

東京大学千葉演習林内のコウヨウザン林分における自殖家系の検出

Detection of self-pollinated individuals in plantation forest of *Cunninghamia lanceolata* in the University of Tokyo Chiba Forest

磯田圭哉*¹・大塚次郎*¹・飯田啓達*²・成田有美子*¹・増山真美*¹・近藤禎二*¹・山田浩雄*¹・生方正俊*¹
Kei-ya ISODA*¹, Jiro OTSUKA*¹, Yoshisato IIDA*², Yumiko NARITA*¹, Mami MASUYAMA*¹, Teiji KONDO*¹, Hiroo YAMADA*¹, Masatoshi UBUKATA*¹

* 1 森林総合研究所林木育種センター

Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Hitachi 319-1301

* 2 森林総合研究所林木育種センター関西育種場

Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Kami 782-0051

要旨: 東京大学千葉演習林には、中国、台湾原産のヒノキ科針葉樹であるコウヨウザンの林分が複数ある。これらについて SSR マーカーによる DNA 分析を行ったところ、2ヶ所のコウヨウザン林（四郎治沢および前沢）において、自殖家系と思われる個体群が検出された。そこで千葉演習林清澄作業所にある古い孤立木で多くの球果を着生させている個体はその母樹ではないかと考え、SSR 分析を行ったところ、これらの個体群はこの孤立木の自殖種子から育成されたものであると推定された。前沢林分で検出された自殖個体群と血縁関係のない個体群との成長の比較を行ったところ、両者の間に差が見られず、成長形質において自殖による近交弱勢は現れていないことが示唆された。一方、遺伝子型の分離比からは、種子成熟段階から育苗段階における致死遺伝子による淘汰があることが示唆された。

キーワード: コウヨウザン・自殖・SSR・近交弱勢・致死遺伝子

Abstract: DNA analysis of *Cunninghamia lanceolata* was conducted in the University of Tokyo Chiba Forest. Analysis of two sites, Shirojizawa and Maesawa, using 27 simple sequence repeat (SSR) markers revealed that self-pollinated full-sibs are planted in those sites. Another individual planted in Kiyosumi Branch was also analyzed, and this tree was expected to be mother tree of the self-pollinated full-sib family. Height and diameter at breast height of the self-pollinated full-sib trees did not show significant differences from other trees, i.e. open-pollinated trees. This result indicated no inbreeding depression on growth traits in this self-pollinated full-sib family. On the other hand, segregation ratio of genotype in each locus indicated that the selection by lethal genes has occurred in seed maturation stage and/or early germination stage.

Key-word: *Cunninghamia lanceolata*, self-pollination, simple sequence repeat, inbreeding depression, lethal genes

I はじめに

コウヨウザン (*Cunninghamia lanceolata*) は中国南部および台湾原産のヒノキ科針葉樹で、成長が旺盛で材質も良く、耐腐朽性や耐虫性も高いことから、中国では主要な建築材として 600 万ヘクタールに及ぶ造林面積の主要造林樹種である。このように林業樹種として優良であることから、我が国においても、国有林、大学演習林、森林公園、植物園、民有林等、複数の地域で導入され試験植栽されている。東京大学においても、台湾演習林を保有していたこともあり、複数のコウヨウザン林が造成されている。特に、千葉演習林では、100 本以上からなる

林分が 3 か所と 100 本以下の林分が 2 か所存在する。

林木育種センターでは、コウヨウザンが新たな造林樹種として大きな可能性を持つと考え、センター構内に植栽されているコウヨウザンを対象に材質特性を調査したところ、建築用構造材として利用可能な高い MOE (Modulus of Elasticity: 弾性係数) を示した (1)。平成 27 年度からは、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「西南日本に適した木材強度の高い新たな造林用樹種・系統の選定及び改良指針の策定」において、国内各地に導入造林されている林分を対象に、広く成長・材質調査、増殖特性調査および遺伝的解析を行ってきた (2、

3、5)。その中で、千葉演習林に造成されたコウヨウザン林の遺伝的特性に興味深い点が明らかになったので報告する。

II 材料と方法

調査は千葉県鴨川市および君津市にまたがる東京大学千葉演習林内の、四郎治沢および前沢のコウヨウザン林にて行った。また、同演習林内の清澄作業所に植栽されている個体も DNA 分析に供した。四郎治沢は 56 年生で 122 個体、前沢は 58 年生（一部補植のため 52 年生）で 144 個体が現存しており、全個体の樹高および胸高直径を測定した。さらに、51 個体ずつをランダムに選び、DNA 分析用の針葉を採取した。

針葉約 50mg を液体窒素で凍らせ、破砕機で破砕した後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。ついで、Wen ら (10) によって報告されている 28 の SSR マーカーのうち、当実験系で再現性高く分析可能であった 27 マーカーを、セット 1～3 に分け、それぞれをマルチプレックス化して SSR 分析を行った (表一

表一 分析に用いたマーカー

Table 1 SSR markers used in this study			
マーカー	range (bp)	蛍光	元マーカー名*
セット1	clssr01	343-375	FAM contig3078_1424A
	clssr07	282-298	FAM contig16322_179A
	clssr08	258-279	VIC contig1382_349B
	clssr14	337-349	VIC contig25400_116B
	clssr15	269-283	NED contig4417_459B
	clssr16	348-384	NED contig406_1209C
	clssr19	126-135	NED contig6319_250C
	clssr22	153-159	PET contig476_526D
	clssr25	354-375	PET contig10192_1677D
	セット2	clssr03	186-190
clssr04		229-233	FAM contig5410_1886A
clssr06		288-298	FAM contig16147_262A
clssr09		247-255	VIC contig1997_271B
clssr10		336-354	VIC contig4728_384B
clssr18		357-363	NED contig6064_1563C
clssr20		231-240	NED contig12886_2058C
clssr27		136-148	PET contig16781_913D
clssr28		226-270	PET contig18815_185D
セット3		clssr02	273-297
	clssr05	211-241	FAM contig9724_201A
	clssr11	260-281	VIC contig7616_683B
	clssr12	144-158	VIC contig7671_1267B
	clssr13	324-344	VIC contig20158_829B
	clssr17	240-258	NED contig2573_171C
	clssr21	293-297	NED contig16181_1285C
	clssr24	223-238	PET contig4056_974D
	clssr26	280-286	PET contig14033_236D

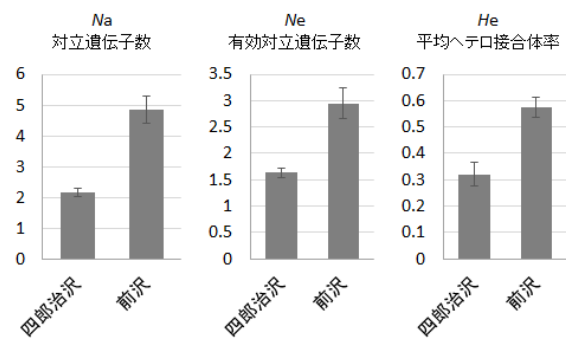
* Wen et al. 2013

1)。PCR は Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いてマニュアルに従い反応液を調整し、GeneAmp9700 (Applied Biosystems) を使用して、95°C15 分の後、94°C30 秒-60°C1 分 30 秒-72°C30 秒のサイクルを 30 サイクル、最後に 60°C30 分インキュベートの条件で行った。PCR 産物 1 ul に HiDi Formamide (Applied Biosystems) 10 ul、GeneScan 500 Liz Sizestandard 0.2 ul を加え、95°C5 分間熱変性した後、キャピラリーシーケンサー ABI3130 (Applied Biosystems) で泳動、GeneMapper 5 で解析し、遺伝子型情報を得た。

得られた遺伝子型から、GenAlEx6.5 (6) により、遺伝パラメータを算出するとともに、遺伝距離を算出し、主座標分析を行った。

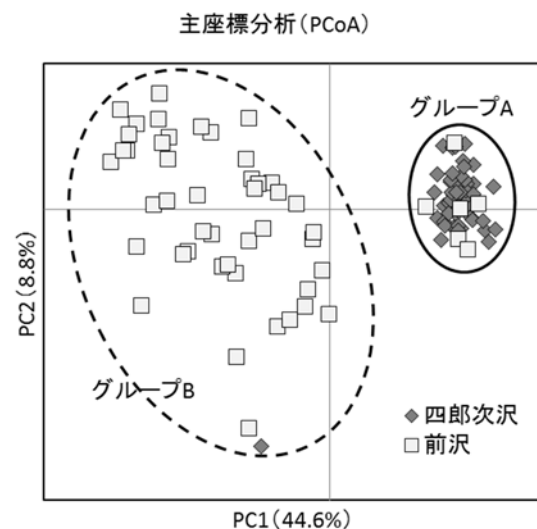
III 結果と考察

SSR 遺伝子型から対立遺伝子数、有効対立遺伝子数お



図一 四郎治沢および前沢の遺伝的多様性。

Fig. 1 Genetic diversity of Shirojizawa and



図二 個体間遺伝距離を用いた主座標分析の結果。

Fig. 2 Principal component analysis of genetic distances between trees.

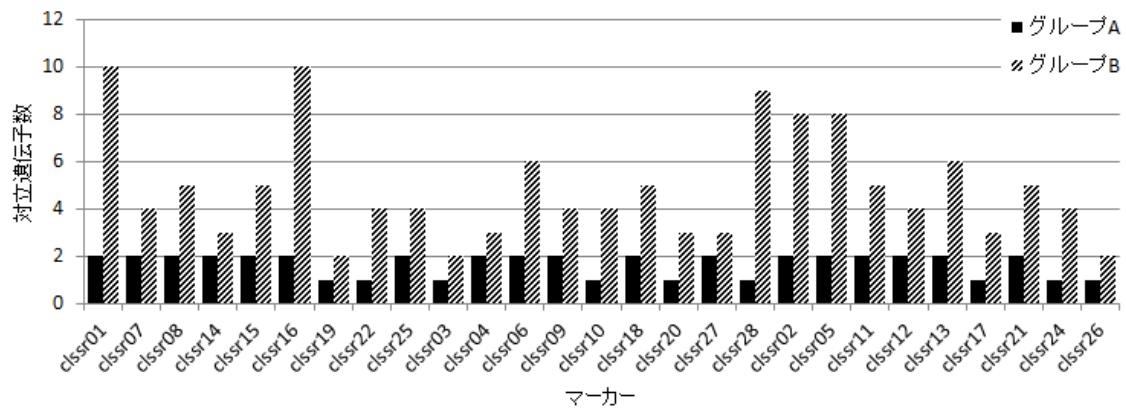


図-3 各マーカーにおける、グループ A およびグループ B における各 SSR マーカーの対立遺伝子数

Fig. 3 Number of alleles found in group A and B in each marker.

よび平均ヘテロ接合体率を算出したところ、それぞれ、前沢で 4.9、3.0、0.575 であったのに対し、四郎治沢では 2.1、1.6、0.321 となり、四郎治沢の多様性が低いことが明らかとなった (図-1)。つぎに、主座標分析では、四郎治沢の 50 個体と前沢の 6 個体が小さくまとまり (以下、グループ A)、四郎治沢の 1 個体と前沢の 45 個体が広がりをもってまとまった (以下、グループ B; 図-2)。このことから、グループ A の 56 個体とグループ B の 46 個体では、由来が異なることが示唆された。各グループの全マーカーの対立遺伝子 (アレル) 数を調べたところ、グループ B では 2 から 10 のアレルが検出されたにもかかわらず、グループ A では 2 もしくは 1 (18 座で 2、9 座で 1) しか検出されなかった (図-3)。多型の多い SSR マーカーにおいて、このようなことが起こるのは、単一母樹の自殖家系の場合が考えられる。自殖では、母樹の保有するアレル (二倍体生物では最大 2) のみが次代に受け継がれることから、どんなに多型の多いマーカーであっても、最大のアレル数は 2 となる。よって、グループ A の個体は自殖由来の単一家系ではないかと推察された。

単一母樹由来の自殖と思われる個体が多数出現したことから、清澄作業所の敷地内に植栽されているコウヨウザンの大木が母樹ではないかとの疑いが出た。この個体は、植栽年は不明であるが、演習林内で最も古いコウヨウザンの一つであるとともに、周囲にはコウヨウザンがないにもかかわらず、樹冠全体に多数の球果を着ける多産個体であるためである。よって、この個体 (以下、清澄孤立木) から自殖種子を採取し、播種、育苗して植栽したことは十分考えられる。そこで、清澄孤立木についても DNA 分析を実施し、遺伝子型を比較したところ、清澄孤立木の保有する 2 つのアレルのいずれか一方もしくは両方がグループ A 個体に出現しており、それ

以外のアレルは見られなかった。このことから、四郎治沢および前沢にて自殖家系と思われた個体群 (グループ A) は、清澄孤立木の自殖によるものであることが推定された。

自殖個体の割合は、四郎治沢では 98%、前沢では 12% であり、両林分間でその割合に大きな違いがあった (表-2)。前沢においては、自殖個体とそれ以外の他家受粉に由来する個体 (以下、他殖個体) が複数個体確認されたため、それらの成長形質を比較した。平均樹高は、自殖個体が 21.4 m に対し他殖個体が 19.8 m ($p > 0.1$, t-test)、平均胸高直径は自殖個体が 43.2 cm、他殖個体が 34.8 cm ($p = 0.06$, t-test) であり、両者の間に差がないか、自殖個体の方が若干良い成長を示した。四郎治沢においても良好な成長を示しており、林分密度も特に低くないことから、清澄孤立木の自殖家系は、生存能力や成長形質に関して近交弱勢が現れていないことが示唆された。

針葉樹は自家不和合性のメカニズムを持たないが、強い近交弱勢が現れるとされている (7)。自殖により劣性致死遺伝子がホモ接合体となることにより、胚発生の段階で致死になることが多く、発芽しても初期に枯死することが多い (4、8、9)。今回検出された自殖家系における、致死遺伝子の影響を検証するために、自殖家系でアレルが 2 つ検出された 17 マーカー (母樹である清澄孤立木でヘテロのマーカー) の遺伝子型の分離比を調べた (表-3)。これらのマーカーでは、遺伝子型の比率は $aa : ab : bb = 1 : 2 : 1$ になると期待される。17 マーカーのうち 7 マーカーは期待される分離比であったが、10 マーカーは、期待値とは有意に異なる分離比であった。この分離比のずれは、ホモ接合体が少ない方向 (Fis が負の値) に起きており、劣性致死遺伝子の影響であることが示唆された。

表-2 各林分における自殖個体の割合

Table 2 Number of selfed individual in each site.

林分	調査 個体数	自殖	他殖	自殖個体 割合
四郎治沢	51	50	1	98%
前沢	51	6	45	12%

IV まとめ

東京大学千葉演習林に植栽されているコウヨウザンの中に、単一の孤立木（清澄孤立木）由来の自殖家系が含まれることが示された。四郎治沢では、大半の個体が自殖家系であったが、成長も良く、林分密度が低いわけでもなかった。さらに前沢において、自殖家系と他殖家系間の成長を比較したところ、差がないか、自殖家系の方がやや良いという結果となった。遺伝子型の分離比の解析からは、種子の成熟段階や苗木の育苗段階において劣性致死遺伝子による淘汰が起きていることが示唆された。これらのことから清澄孤立木は、自殖により致死遺伝子の影響を受けるものの、植栽後の生存能力や成長形質においては、近交弱勢が現れない個体であると考えられる。

謝辞：本研究を行うにあたり、調査地への現地案内や、清澄作業所の孤立木についての情報提供等の御協力をいただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林の久本洋子助教および鈴木祐紀技術主任に厚く御礼申し上げます。本研究は、農林水産省農林水産技術会議の農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「西南日本に適した木材強度の高い新たな造林用樹種・系統の選定及び改良指針の策定」の一部として実施した。

引用文献

- (1) 藤澤義武・何学友 (2012) 12年生コウヨウザンにおける樹幹ヤング率の産地間変異。関東森林研究 63: 59-62.
- (2) 磯田圭哉・上野真義・久保田正裕・三浦真弘・倉本哲嗣・倉原雄二・竹田宜明・大塚次郎・飯野貴美子・飯田啓達・近藤禎二・山田浩雄・生方正俊 (2016) 国内コウヨウザン人工林における遺伝的多様性の解明。日本森林学会大会学術講演集、127:P1-118.
- (3) 近藤禎二・山田浩雄・磯田圭哉・大塚次郎・飯田啓達・飯野貴美子・木下敏・生方正俊・藤澤義武 (2016) 茨城県における 21 年生コウヨウザンの成長。関東森林研究 67: 113-116.
- (4) MORGANTE, M., VENDRAMIN, G.G., ROSSI, P. and OLIVIERI, A.M. (1993) Selection against inbreds in early life-cycle phases in *Pinus leucodermis*

表-3 自殖家系における対立遺伝子(アレル)の出現頻度とメンデル遺伝からのずれ

Table 3 Segregation ratio of genotype in each marker in selfed-family.

マーカー	遺伝子型出現数			χ^2 †	Fis
	aa	ab	bb		
期待値‡	14	28	14		
clssr01	9	43	4	****	-0.536
clssr07	2	38	16	****	-0.357
clssr08	10	38	8	**	-0.357
clssr14	13	31	12	ns	-0.107
clssr15	18	33	5	**	-0.179
clssr16	17	27	12	ns	0.036
clssr25	14	32	10	ns	-0.143
clssr06	12	27	17	ns	0.036
clssr09	9	39	8	**	-0.393
clssr18	10	32	14	ns	-0.143
clssr27	8	36	12	*	-0.286
clssr02	5	36	15	**	-0.286
clssr05	12	28	16	ns	0.000
clssr11	15	34	7	*	-0.214
clssr12	8	35	13	ns	-0.250
clssr13	16	36	4	***	-0.286
clssr21	7	37	12	**	-0.321

† 分離比の期待値とのずれを χ^2 検定した。ns: 有意差なし, *: $p < 0.1$, **: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$, ****: $p < 0.001$

‡ 自殖において期待される値。

Ant. Heredity 70: 622-627.

(5) 大塚次郎・近藤禎二・飯田啓達・飯野貴美子・磯田圭哉・山田浩雄・木下敏・生方正俊 (2016) コウヨウザンのさし木発根性および苗木の枝性について。関東森林研究 67: 145-148.

(6) PEAKALL, R. and SMOUSE, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics 28: 2537-2539.

(7) SARVAS, R. (1962) Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris*. Commun. Inst. For. Fenn. 53: 1-198.

(8) SAVOLAINEN, O., KARKKAINEN, K. and KUITTINEN, H. (1992) Estimating numbers of embryonic lethals in conifers. Heredity 89: 308-314.

(9) SORESENSEN, F.C. (1982) The roles of polyembryony and embryo viability in the genetic system of conifers. Evolution 36: 725-733.

(10) WEN, Y., UENO, S., HAN, W. and TSUMURA, Y. (2013) Development and characterization of 28 polymorphic EST-SSR markers for *Cunninghamia lanceolata* (Taxodiaceae) based on transcriptome sequences. Silvae Genetica 62: 137-141.