

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07863

研究課題名(和文)ハイブリッドカラマツの雑種強勢に迫る-分子フェノロジーにおける雑種特性の解明-

研究課題名(英文)Hybrid vigor processes of *Larix gmelinii* x *L. kaempferi* revealed by molecular phenology

研究代表者

福田 陽子(後藤陽子)(Fukuda, Yoko)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員

研究者番号：00370825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グイマツ、カラマツおよびそのハイブリッドの葉(開葉・葉中クロロフィル量)におけるフェノロジーおよび形成層活動のフェノロジーの種間変異および種内変異を明らかにした。さらに針葉における遺伝子発現プロファイルのフェノロジーについても種間比較を行った結果、ハイブリッドカラマツでは両親種と比較して光合成期間、形成層活動期間がともに長いことが示唆された。このことがハイブリッドカラマツの成長における雑種強勢の一因と考えられる。葉および形成層活動のフェノロジーには種内変異も認められ、成長の優れたハイブリッドカラマツ品種の両親クロンは同一種内の他のクロンと比較して光合成期間が長かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ハイブリッドカラマツの光合成期間および形成層活動期間の長さが成長における雑種強勢の一因である可能性を示した。表現型の観測と同時に針葉における遺伝子発現プロファイルのフェノロジー解析を行うことにより、高い解像度でフェノロジーにおける種間変異を明らかにすることができたことも、学術的成果のひとつである。また、開葉・黄葉および形成層活動の再開および終了期には種内変異があることが明らかになったことから、フェノロジーにおける種内変異に着目することにより、より優れたハイブリッド品種を開発できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to reveal the biological process of the hybrid vigor by comparing leaf phenology and cambial activity among the three species, such as *L. kaempferi* (Lk), *L. gmelinii* var. *japonica* (Lg) and the hybrid larch (F1). The inter-specific difference in the seasonal change of gene expression profiles was also investigated. Both the leaf flushing and the rapid decrease of chlorophyll concentration in autumn were started with Lg, followed by F1 and then Lk. The gene expression profiles indicated that the photosynthetic function duration of F1 was longer than both Lg and Lk. In addition, our microscopic observation revealed that cambial activity of F1 continued still after early September, whereas that of Lk and Lg terminated until early September. These results indicate that the period of cambial activity and photosynthetic function of F1 is longer than other larch species, resulting in hybrid vigor in growth.

研究分野：林木育種、森林遺伝学

キーワード：カラマツ グイマツ グイマツ雑種F1 雑種強勢 フェノロジー RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

グイマツを母樹、カラマツを花粉親として生産されるハイブリッドカラマツは、成長、材質、野鼠害抵抗性に優れるものが多く、北海道では現在最も需要の高い樹種である。特に優れた家系では、両親種のどちらよりも優れた特性を示す雑種強勢が観察されており、雑種強勢を利用した優良品種のさらなる開発が期待されている。これまでに北海道育種基本区では、278 クロンのカラマツ精英樹*と 106 クロンのグイマツ精英樹が選抜されており、この中で雑種強勢が期待できる組み合わせを予測するためには、雑種強勢プロセスの解明が必要である。農作物の育種においては雑種強勢が広く利用されており、その雑種強勢プロセスについても、QTL解析や両親種とハイブリッドの網羅的な遺伝子発現解析による関連遺伝子の探索など、分子レベルでの解明が進められている。雑種強勢に関わる遺伝子が特定できれば、様々な組み合わせでの人工交配や材料育成、形質評価にかかる時間や労力、コストを削減できる。特に、形質評価に長い年月を要する樹木の育種においては、効率化は重要な課題である。

雑種強勢に関わる要因として、ハイブリッドカラマツは高緯度に自生するグイマツの特性を受け継ぎ、カラマツよりも低温環境下での光合成活性が高く⁽¹⁾、光合成活性が高い期間が長い⁽²⁾ことが指摘されている。ハイブリッドカラマツの材質特性として、早材および晩材の容積密度が高い⁽³⁾一方で晩材率が低い⁽⁴⁾ことが指摘されており、早材形成期間や晩材形成期間といった形成層活動におけるフェノロジーが両親種と異なる可能性がある。グイマツは早材を前年の光合成産物を使って形成し、晩材を当年の光合成産物により形成する⁽⁵⁾ことから、葉のフェノロジーや光合成特性の違いが、形成層活動のフェノロジーに影響を及ぼしている可能性もある。しかし、カラマツ、グイマツ、ハイブリッドカラマツにおける形成層活動フェノロジーの種間変異については未解明である。

*育種材料として利用するために人工林や天然林から選抜された成長や通直性に優れたクローン

2. 研究の目的

ハイブリッドカラマツの雑種強勢プロセスを解明するため、カラマツ、グイマツ、ハイブリッドカラマツの開葉、葉中クロロフィル量のフェノロジーを調査し、種間**および種内変異を明らかにする。同時に針葉における遺伝子発現プロファイルのフェノロジーについても種間比較を行い、分子レベルで雑種強勢プロセスを推定する。形成層活動フェノロジーにおけるカラマツ、グイマツ、ハイブリッドカラマツの種間および種内変異を明らかにし、肥大成長における雑種強勢プロセスを推定する。

**本報告書では表現の簡素化のため、ハイブリッドカラマツも 1 樹種として記述した。

3. 研究の方法

(1) 開葉および葉中クロロフィル量の調査

2017年4月中旬から5月3日の期間、約3日おきに北海道育種場内に植栽されているカラマツ6個体、グイマツ16個体、ハイブリッドカラマツ33個体を対象に開葉日を調査した。カプランマイヤー法によりそれぞれの樹種の未開葉個体率を推定し、その推移を比較した。葉中クロロフィル量(絶対重量あたりのクロロフィル量、クロロフィルaとクロロフィルbの総量)の調査は2017年から2019年までの3年間、開葉後の5月上旬から落葉する11月上旬までの期間約2週間おきに行なった。2017年は北海道育種場内に植栽されているハイブリッドカラマツ優良品種「北のバイオニア1号」2個体とその両親クローンであるカラマツ諏訪14号およびグイマツ留萌1号各1個体を測定した。黄葉開始前の9月上旬より、カラマツ2クローン、グイマツ3クローンを追加して葉中クロロフィル量を測定した。2018年および2019年は、カラマツ3クローン(諏訪14号、諏訪16号、網走29号(支))のそれぞれ1個体、グイマツ3クローン(留萌1号、留萌4号、幾寅1号)のそれぞれ1個体、「北のバイオニア1号」1個体を材料とした。葉中クロロフィル量の測定は1個体あたり3本の枝について行い、カルマンフィルタを用いた状態空間モデルにより時系列的变化の平滑化を行った上で採取日ごとの各個体の葉中クロロフィル量を推定した。

(2) 針葉の遺伝子発現解析

2018年5月上旬から10月上旬の期間、1ヶ月おきに諏訪14号、留萌1号、北のバイオニア1号の葉中クロロフィル量の測定に供した枝(各クローン3本ずつをreplicateとして供試)から針葉(短枝葉)を採取し、RNA-seq解析を行い、1サンプルあたり約4000万リードの塩基配列を取得した。取得したリードをカラマツの発現遺伝子リファレンス配列に対してマッピングし、各replicateについて遺伝子発現量(Transcripts per Million)を算出した。各採取日、各クローンの遺伝子ごとにTPMの平均値を求め、低発現および発現量の変動のない遺伝子を除いた12267遺伝子による遺伝子発現プロファイルを作成した。作成した遺伝子発現プロファイルについて主成分分析および階層的クラスタリングを行い、サンプル間の類似性を検討した。k=8とするk-meansクラスタリングにより発現パターンの類似した遺伝子群に分類し、シロイヌナズナのリファレンス配列に対するアノテーション情報に基づきそれぞれの遺伝子群についてGene Ontology(GO)エンリッチメント解析を行い、各遺伝子群に含まれる遺伝子に関わる生物学的プロセスを推定した。

(3) 形成層活動の観察

カラマツ、グイマツ、ハイブリッドカラマツの形成層活動期間を解明するために、2017-2018年の4月下旬から9月上旬まで、各樹種の成木の幹から、樹皮、形成層及び木部を含む試料を約2週間ごとに採取した。2017年は諏訪14号、留萌1号の1個体ずつと、北のパイオニア1号3個体、2018年はカラマツ3クローン(諏訪14号、諏訪16号、十勝43号)、グイマツ3クローン(留萌1号、中標津4号、川北4R)とハイブリッドカラマツ3個体について観察を行なった。採取した試料は、FAA固定液で固定したのち、アルコールシリーズで脱水後、樹脂包埋を行った。スライディングマイクロームを用いて、樹脂包埋試料から約8μm厚の木口面切片を作成し、約1%のサフランin溶液で染色したのち、永久プレパラートを作成、光学顕微鏡により形成層帯の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 開葉および葉中クロロフィル量の季節変化

開葉はグイマツで最も早く4/19に初めて観測され、4/24にはすべての個体が開葉した。最も遅かったのはカラマツで、5/1に一齐に開葉が確認された。ハイブリッドカラマツではグイマツおよびカラマツと比較して個体間のバラツキが大きかったが、多くの個体が4/27までに開葉していた。これらの結果から、カラマツはグイマツと比較して10日程度開葉が遅く、ハイブリッドカラマツはその中間程度でグイマツよりも6日程度遅いという傾向が認められた。調査対象個体は人工交配家系であり、ハイブリッドカラマツには母樹と花粉親の組み合わせが異なる6家系が含まれていた。この中には一齐に開葉が確認された家系とバラツキの大きい家系があり、開葉日には家系間変異も認められた。

葉中クロロフィル量の推移から、2017年、2018年、2019年のいずれの年においてもグイマツは10月上旬から中旬の間に急速に葉中クロロフィル量が減少して黄葉が確認され、カラマツでは10月下旬から11月上旬に葉中クロロフィル量が急減することが明らかになった(図-1)。ハイブリッドカラマツはその中間で10月中旬から下旬の間に葉中クロロフィル量が減少した(図-1)。この結果から、黄葉も開葉と同様にグイマツ、ハイブリッドカラマツ、カラマツの順に早く、それぞれ1週間程度の差があった。また、いずれの樹種においても7月上旬に最も葉中クロロフィル量のピークとなり、それ以降カラマツおよびハイブリッドカラマツでは9月上旬までほぼ変化しなかったが、グイマツでは緩やかに減少した。カラマツ、グイマツともに葉中クロロフィル量のフェノロジーにはクローン間変異があり、北のパイオニア1号の両親である諏訪14号と留萌1号は他のクローンと比較して葉中クロロフィルの減少が緩やかであった。この傾向は2017年、2019年にも共通して観察されたことから、葉のフェノロジーは遺伝的特性であると考えられ、両親クローンの光合成活動期間の長さが北のパイオニア1号の良好な成長の一因であると推察された。

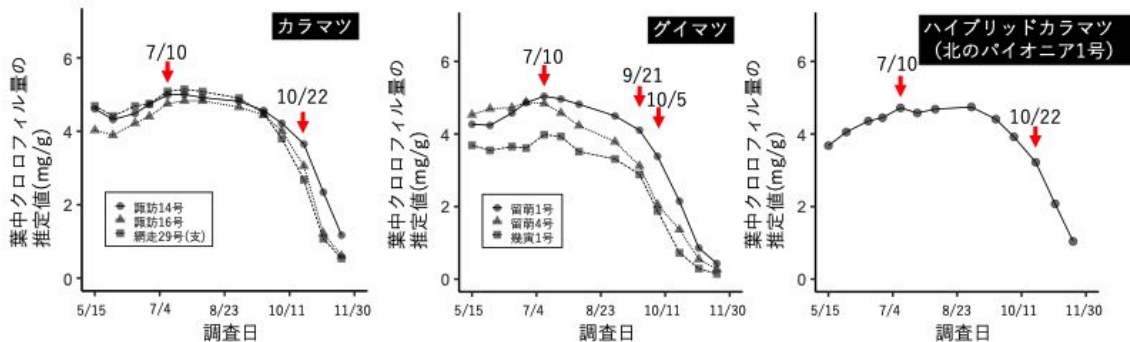


図-1. 2018年におけるカラマツ、グイマツ、ハイブリッドカラマツの葉中クロロフィル量の推移

(2) 針葉の遺伝子発現解析

各採取日の各クローンの遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果、第一主成分の寄与率は29.7%、第二主成分の寄与率は18.2%であり、第一主成分は主に季節変化を表現しており、第二主成分は主に種間変異を表現していると考えられた(図-2)。第一主成分の主成分得点から、いずれの樹種においても開葉から間もない5月の遺伝子発現プロファイルは6月以降の遺伝子発現プロファイルと大きく異なっており、6月以降は時系列的に変化していくことが示された。また、第二主成分の主成分得点の分布から、北のパイオニア

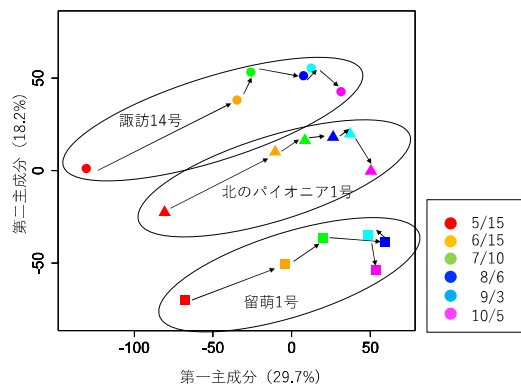


図-2. 遺伝子発現プロファイルの主成分分析の結果

1号は留萌1号と諏訪14号の中間的なフェノロジー特性を示すと考えられた。階層的クラスタリングの結果では、6月から9月の遺伝子発現プロファイルはクローンごとに低階層のクラスターを構成しており、この期間は採取日よりも樹種による変異が大きいと考えられたが、5月と10月は異なった傾向を示した(図-3)。北のパイオニア1号の遺伝子発現プロファイルは、5月には開葉の早い留萌1号に類似しており、10月には黄葉の遅い諏訪14号と類似していた。GO エンリッチメント解析では、低温への馴化や窒素輸送など葉の老化に関わる遺伝子群の発現量が留萌1号において諏訪14号、北のパイオニア1号に先行して上昇する傾向が示されており、ハイブリッドカラマツではカラマツおよびグイマツよりも光合成期間が長いことが雑種強勢の一因である可能性がある。

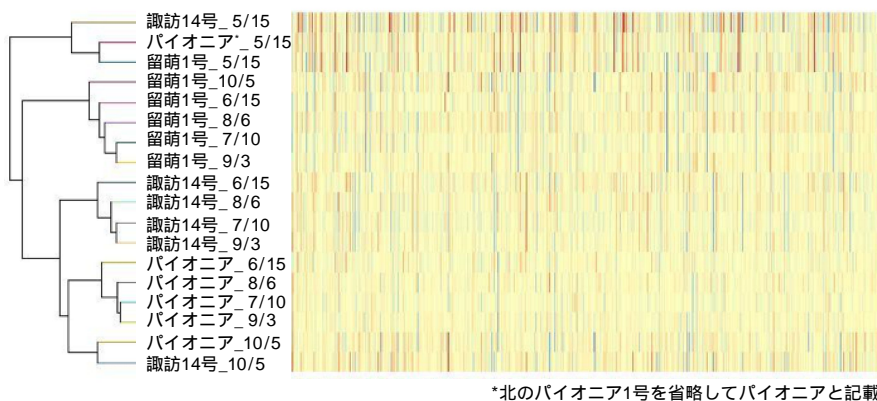


図-3. 遺伝子ごとの発現量のヒートマップと階層別クラスタリングの結果(1本ごとの線が1つの遺伝子を表し、赤が濃いほど発現量が高く、青が濃いほど発現量が低い)

(3) 形成層活動の観察

2017年は、5月中旬から9月上旬まで試料採取を行った。5月中旬には、3種ともに形成層と前年の木部の間に新しい細胞が観察され、形成層活動が再開していた。さらに晩材形成開始時期は、諏訪14号、留萌1号では6月下旬から7月上旬にかけて、北のパイオニア1号は7月上旬から下旬にかけてであった。諏訪14号と諏訪16号は9月上旬までには形成層活動を終了しており、北のパイオニア1号は9月上旬でも終了していなかった。

2017年の結果を踏まえて、2018年は4月下旬から9月上旬を試料採取期間とした。4月下旬では、全ての個体で形成層帯の師部側に新しい細胞が観察されたが、木部側では観察されなかった。一方、5月中旬には、形成層と前年の木部の間に新しい細胞が観察された(写真)。したがって、3樹種ともに、この間に形成層活動が再開したと考えられる。晩材形成開始時期は、カラマツでは7月中旬から下旬、グイマツは7月上旬から中旬、ハイブリッドカラマツは7月下旬から8月上旬の間であった。形成層活動終了時期は、2017年同様、カラマツとグイマツでは全ての個体で9月上旬までであり、ハイブリッドカラマツは9月上旬の時点でまだ形成層活動が終了していなかった(9月上旬に台風によりハイブリッドカラマツの観察個体がすべて風倒被害にあったため、観察が継続できなかった)。

2年間の観察結果から、形成層活動は3樹種とも5月上旬ごろに再開するが、終了時期は3樹種で異なっていた。中でもハイブリッドカラマツは終了時期が最も遅く、形成層活動期間が最も長かったことから、このことが良好な肥大成長の一因と考えられる。また、同樹種内で形成層活動期間にクローン間差があった。晩材形成は、グイマツ、カラマツ、ハイブリッドカラマツの順に開始し、ハイブリッドカラマツは晩材形成開始から形成層活動終了時期が長かった。2017年と2018年で晩材形成時期が異なるのは、気温の変化の違いによるものと考えられる。

(4) まとめ

開葉および葉中クロロフィル量のフェノロジーでは、ハイブリッドカラマツは開葉、黄葉ともにカラマツとグイマツの中間的な時期に観測された。一方針葉の遺伝子発現解析においては、6月から9月には葉中クロロフィル量と同様ハイブリッドカラマツはカラマツとグイマツの中間的なフェノロジーを示したが、開葉間もない5月上旬には開葉の早いグイマツに、黄葉直前である10月上旬には黄葉の遅い

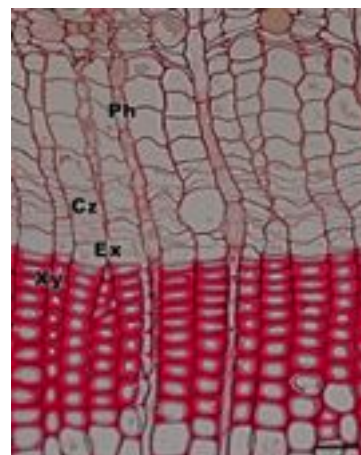


写真. カラマツの形成層帯の光学顕微鏡写真. 2018年5月16日採取. スケールバー=100 μm. Cz: 形成層帯, Ex: 拡大中の細胞, Ph: 師部, Xy: 木部.

カラマツにそれぞれ類似した遺伝子発現プロファイルを示した。この結果から、光合成期間がカラマツおよびグイマツよりも長いことがハイブリッドカラマツの雑種強勢の一因であることが示唆された。また、形成層活動の開始時期は3樹種ともほぼ同時期であったのに対し、晩材形成開始時期と晩材形成終了時期（形成層活動終了時期）が異なっていた。ハイブリッドカラマツでは、晩材形成開始時期と終了時期がいずれもカラマツおよびグイマツよりも遅かったことから、形成層活動期間が両親種よりも長いことが、良好な肥大成長の一因であることが示唆された。したがって、ハイブリッドカラマツではフェノロジーの異なる樹種間の交配により、季節応答が変化することが雑種強勢の一因であると考えられる。

フェノロジー特性には種間変異だけでなく種内変異も認められた。特に、成長に優れたハイブリッドカラマツ品種である北のパイオニア1号の両親であるカラマツの諏訪14号、グイマツの留萌1号は、他のクローンと比較して黄葉の開始が遅く、光合成期間が長いと考えられた。本研究では調査対象としたクローン数が少なかったため、より多数のクローンについて調査および人工交配試験を行う必要があるが、クローンの持つフェノロジー特性に着目することにより、優れたハイブリッドカラマツ品種を効率的に開発できる可能性がある。

<引用文献>

- 小池孝良、長坂寿俊、河野耕蔵、夏期におけるカラマツとグイマツの光合成、日林北支論、36号、1988、57-59
- 原山尚徳、大野康之、上村章ほか、カラマツ類ポット苗における光合成特性の季節変化、北方森林研究、61号、2013、51-58
- 市村康裕、来田和人、藤本高明ほか、グイマツ雑種F₁とカラマツ次代検定林の成長と材質の変異、北海道林試研報50号、2013、7-15
- 安久津久、期待の高まるグイマツF₁、林産試だより1月号、1995、2-6
- Kagawa A., Sugimoto A., Maximov TC, Seasonal course of translocation, storage and remobilization of ¹³C pulse labeled photoassimilate in naturally growing *Larix gmelinii* saplings, New Phytologist, 171, 2006, 793-804

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 福田陽子、花岡 創	4. 巻 67
2. 論文標題 カラマツ、グイマツ、グイマツ雑種F1における葉フェノロジーの比較	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 北方森林研究	6. 最初と最後の頁 23, 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田陽子、花岡 創
2. 発表標題 カラマツ、グイマツ、グイマツ雑種F1における葉フェノロジーの比較
3. 学会等名 北方森林学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	渡邊 陽子 (Watanabe Yoko) (30532452)	北海道大学・農学研究院・研究員 (10101)	
連 携 研 究 者	三嶋 賢太郎 (Mishima Kentaro) (30438098)	国立研究開発法人森林総合研究所・林木育種センター・基盤 技術研究室長 (82105)	