

自殖家系を用いた雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で保有するヒノキ精英樹の発見

誌名	日本森林学会誌
ISSN	13498509
著者名	幸,由利香 遠藤,良太 田村,美帆 森口,喜成 渡辺,敦史
発行元	日本森林学会
巻/号	104巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 176-181
発行年月	2022年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



自殖家系を用いた雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で保有するヒノキ精英樹の発見*

幸 由利香^{1,4}・遠藤良太^{**1,5}・田村美帆²・森口喜成³・渡辺敦史²

花粉症を引き起こす主要な樹種の一つであるヒノキについて、雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ精英樹を探索した。ヒノキ精英樹8クローンの自殖家系を育成し、7年生での花粉の飛散と8年生での花粉組織の細胞を観察した結果、丹沢6と丹沢7の自殖後代でそれぞれ22.2%と25.0%の雄性不稔個体が確認され、両クローンが雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つことが判明した。花粉稔性が正常な精英樹で成熟花粉の形成が確認された2020年3月30日に雄性不稔個体の花粉細胞を観察した結果、花粉母細胞期のまま発育が停止していた。また、丹沢7の自殖後代の雄性不稔2個体から採取した種子はともに発芽し、雌性は正常なことが確認された。これらの個体は、今後のヒノキの雄性不稔育種に活用できることが明らかとなった。なお、自殖個体の種子発芽率と初期成長は他殖個体より劣っており、自殖が花粉細胞の発育に影響している可能性も排除しきれないことから、今後、戻し交配家系などを用いた追加検証を行うことも必要と考えられた。

キーワード：ヒノキ、雄性不稔、ヘテロ接合体、近交弱勢、雌性稔性

Yurika Miyuki,^{1,4} Ryota Endo,^{**1,5} Miho Tamura,² Yoshinari Moriguchi,³ Atsushi Watanabe² (2022) Detection of Plus Trees Heterozygous for a Male-sterility Gene in Hinoki Cypress (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.), Using Self-pollinated Families. J Jpn For Soc 104: 176–181 We attempted to select heterozygous plus-trees to study a male sterility gene in the Japanese hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.), which is one of the primary tree species that cause pollinosis. Hence, we produced self-pollinated families derived from eight plus-trees. We observed pollen dispersal at the age of 8 years and pollen cell at the age of 9 years. Male sterile trees were found in two self-pollinated families of "Tanzawa 6" and "Tanzawa 7," at proportions of 22.2% and 25.0%, respectively. This indicated that these two clones have a male-sterile gene in heterozygotes. All the confirmed male-sterile individuals had no transition from the pollen mother cell stage to the next stage of pollen development. Two self-pollinated male sterile trees in "Tanzawa 7" exhibited normal seed germination, which indicated that they were not female-sterile. These results suggested that these trees are useful for male sterile breeding in Japanese hinoki cypress. However, the seed germination rate and early growth of self-pollinated individuals were inferior to those of other cross-pollinated individuals. Because of the possibility that selfing could also affect pollen cell development, it is essential to perform additional observation using backcross families.

Key words: hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.), male sterility, heterogosity, inbreeding, depression, female fertility

I. は じ め に

花粉症は大きな社会問題となっており、全国の耳鼻咽喉科医師およびその家族を対象に2019年に行われたアンケート調査(松原ら 2020)によると、花粉症の有病率はアンケート対象者全体の42.5%であった。このうち、スギ花粉症有病率は38.8%であり、花粉症による有病者の90%以上をスギ花粉症が占めた。一方、スギ以外の花粉症有病率は25.1%と花粉症有病者のほぼ60%を占め、しかも2008年に実施された調査から花粉症有病率は約10%も増加していた。日本ではヒノキ(*Chamaecyparis obtusa* (Sieb. et Zucc.) Endl.)はスギに次いで植栽面積の多い樹種であり、地域・年次によってはヒノキ花粉飛散量がスギ花粉飛散量を上回る場合もあることから(Okano *et al.* 2012; 川島ら 2016)、スギ花粉症以外の花粉症に占めるヒノキ花粉

症の割合は大きいと推察される。ヒノキ花粉症はスギ花粉症と共通の抗原性があることも知られており(井手ら 1981)、スギの主要抗原Cry j 1とCry j 2はヒノキのCha o 1とCha o 2と相同性が認められ、スギ花粉症患者の65~70%がヒノキ花粉にもアレルギー反応を示すとの報告もある(西端・斎藤 2002; Yamada *et al.* 2014)。

現在、ヒノキの花粉症対策品種として、「少花粉ヒノキ品種」が56品種選抜されているが(田村ら 2017)、これらは相対的に雄花量が少ない品種であることから、一定量の花粉が飛散する。一方、雄性不稔品種は、花粉を全く飛散させないことから花粉症対策としては理想的な品種といえる。近年、神奈川県において雄性不稔ヒノキが発見された。しかし、このクローンは雌性も不稔である両性不稔であり、苗木供給はさし木に限定された(斎藤 2017)。このため、このクローンを利用した人工交配による品種改良が

*本報告の一部は、2019年度森林遺伝育種学会大会において発表した。

**連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: kamataendo@yahoo.co.jp  <https://orcid.org/0000-0002-5305-1165>

¹ 千葉県農林総合研究センター森林研究所 〒289-1223 千葉県山武市埴谷1887-1 (Forest Research Institute, Chiba Prefectural Agriculture and Forestry Research Center, 1887-1 Haniya, Sanmu, Chiba 289-1223, Japan)

² 九州大学大学院農学研究院 〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡744 (Faculty of Agriculture, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka, Fukuoka 819-0395, Japan)

³ 新潟大学大学院自然科学研究科 〒950-2181 新潟県新潟市西区五十嵐二の町8050 (Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050, Ikarashi 2-Nocho, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan)

⁴ 現在：千葉県北部林業事務所印旛支所 〒285-0026 千葉県佐倉市錦木仲田町8-1 (Current affiliation: Chiba Prefectural Hokubu Forestry Administrative Inba Office, 8-8 Kaburaginakatamachi, Sakura, Chiba 285-0026, Japan)

⁵ 現在：千葉大学教育学部 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33 (Current affiliation: Faculty of Education, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba, Chiba 263-8522 Japan)
(2021年12月11日受付；2022年3月17日受理)

できないだけでなく、林木育種事業において種子生産もできない。そこで、花粉症の原因となる花粉を飛散しない雄性のみ不稔の個体の発見が求められている。

遺伝的に雄性不稔となる個体のうち、細胞質雄性不稔 (cytoplasmic male sterility; CMS) は、野生個体の中に普遍的に存在することが知られている (Møller *et al.* 2021)。CMS はこれまでに約 200 種で発見されており (Hu *et al.* 2014)、作物では CMS を活用した育種は重要である。一方、核遺伝子型雄性不稔性 (Nuclear genic male sterility; GMS) もトウモロコシ、トマト、大麦、エンドウ豆などに存在することが知られている (Kaul 2012)。スギは単一の潜性 (劣性) 遺伝子によって雄性不稔となること (Taira *et al.* 1999) から、GMS 型の雄性不稔様式である。スギの雄性不稔個体の出現割合は野外で 0.017~0.040% 程度であった (五十嵐ら 2004; 斎藤ら 2005; 平ら 2005)。この雄性不稔個体の出現割合からハーディ・ワインベルグの法則に基づいてヘテロ接合型で雄性不稔遺伝子を持つ個体、いわゆるヘテロ接合型個体の出現率を推定すると 2.55~3.92% となり、ヘテロ接合型個体は雄性不稔個体に比べて約 100~150 倍の高い確率で出現すると考えられる。スギでは発見された雄性不稔個体を利用したヘテロ接合型個体の探索が行われ、林業に活用される精英樹の中から複数のヘテロ接合型が発見されている (Saito and Taira 2005; 斎藤 2008; 磯田ら 2013; 三嶋ら 2020; Moriguchi *et al.* 2020; 平山ら 2021)。

筆者らは、ヒノキ雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ個体であれば自殖によって雄性不稔個体が出現すると考え、全国に先駆けて 2011 年から千葉県で保有されている精英樹の自殖個体を育成してきた。本研究では、これら自殖個体を対象に、7 年生および 8 年生時点で花粉稔性の評価を行った。雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ個体の探索が自殖個体を利用して効率的に実施できることは、河合ら (2017) がスギで指摘している。一方、ヒノキの自殖は近交弱勢により発芽率、初期の生存率、初期成長を低下させるといわれている (田島 1979)。そこで、本研究では近交弱勢にも注意しながら、育成した自殖個体の花粉稔性を評価し、雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ可能性の高いヒノキ精英樹を発見したので報告する。

II. 材 料 と 方 法

1. 精英樹の自殖個体の作出、育成および花粉飛散の確認

千葉県山武市にある千葉県農林総合研究センター森林研究所内にある採種園のヒノキ精英樹 8 クローンについて、2011 年 4 月に自家受粉を行い、10 月に種子を採取、2012 年 4 月に同研究所苗畑に播種した。その後 6 年間、毎年床替しながら育苗し、2018 年 7 月にジベレリンによる着花促進処理を行った。着花促進方法は中村ら (2015) に従い、幹をはく皮後、ジベレリン協和ペーストを 1 本当たり 2 mg 塗布した。7 年生の 2019 年 3 月時点で 2 個体以上に雄花が着花した秋元 1、丹沢 2、丹沢 6、丹沢 7、西多摩 4、西多摩 6、箱根 1、札郷 2 の 8 クローンの自殖家系について、2019 年 4 月 1 日~9 日に目視で花粉の飛散を 3 回確認し

た。目視で飛散が確認できなかった個体は、4 月 12 日~5 月 7 日まで水さし法 (倉本・藤澤 2014) により花粉の飛散を確認した。

2. 組織観察を用いたヒノキの花粉形成ステージの決定と花粉稔性の評価

前項の方法で花粉の飛散を明確に観察できなかった個体については、以下の方法により花粉稔性を評価した。

まず、ヒノキの花粉形成ステージを決定し、雄性不稔がどのステージで生じているか確認するため、正常個体の雄花の組織観察を行った。この花粉形成ステージ決定には箱根 3 と丹沢 6 を用いた。両クローンは 2020 年 2 月 25 日~4 月 2 日までの花粉形成期において 3~5 日間隔で計 12 回雄花を採取し、ただちに FAA 溶液 (ホルマリン 5%、酢酸 5%、エタノール 45%、水 45%) で固定し、4℃で保存した。組織切片は、戸部 (2006) のプロトコルを一部改変し、脱水後にパラフィンで包埋した試料から、回転式ミクロトームを用いて厚さ 6~7 μm の切片を作製した。各切片は、Hist-Clear II (National Diagnostics) を用いて脱パラフィンし、ヘマトキシリンとエオジンによって染色した。観察は、オールインワン蛍光顕微鏡 BA-X710 (KEYENCE) を使用して行った。観察した花粉囊の状態を花粉形成過程から、ヒノキ (橋詰 1963; 山中ら 2017; 山中 2018) で報告されているステージを参考に①胞原細胞・花粉母細胞期、②減数分裂・四分体期、③小孢子・飛散期の 3 ステージに区分し、各ステージを示す花粉囊数を計測した。組織観察に利用した雄花は 3 個以上とし、雄花内の全ての花粉囊数の観察に基づいて評価した。

次に、これらの自殖個体については、念のため、DNA 分析により採種園内の精英樹の自殖由来であることを確認した。この解析には、ヒノキで開発されたマイクロサテライトマーカー (Matsumoto *et al.* 2006; Iwaizumi *et al.* 2011) の中から選ばれた、多型性が高く、安定して増幅する 10 座 (若尾ら 2017) を使用した。雄花は、花粉飛散時期であり、正常クローンにおいて組織観察から成熟花粉の形成が確認された 2020 年 3 月 30 日に採取した。雄花から花粉組織切片を作成、染色し、花粉囊数の観察および計測を行い、雄花の成熟花粉形成の有無から不稔か可稔かを確認し雄性不稔個体を判定した。

最終的に雄性不稔と判定された個体数から雄性不稔個体の出現率を算出し、雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ場合の期待値 25% から逸脱しているか否かを、Cochran の基準 (Cochran 1952) に拠り二項検定で検討した。

3. 自殖の影響の確認

自殖個体は近交弱勢の影響を受けて生存率や成長が低くなることが考えられるため、花粉稔性を調査した 8 クローンの自殖個体について、7 年生時点の 2019 年 4 月に生存個体数、樹高、根元径 (地際より 3 cm) を測定した。さらに、播種量から通常得られると予測される個体数は以下の式で推測し、実際に得られた個体数と比較した。

$$N = S \times n \times g \times s_1 \times s_2 \times s_3$$

N は播種量から通常得られると予測される個体数、 S は播

種量 (g), n は 1 g 当たり粒数, 531 粒 (弓野・石井 2003), g は発芽率, 8.7% (浅川ら 1981), s_1 は 1 年生床替後残存率, 40% (弓野・石井 2003), s_2 は 2 年生床替後残存率, 90% (弓野・石井 2003), s_3 はその後の消失率, 20% (経験値)。

樹高については, ヒノキ裸苗が 3 年生 (3 成長期) で苗高 45 cm 以上のものが流通していることから, 播種後は 1 年間に平均 15 cm は伸びると仮定した場合の 7 年生時点の推定樹高 105 cm と比較した。さらに, 後述するが, 雄性不稔個体が得られた丹沢 6 と 7 では, 自殖で得られた雄性不稔個体と可稔個体について, それぞれの樹高と根元径の平均値に違いがあるかを検討した。

4. 雄性不稔個体の雌性稔性の確認

ヒノキ雄性不稔個体における雌性の稔性を確認するため, 2020 年に自然交配により球果が着生した丹沢 7 の自殖 7 個体から自然交配の球果を採取, 種子精選して発芽試験を行った。7 個体のうち 2 個体が雄性不稔個体, 5 個体が可稔個体だった。発芽試験は, ISTA (International Seed Testing Association: 国際種子検査協会) が定める国際種子検査規程を準用した (ISTA 2004)。蒸留水で湿らせたろ紙を敷いた内径 9 cm のプラスチックシャーレにベンレート 1,000 倍水溶液に約 18 時間浸漬した種子を置床し, 人工気象機 (株式会社日本医化器械製作所製) 内で 2020 年 10 月 22 日から 28 日間実施した。1 日当たり 20℃ 16 時間, 30℃ 8 時間の変温条件とし, 白色蛍光灯 (75,000 lx) による照射は温度 30℃ 時に行った。発芽試験は各個体について 100 粒 3 反復としたが, 得られた種子数がこれを満たさないものでも実施した。観察はおおよそ 3~4 日間に 1 回行い, 幼根が種皮を破ったものを発芽とし, 得られた各個体の平均発芽率に雄性不稔個体と可稔個体で差があるかを検討した。

III. 結 果

1. 精英樹の自殖個体における花粉不稔性の発現過程と評価

ヒノキの花粉形成ステージを決定するため供試した正常個体 (可稔) である箱根 3 と丹沢 6 の雄花を組織観察した結果を表-1 に示した。箱根 3 および丹沢 6 の雄花は, 2 月 28 日までは胞原細胞・花粉母細胞期と判断された (図-1)。箱根 3 では, 3 月 3 日に一部の花粉嚢で減数分裂・四分子期への移行が認められ, 3 月 12 日には小孢子・飛散期への移行が認められた。3 月 24 日には観察した全ての花粉嚢は小孢子・飛散期であった。丹沢 6 は 3 月 19 日までは

花粉母細胞期からのステージの移行は認められず, 3 月 24 日に減数分裂・四分子期および小孢子・飛散期への移行が認められ, 3 月 30 日には全て小孢子・飛散期のみであった。

花粉の飛散を明確に観察できなかったものは, 丹沢 6 の自殖由来の 2 個体, 丹沢 7 の自殖由来の 13 個体の計 15 個体だった。この中で, 雄花の成熟花粉の形成の有無から雄性不稔個体と判断できたものは丹沢 6 の 2 個体および丹沢 7 の 6 個体で, 3 月 30 日時点でも花粉母細胞のままであり, ステージの移行は認められなかった (図-1, 表-2)。また, これら雄性不稔個体の雄花は發育していないことが外部形態からも明らかであり (図-2), 發育が進んだ雄花の混在も全く認められなかった。DNA による分析でも, これら調査に用いた丹沢 6 と 7 の自殖個体は全て親の持つ対立遺伝子のみしか保有していなかったことから, 自家受粉由来の後代であることが確認できた。

以上から, 花粉稔性を評価したヒノキ 8 クロンの自殖個体数, 雄性不稔個体数, 雄性不稔率を表-3 に示した。丹沢 6 および丹沢 7 の自殖家系で雄性不稔個体が確認され, 雄性不稔率はそれぞれ丹沢 6 が 22.2%, 丹沢 7 が 25.0% だった。これら値は, 検定の結果, スギ同様に雄性不稔性が核内の単一の潜性 (劣性) 遺伝子によって引き起こされると仮定した場合の期待値 25% を逸脱するものではなかった。

2. 自殖の影響の確認

精英樹 8 クロンの自殖家系の播種量, 推定残存個体数, 残存個体数と残存個体の 8 年生時点の樹高および根元径を表-4 に示した。8 クローンとも実際に育成できた個体数は予測された個体数より少なく, 丹沢 6 と 7 は 10% 未満だった。7 年生時点の平均樹高で最も高かったのは西多摩 4 の 112.8 cm, 残り 7 クロンの自殖個体は概ね 60~80 cm だった。同一樹齢で推定される樹高の 105 cm と比べると, 西多摩 4 を除く 7 クロンの自殖個体では明らかに樹高成長が劣っていた。

丹沢 6 では雄性不稔個体 (2 個体) の樹高, 根元径の平均値と標準偏差が 45.5 ± 12.02 cm, 13.8 ± 0.78 mm であったのに対し可稔個体 (7 個体) は 92.6 ± 15.20 cm, 20.9 ± 4.01 mm と樹高, 根元径とも明らかに優っていた。一方, 丹沢 7 では雄性不稔個体 (6 個体) の樹高, 根元径が 64.0 ± 12.39 cm, 20.7 ± 4.25 mm であったのに対し可稔個体 (18 個体) は 62.1 ± 15.80 cm, 18.6 ± 4.14 mm と樹高, 根元径とも同程度であった。

表-1. 箱根 3 および丹沢 6 (可稔個体) で観察された各花粉形成ステージの花粉嚢数

精英樹名	花粉形成ステージ	観察日											
		2/25	2/28	3/3	3/6	3/9	3/12	3/16	3/19	3/24	3/27	3/30	4/2
箱根 3	胞原細胞・花粉母細胞期	16	14	11	8	2	7	7	25	0	0	0	0
	減数分裂・四分子期	0	0	4	12	25	7	3	0	0	0	0	0
	小孢子・飛散期	0	0	0	0	0	16	30	9	51	41	31	31
丹沢 6	胞原細胞・花粉母細胞期	25	37	35	22	19	29	18	25	0	-	0	-
	減数分裂・四分子期	0	0	0	0	0	0	0	0	2	-	0	-
	小孢子・飛散期	0	0	0	0	0	0	0	0	20	-	24	-

3. 雄性的不稔個体の雌性的稔性の確認

丹沢7の自殖7個体から得られた種子の発芽率を調べた結果、雄性的不稔2個体から得た種子の発芽率は17.7～

32.7% (平均 25.2%)、可稔5個体から得た種子の発芽率は26.0～52.5% (平均 39.2%) であり、雄性的不稔個体から得た種子の発芽率は可稔個体から得た種子よりは低い値で

正常型_箱根3

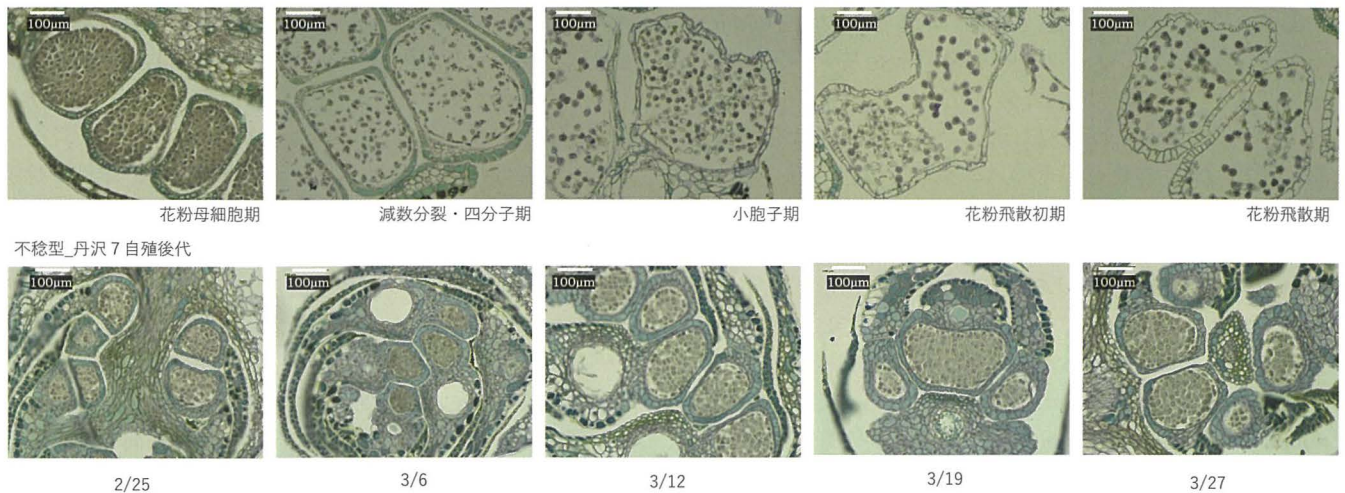


図-1. ヒノキ雄花における花粉形成ステージ

表-2. 花粉飛散を明確に観察できなかった丹沢6と7の自殖個体で3月30日に観察された各花粉形成ステージの花粉囊数

親（精英樹名）		丹沢 6			丹沢 7											
番号		No1	No2	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8	No9	No10	No11	No12	No13
雄花の稔性		不稔	不稔	可稔	可稔	可稔	可稔	可稔	可稔	可稔	不稔	不稔	不稔	不稔	不稔	不稔
花粉形成 ステージ	胞原細胞・花粉母細胞期	26	22	1	0	0	0	0	15	0	50	18	18	31	18	12
	減数分裂・四分子期	0	0	0	0	0	0	4	7	4	0	0	0	0	0	0
	小孢子・飛散期	0	0	35	46	24	45	33	17	29	0	0	0	0	0	0



雄性的不稔個体



雄性的可稔個体

図-2. 丹沢7自殖の雄性的不稔個体と可稔個体の花粉放出時期の雄花

2020年4月1日撮影。

表-3. ヒノキ精英樹8クローンの自殖家系の雄性的不稔個体数と雄性的不稔率 (8年生時点)

家系	自殖 個体数	雄性的不稔 個体数	雄性的不稔率 (%)	P 値*
秋元1	8	0	0	—
丹沢2	2	0	0	—
丹沢6	9	2	22.2	0.5022
丹沢7	24	6	25.0	0.4222
西多摩4	29	0	0	—
西多摩6	10	0	0	—
箱根1	20	0	0	—
札幌2	4	0	0	—

*期待値と差がないとはいえない確率。

表-4. ヒノキ精英樹8クローンの自殖家系個体の播種量、推定残存個体数、残存個体数と残存個体の樹高および根元径の平均値 (7年生時点)

自殖家系	播種量 (g)	推定残存 個体数*	残存 個体数**	樹高 (cm)	根元径 (mm)
秋元1	5.47	73	8	75.9±23.33	19.5±4.10
丹沢2	8.87	118	2	69.5±6.36	25.3±0.57
丹沢6	15.25	203	9	82.1±24.94	19.3±4.70
丹沢7	23.77	316	24	62.6±14.79	19.1±4.18
西多摩4	3.80	51	29	112.8±18.24	27.4±5.09
西多摩6	7.83	104	10	64.6±16.33	18.0±3.93
箱根1	8.16	109	20	81.7±24.84	18.5±5.26
札幌2	3.64	48	4	81.3±24.32	20.6±7.07

*本文中に記載した予測式で播種量から推定した値。**表-1の検定本数と同じ。

はあったが、雌性が可稔であることは確認できた。

IV. 考 察

スギではこれまでに四つの雄性不稔遺伝子が発見されているが、すべて四分子期以降の花粉発達ステージに異常が生じて不稔となる(斎藤 2009)。タイワンスギ(*Taiwania cryptomerioides*)では、雄性不稔を引き起こす原因に四分子期におけるカロス壁の異常が挙げられている(Chen *et al.* 2006)。筆者らが発見したヒノキ雄性不稔は花粉母細胞で花粉形成が停止し、その後の減数分裂、四分子期および小孢子期へのステージに移行しない、スギやタイワンスギとは異なる原因で生じる雄性不稔と考えられる。トウモロコシやトマトなどでは50以上の雄性不稔遺伝子が同定されており(田丸 1994)、シロイヌナズナでは不稔となるステージが本報告で明らかとなったヒノキと同様に花粉母細胞から四分子期のステージ間で生じること(Rhee and Somerville 1998; Francis *et al.* 2006)など、雄性不稔は多様であり様々な遺伝子が関与していると考えられる。本研究が示した丹沢6と7の雄性不稔個体の出現率は、メンデル則の分離比から逸脱する値ではなく、両クローンは単一の雄性不稔遺伝子によって引き起こされている可能性が示唆された。しかし、本研究で調査した個体数は丹沢6で9個体、丹沢7でも24個体であり、分離比の検定には十分な調査数ではない(河合ら 2017)。本調査では8クローンから雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つ個体として丹沢6と丹沢7を発見したが(出現率は25%)、前述のスギで推定された出現率(2.55~3.92%)と比べ著しく高かった。これらの2クローンの親である精英樹丹沢6と丹沢7は同じ地域の同じ林班で、しかも同じ年に植栽された個体であったことから遺伝的にも近い可能性があり、このことが本調査ではヘテロ接合型で持つ個体の高い出現率に影響したのかもしれない。今後は、単一の核内潜性(劣性)遺伝子による雄性不稔であることをより明確にするため、戻し交配による後代などを利用した遺伝性についての追加検証が必要である。

精英樹8クローンの自殖苗の発芽率、生存率、初期成長を健全苗で示されている値と比較した結果、自殖個体の発芽率、生存率、初期成長は低く、自殖による近交弱勢の影響の可能性が考えられた。雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つと推定された丹沢6と7の自殖個体については、丹沢6では雄性不稔個体が可稔個体より明らかに樹高成長が劣っており、近交弱勢の影響をより強く受けていたのに対し、丹沢7では雄性不稔個体と可稔個体の樹高成長に差がなかった。スギやヒノキでは、成長に伴い雄性不稔と判断されたものが可稔となる可能性が報告されている(本間ら 2006; 斎藤 2020)。本研究で用いた自殖個体は7~8年生であり、花粉稔性の判定には飛散の確認に加え、花粉組織細胞の成熟の有無の確認も行ったことから、若齢時における花粉稔性の誤判定の可能性は低いと考えられる。しかしながら、ヒノキではまだ雄性不稔個体に関する知見が乏しいことや本研究で用いたのは自殖による近交弱勢の影響が懸念される雄性不稔個体であったことから、花粉飛散の

経過観察を継続するとともに、戻し交配家系などを用いた追加検証を行う必要がある。

なお、丹沢7では花粉の飛散を観察できなかった個体の中で、花粉組織細胞の観察から花粉の成熟が確認できたものがあった。これは、未だ着生していた雄花数が少なく、目視では花粉の飛散を見逃した可能性がある。スギやヒノキでは、ジベレリンで強制着花させた若齢個体の雄花が開花しない場合があることを筆者らは経験しており、未熟な雄花を水さしした可能性も考えられる。

本研究ではヒノキ精英樹の自殖家系を用い、雄性不稔遺伝子をヘテロ接合型で持つと考えられる精英樹2クローンを発見した。スギでは、すでに雄性不稔個体を利用した林業用苗木が出荷され(斎藤 2012; 斎藤・寺西 2014)、今後増加が期待される(新潟県 2021; 中村・袴田 2021)。しかし、スギでは、雄性不稔が報告され、苗木が出荷されるまでに20年近い年月を要した。樹木の育種改良は、他の栽培作物などと比較してはるかに長い期間を要することから、今後の追加検証と並行して、優良な雄性不稔ヒノキ種苗の開発とそれらの早期普及に向けて、筆者らが発見したヒノキ精英樹クローンおよび育成した雄性不稔個体を活用していくことが必要と考える。

謝 辞

最後に、本研究に助言いただいた神奈川県自然環境保全センター 斎藤央嗣主任研究員、富山県農林水産総合技術センター森林研究所 斎藤真己森林資源課長、特に斎藤央嗣主任研究員には丹沢6と丹沢7の情報も提供いただいた。本研究材料の育成に協力いただいた千葉県農林総合研究センター森林研究所の職員と併せて感謝します。

開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 浅川澄彦・勝田 桓・横山敏孝編(1981)日本の樹木種子(針葉樹編). 林木育種協会
- Chen SH, Chung NJ, Wang YN, Lee CL, Lee YL, Tsai PF (2006) Study of male sterility in *Taiwania cryptomerioides* Hayata (Taxodiaceae). *Protoplasma* 228(1-3): 137-144
- Cochran WG (1952) The χ^2 test of goodness of fit. *Ann Math Stat* 23: 315-345
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP (2006) Separation of Arabidopsis pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methyl esterase gene. *Plant Physiol* 142: 1004-1013
- 橋詰隼人(1963)ヒノキの花芽分化期および花粉の發育経過. 日林誌 45: 135-141
- 平山聡子・岩井淳治・樋口有未・金子岳夫・森口喜成(2021) *MALE STERILITY 1* とは異なる雄性不稔遺伝子を持つスギの選抜. 日林誌 103: 161-167
- 本間莉恵・吉井エリ・平 英彰(2006)スギ雄性不稔の検定期間の短縮. 日林誌 88: 30-32
- Hu J, Huang W, Huang Q, Qin X, Yu C, Wang L, Zhu R, Zhu Y (2014) Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion* 19: 282-288
- 井手 武・芦田恒雄・田端司郎・鳥居健三(1981)ヒノキ花粉の抗原性に関する研究: スギ花粉との共通抗原性について(アレルギー・抗原). *アレルギー* 30(8): 784
- 五十嵐正徳・渡邊次郎・小澤 創・斎藤 寛・平 英彰(2004)福島県でスギ雌性不稔個体を発見 (I) 探索地の選定と雌性不稔個体の確認. *東北森林科学会誌* 9: 86-89
- 磯田圭哉・河合慶恵・山口和穂・久保田正裕・山田浩雄(2013)関西育種基本区におけるスギ雄性不稔遺伝子保有個体の探索. *林育年報* 2013: 55-59
- Iwaizumi M, Watanabe A, Isoda K (2011) Primer Note: Development of highly polymorphic nuclear microsatellite marker for hinoki

- (*Chamaecyparis obtusa*). *Silvae Genet* 60: 62-65
- Kaul ML (2012) Male sterility in higher plants. Book series: Monographs on Theoretical and Applied Genetics Vol. 10. Springer Science & Business Media
- 河合慶恵・久保田正裕・遠藤圭太・磯田圭哉 (2017) 雄性的不稔遺伝子をヘテロ保有するスギ個体の簡易な探索方法—自殖家系における雄性的不稔個体の分離を利用した試行—. *森林総研研報* 16 (4): 265-266
- 川島佳代子・松本達治・玉城晶子・岩田伸子・丹生真理子・有本啓恵・菊守 寛・馬場謙治・入船盛弘・松代直樹・荻野 敏 (2016) スギ・ヒノキ花粉症に対するスギ抗原特異的皮下免疫療法の有効性の検討. *日鼻誌* 55(2): 159-168
- 倉本哲嗣・藤澤義武 (2014) 講座：林木育種の現場の ABC(6) 人工交配技術—ヒノキ—. *森林遺伝育種* 3: 30-33
- 松原 篤・坂下雅文・後藤 稔・川島佳代子・松岡伴和・近藤 悟・山田武千代・竹野幸夫・竹内万彦・浦島充佳・藤枝重治・大久保公裕 (2020) 鼻アレルギーの全国疫学調査 2019 (1998 年, 2008 年との比較) —耳鼻咽喉科医およびその家族を対象として—. *日耳鼻会報* 123: 485-490
- Matsumoto A, Tani N, Li XG, Nakao Y, Tomaru N, Tsumura Y (2006) Development and polymorphisms of microsatellite markers for hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). *Mol Ecol Notes* 6: 310-312
- 三嶋賢太郎・平尾知士・坪村美代子 (2020) 遺伝的に多様で優良形質の無花粉スギ品種の開発に役立つリソースを構築. (令和 2 年度版 研究成果選集. 国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所編. 森林総合研究所). 42-43
- Moriguchi Y, Ueno S, Hasegawa Y, Tadama T, Watanabe M, Saito R, Hirayama S, Iwai J, Konno Y (2020) Marker-assisted selection of trees with *MALE STERILITY 1* in *Cryptomeria japonica* D. Don. *Forests* 11 (7): 34
- Møller IM, Rasmusson AG, Van Aken O (2021) Plant mitochondria – past, present and future. *Plant J* 108: 912-959
- 中村健一・奈良雅代・西澤敦彦 (2015) ミニチュア採種園におけるヒノキ品種の早期着花手法の検討. *関東森林研究* 61(1): 73-76
- 中村健一・袴田哲司 (2021) 無花粉スギ優良系統の選抜と品種開発. *森林遺伝育種* 10: 113-115
- Neale DB, Marshall KA, Harry DE (1991) Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*). *Can J For Res* 21: 717-720
- 新潟県ホームページ: 無花粉スギ (2021 年 9 月 9 日更新). <https://www.pref.niigata.lg.jp/sec/chisan/1356883234891.html>
- 西端慎一・斎藤洋三 (2002) 都市部 (東京都) の一診療所におけるスギ花粉症患者の受診動態. *日耳鼻会報* 105: 751-758
- Okano M, Fujiwara T, Higaki T, Makihara S, Haruna T, Nishizaki K (2012) Characterization of Japanese cypress pollinosis and the effects of early interventional treatment for cypress pollinosis. *Clin Exp Allergy Rev* 12: 1-9
- Rhee SY, Somerville CR (1998) Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J* 15: 79-88
- 齋藤央嗣 (2012) 林木育種の成果シリーズ (17) —花粉症対策品種 (成果の普及と神奈川の事例を中心に) —. *林木の育種* 245: 29-33
- 齋藤央嗣 (2017) ヒノキ両性不稔個体の発見. *日林誌* 99: 150-155
- 齋藤央嗣 (2020) 各都道府県の林業・林産業と遺伝育種の関わり (30) 神奈川県. *森林遺伝育種* 9(2): 89-92
- Saito M, Taira T (2005) Plus tree of *Cryptomeria japonica* D. don with a heterozygous male-sterility gene. *J For Res* 10: 391-394
- 斎藤真己・古賀由美子・古田喜彦・平 英彰 (2005) 採種園実生個体からの雄性的不稔スギの選抜. *日林誌* 87: 1-7
- 斎藤真己 (2008) 無花粉スギの開発状況と今後の展望. *森林科学* 54: 17-20
- 斎藤真己 (2009) 無花粉 (雄性的不稔) スギのデータベースの作成. *林木の育種* 232: 44-46
- 斎藤真己・寺西秀豊 (2014) 無花粉 (雄性的不稔) スギ品種の開発. *日花粉会誌* 60: 27-35
- 平 英彰・斎藤真己・五十嵐正徳・齋藤央嗣 (2005) スギ雄性的不稔個体の選抜. *林木の育種* 216: 17-18
- Taira H, Saito M, Furuta Y (1999) Inheritance of the trait of male sterility in *Cryptomeria japonica*. *J For Res* 4: 271-273
- 田村 明・高橋 誠・星比呂志 (2017) 優良品種の開発について—花粉症対策品種—. *森林遺伝育種* 6: 8-12
- 田島正啓 (1979) ヒノキの自殖に関する遺伝学的研究. *九大農演習林報* 51: 39-124
- 田丸典彦 (1994) 稲の遺伝的雄性的不稔と雑種不稔性に関する育種学研究. *北大農邦文紀要* 19: 203-256
- 戸部 博 (2006) パラフィン切片・樹脂切片の作製法. (細胞工学 別冊 植物細胞工学シリーズ 22 新版 植物の細胞を観る実験プロトコル—顕微鏡観察の基本から最新バイオイメージング技術まで—. 福田裕穂・西村幹夫・中野明彦監. 秀潤社). 35-45
- 若尾みか・小林沙希・幸由利香・遠藤良太・松本麻子・森口喜成 (2017) DNA マーカーを用いた少花粉ヒノキの種子生産方法の評価. *日林誌* 99: 165-171
- Yamada T, Saito H, Fujieda S (2014) Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol* 133(3): 632-639
- 山中智博 (2018) スギ黒点病菌を用いたヒノキ花粉飛散抑制資材開発に関する研究. *法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科* 編 59: 1-4
- 山中智博・秋庭満輝・高橋由紀子・窪野高德・廣岡裕吏 (2017) *Sydowia japonica* のヒノキ雄花への感染と花粉の成熟度について. *樹木医学研究* 21: 136-137
- 弓野 奨・石井正氣 (2003) 育種種子の使用による育苗コストの削減. *林木育種ニュース* 16: 12-13