

テリハボクの自殖率および初期成長に対する近交弱勢の影響の検証

林木育種センター 海外協力部 海外協力課 花岡創

西表熱帯林育種技術園 尾坂尚紀 加藤一隆*

1 はじめに

沖縄県は台風の常襲地域であり、強風や潮（塩害）による家屋・農地・その他の人間活動領域への被害は深刻である。それらの領域における被害緩和策として、防風林の設置は非常に重要視されている。特に過酷な環境となる海岸部や広場等では、とりわけ耐風性・耐潮性に優れた樹種が求められ、植栽推奨樹種の一つとしてテリハボク (*Calophyllum inophyllum* L.) が挙げられる³⁾。林木育種センター海外協力部では、テリハボクの防風林への活用を念頭に、より耐風性・耐潮性に優れた品種の開発を目指し、国内外から育種素材の収集と増殖方法等についての研究を開始している。育種を進めるにあたっては、基礎情報として交配様式、特に自殖種子の生産性や成長等に対する近交弱勢の影響を理解することは重要であるが、テリハボクではこれらの知見はほとんど蓄積されていない状況である。今回は、交配袋の設置による自家受粉処理および自然交配種子（実生）のDNA鑑定を実施することで、テリハボクの交配様式、特に自殖率について解析し、また、発芽不良および初期成長不良との関連性を検証した結果について報告する。

2 材料と方法

(1) 交配袋を用いた自家受粉処理

西表島熱帯林育種技術園内に生育する3個体（供試木1, 2, 3, それぞれ胸高直径 17.5, 16.5, 16.9cm）を調査対象とした。2011年には供試木1, 3の2個体、2012年には上記の3個体全てについて、開花前の20枝（シュート）をマーキングし、シュートごとに花序数を記録した。テリハボクは虫媒植物であるため、シュートに交配袋を設置して花粉媒介者の侵入を防げることで、他殖が生じることを防止できる。そこで、全供試木のマーキングしたシュート全てに交配袋を設置し、他殖を妨げ、自殖のみが生じる環境を整えた。開花終了から約1ヶ月後に交配袋を取り外し、全花序の状態を確認した。また、

開花終了から約6ヶ月後にも果実の形成状況について観察した。

(2) 自然交配種子および実生の親子鑑定

自然条件下での自殖率を推定するため、西表熱帯林育種技術園内の供試木1, 2に加え、石垣島及び西表島に生育する天然性の3個体（供試木4, 5, 6）を対象として、2010年および2011年10月に自然交配種子を採取するとともに、母樹から葉も採取した。採取した種子は全て西表熱帯林育種技術園内の網室内で播種し、半年間にわたって実生を育成した。発芽がみられた場合は実生の葉を採取してシリカゲルで乾燥させて保存し、発芽しなかった場合は胚乳の一部を採取して冷凍保存し、DNA抽出用の試料とした。また、発芽した実生であっても、成長が悪いものについてはそのことを記録した。2012年8月に、全ての試料から改変CTAB法によりDNAを抽出し、EST-SSRマーカー12遺伝子座 (*Ci0147*, *Ci0445*, *Ci0932*, *Ci1542*, *Ci1861*, *Ci1439*, *Ci1785*, *Ci3763*, *Ci4062*, *Ci4038*, *Ci5283*⁵⁾) について遺伝子型を決定した。決定された遺伝子型を基に、単純排斥法を用いて親子鑑定を行い、自殖由来の実生、あるいは種子であるかを検討した。

3 結果

(1) 交配袋を用いた自家受粉処理

交配袋を設置したシュートの観察結果を表1に示す。

2011年には、供試木1, 3でそれぞれ943, 666個の花序が確認されたが、開花終了から約1か月後の調査では、供試木1の4つのシュートで発達途中の果実が合計9個確認され、供試木3では、1つのシュートで同様の果実が2個確認された。しかし、それ以外の花序については落下したことを確認した。開花終了の6か月後の調査では、発達途中であった果実も全て落下していたことを確認した。

*現在 林木育種センター育種部育種第二課

表 1. 花序の観察数。括弧内の数字は果実が形成された花序数を示す。

供試木	シュートNo.	2011年	2012年
供試木1	1	46	22
	2	37	23
	3	68	27
	4	54	7
	5	62	44
	6	44	8
	7	97	20
	8	10(1)	29
	9	28(3)	9
	10	27(1)	14
	11	40(4)	0
	12	49	8
	13	31	10
	14	48	22
	15	32	27
	16	51	17
	17	90	9
	18	24	37
	19	69	44
	20	36	28
供試木2	1		15
	2		15
	3		13
	4		10
	5		0
	6		7
	7		20
	8		8(1)
	9		17
	10		24
	11		0
	12		43
	13		11
	14		43
	15		18
	16		19
	17		0
	18		14
	19		8
	20		48
供試木3	1	50	1
	2	75	34
	3	58	12(1)
	4	2	14
	5	0	25
	6	27	7
	7	73	7
	8	27	75
	9	3	16
	10	74	18
	11	42	10
	12	3(2)	0
	13	47	25
	14	13	22
	15	8	0
	16	21	5
	17	14	44
	18	42	10
	19	134	36
	20	11	47

2012年の観察では、供試木1, 2, 3でそれぞれ405, 326, 408個の花序が確認されたが、開花終了から1か月後に供試木2において1つのシュートで発達途中の果実が1個、供試木3でも1つのシュートで1つの発達途中の果実が確認されたのみであった。それらどちらの供試木の果実についても、開花終了から6か月後には全て落下していたことを確認した。

(2) 自然交配種子および実生の親子鑑定

全てのサンプルについて、10遺伝子座以上で遺伝子型を決定することができた。同定した遺伝子型を基に親子鑑定を実施した結果を表2に示す。供試木4および6から採取した種子由来の実生それぞれ1, 2個体に関しては、全遺伝子座で母樹と共通した対立遺伝子のみを有していたため、自殖由来の実生であることが否定されなかった。その他の実生および種子については、いずれかの遺伝子座で母樹と異なる対立遺伝子を有しており、他殖由来であると判定された。

表 2. DNA分析に用いた試料数。括弧内の数は自殖の可能性があると判定された試料数。

供試木	解析数(実生)	解析数(生育不良)	解析数(種子)
供試木1	25	0	4
供試木2	11	1	8
供試木4	23(1)	1	5
供試木5	22	1	-
供試木6	23(2)	0	-

4 考察

本研究では、交配様式、特に自殖率に注目して2つの解析を実施した。袋がけによる自家受粉処理では、開花終了から約1ヶ月後にわずかな数の果実形成が観察されたものの、開花終了から約6ヶ月後には全ての果実が落下しており、結果として種子は生産されなかった。自然交配種子および実生のDNA分析の結果でも、自殖由来の可能性のある実生は合計で3個体(解析数全体の2.4%)であった。ただし、テリハボクのEST-SSRマーカーは多型性が低い傾向にあり⁶⁾、偶然に母樹と同じ対立遺伝子のみが検出された可能性についても注意を払わなくてはならない。より多くの遺伝子座を解析することで、検出される自殖率はさらに低くなる可能性もあるだろう。

テリハボクは虫媒の雌雄同株植物であり³⁾、それぞれの花序が雌蕊と雄蕊を持つ。加藤⁵⁾(一部未発表)は、本研究の供試木の花序の形態や開花フェノロジー、花粉発芽率を観察し、個々の花序の花粉放出および受粉可能期間は1日程度であるが、シュート内の近隣花序では比較的開花日が同調すること、花序の構造上、葯が裂開して花粉が飛び出した雄蕊が柱頭に触れる可能性があること、また、花粉の発芽率は4.1~40.1%であったことを報告している。これらの観察結果は、テリハボクの自家受粉が十分に成立し得ることを示唆している。しかしながら、本研究では、自殖種子がほとんど得られなかった。それゆえ、テリハボクが自家不和合性を有するか、あるいは受精後に強い近交弱勢が働いたことで結実に至らなかったことが考えられる。どちらの要因が作用したのかを解明するためには花粉管伸長の観察等が必要とされ、今後の課題である。

本研究では、発芽しなかった種子や成長不良の実生についても取り扱ったが、DNA解析の結果、それらは全て他殖由来であると判定された。それゆえ、発芽不良や初期成長不良は必ずしも自殖による近交弱勢等、遺伝的要因によって引き起こされた現象とは言えず、種子採取時の種子の成熟具合やその後の保存状況等が影響した可能性もある⁴⁾。今後、種子を採取するタイミングや保存方法に関しても検証しておくべきであろう。また、テリハボクの種子生産に関して、アポミクシスが成立する可能性が指摘されているが²⁾、本研究で扱った実生や種子の中に母樹と全く同じ遺伝子型を有するものは発見されず、今回の試料の中にはアポミクシスに由来するものは含まれていなかったと考えられる。

5 おわりに

本研究の結果は、テリハボクでは自殖種子が成立する可能性が非常に低いことを示していた。テリハボクの育種改良を目的とした人工交配を実施するにあたり、1) 除雄処理等がなくとも自殖率は低くなるであろうこと、2) 自殖種子はほとんど生産されないため、各家系の形質評価を実施するにあたって自殖による近交弱勢の影響(成長不良など)は考慮する必要がないであろうことが確認できた。また一方で、3) 採種園等の造成に向けては、他殖が容易に生じるような環境作りが重要になるこ

とが言える。テリハボクが虫媒植物であることを考慮すると、花粉媒介者に関する調査や、天然林における花粉を介した遺伝子流動の実態などを調査することも、採種園設計等に有用な情報を提供できるであろう。

6 謝辞

本研究の材料収集にあたっては、竹富町および八重山森林組合の許可・協力をいただいた。ここに記して謝意を表す。なお、本研究は、育種交付金プロジェクト「テリハボクの自殖率推定と近交弱勢の有無の検討」の支援を受けた。

7 引用文献

- 1) Friday J.B. and Okano D. (2006) *Calophyllum inophyllum* (kamani). In. Species profiles for pacific agroforestry. (www.traditionaltree.org)
- 2) Gupta V., kak A., Dashora K., Bhardwaj M. Gupta A. (2009) *Calophyllum inophyllum*: an apomict or a true seed? *Curr. Sci.* 97: 1114
- 3) 花岡 創 (2012) テリハボク (*Calophyllum inophyllum*) の研究に向けて、林木の育種. No242: 26-28
- 4) Hathurusingha S. and Ashwath Nanjappa (2012) *Calophyllum inophyllum*: recalcitrant or intermediate seed? *J. For. Res.* 23: 103-107
- 5) 加藤 一隆 (2013) テリハボク (*Calophyllum inophyllum*) の開花フェノロジーと花粉発芽率. 平成25年版林木育種センター年報
- 6) Setsuko S., Uchiyama K., Sugai K., Hanaoka S., Yoshimaru Y. (2012) Microsatellite markers derived from *Calophyllum inophyllum* L. (Clusiaceae) expressed sequence tags. *American Journal of Botany*, 99:e28-e32