

平成21年 4月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580147

研究課題名（和文） トチノキの果実あたり種子数の変動とその要因

研究課題名（英文） Factors affecting seed set in *Aesculus turbinata*

研究代表者

川口 英之（KAWAGUCHI HIDEYUKI）

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：40202030

研究成果の概要：トチノキ果実の種子数の変動とその至近要因と究極要因を検討した。資源の多少、花粉親の遺伝子型、花粉の制限は至近要因でないことが示された。自殖を含めて花粉親が異なる胚珠の共存と成熟が観察された。果実内の複数の種子は重さを小さくすることなく、同様の重さに成熟した。複数の種子が成熟すると種子に対する果皮のコストは低くなったが、虫害率は高くなった。落下後の散布距離に種子の形態の違いは影響しないが種子重は影響した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：結実率、胚珠、花粉親、近交弱勢、自殖、種子サイズ、虫害、散布距離

## 1. 研究開始当初の背景

日本の冷温帯落葉広葉樹林の溪畔部を構成する主要な高木種であるトチノキは、5月から6月にかけて、多数の雄花と少数の両性花からなる花序をつけ、マルハナバチなどによって送粉される。果実は9月ころに成熟し落下する。なかに入っている種子の重さは30gをこえるものがあり、日本の樹木の中で最も大きくて重く、古くからトチもちなどに利用されてきた。種子は落下したのちにネズミなどにより二次散布される。ネズミなどに

より地中に蓄えられた種子のうち、食べ残された種子が翌年の春に発芽する。

トチノキの種子は通常、1個の果実のなかに1個が入っていることが多い。しかし、ひとつの果実のなかに2個、まれに3個以上の種子が入っている場合がある。トチノキの両性花は、子房が3室に分かれ、胚珠は各室に2個ずつあるので、それらの胚珠がすべて成熟した場合には、ひとつの果実に6個の種子が入る。京都府北部の京都大学芦生研究林における観察では、1個の果実に5個の成熟種

子が入っていた場合があった。1個の種子しか入っていない果実では、必ず直径数 mm 程度のシイナが5個入っており、種皮の大きさが数 mm 程度にまでは、あとの5個も大きくなる。また、芦生研究林における予備的な測定では、個体ごとに果実あたりの種子数にはばらつきがあった。つまり、ひとつの果実に複数の種子を含む果実をたくさんつける個体とほとんどつけない個体がある傾向があった。

多くの樹木において1個の花あたりの胚珠の数に対して、成熟する胚珠の数は少ないことが多い。この現象に対しては、いくつかの仮説が提出されている。遺伝子型の近縁度による選択もその仮説のひとつであるが、その形成過程においてそれぞれの種子の遺伝子型を実際に比較した例はほとんどない。どのような遺伝子型が成熟するのかを測定することにより、種子親が花粉親に対してどのような選択を行なっているのかを明らかにできる可能性がある。また、複数の胚珠が成熟することは、胚珠間の競争だけでなく共存についての新たな情報を与えることとなる。

また、成熟した種子数の異なる果実における種子と種子以外の各部分への有機物の配分、種子の散布距離、実生の形態と成長を測定することにより、果実あたりに複数の種子を持つことにより、種子の生残と定着を通じて、どれだけ適応度が変化するかについての知見を得ることができる。果実あたりに複数の種子を持つことにより、種子の数と重量を変化させるだけでなく、種子の形態を変化させることによる、適応度の変化を評価しようとする試みはこれまでにほとんど報告がない。このことは、進化における種子の数と重量のトレードオフ関係に、形態という視点をあらたに持ち込むことになる。

また、今回の研究は、トチノキとは果実の形態が異なるが、総苞あたりの堅果数に変動するクリ（クリの場合は3個の雌花が刺のある総苞につつまれる）など、果樹の種子生産への有用な情報を与える。

また、虫媒による他殖で大きな種子を持ち、谷沿いを生育場所とするトチノキ個体群にとって、遺伝子選択と種子数の変動による適応度への影響を明らかにすることは、個体群の維持と管理を行なうために重要な役割を果たす。

## 2. 研究の目的

本研究は、トチノキにおいて果実あたりの種子数が異なる果実が、個体内および個体間でどの程度の変動を持って形成されるのかを測定し、さらに、その至近要因および究極要因について検討することを目的とした。以下では、果実あたりに複数の種子を含む場合を多胎とよび、その果実を多胎果実とよぶ。

種子を1個含む果実を単子果実とよぶ。多胎果実のうち、種子が2個、3個、4個の果実を、それぞれ、双子果実、三子果実、四子果実とよぶ。

果実あたりの種子数の変動を形成する要因のうち、至近要因として、花粉の制限、胚珠間の競争、資源の制約について検討した。つまり、花粉の量が制限されたことにより受精できた少数の胚珠だけが成熟したのか、胚珠間の競争において花粉親が同じで種子親との遺伝的近縁度の違いによる近交弱勢の強弱がなく種子の成熟に優劣が生じなかったのか、あるいは、種子親が使用できる資源に応じた間引きを行ったのか、を検討した。胚珠間の競争については、1個の果実内の6個の種子（胚珠）に花粉を供給した開花個体（花粉親とよぶ）の遺伝子型に注目して、種子を生産した個体（種子親とよぶ）と成熟した種子とその他の種子を含む6個の種子の花粉親との近縁度を比較することにより、種子親と花粉親と間の近交弱勢の強弱あるいは有無が、種子の成熟に影響した結果であるかどうかを検証することを試みた。

次に、果実あたりの種子数に変動が存在する究極要因として、果実あたりに複数の種子を持つことが、種子の生産・防衛・散布・生残・定着に影響するかから検討した。果実および種子への有機物の投資量とその比率、虫害の割合、落下後の散布距離、実生の形態と成長を多胎と単子で比較することにより評価を行なった。1個の果実のなかに複数の種子が成熟する場合に、1個の種子の大きさは1個の果実に1個の種子が成熟する場合に比べて、小さく軽くなるのか、あるいはその逆なのか、成熟種子数が異なる果実での、果皮・種子など果実を構成する各部分への有機物配分はどのように変化するのか、虫害や獣害の割合は変化するのか、含まれる種子数が異なることにより生じる種子の形態や重量の違いが、ネズミなどの小動物が散布する距離に影響するのかを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 調査地と調査個体および遺伝マーカー：京都府南丹市、京都大学芦生研究林のモンドリ谷 16ha とその周辺 110ha 内に生育するトチノキ、島根県松江市、島根大学構内に植栽されたトチノキを対象とした。遺伝子型解析と花粉親解析には、マイクロサテライトマーカー (Minami *et al.* 1998) を用いた。花粉親の数が少数に限られているトチノキとして、島根大学構内のトチノキを、広域な範囲で花粉親の遺伝子型が決定されているトチノキとして、京都大学芦生研究林のトチノキを調査対象とした。芦生研究林の上谷の上流 110ha には胸高直径 20cm 以上のトチノキ 294 個体が生育し、マイクロサテライトマーカー

6 遺伝子座による遺伝子型が決定されている (Isagi *et al.* 2007)。これまでの観察により芦生研究林ではトチノキは直径 20cm を越えるサイズから開花が始まる。島根大学構内では 29 個体が植栽されている。芦生研究林と同様にマイクロサテライトマーカー6 遺伝子座による遺伝子型が決定されている。2007 年に剪定が行なわれた個体では開花がなかったため、2007 年と 2008 年の開花個体は 4 個体だけであった。芦生研究林のモンドリ谷とその周辺では本研究以前にトチノキの調査が行なわれており、それらのデータも必要に応じて使用した。

(2) 開花調査： 複数の観察者により、双眼鏡を用いて樹冠を観察し、視野内の当年枝数に対する花序をつけている当年枝の割合を測定した。

(3) 個体ごとの多胎果実の割合とその年変動： 島根大学内の個体、および芦生研究林では過去にデータのあるモンドリ谷の 23 個体について、各個体の樹冠下で果実と果皮を採取して、個体ごとの多胎果実の割合をもとめた。3 個に分かれた果皮については、その形状から多胎果実の果皮かどうかを判断した。過去のデータでは種子の形状から多胎かどうかを判断した。

(4) 種子数が異なる果実間での、胚珠の発達、各部分への重量配分、花粉親の比較： 島根大学内および芦生研究林の個体の樹冠下から採取した果実について、3 室に 2 個ずつ入っている胚珠のうち、どの胚珠が大きくなったかを、種子と隔壁の位置関係を注意深く調べて判断した。果皮と種子の大きさと重量を測定したのち、種子の子葉の部分から DNA を抽出して、マイクロサテライトマーカーを用いて、それぞれの花粉親を推定した。成熟しなかった種子についても、実体顕微鏡下で胚珠を探索して、DNA の増幅と花粉親の決定を試みた。

(5) 果序間および果序内での多胎果実率、種子の花粉親、果実の各部分への配分の変動： 果序をつけた当年枝を、芦生と島根大学の数個体から採取して、葉の面積と重量、枝重量、果序軸重量等を測定したのち、それぞれの果実の種子数、果実の各部分への重量配分、種子の花粉親を測定した。

(6) 虫害を受けた種子の割合の比較： モンドリ谷の 10 個体の樹冠下で種子 6356 個の虫害と獣害を調べた結果を用いて多胎の影響を解析した。

(7) 落下後の二次散布の距離および発芽後の実生のサイズ： モンドリ谷の 2 個体の樹冠下で 794 個の種子の位置とサイズを測定した後、マーキングして放置し、翌年の春、実生を探索し、その種子の番号を確認して位置等とその後の成長と生残を測定した結果を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 個体ごとの多胎果実率とその年変動： 芦生モンドリ谷の、2007 年の個体ごとの多胎果実率は、測定果実数の少ない個体を除いた 19 個体で、平均 11.0%、標準偏差 8.1%、範囲は 2 から 31%であった。2006 年と 2008 年は全体の果実数が少なかった。1997 年と比較すると、測定種子数の少ない個体を除いた 15 個体で、平均 11.7%、標準偏差 8.6%、範囲 3 から 29%であり、これらの値とほぼ同じであった。1997 年と 2007 年のどちらの年も測定データのある 14 個体で比較すると、1997 年の平均 11.6%、標準偏差 8.9%、範囲 3 から 29%、2007 年の平均 9.7%、標準偏差 7.2%、範囲 2 から 27%であり、平均値は 2007 年のほうがやや小さかったが有意な差はなかった。これらの 14 個体の 1997 年と 2007 年の多胎果実率には、有意な正の相関 ( $r=0.762$ ,  $p<0.001$ ,  $n=14$ ) があり、1997 年に多胎果実率が高い個体は 2007 年も高く、1997 年に低い個体は 2007 年も低い傾向があった。また、双子の果実率が高い個体は三子と四子の果実率も有意に高かった ( $r=0.648$ ,  $p=0.017$ ,  $n=13$ )。しかし、これらの関係のばらつきは大きかった。

島根大学内における 2006 年の多胎果実率は、4 個体で平均 12.9%、標準偏差 18.3%、範囲は 0 から 40%であった。2007 年と 2008 年も結果した個体では、多胎果実率の関係は同じであった。

(2) 個体のサイズと着果数、果序の着果数： モンドリ谷の個体の多胎果実率と胸高直径と間には有意な相関はなかった。多胎果実率と着果数と関係を見ると、着果数が多いと多胎果実率はやや低い傾向があった。同じ個体内で果序あたりの着果数と多胎果実率の間にあきらかな関係は観察されなかった。

(3) 種子の花粉親： 成熟しなかった種子について、顕微鏡下で胚珠を探索して、DNA の増幅と花粉親の決定を試みたが、他殖であるという結果を得ることはなかった。成熟した種子について、多胎果実内の種子の花粉親を比較した。双子果実の 2 つの種子の花粉親の組み合わせは、自殖と自殖、自殖と他殖、他殖と他殖のすべての組み合わせがあった。三子果実でもすべての組み合わせがあった。また、他殖と他殖の組み合わせには、異なる個体が花粉親の場合もあった。芦生研究林と島根大学のどちらの個体から得られた果実でも同様であった。このことは、複数の胚珠がどちらも自殖のために、あるいは花粉親の遺伝子型が似ているために、胚珠間の優劣がつかずに多胎となったわけではないことを示している。成熟しなかった種子について、確実に花粉親を決定することはできなかったが、多胎果実は、種子親と花粉親と間の近

交弱勢の強弱あるいは有無によって、種子の成熟に優劣が生じなかった結果ではないことが示唆された。

また、個体ごとに自殖率にばらつきがあったが、個体内で単子と多胎の種子に自殖率にあきらかな違いはなく、単子と多胎で種子の花粉親の組成は似ていた。同じ個体内で花序あたりの自殖率と花粉親の組成にはばらつきがあった。どちらの場合も自殖率と多胎との間にはあきらかな関係はなかった。

(4) 種子重： 単子と多胎で種子1個の重さを比較すると、単子に比べての双子では種子1個の重さは小さくはならないが、三子以上ではやや小さくなる個体が多かった。個体レベルでみると、多胎果実率が高い個体の平均種子重は小さかった ( $r=0.718$ ,  $p=0.006$ ,  $n=13$ )。

多胎果実内の種子の重さのばらつきは果実間にくらべて非常に小さかった。双子果実に含まれる種子は、花粉親が同じ場合も異なる場合も同様に、種子間で重さの差が大きくなることはなかった。島根大学の個体間で比較すると、平均種子重に有意な差があった (Scheffe 検定,  $p<0.05$ ) が、同じ個体の中では花粉親によって種子重に差はなく、種子重に花粉親の遺伝子型は影響していないことが示された。

(5) 果皮と種子への配分： 果実ごとの種子と果皮の重量比を単子と多胎で比較すると、種子の合計重に対する果皮重の比は、単子よりも多胎のほうが有意に小さく (Scheffe 検定,  $p<0.05$ )、多胎果実のほうが種子への投資比率が大きく、種子重あたりの果皮のコストは低かった。

(6) 虫害および獣害： 虫害および獣害を受けた種子の割合を単子と多胎で比較した。虫害は落下前の蛾によるもの、獣害は落下後に哺乳類にかじられたものである。モンドリ谷の10個体の樹冠下で、単子、双子、三子の種子それぞれ、5504、776、76個を測定した結果、虫害を受けた種子は、705、116、15個、獣害を受けた種子は233、46、9個 (金子有子ら未発表) で、その割合は単子よりも多胎の果実のほうが有意に高く (カイ 2 乗検定,  $p<0.001$ )、多胎の果実は虫害や獣害を受けやすいことが示唆された。

(7) 落下後の二次散布の距離と発芽後の実生のサイズ： モンドリ谷の2個体の樹冠下で794個の種子の位置とサイズを測定した後、マーキングして放置し、翌年の春、実生を探索してその種子の番号を確認し位置等を測定した結果を用いて、単子と双子の種子で二次散布の距離を比較した結果、有意な差はなかった。しかし、種子の重量と移動距離の関係は有意 ( $r=0.403$ ,  $p=0.010$ ,  $n=40$ ) で、大きな種子のほうが遠くまで運ばれる傾向があるので、先に示した多胎果実率が高い個

体の平均種子重は小さいため、平均散布距離が短くなることが考えられる。マーキングした種子に由来する実生の樹高を単子と双子で比較すると、平均値±標準偏差は、それぞれ  $30.0 \pm 8.8$  cm、 $32.7 \pm 11.0$  cm で有意な差はなかった。種子の重量の平均値±標準偏差は、 $12.5 \pm 3.1$  g、 $12.7 \pm 3.4$  g で有意な差はなかった。

(8) 結論と展望： 芦生モンドリ谷と島根大学構内で観察された個体ごとの多胎果実率は0から40%の範囲にあり、その高低は異なる繁殖年でも同様の傾向があった。平均値はどちらも11から13%の範囲にあった。多胎果実率は個体サイズに依存せず、同一個体内の花序あたりでみた場合も、サイズとは明瞭な関係はなく、資源の多少が多胎の原因であることを示唆するものではなかった。多胎果実内の花粉親は異なる場合もあり、花粉親が同じであるために優劣がつかずに多胎となったのではないこと、単子と多胎の花粉親の組成は似ており、自殖率および花粉親の組成は多胎に影響していないことが示された。これらの結果は、花粉の制限が多胎の至近要因でないことも示唆していると考えられる。しかし、自殖と他殖も含めた遺伝子型の異なる花粉親をもつ胚珠の競争を許さず、それらの共存を可能にしているシステムが存在することを示唆しており、このシステムは花粉が制限された場合に自殖を保証するものとして機能するだろうと考えることができる。したがって、胚珠の競争ではなく共存についての新たな知見と意味を与えるものかもしれない。共存の機構として、受精のタイミングが同調しやすいなどの機構が考えられるので、多胎率の高い個体と低い個体について、受精時の花の解剖学的な比較を行うことにより何らかの知見が得られるだろう。

トチノキの果実は多胎になる場合も、種子1個の重量を小さくすることなく、また種子間で差が生じないように、複数の種子を成熟させる。このとき果皮は相似形的に厚くなるのではなく、相対的に薄くなるため、果実全体への有機物投資量に対する種子への投資率は向上する。しかし、落下前の虫害率は高くなり、発芽前の生残率は低くなると予想される。単子と多胎に係わりなく同じ重量の種子を生産する傾向は、ネズミなどによると思われる二次散布の距離は種子の重量に依存していること、トチノキの更新場所が下層植生の多い溪畔部に限定されていることなどに関係していると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Yuji Isagi, Daisuke Saito, Hideyuki Kawaguchi, Ryunosuke Tateno and Sonoko Watanabe, Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. Journal of Ecology, 95 卷, 983~990, 2007 年, 査読有 [学会発表] (計 4 件)

①川口英之, 名波哲, 館野隆之輔, 松木悠, 井鷲裕司, トチノキの果実あたり種子数の変動とその要因, 第 120 回日本森林学会大会, 2009 年 3 月, 京都大学, 京都市

②川口英之, 櫻澤如一, 名波哲, 松木悠, 井鷲裕司, トチノキ種子の花粉親の果実内および果実間での比較, 第 119 回日本森林学会大会, 2008 年 3 月, 東京農工大学, 府中市

③川口英之, 幸田怜子, 名波哲, 館野隆之輔, 井鷲裕司, 山地流域におけるトチノキの遺伝構造から推測される対立遺伝子の拡散過程, 第 55 回日本生態学会大会, 2008 年 3 月, 福岡国際会議場, 福岡市

④川口英之, 幸田怜子, 館野隆之輔, 名波哲, 井鷲裕司, トチノキの果実あたり種子数の変動, 第 54 回日本生態学会大会, 2007 年 3 月, 愛媛大学, 松山市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 英之 (KAWAGUCHI HIDEYUKI)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 40202030

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

井鷲 裕司 (ISAGI YUJI)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 50325130  
名波 哲 (NANAMI SATOSHI)  
大阪市立大学・大学院理学研究科・講師  
研究者番号: 70326247

### (4) 研究協力者

金子 有子 (KANRKO YUKO)  
滋賀県琵琶湖環境科学研究センター・総合解析部門・専門研究員  
研究者番号: 90280817  
館野 隆之輔 (TATENO RYUNOSUKE)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号: 60390712  
松木 悠 (MATSUKI YU)  
京都大学・大学院農学研究科・博士課程学生  
幸田 怜子 (KODA REIKO)  
島根大学・大学院生物資源科学研究科・修士課程学生  
櫻澤 如一 (SAKURAZAWA YUKIKAZU)  
島根大学・生物資源科学部・学部学生