

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21580179

研究課題名（和文）ブナ科の堅果生産における自殖回避メカニズムの解明とその生態学的意義の検討

研究課題名（英文）Investigations on the mechanism for avoidance of selfing and its ecological meaning in nut production of Fagaceae

研究代表者 向井 譲 (MUKAI YUZURU)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80283349

研究成果の概要（和文）：

コナラを用いて人工交雑（無受粉、自家受粉、他家受粉）をおこない、雌花・堅果の生存率と発育状況を観察した。交配様式にかかわらず受粉後50-60日の間に堅果内の1個の胚珠が成長しはじめ、残りの胚珠は成長停止した。他家受粉では胚珠の成長が続き、残りの胚珠は完全に退化した。交配様式による堅果サイズの違いは受粉後90日までは小さい。以降、他家受粉堅果が急成長し、無受粉や自家受粉堅果のほとんど全てが落果した。以上から、堅果の中絶は母樹が先導し、選択された胚珠が他家授精し、健全胚を形成することで完了し、接合子間競争を回避し、適応度を高める意義がある。さらに、DNA多型マーカーを用いた胚や胚珠の遺伝子診断により、複数の胚珠が受精できること、花粉親間の競争が存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Artificial pollination with different mating patterns (outcross, self-, and non-pollination) was performed for *Quercus serrate*. The timing of abortion and the size and internal development of acorns from each mating type were investigated. Independently of pollination treatment, size of the one ovule began to increase and developments of remaining ovules were arrested at the period around 50-60 days after pollination (DAP). In the outcross acorns, further development of the ovule and remaining five ovules degenerated. Acorns were slowly developed and similarly dropped in every pollination treatment until 90 DAP. Almost all self- and non-pollinated acorns were rapidly aborted during the period 90-120 DAP. The results indicated that ovule abortion began at maternal initiative and completed in fertilization of the selected ovule with suitable pollen. The correspondence between the timing of abortion and the timing of rapid size growth and the development of storage organs suggests that this acorn-maintenance strategy may be the consequence of a maternal adaptation that allows better reproductive success under resource limitation.

Paternity analysis of seeds obtained from controlled pollination showed the presence of conspecific competition and/or selection from pollination to maturation. Furthermore, the similar analysis for isolate the ovules from the premature acorns also showed that multiple ovules were fertilized and difference of in the contribution on fertilization, and identify that intra-specific interactions was possibly occurred in the pre-fertilization stage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：森林遺伝学

科研費の分科・細目：森林圏科学・森林科学

キーワード：ブナ科、自家不和合性、配偶子競争、資源制約、繁殖適応度、人工交配

1. 研究開始当初の背景

ブナ科では自殖による充実堅果がほとんどできないため、自家不和合性や近交弱勢などの自殖回避メカニズムが存在すると指摘されてきた。自殖回避メカニズムは、個体群の遺伝的多様性を維持する役割を担っていることに加え、ブナ科に広く見られる豊凶現象にも影響を及ぼすため、個体群の繁殖適応度の維持においても重要な役割を担っていると考えられる（向井 2008）。

ヨーロッパブナ(Nielsen and DeMuckadeli 1954)、ブナ（寺沢・柳井 1990）、コナラ属(Ducouso et al 1993)などブナ科の多くの種が自家不和合であると記載されている。自殖できない原因には、自家花粉で受精できないことと自家花粉によって受精した受精卵（接合子）が堅果の発育過程で死亡すること（母樹による中絶を含む）の2通りが考えられる。また、ブナ科は配偶体型自家不和合性を示すとされている（Pandey 1960）が、この報告では花粉核の状態と自家不和合性のタイプとの関連性から推定したものであるため、その根拠はかなり曖昧である。

自家不和合性と近交弱勢とはメカニズムが根本的に異なる。自家不和合性が少数の遺伝子座によって決定されるのに対し、近交弱勢に関与する遺伝子座は大変多いと考えられる（向井 2008, 業績）。自家不和合性や近交弱勢は個体群の繁殖適応度を左右する重要な現象であるため、その違いを解明することは個体群の維持管理を考える上では大変重要である。また、配偶子段階で排除が起こるのか接合子発育過程で排除が起こるのかによって繁殖コストにも大きな違いが生じる。このため、自殖回避の繁殖生態学的意義を考察することはブナ科の森林管理上で大変重要である。

2. 研究の目的

自殖回避の遺伝的メカニズムの解明：人工交雑を行い、堅果発育過程を解剖学的に観察することに加えて、DNA 多型マーカーを利用した受精卵診断を行い、自殖回避が受精前に起こるのか受精後に起こるのかを明らかに

する。また、胚珠の中絶時期について、顕微鏡観察や遺伝子発現解析により胚珠の中絶時期を確定し、その要因を解明する。

ii) 自殖回避の生態学的意義の検討：中絶が受精前に起こる場合と受精後に起こる場合のコストの違いを考察し、自殖回避の繁殖生態学的意義を検討する。

3. 研究の方法

(1) 人工交配：コナラ及びブナ対象として人工交雑をおこなった。人工交雑では、交配袋内の雄花を全て除去し、雌花の柱頭が枯れ受粉能力がなくなったと判断できる時期まで交配袋をかけたままにする無受粉処理、自家花粉を受粉させる自家受粉処理、他家花粉（2~4 個体の花粉を単独あるいは等量ずつ混合）を受粉させる他家受粉処理をおこなった。

(2) 雌花及び堅果の発達と生存率：人工交配後、柱頭が褐変し花粉を受け付けることができなくなったと判断された時期に交配袋をナイロン製の網袋に交換した。この時、袋内の雌花の数を記録し、ほぼ2週間おきに袋内の雌花の数を数え、生存率を調査した。また、8種間目までは2週間ごとに、8週間以降は堅果成熟時(10月)に雌花-堅果を採集し（自然受粉した堅果を含む）、ノギスで直径と高さを測定するとともに採集した雌花-堅果を FAA（5%ホルムアルデヒド：5%酢酸：45%エタノール）で固定・保存した。FAAに固定・保存した雌花・堅果をアルコールシリーズで脱水及びブタノール置換し、パラフィン（融点 56~62°C）に包埋後、ミクロトームを用いて連続切片を作成し、サフラニン-ファーストグリーンによる二重染色をおこない、光学顕微鏡(ESclipse E600, Nikon)で観察した（なお、申請書に記載したようにコナラについては2000年に静岡大学構内でおこなった人工交配で得た雌花及び堅果、2006年岐阜県百年公園でおこなった人工交配で得た堅果（FAAに保存）も解析に加えた）。

コナラの樹冠下にシードトラップ（開口部面積 0.35m²）を10個設置し、毎月1回シードトラップに入った堅果を回収し、未熟、成熟

の区別をおこなって、乾燥重量を測定した。

(3) 花粉管伸長：FAA で固定・保存した雌花を、1 規定 NaOH で軟化させ、脱色アニリンブルーで染色した後、蛍光顕微鏡 (Eclipse E600+CHGFI, Nikon) で観察し、花粉管の伸長状況を観察した。

(4) 遺伝子診断：人工交配後 60 日経過した雌花 (受精直後) を 70 個採集した。実体顕微鏡下で雌花を解剖し、存在する 6 個の胚珠全てを取り出し、Extract-N-Amp™ Plant PCR Kits (SIGMA) 中でチップの先端を用いて押しつぶして DNA を抽出し、母樹及び花粉親間で多型を示す SSR マーカー 3 座 (ssrQpZAG15, ssrQpZAG119, ssrQrZAG5, Barreneche et al. 1998,) を用いて増幅させ、DNA シーケンサー (Model 4200-1G, Li-cor Bioscience) を用いて遺伝子型を決定した。決定した胚珠の遺伝子型と花粉親及び母樹の遺伝子型を比較し、混合した花粉親由来の対立遺伝子を特定することによって、受精した胚珠の数、受精に寄与した花粉親の特定をおこなった。

4. 研究成果

(1) 受粉後の堅果のサイズ変化と生存率

採取した堅果の直径および高さを測定した結果、受粉後 60 日目までは交配様式にかかわらず堅果は比較的ゆっくり成長した。無受粉および自家受粉処理の堅果は、受粉後 60 日頃から成長を停止し、90 日目までは母樹に維持されていたが 90 日以降 120 日目までに

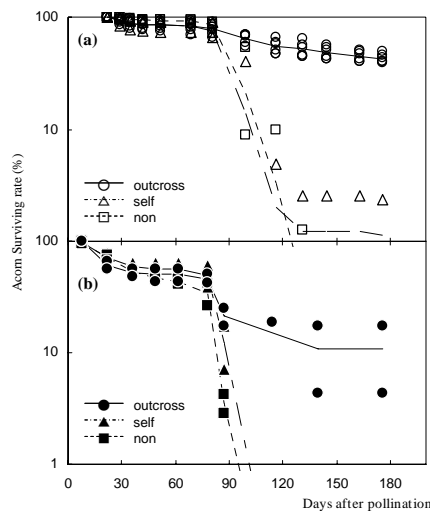


図-1 交配様式別の堅果の生存率の変化
他家受粉(●)、自家受粉(▲)、無受粉(■)
縦軸堅果生存率(対数目盛) 横軸(受粉後の日数)
調査地：静岡(a)、岐阜(b)

全て落下した。一方、他家受粉処理の堅果は、

無受粉および自家受粉の結果が落下する 90 日目までは比較的ゆっくり成長したが、90 日目以降急速に成長し始めた。無受粉および自家受粉の堅果が落下し始める時期は、他家(自然)受粉堅果が急速に成長し始める時期と一致していた(図-1, 図-2)。

受粉後 90 日目までは堅果の成長が遅いため、この間、健全な堅果に発達する見込みのない無受粉や自家受粉堅果の維持コストは低いと考えられる。

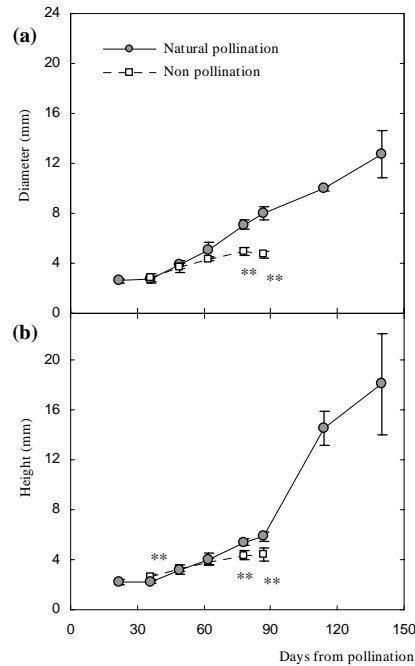


図-2 自然受粉(●)及び無受粉(○)における堅果成長過程
横軸は受粉後の日数、縦軸は堅果の直径(a)及び高さ(b)を示す。

(2) 堅果内部の構造変化

受粉前に採集した雌花より6個の胚珠を取り出し、実体顕微鏡で観察した。胚珠の大きさには変異がみられなかったが、6個中5個の胚珠の内部が変色し始めている様子が観察された(図-3)。

受粉7週間後頃の堅果を切断し、内部の胚珠の発達を観察したところ、堅果内部に存在する6個の胚珠の大きさはほとんど違いがなかった。堅果の大きさは受粉後90日目より急速に増大するが、堅果内部では受粉後60日目までに1個の胚珠が大きくなり始め、残り5個は成長を停止する様子が観察された。受粉後60日目には、残り5個の胚珠は完全に退化・褐変

し、成長し始めた1個の胚珠が堅果内の大部分を占有し始めていた。無受粉および自家受粉処理においても堅果中に存在する全6個の胚珠うち1個が他の5個よりも大きく成長し始める現象が観察されたが、成長停止する胚珠との大きさの違いは小さかった。6個中5個の胚珠の内部が変色し始めていることを併せて考察すると、受粉前の胚珠の変色は胚珠の中絶の前兆である可能性がある。このことから、コナラにおける堅果内の胚珠の中絶は、受精の有無や受精卵の遺伝子型とは無関係に起こり、母樹が先導して胚珠への資源供給をコントロールする役割を果たしていると推察される。

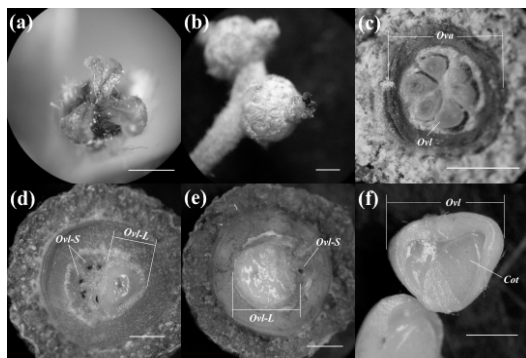


図-3 受粉後の日数経過にともなう堅果の発達 (a)受粉直後の柱頭、(b)受粉後 22 日の雌花、(c)受粉後 49 日の堅果内部 (横断面)、(d)受粉後 62 日の堅果、(e)受粉後 78 日の堅果、(f)受粉後 87 日の堅果内の子葉写真に写っている線の長さは 1mm

(3) 受精する胚珠の数と胚珠の中絶時期

SSR マーカーを用いて受粉後 60 日目 (受精直後) の堅果の遺伝子型を解析した結果、同一堅果内の複数 (最大 6 個) の胚珠で花粉親由来の対立遺伝子を検出した。花柱基部に達した受精前の花粉管に含まれる花粉由来の対立遺伝子を検出している可能性は否定できないが、コナラでは複数の胚珠が受精する可能性がある。

イヌブナでも堅果内の 1 個の胚珠のみが受精し、成長することが報告されているが、退化・中絶される胚珠へも多数の花粉管が伸長していることが記載されている (Sogo and Tobe 2006)。コルクガシ (*Q. suber*) でも複数の胚珠が受精することが報告されている (Boavida et al., 2001)。

なお、コナラでは柱頭に存在する毛が自家蛍光を発し、花粉管と区別できなかつたため、花粉管の伸長距離を計測することはできな

かつた。コナラと同様に自家不和合を示すサクラを用いて花柱内における花粉管の到達位置の計測法を検討した。サクラでは自家花粉で受粉させた場合、花柱の中央部付近で花粉管の伸長が停止すること、和合 (他家) 花粉で受粉させた場合は花柱基部の子房まで花粉管が到達することを確認し、和合-不和合の判定が花粉管の観察によって可能であることを明らかにした。コナラと同様にサクラにおいても花粉管の伸長距離を計測することはきわめて困難であるが、花粉管の到達

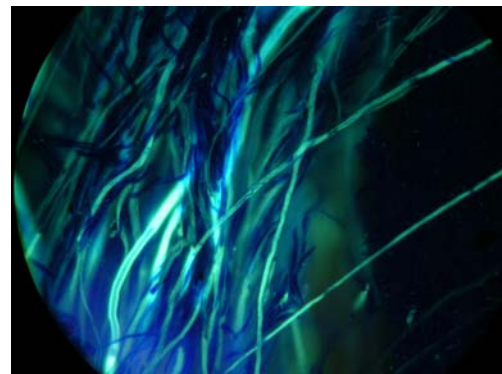


図-4 ソメイヨシノの柱頭における花粉管の伸長 アニリンブルーで染色された花粉管が青白く輝く、蛍光顕微鏡下で観察

位置を、柱頭、花柱中部、花柱基部の 3 段階に分類して観測することにより花粉管伸長の差を表示できることが明らかになった (鶴田ら 2012)。

(4) 他家受粉における花粉親間の競争

他家受粉処理で得た堅果および受粉直後の胚珠を用いて、SSR マーカーにより遺伝子型を決定し、受粉に用いた花粉親の貢献度の違いを調べた。その結果、堅果成熟段階で自家受精した堅果は全く存在せず、強い自殖回

表-1 他家受粉における花粉親間の競争

試料	花粉親	同定数	観察	期待
			貢献度 (%)	貢献度 (%)
実生 (N=86)	P19 (自家)	0	0	-
	P20	4	4.7	25.0
	P50	14	16.3	25.0
	P63	44	51.2	25.0
	P87	24	27.9	25.0
胚珠 (N=50)	P19 (自家)	-	-	-
	P20	3	6.0	33.3
	P63	37	74.0	33.3
	P87	10	20.0	33.3

避機構が存在することが確認された。また、他家受粉において、個別に受粉させた場合の成熟堅果獲得率（成熟堅果／雌花）では、花粉親間に差がみられなかった。しかし、4 個体の花粉を等量ずつ混合して受粉させた場合には、花粉親間で貢献度に大きな違いがあった（ $\chi^2=40.70$, $df=3$, $P<0.001$ 、表-1）。以上の結果は、接合子間の競争ではなく配偶子間の競争が存在することを示唆している。

受精直後の胚珠においても、受精した胚珠の割合において3 個体の花粉親間で顕著な違いが認められ（ $\chi^2=38.67$, $df=2$, $P<0.001$ 、表-1）、胚発生のごく初期における配偶子間の競争が存在することを完全に否定できないが、花粉親間の競争は主として配偶子段階（受精前）に生じることを示唆している。

（5）堅果中絶の生態学的意義

雌花から堅果への発達段階と雌花、堅果の落下時期との関連性を解析した結果、受精前の受粉直後に落下する。その後、交配様式にかかわらず受粉後 90 日程度まで堅果が維持される。自家受粉や無受粉の堅果は受粉後 80 日～120 日の間に全て落下する。

将来健全な堅果に発達する見込みのない無受粉や自家受粉（無受精）堅果を維持していることが明らかになった。他家受粉の堅果では受粉後 60 日まではサイズの増加速度が遅い、60 日以降に急速にサイズが増加する。DNA 分析の結果からこの時期の胚珠は受精が完了していると思われること、6 個の胚珠の内 1 個が受精前から他の 5 個よりも大きくなり始めていたが、その差が顕著になるのはこの時期からである。以上の結果を併せて考察すると、受精が完了するまでに多数の堅果を維持するコストはかなり低いため、将来健全な堅果に発達する見込みのない無受粉や自家受粉堅果を維持することの損失は少ないと思われる。

複数の受精卵が同時に発育した場合、胚致死遺伝子など強い近交弱勢が存在しない限り堅果内での胚珠（接合子）間の競争は堅果成熟まで継続する可能性がある。このような状況では、母樹は胚への養分供給をコントロールできないことに加え、成熟胚にとっても母樹から供給される貯蔵養分が限定されることになる。ブナ科のように遷移後期に出現する樹種では林内の暗い環境でも発芽・成立できるよう、大型の種子を形成する。

このため、母樹の先導により胚珠の中絶が始まり、中絶されないよう予定されている胚珠が有効な他家花粉で受精し、発育することは、母樹と胚の間および胚間の資源の供給と獲得を巡る無駄な競争を回避し、繁殖適応度を維持する意義があると考えられる。

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 2 件）

1. 鶴田燃海、王成、向井 譲 (2012) ソメイヨシノの自家不和合性およびサクラ野生種との交雑親和性に違いが生じる時期. 園芸学研究 11, 321-325 (査読有り)

2. Tsuruta, M., Kato, S., Mukai, Y. (2011) Timing of premature acorn abortion in *Quercus serrata* Thunb. is related to mating pattern, fruit size, and internal fruit development. Journal of Forest Research 16:492-499. (査読有り)

〔学会発表〕（計 1 件）

1. 鶴田燃海・王 成・向井 譲. ソメイヨシノの自家不和合性およびサクラ属野生種との交雑親和性. 第 123 回日本森林学会大会. 2012 年 3 月 27 日、宇都宮大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~ymuka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 譲 (MUKAI YUZURU)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：80283349

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：