

ノート (Note)

雄性不稔遺伝子をヘテロ保有するスギ個体の簡易な探索方法 — 自殖家系における雄性不稔個体の分離を利用した試行 —

河合 慶恵^{1)*}、久保田 正裕¹⁾、遠藤 圭太²⁾、磯田 圭哉²⁾

キーワード：スギ、雄性不稔性、ヘテロ接合体、自殖

スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) は我が国の重要な造林樹種の一つである。しかし現在、人口の約 30% がスギ花粉症を発症しており、花粉飛散量の低減が重要な課題となっている。今後もスギを活用するうえで、育種による花粉生産量抑制のための遺伝的改良が根本的対策として期待されており、森林総合研究所林木育種センターでは、スギの少花粉品種や無花粉 (雄性不稔) 品種の開発を行っている。特に、遺伝的な雄性不稔性を保有した無花粉スギの活用は、環境や樹齢によらず花粉を飛散させないことから、将来の空中花粉量を軽減させるうえで有効な手段となる (斎藤 2010)。林木育種センター関西育種場 (以下、関西育種場とする) では無花粉スギ品種として 2007 年に「スギ三重不稔 (関西) 1 号 (以下、三重不稔という)」を開発した。さらに精英樹「上浮穴 16 号」が三重不稔と相同な雄性不稔遺伝子をヘテロで保有する (以下、雄性不稔ヘテロという) ことを発見した (磯田ら 2013)。三重不稔は無花粉スギ「爽春」や、富山県で開発された我が国最初の無花粉スギ品種「はるよこい」の不稔原因遺伝子と相同な雄性不稔遺伝子を保有し (河合 (宗原) ら 2009, 斎藤 2010, 磯田ら 2014)、1 対の劣性遺伝子に支配される核遺伝子型雄性不稔である (Taira et al. 1999)。

関西育種場では、三重不稔と上浮穴 16 号を用いて優良な無花粉品種の開発を進めている。しかし、育種素材となる不稔遺伝子保有個体がわずか 2 個体であることから、新たな雄性不稔ヘテロ個体の探索を行っている。探索には、①人工交配を用いる手法、②遺伝マーカーの利用、の二つが考えられる。①では、雄性不稔個体と探索個体を交配して得られる F₁ 家系に不稔個体が含まれるかを検定する方法が用いられてきた (Fig. 1a)。しかしこの方法は交配作業に多くの労力が必要である。一方、②は育種年限の短縮に資する強力なツールとなると期待されるが、分析機器を保有しない機関において遺伝マーカーの利用は難しい。

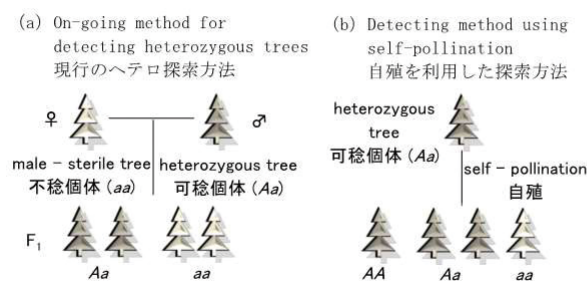


Fig. 1. 雄性不稔ヘテロ個体の探索に利用する交配家系の作出

Breeding designs for finding heterozygous male-sterile tree.

現行の探索方法 (a) と自殖を利用した探索方法 (b)
On-going method (a) and (b) self-pollination method

雄性不稔ヘテロ個体 (Aa) に対し自家受粉させることで、正常な花粉を有する個体 (AA, Aa) と不稔個体 (aa) が分離すると期待されることから (Fig. 1b)、探索対象個体を自殖させることで不稔遺伝子保有の検定が可能と考えた。そこで人工交配で作出した雄性不稔ヘテロ個体 (Aa) から自殖家系を作出し、これを用いて自殖を利用したヘテロ個体探索手法の有効性を検討した。

モデルとして使用する雄性不稔遺伝子をヘテロ型で保有する個体を作出するため、2008 年 3 月に三重不稔を母樹として精英樹 (伊都 3 号、飯南 5 号、神崎 15 号、いずれも AA (磯田ら 2013)) の花粉を授粉させた。得られた種子を養苗し、家系あたり 10 ~ 15 個体を温室内に鉢上げした。自家受粉を行うため、2011 年 7 月上旬と 8 月上旬に、これらのヘテロ家系に対し、ジベレリン液剤 (100ppm) を葉面散布し雄花と雌花の着花誘導を行った。2012 年 1 月から 2 月に、雄花と雌花が両方着生した枝にグラシン袋 (交配袋の代替として使用) をかけ、同年 10 月に自殖種子を得た。同一家系内の複数個体から採種した場合は、家系ごとにまとめた。これらの種子を 2013 年 4 月に苗畑へ播種し、翌年 4 月に床替えした。床替苗に同年 7 月上旬にジベ

Trial of efficient method for screening *Cryptomeria japonica* trees heterozygous for male-sterile gene by segregation of male-sterile seedlings derived from self-pollinated progeny.

Yoshie KAWAI^{1)*}, Masahiro KUBOTA¹⁾, Keita ENDOH²⁾ and Keiichi ISODA²⁾

原稿受付：平成 29 年 7 月 13 日 原稿受理：平成 29 年 9 月 5 日

1) 森林総合研究所 林木育種センター関西育種場

2) 森林総合研究所 林木育種センター遺伝資源部

* 森林総合研究所 林木育種センター関西育種場 〒709-4335 岡山県勝田郡勝央町植月中 1043

Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 1043 Uetsukinaka, Shioh, Katsuta, Okayama, 709-4335 Japan; e-mail: munehara@affrc.go.jp

レリン液剤 (100ppm) を散布した。2015 年 2 月に個体ごとに雄花を採取し実体顕微鏡下で観察した。正常な花粉粒が観察されなかった個体を対象に、雄花の凍結切片を作製し (Kawamoto and Shimizu 2000)、FAA で化学固定した雄花から得られた切片をヘマトキシリンで約 2 分、エオジンで約 10 秒染色した後、永久プレパラートを作製し、光学顕微鏡を用いて花粉の有無を調べた。

播種した 3 家系のうち三重不稔×伊都 3 号の自殖家系は、発芽苗が 1 年以内に全て枯死した。2 年生苗が得られた 2 家系のうち、三重不稔×神崎 15 号の自殖家系では調査した 15 個体のうち葯の中に粒状の花粉が全く見られない雄性不稔個体が 3 個体出現した (Table 1, Fig. 2a)。なお、三重不稔×飯南 5 号の自殖家系では 1 個体のみ着花し、正常な花粉を有していた。以上のように雄性不稔ヘテロ個体の自殖種子から不稔個体が分離したことから、自殖による雄性不稔遺伝子保有の検定が可能と考えられた。

Table 1. スギ自殖家系における雄花稔性調査の結果
Segregation ratio between sterile and normal seedlings derived from self-pollinated seeds of *C. japonica*.

家系名	採取種子重 (g)	調査個体数	正常花粉		判定保留	雄花無し
			有り	無し		
(三重不稔×神崎 15 号) 自殖	0.9	15	11	3	1	
(三重不稔×飯南 5 号) 自殖	2.2	2	1			1
(三重不稔×伊都 3 号) 自殖	0.3	—				

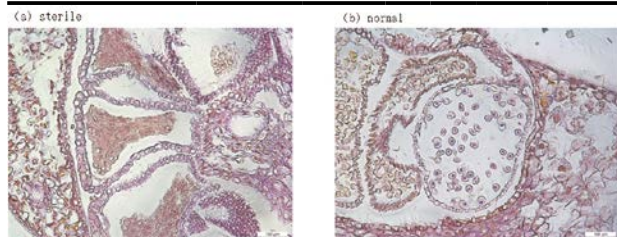


Fig. 2. 三重不稔 (関西) 1 号×神崎 15 号の F₁ 個体の自殖家系で観察された雄性不稔個体 (a) と可稔個体 (b)
Male flower of sterile (a) and normal (b) seedling derived from the self-pollinated seeds of *C. japonica*.

これまでの関西育種場におけるヘテロ探索では、Fig. 1a で示した現行の探索法を用いており、52 系統の検定用種子を得るために 4 年間かけて人工交配を行っている (磯田ら 2013)。これは、人工交配における様々な制限要因があるためである。現行の探索法では、三重不稔のみが母樹として用いられることから、人工交配に供する雌花数が不足し、制限要因の一つとなっている。また、授粉する花粉を検定系統それぞれについて採集、精選する必要があり、人工授粉作業とともに大きな労力を必要としている。(Table 2)。一方、自殖による探索 (Fig. 1b) では、交配母樹が検定個体であるため、母樹数の制限を受けない。さらに、交配袋内に雌花と雄花があり、人工授粉、花粉採集、精選作業が不要となる (Table 2)。また、これまで 4 種類のスギ雄性不稔遺伝子が同定されているが、全て 1 対の劣性遺伝子に支配される核遺伝子型雄性不稔であった (斎藤 2010)。現行の探索方法 (Fig. 1a) では 4 種類の不稔遺伝子それぞれについて、検定交配を実施する必要があるが、自殖によるヘテロ探索では (Fig. 1b)、いずれの遺伝子かをヘテロ保有している場合には不稔個体が出現することが期

待できる。さらに、未知の不稔遺伝子も検出できる可能性がある。こうしたことから、自殖による探索手法を用いることにより、現行よりもはるかに簡便にヘテロ個体探索が可能と期待される。よって今後は今回の手法を活用し、スギ精英樹における雄性不稔遺伝子のヘテロ保有の有無をスクリーニングしていく考えである。

Table 2. ヘテロ保有個体探索方法の比較
Comparison of methods to find trees heterozygous for male-sterility gene.

探索方法	必要な作業				メリット	デメリット
	花粉採取	花粉精選	袋かけ	人工授粉		
不稔個体との人工交配	要	要	要	要	・遺伝子の種類を同定できる	・労力が大きい
自殖家系を利用	不要	不要	要	不要	・労力が小さい ・母樹数による制限無し	・得率が低い

ところで三重不稔×伊都 3 号、三重不稔×飯南 5 号、三重不稔×神崎 15 号を自殖して得た 3 家系の、播種した種子重量当たり 1 年生苗得本数はそれぞれ 0.0、1.8、22.2 本/g であり (平均 8.0 本/g)、同時に播種したスギ精英樹間の人工交配 10 家系 (平均 63.8 本/g) と比較し著しく低い値を示した。このためいずれの家系でも、雄性不稔個体の分離比検定に十分な苗を得られなかった。これは自殖により、胚致死遺伝子がホモ接合化し種子の稔性が低下したことが原因と考えられる (河崎 1990)。ヘテロ保有の検定に必要な苗を効率的に得苗するため、このようなデメリットへの対策についても検討する必要がある。

本研究では、雄花内細胞組織の観察について森林総合研究所森林バイオ研究センターの小長谷賢一博士の指導を頂いた。また、関西育種場の三浦真弘博士と岩泉正和博士には懇切な助言を頂いた。ここに深謝する。なお、本研究の一部は、森林総合研究所エンカレッジモデルによる研究支援を受けた。

引用文献

- 磯田 圭哉・河合 慶恵・山口 和穂・久保田 正裕・山田 浩雄 (2013) 関西育種基本区におけるスギ雄性不稔遺伝子保有個体の探索. 林木育種センター年報, 2013, 55-59.
- 磯田 圭哉・河合 慶恵・山田 浩雄 (2014) 三重不稔 (関西) 1 号と「爽春」の保有する雄性不稔遺伝子の相同性の確認. 応用森林学会大会研究発表要旨集, 65, 27.
- 河合 (宗原) 慶恵・平岡 祐一郎・三浦 真弘・河崎 久男・渡邊 敦史 (2009) 雄性不稔スギ「爽春」と相同な不稔遺伝子を保有する系統の探索と新たな雄性不稔品種の開発. 日本森林学会関東支部大会講演要旨集, 61, 19.
- Kawamoto, T. and Shimizu, M. (2000) A method for preparing 2- to 50- μ m-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem. Cell. Biol.*, 113, 331-339.
- 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.
- 斎藤 真己 (2010) スギ花粉症対策品種の開発. 日林誌, 92, 316-323.
- Taira, H., Saito, M. and Furuta Y. (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. *J. For. Res.*, 4, 271-273.