

論文 (Original article)

スギの人工交配における野外での溶液授粉の効果

宮本 尚子^{1)*}、飯塚 和也²⁾、今野 幸則³⁾、永野 聡一郎⁴⁾、
那須 仁弥¹⁾、織部 雄一郎⁴⁾、竹田 宣明¹⁾

要旨

スギを対象とし、少量の花粉を有効活用しつつ作業性を高めた授粉の促進技術として、溶液授粉の野外における適用の可否を検討した。まず花粉の懸濁液の保存時間が花粉の活性に及ぼす影響を評価したところ、花粉は溶液に懸濁してから12時間まで、懸濁直後と同程度の活性を保つことができた。複数の母樹に対して3つの濃度の懸濁液(0.2、0.5および1.0%)による溶液授粉を複数の雌花の開花ステージ(開花開始、半開、全開)について行った。また、溶液授粉由来であった実生の割合(交配成功率)をDNAマーカーを用いた父性解析によって評価した。球果の結果率、生産される種子の100粒重に対しては、溶液授粉の効果は認められなかったが、種子の発芽率に対し、1.0%の溶液授粉は有意な正の効果があった($p < 0.05$)。交配成功率に対しては0.5および1.0%濃度の溶液授粉に有意な正の効果があり($p < 0.05$ および $p < 0.01$)、0.5%よりも1.0%濃度の方が交配成功率の予測値が高かった。また雌花の開花のステージに関しては半開のステージで授粉処理を行うと交配成功率が高い傾向があり、半開の雌花に1.0%の懸濁濃度の溶液授粉を行うことにより0.362の交配成功率が予測された。これらのことから、野外でも溶液授粉により一定程度の効果が期待できることがわかった。

キーワード：溶液授粉、SMP、雌花の開花ステージ、花粉の発芽、父性解析

1. はじめに

優良な系統が植栽されている採種園では、園外からの花粉の混入を回避すること、構成クローンが種子親・花粉親として均等に寄与すること、自殖を防止することなどの条件が満たされることが種子生産に理想的とされる(Wheeler and Jech 1992)。園外花粉の混入の問題は特に深刻で、園内に植栽されている優良な系統以外の花粉で受精すると、次代の遺伝的獲得量が低下する問題が生じる(El-Kassaby et al. 1989, Wang et al. 1991)。外部花粉の混入率は、多くの風媒樹木あるいは針葉樹の採種園では30%を超え、低い場合で数%、高い場合には70~80%に達することがDNAマーカー等を用いた研究で報告されている(Friedman and Adams 1985, Harju and Muona 1989, Pakkanen et al. 2000, Plomion et al. 2001, Moriguchi et al. 2004, Ozawa et al. 2009)。

SMP (Supplemental mass pollination; Denison and Franklin 1975, Daniels 1978, El-Kassaby and Ritland 1986, El-Kassaby and Reynolds 1990, Askew 1992)は、あらかじめ花粉親とするクローンから収集しておいた花粉を、袋がけしていない雌花に加圧式スプレーなどで人工的に直接散布する方法で、外部花粉の混入率を軽減する技術としての活用が提唱されている。SMPについては、実際に外部花粉の混入

を減少させる効果が認められている(Stoechr et al. 1998)。そのため、日本の育種対象樹種の種子生産現場では、一般的には自然交配が行われているが(田島 1991)、近年はスギおよびクロマツでSMPが試験的に利用されている(Ozawa et al. 2009, 市村ら 2013, 小澤 2015)。スギとクロマツでは雌花の着生の仕方が異なり、クロマツは上に向かって伸びる新枝の先端に1~3個紫紅色の雌花が着生する(倉田 1964)。これに対し、スギでは雌花は短い小枝に頂生し點頭する(倉田 1964)ので、クロマツに比べて目立たず、向きも一定でない。よって、クロマツでは果樹で使用されている花粉交配機器などを使用して効率的にSMPが施用できるが(森林総合研究所林木育種センター東北育種場 2016)、スギでクロマツと同じ方法で事業的にSMPを行うとすると時間と手間がかかり、花粉も大量に必要となると考えられる。特に、スギの少花粉品種が植栽されている採種園では、少花粉品種から採取できる花粉量が少ないためSMPがより難しいという問題がある。

果樹では、多くの樹種が虫媒花であり花粉媒介の役割を訪花昆虫のミツバチやハナアブに期待しているものの、訪花昆虫の種類や数が減少したことにより、また、果実の安定生産を目的として、開花中に羽毛筆、ぼんてんや加圧式スプレーで雌しべの柱頭に花粉を吹き付ける

原稿受付：令和2年7月27日 原稿受理：令和3年6月11日

1) 森林総合研究所 林木育種センター東北育種場

2) 宇都宮大学 農学部

3) 宮城県林業技術総合センター

4) 森林総合研究所 林木育種センター

* 森林総合研究所 林木育種センター東北育種場 〒020-0621 岩手県滝沢市大崎 95

人工授粉が必須の管理作業となっている(山下 1991)。加えて、近年、花粉を液体増量剤に懸濁した花粉懸濁液を雌花に噴霧する溶液授粉に関する研究も盛んに行われている(Hopping and Jerram 1980, Hopping and Simpson 1982, Sakamoto et al. 2009, 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010, Karimi et al. 2017, 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。ただし、樹種や品種によって液体増量剤中の花粉の活性や溶液授粉による結果率が大きく異なることが知られており(大野ら 1964, 農研機構 2020)、本手法の適用にあたっては樹種ごとに条件検討が求められる。

本研究では、日本の主要造林樹種であるスギにおいて、野外での溶液授粉が適用可能かどうかを検討する。溶液授粉が適用可能であれば、少ない花粉を有効に活用することができる。また、花粉を溶液に均一に薄めることで作業性を向上させることができるため、園内の空中花粉量が少ない少花粉品種の採種園で特に問題となる園外花粉の混入(小澤 2015)への対策技術としても期待できる。これまでに、室内で、無花粉スギの母樹に対して、果樹での報告と比較して20倍程度濃い花粉濃度(10%)の溶液を使用した溶液授粉を試験し、59.5%の種子発芽率を得たという報告(斎藤 2020)は存在する。しかし、野外で、かつ、広範囲に使用するために果樹と同程度の濃度での施用した場合、どの程度の効果があるのかについては不明である。

そこで、まずは実際の交配作業における花粉懸濁液の取り扱いに関する知見を得る目的で花粉懸濁液中の花の発芽活性が保たれる時間と条件について評価した。次いで溶液授粉の効率を検証することを目的に野外で複数の母樹に対して複数の花粉濃度で溶液授粉を行い、球果の結果率や得られた種子の重量および発芽率を評価した。また、種子から育成した苗をSimple Sequence Repeat (SSR) マーカーを用いて遺伝子型を判別し、父性解析を行うことで、溶液授粉由来であった実生の割合を算出し、溶液授粉の効果を評価した。

2. 材料と方法

(1) 液体増量剤および花粉懸濁液の調整

果樹の溶液授粉に関してはキウイフルーツ(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010)およびニホンナシ(農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)で詳しいマニュアルが農研機構のウェブサイトから入手できる。これらのマニュアルでは、花粉を懸濁するための媒体を「液体増量剤」、液体増量剤を調整したのちに花粉を懸濁したものを「花粉懸濁液」と呼称している。本論文でも同様の用語で呼称するものとする。展着効果をねらうための液体増量剤への添加物として、キウイフルーツでは0.1%の寒天を用いた方法が紹介されている。ニホンナシでは同様に0.1%の寒天を用いる方法の他、約0.04%のキサンタ

ンガムを用いた方法も紹介されている。また浸透圧を調整し、花粉の発芽率を高めるための添加物としてのショ糖は、キウイフルーツでは5%、ニホンナシでは約10%の濃度で用いられている。また両樹種とも溶液の花の濃度としては0.2%を下限値としていたが、花粉発芽率の差や、散布量の個人差を勘案して、キウイフルーツでは0.3~0.5%、ニホンナシでは0.3%が推奨されている(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010, 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。本研究では、実用化の際の入手のしやすさを考慮して展着剤としては寒天を使用するものとした。ショ糖濃度に関しては、5%と10%で作成した液体増量剤にスギの花粉を重量濃度で0.2%の割合で懸濁した花粉懸濁液の花の発芽率を予備的に試験した。その結果、ショ糖濃度5%での発芽率の方が10%の場合と比較して良好であった。そこで、蒸留水に重量濃度で5%のショ糖と0.1%の寒天を混合し電子レンジで加熱して完全に溶解させ、液温が28℃以下になるのを待ち、花粉を混入することで花粉懸濁液を調整した。

(2) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響の評価

a. 使用した花粉と花粉懸濁液の調整

森林総合研究所林木育種センター東北育種場内に植栽されている5クローンから花粉を収集した。花粉の収集はスギに適しているとされる水差し法(生方 2002)で2017年2月に行った。花粉は、精選後シリカゲルを用いて十分に(2週間程度)乾燥させ、50mlの遠沈管に小分けにして4℃設定の冷蔵庫に保存し、試験に使用した。液体増量剤に花粉を0.5%の重量割合で懸濁した花粉懸濁液を、前述の作製方法に従って調整した。

b. 発芽検定

花粉懸濁液を調整後すぐに4℃に設定した冷蔵庫内と25℃に設定した恒温器内に入れた。懸濁してから、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96時間後にクローン・処理ごとに4つの反復を設けて0.1mlの懸濁液を冷蔵庫および恒温器から取り出して培地に添加することで発芽検定を行った。培地の組成はショ糖10%、寒天1%とした。5日間25℃暗条件で培養した後、実体顕微鏡下で無作為に選んだ100粒の花の花粉について発芽した花粉を計数した。

冷蔵保存および常温保存した花粉懸濁液について、経過時間ごとの発芽数を対象として、懸濁直後(0時間)の花の発芽率との間に差がないことを帰無仮説とし、Bonferroni補正をしたWilcoxonの順位和検定により中央値の差の検定を行った。

(3) 野外での溶液授粉の評価

a. 使用した花粉と花粉懸濁液の調整

花粉親を選択するにあたり、溶液授粉により生産され

た種子とそれ以外が区別できる必要がある。そこで、交配実験を行った森林総合研究所林木育種センター東北育種場(岩手県滝沢市)には保存されていないスギクロン1個体を花粉親として森林総合研究所林木育種センター東北育種場奥羽増殖保存園(山形県東根市)で選んだ。花粉の収集は前述と同様の水差し法(生方 2002)で2018年2月に行った。花粉は、精選後シリカゲルを用いて十分に(2週間程度)乾燥させ、同年4月上旬の交配に使用するまで、50mlの遠沈管に小分けにして4℃に設定した冷蔵庫内で保存した。花粉を懸濁する濃度としては、キウイフルーツにおける溶液授粉で下限値とされていた重量濃度で0.2%、推奨されていた0.5%(愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010)の他、人工交配に用いる花粉量と同程度の1.0%の花粉懸濁液を調整した。3種類の懸濁液は別々のハンドスプレーに入れて交配に供した。

b. 溶液授粉試験

今回の試験を行った東北育種場内の試験地は20クロンが各3個体ずつ合計60個体植栽されている試験地で、すべての個体がDNAタイピングによりクロンの誤植栽はないことがわかっている。今回は20クロンのうち、雌花が着花して試験に使用することが可能であった13クロン各1個体を母樹として使用した。各個体には、0.2%、0.5%と1.0%の花粉濃度の懸濁液で授粉させる枝と、対照として無処理の自然交配枝の4処理枝を、雌花の個数なるべく均等に含まれるようにして設け、各処理を行った雌花の個数を記録した。

栗田ら(2016)は、雌花の開花過程に、A:未開花、B:開花開始、C:開花、D:珠孔液分泌の4つのステージを設けており、この基準に従い、各枝について目視でステージを判定した(Fig. 1)。横山(1975)は、開花に伴い胚珠が見えてきて、やがて珠孔から珠孔液が分泌され、珠孔液に花粉が付着すると珠孔液が珠孔内に引き込まれるが、花粉受容性が最も高いのが珠孔液の分泌が最も盛んな満開の時期(ステージD)の時であるとしている。このため、溶液授粉を行う時期として適当なものは雌花が半開程度のC、または全開のDの時期であると考え、各母樹の雌花を定期的に観察し、雌花の開花ステージCとDの母樹が多く観察され降雨が認められなかった2018年4月3日に1回のみ行った。溶液授粉は、1回に約1mlが噴出されるハンドスプレーを1枝あたり10回噴出させて行った。したがって、0.2%、0.5%と1.0%の懸濁液を用いた授粉における花粉の使用量は、それぞれ、約0.02g、0.05gと0.1gと推定した。

母樹別、開花ステージ別の溶液授粉処理を行った(無処理の自然交配を除く)枝の数をTable 1に示す。各枝には最小4個、最大では40個、平均で16.7個の雌花が含まれた。

c. 結果率・100粒重・種子発芽率

2018年9月に成熟した球果を採取してその個数を、授粉

Table 1. 母樹別の溶液授粉処理を行った枝の数と溶液授粉時の開花ステージ

母樹	開花ステージ		
	B	C	D
A	0	1	2
B	0	1	2
C	0	2	1
D	0	0	3
E	0	3	0
F	1	2	0
G	0	1	2
H	0	0	3
I	0	3	0
J	0	0	3
K	0	3	0
L	0	0	3
M	0	0	2
合計	1	16	21



Fig. 1. 開花ステージの写真

処理を行う前にカウントした雌花の個数で割ったものを結果率とした。球果数の方が雌花数よりも多くなってしまう枝についてはカウントミスとみなし、データから除外した。種子を球果から取りだし、虫害を受けたものを除いてランダムに100粒選んで重量を測定し、100粒重とした。採種数が100粒に満たなかった場合はその合計の重量と粒数から重量/粒数×100で求めるものとした。また、翌年春、100粒、100粒に満たない場合はその粒数の種子を、個体・処理ごとにバット内に播き、発芽した本数をカウントして播種数で割ったものを種子発芽率とした。

結果率、100粒重および種子発芽率に対する母樹と授粉処理の効果を検証するため、結果率および種子発芽率に関しては、(結果した球果数/授粉前に観察された雌花数 - 結果した球果数) および (発芽した本数/播種数 - 発芽した本数) を二項分布に従う目的変数、「母樹と授粉処理」、あるいは「母樹」または「授粉処理」のみを説明変数とし、リンク関数をlogitとした一般化線形モデルを作成し、AIC(赤池情報量規準; Akaike 1973)によるモデル選択を行った。また、100粒重を正規分布に従うものとして目的変数とし、「母樹と授粉処理」、あるいは「母樹」または「授粉処理」のみを説明変数、リンク関数をgaussianとした一般化線形モデルを作成し、AICによるモデル選択を行った。なお、授粉処理における各処理(無処理、0.2%、0.5%と1.0%の懸濁液を用いた溶液授粉)はカテゴリ

リカル変数として扱った。二項分布に従う一般化線形モデルにおいて目的変数が0の時の説明変数の値と、目的変数が1の時の説明変数の値とが完全に分離している場合、最尤推定ができない (Albert and Anderson 1984)。今回、説明変数の母樹Gの結果率としてすべての授粉処理で1が観測され、完全分離が生じていたため、結果率についてはFirthのペナルティ付き尤度法 (Firth 1993) を使用する一般化線形モデルをR version 3.5.3 (R Core Team 2019) のbrglmパッケージ (Kosmidis 2019) を用いて実施した。100粒重および種子発芽率の解析にはRのglm関数を使用した。AICが最も小さいモデルを最適モデルとした。ただし、最適モデルとのAICの差 (Δ AIC) が2以内のモデルについては最良のモデルと明らかな差がない競合モデルとみなし (Burnham and Anderson 2002)、最良モデルと競合モデルの両者の結果を示した。結果率、100粒重および種子発芽率について、最適モデルで利用した各説明変数によるそれぞれの係数の推定値と切片の値から予測値を算出した。

d. DNA抽出とSSR解析

播種後、得られた幼苗から本葉を採取した。各バットにつき11個体から、11個体未満のバットからはすべての生存個体からサンプリングした結果、サンプル数は合計505となった。サンプリングした試料は冷凍し、全DNAを改変CTAB法 (白石・渡辺 1995) により抽出した。DNA分析には、核SSRマーカー4遺伝子座 (CJS0520, CS1226, CS1525 (Tani et al. 2004), およびCjgssr77 (Moriguchi et al. 2003)) を適用した。テンプレートDNAを2 μ l、トータルボリュームを10 μ lとしてQIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen社製)を使用したマルチプレックスPCR反応を付属プロトコルに従って行い、得られたPCR産物についてABI PRISM 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems社製)を用いてピークを検出し、GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems社製)を用いて遺伝子型を決定した。母樹13個体および花粉親1個体についても同様にDNAタイピングを行った。

e. 父性解析

前述のように、今回溶液授粉を行った試験地は20クローン各3個体の合計60個体が植栽されており、父性解析を行うにあたってこの20クローンおよび溶液授粉に用いた1クロンの合計21クロンを花粉親候補とした。4マーカーの総父性排斥率をCervus3.0.7 (Marshall et al. 1998)を用いて、花粉親候補21クロンの遺伝子型から

総父性排斥率 (parent pair) = $1 - \text{Combined non-exclusion probability}$

により計算した。花粉親の特定には、最尤推定法 (Marshall et al. 1998) による父性解析をCervus 3.0.7を用いて実施した。また本試験地は採種園ではないが、隣接して異なるスギクローン個体も多数植栽されているため、サンプリングされた候補親の割合 (Proportion of candidate

fathers sampled)については、スギ採種園で外部花粉による交配率が47.8%であったという報告 (Moriguchi et al. 2004) を参考に、50%と設定した。その他のシミュレーションの設定は以下の通りとした。Number of offspring : 10000、Proportion of loci typed : 0.99、Proportion of loci mistyped : 0.01、Error rate in likelihood calculations : 0.01、Minimum number of typed loci : 2。また判断基準としてDeltaを用い、信頼レベルは95%を使用した。

父性解析の結果、その実生個体が溶液授粉に用いた花粉により生産された種子由来であった場合を「交配成功」と定義し、各個体・各処理について、溶液授粉に用いた花粉により生産された種子由来の実生個体の数を分析した実生個体の数で割ったものを「交配成功率」と定義した。

f. 交配成功率

交配成功率に対する母樹、授粉処理および開花ステージの効果を検証するため、交配成功率を (交配成功の実生の数, 分析した実生個体の数-交配成功の実生の数) とした二項分布に従う目的変数、「母樹と授粉処理と開花ステージ」、「母樹と授粉処理」、「母樹と開花ステージ」、「授粉処理と開花ステージ」、あるいは「母樹」または「授粉処理」または「開花ステージ」のみを説明変数とし、リンク関数をlogitとした一般化線形モデルを作成し、AICによるモデル選択を行った。交配成功率に関しても、説明変数の開花ステージB、および無処理の自然交配枝において交配成功とされた実生の数として0が観測され完全分離が生じていたため、結果率と同様にFirthのペナルティ付き尤度法を使用する一般化線形モデルを用いて実施した。AICが最も小さかった最適モデルと、 Δ AICが2以内の競合モデルがあった場合には両者の結果を示した。最適モデルで利用した各説明変数の係数の推定値と切片の値から授粉処理および開花ステージのそれぞれについて、交配成功率の予測値を算出した。加えて、授粉処理別および開花ステージ別の係数の最小二乗平均値と標準誤差をRのlsmeansパッケージ (Lenth 2016) で求め、これを用いて交配成功率の予測値とその95%信頼区間を計算した。

3. 結果

(1) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響

常温保存あるいは冷蔵保存した懸濁液について、花粉を溶液に懸濁してから経過時間と、その懸濁液内の花粉を培地上で発芽させた場合の発芽率の推移をFig. 2に示した。懸濁液作成直後の花粉発芽率は中央値で0.48であった。懸濁液作成直後(0h)の発芽数と各経過時間の発芽数の中央値の差を検定したところ、25℃の常温保存の場合48時間まで、冷蔵保存の場合12時間までは懸濁直後と発芽率の中央値に有意差がなく ($p > 0.05$)、懸濁直後と同程度

の花粉発芽率が得られると考えられた。それ以降は常温保存、冷蔵保存の場合ともに、発芽率は低下の傾向を取った。一方、96時間後も低いながら、常温保存および、冷蔵保存で発芽活性が確認された花粉も存在した。

(2) 溶液授粉による結果率・100粒重・種子発芽率への影響

AICによるモデル選択の結果、結果率については、母樹と授粉処理の両方の説明変数を含むモデルが最適モデルとして、母樹のみを説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : 1-aおよび1-b)。モデルの結果の要約をTable 3に示した。また、最適モデルで得られた母樹と授粉処理の係数の推定値と切片を用いて算出した結果率の予測値をAppendix Table 1に示した。予測値で見ると、無処理の自然交配枝で0.321から0.987、0.2%の授粉処理で0.409から0.991、0.5%の授粉処理で0.464から0.993、1.0%の授粉処理で0.287から0.985と、母樹によって結果率に2倍以上の差があった (Appendix Table 1)。

しかし、授粉処理には結果率に対する有意な効果は認められなかった ($p>0.05$, Table 2 : 1-a)。

100粒重については、母樹のみを説明変数とするモデルが最適モデルとして採択された (Table 2 : 2-a)。モデルの結果の要約をTable 4に示した。また、最適モデルで得られた母樹の係数の推定値と切片を用いて算出した100粒重の予測値をAppendix Table 2に示した。予測値は母樹によって0.216から0.388の幅があった (Appendix Table 2)。

種子発芽率については、母樹のみを説明変数とするモデルが最適モデルとして、母樹と授粉処理を説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : 3-aおよび3-b)。モデルの結果の要約をTable 5に示した。最適モデルで得られた母樹の係数の推定値と切片を用いて算出した種子発芽率の予測値をAppendix Table 2に示した。予測値で見ると、母樹によって0.085から0.570と、種子発芽率に6倍以上の差があった (Appendix Table 2)。また競合モデルの結果では、1.0%の授粉処理に種子発芽率に対する有意な正の効果は認められた ($p<0.05$, Table 5 : 3-b)。

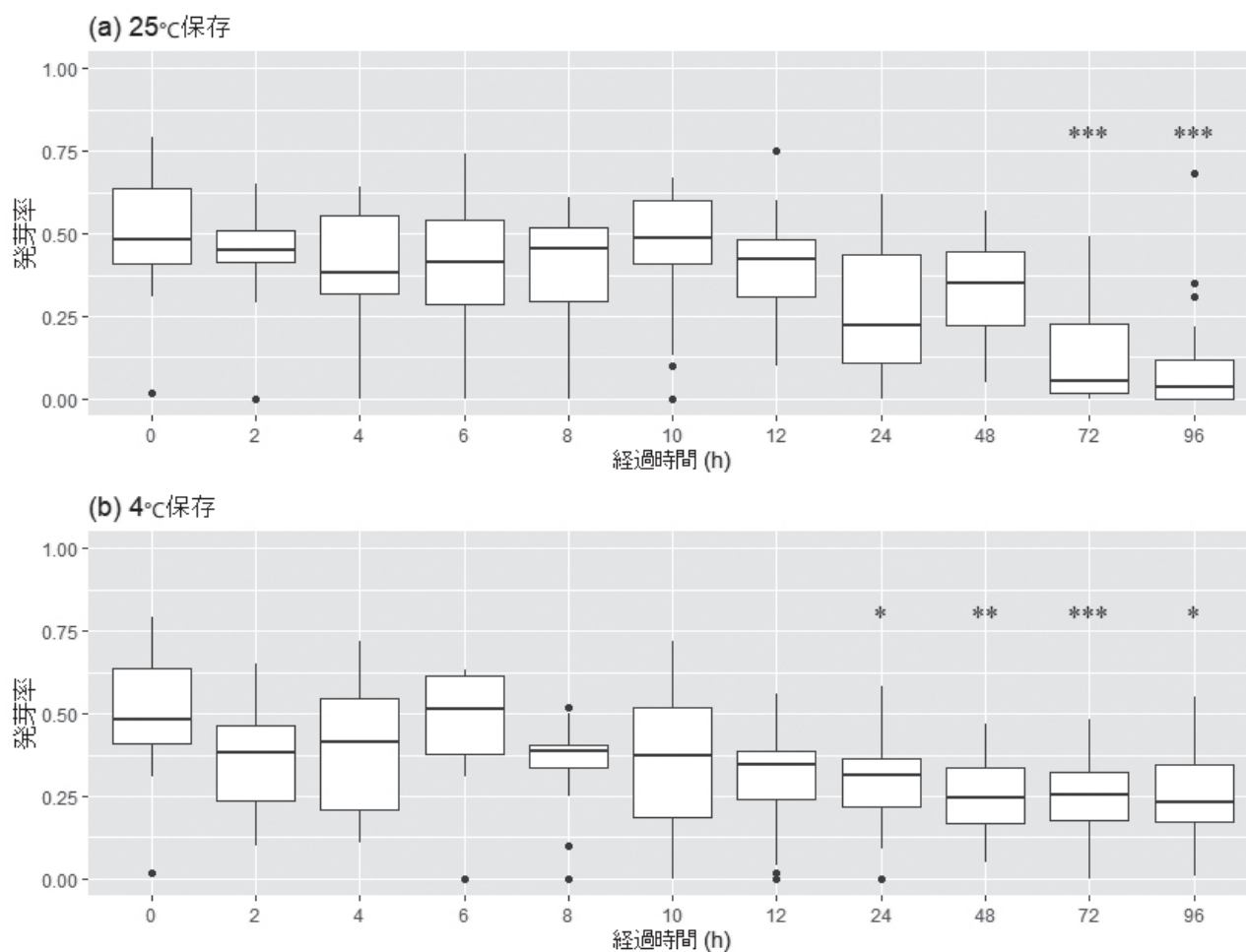


Fig. 2. 懸濁した後の経過時間と花粉発芽率の関係

(a) は懸濁液を 25℃で保存、(b) は 4℃で保存した場合の推移。* は 5%、** は 1%、*** は 0.1%水準で懸濁直後 (0 h) の発芽率の中央値と有意な差があったことを示す。

Table 2. 結果率、100 粒重、種子発芽率および交配成功率
をそれぞれ目的変数とするモデル評価の結果

		説明変数	AIC	Δ AIC
結果率	最適モデル (1-a)	母樹+授粉処理	188.74	
	競合モデル (1-b)	母樹	190.71	1.98
		授粉処理	322.97	134.24
100 粒重	最適モデル (2-a)	母樹	-131.03	
		母樹+授粉処理	-128.87	2.17
		授粉処理	-117.78	13.26
種子発芽率	最適モデル (3-a)	母樹	412.95	
	競合モデル (3-b)	母樹+授粉処理	414.54	1.59
		授粉処理	768.49	355.55
交配成功率	最適モデル (4-a)	授粉処理+開花ステージ	125.38	
	競合モデル (4-b)	授粉処理	127.26	1.87
		母樹+授粉処理+開花ステージ	136.11	10.72
		母樹+授粉処理	135.11	9.73
		母樹+開花ステージ	188.77	63.39
		母樹	191.56	66.18
		開花ステージ	180.80	55.42

Table 3. 結果率を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 1-a)
と競合モデル (Table 2 : 1-b) の結果の要約

(1-a)					
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値	
切片 (母樹 M, 無処理の自然交配枝)	0.716	0.461	1.551	0.121	
母樹 A	2.096	0.791	2.650	0.008	**
母樹 B	-0.952	0.490	-1.942	0.052	
母樹 C	1.381	0.810	1.705	0.088	
母樹 D	-0.515	0.564	-0.912	0.362	
母樹 E	-0.146	0.561	-0.261	0.794	
母樹 F	-0.031	0.511	-0.061	0.951	
母樹 G	3.630	1.506	2.410	0.016	*
母樹 H	3.005	0.941	3.195	0.001	**
母樹 I	-1.464	0.503	-2.912	0.004	**
母樹 J	-0.190	0.565	-0.336	0.737	
母樹 K	-0.599	0.544	-1.101	0.271	
母樹 L	-0.330	0.648	-0.509	0.611	
授粉処理 (0.2%)	0.382	0.273	1.401	0.161	
授粉処理 (0.5%)	0.606	0.316	1.917	0.055	
授粉処理 (1.0%)	-0.163	0.317	-0.515	0.607	

(1-b)					
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値	
切片 (母樹 M)	1.006	0.435	2.314	0.021	*
母樹 A	1.980	0.786	2.520	0.012	*
母樹 B	-1.028	0.485	-2.122	0.034	*
母樹 C	1.235	0.806	1.533	0.125	
母樹 D	-0.566	0.553	-1.024	0.306	
母樹 E	-0.114	0.552	-0.206	0.837	
母樹 F	0.016	0.500	0.032	0.974	
母樹 G	3.285	1.508	2.179	0.029	*
母樹 H	2.756	0.939	2.935	0.003	**
母樹 I	-1.582	0.492	-3.213	0.001	**
母樹 J	-0.134	0.562	-0.238	0.812	
母樹 K	-0.725	0.535	-1.355	0.175	
母樹 L	-0.620	0.630	-0.985	0.325	

* は 5%、** は 1%水準で有意であったことを示す。

Table 4. 100 粒重を目的変数とする最適モデル
(Table 2 : 2-a) の結果の要約

(2-a)					
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値	
切片 (母樹 M)	0.368	0.034	10.805	<0.001	***
母樹 A	-0.115	0.045	-2.560	0.015	*
母樹 B	-0.109	0.045	-2.421	0.020	*
母樹 C	-0.094	0.045	-2.079	0.044	*
母樹 D	0.020	0.045	0.446	0.658	
母樹 E	-0.121	0.045	-2.695	0.010	*
母樹 F	-0.152	0.045	-3.374	0.002	**
母樹 G	-0.070	0.045	-1.561	0.127	
母樹 H	-0.055	0.045	-1.228	0.227	
母樹 I	-0.114	0.045	-2.525	0.016	*
母樹 J	-0.079	0.045	-1.764	0.086	
母樹 K	-0.018	0.045	-0.404	0.688	
母樹 L	-0.069	0.045	-1.542	0.131	

* は 5%、** は 1%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

Table 5. 種子発芽率を目的変数とする最適モデル
(Table 2 : 3-a) と競合モデル (Table 2 : 3-b) の結果
の要約

(3-a)					
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値	
切片 (母樹 M)	0.282	0.117	2.417	0.016	*
母樹 A	-0.687	0.155	-4.435	<0.001	***
母樹 B	-1.059	0.159	-6.671	<0.001	***
母樹 C	-0.523	0.154	-3.394	<0.001	***
母樹 D	-0.205	0.157	-1.310	0.190	
母樹 E	-1.359	0.167	-8.165	<0.001	***
母樹 F	-1.354	0.164	-8.277	<0.001	***
母樹 G	-1.519	0.167	-9.086	<0.001	***
母樹 H	-1.013	0.158	-6.406	<0.001	***
母樹 I	-2.658	0.214	-12.429	<0.001	***
母樹 J	-0.825	0.156	-5.285	<0.001	***
母樹 K	-1.637	0.170	-9.624	<0.001	***
母樹 L	-0.708	0.155	-4.566	<0.001	***

(3-b)					
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値	
切片 (母樹 M, 無処 理の自然交配枝)	0.207	0.127	1.625	0.104	
母樹 A	-0.716	0.156	-4.584	<0.001	***
母樹 B	-1.088	0.160	-6.802	<0.001	***
母樹 C	-0.551	0.155	-3.551	<0.001	***
母樹 D	-0.243	0.158	-1.537	0.124	
母樹 E	-1.385	0.167	-8.275	<0.001	***
母樹 F	-1.383	0.165	-8.395	<0.001	***
母樹 G	-1.548	0.168	-9.197	<0.001	***
母樹 H	-1.042	0.159	-6.539	<0.001	***
母樹 I	-2.688	0.215	-12.512	<0.001	***
母樹 J	-0.854	0.157	-5.428	<0.001	***
母樹 K	-1.667	0.171	-9.730	<0.001	***
母樹 L	-0.737	0.156	-4.714	<0.001	***
授粉処理 (0.2%)	0.115	0.088	1.307	0.191	
授粉処理 (0.5%)	0.111	0.088	1.264	0.206	
授粉処理 (1.0%)	0.187	0.091	2.066	0.039	*

* は 5%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

(3) 溶液授粉による交配成功率の評価

今回使用した4マーカーによる総父性排斥率は0.9996で、父性解析を行うにあたって十分な能力があると考えられた。判断基準としてDeltaを用い、信頼レベル95%で交配成功と判定されたサンプルは505のうち58と推定され、残りの447サンプルはその他の花粉による交配由来と推定された。

授粉処理別の13母樹への交配成功率をFig. 3に示した。

Table 6. 交配成功率を目的変数とする最適モデル (Table 2 : 4-a) と競合モデル (Table 2 : 4-b) の結果の要約

(4-a)				
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (無処理の自然交配枝, 開花ステージ D)	-5.723	1.412	-4.052	<0.001 ***
授粉処理 (0.2%)	2.445	1.458	1.677	0.094
授粉処理 (0.5%)	3.850	1.427	2.698	0.007 **
授粉処理 (1.0%)	4.480	1.415	3.166	0.002 **
開花ステージ_B	-1.260	1.516	-0.832	0.406
開花ステージ_C	0.574	0.306	1.874	0.061
(4-b)				
変数	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片 (無処理の自然交配枝)	-5.525	1.423	-3.884	<0.001 ***
授粉処理 (0.2%)	2.581	1.479	1.745	0.081
授粉処理 (0.5%)	3.692	1.446	2.553	0.011 *
授粉処理 (1.0%)	4.590	1.437	3.195	0.001 **

* は 5%、** は 1%、*** は 0.1%水準で有意であったことを示す。

無処理の自然交配枝で今回使用した花粉により交配したものはなかった。また雌花の開花ステージ別の懸濁液の花粉濃度による交配成功率をFig. 4に示した。開花ステージCとDの雌花が多い時期をねらって交配実験をしたため、雌花が開き始めた開花ステージBの母樹が少なく、開花ステージBでは0.2%と1.0%の懸濁液を用いた溶液授粉が行えなかった。開花ステージBの種子数は合計で11と少なかったが、交配成功と判定されたサンプルはなかった。

交配成功率の予測には、授粉処理と開花ステージを説明変数として含むモデルが最適モデルとして、授粉処理のみを説明変数とするモデルが競合モデルとして採択された (Table 2 : (4-a)および(4-b))。モデルの結果の要約をTable 6に示した。授粉処理に関しては0.5%および1.0%の溶液授粉に交配成功率に対する有意な効果が認められた($p < 0.01$ および $p < 0.01$; Table 6 (4-a)、 $p < 0.05$ および $p < 0.01$; Table 6 (4-b))。開花ステージの交配成功率への影響を見ると、開花ステージCのDに対するオッズ比は1.78であった (Table 6 (4-a))。最適モデルで得られた母樹と授粉処理の係数の推定値と切片を用いて算出した結果率の予測値をAppendix Table 3に示した。加えて、授粉処理別および開花ステージ別の係数の最小二乗平均値を用いて算出した交配成功率とその95%信頼区間をFig. 5に示した。

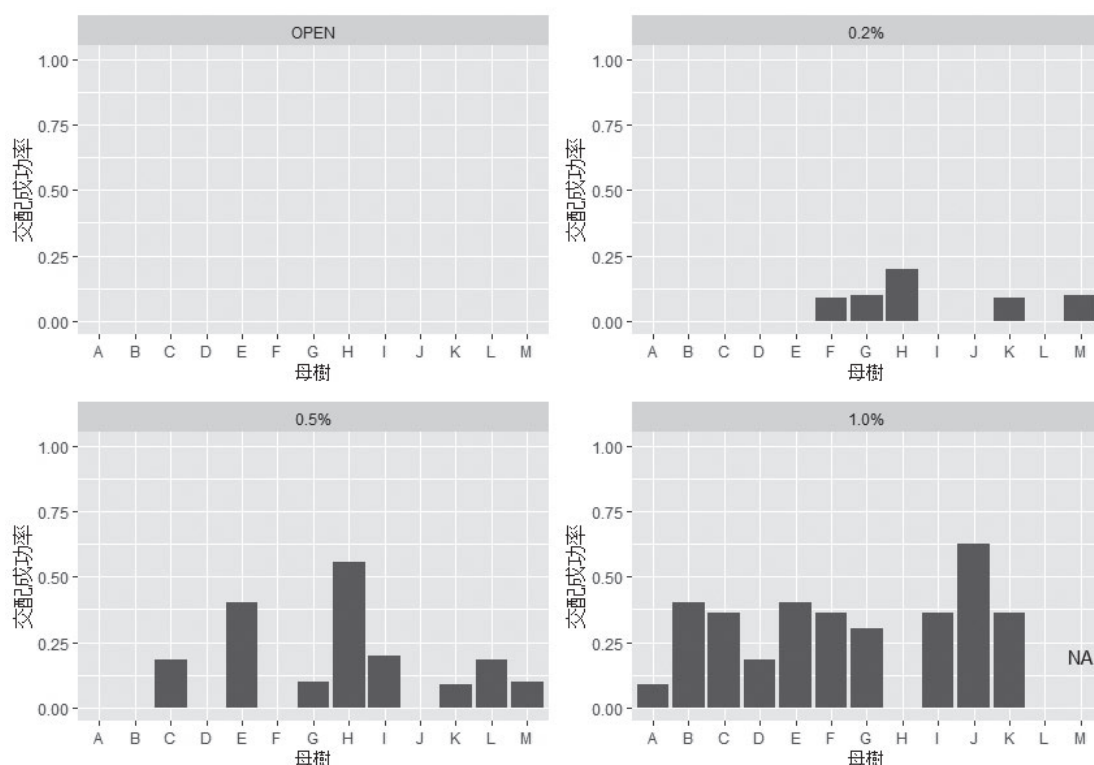


Fig. 3. 授粉処理および母樹別に見た交配成功率

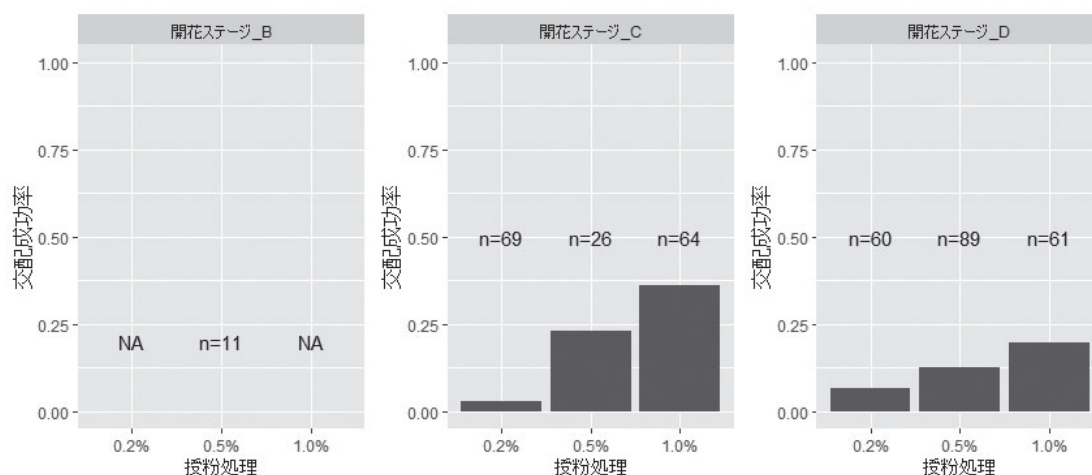


Fig. 4. 雌花の開花ステージおよび懸濁液の濃度別に見た交配成功率

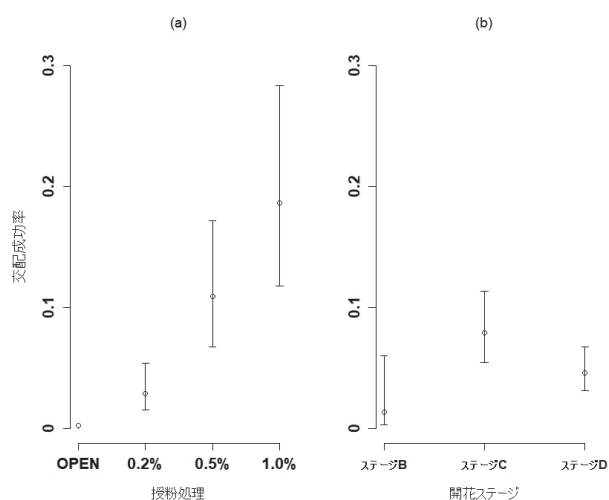


Fig. 5. (a) 授粉処理および (b) 開花ステージの各水準における係数の最小二乗平均値から求めた交配成功率の予測値。エラーバーは 95% 信頼区間を示す。

4. 考察

(1) 花粉懸濁液の保存温度と保存時間が花粉の活性に及ぼす影響

花粉懸濁液の保存について、スギの場合、常温保存の場合48時間まで、冷蔵保存の場合12時間までは懸濁直後と発芽率の中央値に有意差がなかった (Fig. 2)。懸濁液内での花粉の活性の保持について、冷蔵保存の効果を検証したが、冷蔵保存によって活性を保持できる時間が延びるとは言えなかった。ただし、常温保存の場合には4時間以降下限値がかなり低くなっていることや、24時間の時点で中央値が明らかに低いデータが得られていることなどから、実験誤差を考慮すると実用性の面では注意が必要であり、可能な限り早く使用した方が良いであろうと考えられた。溶液授粉が適用できる果樹において、溶液に懸濁した後、花粉の発芽活性は劇的に低下する例が知られている。例えば、ニホンナシでは70%あった懸濁直後の花粉発芽率が、5時間後には10%以下に低下するため溶液は3時間で使い切ることが推奨されている

(農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 2018)。キウイフルーツにおいても時間経過にともなう花粉の発芽率の低下が確認されており、懸濁後2時間程度で使い切ることが推奨されている (愛媛県農林水産研究所果樹研究センター 2010)。またモモでは溶液の組成に関わらず、発芽率は2時間後に懸濁直後の半分になること (阪本ら 2008) が報告されている。これらの果樹の事例では溶液授粉にかなりタイトに時間的な制限があることが示されており、スギは花粉の取り扱いの観点からは前述の果樹に比べて溶液授粉を適用しやすい樹種であると考えられた。

(2) 溶液授粉による結果率・100粒重・種子発芽率への影響

モデル選択の結果から、結果率には母樹と授粉処理が影響すること、種子の100粒重には母樹が影響することが示唆された。また、種子発芽率には母樹と授粉処理が影響することが示唆された。溶液授粉は溶液を媒体として人為的に花粉を雌花に散布するため、量的花粉制限によるシイナが軽減でき、種子の発芽率が上がる可能性がある。加えて、花粉の液体増量剤に展着効果をねらって寒天を添加しているため、この効果で、空中花粉が少ない状況下で目的外の空中花粉をとらえやすくなって種子発芽率が上がったということも一つの可能性として考えられたが、寒天等の展着剤の効果については今後の検討課題である。今回は最も高い花粉濃度で1.0%の溶液授粉を試行したが、非常に高い花粉濃度の溶液授粉を行った事例 (斎藤 2020) によると、花粉濃度10%および20%で、59.5%および53.8%という高い種子発芽率を報告していた。今回の結果では花粉濃度が1.0%の場合にのみ有意な正の効果が見られた (Table 5 (3-b))。同時に、母樹によっては1.0%濃度でも斎藤(2020)と同程度の種子発芽率の予測値が得られたが母樹間変動が大きかったことから、利用できる花粉量に余裕がある場合には、花粉濃度を高めることが有効ではないかと考えられた。

(3) 溶液授粉による交配成功率の評価

無処理の自然交配枝では溶液授粉で使用した花粉による交配がおこったサンプルはなく (Fig. 3)、今回試験した0.5%および1.0%の溶液授粉は交配成功率に有意な正の影響が認められ (Table 6 (4-a)、(4-b))、また、交配成功率の予測値は花粉濃度が高くなるほど上がっていた (Fig. 5 (a)、Appendix Table 3)。一方、0.2%の溶液授粉では有意な影響が認められず (Table 6 (4-a)、(4-b))、今回試験した3つの濃度の中では、0.5%よりも薄い花粉濃度では交配成功率への効果が非常に小さいと考えられた。加えて雌花の開花ステージも交配の成否に影響があることが示唆され、雌花が半開程度の開花ステージCの状態の交配成功率は、開花ステージDでの交配成功率に対してオッズ比が1.78倍となり (Table 6 (4-a))、交配成功率の予測値も開花ステージCで最も高かった (Fig. 5 (b)、Appendix Table 3)。

スギでは一つの雌花の中に複数の胚珠が存在し、それぞれが別個に受粉する (横山 1975, 高相 1996)。そのため、通常、一つの雌花の中でも異なる花粉によって受粉・受精した種子が存在する。開花ステージDよりもCの交配成功率が高い傾向があったが、その理由として、より開花の進んだ開花ステージDで溶液授粉処理を行った枝では、溶液授粉に用いた花粉による受粉より先に、空中花粉によって受粉・受精にいたってしまっているようなケースが多かったことが考えられた。

また、今回算出したモデルには開花ステージBへの施用の値が含まれているため、このデータを除き、1.0%の溶液で開花ステージCおよびDの時期に授粉処理を行ったとした場合の交配成功率の予測値を試算したところ、0.282という値が予想された。また、今回の試験では、開花ステージのCとDが多い時期を狙ったが、結果的には開花ステージDの処理数が一番多くなっていた。しかし、開花ステージCの方がDよりも交配成功率が高くなる傾向が見られたことから、溶液授粉の処理の時期を今回の時期よりも早め、開花ステージCの雌花にのみ施用することができたと仮定して、開花ステージCのみのデータを用いて予測値を試算したところ、交配成功率は0.362と推定された。

本研究では野外のスギ個体の雌花に対して比較的低濃度で、一回のみの溶液授粉の施用した場合にどのような効果が得られるのかを評価したが、適切な開花のステージを選ぶことによって目的とした花粉による種子生産が3割程度は期待できると考えられた。野外でスギ2系統に対して交配適期に花粉を直接吹きかけるSMPを1回のみ行った試験 (小澤 2015) では、図3のグラフから読み取った交配成功率は系統ごとにやや異なり、0.1および0.3程度であった。これらの値は2系統のみの結果であり、また使用した花粉量については不明であるが、今回得られた1.0%溶液授粉の適期への1回処理の交配成功率はこの花粉を直接吹きかけるSMPでの交配成功率と比較して遜色ないと言えた。また、同じく小澤 (2015) は同一の雌花に対して時

期を変えて複数回の花粉を直接吹きかけるSMPを行った場合も検証し、処理回数と交配成功率には正の相関があったことを報告している。これらのことから、溶液授粉でも複数回の施用で交配成功率が上げられる可能性はあると考えられた。

今回の試験によって、少量の花粉を有効活用しつつ、作業性の向上の期待できる溶液授粉により、野外においても一定程度の効果を確認することができた。今後は実用性を高めるために、動力噴霧器などの器具の使用、雌花の開花時期や交配成功率の年次間変動等についてさらに検討を重ねていく必要がある。

謝辞

本研究の一部は、森林総合研究所林木育種センター H30育種交付金プロジェクト (課題番号：エイ a P S 2 6) によって行われたものである。また、森林総合研究所の「家族責任がある研究者のための支援制度」による研究支援を受けた。本原稿の執筆にあたっては編集者、2名の査読者に非常に有益な助言を頂いた。ここに厚く感謝申し上げます。

引用文献

- Akaike, H. (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov, & F. Csaki (Eds.), *Proceedings of the 2nd international symposium on information theory* (pp. 267-281). Budapest: Akademiai Kiado.
- Albert, A. and Anderson, J. A. (1984) On the existence of maximum likelihood estimates in logistic regression models. *Biometrika*, 71, 1-10.
- Askew, G. R. (1992) Potential genetic improvement due to supplemental mass pollination management in conifer seed orchards. *For. Ecol. Manage.*, 47, 135-147.
- Burnham, K. P. and Anderson, D. R. (2002) *A practical information-theoretic approach. Model selection and multimodel inference*, 2nd ed. Springer, New York, 2.
- Daniels, J. (1978) Efficacy of supplemental mass-pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.*, 27, 52-58.
- Denison, N. and Franklin, E. (1975) Pollen Management. In Faulkner R (eds). *"Seed Orchards"*. For. Comm. Bull. 54, London, 92-100.
- 愛媛県農林水産研究所果樹研究センター (2010) “キウイフルーツ溶液受粉マニュアル”, 7pp, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/kiui_jufun.pdf.
- El-Kassaby, Y. A. and Ritland, K. (1986) The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir seed orchard. *Silvae Genet.*, 35, 240-244.
- El-Kassaby, Y. A., Rudin, D. and Yazdani, R. (1989). Levels of

- outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in northern Sweden. *Scand. J. For. Res.*, 4, 41-49.
- El-Kassaby, Y. A. and Reynolds, S. (1990) Reproductive phenology, parental balance, and supplemental mass pollination in a sitka-spruce seed-orchard. *For. Ecol. Manage.*, 31, 45-54.
- Firth, D. (1993) Bias reduction of maximum likelihood estimates. *Biometrika*, 80, 27-38.
- Friedman, S. T. and Adams, W. T. (1985) Estimation of gene flow into two seed orchards of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 69, 609-615.
- Harju, A. and Muona, O. (1989) Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scand. J. For. Res.*, 4, 513-520.
- Hopping, M. E. and Jerram, E. M. (1980) Supplementary pollination of tree fruits: I. Development of suspension media. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 23, 509-515.
- Hopping, M. E. and Simpson, L. M. (1982) Supplementary pollination of tree fruits: III. Suspension media for kiwifruit pollen. *New Zeal. J. Agric. Res.*, 25, 245-250.
- 市村 よし子・小澤 創・坪村 美代子・渡辺 敦史・齋藤 央嗣 (2013) 少花粉スギミニチュア採種園におけるSMP (Supplemental Mass Pollination) の効果. 森林遺伝育種学会大会講演要旨集 2, 15.
- Karimi, H. R., Mohammadi, N., Estaji, A. and Esmailzadeh, M. (2017) Effect of supplementary pollination using enriched pollen suspension with Zn on fruit set and fruit quality of pistachio. *Sci. Hortic.*, 216, 272-277.
- Kosmidis, I. (2019) brglm: Bias reduction in binary-response generalized linear models. R package version 0.6.2, <https://cran.r-project.org/package=brglm>.
- 倉田 悟 (1964) 原色日本林業樹木図鑑. 地球出版, 331pp.
- 栗田 学・平岡 裕一郎・花岡 創・高橋 誠・渡辺 敦史 (2016) スギ雌花の開花フェノロジーと気温の関連性について. 九州森林研究, 69, 107-109.
- Lenth, R. V. (2016) Least-Squares Means: The R Package lsmeans. *J. Stat. Softw.*, 69, 1-33.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, 7, 639-655.
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Taira, H. and Tsumura, Y. (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 751-758.
- Moriguchi, Y., Taira, H., Tani, N. and Tsumura, Y. (2004) Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Can. J. For. Res.*, 34, 1683-1690.
- 農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所・高知県農業技術センター果樹試験場 (2018) “ニホンナシ溶液受粉マニュアル”, 5pp, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/fruit_nasi_jufun2018.pdf
- 農研機構 (2020) “落葉果樹の溶液受粉について”, https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/030162.html, (参照 2020-10-8).
- 大野 正夫・高橋 英吉・寺沼 公士 (1964) 果樹の人工受粉の能率化に関する研究. 園芸学会雑誌, 33, 1-7.
- Ozawa, H., Watanabe, J., Chen, H., Isoda, K. and Watanabe, A. (2009) The impact of phenological and artificial factors on seed quality in a nematode-resistant *Pinus densiflora* seed orchard. *Silvae Genet.*, 58.
- 小澤 創 (2015) 少花粉スギミニチュア採種園におけるSMP (supplemental mass pollination) の効果. 関東・中部林業試験研究機関連絡協議会花粉症対策研究会, “花粉症対策研究会成果集”, 10-11.
- Pakkanen, A., Nikkanen, T. and Pulkkinen, P. (2000) Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scand. J. For. Res.*, 15, 399-404.
- Plomion, C., LeProvost, G., Pot, D., Vendramin, G., Gerber, S., Decroocq, S., Brach, J., Raffin, A. and Pastuszka, P. (2001) Pollen contamination in a maritime pine polycross seed orchard and certification of improved seeds using chloroplast microsatellites. *Can. J. For. Res.*, 31, 1816-1825.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 斎藤 真己 (2020) 優良無花粉スギ「立山 森の輝き」普及推進事業. 令和元年度富山県農林水産総合技術センター森林研究所業務報告, 11.
- Sakamoto, D., Hayama, H., Ito, A., Kashimura, Y., Moriguchi, T. and Nakamura, Y. (2009) Spray pollination as a labor-saving pollination system in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.f.) Nakai): Development of the suspension medium. *Sci. Hortic.*, 119, 280-285.
- 阪本 大輔・羽山 裕子・伊東 明子・樫村 芳記・森口 卓哉・中村 ゆり (2008) モモ溶液受粉のための液体増量剤へのPMEまたはPGの添加が結実に及ぼす影響. 園芸学研究, 7, 525-530.
- 森林総合研究所林木育種センター東北育種場 (2016) 寒冷地におけるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ苗木の安定供給 採種園管理者と苗木生産者のためのマニュアル. 35pp.
- 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.
- Stoeck, M. U., Orvar, B. L., Vo, T. M., Gawley, J. R., Webber, J. E., and 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.
- 田島 正啓 (1991) Ⅲ. 林木育種の基礎 3. 繁殖技術. 大場喜一郎・勝田 枉編, “林木育種学”, 文永堂出版, 116-130.
- 高相 徳志朗 (1996) 針葉樹類の受粉機構. 植物分類, 47, 253-269.
- Tani, N., Takahashi, T., Ujino-Ihara, T., Iwata, H., Yoshimura, K. and Tsumura, Y. (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. Ann. For. Sci., 61, 569-575.
- 生方 正俊 (2002) 遺伝資源の収集・保存に関する技術シリーズ No. 1 樹木花粉の取り扱い (I) —収集から精選まで—. 林木遺伝資源情報, 8.
- Wang, X. R., Lindgren, D., Szmidt, A. E. and Yazdani, R. (1991) Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers. Scand. J. For. Res., 6, 379-385.
- Wheeler, N. C. and Jech, K. S. (1992) The use of electrophoretic markers in seed orchard research. New For., 6, 311-328.
- 山下 研介 (1991) 開花と結実管理. 杉浦 明編, “新果樹園芸学”. 朝倉書店, 138-152.
- 横山 敏孝 (1975) スギにおける胚の形成と球果の成長. 林試研報, 277, 1-20.

Appendix Table 1. 母樹と授粉処理の係数推定値を用いて算出した結果率の予測値

	授粉処理			
	OPEN	0.2%	0.5%	1.0%
母樹 A	0.943	0.961	0.968	0.934
母樹 B	0.441	0.536	0.591	0.402
母樹 C	0.891	0.923	0.937	0.874
母樹 D	0.550	0.642	0.692	0.510
母樹 E	0.639	0.721	0.764	0.600
母樹 F	0.665	0.744	0.784	0.627
母樹 G	0.987	0.991	0.993	0.985
母樹 H	0.976	0.984	0.987	0.972
母樹 I	0.321	0.409	0.464	0.287
母樹 J	0.628	0.713	0.756	0.590
母樹 K	0.529	0.622	0.673	0.488
母樹 L	0.595	0.683	0.729	0.555
母樹 M	0.672	0.750	0.789	0.635

Appendix Table 2. 母樹の係数推定値を用いて算出した100粒重 (g) と種子発芽率の予測値

母樹	100粒重 (g)	発芽率
A	0.253	0.400
B	0.259	0.315
C	0.274	0.440
D	0.388	0.516
E	0.246	0.251
F	0.216	0.255
G	0.298	0.225
H	0.313	0.325
I	0.254	0.085
J	0.288	0.368
K	0.350	0.205
L	0.298	0.395
M	0.368	0.570

Appendix Table 3. 授粉処理と開花ステージの係数推定値を用いて算出した交配成功率の予測値

	授粉処理		
	0.2%	0.5%	1.0%
開花ステージ_B	0.011	0.042	0.076
開花ステージ_C	0.063	0.214	0.339
開花ステージ_D	0.036	0.133	0.224

Effect of spray pollination as an artificial pollination technique for *Cryptomeria japonica* in the field.

Naoko MIYAMOTO^{1)*}, Kazuya IIZUKA²⁾, Yukinori KONNO³⁾, Soichiro NAGANO⁴⁾,
Jin'ya NASU¹⁾, Yuichiro ORIBE⁴⁾ and Nobuaki TAKEDA¹⁾

Abstract

The applicability of spray pollination for *Cryptomeria japonica* in the field, as an artificial pollination promotion technique, was examined to effectively utilize a small amount of pollen while improving workability. First, the effect of storage time of the pollen grain-water suspension on pollen activity was evaluated. Pollen grains stored for 12 h in the suspension had a similar germination activity to those evaluated immediately after the suspension was prepared. Then, spray pollination with three levels of pollen concentrations (0.2%, 0.5%, and 1.0%) on multiple mother tree clones with female strobili at different developmental stages (start, half-open, and full-open) was tested. In addition, to evaluate whether mating following spray pollination was successful, the seedlings grown from the collected seeds were subjected to paternity analysis using DNA markers. There was no effect by spray pollination on the levels of cone yield and the 100-seed weight ($p > 0.05$). Conversely, spray pollination at 1.0% pollen concentration had a significant positive effect on the seed germination rate ($p < 0.05$). Spray pollination at the two pollen concentrations of 0.5% and 1.0% had a significant positive effect on the ratio of seedlings (mating success rate) for the spray pollen used ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). The mating success rate with the 1.0% pollen concentration was higher than that with the 0.5% concentration. Among the three female strobili developmental stages, the mating success rate tended to be higher when spray pollination was performed at the half-open stage. A mating success rate of 0.362 was predicted using a spray pollination with 1.0% at the half-open stage of strobili. In summary, spray pollination was shown to have beneficial effects on mating even in the field.

Key words: spray pollination, supplemental mass pollination, developmental stages of female strobili, pollen germination, paternity analysis

Received 27 July 2020, Accepted 11 June 2021

1) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center (FTBC), Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) School of agriculture, Utsunomiya University

3) Miyagi Prefectural Forestry Technology Institute

4) FTBC, FFPRI

* Tohoku Regional Breeding Office, FTBC, FFPRI, 95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0621, JAPAN; E-mail: naoruko@affrc.go.jp