

林木育種技術

No. 11

ニユース 1999.11



林野庁 林木育種センター

DNAはお役に立ちます

林木育種ではDNAを用いた技術が急速に進歩しています。むずかしいと思われがちなDNA技術ですが、林木育種に役に立つ、実用的で身近な技術としての利用を私たちは考えています。今回の特集ではその現状を分かりやすくかつ正確に紹介するように努めました。読んでいただきますと、思ったより簡単なものだとお分かりいただけると思います。

DNA技術の最も手近な利用法は識別です。最近の犯罪捜査でよく用いられるDNA指紋法もDNA技術を個人の識別に利用したものです。識別は林木育種でも大変重要で、すでにいくつかの県では林木の在来品種の識別などに利用され、威力を発揮しています。ここではスギ精英樹での開発状況を紹介します。

次の利用法は、検定で、よいものを見分けることに使います。有用な遺伝子のそばにあるDNAの目印（DNAマーカー）を見つけることができれば、その目印の「ある」、「なし」で「よいもの」と「よくないもの」を見分けることが可能になります。とりわけ重要なのは、DNAマーカーを使うことで検定までの時間がかからないことです。何十年も先にしか現れない性質も苗木の時に分かります。クロマツでは、マツバノタマバエ抵抗性遺伝子のそばにあるDNAマーカーの検出に成功しましたので、このマーカーを用いることで、限られた家系ではありますが、子供の抵抗性を95%の確率で判定することができます。現在はマツノザイセンチュウ抵抗性について同じように調べています。マツバノタマバエ抵抗性は1個の遺伝子によって支配されているので質的形質ですが、成長や材質のように多くの遺伝子によって支配されているのが量的形質です。相当たくさん遺伝子に関係しているので遺伝子レベルの解析が困難であると考えられてきましたが、DNAマーカーを用いることで、それら遺伝子がある程度まとまっていることが分かってきました。そうであれば、量的形質でもDNAマーカーを目印にした「よいもの」の検定ができることになります。ここではスギの材質について紹介しますが、用語解説の「QTL解析」とともにご覧ください。林木の有用形質には量的形質が多いので、この方面の研究の進展が期待されます。

ミズナラでの事例のように、DNAマーカーは集団の遺伝的評価に有効ですが、タンパク質の多型であるアイソザイムも今なお有力な分析方法として利用されています。一部のDNAマーカーより有利な面をもっているからで、ブナとタブノキでの解析例を紹介します。タンパク質といえば、今一番注目されているのがスギ花粉症の原因物質であるアレルゲンのタンパク質です。ここで紹介するように大きな個体間差があることが明らかとなり、今後の育種に役立つ大きな情報を得ることができました。

DNAの技術開発はどう進むのでしょうか。動物であればヒト、植物であればシロイヌナズナやイネでは染色体の全部の塩基配列を読んでしまう計画がかなり進んでいます。林木でそこまで行うのは困難です。林木での今後の方向性は次の2つが考えられます。まず、役に立つ遺伝子そのものを明らかにし、取り出すことです。これについてはクロマツで明らかにできたマツバノタマバエ抵抗性遺伝子のように単一で、その近くにあるDNAマーカーが分かっているものでは期待できます。将来の遺伝子組換えにも繋がるものです。つぎに、検定の際に利用できるマーカーの検出です。これについてはこれまでに実績がありますので、他の形質でも、より精度の高いマーカーの検出が今後期待できます。

（センター本所 育種課 近藤禎二）

スギ材質関連遺伝子のQTL解析

はじめに

これまでの林木育種でもっともネックになってきたことは、生産者や利用者のニーズに応えた優れた品種の創出に非常に長い年数を必要としてきたことです。この問題を解決するために、有用形質を支配する遺伝子と強く連鎖したマーカーを目印にした早期選抜法（MAS；Marker Aided Selection）¹⁾の実用化が期待されています。この方法を用いると、優れた性質を持った個体のみを幼苗段階で選抜できるため、成熟期にならないと評価できない材質などの検定までの期間を大幅に短縮できます。

しかし、MASを利用した育種法を確立するには、有用な形質、例えば、成長が早い、材質が優れている、病害虫に強い、といった育種目標となる形質をコントロールする遺伝子の解明が必要です。これまで、いくつかのスギの遺伝子について明らかになっていますが⁵⁾、実用的な性質をコントロールするものについては報告はありませんでした。

そこで私たちは、スギの材質、特に材の剛性を示すヤング率をコントロールする遺伝子の解明を試んでいます。その結果、ヤング率で示される材の剛性をコントロールする遺伝子についてその一部が明らかになりました。

ヤング率とは

ヤング率は、値そのものが材の剛性（外力に対して、元の形を保とうとする性質）を示す指標であるばかりでなく、材の強度とも深い関係があります。また、スギではヤング率が材の強度の最も有効な指数であることが報告されています⁷⁾。このため、新しい農林規格（JAS）では針葉樹製材の機械的等級区分製材においてヤング率が材質評価の項目となっています。よって、今後のスギの育種では、ヤング率を目安にした改良が重要な課題の一つになると考えられます。

ヤング率は、今回2種類の方法を用いて計測しました。一つは近年一般化しつつあるタッピング法⁶⁾によるヤング率の測定です。この測定方法は、精密

なヤング率の測定が可能で、材、もしくは丸太全体の平均のヤング率として測定されます。もう一つは、非破壊調査法であるぶら下がり法²⁾による測定です。この測定方法は、林木が林地に育成している状態でヤング率が測定できます。そして、この測定方法は樹幹の外周部に位置する数年輪部分の性質の影響を強く受けたヤング率となります。なお、これら2種類の測定方法で得られたヤング率の結果は、若干値は異なりますがほぼ同じ値となり、かつ、非常に相関が高いと報告されています³⁾。

QTL解析による材質関連遺伝子の解明

QTLとは、量的形質を支配する遺伝子座(Quantitative Trait Locus)の略称です。量的形質とは、成長量のように数や量で表される連続変異を示す形質で、材の密度、含水率などの材質の形質もほとんどが量的形質であると考えられています。しかしほとんどの量的形質は、多くの微小な効果をもつ遺伝子（微働遺伝子またはポリジーン）によって支配されているため、従来の統計遺伝学的手法ではQTLを明確に把握できませんでした。

今回QTL解析の対象としたヤング率は、過去の遺伝率の調査から成長など他の形質に比べてその遺伝率は大きいとわかっていたのですが、具体的にどのような遺伝子がヤング率に関係しているのかわかりませんでした。

DNAマーカーの開発によって、詳細な連鎖地図の作成とQTL解析が可能になりました。つまり、連鎖地図はその名の通り“地図”であり、目的とする育種対象形質を詳しく解析することで、多数の目印（DNAマーカー）がある“地図”のどこに、どのような“遺伝子”があるのかが明らかになることができるのです。現在、連鎖地図の作成やQTL解析用のコンピュータソフトがいくつか開発されており、DNAマーカーさえ開発してしまえば、とても簡単に連鎖地図の作成とQTL解析ができるようになっていきます。

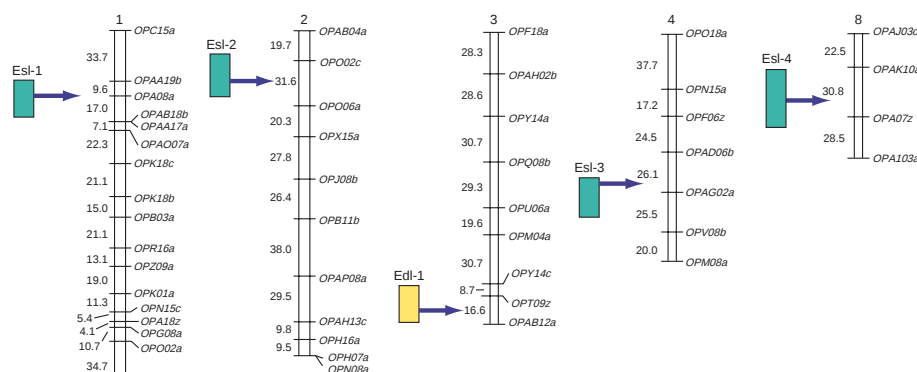


図 - 1. イワオスギのQTLマップ

→ ; QTLのLOD scoreがもっとも高かった位置
 ■ : Esl (ぶら下がり法によるヤング率のQTLの信頼区間)
 ■ : Edl (タッピング法によるヤング率のQTLの信頼区間)

スギ精英樹のDNAマーカーによる識別

はじめに

従来、品種の識別や分類には主に形態的な特徴が用いられてきました。しかし形態的な特徴は環境や樹齢の影響を受けやすく、その確実性には限界があります。その点DNAは一生を通じて変化することがなく、環境により影響を受けることもないため、DNAによる識別は最も確実な方法と言えます。またDNA分析では識別の目印（マーカー）をほとんど無限に増やすことができるため、形態だけでは区別しにくいクローン同士を識別することも可能です。精英樹がすべて識別可能になれば、採種園や採穂園でのクローンの取り違えを簡単に判定できるようになるので、管理上非常に有効な手段になります。

また、最近ではDNAマーカーを利用してスギ¹、²）やハゼノキ³）などの在来品種の識別や分類なども進められています。商業的価値の高い品種の管理や遺伝資源の保存においても、DNAマーカーを用いた簡便で確実な識別法の確立は重要です。

スギ精英樹の個体識別の試み

(1) RAPD法による個体識別の結果

そこで林木育種センターではDNA分析により、関東育種基本区で選抜された精英樹のうち855個体の識別を試みました。DNA分析にもいくつかの方法がありますが、ここでは最も簡便なRAPD法を行いました。RAPD法では任意（ランダム）の配列のDNA断片（プライマー）を用いてDNAを部分的に殖やします。このとき個体によって殖やされるDNAの長さが異なるため、それが識別の目印（マーカー）となります（写真—1）。また、使用するプライマーによって殖やされる部分が異なるので、プライマーの種類を変えることによってマーカー数を殖やすことができます。

今回は、21プライマーによって得られた合計54マーカーを用いて識別を試みました。このマーカー数は理論上、855個体すべてを識別するのに十分な数です。その結果、643個体（75%）が識別可能とな

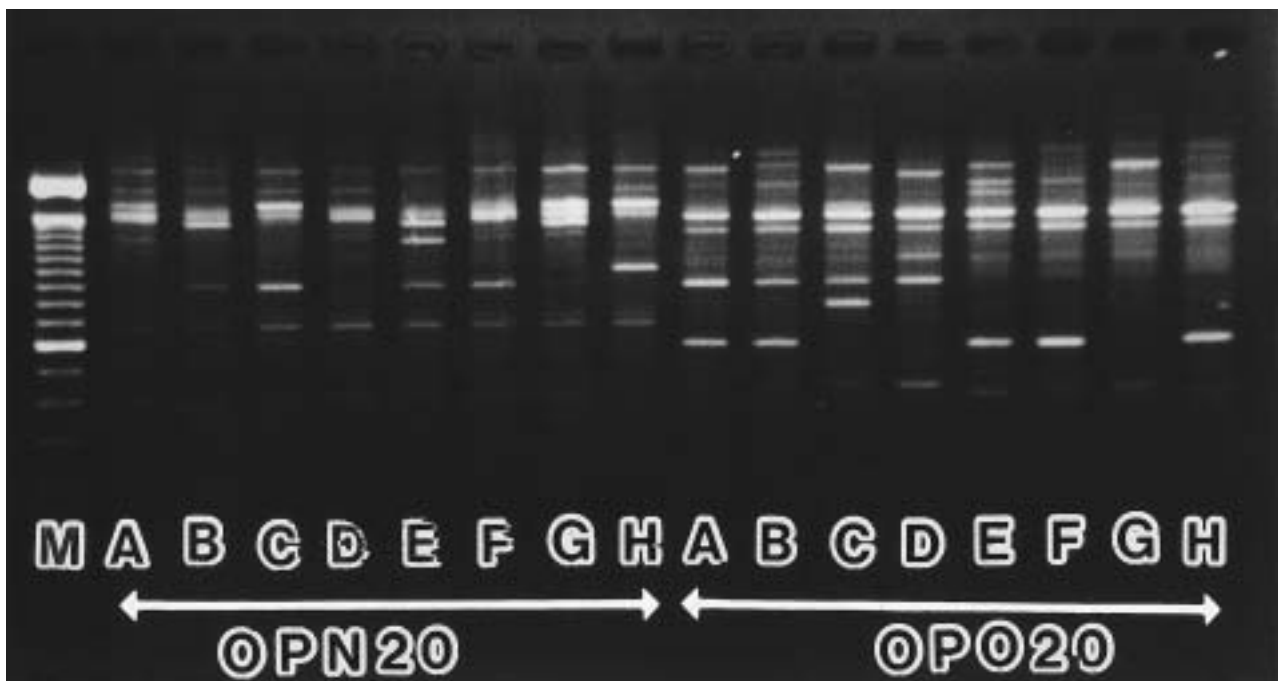


写真 - 1 RAPD法による個体識別の例

（M：分子量マーカー，A～H：個体番号，下段：使用したプライマー名）

り、112個体（25%）は2～5個体のグループに分けることができました。また、中でも識別能力の高いプライマーを選択して使用すると、7種類のプライマーで約70%の個体が識別できることも明らかになりました（図—1）。

（２）識別不可能、の意味すること

一方、8種類以上のプライマーを使用しても識別率が殆ど増加しなかったことから、これまでに識別できずに残ったグループの個体同士を識別することは大変困難であると考えられます。その原因としては、RAPD法の性質による問題と試験材料の問題、つまりこれらの個体が遺伝的に似ているために識別できないという可能性が考えられます。識別できなかったグループのうち、同一営林署管内で選抜された個体の組み合わせが47%、同一県内で選抜された個体の組み合わせが15%を占めることから、その可能性が示唆されます。とすれば、これらの個体を交配したときには近交弱勢が起きる可能性があり、交雑育種を進める上で大きな問題となります。そのため、現在の精英樹よりも一段と優れた次世代の精英樹を創出するための人工交雑においては、これらの結果も活用しつつ、効果的な組合せで交雑を実施

しています。

今後は他の分析方法を試してみることににより、識別率の向上を図ると同時にRAPD分析の結果と遺伝的な近縁度との関係について、さらに検討したいと考えています。

おわりに

これまで、RAPD法によるスギ精英樹の個体識別の試みについて述べてきました。その限界を示すような結果も得られましたが、従来の方法と比較すると70%の識別率は極めて高いものであり、採種園・採穂園の管理においては十分であると思います。そして何よりRAPD法は、特別な技術を要求しない簡便な方法ですので、是非多くの方に利用していただきたいと思います。

（センター本所 育種課 後藤陽子）

引用文献

- (1) 宮原文彦ほか (1994) 日林論105, 293-294
- (2) エンシソ マヌエルほか (1994) 日林九支研論集 47, 105-106
- (3) 後藤 晋ほか (1997) 日林誌79(4), 229-233

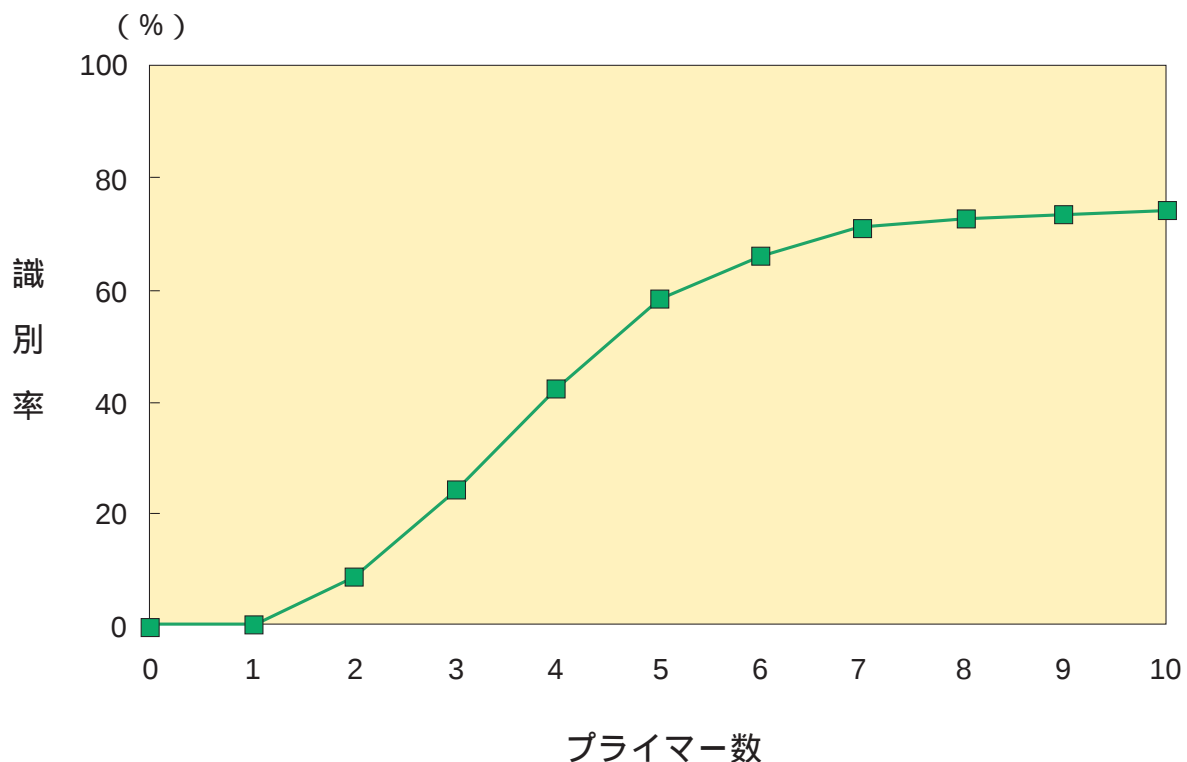


図 - 1 プライマー数の増加によるスギ精英樹の個体識別率の変化

北海道のミズナラにおける葉緑体DNAの地理的変異

葉緑体DNAとは？

葉緑体は、光合成を行う植物の細胞小器官で核と異なる独自のゲノムを保有しています。葉緑体ゲノムは、89～292kbp（キロ塩基対）の環状二本鎖DNA分子からなり葉緑体1個に通常数十分子が存在しています^{6）}。葉緑体DNAの遺伝様式は核とは異なり、被子植物では、一般に母性遺伝とも言われていますが、マツ属やヒノキ属では、父性遺伝することが確認されています^{3）}。

地理的変異を明らかにする必要性

「人間」と一口にいっても様々な特徴を持った人がいるように、種は少しずつ特性の異なる個体の集合と考えることができます。このような種内の変異は、一つの林分内といった小さなスケールのもから地球規模のものまで様々な階層に存在しています。種内変異を地理的なスケールで取り扱ったものが地理的変異です。地理的変異を明らかにすることにより、その種がたどってきた分布の変遷過程や環境への適応の仕方を推定することができます。

林木育種を進める上で、対象となる樹種に適した地域区分を行う必要がありますが、様々な特性から得られた地理的変異のパターンは、地域区分の最も重要な基礎となるものです。また、遺伝資源保存林の設定、配置、箇所数といった遺伝資源の保存方策を決定する根拠となるのが地理的変異です。

今回は北海道のミズナラについて、環境の影響を受けず母親のみから次世代にそのまま伝わる葉緑体DNAの地理的変異を紹介します。

材料と方法

林木育種センター北海道育種場内のコナラ属産地試験園に植栽されているミズナラ33産地 243個体、カシワ4産地14個体及びコナラ1産地10個体を材料としました。詳細な実験手法は、既報^{7）}を参照してください。まず、展開したてのシュートから全DNAを抽出し、PCRにより目的のDNA領域を増幅しました。増幅したDNAを特定の塩基配列を認識して切断する制限酵素で処理し、電気泳動、染色を行いました。6種類のDNA領域と12種類の

制限酵素の計72通りの組合せのうち、たった1つの組合せで個体間差が検出されました。trnC-trnD領域（約3,000bp）を制限酵素EcoR で処理した場合、切断されずに1バンドのみが検出されるタイプ(Aタイプ)と約2,100bpと約900bpの2バンドが検出されるタイプ(Bタイプ)が確認されました（写真 - 1）。



写真 - 1 検出された2つのバンドパターン

No.4,6は切断タイプ、それ以外は非切断タイプを示す。

葉緑体DNAの地理的変異

検出された2つのタイプの頻度を図 - 1 に、地理的な分布を図 - 2 に示しました。出現頻度の低いBタイプは、北海道南部から中央部、北部にかけての産地に分布し、北海道東部には1産地（滝上町上札久留）のみに分布していましたが、他には分布していないことがわかりました。

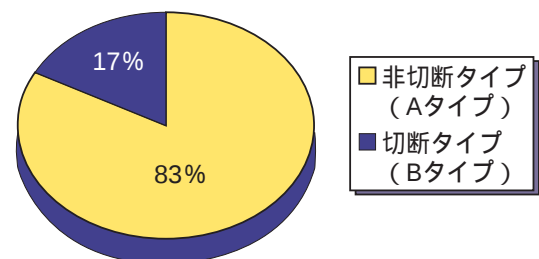


図 - 1 葉緑体DNAの2タイプの割合

北海道においてコナラ属は、氷河期にはほとんど姿を消した後氷期の約8,000年前から急激に分布が拡大したことが花粉分析の結果から示されています^{2）}。葉緑体DNAで今回検出された変異は、遺伝

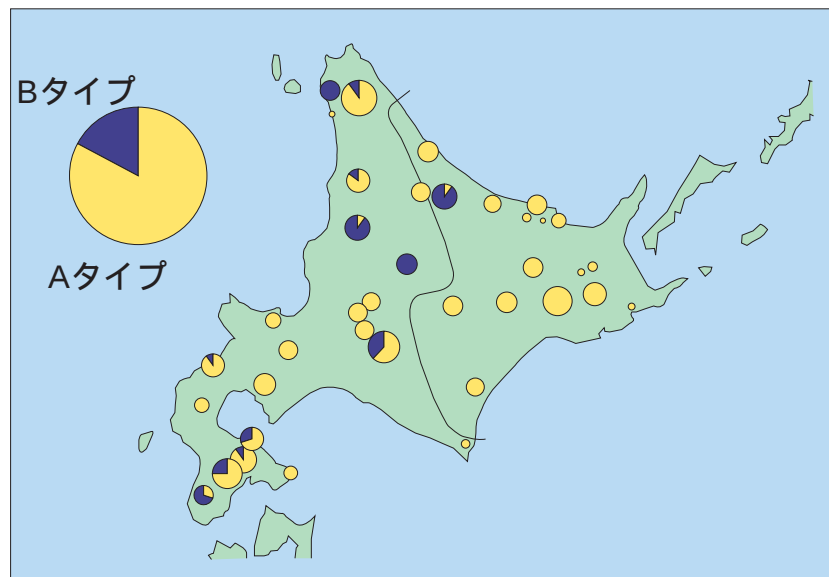


図 - 2 葉緑体DNAの2タイプの地理的分布

子の非コード領域に存在し，選択に対して中立的であると考えられます。北海道東部と西部で葉緑体DNAのタイプの頻度に大きな差がみられたことは，元々の起源が異なっていることが考えられます。ミズナラの種子（堅果）は，重力散布後，げっ歯類（ネズミ等）や鳥類（カケス等）によって散布されますが，その範囲は比較的限られていると言われています⁴⁾。

東西それぞれの地域のミズナラは，花粉による地域間の遺伝子流動はあったものの，ほとんど種子の交換が行われず，それぞれの地域に適応しながら分布を拡大したものと推察されます。

Quercus petraea , *Quercus robur* , *Quercus pubescens* といったヨーロッパのコナラ属で同一地域に分布する複数の種が同一の葉緑体DNAのタイプを共有しているという報告^{1, 5)} があります。今回，産地数は少ないですが，北海道のミズナラとカシワにおいても，同一産地の両種の葉緑体DNAタイプに差がみられませんでした。また，ミズナラとコナラは，1産地ですが両種とも2つの葉緑体DNAタイプを共有していました。コナラとカシワについてより多くの産地からのデータを収集する必要がありますが，これらの樹種間で浸透交雑等により葉緑体DNAを交換している可能性を示唆するものといえます。

葉や堅果の形質，開葉時期といった形態的，生理的な形質においても葉緑体DNAと同様に東西地域間に違いがみられました。これらのことから，

北海道における林木育種事業の推進に際しては，東西関係について十分な検討が必要です。また，近年北海道の民有林等でミズナラの人工造林が増加していますが，東西両地域間の種苗の移動は，避けたほうが賢明であると思われます。

（北海道育種場 育種課 生方正俊）

引用文献

- (1) Ferris, C., King, R. A., Vainola, R. and Hewitt, G. M. (1998) Chloroplast DNA recognizes three refugial sources of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland . *Heredity* 80 : 584-593
- (2) 五十嵐八枝子 (1986) 北海道の完新世におけるコナラ属の分布 . *北方林業*38(10) : 10-14
- (3) 近藤 禎二 (1997) 葉緑体DNAとミトコンドリアDNAの遺伝 . (21世紀の緑はぐくむテクノロジー . 林木育種センター編 , 129pp , 林木育種協会 , 1997) . 103
- (4) 宮木雅美 (1988) ナラ類の堅果の散布様式 . *北海道の林木育種*31(1) : 36-39
- (5) Petit, R. J., Kremer, A. and Wagner, D. B.(1993) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks . *Theor. Appl. Genet* 87 : 122-128
- (6) 杉浦昌弘 (1999) 葉緑体ゲノムの分子遺伝学 . *遺伝*53(4) : 61-65
- (7) 生方正俊・林 英司 (1998) ミズナラの葉緑体DNAのPCR-RFLP . *北海道育種場年報*20 : 50-52

られました。ですから、Cry j 1 含量の低い二倍体のなかからさらに選抜、交雑することにより、Cry j 1 含量がより低い品種やほかの優れた特性を兼ね備えた品種を創出できる可能性があります。

また、雄花の着生量とCry j 1 含量の間には相関関係がみられませんでしたので、「アレルゲン量の少ないスギ」を選抜する際には、雄花の着生量と花粉中のアレルゲン含量の両方を調べる必要があります。そして、花粉症対策の上では、雄花が少なく、かつCry j 1 含量の低い個体が最も望ましいと言えます。

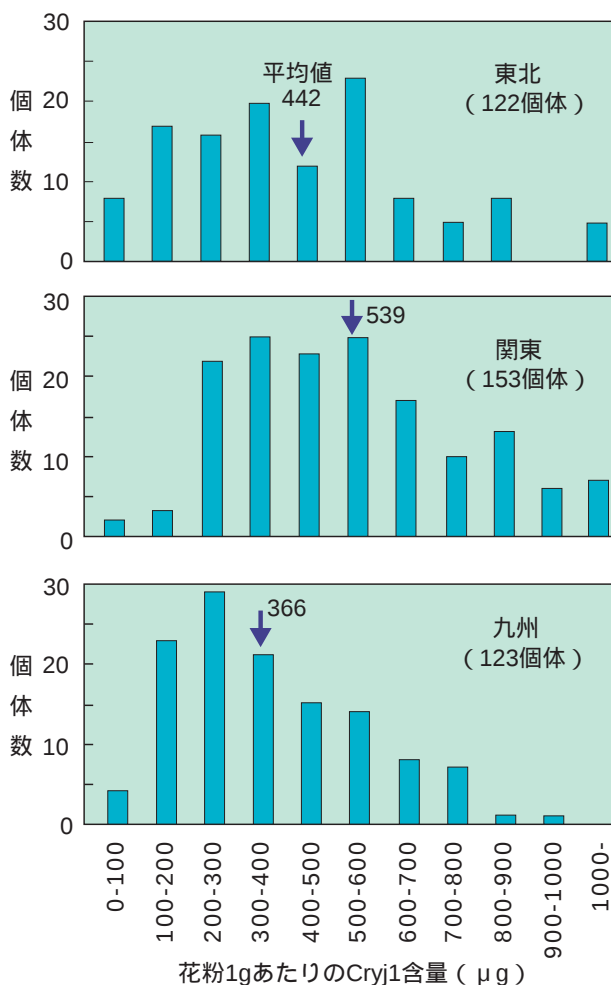


図 - 2 スギ花粉中のCry j1含量の地域間変異

アレルゲン含量の地域間変異

それでは他の地域のスギにおいても、花粉中のCry j 1 含量には個体差があるのでしょうか。また、Cry j 1 含量に地域差はあるのでしょうか。

そこで東北育種基本区、九州育種基本区で選抜されたスギ精英樹について、花粉中のCry j 1 含量を

調べてみました。その結果、いずれの地域のスギ精英樹においても、Cry j 1 含量に個体差が見られました(図-2)。また3つの地域を比較してみると、Cry j 1 含量は関東で高く九州で低い傾向が見られました。調査対象が精英樹のみであるため、スギ林全体の傾向を正確に反映しているとは言えませんが、関東・東海地方では他の地方と比較してスギアレルゲンに対する抗体保有率が高いという報告¹⁾もあり(関東育種基本区には東海地方も含まれる。)、その関連性においても興味深い結果だと思います。



写真 - 1 アレルゲンの抽出

おわりに

この研究から、花粉中のCry j 1 含量には大きな個体差があることが明らかになりました。今後はもう1つの主要なアレルゲン、Cry j 2 の含量の個体差についても検討したいと考えています。Cry j 2 はCry j 1 以上に花粉中含量の個体差が大きいとも言われていますし、ぜひ取り組みたい課題です。これらの結果をもとに、将来的には雄花の着生量とアレルゲン含量を考慮した「アレルゲン量の少ないスギ」の選抜基準の検討や品種の育成を進めていきたいと考えています。

(センター本所 育種課 後藤陽子)

引用文献

- (1) 信田隆夫ほか (1991) 図説スギ花粉症改訂第2版, 金原出版

スギ精英樹における花粉中のアレルゲン含量の変異

はじめに

現在、スギ花粉症患者は人口の1割を越え、大きな社会問題となっています。それを受けて、平成9年より科学技術庁の研究プロジェクト「スギ花粉症克服に向けた総合研究」が始まりました。このプロジェクトでは花粉症の発症機構や予防・治療方法、花粉の生産や飛散の予報、そして花粉の発生の抑制と様々な方面から花粉症の軽減に向けた研究が行われています。その一環として、林木育種センターでは精英樹における花粉中のアレルゲン（アレルギーの抗原物質）含量の個体差について研究を進めてきました。

花粉症対策としては、これまでも雄花の少ないスギの選抜の取り組みが進められてきました。しかし花粉症を引き起こすのは花粉そのものではなく花粉中に含まれるアレルゲンですから、雄花の量だけでなくアレルゲン含量についても考慮する必要があります。

なお、スギ花粉症患者にとっては、毎年のスギ花粉の生産量・飛散量の予測や推定は大変気になると

ころです。さらに詳細な情報を提供するための一助としても、花粉中のアレルゲン含量を把握しておく必要があります。

これまでにCry j 1, Cry j 2の2種類のタンパク質がスギ花粉症の主要アレルゲンであることが明らかにされています。ここではそのうちの1つ、Cry j 1の花粉中の含量（花粉1g当たりのCry j 1含量）の個体差について研究した結果を紹介します。

アレルゲン（Cry j 1）含量の個体差について

花粉中のCry j 1含量の個体差の大きさを明らかにするために、関東育種基本区で選抜されたスギ精英樹、163個体（三倍体5個体を含む）を対象に花粉1g当たりのCry j 1含量を調べました。その結果、少ない個体と多い個体との間に50倍以上の大きな個体差が認められました（図—1）。三倍体でとくにCry j 1含量が低いという傾向はなく、二倍体、三倍体ともに大きな個体差がありました。また、特にCry j 1含量が高い個体、低い個体が存在するというよりは、広範囲に連続的に分布する傾向が見

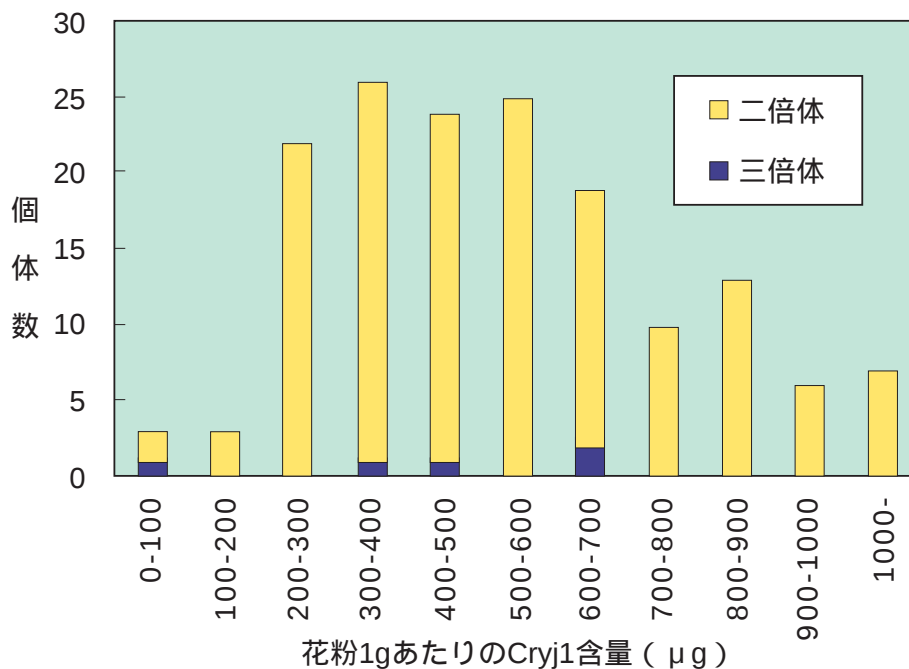


図 - 1 関東育種基本区で選抜されたスギ精英樹の花粉中のCry j1含量

ブナ林の林分内の遺伝構造

- 天然林と二次林の比較から -

1. はじめに

林分内の遺伝構造（遺伝子の散らばり方、分布の仕方）は、交配様式や花粉によるジーンフロー、種子散布、自然淘汰などの影響を受けることが知られています。このことから、林分がそれまでに経てきた伐採や山火事等のイベントによって、その林分の遺伝構造に影響を受けることが考えられます。

ブナは日本の冷温帯落葉広葉樹林を構成する主要な樹種の一つであり、この樹種の遺伝資源の保全を考える上で、遺伝構造に関する情報を集積することは重要です。本研究では、奥羽山脈沿いの経歴の異なるブナ林2林分、すなわち、極相林と考えられる林分と伐採後に天然更新した二次林について遺伝構造に関する解析を行い、ブナ林の遺伝構造の特徴、林分の経歴と遺伝構造との関連性について検討しました。

2. 調査地と方法

調査したのは、秋田駒ヶ岳山麓のブナ二次林（以下「AK」という。）と栗駒山山麓のブナ天然林（以下「KU」という。）で、それぞれ 0.77ha, 1.23haの調査地を設定しました。AKは、1920年代に一度伐採され（その際、少数の個体が母樹保残されました。）、その後天然更新した二次林です。KUは、これまでに伐採されたことがないと考えられる林分です。のべ2haの調査地内の合計660個体の位置を測量し、各個体からアイソザイム分析用試料として冬芽を採取しました。アイソザイム分析により8酵素種9遺伝子座について分析を行い、各個体の遺伝情報（遺伝子型のデータ）を得ました。それぞれの個体の位置情報と遺伝情報をもとにブナ林内の遺伝構造について解析しました。

遺伝構造の解析には、Spatial autocorrelationの統計量の一つであるMoran's I （以下「 I 」という。）を用いました。 I は一種の相関係数のようなもので、-1から+1の間の値をとります。値がプラスだと互いに似た遺伝子を持った2個体の組み合わせが多いことを、マイナスだと異なった遺伝子を持った2個体の組み合わせが多いことを意味します。

を個体間距離階級ごとに算出し、個体と個体の

距離が遠ざかるにしたがって、遺伝的な類似性がどのように変化しているかをみることで、林分内の遺伝構造について知ることができます。

3. ブナ林の遺伝構造

横軸に距離階級をとり、縦軸に I の値をとってグラフにしたものをコアリログラム（correlogram）といいます。AKとKU、それぞれの林分において、7対立遺伝子について12の距離階級の I を算出しました。各距離階級における7対立遺伝子の I の平均値を用いて作成した平均コアリログラムを図-1に示しました。KUの平均コアリログラムでは、 I は第一距離階級と第二距離階級で高いプラスの値を示し、その後はほとんどゼロに近い値で推移しています。AKの平均コアリログラムでは、第一距離階級で最も高い I の値を示し、距離階級

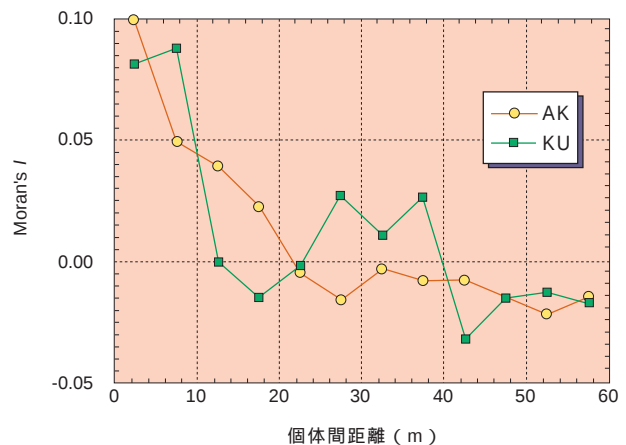


図-1 調査した2林分（AK・KU）における平均コアリログラム

の増加に伴い値は徐々に減少し、KU同様、高い距離階級でゼロに近い値で推移しています。

これらの結果は、個体間距離が近いほど、任意の2個体の持つ遺伝子は類似性が高く、個体間距離の増加に伴いその類似性が減少し、遺伝的類似

性の連関は失われていっていることを示しており、これは遺伝的に類似した個体群が近い距離に集まりながら林分内に分布（遺伝子の集中分布）していることを意味します。

ブナの健全種子の多くは重力散布によって散布されます。シードトラップを用いたブナ種子の飛散距離に関する調査によると、ブナの健全種子のほとんどは母樹の周辺10m以内に散布し、30mを越えて散布されることは一般的にないとされています^{1, 2)}。このように種子の散布範囲が限定されていることが、ブナ林の遺伝子が集中分布する遺伝構造の形成に密接に関係していると考えられます。

4．天然林と二次林の遺伝構造の違い

各距離階級でプラスに有意な認められた対立遺伝子の割合を図 - 2 に示しました。第一距離階級あるいは第二距離階級で有意な値の認められた対立遺伝子を、遺伝子の集中分布の認められた対立遺伝子とみなすと、林分内で遺伝子の集中分布が認められた対立遺伝子は、AKでは6対立遺伝子（86%）、KUでは3対立遺伝子（43%）で、AKの方がKUより遺伝子の集中分布の程度が高く、遺伝子の集中分布の程度は2林分間で異なりました。

これらの2林分間での遺伝構造の違いは、AKが伐採の後に更新した林分であることと関係があると思われます。AKの林分は1920年代に伐採され、

その後に更新した林分です。その伐採の際に少数の母樹が保残されたとされています。その限られた数の個体が母樹となって現世代の個体が更新したため、母樹周辺に母樹個体と同一の遺伝子を持つ個体群による遺伝子の集中分布が引き起こされたものと考えられます（図 - 3）。

今回、ブナ林には遺伝子が集中分布する遺伝構造が認められることが分かりました。また、天然林と二次林の遺伝構造を比較することにより、ブナ林において伐採がその遺伝構造に影響を及ぼしていることが分かりました。ブナの場合、種子の散布範囲は限られています。天然林の場合には多数の母樹が種子を散布するため林分内での遺伝子の散らばり方は複雑になりますが、少数の母樹保残によって更新した林分の場合、林分内での遺伝子の散らばり方は天然林に比べて単純化されると思われます。遺伝的組成の単純化は環境適応性の面でリスクを高めることにつながると考えられます。

（東北育種場 育種課 高橋 誠）

引用文献

- (1) 前田禎三・宮川 清 (1971) ブナの新しい天然更新技術, 180-252
- (2) 柳谷新一ほか (1969) 林試東北年報10, 124-135

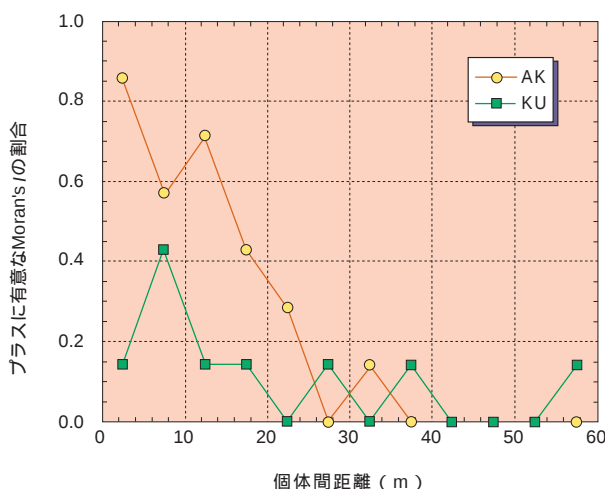


図 - 2 調査した2林分 (AK・KU) におけるプラスに有意なMoran's I の割合

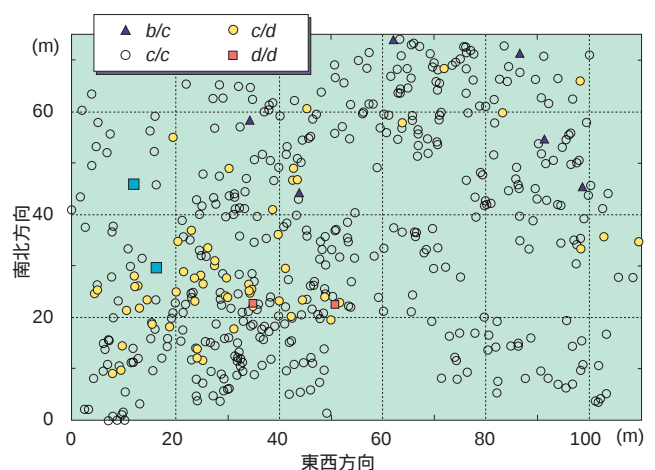


図 - 3 AK林分におけるPgi-1遺伝子座の4遺伝子型の林内散布図

大きな■はc/dの遺伝子型を持つ母樹と思われる2個体。その周辺に対立遺伝子dを持つ個体群が集中分布していることが分かる。

九州におけるタブノキの天然林と人工林の遺伝的変異

1. はじめに

九州におけるタブノキは、広葉樹の中で代表的な樹種の一つです。そのタブノキを対象として、遺伝資源の保全や広葉樹育種の推進のために、天然林と人工林の遺伝的変異並びに天然林の林木遺伝資源保存林内における上層木と次世代の下層木の遺伝的変異をアイソザイム（同位酵素ともいう。）分析により調査した事例を紹介します。

2. 調査の対象及び方法

調査林分は、図 - 1 の宮崎市と鹿児島県吉松町の2箇所の天然林及び鹿児島県内之浦町の人工林で、これらの地況と林況の概要は、表 - 1 のとおりです。

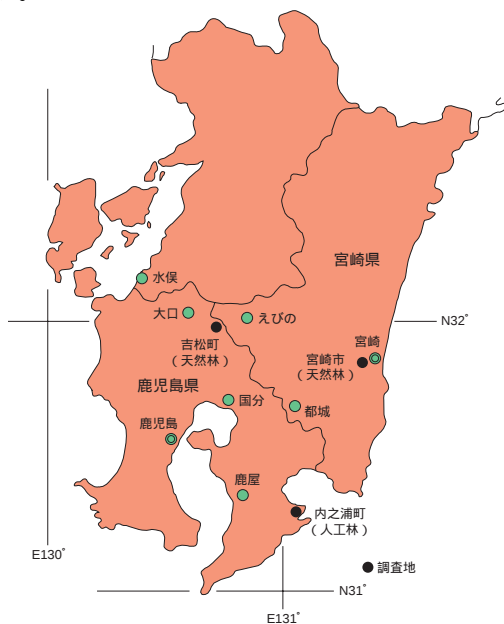


図 - 1 タブノキ3林分の位置図

表 - 1 タブノキ3林分の地況・林況の概況

	宮崎市の林分	吉松町の林分	内之浦町の林分
所在地	宮崎県宮崎市 宮崎森林管理署（旧宮崎営林署）管内46カ林小班ほか	鹿児島県始良郡吉松町 宮崎森林管理署都城支署（旧えびの営林署）管内70い林小班ほか	鹿児島県肝属郡内之浦町 大隅森林管理署（旧内之浦営林署）管内1よ林小班
面積	66ha	79ha	0.54ha
標高	200～500m	600～1070m	140～200m
地 傾斜	30°	25°（5～30°）	20°（15～30°）
況 斜面方位	北西	北（北西～北東）	北
土壌型	BD(d), BC	BD, BD(d)	BD(d)
林種	天然林（林木遺伝資源保存林）	天然林（林木遺伝資源保存林）	人工林（66年生、採種源等不明）
タブノキ	樹高 5～20m 本数割合 36% 材積割合 42%	5～24m 6% 25%	8～23m
その他の樹種	ツブラジイ、カシ類等	イスノキ、カシ類等	

これら3林分のタブノキを対象に、1994年から1996年に上層木の成木から葉を採取しました。また、宮崎市の同じ天然林については、さらに、樹高3m程度以下の下層木の稚幼樹からも葉を採取しました。

この採取した母樹別の葉を用いて、アイソザイム分析を行いました。分析したのは、ジアホラーゼとパーオキシダーゼという酵素で、その5推定遺伝子座について、各林分のヘテロ接合度の算出や近交係数の推定などを行いました。

3. 調査結果

(1) 天然林と人工林の遺伝的変異

3林分の上層木における各5推定遺伝子座の平均の対立遺伝子の種類数、ヘテロ接合度及び近交係数は、表 - 2 のとおりです。

対立遺伝子の種類数では、宮崎が最も多く3.8で、吉松が3.4、内之浦の人工林が3.2と最も少なくなっています。集団の遺伝的変異を表す平均ヘテロ接合度は、天然林の宮崎と吉松では0.525と0.568で、人工林の内之浦は0.432と相対的に小さい値で遺伝的変異が小さいことを示しています。また、各林分の近交係数では、天然林の宮崎と吉松が0.016と-0.031で比較的小さく、おおむね任意交配が行われてきたことを示唆しています。内之浦の人工林は、0.173とかなり高い値を示しています。

内之浦の林分については、その造林に当たっての採種源は不明ですが、平均ヘテロ接合度、近交係数などから、採種しやすい限定された母樹から種子採取された可能性が伺えます。

以上のように、少ない箇所数の調査ですが、タブノキ遺伝資源の現地保存は、遺伝的多様性の確保を主目的とする場合には、天然林を主体に行うことが有効といえます。国有林での林木遺伝資源保存林の設定が天然林を主体に進められてきており、その有効性が対立遺伝子レベルにおいて示されました。

また、広葉樹育種における優良木の選抜においても、1林分から複数の優良木を選抜する場合にも、遺伝的に近縁なものをより排除できる天然林の方が採種園方式を主体とする樹種では、特に有効と考えられます。

(2) 宮崎の林木遺伝資源保存林における上層木と下層木における遺伝的変異

宮崎森林管理署(旧宮崎営林署)管内に設定されている林木遺伝資源保存林(写真-1)のタブノキについて上層木と次世代の下層木のアイソザイム変異を調査した結果は、表-2のとおりです。上層木と下層木とでは、対立遺伝子の種類数とヘテロ接合度は、おおむね類似しています。また、近交係数も、上層木が0.016、下層木が0.089と推定され、ともに比較的小さい値で、おおむね任意交配が行われてきたことが示唆されました。これらのことから、次世代の下層木も上層木に近い遺伝的変異を保持していると考えられます。



写真-1 宮崎市内の林木遺伝資源保存林

表-2 タブノキの各林分における5推定遺伝子座の平均の対立遺伝子の種類数、ヘテロ接合度及び近交係数

項 目	宮崎	宮崎(下)	吉松	内之浦
調査個体数	44	28	24	49
対立遺伝子の種類数	3.8	3.4	3.4	3.2
ヘテロ接合度	0.525	0.513	0.568	0.432
近交係数	0.016	0.089	-0.031	0.173

注)「宮崎(下)」は、「宮崎」と同一林分で下層木を表す。その他の林分はすべて上層木である。

ところで、林木遺伝資源保存林における保存対象樹種の永続的な保存を図るためには、次のことに留意する必要があります。

次世代を担うために必要な稚幼樹が十分に更新してきていること。

集団の遺伝的変異を維持すること。なお、明石¹⁾は集団の遺伝変異を維持するための目安は、近交係数を低く抑えることで説明できるとしています。

表-3 宮崎市内の林木遺伝資源保存林のタブノキの更新状況

芽生え	1,000本 / ha (苗高10cm未満)
稚幼樹	6,500本 / ha (樹高10cm以上、 胸高直径5cm未満)

注) 標準地調査による。

当該保存林において、については、熊本営林局(現九州森林管理局)(以下「局」という。)の調査によるタブノキの稚幼樹の更新状況は、表-3のとおりで、現状では、特に人手を加えて、更新を促す施業を要しないと考えられます。

の遺伝的変異の維持について、明石¹⁾は近交係数を上昇させないための集団の大きさは、数千個体と述べており、宮田²⁾もモデル計算により近交係数と遺伝子頻度変動率をほとんど上昇させない林分内個体数は、500個体、安全をみて1,000個体以上が必要と述べています。

当該保存林における局の調査による胸高直径5cm以上のタブノキの66haの保存林全体における推定成立本数は、3万本程度であり、本数面では遺伝的変異の維持に支障はないと考えられます。

一方、推定した近交係数も上述のとおりで、当面の遺伝的変異の確保には、大きな問題はないと考えられます。

以上のことから、当該林木遺伝資源保存林は、現状のまま推移させても、タブノキ遺伝資源の保全は、当分の間、維持できるものと考えられます。

(センター本所 育種課 宮田増男)
(九州育種場 育種課 竹内寛興)

引用文献

- (1) 明石孝輝(1994) 絶滅の危機にある有用な希少樹種の保全対策について、林木の育種171:1~4
- (2) 宮田増男(1986) 林木遺伝資源の現地保存方法論() - 必要保存面積の算出法 - . 日林関東支論 38:111~112

走査型電子顕微鏡を利用した遺伝資源の特性評価

— カラマツ属花粉における種間の相違の検討 —

1. はじめに

林木育種センター遺伝資源研究室では、農林水産省ジーンバンク事業（林木遺伝資源部門）における遺伝資源の特性評価と配布に役立てるため、走査型電子顕微鏡（Scanning Electron Microscope：以下「SEM」という。）を用いて、様々な微細形態の評価を行っています。

カラマツ属(*Larix* Miller)は、北半球の冷温帯に分布し、約半数の種が林業用に活用されそのうちの大半が育種対象樹種となっています。しかし、その分類は研究者によって意見が分かれており、「現在私は10種でよいと思いますが、細かく分ける人で17～18種、普通は13種ぐらいに分ける人が多い」¹⁾状況です。このことは、カラマツ属においては必ずしも種の範囲が明確ではなく、種間の識別が常に容易とは限らないことを示しています。

ジーンバンク事業では、カラマツ属樹種を成体・種子・花粉で保存し配布していますが、その際には収集した遺伝資源が的確に同定され正確な目録が作成されていることが大変重要です。一般に、花粉の形態は外部形態では区別しにくい種同士の識別に役立つと考えられており、特に光学顕微鏡に比べてはるかに分解能が高いSEMにはこの役割が大いに期待されています。このことから、SEMを用いて、カラマツ属花粉の微細構造から正確な種の同定を行うことを試みました。

2. 花粉とは

花粉は、その外側が外壁に覆われています。その構造や表面模様は科・属・種などの分類群ごとに特徴的です。外壁は、スポロポレニンという特有の物質から成っていますが、この物質は化学的には非常に強く、王水にも融けません。

花粉（写真 - 1）には、各部分に極や赤道（eq）という名称が付けられています。これは、花粉を地球に見立てたものです。北極にあたる部分を遠心極（dp）、南極にあたる部分を向心極（pp）と呼びます。向心極は減数分裂後の四分子のときにその中心部を向いていた部分、遠心極はその反対にあって外側を向いていた部分です。また、ふつう、花粉には発芽

口があります。発芽口は、針葉樹では遠心極側に1つあることがほとんどです。

花粉の形態を詳しく調べるには、それに先だって「KOHアセトリシス処理」という化学処理を行います。これは、花粉を10%水酸化カリウム水溶液に入れ95℃で5分煮た後、無水酢酸と濃硫酸の9：1の混合液で95℃で5分間煮るものです。SEM用には、さらに脱水、置換、臨界点乾燥ののちスパッタコーティング処理を行います。これらの処理には2～3日を要し手間がかかりますが、花粉表面を覆う有機物などを取り除き、再現性の高い観察結果を得るためには欠かせない方法です。

3. 材料と方法

材料は、ジーンバンクから提供を受けた、カラマツ（*L. kaempferi* (Lamb.) Carr.；品種系統名：南佐久27号、中之条2号、沼津101号）、グイマツ（*L. gmerinii* Gorton；グイマツS）、ヨーロッパカラマツ（*L. decidua* Mill.；PERG-6）の花粉です。前節の方法にしたがって試料を作成し、高分解能型SEMで観察しました。

4. 結果

観察の結果、カラマツ属3種の花粉は、共通して次のような性質を持つことが分かりました（写真 - 1）。すなわち、形は基本的には球状ですが遠心極側の発芽口部分が突き出ており（A1：dp）、また、赤道部には弱いうねがあってこれは赤道を一周して花粉を取り巻いています（eq）。さらに、赤道から3本のうねが向心極側に延び、それらは向心極で合流しています（A2：pp）。3本のうねは、互いに約120度離れてほぼ等間隔に南半球の子午線上に並んでいます。この観察結果から、カラマツ属花粉におけるそれぞれの部位が正確に特定できるようになり、3種間での形態の比較が可能となりました。

一方、花粉の表面模様は、部位ごとに模様が異なることが分かりました。すなわち、カラマツの場合では、向心極（A5）においてはその表面に直径100nm（ナノ・メートル；1nm = 1/1,000μm = 1/1,000,000mm）のいぼ状突起が互いに接し合っ

密に分布していますが、遠心極（A4）においては突起同士は互いに離れています。

そこで、3種の花粉において相同部分、すなわち向心極側の3本のうねが合流する部位の表面模様を比較してみました。その結果、カラマツ（A5）では、前述したように直径約100nmのいぼ状突起が平面状に密に分布していますが、グイマツ（B）では、いぼ状突起の大きさは100～400nmと様々でしかもそれらは互いに集合したり、いぼ状突起の上にさらにいぼ状突起を生じるなど、立体的な配置をしています。ヨーロッパカラマツ（C）では、いぼ状突起は直径約250nmでほぼ揃った大きさですが、いぼ状突起の上に直径約30nmの明瞭で細かいいぼ状突起を密に生じ、金平糖状を呈しています。このように、今回検討した品種系統を見る限りにおいては、3種は明確に区別できました。

5. おわりに

今後は、さらに試料を増やして今回得た結果を検証し、他の種についても検討する必要があります。

また、花粉の断面構造を調べて表面模様との関係を把握しておくことも必要でしょう。さらに、より簡単な手順でSEM用試料を作成するなど簡便かつ迅速に種を判別する手法の開発も必要です。これらの成果から、より正確な遺伝資源目録が作成できるようになると考えられます。

また、成果は他の研究分野でも活用できます。例えば花粉分析（泥炭層等の堆積物中の花粉から過去の植生や森林の種構成とその変化を調べる研究分野）に活用した場合には、過去の気候変動によるカラマツやグイマツの分布の変遷や、これらを指標とした地球温暖化の影響の解明等が期待できます。このほか、北限にあって特異な性質を持つ「馬ノ神のカラマツ」の花粉形態なども興味ある問題です。

（センター本所 遺伝資源課 星比呂志）

引用文献

- (1) 濱谷稔夫（1994）カラマツ属 *Larix* の分類と特性、隔離分布する天然性北限カラマツの特性と保存：22～32、林木育種協会。

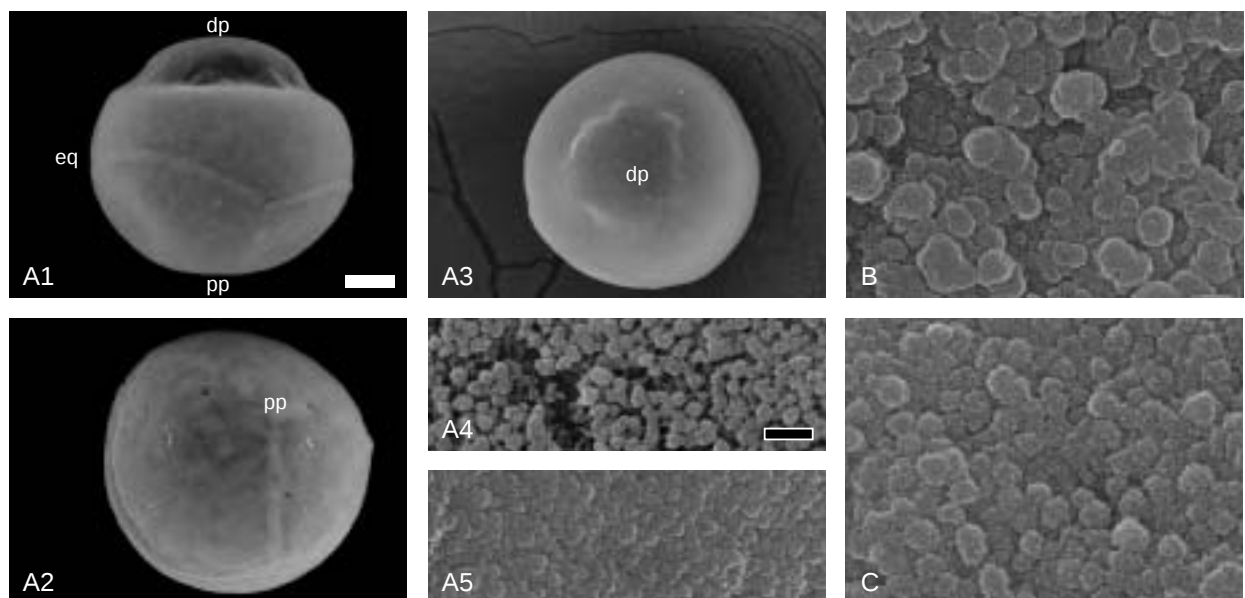


写真 - 1 カラマツ属の花粉のSEM像

A1～A5：カラマツ，B：グイマツ，C：ヨーロッパカラマツ

A1：赤道側，A2：向心極側，A3：遠心極側，A4：遠心極部の拡大，A5：向心極部の拡大，B,C：向心極部の拡大
dp：遠心極，pp：向心極，eq：赤道。スケール；A1～A3：10μm，A4，A5，B，C：500nm

スポット

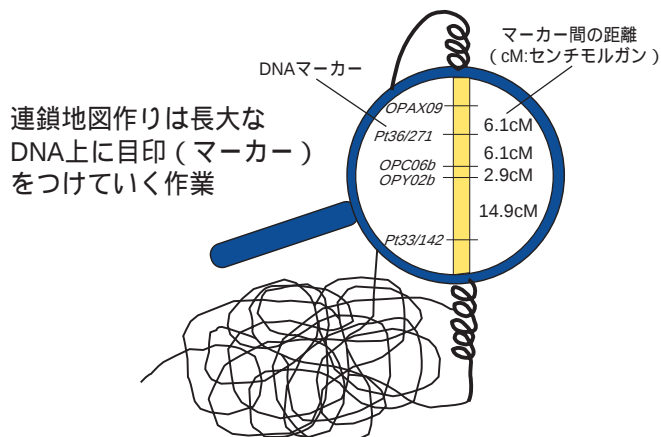
クロマツの連鎖地図

私たちの家には一軒一軒，××県○町 丁目□番地という住所があります。おかげで郵便物が間違いなく届きます。また，地図さえあれば知らないところでも旅行したりできます。DNAはA, T, G, Cという4つの塩基から成る長大な二重らせん構造をしており，生物の遺伝情報が記録されています。

特定の形質をつかさどる遺伝子に迫ることは地球上のどこかにある小さな家を探すようなもので容易なことではありませんが，DNA上に目印（マーカー）をつけ詳細な地図をつくれば，目的の遺伝子を探しだす道しるべになります。地図上の距離は物差しで測れないので，減数分裂によって生殖細胞が作られるときの，マーカー同士の御近所の度合いで計ります。マーカー同士近ければ仲良く同じ生殖細胞に伝わる度合いが高くなります。遠ければ同じ細胞に伝わる度合いは低くなり，異なる染色体にあるマーカー同士は互いに無関係に伝わります。マーカー同士が非常に近い所にあることを「連鎖」しているといい，連鎖の程度をもとに作られる地図を連鎖地図と呼んでいます。

林木育種センターでは，マツバノタマバエ抵抗性のクロマツを用いて，213個のDNAマーカーから成る連鎖地図を作りました。従来方法だと何年もかかる抵抗性の検定ですが，抵抗性遺伝子の近所にあるマーカーを利用して，苗木の中から抵抗性個体を選抜できます。抵抗性遺伝子の近くに，もっと多くのマーカーを地図上に書けば，抵抗性遺伝子を取り出すことにもつながります。住宅地図や道路地図と同様，育種における連鎖地図も非常に便利なものなのです。

（センター本所 育種課 林 英司）



用語解説

Q T L 解析

花の色や背の高さなど，生物において目で見える性質の単位のことを形質と呼びます。形質には「赤い・白い」のように表現型が明瞭に分かれる質的形質と，「何cm」のように表現型が連続的に現れる量的形質があります。

育種では有用な形質を支配する遺伝子を同定し数を明らかにすることが重要です。特に量的形質を支配する遺伝子座を明らかにすることをQTL（量的形質遺伝子座：Quantitative Trait Locus）解析と呼んでいます。

林木の有用形質は量的形質であることが多いと考えられていますが，量的形質は質的形質と違って，一般に複数の遺伝子座が関係し，そのほとんどに効果の微小な遺伝子（ポリジーン）が関わっています。そのうえ，量的形質は環境の変化に影響されやすいため，質的形質と同じ方法では解析が大変です。そのため，林木の量的形質ではこれまで，遺伝率を推定し，おおよその選抜効果を求めることしかできませんでした。つまり，量的形質を発現する個々の遺伝子を明確にとらえることができなかったのです。

ところが近年，様々なDNAマーカーの開発によって，個体間の違いをバンドの有無で現せる多数の遺伝マーカーが利用できるようになりました。それらのバンドの連鎖を調べることにより，詳細な連鎖地図の作成も可能となりました。そのため，DNAマーカーという目印がいっぱい散らばった地図があれば，コンピューターの計算ソフトを使って簡単にQTLがどこに存在するのかがつかめるようになったのです。しかも，QTLに強く連鎖したDNAマーカーを探せば，マーカーを用いた選抜（MAS：Marker Aided Selection）の可能性もでてきました。特に，成長に時間のかかる林木では，MASは目的の形質をもった個体の選抜が早くできる技術として期待されています。さらに，QTL解析を行うことによって，複雑な遺伝のしくみの解明も期待されています。

（センター本所 遺伝資源課 宮本尚子）