}$ であり、統計的に有意な差は見られなかった(表8.4)。花粉管の発芽試験でも90%以上の発芽を示し、花粉管の伸張も174~186 $\mu\text{m}$ の範囲で平均181 $\mu\text{m}$ であり、発芽率、花粉管長のクローン間差は認められなかった。このことは橋詰(1968)の発芽・花粉管伸張の個体間の結果とほぼ一致した。ヒノキの選択受精について花粉の側から考えた場合、これらの結果は花粉間の競争は大きくないことを裏付けるものと考えられる。

被子植物においても花粉選択が見られない報告もあり(Ellstrand 1984、Snow 1990)、花粉選択があったとしても、分化に果たす役割は小さい(Schlichting *et al.* 1990)との見解もある。したがって、構成精英樹クローン間の選択強度は受精にさらされる花粉の数に比例して高まるというのではなく、むしろ花粉の数と選択強度との間の関係は、あったとしてもきわめて緩慢な上昇率を示す対数関数的な小さいもの(Haldane 1932)であろうと考えられる。

## 第9章 総合考察

採種園における遺伝的管理に関する研究は、日本では必ずしも多くはない。ヒノキの採種園については、田島(1979)がおこなった採種園の自殖に関する研究以降大きな進展はない。しかし、着花促進の面でジベレリン処

理に基づく量的生産技術とそれに関連した雌雄の量的な問題については、国庫補助試験として多くの県が参画した総合研究が実施されたことがあるため、多くの報告が見られる(勝田 1982、金川・勝田 1983、金川・北川 1987、前田・西村 1985)。採種園は、その目標から、集積した遺伝子が有効に働き、最適な遺伝獲得量を達成し、より生産性が高い状態で交配が行われるように管理されなければならない。種子生産に至る採種園内の受粉受精については、適当な研究方法が見出されていないことがネックとなり、ほとんど明らかにされておらず、スギなど他の樹種の結果から推察しているにすぎなかった。採種園における最適な遺伝獲得量を達成するためには、その基礎的な資料として、可動する配偶体、すなわち花粉に関する情報が必要である。本章ではこれまでの結果を踏まえて受粉管理に係わる問題点と対策を 1) 解析マーカーの探索、2) 自然自殖の防止、3) 採種木間の交配の均等化、4) 園外花粉飛来の防除、5) 次世代の採種園、にまとめて考察する。

### 9.1 解析マーカーの探索

採種園における構成クローンの受粉受精の実態を把握するためには、遺伝的に明らかとなったマーカー(標識遺伝子)がなければならない。その方法についてはすでに述べたように、これまでは形態マーカー、色素異常マーカー、アイソザイムマーカーに頼っていた。田島(1979)は、ヒノキについてアイソザイム遺伝子座の遺伝頻度から採種園の自殖を推定する方法を明らかにした。この方法は、採種園全体の自殖率の推定を可能にしたが、きまこまかな採種園の管理を考えた場合、母樹の受粉について解析できる方法が必要である。本研究では遺伝情報本体である DNA に着目し、第 3 章において葉緑体 DNA マーカーの探索とその父性遺伝の検証を行った。葉緑体 DNA 塩基配列多型をスクリーニングする手段として、非コード領域の PCR-SSCP 分析を用いた。そのねらいは、非コード領域は変異性が高いこと、また SSCP 法は、分析が容易であり、かつ迅速に行なえる点にある。本研究では、*trn* 遺伝子間の非コード 4 領域：*trnP-trnP*、*trnL-trnF*、*trnD-trnY*、*trnP-trnW* を対象に PCR-SSCP 分析を行った結果、*trnD-trnY* 間の非コード領域(CS4 領域)において、一本鎖 DNA の二次構造の差異により移動度を異にする変異型と野生型の 2 種類のハプロタイプを明らかにし、葉緑体 DNA 上の種内変異を捉えることができた。解析した精英樹クローンの葉緑体

DNA ハプロタイプは、105 クローンの内 8 クローンが変異型(8%)を示した。

SSCP 分析は、塩基配列に特異的な二次構造の差異を検出する方法である。そこで、野生型、変異型ハプロタイプの移動度の違いはどのような塩基配列多型に起因しているのかを明らかにした。両葉緑体 DNA ハプロタイプの塩基配列を決定した結果、非コード領域の塩基配列長は、198 塩基対で、野生型と変異型の塩基配列を比較すると、20 塩基目に C(野生型)と T(変異型)の塩基置換が認められた。他の配列はすべて同一であった。すなわち、この一塩基置換が一本鎖の二次構造の差異を引き起こしていた。したがって CS4 領域に一塩基置換の多型が存在し、この塩基配列上の差異が SSCP 分析による移動度の違いとなって現れることを明らかにした。

CS4 領域の塩基配列多型を DNA 分子マーカーとして採種園の解析に利用するために、ヒノキの葉緑体 DNA の父性遺伝について検証した。交配家系の F<sub>1</sub> 子供群の葉緑体 DNA ハプロタイプを調べた結果、おおむね父性遺伝することが明らかになった。しかし、葉緑体 DNA ハプロタイプが母親由来型を示すものも若干出現しており、葉緑体 DNA が完全な父性遺伝をしているという結果には至らなかった。自然受粉の発芽種子の段階において、低頻度ではあるが同一個体内に野生型と変異型の両方をしめすヘテロプラズミー(Heteroplasmy)の例が確認された。このことから全個体が完全な父性遺伝を行うのではなく、若干の個体では母性遺伝も行われている可能性が示唆された。このような現象は Douglas-fir の父性遺伝の検証においても報告されている(Stoehr *et al.* 1998)。同じ細胞小器官であるミトコドリア DNA は厳密な母性遺伝を行ない、父親の精子のミトコドリア DNA は、初期段階で排除されている(金田・米川 1998)。同様に受精後に母親の葉緑体を排除する機構が存在すると考えられるが、今後この点を明らかにする必要がある。

DNA マーカーは、遺伝情報を直接反映させる環境や発育段階などの要因に影響されないマーカーであり、形態形質、色素やアイソザイムなどでは困難とされてきた直接的な遺伝育種情報を飛躍的に増大させる可能性を秘めている。DNA レベルでの検証は、針葉樹の葉緑体 DNA の研究では、PCR・RFLP やサザンハイブリダイゼーションが用いられてきた(Neale *et al.* 1986、Wagner *et al.* 1987、Tamura *et al.* 1994、白石・渡辺 1995、渡辺ら 1996、Kondo *et al.* 1998)。これらの分析には、制限酵素処理が加わるために手間がかかるため、多

量のサンプルを分析しなければならない採種園の花粉動態等の研究においては、不利であった。その点、SSCP分析は、実験操作が比較的簡単で、短時間に処理することができる。また、自動蛍光シーケンサー分析により多検体の効率的な分析も可能である。今後、葉緑体DNA上の多くの領域について塩基配列多型を検索することにより、さらに有用なマーカーを検出し、遺伝解析に利用していく必要がある。

ここではSSCP分析の有意性を述べたが、マーカーを見出すことで初めて可能となる。最近では葉緑体マイクロサテライトの多型が多数見出され、父性遺伝のマーカーとして用いられており (Vendramin and Ziegenhagen 1997, Ziegenhagen *et al.* 1998)、ヒノキにおいてもマイクロサテライト変異について調査する意義は高く、今後、変異性の高いマーカーのSTMS (sequence tagged microsatellite site) (David and Michael 1994) 化が図れば簡便・迅速に分析できる可能性は高い。

## 9.2 自然自殖の防止

採種園における自殖、近親交配は、種子の諸形質の低下、特に発芽率の低下をもたらす、さらに次世代の集団の近交係数を高め、様々な悪影響をもたらす。したがって自殖による遺伝的低下をできるだけ取り除く必要がある。ヒノキではすべての形質に自殖弱勢が見られることから、遺伝的荷重は大きく、樹種として受ける自殖弱勢の程度はかなり大きいとされている (田島 1979)。しかし、山出しされる集団の自殖個体率は、問題にならないほど低率であることがスギで明らかにされた (古越、1978)。ヒノキでは種子と育苗段階での遺伝的多様性は変わらない。その理由は、他殖性と苗畑移植時の自殖苗の除去にある (Tang and Ide 1998)。

採種園の自殖率は、樹種によっても異なるが、これまでの調査結果から0%~30%程度であると思われる。この自殖率の違いは、樹種特性、採種園の構成クローン数、植栽間隔などの設定条件、樹齢、立地条件、管理方法に起因していると思われる。

本研究においてヒノキの自然自殖率は、1.0~5.9%で平均2.3%と低頻度であった。ここでは構成クローンが33であるので、完全な任意交配が行われるならば、1/33、約3%が自殖となる。この値以下であれば偏って自殖が起きていることにはならない。したがって、本採種園における自殖は、大きな遺伝的低下の問題として特に考慮する必要はなさそうである。

このように低い自殖率を示した理由は、本園では、採種園の設定から30年近く経過し、成熟年齢に達していたことがあげられる。また調査年は大豊作年であり、受粉受精にいたる為の豊富な花粉生産により、交配環境が偏らなかったことが推察される。若齢時ではクローン間の着花量のバラツキも大きい、成熟するにつれて、各採種木間の差が小さくなる。また、樹間距離は間伐の実施により現在5m間隔になっており、樹冠が完全閉鎖に至っていないことから、花粉流動が妨げられないことも大きな要因と考えられる。

全国の採種園では、第2章で述べたように、平均構成クローン数は35クローン、面積2.14ha、植栽配置25型である。また設定年からみて成熟年齢に達している園が多い。これらの採種園においても、間伐が施されていれば、自殖率が大きな値を示すとは考えにくい。

今回得られた自殖率は全体としては低い値であったが、さらに詳細に考察する。ジベレリン処理により着花量が多くなる個体では自殖率が高くなった。しかもその樹高が低い場合に自殖率は高めであった。個体内の自殖率を見ると、上層で高くなる傾向がある。このことは、ヒノキの特性である雌雄花対称上偏 (菊池 1967) に起因するものと思われる。種子採取をしやすくするために樹高を低めた場合、雄花が中間層に分布するタイプも雌雄花対称上偏タイプに移行するため、上層での雌雄花の混在化を招き、隣花交配を引き起こし、自殖にいたる確率が高まるものと思われる。

Webber *et al.* (1993) によれば自殖は、成熟採種園においてその両親の数と花粉生産の条件が満たされれば、問題ないとされている。本研究の結論も同様であった。仮に低頻度の自殖が起ころても、次世代に強い近交弱勢が現れ選択的に死亡するため、近交係数を低下させ、遺伝的な健全性が保持されると考えられる。

しかし、ある程度成熟した採種園を対象としてできるだけ自殖をさけることを配慮した管理として、採種木間で樹冠の閉鎖が起きないように間伐、整枝を行い、園内の風の流れを良くし、花粉の流動が妨げられないようにすることに留意する必要がある。また、採種木の樹高は採種に支障がない限り高くして樹冠面積を大きくし、風が当たるように、また陽光が十分にあたり着花が全面に広がるように促し、必要によっては枝透かしなども整枝にあわせて行うなどの管理が必要である。

### 9.3 採種木間の交配の均等化

自殖率が低いとするならば、採種園において最大限に遺伝的潜在能力を発揮させるためには、採種木が交配親木として均等に寄与をしているかが、鍵となる。言葉を変えて言うならば、選抜個体である構成クローンのすべての遺伝子型が次世代の生産集団に寄与することによって、生産される種子の遺伝的獲得量の増大がはかられることを意味する。また、このことは、9.1の項で述べた自殖率の低下にも貢献し、生産される種子の内容充実率や発芽率の向上など、種子の良質向上にもプラスに働く。

被子植物では、受粉花粉の中で発芽や花粉管伸張速度の速い花粉だけが受精・結実に至る。田島(1979)は、ヒノキの選択受精について考察し、母樹の遺伝子型と次世代の生産集団における分離比の理論的期待値との差から、受粉から受精へ、受精から種子生産に至る間の花粉間の競争等による不和合や不稔を推察した。もしこのような選択受精が起こるのであれば、任意交配は成り立たず、採種園は理想でしかない。第8章においてこの選択受精の有無について確認した。その結果、花粉の側からみて、2つのことがわかった。第一番目は、ヒノキは近交弱勢を示し、自家花粉が受粉した受精胚や個体の適応度は低く、選択的に死亡するため、自家受精は選択的に排除されていることがわかった。第二番目は、他家花粉による受粉の場合、混合受粉の割合にほぼ等しく後代が分離することから、選択的な受精を示す結果が認められなかった。これらの結果は、花粉間競争などによる不和合は大きくないことを裏付けるものである。選択受精現象がないならば、構成クローンの花粉生産と花粉飛散時期を均等にすることにより、交配のチャンスは任意に近づくはずである。本研究では、緞沢5号の次世代への寄与について3年間調査を繰り返し、追跡した。採種園内のすべての構成採種木が花粉親として等しく寄与すると仮定した場合の期待寄与率は、緞沢5号の本数を $n$ 、全構成個体数を $nt$ とすれば、 $n/nt$ であるから、1号園においては3.3%、2号園では3.9%、全体で3.6%となる。期待値と実測値を比較した結果、1995年は、ジベレリンによる着花促進処理を施した1号園においては、期待値を上回り、2号園では若干下回った。全体ではほぼ期待値に近いことが認められた。1996年のジベレリン処理区である2号園における実測値は、無処理区である1号園に比べ、多少高い値になるものの、期待値の1/4であった。1号園の実測値は、期待値の1/10ときわめ

て低かった。1997年においても各園の実測値は期待値のそれぞれ約1/2(1号園)、1/3(2号園)であり、全体でも1/2以下であった。豊凶は、1995年は大豊作、1996年は大凶作、1997年は並作であった。したがって花粉親としての寄与は、豊凶に大きく影響されることが分かった。すなわち、豊作年ではほぼ期待寄与率に沿った花粉親としての寄与を果たしているが、豊作年以外の寄与率は非常に低い。このことから、豊作年は別として、それ以外の年の採種園産種子における花粉親の構成比には大きな歪みがあることが示唆された。

本採種園構成クローンの開花期は、雄花で約10日間、雌花で2週間のクローン間差があるが、ほぼすべてのクローン間で交配が可能な状態にある。しかし構成クローンの12%に相当する4クローンが完全な任意交配を行なう条件からずれていた。寄与率の歪みへの影響は、小さいと見ているが、この開花期の同調性も場合によっては検討する必要があるだろう。

清藤・相沢(1989)は、ヒノキ雄花数のクローン間差が豊作年には平準化することを報告した。この豊作年における雄花数の平準化により、1995年(豊作年)には期待寄与率に近い値が得られたと考える。

ヒノキ採種園における着花促進にジベレリン処理が効果的であることが報告され、凶作年でもその効果は見られるている。しかし、1996年の凶作年では種子生産に対して顕著な効果は認められなかった。一方、並作年の1997年における種子生産の結果で明らかのように、ジベレリン処理は自然着花にくらべ6倍の種子生産量を示し、凶作年を除き、種子生産に効果のあることが改めて示された。しかし、ジベレリン処理による緞沢5号の花粉親として寄与率上昇への効果は、自然着花に比べ若干認められたが、その効果は期待値の半分程度でさほど大きくなかった。ジベレリン処理は、雄花・雌花の着生量を増大させ、自然着花時のクローン間差を改善することができるが、全採種母樹に機械的にジベレリン処理した場合は、クローン間の雄花数のアンバランスを大きく改善することはできず、その結果、花粉親としての寄与率に大きな偏りが生じるものと推察された。採種園構成クローン間でランダム交配が行われ、全クローンが等しく花粉親として寄与することを前提としている採種園管理の視点から考えると、各クローンの生理生殖特性に沿った、きめこまかな着花促進が必要である。

また、豊作年には花粉親としての寄与の平準化が期待でき、発芽率の高い多量の種子生産が行なわれるので、

豊作年に種子採取し、貯蔵して使う体制の方が、豊作年以外に着花促進処理を行い、種子生産をはかるよりも望ましいと思われる。

ここで事業的にみた対策をまとめると以下のとおりである。

- ① ジベレリン処理による着花促進は、機械的に行わず、クローンの着花特性を把握し、花芽の分化能力の劣っているクローンを優先して行なう。
- ② 自然着花性の良過ぎるクローンは、雄雌両花とも良くつき、種子生産性が高いため捨てがたいが、遺伝的偏りを生ずるので採種園内の本数を調節すること。
- ③ 樹高は種子採取に支障がない範囲で高くし、着花を促進させる。
- ④ 花粉の有効飛散距離は 20m 程度であるから、クローン数はなるべく多くするとともに、各クローンの隣接組み合わせの多様化をはかる。
- ⑤ 種子採種は凶作年は避け、出来るだけ豊作年におこなう。

#### 9.4 園外花粉飛来の防除

園外花粉による汚染は、カナダの Douglas fir の採種園において、遺伝効果の減少を引き起こしている重大な問題として受け止められている (Wheeler and Jack 1986, Webber *et al.* 1993, Webber and Painter 1996)。Douglas-fir 林分に隣接する若い採種園では、58%の高い汚染を示した例 (Smith and Adams 1983) も報告されている。天然林から 2km 離れた採種園で 22~56%に及ぶ汚染も観察されている (Wheeler and Jack 1986)。また 20 クローンで構成され樹高が 2~3m に保たれている採種園における園外花粉汚染は、14%~48%と高いこと、しかもクローンによっては採種園内の構成木による受粉よりも園外花粉との交配の方が高くなっているケースも報告されている (Stoehr *et al.* 1998)。カナダでは受粉作業、種子採取作業の集約化をはかるため、樹高を低くした"マイクロ採種園"化が提唱されてきた (Webber *et al.* 1993, Webber 1995)。明らかに園内採種木の樹高の低さが、このような花粉汚染を引き起こしていることは明らかである。一般に採種園では、種子採取を容易にするため、採種木を可能な限り低く仕立てているが、風媒植物であるヒノキの受粉は空中花粉によって行われることから、採種園の樹高が低ければ低いほど、園周辺からの花粉の侵入が多くなる。しかも同一樹種が接していればその程度は大きくなり、遺伝獲得量は減少すること

になる。

本研究においては、園外花粉の影響評価まで調査することはできなかったが、今後ヒノキの場合についても花粉汚染と周辺林との関係を明らかにする必要がある。

園外花粉の防除対策としては、9.1 の項と同様、採種木の樹高を可能な限り高くし、園内の花粉濃度が高まるようにする。しかしこの場合、着花性の高いクローンに偏らない配慮が必要である。特に着花能力の低いクローンはジベレリン処理を施し、できるだけ高めてやる必要がある。同一樹種の林が周辺に接してあるならば、異樹種による防除帯を設け、可能であれば、無選抜個体が花粉源とならないよう除去する必要がある。

以上現在設定されている採種園内の問題と管理方法について述べた。現存する既設採種園の 1.5 世代化にあたり以上のような点を考慮することにより、採種園の交配環境は改善され、より遺伝獲得量は増加するものと期待される。

#### 9.5 次世代の採種園

育種は一代限りで終わらない。悪いものを除去し、良いものを選抜していくことで改良が進む。しかし、このことは、遺伝的変異を狭め、優良遺伝子も捨ててしまう危険性もはらんでいる。そのようなことを踏まえ、アメリカにおいては将来世代の戦略が盛んに議論された (Zobel *et al.* 1972, Squillace 1973, Libby 1973, Weir and Zobel 1975)。日本においても育種集団林の必要性が叫ばれ (戸田 1979, 大庭 1979)、その具体化に向けて林木育種センターからの計画も示されている (林木育種センター 1999)。このような方向の中で、将来の採種園に絞ってここでは述べる。

戸田 (1979)、大庭 (1979) が提唱しているミショウ採種園 (林) がある。クローン採種園方式では育種集団林の検定結果にもとづき採種園構成クローンを選ぶことになるから、その種苗供給には 1 伐期近い期間を要することになる。しかしミショウ採種園では検定と種子採取を同時に行なえる利点があり、最初はクローン採種園より遺伝獲得量は低いが、家系内選抜と家系間選抜によりさらに付加的な遺伝獲得量が期待できる。しかも種子生産がクローン採種園に比べて数 10 年早くから可能になる。しかし、欠点としては、家系間、家系内の選択が不可欠であるから、種子採種を容易にするための管理はできず、採種林として仕立てるしかなく、このことは将来大きな障害となるとと思われる。このため最終的にはクロー



ン採種園になるであろう。

クローン採種園は長期間を要するものの種子採取を考えた場合はより現実的である。その方法は、育種集団林の各家系の中から、評価により採種園の構成すべき親を選び出す。この場合、戦略により二通りの方法が取られるであろう。目的を絞りにそれにそった両親によるマイクロナル採種園と、従来のように遺伝的多様性の縮小化を極力さけるため多数の家系で構成する混合クローン採種園である。前者は経営目標を絞った品種を作るのに役立つ。これは、住宅業界が建築部材の品質評価の方向に進んでいる現状において、この動きに標準をあわせやすい。ただし、用いるクローンは多様な環境条件での検定が行なわれていない場合、最初から少数のクローンに絞って造林に供しえるか、疑問も残る。むしろ、従来の多数のクローンによる方式が安全である。

次世代では、恐らく広い面積を確保して採種園を造成し、豊富な労働力によりこれを管理することは不可能と考える。したがって採種園サイズのミニチュア化も考えねばならない。採種園のミニチュア化については、ニュージーランドの *Radiata pine* の樹高 2m に管理した "Hedge orchard" (Sweet *et al.* 1990) が実用化されており、最近ではカナダの *Douglas fir* 採種園においても同様な "Micro-orchard" (Webber 1995) が実用的に用いられている。また次世代向けとして "Container seed orchard" も提唱されている (Ross *et al.* 1986、Ross and Webber 1991)。わが国においては、スギの "ミニチュア採種園" が試みられ、既設採種園と比較して自然交配状況は変わらないことが報告されている (Ito and Katuta 1986)。

ミニチュア化されることで危惧される点は、自殖率の程度、構成クローンの任意交配性、そして園外花粉の汚染である。自殖率はクローン数をふやし、樹間の間隔をコントロールすることで低くすることは可能である。あとの二点が問題として残る。カナダではこのための花粉管理方法として、"Supplemental mass pollination" と "Cooling" を実行している。"Supplemental mass pollination" は花粉を採取し、それを散布する人工媒助法で、任意交配と遺伝性の向上を狙っている。また "Cooling" は、花芽を冷却 (irrigation and cooling) することにより、開花を 10~14 日遅らせ、これによって園外花粉の汚染を防いでいる (Webber and Painter 1996)。

このような将来世代の採種園では、より高度の花粉管理技術が要求される。そのための基礎的情報をえるため

にも、今後、DNA 分子マーカーを用いた採種園研究をさらに推進する必要がある。

## 摘 要

ヒノキは日本の固有種で、建築材料としても優れた特性を有し、木材価値の上では他に類をみない優れた樹種である。現在、人工林面積の 25% を占め、年間造林面積の首位の座にある。採種園からの種苗の供給は、70% を超えるまでに至っている。しかしヒノキ採種園に関する遺伝育種学的研究は進んでおらず、その情報は非常に乏しい現況にある。そこで、本論文においては、採種園における種子生産に係わる遺伝的振る舞いを明らかにすることを目的に、1) ヒノキの父性遺伝マーカーの探索、2) ヒノキ採種園における花粉の有効飛散距離の推定、3) ヒノキ採種園における自殖率の推定、4) ヒノキ採種園構成クローンの花粉親としての次代に対する寄与率の評価、5) ヒノキにおける選択受精の検討、について研究を行った。

### 1) ヒノキの父性遺伝マーカーの探索

直接的な雄親側の遺伝育種情報をえるため、葉緑体 DNA のマーカーの探索を行った。精英樹 105 クローンを対象に、葉緑体 DNA 上の非コード領域を PCR-SSCP 法により分析した。

その結果、*trnD-trnY* (CS4) 領域において異なる移動度のピークを示す変異が見られた。これは一塩基置換に起因していることが明らかとなった。この変異型葉緑体 DNA ハプロタイプは、全調査クローン中 8 クローン (7.6%) であった。本研究で対象とした山梨県八木沢採種園において、鯨沢 5 号のみが変異型ハプロタイプを示した。5 交配家系の  $F_1$  子供群の葉緑体 DNA ハプロタイプを調べた結果、高頻度で父性遺伝していることがわかった。

葉緑体 DNA の分析は、一般にサザンハイブリダイゼーション、RFLP 法が用いられ、多数のサンプルについて分析することは困難であった。本研究で用いた PCR-SSCP 分析法は、実験操作が比較的簡便で、多数のサンプルの分析が比較的容易であった。プライマーの設計により、さらに短時間で分析できるようになった。したがって、PCR-SSCP 分析は、迅速に、効率よく情報量を収集するには適した手法であり、採種園の交配実態の解析には最適な方法である。

### 2) ヒノキ採種園における花粉の有効飛散距離の推定

CS4 遺伝子非コード領域の SSCP 分析を用いた葉緑

体 DNA マーカーにより、採種園内 2 カ所において花粉飛散距離を推定した。マーカークローンの鰍沢 5 号を中心に、プロット No.1 においては 30m 以内にある 40 採種母樹からの種子発芽サンプルを PCR-SSCP 法によって分析した。プロット No.2 では、マーカー木の周囲 37 採種母樹について同様に分析した。

その結果、以下のことが明らかになった。花粉飛散は、No.1 では 26m、No.2 では 29m の位置まで確認された。花粉飛散はマーカーからの距離に逆比例していた。マーカー木の隣接周囲木の交配に与える影響は非常に大きいことが示された。有効花粉飛散距離を任意交配の期待値を基準として求めた結果、実用的な有効花粉飛散距離は 20m 以内であることが示唆された。

### 3) ヒノキ採種園における自殖率の推定

採種園内の自然自殖率を推定するため構成クローン 33 クローンのうち、葉緑体 DNA ハプロタイプが変異型である鰍沢 5 号の生産種子の自殖率を求めた。その結果、自殖率は、1.0%~5.9%と低く、平均 2.3%であった。

次に樹冠の位置別の自殖率を求めるため、樹冠の部位(上層・下層と方位)別に樹冠上層と下層で採種し、分析した。用いた 3 ラメートの上下樹冠位置別の自殖率はそれぞれ、上層 7.3%—下層 2.0%、上層 1.2%—下層 1.0%および上層 1.0%—下層 2.0%であり、平均すると上層の自殖率 3.2%、下層 1.8%であった。種子の発芽率は自殖率に逆比例していた。方位別ではラメートにより異なるが、南面の自殖率 1.0~9.3%の範囲にあり 4 方位の中で最も高い自殖率を示し、東面では 0~4.0%、西面では 0~7.0%、北面では 1.0~5.0%であった。自殖率に樹冠方位による顕著な違いは認められなかった。

### 4) ヒノキ採種園構成クローンの花粉親としての次代に対する寄与率の評価

1995~1997 年の 3 年間、山梨県内のヒノキ採種園において、鰍沢 5 号の花粉親としての次代への寄与率を調べた。

その結果、豊作年の 1995 年には 4.0%の寄与率を示し、期待寄与率 3.6%に近い値であった。凶作年の 1996 年は 0.5%、並作年の 1997 年は 1.3%の寄与率であり、いずれも期待寄与率を大きく下回った。豊作年には、並作・凶作年に比べ、採種園構成クローンの花粉親としての寄与率が平準化する可能性が示唆された。

### 5) ヒノキにおける選択受精の検討

ヒノキの選択受精について明らかにするため、葉緑体 DNA ハプロタイプの父性遺伝の現象を利用し調査を行った。対象としたヒノキ採種園の構成クローンのうち、鰍

沢 5 号のみが変異型の葉緑体 DNA ハプロタイプである。このクローンを指標としてヒノキの選択受精について 2 カ年間の調査を行った。マーカークローンの鰍沢 5 号を含む、5 クローンからの等重量混合花粉を用い、これらの 5 クローンを母材料として交配をおこなった。その結果、特定クローンの花粉が選択的に受精する現象(選択受精)は認められなかった。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたって、九州大学農学部農学研究大学院・白石 進教授からは、計画の段階から終始懇切丁寧なご指導とご助言をいただいた。心からお礼申し上げます。本論文のとりまとめに際しては、九州大学農学部名誉教授・斎藤 明博士からは丁寧なご指導とご助言、懇篤なるご校閲を賜った。ここに心から感謝の意を表する次第です。また九州大学大学院農学研究大学院・今田盛生教授には、論文のご校閲とご助言を賜り、深くお礼申し上げます。

論文の準備にあたって、筑波大学名誉教授、元山梨県森林総合研究所客員研究員・陣内 巖博士には、激励、ご配慮をいただいた。厚く感謝申し上げます。

DNA 分析については多くのご協力、ご支援をいただいた九州大学農学部木本植物研究室時代の学生各位に心から感謝申し上げます。

林木育種センター九州林木育種場並びに大分県林業試験場より材料を提供していただき、ここに厚くお礼申し上げます。

また、山梨県森林総合研究所森林環境研究部・大澤正嗣博士、田中 格氏、西川浩己氏、長池卓男博士には、終始励まし、多大なご助言、ご校閲を賜った。実験のための調査、交配、種子採取、発芽検定、分析および資料整理には、山梨県森林総合研究所加藤愛子、深沢紀代見、樋口幸子、小池香織、志村知美、齊藤美咲、丹沢浩江、富沢林木育種園・遠藤積哉、望月良江、遠藤初恵、望月貞夫、小泉年且の各諸氏にご協力いただいた。

また論文をまとめるにあたり歴代山梨県森林総合研究所所長萩原哲哉氏、鈴木 宏氏、横井昭男氏には激励・ご協力を賜った。以上心から感謝の意を表します。

その他、ここに記す事が出来ないくらい多くの方々のご支援、ご協力があったことに対しても、心から厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- Adams, W. T., Joly, R. J., 1980. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards : clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. *Silvae. Gent.*, 29 : 1-4.
- Aspit, V. J., Nakamura, R. R., Wheeler, N. C., 1989. Differential male reproductive success in Douglasfir. *Theor. Appl. Genet.*, 77 : 681-684.
- Avery, O. T., MacLeod C. M., McCarty, M., 1944. Studies on the chemical nature of substance including transformation of pneumococcal types. *Exp. Med.*, 79 : 137.
- Burczyk, J., 1998. Mating system variation in a Scots pine clonal seed orchard. *Silvae Genet.*, 47: 155-158.
- Burczyk, J., Prat, D., 1997. Male reproductive success in *Pseudotsuga* effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity*, 79 : 638-647.
- Burczyk, J., Nikkanen, T., Lewandowski, A., 1997. Evidence of an unbalanced mating pattern in a seed orchard composed of two larch species. *Silvae Genet.*, 46 : 176-181.
- Burtun, V., Barnes, R. T. B., Squillace, A. E., 1962. Selective fertilization in *Pinus monticola* Dougl. *Silvae Genet.*, 11 : 103-111.
- 茶屋場盛, 1977. アカマツ採種園における自然自殖率の推定. *日林誌*, 59 : 414-417.
- David, N. S., and Michael, E. D., 1994. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. *Genome*. 37 : 977-983
- Di-Giovanni, F., Kevan, P. G., 1991. Factors affecting pollen dynamics to pollen contamination : a review. *Can. J. For. Res.*, 21 : 1155-1170.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15.
- Echt, C. S., Vendramin, G. G., Neison, C. D., Marquardt, P., 1999. Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Can. J. For. Res.*, 29 : 365-371.
- El-Kassaby, Y. A., Fashiler, A. M. K., Sziklai, O., 1984. Reproductive phenology and its impact on genetically improved seed production in Douglasfir seed orchard. *Silvae Genet.*, 33 : 120-125.
- El-Kassaby, Y. A., Parkingson, J., Devitt, W. J. B., 1986. The effect of crown segment on the mating system in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (MIRB.) Franco) seed orchard. *Silvae Genet.*, 35 : 76-82 .
- El-Kassaby, Y. A., Davidson, R., 1991. Impact of pollination environment manipulation on the apparent outcrossing rate in Douglas-fir. *Heredity*, 66 : 55-59.
- El-Kassaby, Y. A., Barnes, S., Cook, C., Macleod, D. A., 1993a. Supplemental mass pollination success rate in a mature Douglas-fir seed orchard. *Can. J. For. Res.*, 23 : 1096-1099.
- El-Kassaby, Y. A., Meagher, M. D., Davidson, R., 1993b. Temporal variation in outcrossing rate in a natural stand of western white pine. *Silvae Genet.*, 42 : 131-135.
- Eilstrand, N. C., 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Paphanus sativus*. *Am. J. Bot.*, 76 : 1081-1088.
- Eriksson, G., Schelender, B., Akebrand, V., 1973. Inbreeding depression in an old experimental plantation of *Picea abies*. *Hereditas*, 73 : 185-194.
- Fast, W., Dncik, B. P., Bower, R. C., 1986. Mating system and pollen contamination in a Douglas-fir clone bank. *Can. J. For. Res.*, 25 : 1314-1319.
- Fowler, D. P., 1964. Effects of inbreeding in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Silvae Genet.*, 13 : 170-177.
- Fowler, D. P., 1965. Natural self-fertilization in three Jack pines and its implications in seed orchard management. *For. Sci.*, 11(1) : 55-58.
- Franklin, E. C., 1969. Mutant forms found by self-pollination in Loblolly pine. *J. Heredity*, 60 : 315-320.
- Franklin, E. C., 1970. Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family Pinaceae. USDA Forest Serv. Res. Paper, SE-

- 61: 1-21.
- 藤野泰助, 1969. 木曽のヒノキ天然林について. 山林, 1023: 63-66.
- 深田俊武・白石 進, 1995. スギにおけるマイクロサテライトを利用した分子マーカー開発のための基礎研究. 日林論, 106: 429-430.
- 古越隆信, 1978. スギ採種園の花粉管理に関する基礎的研究. 林試研報, 300: 41-120.
- 古越隆信. ヒノキの着花結実技術開発 - 技術開発と育種的意義 -. 林木の育種 134: 28-31.
- 古越隆信・大谷賢二. スギ、ヒノキ、アカマツにおける近交弱勢の現われ方. 日林論, 96: 273-275.
- 後藤 晋・渡辺敦史・池田浩一, 1997. RAPD マーカーによるハゼの品種識別. 日林誌, 79: 229-233.
- Grattapaglia, D., Bertolucci, F. L., Sederoff, R. R., 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 90: 933-947.
- Haldane, J. B. S., 1932. The cause of evolution. Harper and Brothers, New York, 234pp.
- 原田 光・小西伴尚, 1999. フタバガキ自然集団の AFLP を用いた遺伝的変異の解析. 日林学術講, 110: 146-147.
- 長谷川孝三, 1943. 林木種子の活力に関する実験的研究. 帝室林野林試報, 4: 106-122.
- 橋詰隼人, 1968. ヒノキおよびヒノキアスナロの花粉発芽について. 鳥大農学報, 20: 31-34.
- 橋詰隼人・岡田泰久, 1968. ヒノキの花粉形成、発育ならびに採取適期. 林木の交配に関する基礎研究(I), 304-309.
- 橋詰隼人, 1975. 林木の交配に関する基礎的研究(II). ヒノキの球果の発達に対する受粉の役割および単為結果の人為誘起. 鳥大農学報, 27: 51-59.
- Hayashi, K., 1991. A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. PCR Methods Appl., 1: 34-38.
- Heribert-Nirsson, N., 1923. Zertationsversuche mit durchtrennung des griffes bei *Oenothera lamarckiana*. Hereditas, 4: 177-190.
- House, A. P. N., Bell, J. C., 1994. Isozyme variation and mating system in *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake. Silvae Genet., 43: 167-176.
- 井出雄二, 1984. 採種園の造成に関する研究(II) - 2つのヒノキ採種園における種子生産性のちがいを, 日林論 95: 285-286.
- Ito, S., Katuta, M., 1986. Seed productivity in the miniature seed orchard of *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jpn. For. 68: 284-288.
- 岩波洋造, 1981. 花粉学. 講談社, 東京, 208pp.
- Jhingan, A. K., 1992. A novel technology for DNA isolation. Methods in Molecular and Cellular Biology, 3: 15-22.
- Johansen, W., 1909. Elemente der exacten Erblichkeitslehre. Gustav Fischer, Jena.
- Johnson, L. C., Critchfield, W. B., 1945. Reduced vigour, chlorophyll deficiency and other effects of self-fertilization in *Pinus*. Can. J. For. Res., 23: 145-149.
- 金指達郎・金川 侃・勝田 征, 1984. スギ採種園で雄花量を調節した条件下での花粉の飛散状況. 日林誌, 66: 491-498.
- 勝田 征, 1982. 坂下ヒノキ採種園における種子生産実績と今後の技術的対応, 林木の育種, 124: 13-18.
- 金田秀貴・米川博通, 1998. ミトコンドリア DNA にみられる母性遺伝の不思議. 遺伝, 52: 27-31.
- 金川 侃・勝田 征, 1983. GA3、GA4/7 による着花促進効果. 日林論, 94: 299-300.
- 金川 侃・北川紀彦, 1987. ヒノキ採種園の着花促進について. 林木の育種, 143: 28-33.
- 河崎久男, 1990. スギにおける胚致死遺伝子の検出法に関する研究. 林育研報 8: 1-67.
- 菊池秀夫, 1967. ヒノキの開花・結実習性(九州林木育種場における調査結果). 日林誌, 49: 73-76.
- Kondo, T., Ishibashi, T., Shibata, M., Hirai, A., 1986. Isolation of chloroplast DNA from *Pinus*. Plant Cell Physiol., 27: 741-744.
- 近藤禎二・寺田貴美雄・河崎久男・岡村政則, 1997. クロマツのマツノタマバエと連鎖した RAPD マーカー. 日林講, 108: 189.
- Kondo, T., Tsumura, Y., Kawahara, T., Okamura, M., 1998. Paternal inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in interspecific hybrids of *Chamaecyparis* spp. Breeding Science, 48: 177-179.

- Koski, V., 1970. A study of pollen dispersal as a mechanism of gene flow in conifers. Com. Inst. Forestalis Ferriæ, 70. 4 : 4-78.
- Krauss, S. L., Peakall, R., 1998. An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae). Australian J. Bot., 46 : 533-546.
- Krauss, S. L., 1999. Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Molecular Ecol., 8 : 217-226.
- 倉本哲嗣・近藤禎二・藤沢義武, 1999. スギ材質の QTL マッピング. 林木の育種, 192 : 15-18.
- Langner, V. W., 1953. Eine Mendelspaltung bei Aureau-Formen von *Picea abies* (L.) Karst. als Mittel zur Klärung der Befruchtungsverhältnisse im walde. Silvae Genet. 2 : 49-51.
- Langner, W., 1959. Self-fertility and inbreeding in *Picea omorika*. Silvae Genet., 8 : 84-93.
- Libby, W. J., 1973. Domestication strategies for forest trees. Can. J. For. Res. 3 : 265-276.
- Markert, C. L. and Møller, F. 1959. Multiple forms of enzymes : Tissue outogenetic and species specific pattern. Proceeding Natural Academy Science 45 : 753-763.
- Maeda, H., Shiraishi, S., 1997. An identification of chloroplast DNA haplotypes of *Larix kaempferi* and *L. gmelinii* var. *japonica* using fluorescence-based PCR-SSCP analysis of rbcL gene. J. For. Res., 2 : 187-188.
- 前田武彦・西村慶二, 1985. ヒノキ採種園における種子生産技術. 林木の育種, 134 : 32-34.
- 牧野富太郎, 1961. 牧野新日本植物図鑑. 北隆館, 東京, 1060pp.
- 実森一郎, 1992. 斑入りヒノキの交配実験. 林木の育種, 163 : 22-24.
- 宮原文彦・後藤 晋, 1997. 第6回バイテク林木育種研究会記録. 林木の育種, 184 : 38-43.
- 宮原文彦・前田 一・白石 進, 1998. マツノサイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園構成クローンとしての小浜ク-24号の評価. 日林誌, 80 : 233-235.
- Moran, B. J. C., Matheson, A. C., 1980. The genetic structure and levels of inbreeding in *Pinus radiata* D. Don. seed orchard. Silvae Genet., 29 : 190-193.
- Moran, G. F., Griffin, A. R., 1985. Non-random contribution of pollen in polycrosses of *Pinus radiata*. Silvae Genet., 34 : 117-121.
- Morgan, T. H., 1911. Random segregation versus coupling in Mendelian inheritance. Science, 34 : 384.
- Mulcahy, D. L., Mulcahy, G. B., Sercy, K. B., 1992. Evolutionary genetics of pollen competition. In : Wyatt, R. (Ed.), Ecology and evolution of plant reproduction -New approaches-. Chapman and Hall, New York, pp. 25-36.
- Müller, G., 1976. A simple method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. Silvae Genet., 25 : 15-17.
- Müller, G., 1977. Cross-fertilization in a conifer stand inferred from enzyme gene-markers in seeds. Silvae Genet., 26 : 223-226.
- Müller, G., 1982. Reproductive system in conifer seed orchard, mating probabilities in seed orchard of *Pinus sylvestris* L. Silvae Genet., 31 : 188-197.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Cold spring harbor symposium on quantitative biology. 101 : 263-273.
- Muona, O., Yazdani, R., Rudin, D., 1987. Genetic change between life stages in *Pinus sylvestris* : allozyme variation in seeds and planted seedlings. Silvae Genet., 36 : 39-42.
- 村井正文, 1986. 我が国における遺伝子分析研究の現状. 林木の育種, 140 : 8-10.
- Murry, M. G., Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8 : 4321-4325.
- 長尾精文・佐々木恵彦, 1985. ヒノキの花成反応に及ぼす光処理の効果. 林試研報, 332 : 39-60.
- Nakamura, R. R., Wheeler, N. C., 1992. Pollen competition and paternal success in Douglas-fir. Evolution, 36 : 846-851.
- 生井兵治, 1992. 植物の性の営みを探る. 養賢堂, 東京, 240pp.

- 榎崎康二・渡辺敦史・富田啓治・佐々木義則・白石 進, 1996. ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種のDNA分析. 日林誌, 78: 157-161.
- Neale, D. B., Wheeler, N. C., Allard, R. W., 1986. Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. *Can. J. For. Res.*, 16: 1152-1154.
- Neale, D. B., Sedeeoff, R. R., 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 212-216.
- 西岡常一・小原二郎, 1978. 法隆寺を支えた木. 日本放送出版協会, 東京, 226pp.
- Noss, R. F., 1990. Introduction for monitoring biodiversity: A hierarchical approach. *Conservation Biology* 4: 355-364.
- 大庭喜八郎, 1972a. ヒノキの葉緑素変異個体の遺伝. 日林誌, 54: 56-58.
- 大庭喜八郎, 1972b. メアキ、キリスマメアサおよびアオスギのミドリスギ劣性遺伝子. 日林誌, 54: 1-5.
- 大庭喜八郎, 1972c. クロマツの黄子苗を生ずる劣性遺伝子および自然自殖率の推定. 日林誌, 54: 28-29.
- 大庭喜八郎, 1972d. 黄金スギ花粉を指標とした選択受精. 日林講, 83: 204-206.
- 大庭喜八郎, 1979. 育種集団林について. 林木の育種, 111: 9-17
- Ohba, K., Iwakawa, M., Okada, U., Murai, M., 1971. Paternal transmission of a plastid anomaly in some reciprocal cross of sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don. *Silvae Genet.*, 20: 101-107.
- 大庭喜八郎・岩川盈夫・岡田幸郎・村井正文, 1971. アカマツの葉緑素変異苗の発生頻度による自然自殖率の推定および葉緑素変異苗の遺伝. 日林誌, 53: 327-333.
- 大庭喜八郎・前田武彦・福原植勝, 1974. ヨレスギの遺伝およびヨレ遺伝子と白子、ミドリスギの両劣性遺伝子との連鎖. 日林誌, 56: 276-281.
- 岡浦貴富・原田 光, 1999. AFLP法によるブナ・ミズナラ自然集団の遺伝的変異の解析. 日林学術講, 110: 137.
- Olsson, G., 1960. Self-incompatibility and outcrossing in rape and white mustard. *Hereditas*, 46: 241-252.
- 尾中文彦, 1939. 古墳その他古代の遺構より出土せる材料. 昭和13年度日林講, 430-456.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989a. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 86: 2766-2770.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., Hayashi, K., 1989b. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5: 874-879.
- Ottaviano, E., Sari-Gorla, M., Villa, M., 1988. Pollen competitive ability in maize within population variability and response to selection. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 601-608.
- 小沢準二郎, 1962. 針葉樹のタネ (生産と管理). 地球出版, 東京, 451pp.
- Pederson, S., 1988. Pollen competition in barley. *Hereditas*, 109: 75-82.
- Ponoy, B., Hong, Y.-P., Barryjaquish, W. J., Carlson, J. E., 1994. Chloroplast DNA diversity of Douglas-fir in British Columbia. *Can. J. For. Res.*, 24: 1824-1834.
- Ritland, K., El-Kassaby, Y. A., 1985. The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas-fir is shown by an efficient multilocus model. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 375-384.
- 林木育種センター, 1994. 全国採種園・採種園一覧. 林木育種協会, 東京, 165pp.
- 林木育種センター, 1996a. 精英樹選抜現状 (営林 (支) 局・都道府県別) 林木育種事業統計, 14-15.
- 林木育種センター, 1996b. 平成8年度育種種苗の生産と普及の現況 (ヒノキ). 林木育種事業統計, 64-65.
- 林木育種センター, 1999. 交雑育種推進事業について. 平成10年度林木育種都県担当者会議資料, 1-33
- 林野庁, 1966. 主要植種の開花・結実習性に関する調査中間報告(1). 林野庁, 134pp.
- 林野庁, 1975. 昭和49年度関東林木育種基本区育種協議会議事録, 14-21
- 林野庁, 1986. 昭和60年度遺伝子保存に関する調査報告書. 237pp.
- 林野庁, 1997. 林業統計要覧 1997年版. 林野弘済会, 東京, 252pp.
- 林野庁, 1999. 平成9年度林木育種事業統計. 林野庁林

- 木育種センター, 1-71.
- Ross, S. D., Eastham, A. M., Bower, R. C. 1986. Potential for container seed orchards. In Proc. symposium : conifer tree seed in the inland mountain west. Shearer, R. C. (ed.) USDA. For. Serv. Intermtn. Res. Sta., Gen. Tech. Rep. INT-203. Pp180-186.
- Ross, S. D., Webber, J. E. 1991. Evaluation of the miniaturized, clonal row seed orchard for coastal Douglas-fir. B. C. Min. of For., Res. Br. Working Plan E. P1129.
- Rudin, D., Erikson, G., Ekerberg, L., Rasmuson, M., 1974. Studies of allele frequencies and inbreeding in Scotch pine populations by the aid of the isozymes technique. *Silvae Genet.*, 23 : 10-13.
- Rudin, D., Lindgren, D., 1977. Isozyme studies in seed orchards. *Studia Forest Alia Suecica*, 139 : 1-23.
- 坂口勝美, 1952. 実用ヒノキ育林学. 養賢堂, 東京, 339pp.
- 佐藤敬二, 1934. マツに関する基礎造林学的研究 第二報 結実性の遺伝並苗木性現象. 東大演報, 20 : 1-20.
- 佐藤敬二, 1971. 日本のヒノキ (上巻). 全国林業普及協会, 東京, 275pp.
- 佐藤敬二, 1973. 日本のヒノキ (下巻). 全国林業普及協会, 東京, 361pp.
- Schlichting, C. D., Stephenson, A. G., Small, L. E., Winsor, J. M., 1990. Pollen loads and progeny vigor in *Cucurbita pepo* : the next generation. *Evolution*, 44 : 1358-1372.
- 清藤城宏, 1975. 採取位置をかえたヒノキの発芽. 林木育種情報、林木の育種, 5 : 7.
- 清藤城宏, 1980. ヒノキ採種園における開花期のクローン間差異. 日林論, 91 : 197-198
- 清藤城宏, 1983. 昭和 57 年度山梨県林業試験場事業報告, 山梨林試 7-16.
- 清藤城宏, 1983. ヒノキ採種園における着花習性と受粉適期. 日林関東支論, 35 : 109-110.
- 清藤城宏, 1984. ジベレリン処理によってえられた凶作年のヒノキ種子. 日林関東支論, 36 : 91-92
- 清藤城宏・鈴木賢二・白石 進, 1987. 富士山麓青木ヶ原におけるヒノキ天然林のアイソザイム変異. 日林誌, 69 : 379-361.
- 清藤城宏・相沢武夫, 1989. ヒノキ採種園における種子生産技術. 林技情報, 15 : 1-8.
- 清藤城宏, 1990a. ヒノキ採種園におけるアイソザイム変異と自殖率の推定. 日林論, 101 : 301-302.
- 清藤城宏, 1990b. アイソザイム遺伝子をマーカーにしたヒノキ天然林の繁殖構造の解析. 日林誌, 72 : 431-434.
- 清藤城宏, 1992a. ヒノキ針葉におけるアイソザイムの遺伝および富士山天然林のアイソザイム変異. 山梨林技セ報, 18 : 10-22.
- 清藤城宏, 1992b. ヒノキ採種園におけるアイソザイム変異およびクローンの同定. 山梨林技セ報, 18 : 23-29.
- 清藤城宏・内田煌二, 1996. ヒノキ採種園における遺伝変異. 日林講, 107 : 175.
- Shaw, D. W., Allard, R. W., 1982. Estimation of outcrossing rates in Douglas-fir using isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.*, 62 : 113-120.
- Shen, H.-H., Rudin, D., Lindgren, D., 1981. Study of the pollination pattern in a Scots pine seed orchard by means of isozyme analysis. *Silvae Genet.*, 30 : 7-15.
- 白石 進・上中久子, 1983. ヒノキ針葉パーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝, 日林論, 94 : 287-288.
- 白石 進・上中久子・西村慶二, 1986. ヒノキ針葉および花粉のアスパラギン酸アミノ転移酵素. 日林誌, 68 : 499-504.
- Shiraishi, S., Kaminaka, H., Ohoyama, N., 1987. Genetics variation and differentiation recognized at two allozyme loci in hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). *J. Jpn. For. Soc.*, 69 : 88-93.
- Shiraishi, S., 1988a. Linkage relationships among allozyme loci in Japanese black pine, *Pinus thnbergii*. *Silvae Genet.*, 37 : 60-66.
- Shiraishi, S., 1988b. Inheritance of isozyme variations in Japanese black pine, *Pinus thnbergii* Parl. *Silvae Genet.*, 37 : 93-100.
- 白石 進・渡辺敦史, 1995. rbcL 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌, 77 : 429-436.
- 白石 進・磯田圭哉・渡辺敦史・河崎久男, 1996. 蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツの DNA 分類学的解析. 日林誌, 78 : 175-182.
- Shiraishi, S., Maeda, H., Toda, T., Seido, K., Sasaki,

- Y., 2001. Intraspecific sequence polymorphism and inheritance of intergenic (*trnD-trnY*) spacer region of chloroplast DNA in *Chamaecyparis obtusa* ENDL. *Theor. Appl., Genet.* (102 : 935-941)
- Siegismund, H. R., Kjaer, E. D., 1997. Outcrossing rates in two stands of noble fir (*Abies procera* REHD.) in Denmark. *Silvae Genet.*, 46 : 144-146.
- Smith, D. B.a, Adams, W. T. 1983. Measuring pollen contamination in clonal seed orchards with the aid of genetic markers. In Proc. 17<sup>th</sup> southern forest tree improvement conference, June 69, Univ. Georgia, Athens, Ga : 69-77.
- Snow, A. A., 1990. Effect of pollen load size and number of donors on sporophyte fitness in wild radish (*Papuanus sativus*). *Am. Nat.*, 136 : 742-758.
- Sorensen, F. C., Frankline, J. F., Woollard, R., 1976. Self-pollination effects on seed and seeding traits in Noble-fir. *For. Sci.*, 22(2) : 155-159.
- Sproule, A. T., Dancik, B. P., 1996. The mating system of black spruce in north-central Alberta, Canada. *Silvae Genet.*, 45 : 159-164.
- Squillace, A. E., Bingham, R. T., 1958. Selective fertilization in *Pinus monticola* Dpugl. *Silvae Genet.*, 7 : 188-196.
- Squillace, A. E., Kraus, J. F., 1963. The degree of natural-selfing in slash pine as estimated from albino frequencies. *Silvae Genet.*, 12 : 46-50.
- Squillace, A. E., 1973. Comparison of some alternative second generation breeding plans for slash pine. Proc. 12<sup>th</sup> Conf. On South For. Tree Improvement, Baton Rouge, La, 2-9.
- Squillace, A. E., Goddard, R. E., 1982. Selfing in clonal seed orchards of slash Pine. *For. Sci.*, 28 : 71-78.
- Stine, M., Sears, B. B., Keathley, D. E., 1989. Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce. *Theor. Appl. Genet.*, 78 : 768-774.
- Stoehr, M. U., Orvar, B. L., Vo, T. M., Gawley, J. R., Webber, J. E., Newton, C. H., 1998. Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.*, 28 : 187-195.
- 陶山佳久, 1998. 林木のDNA分析法(3)-核DNAの異変の分析①RFLP, PCR-RFLP 林木の育種, 189 : 38-41.
- 陶山佳久・来田和人・黒丸 亮, 1999. DNA多型を用いたアカエゾマツ実生苗の花粉親推定. *日林学術講*, 110 : 140.
- 鈴木賢二・奥泉久人・白石 進, 1989. 栃木県におけるヒノキ採種園の構成クローンの遺伝変異. *日林論*, 100 : 297-298.
- Sweet, G. B., Bolton, P., Litchward, H. 1990. A meadow orchard in radiata pine-research and reality. In Proc. reproductive processes working party (S2.01-5). XIX IUFRO World Congress, Montreal, Ca. 7p.
- Szmidt, A. E., El-Kassaby, Y. A., Sigurgeirsson, A., Alden, T., Lindgren, D., Hallgren, J.-E., 1988. Classifying seedlots of *Picea sitchensis* and *P. glauca* in zones of introgression using restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 76 : 841-845.
- 田島正啓, 1979. ヒノキの自殖に関する遺伝学的研究. *九大演報*, 51 : 39-120.
- 田島正啓・栗延 晋・西村慶二・藤本吉幸, 1984. 採種園内の黄金スギの自然自殖率と種子の形質. *日林誌*, 66 : 506-510.
- 田島正啓, 1991. 林木育種学. 大庭喜八郎・勝田 柁編. 文英堂出版, 東京, 116, 337pp.
- 高田和彦・白石 進, 1996. RAPD マーカーを用いた九州地方のさし木品種の分類. *九大演報*, 75 : 1-14.
- 田村隆明・村松正實, 1997. 基礎分子生物学. 東京化学同人, 東京, 239pp.
- 田中 壤, 1882. 林学雑俎. 林協集, 13 : 31-32.
- 田中 壤, 1883. 林学雑俎. 林協集, 17 : 140-142.
- Tang, D.-Q., Ide, Y., 1998. Detection of genetic variation among seedlings of *Chamaecyparis obtusa* using allozyme markers. *J. For. Res.*, 3 : 35-38.
- 徳川宗敬, 1941. 江戸時代における造林技術の史的研究. 地球出版, 東京, 102-362.
- 戸田良吉, 1979. 育種集団の必要性とその種類. 林木の育種. 111 : 1-3
- Tsumura, Y., Taguchi, H., Suyama, Y., Ohba, K., 1994. Geographical cline of chloroplast DNA



- variation in *Abies mariesii*. *Theor. Appl. Genet.*, 89 : 922–926.
- Tsumura, Y., Yoshimura, K., Tomaru, N., Ohba, K., 1995. Molecular phylogeny of conifers using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.*, 91 : 1222–1236.
- 津村義彦, 1999. 林木の DNA 分析法(6) – 葉緑体 DNA の異変分析 – 林木の育種, 192 : 44–47.
- Tuskan, G. A., Francis, K. E., Russ, S. L., Romme, W. H., Turner, M. G., 1996. RAPD markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of aspen in Yellowstone National Park, U.S.A. *Can. J. For. Res.*, 26 : 2088–2098.
- 生方正俊・飯塚和也, 1999. 北海道のミズナラにおける葉緑体 DNA、葉形質及び開葉時期の地理的変異. *日林学術講*, 110 : 135–136.
- Uchida, K., Tsumura, Y., Ohba, K., 1991. Inheritance of isozyme variants in leaf tissues of hinoki, *Chamaecyparis obtusa* and allozyme diversity of two natural forests. *Jpn. J. Breed.*, 41 : 11–24.
- Uchida, K., Tomaru, N., Tsumura, Y., Takahashi, C., Ohba, K., 1993. Allozyme variation in plus-tree of hinoki, *Chamaecyparis obtusa* selected from artificial stands. *Jpn. J. Breed.*, 43 : 485–494.
- 内田焯二, 1995. アイソザイムによるヒノキの遺伝育種に関する研究. 筑波大農林技術センター演習林報告, 11 : 159–269.
- Vendramin, G. G., Ziegenhagen, B., 1997. Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome*, 40 : 857–864.
- Wagner, D. B., 1992. Nuclear, chloroplast, and mitochondrial DNA polymorphisms as biochemical markers in population genetic analyses of forest trees. *New For.*, 6 : 373–390.
- Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marooof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84 : 2097–2100.
- Wagner, D. B., Govindaraju, D. R., Yeatman, C. W., Pitel, J. A., 1989. Paternal chloroplast DNA inheritance in a diallel cross of jackpine (*Pinus banksiana* Lamb.). *J. Heredity*, 80 : 483–485.
- 渡辺敦史・白石 進・川瀬英治・戸田忠雄・那須 孝, 1996. クロマツ (*Pinus × densi-thunbergii*) のゲノム解析 – その雑種性の検証 –. *日林誌*, 78 : 293–300.
- 渡辺敦史・前田 一・白石 進, 1997. PCR-SSCP 分析を用いたアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム型の簡便判定法. *日林誌*, 79 : 155–156.
- Watano, Y., Imazu, M., Shimizu, T., 1995. Chloroplast DNA typing by PCR-SSCP in the *Pinus pumila-P. parviflora* var. *pentaphylla* complex (Pinaceae). *J. Plant Res.*, 108 : 493–499.
- Watson, J. D., Crick, F. H. C., 1953. Molecular structure of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature*, 171 : 735–736.
- Webber, J. E., 1995. Alternate orchard design for coastal Douglas-fir an approach for improving genetic efficiency. *Nursery and seed*, 8 : 1–12.
- Webber, J. E., Painter, R. P., Hollefreund, C. A., 1993. Alternate orchard design for coastal Douglas-fir an approach for improving genetic efficiency. *DfMicOr. D92* : 1–10.
- Webber, J. E., Painter, R. A., 1996. Douglas-fir pollen management manual. 2nd ed. Working Pap., Research Branch, B.C., Ministry of Forests, Victoria, B. C. : 1–91.
- Weir, R. J., Zobel, B. J., 1975. Advanced-generation seed orchards. *Forestry Commission Bulletin*, 54 : 118–127.
- Wendel, J. F., Edward, M. D., Stuber, C. W., 1987. Evidence for multilocus genetic control of preferential fertilization in maize. *Heredity*, 58 : 297–301.
- Wheeler, N. C., Jeck, K. 1986. Pollen contamination in mature Douglas-fir seed orchard. In *Proc. IUFRO Con. On breeding theory, progeny testing and seed orchards*, Oct. 13-17, 1986, Williamsburg, Va. Weir, R. J. (editor). 60–71.
- Wiseloge, A. E., van Buutenen, J. P., 1988. Probability of equal mating in poly mix pollinations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Silvae Genet.*, 37 : 184–187.

- 柳沢聡雄, 1955. 育林綜典. 朝倉書店, 東京, 155-195
- 山手広太・大庭喜八郎, 1974. スギ採種園における花粉の有効飛散距離. 林育情報, 90-94.
- 山手広太・大庭喜八郎, 1979. スギ採種園における花粉の有効飛散距離. 日林九講, 32: 197-198.
- 横山敏孝, 1977. スギ自殖不稔の主因. 日林誌, 59: 389-390.
- 吉丸博志, 1999. 林木の QTL 解析と育種への応用. 北海道の林木育種, 41(2): 1-6.
- Ziegenhagen, B., Kormutak, A., Schauerte, M., Scholz, F., 1995. Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.). For. Genet., 2: 99-107.
- Ziegenhagen, B., Schauerte, M., Kormutak, A., Scholz, F., 1996. Plastid DNA polymorphism of megagametophytes and pollen in two *Abies* species. Silvae Genet., 45: 355-358.
- Ziegenhagen, B., Scholz, F., Madaghiele, A., Vendramin, G. G., 1998. Chloroplast microsatellites as markers for paternity analysis in *Abies alba*. Can. J. For. Res., 28: 317-321.
- Zobel, B. J., Weir, R. J., Jett, J. B. 1972. Breeding methods to produce progeny for advanced-generation selection and evaluate parent trees. Can. J. For. Res. 2: 39-345.

## Genetic and Breeding Studies on Pollen Management in Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) Seed Orchard

Kunihiro SEIDO

### Summary

Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) is one of the most important commercial trees in Japan. Hinoki is given the top priority in current reforestation efforts, and 70% of the planting stock is grown from seed, which is currently harvested from commercial orchards. Due to the great importance of the seeds, it is necessary to understand the mechanism of Hinoki mating to establish appropriate genetic techniques for future management of the orchards.

In seed orchards where random mating is required, the contribution rate of each clone should be as equal as possible. Furthermore, self-fertilization and the pollen of surrounding unselected trees should be prevented.

Recently, many forest geneticists have transferred their genetic analysis techniques from Isozyme to DNA molecular marker. In particular, there is a tendency to use PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction - Single-Strand Conformation Polymorphism) to detect DNA polymorphisms and point mutations, as it is a simple, fast, and sensitive method. The SSCP method is based on the principle that single-strand DNA molecules assume a specific secondary structure depending on the base sequence of non-denaturing condition.

In this study, intraspecific variation in several non-coding regions of chloroplast DNA was surveyed in *Chamaecyparis obtusa* Seib. et Zucc (*Cupressaceae*). By utilizing a sequence polymorphism found in the intergenic spacer region between the *trnD* (GUC) and *trnY* (GUA) genes as a PCR-SSCP marker, the imperfectibility in the paternal inheritance of *Chamaecyparis* cpDNA was verified using several artificial crossed fullsib families. Of 361 progenies, in which the cpDNA haplotypes of their female and male and male parents were different, 352 (97.5%) progenies possessed the same haplotypes as their male parents, and 9 (2.5%) as their female parents.

Kajikazawa 5 (YKZ5) is one of the 33 plus tree clones composing a tested hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) seed orchard in Yamanashi prefecture and it was a solitary mutant type clone in this orchard. The epicotyls of germinated seeds from this clone were used for fluorescence-based SSCP analysis. As a result of the analysis of 80 epicotyls, the three SSCP profiles observed. Seven epicotyls were the same mutant type as their mother tree, and 70 were wild types. The profile with double peaks originated from wild and mutant types was recognized in the remaining three epicotyls. These individuals were heteroplasmies that possessed cpDNA from both female and male parents.

Pollen dispersal was estimated in two test plots in the tested hinoki seed orchard using a chloroplast DNA marker, the spacer region between the *trnD* and *trnY* genes, and SSCP (single strand conformation polymorphism). In Plot 1, 2,020 seeds, from 40 trees within 30 m of the marker tree were analyzed using the PCR-SSCP method. In Plot 2, 1,850 seeds from 37 trees were analyzed in the same manner. The results revealed that the maximum pollen dispersal distance in the two plots exceeded 25 m. Pollen dispersal appeared to be inversely proportional to the distance from the marker tree. The effective pollen dispersal was suggested to be less than about 20 m in a mature hinoki seed orchard. Adjacent tree had an excessive influence when the pollen density was increased by artificial flower stimulation. Therefore, it was suggested that seed production better resembles ideal random mating when carried out as naturally as possible.

The selfing rate in a hinoki seed orchard was determined using PCR-SSCP on the spacer region between *trnD* and *trnY* (CS4) of chloroplast DNA. One thousand and three samples from five ramets were analyzed. From these samples, the mutant type was detected in 23 samples. The selfing rate in the seed orchard was calculated as 2.3%. The selfing rate tended to be greater in upper clowns than in lower rows. It was no significant differences in four directions of crowns. This result roughly conformed with the expected rate from composed clones in the seed orchard. It was thus concluded that using the SSCP marker provides useful and accurate information to manage the seed orchard.

The contribution of pollen parent Hinoki trees to the next generation was investigated for three years, from 1995 to 1997, using YKZ5 as a chloroplast DNA marker in a seed orchard in Yamanashi Prefecture. In 1995, a good harvest year, the average contribution rate was 4.0%, very close to the expected rate of 3.6%. However, the average contribution rates in 1996, a poor harvest year, and in 1997, a typical harvest year, were 0.5% and 1.5%, respectively, much lower than the value expected. This study shows that the contribution of constructed clones as pollen parents in the seed orchard is more likely to equal the expected rate in years with good harvests than in years with poor or typical harvests.

Selective fertilization of Hinoki was investigated by observing the paternal inheritance of chloroplast DNA haplotypes for two years. The chloroplast DNA haplotype representing clone YKZ 5 was used as a specific PCR-SSCP marker. The same amount of pollen from five clones that included the marker clone YKZ 5 was mixed. The five clone trees from which the pollen was collected were artificially using the mixed pollen. No selective fertilization resulting from fertilization by pollen of a specific clone selectively was recognized.

As a result of the above-mentioned studies, I could extract some basic conclusions to develop the seed orchard management techniques, especially pollen management techniques. Moreover, it was concluded that chloroplast DNA marker which is paternal inherited for such a genetic and breeding research was effective.