

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450190

研究課題名(和文) スギ、ヒノキ人工林由来の花粉による繁殖干渉 - 近縁種への潜在的影響と発生要因 -

研究課題名(英文) Reproductive interference of *Chamaecyparis pisifera* by the heterospecific pollens from artificial plantation of *Cryptomeria japonica* and *Chamaecyparis obtusa*

研究代表者

向井 讓 (MUKAI, Yuzuru)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：80283349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：スギやヒノキの人工林由来の花粉によるサワラへの繁殖干渉を解明するため、スギ、ヒノキ、サワラの3種間の生殖隔離と空中花粉の種組成を調査した。珠孔液の引き込みと受粉後の花粉管の挙動を観察した結果、3種間には受粉時の生殖隔離なく、受粉後に生殖隔離が機能することが明らかになった。空中花粉の種組成を調査するため、葉緑体DNAによる種識別マーカーと花粉1粒を用いた種判別法を開発した。サワラ個体周辺から採集した空中花粉から顕微鏡でヒノキ科花粉を単離し、開発したマーカーを用いて種判別を行った結果、90%がヒノキの花粉であった。以上の結果、大量に混入する近縁種花粉によるサワラへの繁殖干渉の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To verify reproductive interference in *Chamaecyparis pisifera* by heterospecific pollens from artificial stands of *Cryptomeria japonica* and *Ch. obtusa*, reproductive isolation among the three Cupressaceae species and species composition of airborne pollens were investigated.

The results from the withdrawal of pollination drop and post pollination behavior of the heterospecific pollen tubes in the ovules suggest that reproductive isolation among the three species did not function at the pollination stage but in the post-pollination stage. To evaluate species composition of airborne pollen, chloroplast DNA based genetic markers and single-pollen genotyping method was developed. Cupressaceae pollens were isolated by microscope and genotyped with the markers. The 90% of the Cupressaceae pollen was identified as *Ch. obtusa*. These results suggest that *Ch. pisifera* might suffer reproductive interference due to the heavier contamination of heterospecific pollens from related species.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：繁殖干渉 空中花粉 生殖隔離 ヒノキ科 サワラ 種判別

1. 研究開始当初の背景

種間の生殖隔離には、有性生殖の過程で機能する生理的な生殖隔離に加えて、異種個体との空間的棲み分けや開花時期のずれなど生態的要因による生殖隔離が存在する。自然環境下では、生理的な生殖隔離と生態的な生殖隔離とがともに機能して種の繁殖適応度を維持していると考えられる。

ヒノキ科の雌花は成熟して受粉の準備が整うと、胚珠先端から珠孔液が分泌される。珠孔液に飛来した花粉が付着すると、珠孔液とともに花粉が珠孔の内部へ取り込まれ、受粉が完了する。一度受粉すると、珠孔液は再分泌されない(向井・横山 1985)。また、受粉後、珠孔内側の細胞が肥大生長し、珠孔が閉鎖する(横山 1975, 高相 1997, Veit and Armin 2014)。飛来する花粉が別種の花粉であっても珠孔液による取り込みが起こることが、ヒノキ科様々な種で報告されている(向井・横山 1985, Mugnaini et al. 2007, Veit and Armin 2014)。このため、ヒノキ科には受粉時の生殖隔離は存在しないことが予想される。

ヒノキとサワラの人工的な種間交配では、種間雑種は可能であるが、種間交雑種子の稔性は種内交雑種子よりもかなり低いと記載している。申請者らの調査でも、サワラ×ヒノキの交配種子の充実率はわずか 0.5%であった。このため、ヒノキ科における生理的な生殖隔離は受粉後に機能すると推定される。

ヒノキ科ヒノキ属に属するヒノキとサワラとは、水平分布の範囲は重複するが、地形的な要因による棲み分けがある。また、正確な記載はないが、サワラの開花時期はヒノキより 1 週間程度早いと言われている。このような、空間的、時間的な隔離が機能するため、上述したように受粉時の生殖隔離が存在しなくても両種の繁殖適応度は安定的に維持されていたと考えられる。

戦後の拡大造林政策によってスギ、ヒノキ

の造林面積は顕著に増加し、国土の 20%にも達する。さらに、その多くが着花年齢に達し、毎年大量の花粉を放出している。人工林から放出される大量の花粉は、人間に対して花粉アレルギーを引き起こすだけでなく、天然林の遺伝子組成への影響(遺伝的攪乱)が懸念されている。

加えて、風媒花粉の散布距離はきわめて長いいため、大面積植栽、生育適地(棲み分け)を配慮しない植栽などの人為的要因によって、距離や開花時期など生態的な要因による生殖隔離機構の効力が低下する。これにより、サワラなど人工造林の対象となっていないヒノキ科の樹種では、大量に飛来する人工林由来の花粉を受粉する機会が増加し、繁殖適応度が低下(繁殖干渉)することが懸念される。

2. 研究の目的

当該研究では、スギ、ヒノキ人工林由来の花粉による近縁種への繁殖干渉を明らかにするため、過去にほとんど人工造林されていないサワラ(*Chamaecyparis pisifera*)を対象として、ヒノキ及びスギの花粉を用いた人工交配により、受粉後の生殖隔離の詳細を明らかにし、繁殖干渉の潜在的な可能性を解明することを研究目的 1 とした。

次に、サワラの雌花周辺に飛来する花粉(空中花粉)の種組成を調査することによって、サワラに対してヒノキやスギの花粉による繁殖干渉が実際に起きているのかを明らかにすることを研究目的 2 とした。このために、ヒノキ科樹種の判別が可能な遺伝子マーカーの開発と、このマーカーを用いたヒノキ科花粉 1 粒からの DNA 分析による種判別方法を確立する。また、この方法を用いてサワラ雌花周辺に飛来した花粉数とヒノキ科花粉の種組成を調査する。

3. 研究の方法

- 1) サワラとヒノキの開花時期の重複
サワラとヒノキの開花期間を明らかにす

るために、2013年4月16日～5月26日の間、岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター位山演習林(N35°59'～36°02', E137°12'～137°14';以下位山演習林と記載する)の2箇所標高1,090m～1,130mおよび標高860m～990m)でそれぞれ3個体を選び、ルーペを用いて珠孔液の分泌状況を観察した。また、雄花を棒でたたいて花粉の飛散を調査した。

雌花が着生しているサワラの枝を切り取り、研究室に持ち帰り、水差して珠孔が観察できるようにデジタルカメラを設置した。珠孔液の分泌が確認できた胚珠に、花粉銃(林木育種協会)を用いて、サワラ、ヒノキ及びスギの花粉を噴霧した。撮影距離1cmのマクロ撮影に撮影条件を設定し、インターバル撮影(10秒間隔)により、珠孔液が取り込まれる様子を記録した。

2. サワラとヒノキ、スギとの生殖隔離

サワラおよびヒノキを母樹として、サワラ、ヒノキおよびスギ花粉を用いて同種他家交配、種間交配(同属、属間(以下、同属種間交配、属間交配))をおこなった。そして授粉後、2週、6週、11週および15週の雌花・球果を採取し、組織標本を作成した。作成した組織標本を光学顕微鏡で観察した。

3. 空中花粉の種組成

1) 花粉1粒からの種判別法の開発

(1) 種判別マーカーの開発

葉緑体DNAの *trnL* Intron、*trnL-trnF* Intergenic spacer(IGS)、*trnF* Intron、*matK* Intron、リボソームDNAの18S-5.8S Internal transcribed spacer(ITS)の遺伝子領域において、日本産のヒノキ科及びその園芸品種7種(サワラ、ヒノキ、イブキ(*Juniperus chinensis*)、ネズミサシ(*J. rigida*)、コノテガシワ(*Platyclusus orientalis*)、アスナロ(*Thujopsis dolabrata*)およびスギ)の塩基配列データをDNAデータベース(NCBI)から取得し。取得した塩

基配列データをMEGA ver.5(Tamura et al. 2011)を用いて整列させ、種間で塩基配列の長さが異なる領域を探索した。解析ソフトPrimer3(Rozen and Skaletsky 2000)を用いて目的の領域を増幅するプライマーを設計した。

(2) 花粉1粒を用いた種判別法の開発

陶山(2012)の方法を参考にして、1粒ずつ単離したサワラ、ヒノキおよびスギの花粉を用いて、マイクロピペットのチップを用いた物理的粉碎の有無、プロテアーゼ処理の有無、*Taq* ポリメラーゼの製品の種類などの複数の要因を組み合わせて最も効率のよい花粉1粒からの種判別法を検討した。

(3) サワラ雌花の周辺に飛来した花粉の種組成

サワラの珠孔液の分泌が観察された2014年5月1日から2014年5月13日の期間に空中花粉の採取をおこなった。サワラ雌花と同程度の大きさのプラスチック球(直径 5.94 ± 0.02 mm)の表面にワセリンを塗り、雌花の近傍に設置し、毎日花粉トラップを回収することで一日間の空中花粉の採取をおこなった(図-4-2)。回収した花粉トラップのうちの1個を空中花粉数の調査に用い、残りの1個を空中花粉の組成の調査に用いた。

回収した花粉トラップをマイクロチューブに入れ、ヘキサンをを用いてワセリンを除去し、花粉を回収した。回収した花粉を滅菌水中に攪拌し、光学顕微鏡を用いて花粉粒数を計数した。また、実体顕微鏡を用いてヒノキ科の花粉を選別し、選別した花粉を1粒ずつマイクロチューブに単離し、DNA抽出を行い、開発したマーカーによる種判別を行った。

4. 研究成果

1. 開花時期の重複と受粉時の生殖隔離

1) サワラ及びヒノキの花粉飛散時期及び珠孔液分期間

サワラ及びヒノキの花粉飛散時期及び珠孔液分泌期間を図-2 に示す。サワラの花粉飛散時期はヒノキよりも7日~10日程度早く、標高が高いほど両種の差は小さかった。以上の結果から、従来から言われていたようにサワラの開花開始日はヒノキよりも1週間程度早いこと、サワラの珠孔液分泌期間中にヒノキの花粉飛散が始まるため、サワラの雌花がヒノキの花粉を受粉するチャンスは十分にあることが確認できた(図-1)。

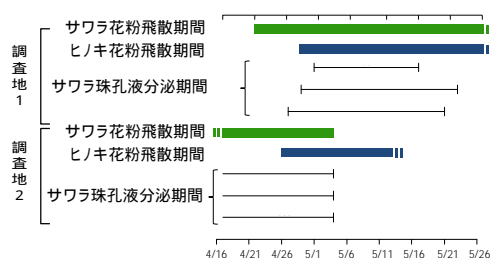


図-1 サワラ及びヒノキの開花時期

2) サワラにおける珠孔液による他種花粉の取込

サワラ、ヒノキ、スギの3種いずれの花粉で受粉させても、5分以内で珠孔液は完全に吸い込まれ、再度分泌されないことが観察され、向井・横山(1985)がスギの珠孔液について観察した結果がサワラでも確認できた。

2. サワラとヒノキ、スギとの生殖隔離

サワラを胚珠親とした同種他家交配では、授粉後2週目にはほとんどの雄性配偶体が珠心内へと侵入していた(図-2: A)。授粉後6週目には、雄性配偶体は珠心、頸細胞を通り抜け、造卵器へと達していた(図-2: D)。授粉後11週目には、胚が後期胚まで発達しており(図-2: G)、授粉後15週目になると、胚が成熟胚にまで発達していた(図-2: J)。

同属種間交配では、授粉後2週目までの雄性配偶体の発達の様子は同種交配の雄性配偶体の発達と同程度であったが(図-2: B)、授粉後6週目では、多数の雄性配偶体は頸細胞の上方に留まっており、造卵器に到達した

雄性配偶体はごくわずかであった(図-2: E)。授粉後11週目および15週目では、胚珠内に胚は全く観察されず胚珠組織が崩壊していた(図-2: H)。

一方属間交配では、雄性配偶体は珠心の外層に留り、珠心内部に侵入していなかった(図-2: 3: C)。授粉後6週目でも珠心内部への侵入は観察されず、雄性配偶体は珠心の外層で崩壊しかけていた(図-2: F)。授粉後11週目および15週目の胚珠内の様子は同属種間交配の場合と同様に胚珠内に胚が無く胚珠組織が崩壊していた(図-2-I)。

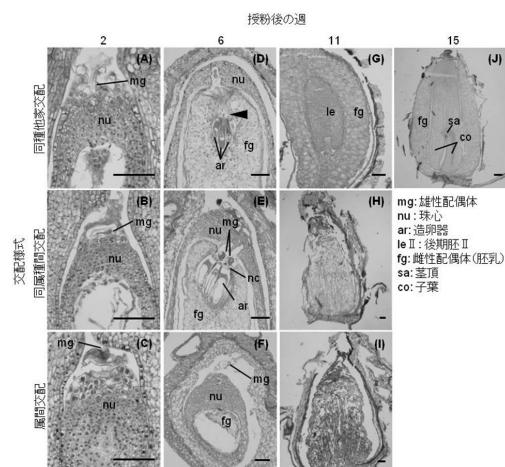


図-2 同種他家(サワラ) 同属他種(ヒノキ)および属間(スギ)交配後のサワラの胚珠における受粉後の雄性配偶体の挙動と胚の発達

ヒノキを胚珠親とした交配実験においても、サワラを胚珠親としたときに得られた結果と同様、同種他家交配では、珠心内への雄性配偶体の侵入、頸細胞の通過、胚の発達が確認できたが、同属種間交配では、珠心内への雄性配偶体の侵入は見られたが受精や胚の発達は確認できなかった。また、属間交配では、サワラでの属間交配と同様に、授粉後2週目および6週目では雄性配偶体は珠心の外層に留まっており、授粉後11週目および15週目では胚珠組織が崩壊していた。

以上の観察結果から、サワラ、ヒノキ、スギの3種の間には受粉後の明確な生理的生殖隔離機構が存在することが明らかになった。

また、スギの花粉管はヒノキやサワラの珠心に侵入できないが、ヒノキとサワラとの間では珠心内部への他種花粉管の侵入が観察されることから、類縁関係が近いほど受粉後の生殖隔離が弱いことが明らかになった。

3. 空中花粉の種組成

1) 花粉 1 粒からの種判別法の開発

(1) 種判別マーカの開発

ヒノキ科 7 種の塩基配列を比較した結果、葉緑体 DNA の *trnL* Intron の領域におけるギャップの長さには種ごとに差異があり、種判別が可能であったので、その領域を含むようにプライマーを設計し、計 2 座のマーカ-

表 - 1 開発した種判別マーカ-

| プライマー | 塩基配列 | Tm (°C) |
|-------|---------------------------------|---------|
| Cup06 | F 5'-CGAGAAAGGGATAGGTGCAG-3' | 59 |
| | R 5'-ACCAACGGATTTTCCTCCTAC-3' | |
| Cup07 | F 5'-AGAAAGGGATAGGTGCAGAGA-3' | 57 |
| | R 5'-GGACTCTATCTTTATCCTCGTCC-3' | |

開発した (Cup06、Cup07; 表-1)。

Cup07 は Cup06 に比べて標的配列が 61bp 短く設計されている。上記の 7 種では増幅断片長の差にあるため PCR 産物を直接電気泳動するだけで種判別が可能であるが、制限酵素 *Cla* の認識サイト (ATCGAT) がサワラにのみ存在するため、増幅断片を *Cla* で切断することによりサワラを容易に判別することができる。

開発したプライマーを用いてヒノキ科 7 種の葉から抽出した DNA を鋳型に、PCR 増幅をおこなったところ、2 つのマーカ-とともに期待される長さの DNA 断片が増幅された。アガロースゲル電気泳動では、コノテガシワとスギ (4bp の差)、アスナロとスギ (8bp の差) およびカイヅカイブキとネズミサシ (6bp の差) の種判別は困難であった。一方サワラとヒノキ (16bp の差) は、識別できたが、制限酵素 *Cla* で処理することにより明確な判別が可能であった (図-3)。

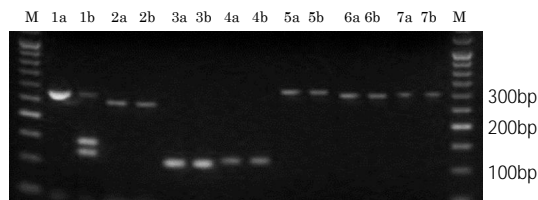


図-3 Cupch07trnL を用いたヒノキ科樹種の種判別

M: 50bp ladder、1: サワラ、2: ヒノキ、3: カイヅカイブキ、4: ネズミサシ、5: コノテガシワ、6: アスナロ、7: スギ

a: 制限酵素処理なし、b: 制限酵素 (*Cla* I) 処理

(2) 花粉 1 粒を用いた種判別法の開発

物理的粉碎をおこなった抽出液をテンプレートとし、Ex Taq (TAKARA) と Cup07 を用いて増幅した場合に成功率が最も高かった。増幅成功率は、サワラ花粉で 75.0% (9/12)、ヒノキ花粉で 58.3% (7/12)、スギでは 100% (12/12) であった。

(3) サワラ雌花の周辺に飛来した花粉の種組成

2014 年 5 月 1 日、2 日、3 日、6 日、7 日、9 日、10 日、11 日および 13 日にサワラ 2 個体に設置した花粉トラップから花粉サンプルを回収し、実体顕微鏡を用いてヒノキ科花粉とヒノキ科以外の花粉を識別した。補足した花粉数は 50 粒 ~ 733 粒まで日によって大きく変動したが全花粉粒数に占めるヒノキ科以外の花粉の割合は 5 月 9 日以降急速に高くなった (表-2)。

表 - 2 花粉トラップで補足した空中花粉の実体顕微鏡による種判別

| 採集日 | ヒノキ科 | ヒノキ科以外 | 合計 | ヒノキ科以外の割合 (%) |
|-------|------|--------|-----|---------------|
| 5月1日 | 191 | 14 | 205 | 6.8 |
| 5月2日 | 680 | 53 | 733 | 7.2 |
| 5月3日 | 534 | 84 | 618 | 13.6 |
| 5月6日 | 33 | 17 | 50 | 34.0 |
| 5月7日 | 232 | 39 | 271 | 14.4 |
| 5月9日 | 12 | 60 | 73 | 82.2 |
| 5月10日 | 75 | 269 | 344 | 78.2 |
| 5月11日 | 20 | 60 | 80 | 75.0 |
| 5月13日 | 14 | 47 | 61 | 77.0 |

5月11日のサンプルは花粉トラップ1個、それ以外は2個の合計

受粉させていない雌花における珠孔液の分泌は 5 月 13 日まで確認できたが、自然受粉では調査期間の前半で珠孔液の分泌は終

了していると予想される。このため、5月2日および3日のサンプルを用いてヒノキ科空中花粉の種組成を調べた。その結果、5月2日のサンプルでは、サワラ 10%、ヒノキ 86.7%、サワラ・ヒノキ以外（おそらくスギ）3.3%であり、5月3日のサンプルではサワラ 2%、ヒノキ 98%であった(表-3)。

表 - 3 2014年5月2日および3日における空中花粉のヒノキ科樹種の判別結果

| 花粉採集日 | 分析花粉数 | 増幅成功数 | 種判別 | | |
|-------|-------|-------|----------|------------|----------|
| | | | サワラ | ヒノキ | 2種以外ヒノキ科 |
| 5月2日 | 48 | 30 | 3 (10%) | 25 (86.7%) | 1 (3.3%) |
| 5月3日 | 96 | 51 | 1 (2.0%) | 50 (98.0%) | 0 |

2016年及び2017年に、花粉飛散が終了した5月中旬にサワラの雌花を採集し、胚珠を取り出し、10NのNaOHを用いて軟化した後、スライドグラス上で押しつぶして胚珠内の花粉を観察した。その結果、ヒノキ科以外の花粉を取り込んでいる胚珠の割合は、1%及び13%であった。調査した年は異なるが、この値は、サワラ珠孔液分泌時期前半の空中花粉に含まれるヒノキ科以外の花粉の割合と同程度である。このため、胚珠内の花粉の種組成は空中花粉の種組成を反映している可能性がある。

以上を併せると、サワラ胚珠は、周囲の造林地や天然林から飛来するヒノキ科花粉やヒノキ科以外の花粉を受粉することで繁殖干渉を受ける可能性が高いと考えられる。

課題申請時には、サワラの雌花がスギやヒノキの人工林由来の花粉を受粉することによる繁殖干渉のみを想定していた。しかし、自然受粉したサワラの胚珠内には直径が2倍近いマツ科の花粉やブナ科やカバノキ科などの広葉樹の花粉も取り込まれていた。このことから、風媒樹種が混生する森林では、スギやヒノキの拡大造林以前から繁殖干渉は起こっていたと考えられる。

一方、開花期のサワラの雌花周辺の空中花粉中のヒノキ科花粉の中で、サワラ花粉の占める割合は10%以下であるのに対し、ヒノキの花粉は90%にも達していた。このことがサ

ワラの繁殖成功度（種子の充実率）の低下にどれほどの影響を及ぼしているのかを解明するには、針葉樹の多胚現象、同種花粉と異種花粉とを同時に受粉した場合の同種花粉の優先性、同種内における近交弱勢の程度などを総合的に調査する必要がある。

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)

Ikeru, A., Tsuruta, M. & Mukai, Y. Identification of *Cupressaceae* species from airborne pollen grains using chloroplastic markers : implications for reproductive interference evaluation in a remnant natural population of *Chamaecyparis pisifera* (Sieb. et Zucc.) Endl. (査読有り) Journal of Forest Research 22:320-324, 2017

〔学会発表〕(計 3件)

加藤敬介、向井 讓、鶴田燃海、安藤正規. 近交弱勢と受粉率を考慮したサワラ自然受粉種子の充実率の推定、第129回日本森林学会大会学術講演集 p139(P1-076), 2018

蘇 彰宏・鶴田燃海・向井 讓. サワラにおける繁殖干渉の実態評価方法 葉緑体 DNA マーカーを用いた花粉 1 粒からの樹種判別 . 第126回日本森林学会大会学術講演集 p125(P1B054), 2015

蘇 彰宏・上窪佑樹・鶴田燃海・向井 讓. サワラとヒノキ科近縁種との間での受精前および受精後の生殖隔離 . 第125回日本森林学会大会学術講演集 p112(P1-119), 2014

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当無し

取得状況(計 0件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

向井 讓 (MUKAI, Yuzuru)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号:

8 0 2 8 3 3 4 9