

ヒノキの自殖に関する遺伝学的研究

田島, 正啓

<https://doi.org/10.15017/14811>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 51, pp.39-124, 1979-03. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

ヒノキの自殖に関する 遺伝学的研究

田 島 正 啓

Genetic Studies on the Characteristics of Selfing in Hinoki
(*Chamaecyparis obtusa* Endl)

Masahiro TAJIMA

目 次

第1章 緒 論	殖率の推定
第1節 研究目的	第1節 ザイモグラフ法
第2節 研究史	第2節 ヒノキの發育段階におけるアイソ ザイム・バンドの消長
第2章 ヒノキの受粉と自殖による諸形質の 変異	1) 材料および方法
第1節 ヒノキの開花習性と受粉適期	2) 結 果
1) 材料および方法	3) 考 察
2) 結 果	第3節 パーオキシダーゼ・アイソザイム の遺伝子分析
3) 考 察	1) 材料および方法
第2節 ヒノキの自殖による諸形質の変異	2) 結 果
1) 材料および方法	3) 考 察
2) 結 果	第4節 ヒノキ採種園における自然自殖率 の推定
3) 考 察	1) 材料および方法
第3章 組み合わせ能力の推定と劣性ホモ接 合体の検出	2) 結 果
第1節 ダイアレル・クロスによる組み合 わせ能力の推定	3) 考 察
1) 材料および方法	第5章 総合考察
2) 結 果	1) 自殖による遺伝的弊害
3) 考 察	2) 子供群の諸形質におよぼす母樹の 影響
第2節 ヒノキ葉緑素変異苗の遺伝	3) 自然条件下で起こる採種園での自 殖率
1) 材料および方法	摘 要
2) 結 果	謝 辞
3) 考 察	引用文献
第4章 ザイモグラムによる遺伝子分析と自	

第1章 緒 論

近年、木材の需要が増大して、かつては採取的意識が強かった林業形態から育成林業形態へと移りかわってきた。このような背景のもとに、我が国では1954年、全国的規模で林

木育種事業が始められ、各地の森林から主要針葉樹7種（スギ、ヒノキ、アカマツ、クロマツ、カラマツ、エゾマツ、トドマツ）および広葉樹について、精英樹（plus tree）の選抜が行なわれた。ヒノキ精英樹は国有林で221本、民有林で775本が選抜された（昭和48年3月末現在、林業統計要覧1974年）。そして、国や県の各試験研究機関は、これらの精英樹から養成されたクローンによる採種園（seed orchard）や採穂園（scion garden）を造成した。なかでも採種園の目的は、①種子採取が比較的容易に行なわれ得ること、②多量の種子が一度に得られること、③現在のものより遺伝的に優れた種子が得られることなどであり、とくに③の遺伝的水準の向上をはかることが大きなねらいである。

採種園設定当初の研究は、開花、結実の習性を知るとともに、さらに積極的に結実量を増大させるための採種木に対する樹形調節や本数管理、施肥を含む土壌管理、ならびに機械的処理や生長調整物質の利用などに関する研究が行なわれてきた（斉藤1965、高山1968、Lyons 1956）。なかでも、加藤（1958）や Sato（1963）らによって、スギやヒノキに対してジベレリンによる花芽分化の促進が行なわれるようになったことは1つの大きな成果である。

しかしながら、採種木あるいは採種園全体についての遺伝育種学的研究は、まだ不十分で今後に残された問題である。

本研究は、ヒノキ精英樹の交配試験を行ない、自殖による遺伝的弊害と子供群の諸形質におよぼす親木の影響を調べ、更に、現実の採種園での自然自殖率の推定を行なったもので、

第1章では、研究の目的と林木の同系交配に関する研究史について述べた。

第2章では、まずクローン別に雌・雄花の開花時期、着花の状態を調べ、受粉の時期について検討した。そして、ヒノキの自殖と他殖試験により、諸形質の比較を行ない自殖弱勢の効果を調べた。

第3章では、ダイアレル・クロスにより、形質別に組み合わせ能力について検討し、更に変異形質の検出とそれらのうちの2、3の形質の遺伝子分析を行なった。

第4章では、発芽後1年間の稚苗の発育段階でのパーオキシンダーゼ・アイソザイムバンドの消長を調べ、ヒノキで出現したバンドのうち、特定バンドをとらえて、それらの遺伝子分析を行なった。また、その遺伝性が明らかにされたバンドを標識遺伝子（marker gene）として、現実の採種園と、クローン集植園での自然自殖率の推定を行なった。

第1節 研究目的

野生種である林木は、その分布範囲が広大であるので遺伝変異は大きく、しかも超永年生作物であるため、従来、一般農作物のような遺伝的固定や生育環境の人為的制御がきわめて困難である。したがって、我々にはできるだけ広範囲にわたり、各樹種ごとの遺伝変異を把握しておく必要がある。更に、個々の親木についてもできるだけ詳細な遺伝的分析を行ない、それらの特性を十分認知し、次代の遺伝的向上をはかることが、今後の林木育種事業を進めていく上で特に要求される。

精英樹の選抜は外部形態的特徴に基づいて行なわれたものであるが、他殖性植物であるため、次代の遺伝変異は大きく、両親の組み合わせによる影響が大きいと考えられる。更に、ヘテロ接合体であるため、自家受精を行なうと、その次代ではいわゆる自殖弱勢（in-

breeding depression) の効果が現われて、一般に好ましくない結果をもたらす場合が多いと言われている。このことは、遺伝的に優れた種子を採取することを目的とした、採種園の経営においてきわめて重要な問題である。

すなわち、一方では雑種強勢 (heterosis) を目的とした育種を行ない、他方では不良な遺伝子はできるだけ除去し、また望ましくない交配は起こらないように、その交配様式を人為的にコントロールしてやるのが大切である。

現在、孤立木や林分内で、花粉の飛散距離や分布が調べられているが、ごく少量の花粉を除き、その大部分は案外近い範囲に分布することが明らかにされ (Lanner 1966, Silen 1962, Wright 1967, Sakai and Miyazaki 1972), 更に、スギ採種園での調査でもせいぜい数メートルの範囲内であることが明らかにされている (菊池・古越1976)。もし、採種園内でこのような花粉の飛散分布が起こっているとすれば、自家受精の起こる割合は非常に高まり、次代に好ましくない影響をおよぼすことになる。現在、ヒノキに関する自殖弱勢の程度、組み合わせ能力の検定、あるいは採種園での自殖などについてはまったく知られていない。更に、自殖率の推定方法もまちまちである。従って、これらの問題を解明することは今後、ヒノキの育種を進めていくための基礎としてきわめて重要である。

第2節 研究史

自殖 (selfing) とは同系交配 (inbreeding) の中で、最も極端な生殖様式である。すなわち、これは一つの個体に着生している花粉が同じ個体または同一クローンの雌しべと交配することで、このような現象を自家受粉 (self-pollination) といい、その結果、受精することを自家受精 (self-fertilization) という。

林木が自殖を行なうと、その後代では充実種子量の減少、発芽力の低下、奇型苗の出現、生育途中での自然消失、生長量の減退などが見られる。林木の自殖に関する研究は、これまで種々の方向から進められてきたが、それを大別すると、①種子の生産量、②生長量の減退および適応力の欠乏、③自然自殖率の起こる割合などである。

まず、林木の種子生産量に関する研究は、Sorensen (1971a) によれば、1937年 Larsen が *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco を用いて行なったのが最初で、孤立木から得られた種子量は林分内のものと比べて著しく少ないことを報告した。その原因は花粉が雌しべに付着して受粉する以前にほとんど飛散し、受精する機会を失ったためだと述べている。しかし、Allen (1942) は同じ樹種について自殖試験を行ない種子の生産量を調べたところ、自然受粉のものよりは自殖のときの種子の生産量が著しく低下することを明らかにした。そして、林木では自殖をできるだけ避けるべきだと示唆した。その後多くの研究者によって、多くの樹種について自殖試験が行なわれている。すなわち、Cuffield (1950), Orr-Ewing (1954, 1957b), Sorensen (1969, 1971a, 1974), Sorensen and Miles (1974) らは Douglas-fir で自殖が起こると、他殖に比べて約 10%, Ponderosa pine (*Pinus ponderosa* L.) では約 35% の充実種子量しか得られないと報告している。また、Franklin (1969a, 1969c) は *Pinus taeda* L. について、Sorensen et al. (1976) は noble-fir (*Abies procera* Rehd.) について他殖の場合の約半分しか得られないと述べている。その他、Fowler (1964b, 1965b), Fowler and Lester (1970) は *Pinus resinosa* Ait で、また Koski (1973) は *Pinus sylvestris* L. について、Orr-Ewing (1965) は Douglas-fir

で、Lindgren (1975a) は *Picea abies* (L.) Karst で、齊藤ら (1973) はクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) で、横山ら (1973) はカラマツ (*Larix leptolepis* Gordon) で、そして勝田 (1964, 1966a, 1966b) はアカマツ (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) とクロマツについてそれぞれ、やはり自殖の場合充実種子量が低下することを認めている。しかし、なかには Franklin (1969a) が loblolly pine (*Pinus taeda* L.) について述べているように、個体によっては自殖でも他殖でも充実種子生産量に差が認められないものや、あるいは Wright (1976) の報告のようにユーカリ類や *Alnus incana* のように種としてその影響を受けにくいものなども知られている。また、一方では自殖した場合、稔性が低下する原因を細胞学的に調べている (Orr-Ewing 1957a, 1957b, Mergen et al. 1965, Hagman and Mikhola 1963, Hagman 1964, Ehrenberg et al. 1955, Forshell 1974, Lindgren 1975b)。そして自殖の場合、花粉の不発芽、花粉管の伸長停止、あるいは胚の発育不全 (embryonic abortion) などが起こることを明らかにしている。また、その原因を遺伝学的に調べているが、はっきりした説明はなされていない (Sorensen 1967, Fowler 1964a, Barnes et al. 1962, Kraus and Squillace 1964)。

生長量等については、1909年 Sylven が Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) 5 個体について自殖と自然受粉子供群の比較を行なったのが最初である (Eriksson et al. 1973)。すなわち、発芽力、1年生苗木の生存力、その後の定期的生長量など、いずれも自殖個体が劣り、1972年樹齢61年生時の材積では、自然受粉のものに比べて約半分にしかならないことを明らかにし、これらは自殖弱勢 (inbreeding depression) の効果であるとした。その後、自殖と他殖あるいは自然受粉の違いによる後代への影響は、多くの形質について調べられている (Fowler 1964b, 1965c, Hagman and Mikhola 1963, 勝田 1966a, 1966b, Mergen et al. 1965, Orr-Ewing 1954, 1965, Snyder 1968, Lindgren 1975a, Sorensen et al. 1976, Sorensen and Miles 1974, Koski 1973, Franklin 1969a, 1969b, Lester 1971, Anderson et al. 1974)。また、Franklin (1970) はマツ類35種について多くの研究者が行なった結果をまとめ、特に胸高直径、樹高、発芽率および残存率ではっきりした自殖弱勢の傾向があることを認めている。

また一方では、採種園の重要性が増大するにつれて、実際の林分や採種園での花粉の飛散による遺伝子の拡散 (gene flow) を把握しておく必要が生じてきた。当初は花粉の飛散距離を調べることから始められ、いろいろな方法で花粉の飛散距離や飛散分布の研究が行なわれた。Johnson (1945, 1948) は *Pinus nigra* var. *austriana* (Hoess) Aschers and Graebn. の孤立木から得られた種子数を調べ、充実種子が意外に多いことからかなりの自殖が起こっていて、花粉の飛散分布範囲は狭いのではないかと述べている。その後、アイソトープでラベルした花粉を用いたり、孤立木周囲に方向別、距離別にワセリンやゼラチンを塗布したスライドガラスを置いて花粉の飛散距離や分布範囲を調べた (Wright 1953, Wang et al. 1960, Strand 1957, Silen 1962)。その結果、花粉は稀に非常に遠くまで飛散するが、そのほとんどは案外、近距離内に飛散分布を示したと述べている。

Langner (1953) は Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) の林分内での花粉の動きを調べた。優性遺伝子によって支配されている淡黄色葉 (light yellow foliage) を標識 (marker) として、その遺伝子を持つ母樹を中心に、周囲木からそれぞれ得られた淡黄色葉苗の出現割合を調べ、その範囲は大体半径 20m 以内であることを明らかにした。

Squillace and Kraus (1963) は劣性ホモ接合体である白子苗 (albino) を標識遺伝子にして, slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) の林分内での自殖率を調べた。対象とした 11 本の母樹のうち, 9 本はいずれも 5% 前後, 残り 2 本は 23%~27% と意外に高い割合で自殖が起きていることを明らかにした。更に, Fowler (1965d) は劣性ホモ接合体である淡黄色苗 (pale yellow) と白子苗を標識遺伝子として, jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) の採種園内での自殖率を調べた。樹冠を上下に分けて調べたところ, 樹冠上部が平均 13% 前後の自殖率であったのに対して, 樹冠下部では倍の 26% にもなることを明らかにした。この結果から, 採種園を造成する場合, 母樹の樹冠の型や, 同一個体内での雌・雄花の着生分布などを認知しておくことの重要性を示唆した。その後, 種々の標識遺伝子を用いて, 多くの樹種で自殖率の推定が試みられてきた (Sorensen 1973, Koski and Malmivaara 1974, Sittmann and Tyson 1971, Teich 1969, 1970, Franklin 1971a, 1971b, Sorensen 1971a, Coles and Fowler 1976, Moffet 1956, Morgenstern 1972, 大庭ら 1971c, 大庭 1972b)。以上のことから, ほとんどの樹種で他殖と比べ自殖子供群の諸形質の方が劣ること, 有効花粉の飛散距離は意外に近く, 更に林分内での自殖はかなり高い割合で起きていることが明らかにされた。

近年, ザイモグラフ法によって, 林木の遺伝学的研究が行なわれ, 特に集団遺伝学的研究において, 数多くの報告がなされている (Sakai et al. 1971, Sakai and Miyazaki 1972, Tigerstedt 1973, Feret 1974, Bergmann 1973, 1974 Rudin et al. 1974, Rasmuson and Rudin 1971, 三上 1972)。一方, 出現したバンドのうち, 特定バンドをとらえ, それらのバンドの遺伝子分析がなされつつある (Lundkvist 1974, 1975, Feret and Stairs 1971, Bartels 1971, Conkle 1971a, 朴・酒井 1971, Müller 1976)。その結果, ある特定バンドは単純なメンデルの遺伝様式を示し, しかも共優性 (codominance) の場合は, 一對の対立遺伝子間に優劣関係がないことが明らかにされた。

すなわち, これらを標識遺伝子として用いるならば, 林木の交配様式は単木のみならず集団的にも解明することが可能であることを示唆している。

第 2 章 ヒノキの受粉と自殖による諸形質の変異

第 1 節 ヒノキの開花習性と受粉適期

人工交配を行なう場合, 受粉適期の判定や, 受粉回数あるいは花粉採取時期などをあらかじめ知っておくことは基礎的で重要な問題である。事実, 針葉樹を中心としたいろいろな樹種で, 雌・雄花の発達程度が肉眼的あるいは解剖学的観察によって調べられている (橋詰 1970, Pattinson et al. 1969, 河村・山田 1970, Barner 1960, 中井ら 1967a, 1967b)。

近年, 各公的試験研究機関に主要樹種ごとの採種園 (seed orchard) が造成され, 種子の生産が事業的に行なわれつつある。今後これらの採種園の運営において, 特に, 後代の遺伝的向上をはかるためには, ①各採種木ごとの雌・雄花の着生状態, ②同一個体内での雌・雄花の開花期の受粉適期に差があるかどうか, ③他のクローンと比べて開花期と受粉期に差があるかどうかなど, 特に受粉期におけるすべての採種木の着花と開花習性を知っ

ておく必要がある。

また、採種園内の交配様式は任意交配 (random mating) を前提としているが、これまでに行なわれてきた花粉の飛散距離や分布についての研究結果によれば、実際に受粉・受精に関与する花粉は案外近距離で小範囲に分布することが明らかにされている (Lanner 1966, Wang and Perry 1960, Silen 1962, Wright 1953, 1967, Sakai and Miyazaki 1972)。採種園でこのような現象が起きているとすれば、自殖の起こる確率は増大すると考えられる。

本実験は、採種園内での自然自殖率および異クローン間の交配の機会を調べる目的で次のような項目について調査した。①クローンまたは同一個体の樹型や樹冠の位置による雌・雄花の着生量の差。②同一個体内における雌・雄花の着生量の差。③同一個体内に着生している雌・雄花の発育状態の比較。④雌花の受粉適期と花粉の飛散時期の差の有無。

1) 材料および方法

本実験で用いた材料は、九州大学農学部粕屋演習林のヒノキクローン集植園に植栽されているヒノキ精英樹クローンで、その樹齢は14年生 (1976年3月現在) である。調査対象は、ナンゴウヒ (NO), 粕演20号 (K20), 粕演12号 (K12), 久原1号 (下) (KS1), 久原1号 (上) (KU1), 神埼4号 (K4), 長崎1号 (N1), 国東18号 (K18), 藤津2号 (F2), 嘉徳5号 (K5), 始良25号 (A25), 始良27号 (A27), 始良40号 (A40), 遠賀1号 (O1), 中津10号 (N10), 中津11号 (N11), 大分7号 (O7), 宇和島2号 (U2), 宇和島3号 (U3) および富士2号 (FJ2) の20クローンであった。調査はヒノキ雌・雄花が非常によく着生した1976年3月中旬から4月上旬にかけて行なった。

調査は主として肉眼的観察に基づいて以下のような方法で行なった。

(1) クローンごとの雌・雄花の着生状態と、同一個体内での着生分布。

着生状態を5つのレベルに分けた。また、着生分布は樹冠を上・中・下に大別して調査した。

(2) 各クローン別の雌・雄花の発育状態の調査。

雌・雄花がはっきりと見分けられるようになった3月中旬から4月上旬にかけて調査した。調査は雌・雄花の発育程度を5段階 (stage) に分けて日を追って調べた。そして、クローンごとの雌・雄花の発育時期と受粉適期との関係を比較した。

上記の調査結果に基づいて、「Stage-4」を受粉最適期とみなし、同一個体内の雌・雄花の発育段階の比較を行なうことで受粉最適期の差について検討した。

2) 結果

調査 (1)

調査は肉眼的観察に基づいて、雌・雄花別に着生量の多少で次の5つのレベル (quantity level) に分けた。

1. ほとんど着生していない (着生していてもきわめて少なく、ごくわずかに点在している程度)。
2. 着生量はきわめて少なく、部分的に着生している程度。
3. 着生状態はそれほどよいとは言えないが、一見して着生していることが分かる。

4. 着生状態は良好。

5. 全体的に非常によく着生していて、やや着きすぎている感じを与える。

また、着生部位の調査は樹冠を上・中・下に分けて行なったが、上部で特に偏在が認められた場合は、梢端部を別として取り扱った。なお、久原1号(上)(KU1)は1本しかなく、突然変異体なので本調査から除外した。それらの結果は Table-1 に示すとおりである。

Table-1. Indication of criteria for quantity level of male and female flowers in HINOKI, *Chamaecyparis obtusa* Endl.

Clones	Sex	Quantity level	Position of male and female flowers	Tree height(m)
Nangōhi (NO)	male	1	Upper main shoot	4.1
	female	1	"	
Kasuen 20(K20)	male	1	Upper main shoot	2.6
	female	1	"	
Kasuen 12(K12)	male	2-3	Middle and upper crown, omnipresence	4.2
	female	3	Whole crown, scattered	
Kubara 1 (KS1)	male	5	Whole crown, especially concentrate in middle	3.3
	female	5	Whole crown	
Kanzaki 4 (K4)	male	5	Whole crown, scarcely visible in upper shoot	3.7
	female	5	"	
Nagasaki 1(N1)	male	5	Whole crown	4.4
	female	5	"	
Kunisaki 18(K18)	male	4	Concentrate in middle and upper crown	4.7
	female	4	Whole crown	
Fujitsu 2 (F2)	male	2	Upper crown, a few	3.7
	female	2	Middle and upper crown, a few	
Kaho 5 (K5)	male	1	Upper crown, scarcely visible	3.7
	female	3	Upper crown, omnipresence	
Aira 25 (A25)	male	2	Middle and lower crown, a few	3.8
	female	4	Whole crown	
Aira 27 (A27)	male	1	Scarcely visible	4.4
	female	3	Whole crown, scattered	
Aira 40 (A40)	male	1.5	Upper crown, a few	4.1
	female	3	Middle and lower crown	
Onga 1 (O1)	male	5	Middle and upper crown	2.8
	female	5	"	
Nakatsu 10(N10)	male	5	Especially, upper crown	3.9
	female	5	Upper and middle crown	
Nakatsu 11(N11)	male	4	Upper and middle, scattered in lower crown	4.5
	female	4	Whole crown	
Ōita 7 (O7)	male	1	Upper crown and main shoot	4.2
	female	3	Middle crown, concentrate in main shoot	
Uwajima 2 (U2)	male	2.5	Middle crown, scattered in lower crown	4.4
	female	3.5	Whole crown	
Uwajima 3 (U3)	male	3	Whole crown	4.7
	female	2	Middle crown, a few	
Fuji 2 (FJ2)	male	5	Whole crown	2.3
	female	5	"	

種子生産量は気候や年度によって変動のあることは周知のとおりである。採種木の雌・雄花の着生量に関しては主としてジベレリンの樹幹への注入や、はく皮あるいは施肥など

の処理に基づいた研究がなされてきた（田中ら1971, 長浜・加藤1970, 細山田ら1975, 伊集院1976, 齊藤1964）。一方, 齊藤ら（1965）はカラマツ類3種, 43クローンについて5年間にわたり雌・雄花の着生量を調べた。その結果, いずれの樹種でもクローンによって着生量に差があることを明らかにした。また山手（1973）はヒノキに関して同様な結果を認め, 更に, 樹齢が比較的低い間（7, 8年生以下）は雌花の着生量が多いと述べている。本調査の結果でもクローンによって着生量に差があることが認められた。また, 同一個体内の雌・雄花の着生量は嘉穂5号, 始良25号, 始良27号, 始良40号, 大分7号などで雌花の着生量が多かった。しかしそれ以外のクローンではほぼ同じ着生量を示していた。

また, 同一個体内での雌・雄花の着生部位は, 樹齢や樹型あるいは立木密度などによってかなり異なることが認められている（百瀬1964, 齊藤1965）。Fowler（1965b）は *Pinus resinosa* Ait. の雌・雄花別に着生部位を調べ, 主として, 雌花は樹冠最下層部を除きほぼ全体に着生しているが, 雄花は中・下部に着生する傾向があると述べている。ヒノキの場合は, 雌・雄花とも樹冠の上・中部に着生し, 特に着生量が少ないほど, 樹冠上部に偏在し, 著しく少ない場合（quantity level 1）は梢端部付近のみにしか見られなかった。更に, 梢端部や着生枝での雌・雄花の分布は, 先端部に雌花が, それに隣接した下部（根元側）に雄花が着生していた。

調 査（2）

調査は, 自然受粉期が近づき雌・雄花の発達具合が肉眼的に観察できる3月17日から毎日行なった。調査に先がけて, 雌・雄花の発達状態を, その外観的特徴に基づいて, 便宜的に5つの発育「ステージ（Stage）」に分けた。各発育「ステージ」と外観的特徴との関係は下記のとおりである。

雌 花

Stage 1: 雌花の形状を呈しているが, まだ十分に発達せず, 苞りんは閉じている。

Stage 2: 成熟が進み, まもなく苞りんが開き始める。

Stage 3: 苞りんがわずかに開き, なかには受粉滴（pollination drop）を出しているものもある。

Stage 4: 苞りんは完全に開き, すべての雌花に露玉大の受粉滴が見られる。

Stage 5: 受粉滴は完全に消失して, 苞りんがやや丸みを帯び閉じてしまった状態。

雄 花

Stage 1: 大分大きくなっているが, 指でつぶすとまだ水分を十分含んでいる。

Stage 2: 指でつぶしてもほとんど水分がなくなった状態。

Stage 3: 黒紅色を呈していたが, なかの花粉のうが肥大して白はだ色の亀裂が見られる。更に, わずかであるが花粉をはじきだしたものもある。

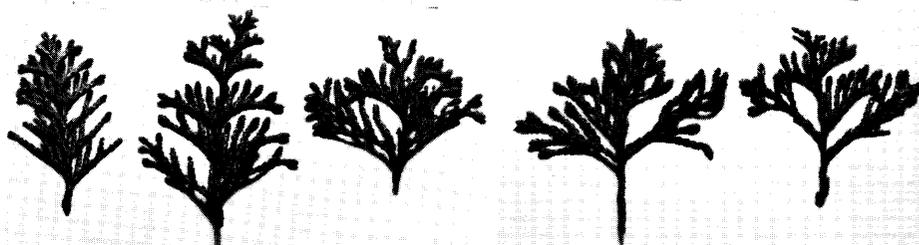
Stage 4: 指で触れると花粉がサラサラ落下する。

Stage 5: 花粉が飛び散ってしまって, 完全に殻だけになった状態。

各「ステージ」における雌・雄花の状態は Photo-1 に示した。また, 各クローン別, 雌・雄花別の各発育「ステージ」と経過日との関係は Table-2 に示した。

被子植物の両性花の中には雌雄異熟（dichogamy）のあることがよく知られている。しかし針葉樹類では, このような例はほとんど見あたらない。佐々木ら（1976）はカラマツの雌・雄花別の発育程度を調べ, その受粉適期はほぼ一致している事を明らかにした。ま

Male flowers



Female flowers

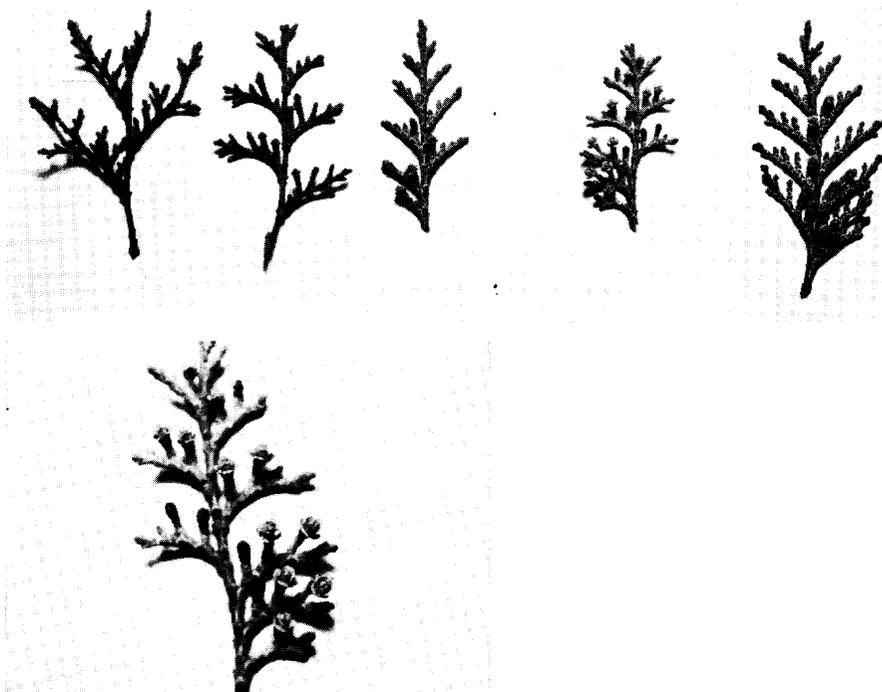


Photo.-1 Developmental stages of male and female flowers in Hinoki, *Chamaecyparis obtusa* Endl.
 Upper : male flowers. Middle : female flowers.
 From left to right, stage 1, 2, 3, 4 and 5.
 Lower : developmental stage-4 of female flowers (notice pollination drop).

た、橋詰・岡田（1968b）はヒノキの場合、雌花の開花の方が雄花よりやや早いと述べているが、本調査の結果（Table-2）では、同一個体内の雌・雄花の発育「ステージ」に著しい差は認められなかった。

更に、Table-2 でも明らかのように、ヒノキクローン間で発育「ステージ」がずれてい

Table-2. Change in male and female flowers developmental stage of twenty clones.

Clones sex		Mar.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Apr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NO	male	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2.5	3	3	3.5	4	4.5	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	3	3	4	4.5	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K20	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4	4.5	4.5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4	4	4.5	5
K12	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2.5	2.5	3	3	3	3	4	4	4	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2.5	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4	4.5	5	5
KS1	male	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3.5	3.5	3.5	4	4.5	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
KU1	male	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2.5	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K4	male	1	1.5	1.5	2	3	3	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3.5	4	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
N1	male	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2.5	3	3	3.5	3.5	3.5	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2.5	3	3.5	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K18	male	1.5	1.5	2	2	2	3	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3.5	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
F2	male	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2.5	3	3	3	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
K5	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3.5	4	4	4	4.5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3.5	4	4	4.5	5	5
A25	male	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2	2.5	3	3	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2.5	3	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
A27	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	3	3.5	3.5	4	4	4	4	4.5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	2	2	2	2	3	3	3	3.5	4	4	4	4	4.5	5	5	5

continued

Clones sex		Mar.	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	Apr.	2	3	4	5	6	7	8	9	10
		17															1									
A40	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2.5	3	3	4	4	4	4.5	4.5	5
	female	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2	2	2.5	3	3	3	3	3.5	4	4	4	4.5	4.5	5	5
O1	male	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2	3	3	3.5	3.5	4	4	4	4	4.5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2.5	2.5	3	3.5	4	4	4	4	4.5	4.5	5	5	5
N10	male	1	1	1	1	1	1.5	2	3	3	3	3.5	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2.5	3	3.5	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5
N11	male	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2.5	3	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	2	2	2	2	2.5	2.5	3	4	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5
O7	male	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	3	3	3	3	3	3.5	3.5	4	4
	female	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	3	3	3	3	3.5	4	4	4
U2	male	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2	2	2	2	2.5	3	3	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5
U3	male	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3.5	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2	2	2	2.5	3	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5
FJ2	male	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	female	1	2	2	2	2	2.5	2.5	3	3	3	4	4	4	4	4.5	4.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

ることが分かる。Table-2 のうち「ステージ」3を一応の開花期と考えるならば、雌花の開花の最も早かったクローンはK4とK18で3月25日、最も遅かったクローンはO7で、4月6日であった。また、雄花の開花期の早かったクローンはK4で3月21日、遅かったものはO7で4月3日であった。従って、開花期の遅速はクローンによって約2週間程度の差が認められ、残りのクローンはこの期間内にそれぞれ開花することが分かった。

横山 (1973, 1975), 渡辺・岩川 (1969), 中井ら (1967b), 橋詰 (1968b) らは、受粉の最適期は「満開」時の少し前からその後4~5日であろうと述べている。本調査では発育「ステージ」4を、いわゆる「満開」と考えて、開花期の最も早かったK18と、最も遅かったO7、およびその中間を示したO1の3クローンについて、発育「ステージ」と経過日および最適受粉期間を雌・雄別に図示した (Fig.-1)。

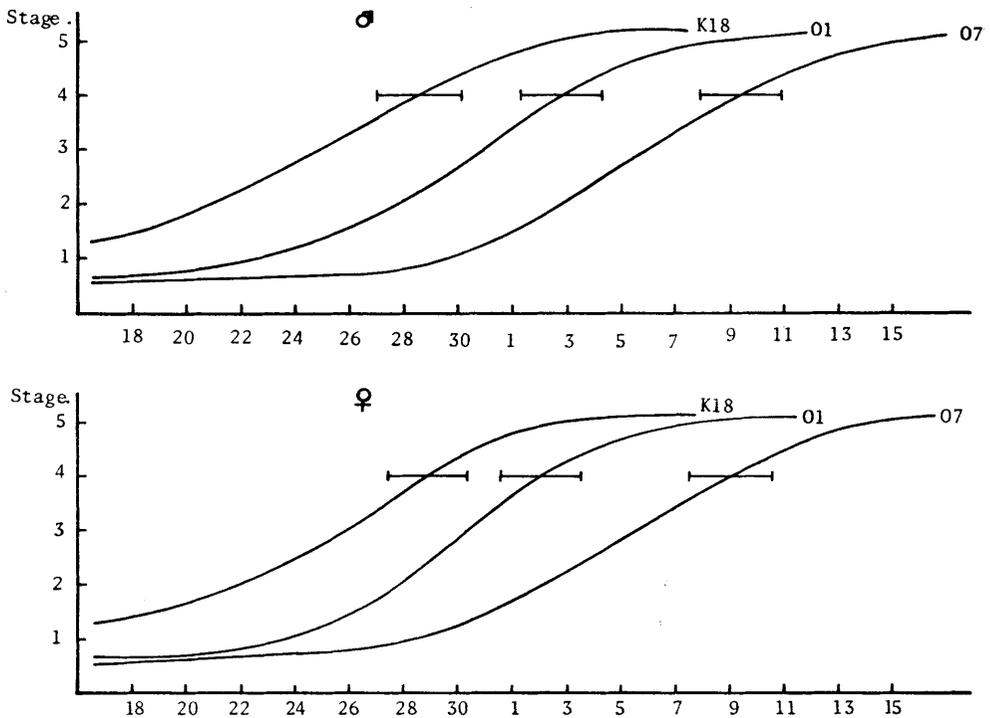


Fig.-1 Graphical illustration of the change in male and female flowers' developmental stages.

3) 考 察

Barner et al. (1960) は *Larix leptolepis* Gord. と *L. decidua* Mill. で、橋詰 (1970), 河村・山田 (1970) らはスギで、渡辺・岩川 (1969) はクロマツとアカマツで、Pattinson et al. (1969) は *Pinus kesiya* Royle ex Gordon (syn. *P. khasya* Royle) で、そして橋詰 (1968b) はヒノキについて、それぞれ受粉最適期あるいは雌・雄花の発育過程を細かく調べている。しかし、これらはいずれも人工交配を前提とした基礎的研究である。

本実験の目的は、採種園内の各クローン間で無作意交配が起こっているかどうかを調べるために、各クローン毎の開花習性や、受粉適期をあらかじめ知っておくことを主目的とした。したがって、組織解剖学的実験や、生殖生理学的実験も行わず、ただ雌・雄花の形態的变化の特徴を肉眼的にとらえ、更に、調査は比較的豊作と考えられた1976年の1回のみにとどめた。

調査の結果、同一個体内の雌・雄花の発育「ステージ」はほぼ一致しているが、クローン間ではその遅速に明らかな差があることが分かった。更に、受粉最適期を「ステージ」4とすると、約2週間のずれがあることが明らかとなった。九州大学農学部柏屋演習林のヒノキ精英樹集植園での自然受粉適期は3月28日頃から4月10日頃までで、特に3月末日から4月5日頃までの約1週間を最盛期と考えてよかろう。また、自然条件下であるため、実際の開花は急に暖くなるような天候によって大きく影響されるし、年度によっても異なってくるだろうが、「ステージ」4はせいぜい2～3日位で、意外に早く花粉が散ってしまうこと、また雌・雄花の着生部位が非常に隣接していること、あるいは、菊池・古越(1976)、Sakai and Miyazaki(1972)らがスギで、Wright(1953)がash, elm, *Atras ceder*などで、更にSilen(1962)やWang et al.(1960)がDouglas-firやマツ類について述べているように花粉の飛散分布は案外狭い範囲であることなどを考慮すると、採種園内で起こっている交配は意外に限られた範囲のものであることが予想される。

第2節 ヒノキの自殖による諸形質の変異

イネ、ムギ、トウモロコシ、タバコなどは長年月にわたって栽培が続けられてきた。その間に、選抜や交雑が繰り返され、また突然変異など種々の人為的操作が加えられて、遺伝的固定が行なわれ現在にいたった。その間数多くの品種が作り出されてきた。

他方、林木は自然状態のまま取り残され、ごく一部を除き、いわゆる野生種として取り扱われてきた。したがって、林木は遺伝的にはヘテロ接合体(heterozygote)で、他殖性植物(allogamous plant)である。このような林木が、近親交配(inbreeding)を行なうと、その後代でいわゆる自殖弱勢(inbreeding depression)の傾向が生ずると言われている。

林木についてこれまでに行なわれてきた近親交配に関する研究は、2, 3の報告(Orr-Ewing 1965, Anderson et al. 1974, 勝田 1966a, 齊藤ら 1973)を除き、自殖に関するものがほとんどである。そして、多くの樹種について、またいろいろな形質について報告されている(Langner 1959, 野口・渡辺 1972, Ehrenberg 1955, Orr-Ewing 1954, 1957b, Koski 1973, 勝田1964, 1966b, 原・山口 1971, Diechert 1964)。

これまでに行なわれてきた研究内容を大別すると次のようになる。すなわち、①充実種子生産量の違い、②発芽率や上胚軸長など発育初期に見られるような諸形質、③苗木の残存率や奇型苗、④苗高や樹高あるいは材積など。その結果、樹種や種内で、または個体によってその程度に差が認められる(Bingham and Squillace 1955, Franklin 1969a, 1969c)が、一般に多くの形質で、自殖による弊害があらわれることを報告している。なかでも、Franklin(1969a)は*Pinus taeda* L.の生産種子量などで、またEriksson et al.(1973)は*Picea abies* (L.) Karst.の材積について、いずれも自然受粉のものに比べて半分以下にしか達しないことを明らかにするとともに、林業上での注意を促した。

このように、自殖による弊害がどのような樹種でも一様に起こるとすれば、生育期間の長い林木にとって、その影響はきわめて大きく、林木の育種を進めていく場合、特に考慮されるべき問題であるといえる。

本実験では、ヒノキ (*Chamaecypris obtusa* Endl.) の自殖による後代への影響を明らかにするため、自殖子供群と他殖子供群との比較を行なった。特に生育初期に得られる種々の形質についてその影響の違いを調べ、この樹種の自殖に関する特性を検討した。

1) 材料および方法

1972年、1973年および1974年の3カ年間、ヒノキ精英樹クローン間の交配試験を行なった。交配試験に用いた材料は、九州大学農学部粕屋演習林ヒノキクローン集植園の精英樹クローンである。1972年と翌1973年の交配試験で使用したクローンは、Table-1 に示したもののうち粕演12号と始良40号を除いた17クローンである。この両年は、いわゆるヒノキの凶作年であったため思うように交配試験を進めることができなかった。つぎに、1974年の交配試験で使用したクローンは、ナンゴウヒ、神埼4号、国東18号、藤津2号、始良25号、遠賀1号、宇和島2号、宇和島3号、粕演12号、粕演20号、始良27号、中津10号、大分7号の18クローンである。この年はヒノキの豊作年であったため、完全ダイアレルクロスの型で交配試験を行なった。交配試験は各年の3月下旬から4月上旬の間に行なった。すなわち、3月中旬、雌花の着生量の多い枝を選んで除雄し、二重パーチメント交配袋を用いて包み込み、開花期をみはからって、あらかじめ採集していた花粉を花粉銃で注入し受粉させた。花粉の注入は時期をずらして原則的に2回行なった。そして、それぞれの年の秋、大体10月上旬に採種し、肉眼選別し、種子重を測定して、それぞれの年の翌春、播種するまで低温保存した。

1972年と1973年に交配した種子の播種試験は、九州大学農学部粕屋演習林の温室内で、また1974年に交配したものは、九州大学農学部のガラス温室内で行なった。播種床はいずれも加熱消毒した砂土を8cmの深さにつめた播種用バット(34×43×10cm)を使用した。そして播種前にN・P・K(13:8:9)配合化成肥料を15g/バット施用した。途中、消毒のため4-4式ボルドー液やマルカ「オーソサイド」水和剤約0.7ℓ/m²を散布した。

測定形質は、種子1000粒重、発芽率、胚軸長(hypocotyl length)、下胚軸長(epicotyl length)、子葉形態、1年目の苗木の残存率および2年生苗高である。これらのうち、胚軸長、下胚軸長および子葉形態については1974年のものについて行ない、発芽してから約5カ月経過した8月上旬に測定した。

種子重と発芽率は1974年のものを中心とし、欠損したクローンについては前2年のもので補った。残存率は1974年のもので、採種後約1年経過した1976年2月下旬、18クローンについて調べた。また、2年生苗高については、播種後1年間温室で育苗し、1976年3月下旬、九州大学農学部粕屋演習林の苗畑に移植し、同年10月下旬測定を行なった。したがって、交配試験を行なって苗木に至る過程で、交配の不備のため種子が十分得られなかったものや、発芽しても生育途中で自然消滅したものがあったため、各測定形質のクローン数は必ずしも同じではない。

2) 結 果

測定形質は得られた種子から発芽して、苗木に至る比較的初期の生育段階に得られた7つの形質である。

肉眼選別した自殖種子と他殖種子の各1000粒重の相関図を Fig.-2 に示した。全部で17クローンである。横軸に他殖区の種子重を、また縦軸に自殖区の種子重をクローン別に示した。図から明らかなように、その大多数が破線で示した対角線より下方に現われた。すなわち、同一クローンの自殖種子と他殖種子では自殖種子重の方が小さいことを示している。

種子重に関しては red pine, loblolly pine, Douglas-fir, ponderosa pine, スギあるいはヒノキについて報告されている (Sorensen and Miles 1974, Franklin 1969a, 1969b, Fowler 1964b, 1965a, 大庭 1972c)。そして、いずれも自殖種子重が小さくなると述べている。しかし、その程度はわずかで、Franklin (1970) がマツ類について調べた結果では、他殖種子重1に対して自殖種子重は0.97前後であったと述べている。また、勝田 (1964) はアカマツとクロマツについて調べた結果では、逆に自殖種子重がやや大きかったと述べている。ヒノキの場合は、その比は約0.9でマツよりやや低下の割合が大きいことが分かった。このように、自殖種子重が小さくなる理由として、シイナ粒が多いこと、遺伝的な理由により胚の発達が途中で退化した不完全種子が多く含まれているためと思われる。

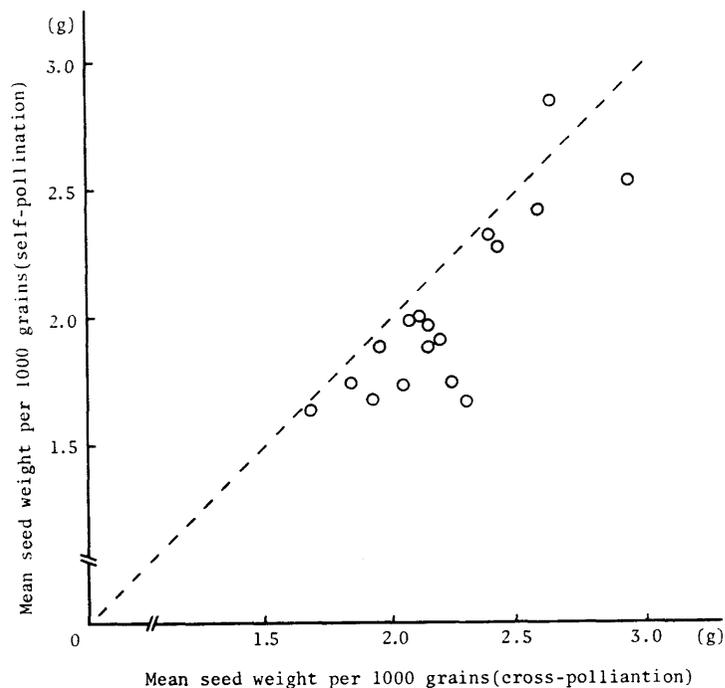


Fig.-2 Correlation of mean seed weight between cross- and self-pollinated 1000 seed grains from Hinoki plus trees.

次に発芽率に関する自殖区と他殖区の相関図を Fig.-3 に示す。全部で17クローンである。他殖区の発芽率が高いものは32.9%、低いものは0.86%であった。また自殖区では

高いものは 25.4 %, 低いものは 0.4 % であった。いずれの区でもクローンによるバラツキが見られた。しかし、同一クローンでこの両区を比べると、ほとんどのクローンが破線で示した対角線の下方に位置し、自殖種子は発芽率が低いことが分かる。しかし、図中、自殖区でかえって発芽率の良いものがみられたが、このような例は Douglas-fir についても報告されている (Orr-Ewing 1954)。しかし、*Pinus monticola* Dougl. (Bingham and Squillace 1955, Barnes et al. 1962), スギ (大庭 1972b, 1973), Douglas-fir (Orr-Ewing 1965) およびアカマツ, クロマツ (勝田 1964) など多くの樹種で認められているように、一般に自殖種子の発芽率は低下する。Franklin (1969a) は loblolly pine で同様な実験を行ない、自殖による発芽率の低下率は 10% 程度だと述べている。また、Koshi (1973) は *Picea abies* (L.) Karst. の他殖種子の発芽率は 65~75 % であるのに、自殖種子ではわずかに 6~8 % に過ぎなかったと述べている。ヒノキ他殖種子の発芽率はスギやマツに比べて低く、平均 20% と言われているが、自殖種子では約 10% であった。更に、自殖による発芽率の低下率は 36.7% であった。

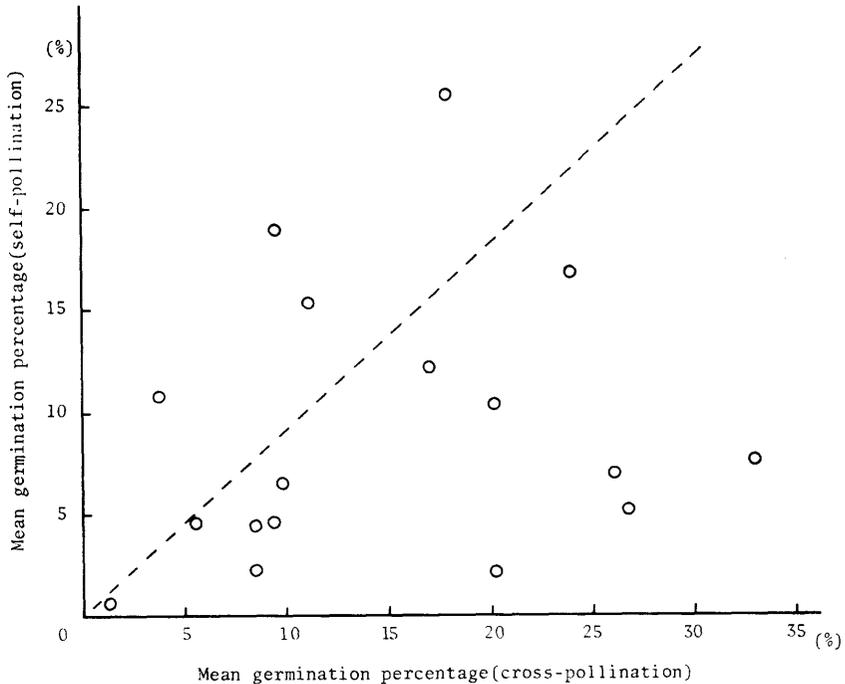


Fig.-3 Correlation of mean germination percentage between cross- and self-pollination from Hinoki plus trees.

Fig.-4 は子葉 (cotyledon) の形態に関する自殖区と他殖区との相関図である。子葉形態の表示は子葉の長さに対する幅の比で示した。また、Fig.-5 は胚軸長と上胚軸長に関する自殖区と他殖区との相関図である。子供群数の関係から、これら 3 形質を 8 クローンについて調べた。3 形質はいずれも対角線をはさんで下方に位置し、自殖区の方が小さかった。交配の違いによる子葉形態の差異についての報告はみあたらないが、子葉は発芽

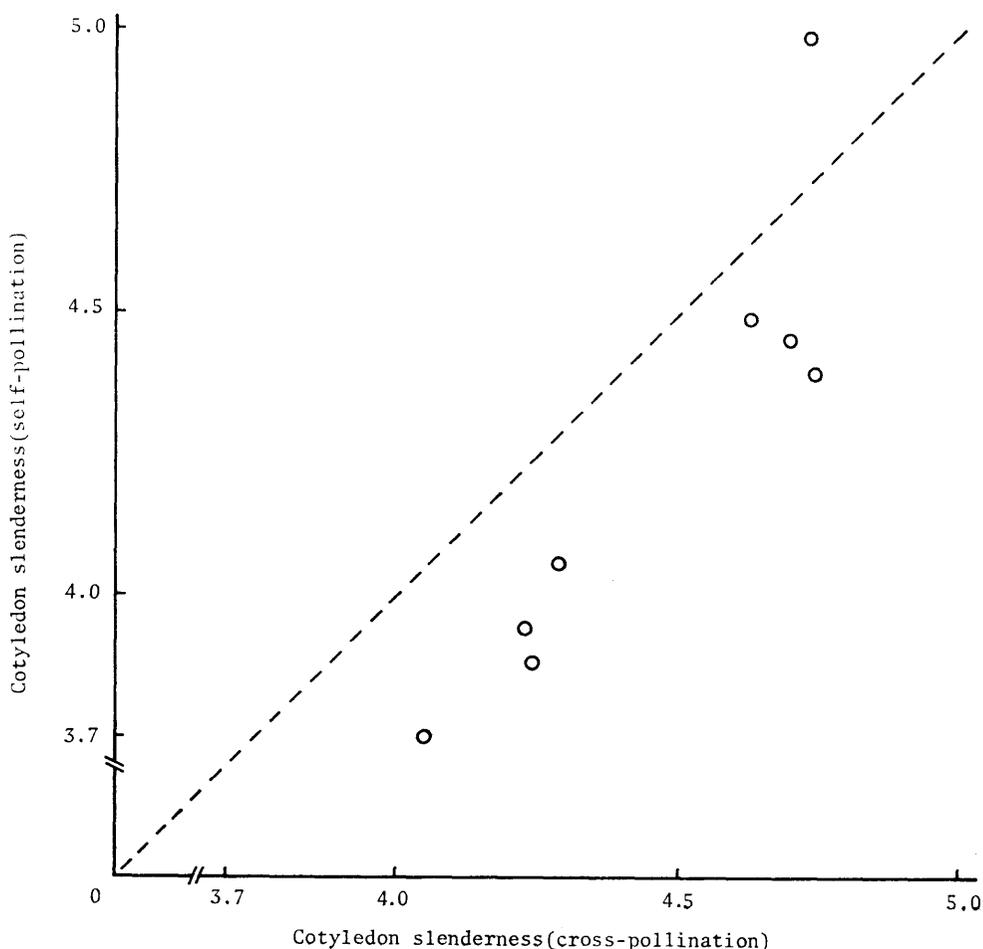


Fig.-4 Correlation of slenderness which was expressed the ratio of cotyledon length to width between cross- and self- pollinated progenies originated from every Hinoki plus tree.

当初の栄養をつかさどっていることから、その後の生育に影響をおよぼしているものと考えられる。また、上胚軸長は loblolly pine (Franklin 1969c), red pine (Fowler 1965a) で、また胚軸長は noble-fir (Sorensen et al. 1976), *Pinus monticola* Dougl. (Squillace and Bingham 1958) および Douglas fir (Sorensen and Miles 1974) でそれぞれ報告されている。勝田 (1964) はクロマツの上胚軸長は他殖区に比べ14%程度小さいと述べている。ヒノキでも、これら3形質いずれも自殖区の方が小さく、他殖区のものに比べ、子葉形態は5%、胚軸長は4%そして下胚軸長は9%低下していた。

残存率 (survival percentage) は、播種後約1カ年経過した時期の残存個体数を発芽個体数で除した値を百分率で表わした。その結果は Fig.-5 に示した。残存率や死亡率は *Pinus*, *Picea*, *Larix* および *Pseudotsuga* (Franklin 1970) などについて調べられ、明らかに自殖子供群の方が死亡の割合は高い。ヒノキの場合もまた同様であった。ただ図中

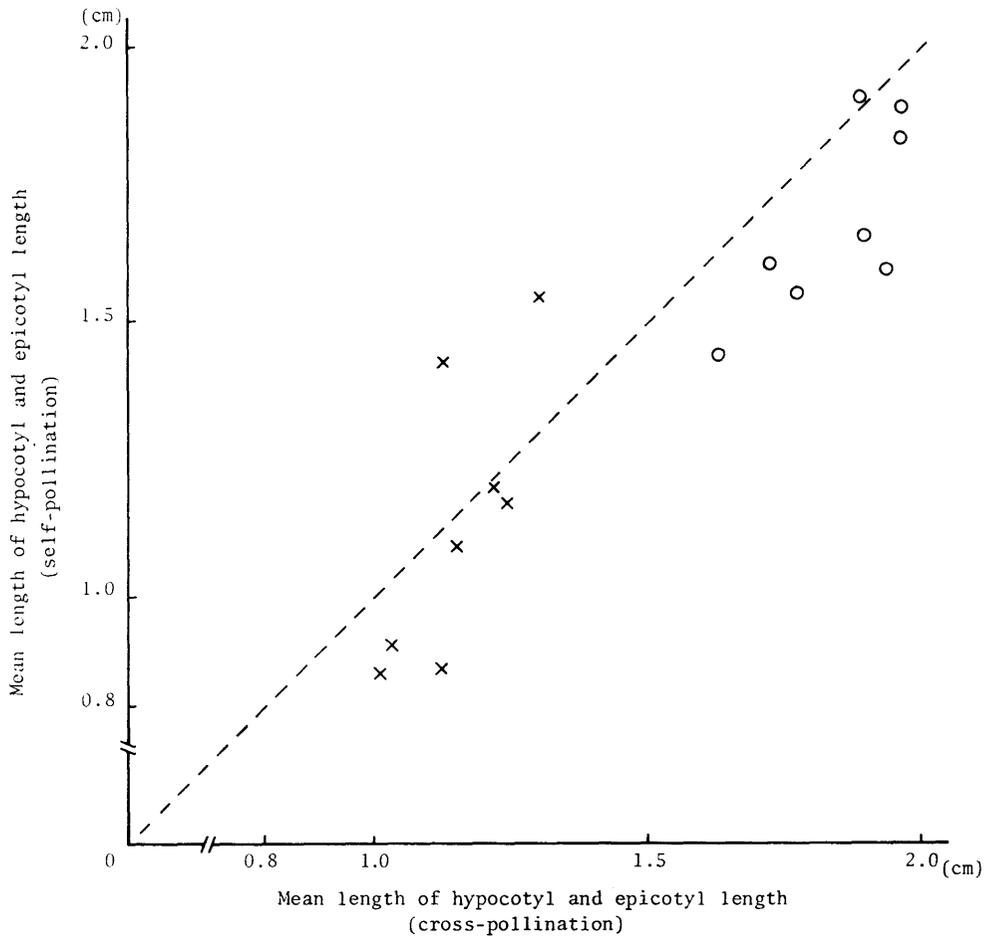


Fig.-5 Correlation of mean length of hypocotyl and epicotyl length between cross- and self-pollinated progenies from Hinoki plus trees.
(x : hypocotyl length, o : epicotyl length)

(Fig.-6), クローンによるかなりのバラツキが見られ, 更に自殖区のもの低いものも認められたが, これは生育期間中の灌水の不備や, 一部原因不明の疾病が生じたことなどによるものと考えられる。

2年生苗高に関する7クローンの自殖と他殖の相関図を Fig.-7 に示した。7クローンのうち, 5クローンで自殖弱勢が認められた。相当のバラツキがみられたが, 平均すると5%の自殖弱勢が起っていた。

樹高の自殖弱勢に関しては, いずれも比較的若い樹齡であるが, *Picea abies* (L.) Karst. (Koski 1973), loblolly pine (Franklin 1969a, 1969b, 1969c, 1970), Douglas-fir (Sorensen and Miles 1974, Sorensen et al. 1976), スギ (大庭 1973), クロマツとアカマツ (勝田 1964) など多くの樹種で調べられている。更にスギ (外山ら 1976) や rad pine (Fowler 1965c) のように, 自殖してもまれに非常に生長の優れた個体や, あ

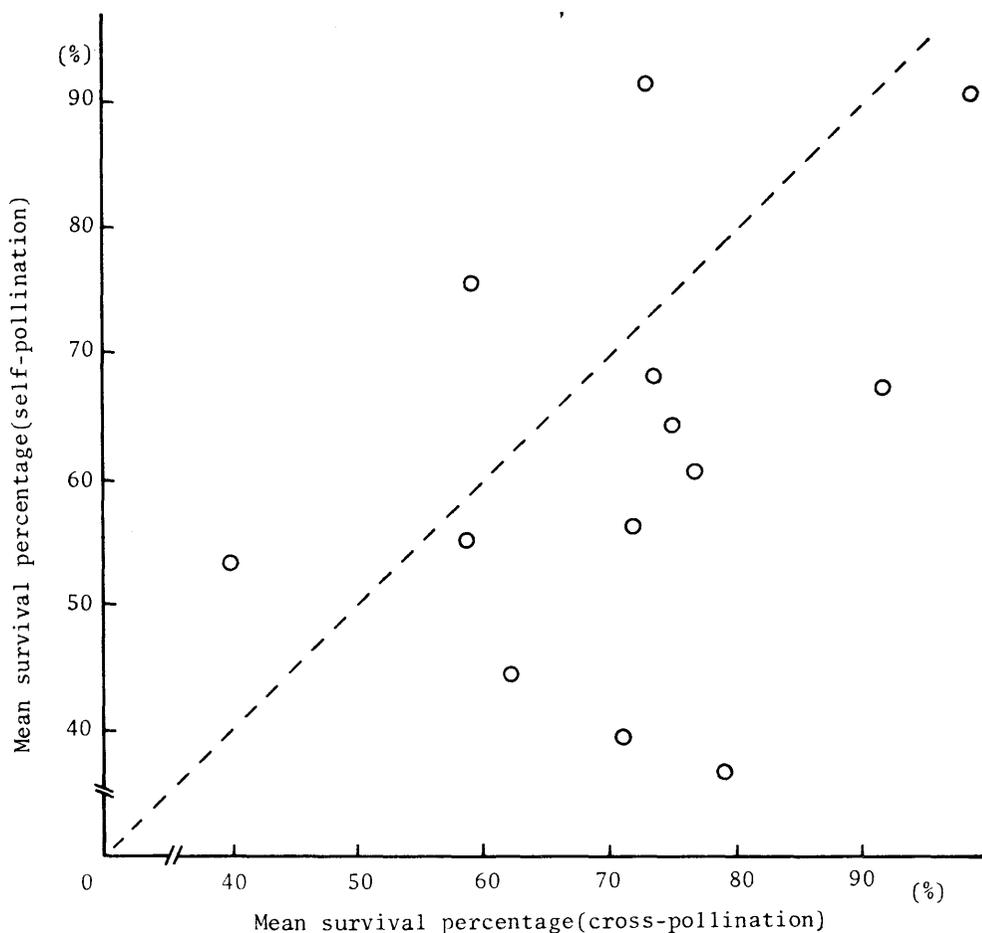


Fig.-6 Correlation of mean survival percentage between cross- and self-pollinated progenies from Hinoki plus trees.

るいは親木が存在することも認められている。

次に本実験で調べた7形質の平均的な自殖弱勢の程度（自殖子供群/他殖子供群）をTable-3に示した。いずれの形質も、その値は1より小さく、特に発芽率と残存率の値が小さかった。

Table-3. Effects of one generation of selfing on seed and seedling traits in HINOKI, expressed as ratios of mean value after self-pollination divided by mean value after cross-pollination.

Pollination / Traits	Seed weight (g./1000)	Germination percentage (%)	Cotyledon type (C. L./C.W.)	Hypocotyl length (cm)
Self-pollination	1.99	9.65	4.25	1.68
Cross-pollination	2.21	14.79	4.45	1.84
Self-P./Cross-P.	0.90	0.63	0.95	0.91

Pollination / Traits	Epicotyl length (cm)	Survival percentage (%)	Seedling height (cm)
Self-pollination	1.13	61.87	11.78
Cross-pollination	1.18	72.14	12.40
Self-P./Cross-P.	0.96	0.84	0.95

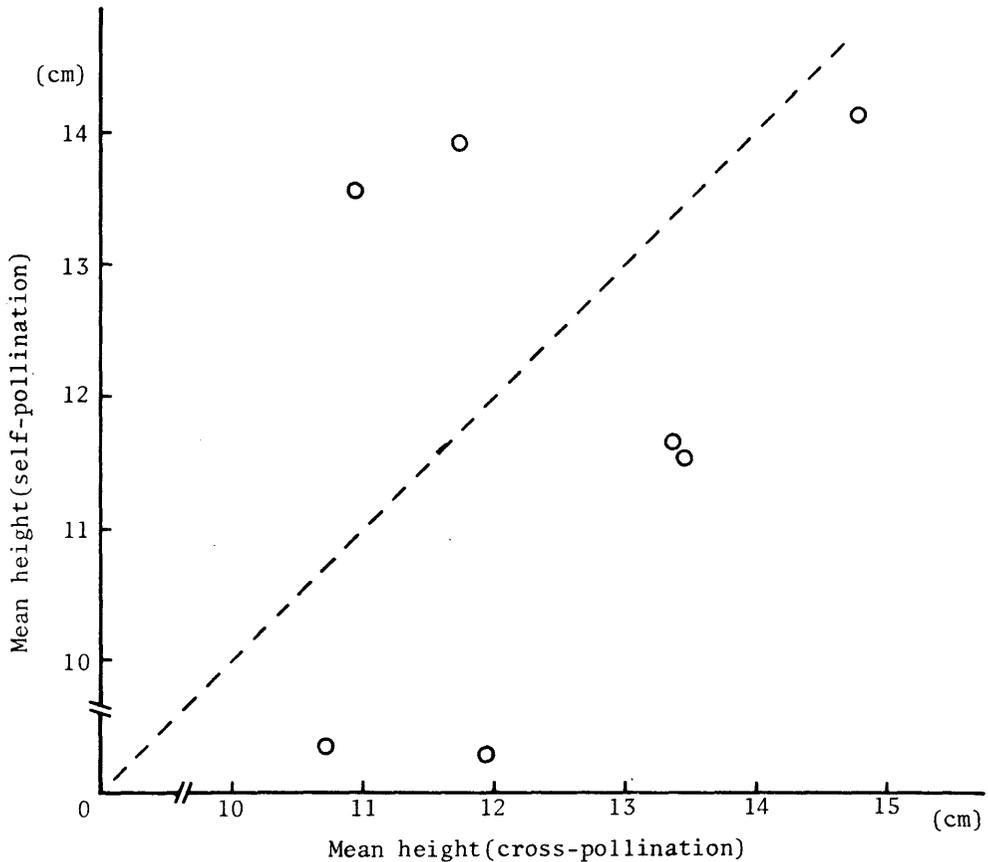


Fig.-7 Correlation of mean seedling height between cross- and self-pollinated progenies from Hinoki plus trees. The seedlings were two-years old.

3) 考 察

本実験では自殖と他殖の違いによる種子生産量についての配慮を欠いた。しかし、この形質も自殖区の方が低下するという報告が数多くの樹種でなされており(齊藤ら 1973, Bramlett and Polham 1971, Mergen et al. 1965, Forshell 1974, Koski 1973), とくに Bingham (1955) は *Pinus monticola* Don について、球果着生率は両交配区で差はないが、充実種子量は他殖区の 50% にしか達せず、そのうちシイナが約半分をしめ、発芽率は更に低下すると述べている。また、野口・渡辺 (1972) はアカマツを用いて 4 年間自殖

試験を行なった結果、同一木の球果着生率は年度によって異なるが、それ以上に、交配の違いによるタネのでき方に差があり、更に母樹によっても差があることを認めている。

本実験によるヒノキの場合、もろもろの形質で、はっきりした自殖弱勢の効果がみられた (Table-3)。また生長量に関しては2年生苗高までにとどまった。しかし、Sorensen and Miles (1974) は Douglas-fir の樹高に関して、その自殖弱勢の程度を樹齢との関係から調べたところ、自殖子供群の樹高は他殖のものに比べ、0.82, 0.72 および 0.68 と樹齢とともにその差が大きくなることを報告している。さらに61年生の *Picea abies* (L.) Karst. では約半分の材積にしか達しない (Eriksson 1973) ことなどから、ヒノキの場合も、樹齢にともなってその差が大きくなるものと予想される。

また、*Pinus resinosa* Ait. (Fowler 1965a, 1965b) のように樹種として自殖弱勢の効果が現われにくいものが存在し、種によってその程度に差があることも認められている。Koski (1973) は *Picea abies* (L.) Karst. で、Franklin (1972) は loblolly pine で、さらに Snyder (1968) は slash pine など、それぞれ自殖の影響が大きく表われることを明らかにしている。Franklin (1970) はいろいろな樹種を4つの属に分けて、自殖弱勢の程度を比較し、*Pinus* で 0.90, *Picea* で 0.91, *Larix* で 0.73, そして *Pseudotsuga* で 0.68 であると述べている。ヒノキの場合、2年生苗高で 0.95 (Table-3) であった。しかし、Table-3 に示したように、もろもろの形質で、明らかに自殖弱勢の効果がみられること、さらに樹高は樹齢とともにその差が大きくなることなどから、ヒノキの自殖弱勢の程度はかなり大きいと考えられる。また、同一母樹でも、自殖弱勢の程度は調べた形質によって違っていた。これは各形質を支配する遺伝子構成が母樹によってそれぞれ違うためだと考えられる。

林木のように生育期間の長い永年生作物において、このように自殖弱勢が表われることは今後の林木育種を進めていく上で、特に考慮すべき問題である。一方、Diechert (1964), Eriksson (1976), 原 (1967, 1971) や戸田・西村 (1971a, 1971b, 1973) らが述べているように、精英樹クローン間の組み合わせ能力に差があることから、今後これらの問題をも含めて林木育種事業を進めていくべきであろう。

第3章 組み合わせ能力の推定と劣性ホモ接合体の検出

第1節 ダイアレルクロスによる組み合わせ能力の推定

林木の遺伝的改良方法の一つとして交雑育種法がある。林木の交配試験は、かなり古くから行なわれている。しかし、マツ属をはじめ、カラマツ属、ハコヤナギ属あるいはヒノキ属などでみられる種間交雑に関するものが多い (中井 1972, 1974, Genys 1974, 田淵ら 1967, Nilsson 1974, Wright 1976)。これらのうち、比較的最近報告されたアカマツとクロマツの交雑試験 (小林・今井 1963, 中井ら 1967a, 西村ら 1974) によると、稔性は双方の自然受粉より劣るが、アカマツよりクロマツを母樹にした方が良く、 F_1 の生長量はクロマツ×アカマツの方がはるかに優れ、いわゆる雑種強勢 (heterosis) が表われていたことなどを報告している。また *Pinus rigida* × *P. taeda* の F_1 (× *Pinus rigitaeda*) は事業的な成功を収めている (Hyun 1956, 1972)。

近年、林木の遺伝的改良を目的として、各試験研究機関に採種園が造成され、従来の採種林、あるいは特定採種木にかわって、採種園から全面的に種子を供給しつつある。

他方、林木のように永年生作物では、一度植えつけられたものは長年月にわたって同一個体を栽培しつづけるので母樹の良否が経営上におよぼす影響はきわめて大きい。したがって、我々はできるだけ多量の種子を、しかも遺伝的特性のすぐれた種子を提供できるように努めるべきである。

採種園母樹は、各地域で精英樹として選ばれ、クローン増殖されたものであるが、まだその遺伝的特性についての検定はなされていない。

これまで行なわれてきた遺伝的特性の研究として、スギ、ヒノキ、およびマツ類などで遺伝率 (heritability) の推定が試みられた。調べられた形質も、樹高、胸高直径、枝張り、ほそり、クローネ幅および枝下高のほか繊維長、年輪幅、ねじれ、比重などにまでおよび、特に樹高、胸高直径などの主要形質は、0.24~0.80 と幅があるが、比較的高い遺伝率を示すことが明らかにされた (Toda 1958, 1964, 有田 1964, 明石ら 1972, 矢幡ら 1971, 1972, Steinhoff and Hoff 1971, Sakai and Hatakeyama 1963, Matziris and Zobel 1972, Squillace et al. 1967, Nicholls et al. 1964, Sonith 1967, Hyun 1970)。他方では、各母樹ごとの自然受粉子供群の生長量を比較する次代検定 (progeny test) が行なわれ (長浜・野中 1975a, 1975b, 明石・松永 1966, 塚原ら 1966, 戸田・明石 1963, Farmer 1970)、母樹によって差があることが明らかにされた。このことは、組み合わせによって、目的とする形質の遺伝的向上がはかられることを示唆している。

一般に、ヘテロシスは固定できないので、常に、特定母樹の交配により F_1 を作り出す必要がある。しかも、そのためにはできるだけ優れた種子を容易に、しかも多量に作り出す必要がある。

本実験では、まだあまり研究が進んでいないヒノキ精英樹クローン間の完全ダイアレルクロスを行ない、その後代におよぼす影響を明確にする目的で、一般組み合わせ能力 (general combining ability : G. C. A.)、特定組み合わせ能力 (specific combining ability : S. C. A.) および相反交雑の効果 (reciprocal combining effect : Recip.) をいくつかの形質ごとに調べた。そして、狭義の遺伝率の推定を試みた。

1) 材料および方法

(1) 発芽率、胚軸長および子葉形態

1974年4月上旬、九州大学農学部柏屋演習林ヒノキクローン集植園の精英樹13クローンをを用いて人工交配を行なった。交配型は 13×13 の完全ダイアレルクロス型を目的としたが、交配の不備や、組み合わせ当りの充実種子数の減産などのため、最終的に得られたものは 8×8 の 64 組み合わせであった。用いたクローンは、ナンゴウヒ (NO)、神埼4号 (K4)、国東18号 (K18)、藤津2号 (F2)、始良25号 (A25)、遠賀1号 (O1)、宇和島2号 (U2)、および宇和島3号 (U3) である。

同年10月中旬採種し、さらに選別し、翌1975年4月4日~10日、九州大学農学部ガラス温室内で播種した。播種床は加熱消毒した砂土を 8cm の深さにつめた播種用バット (34×43×10cm) を使用した。播種前に N・P・K (13 : 8 : 9) 配合化成肥料を 15g/バット 施用した。途中、消毒のため 4-4 式ボルドー液とマルカ「オーソサイド」80 水和剤を

0.70 ℓ/m^2 散布した。

測定形質は次の3つである。発芽率 (germination percentage) : 播種後28日間の累積発芽率。胚軸長 (hypocotyl length) および子葉形態 (cotyledon length/c. width) : 播種後約5カ月経過した8月上旬に万能拡大器を用いて測定した。

播種試験は3回反復とし、1回当りの播種数は400粒とした。発芽率はアークサイン (Sin^{-1}) 変換したものをを用いた。また、胚軸長と子葉形態に関する1組み合わせ当りの測定個体数はそれぞれ15個体で、2回反復した。

(2) 苗 高

これらの稚苗はそのままの状態です約1年間育苗し、適宜4-4式ボルドー液を用いて消毒した。そして、1976年3月15日、九州大学農学部粕屋演習林の苗畑(1×20m)に組み合わせ別に移植した。発芽後、約1年間の温室での育苗中、疾病や原因不明の自然消滅などのため欠損区が生じ、苗畑移植時、最終的に残ったのは7×7の完全ダイアレルクロス型であった。それは前記(1)で述べたもののうち宇和島3号(U3)を除いた7クローンである。

1組み合わせ当りの移植苗木本数は原則として100本とした。そして、1976年10月上旬、苗高の測定を行なった。測定は1組み合わせ当り30本とし、2回反復とした。移植後、自然枯死したものなどが生じたため、全測定本数は2,649本であった。

ダイアレルクロスによる解析法は、その目的によっていくつかの方法が報告されている(Hayman 1954, 1958, Jinks 1954, Yates 1947, Kempthorne 1956)。本実験では、一般組み合わせ能力、特定組み合わせ能力、相反交雑の効果および自殖の効果についての解析を主目的としたため Griffing (1956) のモデル(純系の場合)の解析法を参考にし、更に、遺伝率の推定は Becker (1964) の方法を参考にした。

2) 結 果

4形質に関し、各クローンの雌・雄親別の違いを調べ、その結果を Table-4 に示した。この表から明らかなように、それぞれの形質の全平均値と比べると、各クローンの雌・雄でかなりのバラツキが見られる。例えば発芽率(Germ. per.)の全平均値21.59%よりも高い値を示している雌親はNO, K18, O1, 雄親はK4, K18, F2である。しかし、雌・雄いずれとも高い発芽率を示しているのはK18のみであった。胚軸長(Hypo. L.)ではNO, A25, O1, 子葉形態(C.L./C.W.)ではK4, O1, U2が雌・雄いずれも高い値を示した。また、2年生苗高(seedling height)に関して全体の平均値12.35cmよりも高い値を示したのは、雌親ではK4, F2, A25, 雄親ではF2, A25, O1で、雌・雄いずれも高い値を示したのはF2とA25のみであった。それぞれの形質によって高い値を示しているクローンは必ずしも一致していないが子供群の各形質におよぼす母樹の影響は相当に大きいものと予想される。

次に、4形質それぞれについて、組み合わせによる違いがあるかどうかを調べた。その結果は Table-5 と Table-6 に示した。表から明らかなように、4形質いずれも組み合わせ(Crosses (F_1))で非常に高い確率(1%レベル)で有意差が認められた。また、発芽率と苗高の2形質について雌・雄親に分けて、その影響を調べた結果を Table-7 に示した。「雌親(females)」, 「雄親(males)」, およびこれらの交互作用「雌親×雄親(fe-

Table-4. The mean value for germination percentage, hypocotyl length, C. L./C. W. and seedling height.

Clone	sex	Germ. Per.		Hypo. L.	C. L./C. W.	Seedling height
		(%)	sin ⁻¹	(cm)		(cm)
NO	females	33.79	19.96	1.95	4.26	11.91
	males	18.23	10.58	1.97	4.42	12.14
K4	females	20.25	11.75	1.74	4.57	13.36
	males	23.54	13.72	1.72	4.55	12.21
K18	females	28.03	16.36	1.89	4.19	11.53
	males	25.48	14.93	1.70	4.09	11.49
F2	females	15.61	8.99	1.93	4.02	13.28
	males	22.57	13.09	1.78	4.39	12.67
A25	females	8.90	5.11	1.87	4.61	14.65
	males	20.06	11.69	1.82	4.43	12.69
O1	females	26.04	15.24	1.87	4.77	11.23
	males	21.42	12.44	1.89	4.52	13.27
U2	females	19.72	11.40	1.61	4.70	10.49
	males	21.23	12.35	1.86	4.49	11.88
U3	females	20.35	11.80	1.71	4.19	—
	males	20.15	11.80	1.83	4.52	—
Average	females	21.59	12.58	1.82	4.43	12.35
	males					

Table-5. Analysis of variance for germination percentage and seedling height.

Souce	Germination percentage				Seedlings height			
	d.f	S.S	M.S	F	d.f	S.S	M.S	F
Crosses (F ₁)	63	9140.3106	144.5129	27.6215**	48	342.5891	7.1373	7.0897**
Replications	2	6.1198	3.0599	0.5849	1	4.8494	4.8494	4.8171
Crosses × Replications	126	659.2250	5.2319		48	48.3225	1.0067	
Total	191	9769.6554			97	395.7610		

** : Significant at 1% level.

Table-6. Analysis of variance for hypocotyl length and C.L./C.W.

Souce	d.f	Hypocotyl length			C.L./C.W.		
		S.S.	M.S.	F	S.S.	M.S.	F
Crosses (F ₁)	63	4.8079	0.0763	9.0833**	17.5503	0.2786	
Replication	1	0.0185	0.0185	2.2024	0.0044	0.0044	
Crosses × Replications	63	0.5296	0.0084		2.4760	0.0393	
Total	127	5.3560			20.0307		

** : significant at 1% level.

Table-7. Analysis of variance for germination percentage and seedling height.

Source	Germination percentage				Seedlings height			
	d.f	S.S	M.S	F	d.f	S.S	M.S	F
Replications	2	6.1198	3.0599	0.58499	1	4.8495	4.8495	4.8171
Females	7	3530.8152	504.4022	6.4090**	6	178.6186	29.7698	29.5717**
Males	7	298.2689	42.6098	8.1442**	6	30.0806	5.0135	4.9801**
Females-Males	49	5275.2265	107.6577	20.5771**	36	133.8897	3.7192	3.6944
Females-Males × Replications	126	659.2250	5.2319		48	48.3320	1.0067	
Total	191	9769.6554			97	395.7605		

** : Significant at the 1% level.

males×males)」のいずれの項でも1%レベルで有意差が認められた。子供群の各形質の変異は、それぞれの親木の持つ遺伝的特性によるところが大きく、交配親の違いによって各形質は著しく左右されることが分かった。

次に、組み合わせによる影響を、一般組み合わせ能力 (G. C. A.), 特定組み合わせ能力 (S. C. A.) および相反組み合わせの効果 (reciprocal effect) に分けて調べた結果を Table-8 に示した。それぞれの形質のいずれの項でも非常に高い確率 (1%レベル) で有意差が認められた。ただ、子葉形態 (C.L./C.W.) の S. C. A. のみは $P=0.25-0.50$ で有意差がないが、G. C. A. と Reciprocal の各項では有意差が認められた。以上のことは、ある特定母樹はどのような花粉親を用いても比較的優れた子供群を生産すること、また個々の組み合わせ間には相当バラツキがあるが、その中には非常に優れた子供群を生産し、いわゆる正のヘテロシスを示すものもあること、更に単一の組み合わせであっても、いずれを雌・雄親にするかでその子供群に異なった影響をおよぼすことなどを示している。

Table-8. Analysis of variance for G.C.A., S.C.A. and Reciprocal effects in respect to germination percentage, hypocotyl length, C.L./C.W. and seedling height.

Source	Mean Square						
	d.f	Germ. per.	d.f	Hypo. length	C.L./C.W.	d.f	Seedlig height
G. C. A.	7	82.6088**	7	0.0914**	0.6009**	6	9.0866**
S. C. A.	28	39.6921**	28	0.0148**	0.0165	21	1.9479**
Reciprocal	28	18.5307**	28	0.0376	0.1929**	21	3.1014**
Error	126	1.7440	1754	0.0022	0.0147	2646	0.1021

** : Significant at the 1% level.

次に、4形質に関する G. C. A. および S. C. A. のそれぞれの効果を調べるため、具体的な推定値を用いて比較した結果を Table-9 に示した。表中、これらの推定値は正で、しかもその値が大きい程その効果は大きく、負の数値の場合は逆の効果があることを意味している。例えば、発芽率の向上に関する G. C. A. の効果は K18, NO, O1 などに大きく、S. C. A. の効果は K4×O1, F2×F2 などが特に大きい。胚軸長に関しては、

Table-9. General and specific combining ability effects for germination percentage, hypocotyl length, C.L./C.W. and seedling height.

Character	Clone ♀ \ ♂	NO	K4	K18	F2	A25	O1	U2	U3	G.C.A.
Germination Percentage	NO	-14.6813	-2.8150	2.1394	-0.3944	2.2700	4.4231	4.4337	4.6244	2.6831
	K4		-5.1388	0.5706	-2.5631	0.4013	7.4594	4.1400	-2.0544	-0.0181
	K18			-9.4000	-1.9088	4.1656	4.6438	-2.8456	2.6850	3.2125
	F2				4.8250	-1.6931	-0.5150	1.3506	0.8913	-1.1538
	A25					-2.9888	-4.6259	-1.7700	4.2306	-3.9981
	O1						-9.4025	-0.2069	-1.7363	0.5588
	U2							-5.6313	0.5294	-0.3519
	U3								-9.1700	-0.9325
Hypocotyl Length	NO	-0.1744	0.0469	0.1281	-0.0662	-0.0237	-0.1006	0.0856	0.0569	0.1264
	K4		-0.0919	-0.1206	0.1750	0.1550	0.0156	-0.1713	-0.0068	-0.0900
	K18			-0.1994	-0.0037	0.0462	0.0069	0.0681	0.0744	-0.0163
	F2				-0.0681	-0.0131	-0.0824	0.0688	-0.0100	0.0381
	A25					0.2181	-0.0725	0.0038	0.0750	0.0231
	O1						-0.0269	0.2344	0.0257	0.0575
	U2							-0.2044	-0.0831	-0.0888
	U3								-0.1319	-0.0600
Cotyl. L./Cotyl. W.	NO	-0.1937	-0.1712	-0.1487	0.1669	0.3313	-0.1206	0.1300	0.0062	-0.0863
	K4		-0.3387	-0.1563	0.1293	0.1637	0.1919	0.0075	0.1738	0.1812
	K18			-0.0863	0.0219	-0.0538	0.1493	0.0001	0.1012	-0.2862
	F2				-0.1925	0.0869	-0.0750	-0.0193	-0.1181	-0.2218
	A25					-0.1337	-0.4407	0.0150	0.0312	0.0937
	O1						0.1725	0.0781	0.0444	0.2207
	U2							-0.3762	0.1650	0.1700
	U3								-0.4037	-0.0713
Seedling height	NO	2.0622	-0.0256	1.5215	-0.5213	-0.2349	-1.5163	-1.2856		-0.2358
	K4		-1.3735	0.1487	-0.2642	1.2522	-0.1042	0.3665		0.3220
	K18			-1.3892	0.0530	-0.0506	-0.9270	0.6437		-0.8251
	F2				-1.8449	0.7865	0.6951	1.0958		0.5178
	A25					-0.8820	-0.2435	-0.6278		1.3063
	O1						1.3651	0.7308		-0.0472
U2							-0.9235		-1.0380	

G. C. A. の効果は NO, O1, F2 などに大きく, S. C. A. は O1×U2, K4×F2, K4×A25 など特に大きい効果が見られた。子葉形態の G. C. A は O1, K4, U2 の順で, S. C. A. では NO×A25, K4×U3, NO×F2 などで大きく, また, 苗高に関する G. C. A. の効果は A25, F2, K4 の順に大きく, U2 や K18 では逆に小さくあらわれていた。他方, S.C.A. は NO×NO, NO×K18, O1×O1, K4×A25 の順に大きくあらわれていた。更に, 4形質の S. C. A. のうちで, 特に自殖区はそのほとんどが負で, しかもその絶対値が比較的大きい値を示していた。これは, いわゆる自殖弱勢の表われである。

また, 苗高に関する相反交雑の効果について調べた結果を Table-10 に示した。表中の値はその絶対値が大きい程相反組み合わせ間に差があることを示し, 更に, この表は雌親側を基準にしているため, その値が正で大きいほど, 表中の「行」の親を雌親にした方がよいことを示している。例えば, 最も大きな値を示した K4×O1 では 2.600 を示しているが, これらは O1×K4 よりも K4×O1 の子供群の方が優れていることを表わしている。表中, かなりのバラツキが見られるが, O1 は雌親に, また A25 は雄親にした方が, それぞれの逆の場合よりも優れた結果をもたらすことなどが明らかとなった。

Table-10. Reciprocal cross effects for seedling height.

Clone ♀\♂	NO	K4	K18	F2	A25	O1	U2
NO	0.000	0.630	-0.490	0.180	-9.625	0.830	1.160
K4		0.000	0.270	-0.375	-0.040	2.600	1.420
K18			0.000	-0.515	-1.290	1.840	-0.130
F2				0.000	-1.100	1.486	1.105
A25					0.000	1.445	0.740
O1						0.000	1.215
U2							0.000

更に, 胚軸長, 子葉形態および2年生苗高の3形質に関する狭義の遺伝率(narrow sense heritability) (Becker 1964) を求めた (Table-11)。すなわち, まず, 雌・雄親別に遺伝率をそれぞれ求め, 次に全体としての遺伝率を求めた。3形質いずれも雌親の方に高い値が得られ, 母樹が子供群におよぼす影響が強いことが分った。また, 全体での遺伝率は 0.33—0.34 の間であった。

Table-11. Narrow sense heritability on the three characters, hypocotyl length, hypocotyl types (C.L./C.W.) and two year seedling height which were calculated from Hinoki 7×7 diallel crosses.

Parents \ Characters	Hypocotyl length	Cotyledon type (C.L./C.W.)	two years seedling height
h^2 male	0.207	0.109	0.032
h^2 female	0.454	0.561	0.634
h^2 male · female	0.330	0.335	0.333

3) 考 察

組み合わせ能力は、すでにトウモロコシなどの一年生作物で研究され、ヘテロシスとの関係が明確にされた。そして雄性不稔 (male sterility) を利用することで、著しい成果をおさめている (赤藤 1968, 松尾 1969, 1972)。

最近の報告として、Gritton (1975) はエンドウ (*Pisum sativum* L.) の優良 8 系統を選び、それらの間でダイアレルクロスを行ない、組み合わせ能力を調べた。そして、G. C. A., S. C. A. いずれも 1% レベルで有意差が認められたこと、更に 7 形質中最も重要な種子生産量は平均親 (average mid parent) や優良親 (height parent) と比べて、それぞれ 55.1% および 28.0% も増産することなどを明らかにした。その他に、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) (Fan and Aycock 1974, Huang et al. 1975), トウモロコシ (*Sorghum vulgare* Pers.) (Kambel and Webster 1965, Dhillon and Singh 1976), ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) (Paschall and Wilcox 1975), コショウ (*Capsicum annuum* L.) (Lippert 1975, Marin and Lippert 1975) あるいはテンサイ (藤本・松村 1970a, 1970b) などについて、それぞれ、いろいろな形質が調べられ、組み合わせ能力に著しい差があり、またヘテロシスの効果が見られたことが報告されている。

一方、各樹種ごとに採種園が造成された現在、それぞれの母樹の遺伝的特性をより明確に把握しておく必要が生じてきた。林木の生育期間は非常に長いため、その結果を見るまでに長年月を要する。しかし、このような背景のもとに早期検定を目的とし、更にヘテロシス効果を期待した組み合わせ能力に関する研究が徐々に進められている。

Nilsson (1974) は 1950 年代初期、フランスとスウェーデンで選抜された Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) を用いて産地の異なる母樹間の部分ダイアレルクロスを行なった。そしてスウェーデンの中、南部の 5 カ所で植栽試験を行なった。20 年生時の樹高、胸高直径など種々の形質で組み合わせによる差が認められ、更に材積と樹高は同一産地内のもの同志の F_1 よりも、産地間の F_1 の方が 50% も優れ、その増大の割合は南から北に移動するにつれて大きくなることを明らかにした。その原因として、フランス産の生長力とスウェーデン産の耐寒性が組み合わせられた結果であると述べている。Eriksson (1976) もまた同様なことを述べている。また、Wilcox et al. (1975) は radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.) のダイアレルクロスを行ない、その F_1 は組み合わせの違いで著しい差があることを認めた。更に、クローンナンバー 96×55 の F_1 は調べたすべての形質で最も優れ、特に材積では 43% も増大し、ヘテロシス効果を認め多量生産を目的とした特別の場合は 2×2 型の採種園を造成しても可能であると述べている。

本実験の結果は発芽から約 2 カ年間に見られた諸形質の分析結果である。従って、Wilcox et al. (1975) が報告しているような著しいヘテロシスの効果はまだ認められていないが、 F_1 の各形質は組み合わせの違いにより大きな影響を受けることが分かった (Table-5, Table-6)。同じような報告は、スギ、ヒノキおよびマツ類でもなされている (原 1973, 戸田・西村 1973, 甲斐 1976, Critchfield 1963, Bingham et al. 1969, 福田 1972)。更に、雌・雄親別にその影響を調べると、雌親の効果の方が大きく表われていた (Table-7, Table-11)。Morgenstern (1974) は black spruce (*Picea mariana* (Mill) B. S. P.) で、また戸田・西村 (1971b) と原 (1973) はスギで同じような結果を得ている。以上のことから、生育当初は特に雌親の影響が大きいことが分かった。

また、G. C. A. と S. C. A. および Reciprocal の効果それぞれに違いがあることが

分った。同じような結果は、Kraus (1973) が slash pine の生産量と紡錘型サビ病 (fusi-form rust canker) 抵抗性について、Bingham (1968), Bingham et al. (1969) が western white pine のサビ病 (blister rust) 抵抗性について、更に Wilcox et al. (1975) は radiata pine の樹高や胸高直径などの諸形質について報告している。特に Morgenstern (1974) は black spruce の発芽率指数 (germination rate index), 発芽率, 子葉数, 残存率および 1, 2 年生苗高を調べ S. C. A., G. C. A. および Reciprocal の効果にそれぞれ差があることを認め、更に発芽率と残存率を除いた形質の遺伝率は 0.42—0.59 であったと報告している。ヒノキの遺伝率はこれと比べてやや低かったが、かなり大きな値が得られた (Table-11)。

以上のような結果から、G. C. A. や S. C. A. に違いがあることは採種園経営において非常に重要なことである。従って個々の親木の遺伝的特性を把握し、種子生産量や生長量等の形質は G. C. A. の高いもの、抵抗性等は S. C. A. の高い親木を選定していくべきであろう。

第 2 節 ヒノキ葉緑素変異苗の遺伝

生物の表現形質は遺伝的要因で決まる。更にこれは環境要因によって大きな影響を受けている。

林木は永年生作物であり、他殖性植物である。また、その遺伝子型はヘテロ接合体である。従って、林木はいろいろな形質を支配するような遺伝子をヘテロの状態で内包していると考えられる。

ある形質が単純な遺伝子の組み合わせによって支配されているならば、比較的簡単な交配試験を行なうことで、これらの形質の遺伝的メカニズムを解明することができる。

近年、このような考えのもとに、林木に内包されている諸変異形質の確認と、それに関する遺伝子分析が行なわれつつある。研究対象とされた樹種はまちまちであるが、なかでもマツ類 (Franklin 1969b, 1972, Steinhoff 1974, Donald 1972, Khalil 1974, Johnson and Critchfield 1945, 1974, 大庭ら 1971c, Sorensen 1971b) や、スギ (大庭 1972b, Ohba 1972d, 1974b, 大庭ら 1967b, 千葉 1953, 塚原 1964, 甲斐 1975) についての報告が多い。その結果、主動遺伝子によって支配されているようないくつかの形質に関する遺伝子分析が行なわれた。また、一方では放射線等の人為的操作によって変異形質を誘発し、それらの遺伝子分析を行ない、更に林木の主要形質の遺伝的メカニズムを解明しようとする試みがなされている (大庭・村井 1971b, 大庭 1967a)。

ヒノキはスギやマツ類に比べると、一般に外部形態の変異に乏しいと言われている。事実、ヒノキの変異形質に関する遺伝子分析は大庭 (1972c) が報告しているに過ぎない。しかし、ヒノキ精英樹のクローン別播種試験の結果、特定クローンで、しかもかなりの頻度で変異形質が出現する。したがって、これらの変異形質はマツやスギ等と同じように、比較的単純な遺伝子の組み合わせに支配されていると考えられる。

本論文では、ヒノキの生育初期に見られた種々の変異形質の類別と、更に、これらのなかの 2, 3 の変異形質を保有していたクローンを用いて交配実験を行ない、これらの形質の遺伝子分析を試みた。

1) 材料および方法

1972, 1973年4月, 九州大学農学部粕屋演習林ヒノキ集植園における精英樹クローンから採種したオープン種子をクローン別に播種し, 変異形質の検出を行なった。翌1974年3月下旬, 変異形質が確認された一部のクローン間の交雑試験を行なった。そして, 同年10月下旬, 組み合わせ別に播種し, 翌1975年4月8, 9日九州大学農学部ガラス温室で播種試験を行なった。播種床としては播種用バット(34×43×20cm)内に加熱消毒した砂土をつめ, 播種前にN・P・K(13:8:9)配合化成肥料15g/バット施用したものをを使用した。一部は普通の砂土ベッドで播種試験を行なった。播種前にマルカ「オーソサイド」水和剤で種子を消毒し, 途中5月27日, 4-4式ボルドー液で稚苗の消毒を行なった。播種用種子は肉眼選別したもので, なかには種子数が十分でなかった組み合わせもあったが, 原則として1組み合わせ当り1,000粒を播種した。本実験で使用した精英樹クローンはTable-1で示したもののうち始良40号(A40)を除き, 更に久原1号(KU1)を加えた19クローンで, 各クローンの略記号はTable-1で示したものをを使用した。発芽率の調査は, 播種後1日おきに約1カ月間行ない, その累積数を採用した。また, 変異形質の検出は定期的に秋期まで続けた。

Table-12. Detection of chlorophyllous and morphological variants in open pollination progenies of HINOKI plus trees.

Kind of variants	Clone																		
	NO	K ₂₀	K ₁₂	K ₁₈	F ₂	A ₂₅	A ₂₇	O ₁	N ₁₀	N ₁₁	O ₇	U ₂	U ₃	N ₁	K ₅	KU ₁	KS ₁	FJ ₂	K ₄
Cotyledon and primary leaves yellow							○												
Primary leaves light green								○											○
Xantha									○										
Albino		○	○																
Cotyledon light green and hypocotyl white and pink																			○
Obtuse leaves															○				
Weeping leaves																			○
Fused leaves							○								○				
Drooping primary leaves					○					○									○
Thicked and white leaves			○																○
Numerous primary leaves								○											○
Dwarf seedling							○												○
Needle-like leaves			○				○												○
Three cotyledons	○	○	○	○	○	○	○	○			○				○	○		○	○

2) 結 果

ヘテロ接合型である林木が近親交配, 特に自殖などを行なうと, 充実種子生産量, 発芽率あるいは生長量などの低下が見られる。更に, 葉緑素変異個体や形態異常個体などの,

いわゆる変異形質の出現が見られる。

交配試験に着手する前年および前々年にヒノキ精英樹のクローン別オープン種子を用いて変異形質の検出を続けてきた。その結果、特定クローンで、ある種の変異形質がかなりの頻度で出現することが分っていた。すなわち、これを大別すると次のようである。

(1) 色素変異形質 (chlorophyll variant characters)

胚軸の色、子葉や初生葉あるいは鱗状葉(本葉)の色が正常個体と比べ、明らかに異なるもの。例えば、白子苗(albino)、淡緑色苗(light green)、黄子苗(xantha)など。

(2) 形態異常形質 (morphology variant characters)

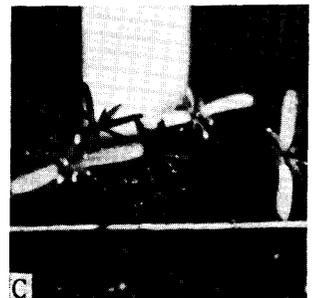
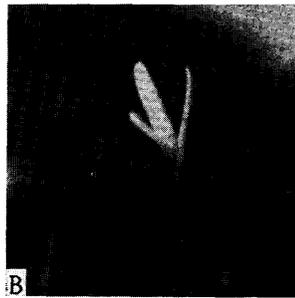
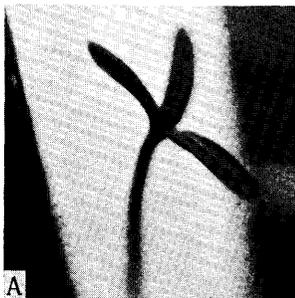
非常に多種類の変異体が見られた。初生葉が異常に多いもの、矮小化してほとんど生長しないもの、針葉が異常に長いもの、本葉が厚く、まるみを帯びているものあるいはスギ型の針葉を呈したものなど。

(3) 子葉数の変異

通常の子葉は2枚であるが、3枚のものあるいは癒着しているものなど。

19クローンのクローン別自然受粉種子播種試験の結果、種々の変異形質が観察された。それらの変異形質の種類と出現したクローンとの関係を Table-12 に示した。これ以外にも変異形質と思われるものが出現したが、適確な類別ができなかったり、出現頻度がきわめて少なかったので除外した。また、観察されたいくつかの変異形質の種類を Photo.-2 に示した。

これらのなかで、特にその出現頻度が高く、しかも識別容易な4つの変異形質の遺伝性について調べた。すなわち、2つは A27 と O1 の子供群で見られた葉緑素変異形質である。これらは非常に類似しているが、注意して観察すると容易に識別できる。A27で見られたものは、子葉と初生葉とともに淡緑色で、ほとんど生長せず約2カ月後に枯死する(Photo.-2のC)。O1で見られたものは、子葉は正常で初生葉のみが淡緑色で、生長は正常で2カ月目頃から生長点のみが黄化してくる(Photo.-2のD, E)。3つ目は N1 で見られた形態異常個体である。発芽時の子葉の色はやや淡緑で、ヒノキ苗の形態を呈した頃、鱗状葉(本葉)のY字線の両先端部が内側に湾曲し、全体的に葉は丸みを帯びて細く見える(Photo.-2のQ)。最後のものは O1×FJ2 で見られた葉緑素変異体で、初生葉のみが淡緑色(やや白色)で、更にキメラ状になり、鱗状葉を出し始めた頃、生長点が白化してくる(Photo.-2のR)。これら4クローンを用い、自殖を含んだ相反交雑試験を行なった。各組み合わせごとに、1,000粒重、播種粒数および発芽率をまとめて Table-13 に示した。自殖区の発芽率はやや低い傾向が見られる。また、特に FJ2 が関係した組み合わせ区の発



芽率は著しく低い。次に総発芽個体数とそれぞれの変異形質個体数を調べた (Table-14)。

A27 自殖区に関しては 2 回播種試験を行なった。もし、これらの変異形質が単一劣性遺伝子によって支配されているならば、自殖区では正常型と異常型が 3 : 1 に分離し発現してくるはずである。A27 に関するカイ自乗 (χ^2) 検定の結果は、いずれも理論的分離比を満足することができた。また、これをプールした場合でも同様であった。したがって、A27 で検出された葉緑素変異形質は単一劣性ホモ接合体であることが明らかとなった。ま





Photo.-2 Various kind of variants which were detected in open and cross pollinated progenies of Hinoki, *Chamaecyparis obtusa* Endl., plus trees.

A - G : Chlorophyllous variants

A : Three cotyledons B : Albino C : Light green cotyledon and light green primary leaves

D, E : Light green primary leaves F : Light green cotyledon and white (or pink) hypocotyl G : Xantha

H - Q : Morphological variants

H : Drooping primary leaves I : Fused normal leaves

J : Weeping leaves K : Thickened and white leaves

L : Numerous primary leaves M, N : Needle like leaves

O, P : Dwarfish seedling Q : Obtuse leaves

R : White apical shoot (at two month after germinated)

た, O1 で検出された変異形質についても同様な結果が得られた。しかし, N1 と FJ2 で見られた変異形質に関しては, この仮説は当てはまらず, 別の遺伝様式によっていると考

Table-13. Seed weight, number of seeds sown and germination percentage after selfing or reciprocal crossing of four plus trees which seemed to have chlorophyllous and morphological variants.

Cross combination	1000 seeds weight (g)	No. of seeds sown	Mean rate of germination (%)
A27 • self	1.89	200 × 5	4.30
O 1 • self	1.89	200 × 5	6.80
N 1 • self	1.99	200 × 5	10.70
FJ2 • self	1.65	200 × 5	0.40
A27 × O 1	1.97	200 × 5	8.50
A27 × N 1	1.87	500	11.20
A27 × FJ 2	1.99	900	0.22
O 1 × A27	1.95	200 × 5	13.00
O 1 × FJ 2	1.93	200 × 5	5.50
N 1 × A27	1.99	200 × 5	2.67
N 1 × O 1	2.19	200 × 5	4.67
N 1 × FJ 2	1.52	200 × 5	0.20
FJ 2 × O 1	1.49	200 × 5	0.50
FJ 2 × A27	1.68	200 × 5	0.20

Table-14. Segregation of the seedlings with yellowish or light green leaves after selfing or reciprocal crossing between four plus trees,

Cross combination	Reiteration	Segregation of seedlings			χ^2 for 3 : 1
		Total	Normal	Abnormal	
A27 • self	1	43	33	10	0.0317**
	2	46	35	11	0.0289**
	Mean	89	68	21	0.0936*
O 1 • self		68	53	15	0.3136*
N 1 • self		107	92	15	6.8816
FJ 2 • self		4	4	0	—
A27 × O 1		85	85	0	—
O 1 × A27		52	52	0	—
FJ 2 × O 1		5	5	0	—
O 1 × FJ 2		55	40	15	0.1514*
A27 × FJ 2		2	2	0	—
FJ 2 × A27		—	—	—	—

** , * : Nonsignificant at 1 and 5% level.

えられる。

次に、A27 と O1 のそれぞれで検出された葉緑素変異形質が同一遺伝子によって支配されているかどうかを検討した。その結果、A27 × O1 および O1 × A27 のいずれにも、これらの変異形質は見られなかった。したがって、A27 と O1 で見られた変異形質はそれぞれ異なる遺伝子によって支配されていることが分った。また、O1 × FJ2, FJ2 × O1 の相反交雑では O1 × FJ2 のみに 3 : 1 の分離が認められたが、FJ2 の自殖区と FJ2 × O1 の交配区ではいずれも供試個体数が少なく、その分離が未確認のため、この遺伝関係はいまのところ不明である。

3) 考 察

林木の変異形質に関する報告は、いろいろな樹種で数多くなされている。その種類はさまざまであるが、子葉、胚軸、針葉、花粉などの色素変異に関するもの (Sorensen 1967, 大庭 1967b, 1972b, Donald 1972, Johnson and Critchfield 1945, 甲斐 1975, Franklin 1969b, Carlisle and Teich 1970) と、球果の形態、閉果球 (cone serotiny), 針葉形などの形態の変異に関するもの (Duffield and Williams 1963, Khalil 1974, 大庭ら 1974a, Ohba 1972d, 1974b, Teich and Holst 1969, Teich 1970) に大別できる。

そのうち、比較的最近のものとして、Steinhoff (1974) は *Pinus monticola* Dougl. の球果の色の発現について調べている。そして、一對の対立遺伝子 P と p が関与していて、 P/P と P/p のときは紫色になるが、劣性ホモ (p/p) のときは緑色になることを明らかにした。また、大庭 (1972a) と千葉 (1953) は冬期でも針葉が緑色を保つミドリスギの遺伝子分析を行なった。そして、ミドリスギは劣性ホモ接合型 (r/r) であり、優性遺伝子が関与しているときは ($R/R, R/r$)、普通の赤褐色になることを明らかにした。更に、色素変異形質の一種であるアルビノは、古くから多くの植物で認められているが

(Robertson et al. 1966, Smith et al. 1959), 林木でもいくつかの報告がなされている。Franklin (1969b) は *Pinus taeda* L. で、大庭 (1971a, 1971c, 1972b, 1973) はスギとアカマツで、また Sorensen (1967, 1971b) は *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. などについて、それぞれ単一劣性ホモ接合体であることを明らかにしている。本実験でも K20 と K12 の自然受粉子供群の中でアルビノが検出された。また、K12 のものは完全アルビノであったが、K20 で見られたものは子葉が淡緑色で胚軸が白～ピンク色を呈していた。交配不備のためそれぞれの遺伝性を確認するまでに至らなかった。しかし、Franklin (1969b) は loblolly pine のアルビノについて細かな観察を行ない、胚軸、子葉ともに白色となるもの、胚軸は白～ピンク色で子葉は淡緑色を呈するものがあり、これらはまったく別々の遺伝子によって支配されていることを明らかにしている。したがって、K20 と K12 で見られた2つのタイプのアルビノは別々の遺伝子に支配されていると考えられる。

ヒノキの葉緑素変異に関しては大庭が報告しているのみであるが、本実験結果 (Table-14), A27 と O1 で見られた2つの型の淡緑色苗の遺伝性を明らかにすることができた。同様なことは、スギ (大庭 1967b, 1971a, Ohba 1972d, 1974b) やマツ (Franklin 1969b) でも報告されている。

更に、本実験で確認された形態異常苗の種類は Table-12 に示したように8つであった。その遺伝性はいずれもまだ明確でない。しかし、大庭ら (1973) の報告によるとスギでも、天狗巣病状苗、エンコウスギ型、細葉苗あるいは矮小苗などが数多く出現することを報告している。更に、ヨレスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don var. *araucarioides* Henk. et Hochst. form *spiralis* Makino) の遺伝は単一優性遺伝子によって決まることを明らかにした。また、Lotan (1967) は *Pinus contorta* の閉果球 (cone serotiny) について、Franklin (1969b) は loblolly pine 稚苗で見られる crinkly dwarf, pale droopy cotyledons, fused cotyledons, singled cotyledon あるいは dwarf などは単一劣性ホモ接合体であることを明らかにしている。

クローン数は少ないが、調査した18クローンのうち、10クローンで何らかの変異苗が出現することが分かった (ただし、子葉が3枚のものは除いた)。これらの形質の中には、子葉の黄化、アルビノあるいは fused leaves などのような致死遺伝子、あるいはシオレ (drooping primary leaves), 矮小苗, 初生葉が異常に多いもの (numerous primary leaves) のように生長抑制などの劣悪遺伝子をヘテロの状態では保有していることが分かった。更に、今回明らかにすることができなかった未確認の形質をも考慮すると、かなり多くの有害因子を内包しているものと考えられる。このことは、今後の林木育種を進めていくうえで、十分考慮すべき問題である。

第4章 ザイモグラムによる遺伝子分析と自殖率の推定

第1節 ザイモグラフ法

1) 同位酵素 (アイソザイム)

アイソザイム (isozyme) とは、同一組織内に存在し、しかも同じ基質特異性を持つタンパク質のうち異なった分子形態を持つタンパク質のことである (Markert and Møller

1959)。

タンパク質は20の同種または異種のアミノ酸分子がペプチド結合 (—C—NH—) を行ない、更にポリペプチド鎖を形づくったものである。その一般化学式は —HN—C—HN— $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$ —CHC— $\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{matrix}$ で示すことができ、その分子量は $10^4 \sim 10^5$ である。そしてこれらのタンパク質は、動物、植物、微生物などをとわず、およそ生物と呼ばれるものの細胞の原形質の主成分をなしている。

これらのタンパク質のうち、生体の生命現象で重要な働きをつかさどり、それ自体は変化することなく、生体内で触媒作用をしている一群のタンパク質を酵素 (enzyme) と言う。酵素の種類は現在知られているだけでも1,000以上を越しているが、これらは反応に関する特異性に基づいて、①酸化還元酵素、②転移酵素、③加水分解酵素、④リナーゼ、⑤異性化酵素、⑥結合酵素の6つに分類されている。更に、これらの酵素はある特定の化合物の特定反応に関してのみ触媒反応を示す。これを酵素の基質特異性 (substrate specificity) という。普通、酵素はただ1種類の化合物を基質とするが、時には化学構造が非常に似た2つ以上の物質を基質とする場合もある。この基質特異性に基づいて、これらの酵素は更に細かく分類されている。

特に、1955年 Smithies によって澱粉ゲル電気泳動法が導入されて以来、動植物における酵素タンパク質に関する研究が盛んとなった。その結果、同じ生物の同じ組織や細胞にあって、同じ反応特異性や、基質特異性を示すにもかかわらず、わずかに違った分子構造を有する一群の酵素タンパク質があることが分かった。そして、これらの酵素タンパク質は電氣的荷重と分子の大きさのわずかな違いのため高度に分離してくる。このような一群の酵素タンパク質のことを Markert and Møller (1959) は同位酵素 (isozyme) と呼んだ。これらのアイソザイムは血液型や抗原型と同じように、タンパク質の構造的変異であって、関与している突然変異、すなわちコードしている DNA 分子のうち1つか2つのヌクレオチドの入れ替えで対応するアミノ酸が置換したために荷重に差を生じたものである。しかもこれらのアイソザイムは、酵素の分離操作中に2次的に生成したものではなく、その分子構造の差異はすべて遺伝子の支配を受けているのである。血液型が終生変わらない遺伝的特徴であり、適応や生存力とは直接関係のない形質であることはよく知られている。このように質的発現に環境が影響をおよぼさないことは DNA を鋳型に直接合成されるタンパク質に共通の特徴で、酵素タンパク質の遺伝的多型にもそのままあてはまる。

一方、遺伝子の化学的本質はデオキシリボ核酸 (DNA) である。これはデオキシリボースという糖 (S) とリン酸 (P) から水分子が取り除かれ —P—S—P—S—P— という型の高分子結合をしたものであり、更にデオキシリボースの炭素にアデニン (A), チミン (T), グアニン (G), およびシトシン (C) の4つの塩基のうちいずれか1つの塩基がそれぞれくっついたものである。この4つの塩基 A, T, G, C の組み合わせがいわゆる遺伝情報で、これら4つの塩基のうち3つの塩基が組み合わさって1つのアミノ酸の配列順序が決まるのである。また、核内の DNA の持つ遺伝情報はリボ核酸、すなわちメッセンジャー RNA (m-RNA) のリボースに結合したアデニン (A), ウラシル (U), グアニン (G),

およびシトシン (C) の4つの塩基のうち3つの塩基を組としてそれぞれの情報が複写される。遺伝情報を複写した m-RNA は細胞質中の S100 とリボソームに移り、ここでまずタンパク質合成のための酵素タンパク質を生成する。そして、転移リボ核酸 (t-RNA) によって運ばれてきた遊離アミノ酸はこれらの酵素を媒介として高分子結合したタンパク質を形成するのである。

澱粉ゲル電気泳動法が導入されてから、アイソザイムに関する研究は著しい発展をとげた。そして1971年、これまでの成果をもとにして国際生化学連合 (IUB) の生化学命名委員会 (CBN) は種々の酵素に対して7つの分類を行なった (西沢・志村 1967)。そして、ゲル電気泳動法などでザイモグラフ化された酵素名は IUB-CBN の定めた酵素分類番号 (EC番号) によって登録されている。本実験で使用した酵素はパーオキシダーゼであり、この酵素の分類番号は EC・1・11・1・7 である (Endo 1973)。

現在のアイソザイムの研究の観点と研究領域は、①タンパク質の構造、サブユニットの研究、②酵素に関与している遺伝子と変異についての研究、③変異遺伝子を標識とする集団遺伝学的研究、④代謝調節や適応についての生理、生化学的研究、⑤タンパク質の発生段階や組織特異的発現に関する研究、そして⑥遺伝子レベルでの進化についての研究などである (沼知 1973b)。

また、実際に使用される酵素の種類や数も多く、応用範囲もヒトやウサギなどの哺乳類 (Brinster 1973, Chapman 1971)、ショウジョウバエなどの昆虫類 (Birley and Barnes 1973, Pipkin and Hewitt 1972)、鳥類や魚類 (Gregory et al. 1971, 沼知 1973a, 1973b) などにおよんでいる。

しかし、植物にザイモグラフ法が応用されたのは比較的新しく、1960年 Schwartz がつもろこし (*Zea mays* L.) のエステラーゼ・アイソザイムを調べ Est-1 座位で対立遺伝子によって支配されているバンドがあることを報告したのが始まりである。その後、つもろこし、コムギ、イネ、タバコなどの1年生植物や、セイヨウワサビなどの2年生植物に応用され、特に遺伝学の分野で著しい発展をとげてきた (Shaw 1969, Shannon 1968, Scandalios 1969, Whitt 1967)。その結果、アイソザイム・バンドの遺伝はいろいろの型の遺伝様式があることが明らかにされた (遠藤 1974)。また、一方では代謝調節を中心とした生理学的研究、発生学的研究など比較的新しい分野の研究が行なわれつつある (Efron 1971, Gupta and Stebbins 1969, Chen et al. 1970, Hirano 1975, Steward 1965, Scandalios 1964, 野間 1969, 関山・山懸 1973)。

永年作物である林木は生育期間が長い代り世代の交代が著しく遅く、また分布範囲も広大であるため、遺伝育種学的研究が著しく遅れていた。しかしながら、近年ザイモグラフ法の導入によって、種間変異の研究 (Hirano 1975, 平野 1975, 1976)、個々のバンドの遺伝子分析や集団遺伝学的研究 (Mikshe 1976, Sakai et al. 1971, Bartels 1971, Feret and Stairs 1971, Sakai and Miyazaki 1972, Bergman 1974, 朴・酒井 1971) などが行なわれ、数々の成果をおさめている。

2) 本実験で用いた電気泳動法

1938年 Tiselius が電気泳動装置を用いて血清タンパクの研究で好結果を得て以来、いろいろの分野でこの方法が使用され始めた。その後いくたびも改良が加えられ、分離能の

精度が上がってきた。現在種々の方法が用いられているが、構造的な違いで大別すると、水平式、垂直式、薄層式の3方式がある。また、その支持体としては、濾紙、澱粉、寒天、ポリアクリルアミド、セルロースアセテート膜などが使われている（坂岸 1974, 青木ら 1972）。本実験で用いた方法は水平式澱粉ゲル電気泳動法で、Endo (1966, 1973) や Scandalios (1969) の原法を基本として、これに若干の修正を加えた方法にしたがった。実験装置の一式は次に示したとおりである。

(1) 電気泳動実験装置

(a) 定電圧, 定電流発生装置	0~1,000V, 0~80mA	1台
(b) 白金電極付電解槽 (内径40×40×200mm)		2台
(c) 泳動用ゲル容器 (カバー付) (内径6×20×200mm)		12個
(d) ゲル切断用容器 (カバー付) (内径6×21×200mm)		1個
(e) 垂直および水平切断用ゲルカッター		各2枚
(f) ゲル・ホルダー (アクリル樹脂製)		1個
(g) 呈色用バット (キャビネ型)		6個
(h) サランラップとアルミ箔		各30×200cm
(i) ビニール・テープ		1巻
(j) ガーゼ		適量

(2) 澱粉

澱粉ゲル電気泳動実験で使用する澱粉はすでに加水分解されたものが市販されている（泳動用澱粉, 東洋科学産業K.K.）。しかしこれは何分にも高価で、多量の実験を行なうには不経済である。本実験では市販されているバレイショ澱粉（化学用, 和光純薬工業K.K.）を加水分解したものをを使用した。加水分解のための材料, 器具類とその方法について記す。

(材料と器具)

バレイショ澱粉 (化学用, 和光純薬工業K.K.)	1,000g
アセトン	1,300ml
濃塩酸 (35%)	10ml
プフナ・ロート大型	1個
3,000mlピーカー	2個
濾紙 (No. 50, 東洋科学K.K.; プフナ・ロートの口径大に切る)	2枚

(加水分解の方法)

(a) 3,000ml ピーカーにバレイショ澱粉 1,000g, アセトン 990ml を入れサランラップ, アルミ箔の順にカバーする。(b) 正確に $(51 \pm 0.2)^{\circ}\text{C}$ にセットされた恒温水槽に上記(a)のピーカーを入れ固定し, 4時間放置し加熱する。(c) 恒温水槽に入れたままの状態ですらんラップとアルミ箔を少し開き, 濃塩酸 10ml を加え, ガラス棒で約 0.5~1 分間攪拌し, 再びカバーする。(d) そのままの状態ですらんに 90 分間加熱し続ける。(e) 恒温水槽からピーカーを取り出し, その上澄液 (アセトン, 濃塩酸の混合液) を静かに捨てる。(f) 1,000ml の蒸留水を加え攪拌し, あらかじめ濾紙が敷かれてあるプフナロート内に移し吸引濾過し, 引き続き 3,000ml の蒸留水で濾過する。(g) もう一つのピーカーにプフナロート内の澱粉を移し, 2,500ml の蒸留水を加えて懸濁し約 1 時間静かに放置

する。(h) 上澄液を静かに捨てて、あらかじめ濾紙が敷かれているブフナロートで吸引濾過する。(i) 吸引が終わったら、更に 300ml のアセトンを静かに注ぎ再び吸引濾過する。(j) 吸引濾過が完全に終わった澱粉は濾紙 (60×60cm, 東洋科学, No. 50) に均一になるように広げ、室温で一昼夜乾燥させる。(k) 乾燥した澱粉は固まりのないようにメッシュ (No. 40) にとおす。出来上がった澱粉は湿気や化学変化をさけるため容器につめ、密閉した冷蔵庫内で保存し、必要に応じて取り出すようにする。

(3) 澱粉ゲルの調整

泳動用ゲル容器12本分について記す。

(a) 2,000ml 丸底フラスコに加水分解澱粉 60g, ゲル用緩衝液 ((4)(a)参照) 50ml および蒸留水 450ml を加えよく攪拌する。(b) 上記(a)のフラスコを 80°C 温湯中に入れ回転しながらよく攪拌する。約 3~4 分ほどして、半透明となり粘り気が高くなった後ひき続き約30秒間加熱する。(c) 温湯中からフラスコを取り出し、直ちにサッカーで減圧し完全に気泡を除く。(d) ゲル容器は、あらかじめビニールテープで底を封じ、流動パラフィンを塗っておく。糊化澱粉は容器内に少しずつ流し込み多少多めになるように調整する。12本全部流し終わったら絶対に気泡やゴミが入らないように注意し、すばやくふたをする。(e) ふたをかぶせ終わったら上から押さえつけて過剰のゲルを溢出させ、重しをして室温の状態で一晩放置し翌日使用する。

(4) 緩衝液系の調整

緩衝液系には連続系と不連続系の2種類あるが、本実験で使用したのは連続系である。本実験で使った緩衝液は、泳動用ゲルを作る場合に用いたゲル用緩衝液 (gel buffer), 泳動中に使用するブリッジ用緩衝液 (bridge buffer) およびバンド染色時に使用するトリス酢酸緩衝液 (Tris buffer) の3種類である。それらの調整について記す。

(a) ゲル用緩衝液

水酸化ナトリウム (NaOH) 2.1g, ホウ酸 (H_3BO_3) 18.0g に蒸留水を加えて 1,000ml にする。

(b) ブリッジ用緩衝液

NaOH 3.4g, H_3BO_3 18.5g に蒸留水を加えて 1,000ml にする。

(c) トリス酢酸緩衝液

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 12.1g, 氷酢酸 (CH_3COOH) 13.0ml に蒸留水を加えて 1,000ml にする。

(5) 泳動および染色方法

パーオキシダーゼ酵素受容体として以前はグアヤコール (Guaiacol), ピロガロール (Pyrogallol) などが使用されていた。しかし呈色が安定せず長時間保持できないなどのため酢酸ベンジジン (Benzidin Acetate) やオルト・ジアニシジン (O-Dianisidine) が用いられた。しかし、これらは発ガン性物質の恐れがあるという理由から、現在ではアミノ・カルバゾール (3-amino-9-ethylcarbazole) が使用されている。泳動ゲル12本分の染色液の作り方、およびその方法は以下のとおりである。

(a) アミノ・カルバゾール (3-amino-9-ethylcarbazole)	126mg
(b) ベーター・ナフトール (β -Naphthol)	86.4mg
(c) アセトン (Acetone)	30.0ml

- (d) トリス・バッファ (Tris buffer) ……(4)(c)参照 30.0ml
 (e) 過酸化水素水 (H_2O_2 , 3%) 2.0ml
 (f) これらに蒸留水を加えて全体を 300ml に調整する。

5°C にセットされた冷凍庫の中で定電圧 350V で約 2 時間30分泳動を行なう。各ゲルの移動度を均一にするため B. P. B. (Bromophenol Blue) 色素を用いて調整した。泳動を終わったゲル容器 (12本) は電解槽から取り出し、更にゲル容器内のゲルを定位置の長さのところ (試料挿入点から陽極側10.5cm の位置) で垂直切断用ゲルカッターで切断し、途中切れないように注意しながらゲルを取り出しゲル切断用容器内に移す。そして、水平方向に切断し下部のゲルのみを染色のために使う。

染色液は過酸化水素水 (H_2O_2) を加えない状態で準備しておき、染色の直前に H_2O_2 2.0ml を加えよく攪拌し呈色バット内のゲル上に静かに注ぐ。ゲルが均等に染色液に浸ったならばアルミ箔でおおい、そのままの状態で一昼夜放置する。翌日、呈色バット内のゲルをゲルホルダーで軽く押さえ、水道水で 3～4 回洗滌する。洗滌されたゲル上のバンド部分は赤色 (深紅色) に染まっている。これらのゲルはきれいに並べて写真を撮り、次いで方眼紙上にスケッチしておく。

第 2 節 ヒノキの発育段階におけるアイソザイム・バンドの消長

林木は永年生作物であり、その生育期間は非常に長い。このような林木にザイモグラフ法を応用する場合、特に発生・発育的特異性をあらかじめ知っておく必要がある。実際、林木の芽生えから成木までにアイソザイム・パターンがどのように変化し、特にいつ頃安定したパターンを示すようになるかについて調べられた報告はほとんどみあたらない。

本実験では、ヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの遺伝子分析を行なう前段階として、稚苗の発育段階ごとにアイソザイム・パターンの変化を調べ、安定したパターンを示す発育段階とその時期を明らかにする目的で、この実験を行なった。

1) 材料および方法

供試材料は、ナンゴウヒと精英樹須崎 2 号の人工交配で得られた稚苗を用いた。すなわち、1972年 4 月、九州大学農学部粕屋演習林林木育種試験地に植栽されている12年生のナンゴウヒ (NO) を母親とし、父親として須崎 2 号 (SZ2) の花粉を用い人工交配を行なった。同年10月初旬採種し、そして実験期間を短縮するため、一部は1972年12月22日、粕屋演習林の温室内で播種し、残りの種子は翌年1973年 4 月中旬野外で播種した。いずれの場合も播種床には播種用バット (25×35×10cm) に加熱消毒した砂土をつめ、播種前に 1 バット当り N・P・K (5 : 4 : 3) 配合肥料 9.5g を施用した。冬期播種・育成したときの温室内の気温は大體 25°C になるようにセットした。

4 月播きの子供群は、播種後逐次生育状態を観察し、外部形態的に大きな変化が認められた時点をとらえ、9 月下旬まで次に示す 1～8 の発育ステージを選び実験材料を採取した。また、発育の進んだ前年12月播種の子供群は Stage 9 とした。試料を採取した 9 つの発育ステージは次のとおりである。

Stage 1 : 種子が発芽し hypocotyl が約 1.5cm 伸びたとき。

Stage 2 : hypocotyl は十分伸びきっているがまだ seed coat は残っている。

Stage 3 : cotyledon が生じたとき。

Stage 4 : primary leaves が生じたとき。

Stage 5 : primary leaves が生じ, epicotyl が見えるようになったとき。

Stage 6 : secondary leaves が生じたとき。

Stage 7 : 播種後約 120 日経過したとき。

Stage 8 : 播種後約 160 日経過したとき。

Stage 9 : 播種後約 280 日経過したとき。

子供個体の供試数は 3 個体としたが, これは Stage 1 および 2 では個体がまだ小さくてアイソザイム用の試料調整がはなはだ困難であったためである。また, Stage 3 から 9 までは一団体ずつとした。

材料は原則として葉の部分を用いた。各発育ステージで採取した材料は実験を行なうまで -20°C の冷凍庫内に保存した。調べた酵素の種類はパーオキシダーゼ・アイソザイムで, 水平式スターチ・ゲル電気泳動法によった。また具体的な実験方法や試料の調整は第 3 章, 第 1 節に述べたとおりである。

2) 結 果

供試材料の採取時期と各発育ステージとの関係を Fig.-8 に示した。

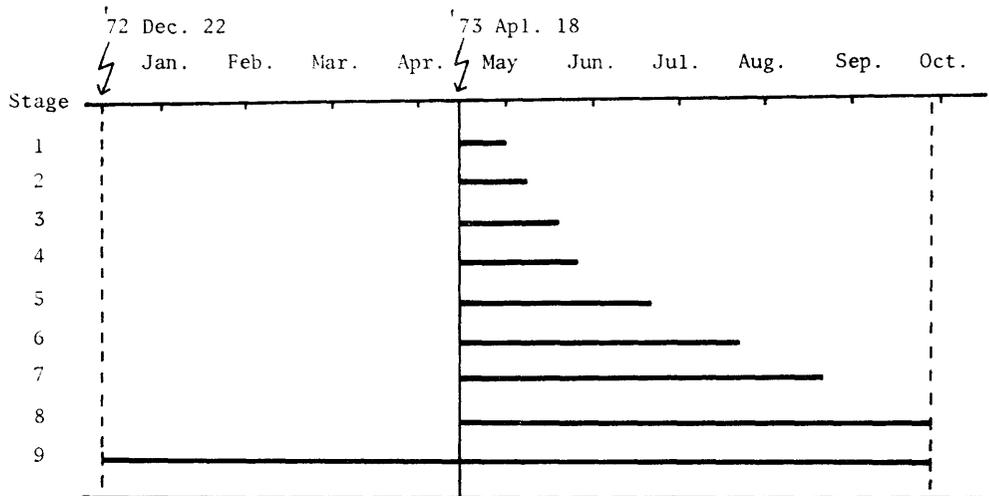


Fig.-8 The relationship between the material sampling times and nine developmental stages.

全発育ステージを通じて確認されたアイソザイム・バンドは総計11本であった。出現した全バンドのうち, 陽極側で最も移動度の早かったバンドを a とし, 以下順次 b, c, ... とし, 陰極側で最も移動度の早かったバンドを k とした。また出現した各バンドの活性の大小によって肉眼的に 6 つに区分した。その結果は Fig.-9 に示すとおりである。図中, 左端に a から k までの各バンドの相対的位置を, 右端下側に活性の大小を, そして中央に各ステージのアイソザイム・パターンを模式的に示した。

これらのバンドはいずれも母親であるナンゴウヒか、または父親である須崎2号に遺伝的に由来している。すなわち、a バンドの出現は a 同位酵素を作るのにあずかる a 遺伝子に、b 同位酵素は同様にして b 遺伝子にと以下順次 k 番の遺伝子までが子供群の中に発現していると考えられる。

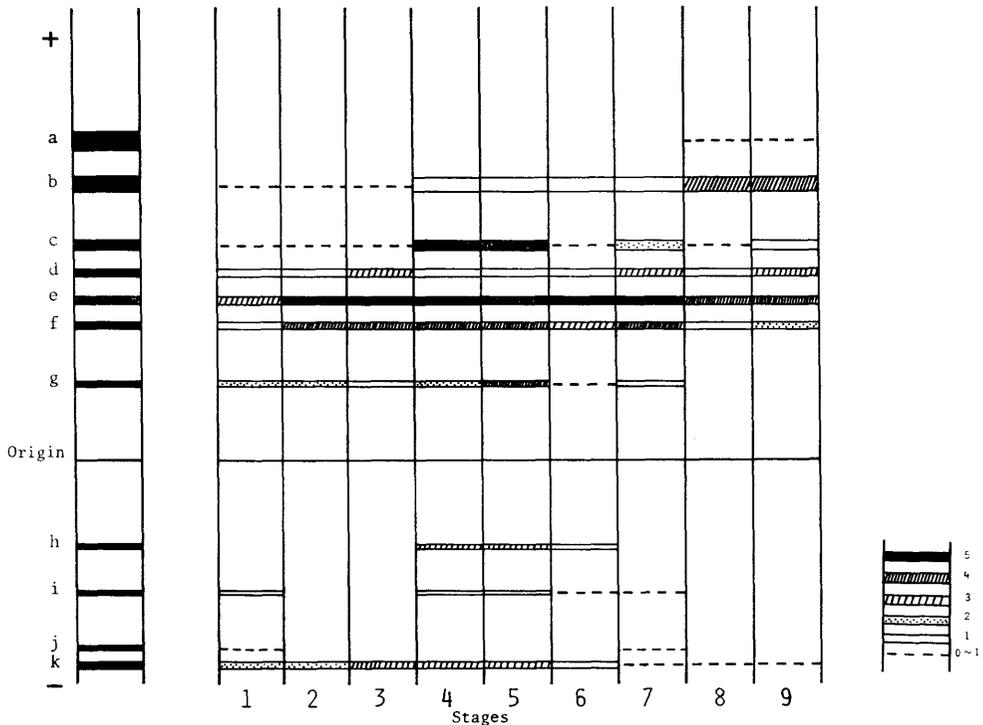


Fig.-9 1~9: diagrammatic peroxidase zymograms of NO \times SZ2 progenies in nine stages which were examined during about one year after germination. Left: whole bands which were detected throughout nine stages. Right: expression of enzymatic activity.

Fig.-9 から明らかなように、发育ステージの比較的最早いもの (Stage 1, 2, 3) は、全体的に各バンドが明確ではなかった。特に a, b, c バンドは活性が著しく低かった。しかし、移動度の遅い陽極側のバンド e, f, g の活性は比較的高く、特に Stage 2, 3 の e バンドは活性が高かった。また、a, i および j バンドは Stage 1 から Stage 3 まで認められなかった。Stage 4, 5, 6, 7 では e, f, g のバンドが比較的安定し、b, c, d の各バンドの活性もかなり高まっていく傾向にあった。陰極側では新たに h バンドが出現した。Stage 8 では c, d バンドの活性がやや低かったが b バンドの活性の増大が見られた。また新たに a バンドが出現し、g, h, i バンドなどは確認できなかった。特に播種後約 280 日経過し、生長休止期に至った Stage 9 では全体的に活性が高まり、b, d, e バンドはかなり安定してくることが分かった。全ステージのうち、Stage 1, 3, 5, および 9 のアイソザイム・パターンの波形グラフを Fig.-10 に示した。

外部形態的に特徴ある 9 つのステージをとらえて、そのアイソザイム・パターンの変化

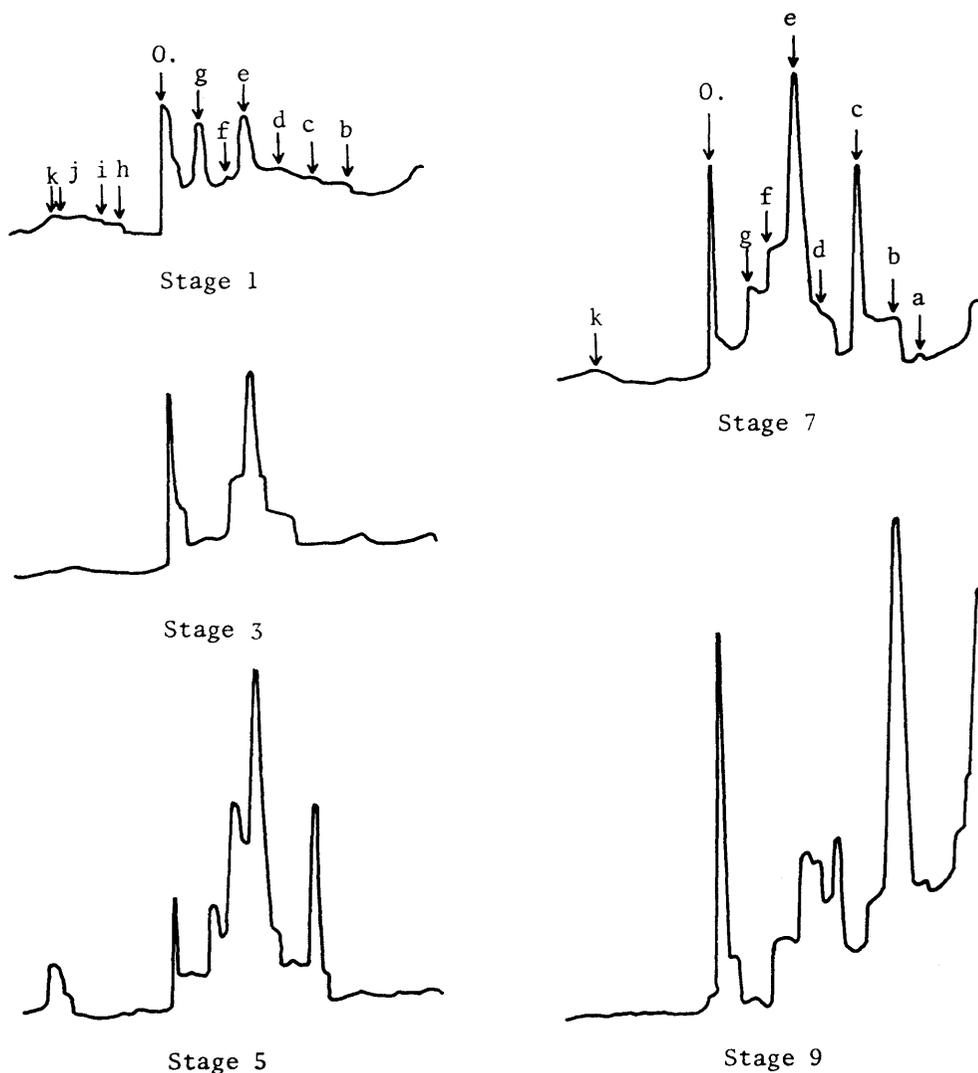


Fig.-10 Detection of peroxidase isozyme bands with the developmental stages 1, 3, 5, 7 and 9 during about one year after germination. The letters of a-k showed the each band. O. : origin, + : anode, - : cathode

を調べた結果、発育ステージによる特定バンドの消長と活性の増減があることが分かった。しかし、発育ステージが進み、生長休止期に達したときには1年生苗木であってもそのなかの特定バンド（例えば d, e バンドなど）は比較的安定してくるという見通しを得た。

3) 考 察

同一植物体のアイソザイム・パターンは器官特異性や発育ステージで変化することが知

られており、これらの研究は1年生植物を中心としてなされている (Efron 1971, 野間 1969, Gupta and Stebbins 1969, Chen et al. 1970, Hirano 1975, 関山・山懸 1973, Steward 1965, Scandalios 1964)。

Scandalios (1964) はトウモロコシの胚乳、花粉、若い穂 (young ear), 毛 (corn silk), 皮 (husk), 根, 幹および葉のパーオキシダーゼなど全部で4種の酵素について, Hirano (1975) はクワ (*Morus spp.*) の栽培3品種の葉身, 葉柄, 茎, 根および花穂のパーオキシダーゼについて, 更に, 関山・山懸 (1973) は水稲品種「銀坊主」の第1・1葉齢期および第3葉齢期の幼植物体とその器官, および圃場で栽培した出穂期植物体の各期間のパーオキシダーゼ・アイソザイム・パターンの変化を調べ, それぞれ器官によってパターンが少しずつ違うことを明らかにしている。

更に, Chen et al. (1970) はオナモミ (*Xanthium pennsylvanicum*) の葉のいろいろな発育ステージをとらえ, パーオキシダーゼや, エステラーゼなど全部で11種の酵素について, Price and Stebbins (1971) は大麦の1品種 *Hordeum vulgare* var. Bonus の外花穎基部の突然変異型 (calcaroides) と正常型 (awned) の2種の第1葉から第8葉までとシオレ葉 (flag leaf) のパーオキシダーゼについて, それぞれ発育相での変化を調べている。そして, 発育相が進むにつれて, それぞれのバンドの活性は増大し, 安定してくることを明らかにしている。

林木のように生育期間の長い永年生作物のアイソザイム・パターンは季節的なものと, 発育ステージの違いによる影響を受けるものとが考えられる。季節的变化については, Park (1972) がアカマツ, Perry (1971) が red maple, 近藤 (1976) がスギについて調べ, それぞれ生長期には活性が不安定で, アイソザイム・パターンの消長が少しみられると述べている。

発育ステージに伴うアイソザイム・バンドの消長に関する研究は, Barnett and Naylor (1969) が *Pinus palustris* Mill. で, また, Conkle (1971b) が knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemm.) について報告しているのみである。特に Conkle は発芽後, 外部形態の変化に基づいた11の発育ステージで, パーオキシダーゼなど全部で5つの酵素のアイソザイム・パターンの変化を調べている。そして発育ステージが進むにつれて, パターンも活性も漸次安定してくることを明らかにしている。

本実験では稚苗の準備が十分でなく, 供試材料が数的に制限されたため, 個体間の変動を確実に調べることができなかった。しかしながら, 上述の結果とほぼ一致し, 発芽から通常葉形成に至る当年の生育期間の Stage 1~7 までの生育期間におけるパターンは不安定であり, また活性にも変化が見られた。しかし, 生長休止期の稚苗段階 (Stage 8, 9) でのパターンは多少活性の差は認められたが, バンド b はもちろん d および e などの特定バンドは安定してくることが分かった。したがって, 1年生稚苗であっても, 生長休止期に至った成葉を用いれば, これらのうちの特定バンドによって, 遺伝子分析が可能と考えられる。

第3節 パーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝子分析

生物の示すさまざまな形質のうち, およそ測定可能な何らかの遺伝変異が見い出されるならば, それらはすべて育種材料としてとり上げられうる。また, 測定形質が精密であ

ればあるほどより正確な知識を我々に与えてくれることはいうまでもない。

これまでの遺伝育種学的研究は主として形態的、細胞的、化学的特性などに関するものが多かった。しかしながら、ザイモグラフ法によれば、各遺伝子座に位置する対立遺伝子レベルまでほり下げて問題を考えることができる。また、実験材料としてきわめて少量の生体粗抽出液中の酵素成分を使用することで分析可能であること、しかもその技術は慣れれば比較的容易であることなどの理由から有効な方法と考えられる。

本実験では自殖に関する研究の一環として、ヒノキ精英樹クローン間の交配により、その親木に見られるパーオキシダーゼ・アイソザイムバンドについて変異が認められ、しかも活性が強い特定バンドをとらえ、それらのバンドが子供群にどのように発現するかという遺伝子分析を試みた。

1) 材料および方法

実験材料として使用したヒノキは、九州大学農学部粕屋演習林のクローン集植園に植栽されている精英樹クローンとその子供群である。1974年4月上旬、ヒノキ精英樹13クローン間の完全ダイアレルクロスを行なった。使用したクローンはつぎのとおりである。すなわち、神埼4号、国東18号、始良25号、宇和島2号、ナンゴウヒ、粕演12号、粕演20号、藤津2号、始良27号、遠賀1号、中津10号、大分7号、宇和島3号。

同年10月中旬、採種し、翌1975年4月上旬、九州大学農学部ガラス大温室内で組み合わせ別に播種した。播種床は播種用バット(34×43×20cm)内に加熱消毒した砂土をつめ、播種前にN・P・K(13:8:9)複化成肥料を15g/バット施用したものである。播種は1列当たり200粒の列まきとし、1バット内に10列設けた。稚苗はそのままの状態に1年間育苗した。しかし、発芽率が著しく悪かったり、発芽しても原因不明で枯死したり、また疾病により消失したものが相当数生じた。その結果、組み合わせによっては欠損区が生じたり、またごく少数の子供しか得られなかったものもあった。翌1976年3月中旬、九州大学農学部粕屋演習林の苗畑に7×7の完全ダイアレル・クロスの型で移植した。7つのクローンは次のとおりである。すなわち、神埼4号(K4)、国東18号(K18)、始良25号(A25)、宇和島2号(U2)、ナンゴウヒ(NO)、藤津2号(F2)、遠賀1号(O1)。

生長休止期に達した1976年11月上旬、前記13クローンのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドを調べた。すなわち、同年11月上旬に苗木(F₁)および親木(P)から鱗状葉(尋常葉)を採取し、ストッカーの中で-20°Cに保ち逐次取り出して実験を行なった。

ザイモグラフ実験法は水平式、垂直式、薄層式の3方式に大別できるが、本実験ではおおむね遠藤(1973, 1974)やScandalios(1969)の原法にしたがった。すなわち、水平式澱粉ゲル電気泳動方式で、支持体は加水分解した濃度約12%の澱粉ゲルを用いた。試料は各個体から鱗状葉約0.3gをとり乳鉢ですりつぶし、その上澄液を濾紙(6×9mm、東洋No.50)に吸着させたものを泳動用ゲル内に挿入した。泳動は5°Cにセットされた保冷庫の中で行なった。また泳動時間は350Vで約2時間30分とした。各移動度を均一にするためB. P. B(Bromophenol blue)色素を用いて調整した。本実験で使用したゲル用緩衝液、ブリッジ用緩衝液、トリス緩衝液の調整およびパーオキシダーゼ・アイソザイムバンドの染色方法は第4章、第1節、2)で述べたとおりである。各個体間のバンドのわずかな違いを検出できるようにするため泳動用澱粉ゲルを縦方向に2分した型の併泳動方

式で実験を行なった。なお本論文中で使用した遺伝子型表示法は国際生化学連合 (IUB) の生化学命名委員会 (CBN: Comprehensive Biochemistry Enzyme Nomenclature) によって決められた方法に準じた (Endo 1973, 遠藤 1974)。

2) 結 果

調査したクローンのうちパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの中で移動度をわずかに異にするバンドがあり、それらの中で比較的活性が高く、しかも肉眼的にその違いを容易に識別できるバンドが試料挿入点を 0 とした場合の陽極側 Rf 36-41 の間に出現することが確認された。その模式図は Fig.-11 に示すとおりである。模式図から分かるように、

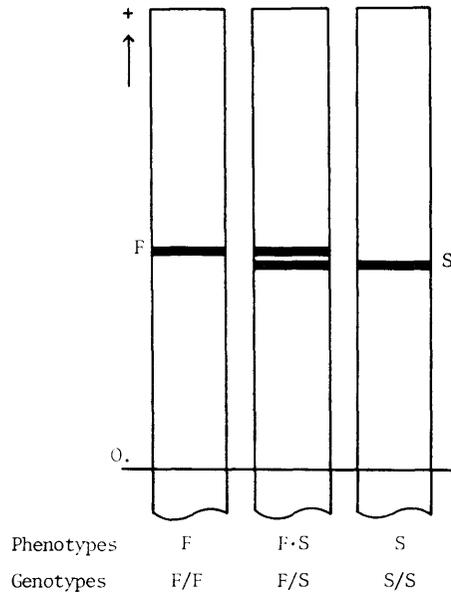


Fig.-11 Schematic illustration of F, F·S and S peroxidase isozyme bands and their genotypes observed in Hinoki, *Chamaecyparis obtusa* Endl.

F: fast migrated band
S: slow migrated band
F·S: fast and slow migrated bands
O: origin

に、その移動度が速いものと遅いもの、およびその両方のバンドを持っている3つの型があることが明らかとなった。

これら2本のバンドを、移動度の遅速によってそれぞれ S (slow migration) および F (fast migration) とした。本実験で使用した4クローンのうち、宇和島2号 (U2) は F バンドを、始良25号 (A25) は S バンドを、神埼4号 (K4) と国東18号 (K18) は F と S の2本のバンドをそれぞれ持っていた。いまこれら2本の F, S バンドが同一遺伝子座にあり、しかも各々が2つの対立遺伝子 (F および S バンドを支配する対立遺伝子を遺伝子記号で P_x^F および P_x^S と表わす。) によって支配されているとすれば、U2 と A25 はそれぞれホモ接合体と考えられ、それらの遺伝子型は P_x^F/P_x^F 、および P_x^S/P_x^S と表わされる。また K4 と K18 はヘテロ接合体と考えられ P_x^F/P_x^S と表わされる。各クローンと F および S バンドおよび遺伝子型との関係は Table-15 に示すとおりである。

親木で見られた F, S および F と S (F·S と略記) バンドの遺伝性を検討するため、

Table-15 Phenotype and genotype in four parental trees

Clone	Phenotype	Genotype
K 4 (Kanzaki 4)	F,S	P_x^F/P_x^S
K18 (Kunisaki 18)	F,S	P_x^F/P_x^S
A25 (Aira 25)	S	P_x^S/P_x^S
U 2 (Uwajima 2)	F	P_x^F/P_x^F

Table-17 Segregation of $P_x^F/P_x^F, P_x^F/P_x^S$ and P_x^S/P_x^S genotype progenies after self-pollination of four parental trees

Parental tree	Parental tree genotype	No. of progenies	Observed genotypes			Expected genotypes			χ_1^2	P*
			P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S	P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S		
K 4	P_x^F/P_x^S	39	7	20	12	9.75	19.50	9.75	1.30	0.50-0.60
K18	P_x^F/P_x^S	39	10	23	6	9.75	19.50	9.75	1.08	0.60-0.70
A25	P_x^S/P_x^S	21			21			21.00	—	—
U 2	P_x^F/P_x^F	31	31			31.00			—	—

* Chi square analysis of observed and expected ratios demonstrated no significant deviation between the observed and expected segregation pattern.

¹ : Expected segregation ratios is as follows, 1 : 2 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$, 1 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^F/P_x^F \times P_x^S/P_x^S$), 1 : 0 for $P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^S/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$).

Table-18 Segregation of $P_x^F/P_x^F, P_x^F/P_x^S$ and P_x^S/P_x^S genotype progenies after cross pollination of four parental trees

Cross combination	Parental tree genotype	No. of Progenies	Observed genotypes			Expected genotypes			χ_1^2	P*
			P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S	P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S		
K 4 × K18	$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$	20	6	9	5	5.00	10.00	5.00	0.30	0.80-0.90
K 4 × A25	$P_x^F/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$	21		11	10		10.50	10.50	0.05	0.80-0.90
K 4 × U 2	$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$	26	14	12		13.00	13.00		0.15	0.60-0.75
K18 × K 4	$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$	28	5	17	6	7.00	14.00	7.00	1.36	0.30-0.50
K18 × A25	$P_x^F/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$	30		14	16		15.00	15.00	0.13	0.60-0.70
K18 × U 2	$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$	20	11	9		10.00	10.00		0.20	0.50-0.70
A25 × K 4	$P_x^S/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$	26		12	14		13.00	13.00	0.15	0.70-0.80
A25 × K18	$P_x^S/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$	20		12	8		10.00	10.00	0.80	0.30-0.50
A25 × U 2	$P_x^S/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$	28		28			28.00		—	—
U 2 × K 4	$P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^S$	22	11	11		11.00	11.00		0.00	1.00
U 2 × K18	$P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^S$	20	9	11		10.00	10.00		0.20	0.60-0.70
U 2 × A25	$P_x^F/P_x^F \times P_x^S/P_x^S$	21		21			21.00		—	—

* Chi square analysis of observed and expected ratios demonstrated no significant deviation between the observed and expected segregation pattern.

¹ : Expected segregation ratios is as follows, 1 : 2 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$, 1 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^F/P_x^F \times P_x^S/P_x^S$), 1 : 0 for $P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^S/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$).

$P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^S$), $P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^S \times P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F (P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F \times P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^S)$ および $P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F \times P_{\alpha}^S/P_{\alpha}^S (P_{\alpha}^S/P_{\alpha}^S \times P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F)$ の4つの遺伝子型組み合わせ別で全体での分離状態を調べて検討した。その結果、各遺伝子型組み合わせ別でのカイ自乗値 (χ^2) およびその確率 (P) は 1.15 (0.60—0.70), 0.01 (0.90—), 0.05 (0.80—0.90) および—(—) を示し、理論値ときわめてよく一致し、上述の仮説が正しいことが分かる。

各組み合わせ当りの子供群個体数は多いもので39個体、少ないものでは20個体で必ずしも一様ではなかった。また個体数は多い方が良いと思われるが Table-19 にも示したように全体の遺伝子型組み合わせ別でのカイ自乗検定の結果から、多いもので126個体、少ないもので49個体であるから、本実験はほぼその目的を達成したものと考えられる。

以上の結果から、ヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの中で Rf=36—41 の区域に出現する2つのバンド F と S は同一遺伝子座に位置する一対の対立遺伝子 P_{α}^F と P_{α}^S によってそれぞれ支配されていることが分かった。したがって、 F バンドまたは S バンドのいずれか1本しか生じなかった親木 U2 と A25 はいずれもホモ接合体で、遺伝子記号で表わせば、それぞれ $P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F$ および $P_{\alpha}^S/P_{\alpha}^S$ となる。一方、 F と S 2本のバンドを示した親木 K4 と K18 はヘテロ接合体で、いずれも P_{α}^F , P_{α}^S と表わされる。またその遺伝様式はモノマー型 (monomeric form) であることが分かった。

3) 考 察

ヘテロ接合体である林木の表現形質に関する遺伝子分析の研究は第3章、第2節に述べたとおりで、多くの人々がいろいろな樹種について報告している。なかでも、大庭 (1967b, 1971a, 1973, 1974a) はスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don.) について、また Franklin (1969a, 1969b) は Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) についてそれぞれ詳細な分析を行ない、これらの変異形質のほとんどが、単一劣性遺伝子ホモ接合体であることを明らかにしている。

一方、ザイモグラフ法を用いた研究は主としてトウモロコシやイネなどの1年生または2年生作物において行なわれてきた。アイソザイムの遺伝に関する研究は1960年に Schwartz がトウモロコシ (*Zea mays* L.) 胚乳のエステラーゼを調べ、 F_1 でいずれの両親にも見られなかった新しいバンド N が生じることを明らかにし、このバンドを雑種酵素 (hybrid enzyme) と呼んだ。そして、この Est-1 座位では E^F , E^N および E^S の3つの対立遺伝子が関与していることを報告したのが始まりである。その後、Schwartz (1964a, 1964b, 1965) は、同じくトウモロコシのエステラーゼに関して Est-1~Est-4 座位まで、また、Macdonald and Brewbaker (1972, 1974) は同様に Est-5~Est-10 までの各座位についての遺伝子分析を行なった。

また、Shahi et al. (1969) は *Oriza sativa* と *O. perennis* から数系統を選んで交配を行ない特定バンドの遺伝子分析を行なっている。更に、Chu (1967) は、遺伝子分析の結果明確にされた各々のバンドの頻度に基づいてイネの系統分化の研究を行なっている。

一方、近年 Miyazaki and Sakai (1969) がスギ在来品種のクローン性の同定においてザイモグラフ法を応用して以来、同様な研究が Rasmuson and Rudin (1971) によって行なわれた。また集団遺伝学的研究として系統分化 (Sakai et al. 1971), 家系分析 (Sakai and Miyazaki 1972), 産地問題 (Bergmann 1972, 1973, Hans 1974, 三上 1972)

Table-19 Segregation of all progenies in four genotype combinations

Parental tree genotype	No. of progenies	Observed genotypes			Expected genotypes			χ_1^2	P*
		P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S	P_x^F/P_x^F	P_x^F/P_x^S	P_x^S/P_x^S		
$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$	126	28	69	29	31.50	63.00	31.50	1.15	0.60-0.70
$P_x^F/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$ ($P_x^S/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$)	97		49	48		48.50	48.50	0.01	0.90-
$P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^S$)	88	45	43		44.00	44.00		0.05	0.80-0.90
$P_x^F/P_x^F \times P_x^S/P_x^S$ ($P_x^S/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$)	49		49			49.00		—	—

* Chi square analysis of observed and expected ratios demonstrated no significant deviation between the observed and expected segregation pattern.

¹ : Expected segregation ratios is as follows, 1 : 2 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^S$, 1 : 1 for $P_x^F/P_x^S \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^F/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$), 1 : 1 for $P_x^F/P_x^F \times P_x^F/P_x^F$ ($P_x^S/P_x^S \times P_x^S/P_x^S$).

あるいは花粉および種子のタンパク質に関する研究 (James and Naylor 1969, Bergmann 1972, Saito 1970, Durzan 1966) などがもろもろの樹種で調べられている。

しかし、林木のアイソザイムに関する遺伝子分析の研究は、まだ始められたばかりでその報告数もきわめて少ない。その主なものについて述べると、Feret and Stairs (1971) がシベリアニレ (*Ulmus pumila* L.), Lundknist (1974, 1975), Tigerstedt (1973), Bartels (1971) が *Picea abies* K., Rudin and Rasmuson (1973) が *Pinus silvestris* L., Conkle (1971a) が *Pinus attenuata* Lemm. そして Feret (1972) が *Ulmus pumila* L., *U. rubra*, *U. pumila* × *U. rubra*, *U. pumila* × *U. japonica* 4 種間の F₁ についてそれぞれ特定バンドの遺伝子分析を試みている。また、用いた酵素の種類も、パーオキシダーゼをはじめとし、エステラーゼ, LAP (Leucine amino opeptidase) や, ACP (Acid phosphatase), ADH (Alcohol dehydrogenase) などさまざまである。

その結果、いずれも単純なメンデルの分離比を示し、更にその遺伝様式は、同一遺伝子座に一对の対立遺伝子が位置し、両親の持つバンドが次代にそのまま伝えられるモノマー型 (monomeric forms) と、両親の持つバンドのほかに、その中間に新しいバンド (hybrid band) を生ずるダイマー型 (dimeric form) の 2 つの遺伝様式型があることをそれぞれ報告している。

アイソザイムの遺伝様式は、トウモロコシやイネを使った研究ですでにいくつかの型のあることが知られているが、遠藤 (1974) によると上述以外に、テトラマー (tetramer) や、バンドとしては 1 本しかなくその発現に優劣関係があるもの、あるいはハイブリッド・バンドのみを生ずるものなど全部で 5 つの型のあることが報告されている。

本実験ではヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイムの遺伝子分析を試みたが、その結果 Rf 36—41 の間に生じるバンドはモノマー型の遺伝様式によるバンドで、しかもヒノキ個体は 3 つの遺伝子型のうちいずれか 1 つに該当することが分かった。これまで報告されてきた変異形質は、いずれも劣性ホモ接合体で、優劣関係があるため 3 : 1 という分離比でしか認知することができず、更に、これらの変異形質個体は生育初期もしくは途中で死滅する場合がほとんどである。また、これらの形質を標識遺伝子とする場合は交配実験によってあらかじめヘテロの親木を探しておかねばならぬ。しかしながら、パーオキシダーゼ・アイソザイムは自然淘汰に関して中立であり、モノマー型の場合は対立遺伝子間に優劣関係はない、いわゆるコドミナント (codominant) であり、しかもヒノキでは全個体がいずれかの遺伝子型を持っている。また、林木のように超永年生作物であっても、活性の高い安定した特定バンドをとらえるならば、生長休止期に至った 1, 2 年生苗木でも十分利用できる。したがって、ヒノキで見られたこのバンドは、林木の集団遺伝学的研究、自殖率の推定あるいは林木の交配様式などの諸問題を解明していく上で、有効な標識遺伝子となり得ることが分った。

第 4 節 ヒノキ採種園における自然自殖率の推定

林木の繁殖様式は有性繁殖法と無性繁殖法とに大別できる。後者の場合は親の形質をそのまま受け継いでいるが前者の場合、種子源はそのほとんどが採種園 (seed orchard) に由来し、次代の遺伝変異はきわめて大きい。また、林木は他殖性で、遺伝子型はヘテロ接合体である。このような林木の採種園内でどのような遺伝子拡散 (gene-flow) が起こっ

ているのかいまだ十分明確にされていない。

採種園内での種子生産量は、母樹の組み合わせ能力 (combining ability), 稔性 (fertility), 和合性 (compatibility) あるいは同系交配 (inbreeding) などによって大きく左右される。本実験では、そのなかの自家受精, 特に採種園内での自然自殖率の程度について研究を行なった。これは林木育種における基本的課題の1つであり、今後、林木の遺伝的改良をはかるために特に留意されるべき問題である。

これまでに行なわれてきた自然自殖率の推定は、天然林や人工林の中のある特定個体に関する報告が大部分である。また、標識遺伝子 (marker gene) として、白子苗 (albino) (Squillace and Kraus 1968, 大庭ら 1971c, Koski and Malmivaara 1974, Fowler 1965d), 淡緑色苗 (light green) (Sorensen 1973, 大庭 1972b, Moffet 1956) や閉果球 (cone serotiny) (Teich 1970, Sittman and Tyson 1971, Lotan 1967) などの単一劣性遺伝子形質を用いて行なう方法と、交配実験を行なって種子のでき方や苗木の生長量などの違いから自殖率を推定する方法 (Franklin 1971a, 1971b, Coles and Fowler 1976, Sorensen and Miles 1974, Sorensen 1971a) とに大別できる。

また、近年林木の集団遺伝学的研究においてザイモグラフ法が取り入れられ数多くの報告がなされている (Tigerstedt 1973, Feret 1974, Sakai et al. 1971, 1972, Bergmann 1972, 1973, 1974, Park 1972, Sakai and Miyazaki 1972, Sakai and Park 1971, Rudin et al. 1974, Rasmuson and Rudin 1971)。一方では多くの樹種について、いろいろなアイソザイムが調べられ、その中の特定バンドの遺伝子分析が行なわれつつある。その結果、ある特定バンドは比較的単純な遺伝様式に基づいていることが明らかにされた (Feret 1971, 1972, Lundkuist 1974, 1975, Bartels 1971, 朴・酒井 1971, Conkle 1971b, Rudin and Rasmuson 1973)。

アイソザイムの遺伝様式には、いろいろな型のあることが知られているが (遠藤 1974), なかでも単量体, モノマー (monomer) の場合は非常に単純なバンド組成を示す。ここで注目すべきことは、従来、自殖率推定は標識遺伝子を持つ特定母樹にのみ限られ、しかもその標識遺伝子は単一劣性遺伝子 (3:1) によるものであった。しかしながら、全てのヒノキ個体はこれらのバンド型のいずれかを普遍的に持ち、しかもこのバンド型のヘテロ接合型を示す親木の自殖次代では、分離したバンド型によって1:2:1まで識別することが可能なことである。したがって、モノマー型のバンドはこれまでの主動遺伝子による形質と同様に、あるいはそれ以上に有用な標識遺伝子としての役目を帯びていることが分かった。

本論文ではこれら3つのバンド (F , S および $F \cdot S$) を標識として、実際の採種園とクローン集植園でどの程度自殖が起こっているかを調べた。

1) 材料および方法

本研究では1つの採種園と1つのクローン集植園を研究対象とした。1つは長崎県総合農林試験場, 遠目採種園である。本採種園は7×7型式の採種園で、材料採取当時の樹齢は12年生である。採種園内の各クローンとその配置との関係を Fig.-12 に示した。材料はいずれも1年生苗木から得られた針葉 (鱗状葉) を用いた。1976年3月中旬, 当採種園の各母樹の針葉と、母樹ごとに養成された自然受粉子供群の針葉を1クローン当り20~30個

体、全部で747個体から採取した。更に、これとは別に、母樹神埼4号の自然受粉子供群247個体の針葉を採取した。また、翌1977年4月初旬、再び当採種園の6母樹、小城2号、山田2号、長崎1号、遠賀1号、南高来3号、および諫早1号の各々の自然受粉子供群から少なくとも100個体以上の針葉を採取した。

もう一つの対象は、九州大学農学部粕屋演習林のヒノキクローン集植園である。ここはクローン集植園となっているため同一クローンを1列10本植えとし、更に隣り合わせて2~3列が植栽されている。現在20クローンが植栽されているが欠損区が生じ、クローンによっては1~2本しか残っていないものもある。樹齢は14年生である。これらのクローンの中から神埼4号と宇和島2号の特定個体から養成した自然受粉子供群各々200個体以上から針葉を採取した。2母樹と周囲のクローンの配置関係はそれぞれ Fig.-13, Fig.-14 に示した。

採取した針葉は、いずれの場合も直ちに -20°C のストッカーの中に保存し、逐次取り出して実験に供した。実験は1976年6月上旬から9月下旬までと、1977年4月下旬から6月上旬の間に行なった。調べた酵素はパーオキシダーゼ同位酵素である。具体的な実験方法、使用薬品および使用器具等については第4章、第1節「サイモグラフ法」で述べたとおりである。そして、第4章、第3節でその遺伝性が明らかにされた3つの遺伝子型 F/F , F/S および S/S の別を各個体ごとに調べた。同時に、陽極側に出現した各バンドのスケッチを行ない、更に写真撮影を行なった。

2) 結 果

(1) P_{σ}^F と P_{σ}^S , 2つの遺伝子頻度 p, q の決定

長崎県総合農林試験場、遠目採種園 7×7 型式の母樹49本それぞれから針葉を採取し、パーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドを調べた。第4章、第3節で定義づけた Rf 36-41 の間に出現する $P_{\sigma}^F/P_{\sigma}^F$, $P_{\sigma}^F/P_{\sigma}^S$ および $P_{\sigma}^S/P_{\sigma}^S$ (それぞれ F/F , F/S および S/S と略記) の3つの遺伝子型についての出現個体数と出現頻度を調べた。その結果は Table-20 に示したとおりである。

Table-20 Estimation of F - and S -gene frequency (p, q) from forty-nine mother tree genotype frequencies at Nagasaki pref. Agri. Forest. Sta.

Genotypes	F/F	F/S	S/S	Total	
Observed No.	0	18	31	49	
Observed Freq.	.0000	0.3673	0.6327	1.0000	$p=0.1837$
Expected Freq.	0.0337	0.2999	0.6665	1.0000	$q=0.8163$

更に、これらの遺伝子頻度に基づいて、この採種園内での F と S の2つの遺伝子頻度 (それぞれ p および q とする) を求めた。 p と q を求めるための式は下記のとおりである。

$$p = f(F/F) + \frac{1}{2} \cdot f(F/S)$$

$$q = f(S/S) + \frac{1}{2} \cdot f(F/S)$$

但し、

p, q : 採種園内の F および S 遺伝子頻度で, $p+q=1$

$f(F/F), f(F/S), f(S/S)$: 採種園内の全母樹で観察された $F/F, F/S$ および S/S 遺伝子型の出現頻度

上式に基づいて求めた p, q の値は $p=0.1837, q=0.8163$ であった。更に、この採種園内で任意交配 (random mating) が行なわれたとすると、この採種園全体から得られる子供群の3つの遺伝子型別の期待頻度はそれぞれ 0.0337, 0.2999 および 0.6665 である。

次に、九州大学農学部柏屋演習林、ヒノキクローン集植園内での遺伝子頻度は $p=0.2601, q=0.7399$ であった (Table-21)。クローン集植園であるため、20クローンそれぞれが2~3列に列状植栽されている。もし任意交配が行なわれた時、次代で期待される $F/F, F/S$ および S/S 遺伝子型頻度はそれぞれ 0.0676, 0.3849 および 0.5475 となる。

Table-21 Estimation of F - and S -gene frequency (p, q) from mother tree frequencies at the clone stock garden at Expt. Forest, Kyushu Univ.

Genotypes	F/F	F/S	S/S	Total	
Observed No.	6	91	101	198	
Observed Freq.	0.0303	0.4596	0.5105	1.0000	$p=0.2601$
Expected Freq.	0.0676	0.3849	0.5475	1.0000	$q=0.7399$

(2) 自然自殖率を求めるための推定式

出現したヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドのうち $Rf=36-41$ の間で3つのバンド型が出現することが分かった。これらのバンドは一对の F, S 対立遺伝子によって支配され、遺伝子記号では $F/F, F/S$ および S/S と表記できる。したがって、これらのバンドを標識遺伝子として自殖率を推定する場合、対象とする母樹の遺伝子型と、更に用いる標識遺伝子の違いによって下記のようにそれぞれ異なった推定式が考えられる。

① 母樹の遺伝子型が F/F である場合

$$f(F/F) = \underline{S} + p(1-\underline{S}) \quad \therefore \underline{S} = \frac{f(F/F) - p}{1-p} \times (100)$$

② 母樹の遺伝子型が S/S である場合

$$f(S/S) = \underline{S} + q(1-\underline{S}) \quad \therefore \underline{S} = \frac{f(S/S) - q}{1-q} \times (100)$$

但し、上記①, ②の場合

$0 < p < 1, 0 < q < 1$ だから $f(F/F) > p, f(S/S) > q$ の条件を満足していなければ推定は不可能である。

③ 母樹の遺伝子型が F/S である場合

a) F/F 遺伝子型頻度による場合

$$f(F/F) = \frac{1}{4}\underline{S} + \frac{1}{2}p(1-\underline{S}) \quad \therefore \underline{S} = \frac{2f(F/F) - p}{0.5 - p} \times (100)$$

但し、 $\underline{S} > 0$ だから

- i) $0.5-p > 0$, $2f(F/F)-p > 0$ したがって $p < 0.5$, $f(F/F) > \frac{p}{2}$
- ii) $0.5-p < 0$, $2f(F/F)-p < 0$ したがって $p > 0.5$, $f(F/F) < \frac{p}{2}$
- b) S/S 遺伝子頻度による場合
- $$f(S/S) = \frac{1}{4} \underline{S} + \frac{1}{2} q(1-\underline{S}) \quad \therefore S = \frac{2f(S/S)-q}{0.5-q} \times (100)$$
- 但し, $S > 0$ だから
- i) $0.5-q > 0$, $2f(S/S)-q > 0$ したがって $q < 0.5$, $f(S/S) > \frac{q}{2}$
- ii) $0.5-q < 0$, $2f(S/S)-q < 0$ したがって $q > 0.5$, $f(S/S) < \frac{q}{2}$

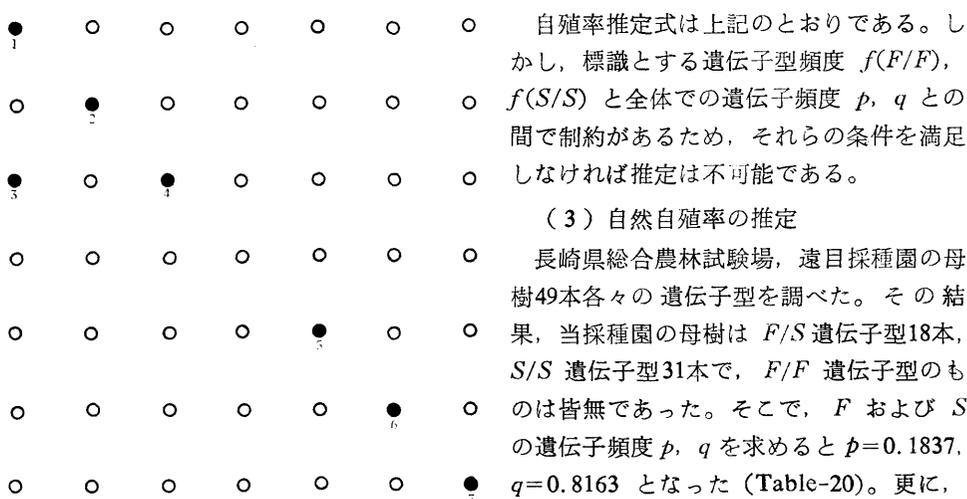
更に, ③の場合, 次代の F/S 遺伝子型子供群の頻度が理論どおり $f(F/S) = 0.5$ となれば両方の標識遺伝子を用いた推定, すなわち a), b) どちらからも推定可能で, その場合の推定値は必ず一致する。もし $f(F/S) \neq 0.5$ の時は, それぞれの条件のもとで a) または b) によって推定が可能である。

〔記号の説明〕

\underline{S} : 自然自殖率

p, q : 採種園またはクローン集植園での F および S の遺伝子頻度, $0 < p < 1$, $0 < q < 1$, $p+q=1$

$f(F/F), f(S/S)$: $F/F, F/S$ および S/S 遺伝子型母樹それぞれから生じた全自然受粉子供群中の F/F および S/S 遺伝子型子供群の出現頻度。



(3) 自然自殖率の推定

長崎県総合農林試験場, 遠目採種園の母樹49本各々の遺伝子型を調べた。その結果, 当採種園の母樹は F/S 遺伝子型18本, S/S 遺伝子型31本で, F/F 遺伝子型のもの皆無であった。そこで, F および S の遺伝子頻度 p, q を求めると $p=0.1837$, $q=0.8163$ となった (Table-20)。更に, 当採種園の F/S 遺伝子型母樹5本と, S/S 遺伝子型母樹2本のそれぞれから自然受粉子供群の針葉を採取した。対象とした7母樹のクローンと遺伝子型およびそれらの位置関係は Fig.-12 に示したとおりである。

各母樹ごとの子供群の遺伝子型別出現個体数および出現頻度を調べ, それらの頻度

Fig.-12 Arrangement map of forty nine mother trees in Nagasaki pref. Agri. Forest, Sta. seed orchard. Black circles indicated the position of seven experimented mother trees. The names and genotypes of these trees are as follows; 1: Minami-takaki 3 (S/S), 2: Isahaya 1(S/S), 3: Nagasaki 1(F/S), 4: Kanzaki 4(F/S), 5: Yamada 2(F/S), 6: Onga 1(F/S), 7: Ogi 1(F/S).

に基づいて自然自殖率の推定を行なった。母樹の遺伝子型が F/S である場合は、 p , q および $f(F/F)$, $f(S/S)$ の関係から上記の推定式③—a) 式で推定した。また S/S 遺伝子型母樹の場合は②式によって自殖率を求めた。しかし、 S/S 遺伝子型母樹の場合、諫早1号、南高来3号はいずれも $f(S/S) < q (=0.8163)$ となったため自殖率の推定はできなかった (Table-22)。

Table-22 Estimation of frequency of natural self-fertilization in five F/S -genotype and two S/S -genotype mother trees at Nagasaki pre. Agri. Forest. Sta. ($p=0.1837$ $q=0.8163$)

Clones	Genotypes	F/F	F/S	S/S	Total	$\underline{S}(\%)$
Onga 1 (F/S)	Observed No.	13	43	48	104	20.96
	Observed Freq.	0.1250	0.4135	0.4615	1.0000	
Yamada 2 (F/S)	Observed No.	15	52	41	108	29.75
	Observed Freq.	0.1389	0.4815	0.3796	1.0000	
Ogi 2 (F/S)	Observed No.	14	34	58	106	25.45
	Observed Freq.	0.1321	0.3208	0.5471	1.0000	
Nagasaki 1 (F/S)	Observed No.	12	39	51	102	16.28
	Observed Freq.	0.1176	0.3824	0.5000	1.0000	
Kanzaki 4 (F/S)	Observed No.	30	46	171	247	18.75
	Observed Freq.	0.1215	0.1862	0.6923	1.0000	
Isahaya 1 (S/S)	Observed No.		21	79	100	—
	Observed Freq.		0.2100	0.7900	1.0000	
Minamitakaki 3 (S/S)	Observed No.		19	81	100	—
	Observed Freq.		0.1900	0.8100	1.0000	

\underline{S} : Natural self-fertilization

また、前述のものとは別に当採種園の F/S 遺伝子型母樹14本から、それぞれ自然受粉子供群の針葉を採取した。採種個体数は24~31本で、全部で391本であった。各母樹ごとの遺伝子型別出現個体数およびこれらを総計した場合の出現個体数とその頻度は Table-23 に示した。そして、 F/F 遺伝子型頻度に基づき、前述の推定式③—a) によって求めた自然自殖率は 16.28% であった。しかし、 S/S 遺伝子型頻度による自殖率の推定式は③—b) によったが、 $f(S/S) > \frac{q}{2} (=0.40815)$ であるためできなかった。

同様に S/S 遺伝子型母樹13本について遺伝子型別出現個体数と頻度を調べた。調べた個体数は各母樹当り25~30本で、総計 356 本であった。推定式②に基づいた自然自殖率は 9.80% であった。その結果は Table-24 に示した。 S/S 遺伝子型母樹の場合は F/S 遺伝子型母樹の場合に比べて低い自殖率の値が得られた。これは各母樹の遺伝子型頻度が $f(S/S) < q (=0.8163)$ である場合が多かったためだと推察される。

九州大学農学部柏屋演習林のものはクローン集植園である。当園内での F および S 遺

Table-23 Estimation of frequency of natural self-fertilization in pooled progenies which were collected from fourteen *F/S* genotype mother trees. ($p=0.1837$, $q=0.8163$)

Clones Genotypes	<i>F/F</i>	<i>F/S</i>	<i>S/S</i>	No. of Observed progenies
Kanzaki 5	0.1035	0.3793	0.5172	29
Kaho 5	0.0645	0.2903	0.6452	31
Nagasaki 1	0.1786	0.4643	0.3571	28
Fujitsu 3	0.1538	0.6154	0.2308	26
Fujitsu 4	0.0968	0.4193	0.4839	31
Fujitsu 6	0.1786	0.6071	0.2143	28
Fujitsu 11	0.1538	0.5769	0.2693	26
Ogi 2	0.0714	0.2500	0.6786	28
Yamada 2	0.0714	0.3572	0.5714	28
Onga 1	0.0714	0.4286	0.5000	28
Amagi 2	0.1667	0.5416	0.2917	24
Ukiha 14	0.2500	0.4643	0.2857	28
Nagasaki 1	0.1154	0.4615	0.4231	26
Kikuchi 1	0.0000	0.7667	0.2333	30
Pooled Observed No.	46	184	161	391
Pooled Observed Freq.	0.1176	0.4706	0.4118	1.0000

 $\underline{S}=16.28$ \underline{S} : Natural self-fertilization per.

Table-24 Estimation of frequency of natural self-fertilization in pooled progenies which were collected from thirteen *S/S* genotype mother trees. ($p=0.1837$, $q=0.8163$)

Clones Genotypes	<i>F/S</i>	<i>S/S</i>	No. of Observed individuals
Ogi 1	0.2857	0.7143	28
Ukiha 13	0.2000	0.8000	25
Kaho 4	0.0357	0.8214	28
Isahaya 1	0.1852	0.8148	27
Isahaya 2	0.1667	0.8333	30
Fujitsu 7	0.0357	0.9643	28
Fujitsu 10	0.2857	0.7143	28
Fujitsu 12	0.1481	0.8519	27
Minamitakaki 4	0.0000	1.0000	26
Minamitakaki 5	0.1786	0.8214	28
Minamitakaki 7	0.3333	0.6667	27
Minamitakaki 8	0.2143	0.7857	28
Minamitakaki 9	0.0769	0.9231	26
Pooled Observed No.	59	297	356
Pooled Observed Freq.	0.1657	0.8343	1.0000

 $\underline{S}=9.80$ \underline{S} : Natural self-fertilization per.

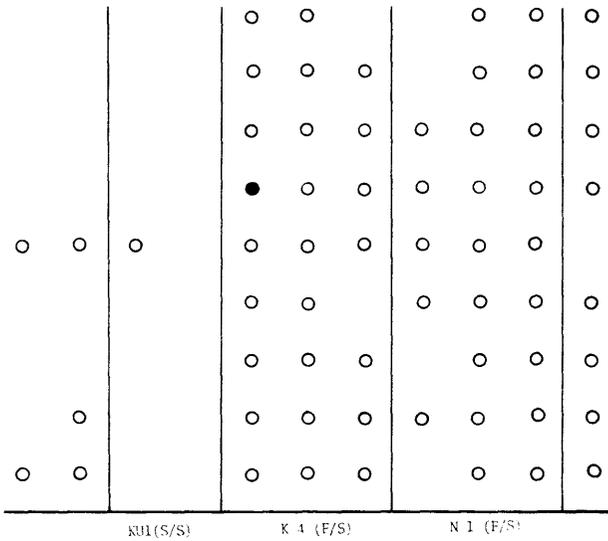


Fig.-13 Arrangement map of Kanzaki 4(K4) clone in Hinoki clone stock garden at Kasuya Forest Exper. of Kyushu Univ. The black circle indicated the experimented mother tree. KSI : Kubara 1 (under), KU1 : Kubara 1 (upper), N 1 : Nagasaki 1.

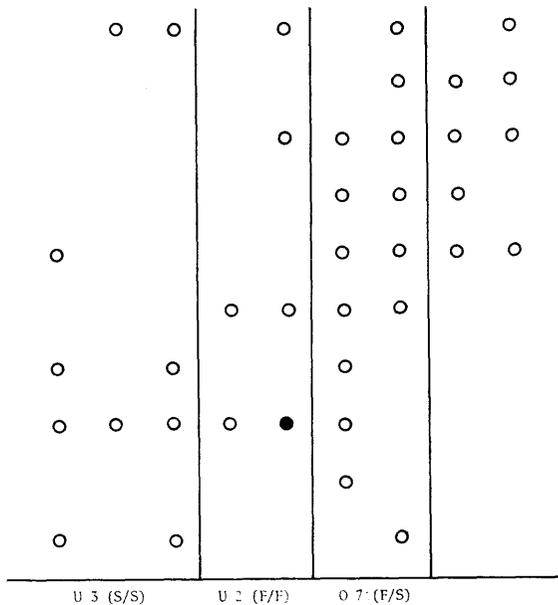


Fig.-14 Arrangement map of Uwajima 2 (U2) clone in Hinoki clone stock garden at Kasuya Forest Exper. of Kyushu Univ. The black circle indicates the experimented mother tree. U 3 : Uwajima 3, O 7 : Ooita 7

伝子頻度 p, q はそれぞれ $p=0.2601, q=0.7399$ であった (Table-21)。

当園に植栽されている神埼4号 (遺伝子型 F/S) と宇和島2号 (遺伝子型 F/F) の植栽区中の特定母樹から養成した自然受粉子供群の針葉を採取した。特定母樹および隣接個体との位置関係はそれぞれ Fig.-13, Fig.-14 に示したとおりである。採取個体数はそれぞれ 234 と 218 である。各母樹の子供群の遺伝子型別出現個体数とその頻度は Table-25 に示した。

これらの頻度に基づき、宇和島2号の自殖率推定は前述の推定式①により、また神埼4号では ③-a) 式によって推定した。その結果、それぞれ 13.20% と 44.81% であった。採種園の場合に比べてクローン集植園内での自殖率は一般に高く、更に、隣接木との距離間隔などがその要因の一つと考えられる。

母樹の遺伝子型が F/S である場合、その後代の各遺伝子型子供群の頻度は次式のように表わされる。記号は前述のとおりである。

$$\left\{ \begin{aligned} f(F/F) &= \frac{1}{4}S + \frac{1}{2}p(1-S) \\ f(F/S) &= \frac{1}{2}S + \frac{1}{2}(p+q)(1-S) \\ f(S/S) &= \frac{1}{4}S + \frac{1}{2}q(1-S) \end{aligned} \right.$$

Table-25 Estimation of frequency of natural self-fertilization in one F/F -genotype and one F/S -genotype mother trees at the clone stock garden in Exp. For., Kyushu Univ. ($p=0.2601$, $q=0.7399$)

Clones	Genotypes	F/F	F/S	S/S	Total	$\underline{S}(\%)$
Uwajima 2 (F/F)	Observed No.	78	140		218	13.20
	Observed Ereq.	0.3578	0.6422		1.0000	
Kanzaki 4 (F/S)	Observed No.	43	123	68	234	44.81
	Observed Freq.	0.1838	0.5256	0.2906	1.0000	

\underline{S} : Natural self-fertilization

これらの式中, F/S 遺伝子型の出現頻度 $f(F/S)$ は $p+q=1$ であるから, 結局 $f(F/S)=0.5$ となり, 残り 2 つの遺伝子型頻度間には $f(F/F)+f(S/S)=0.5$ という理論値が期待される。

しかし, 実際の観察頻度を見ると (Table-22, Table-23), そのほとんどが $f(F/S)<0.5$ で, しかも $f(F/F)+f(S/S)>0.5$ となっている。このようにいずれかの方向にひずんだ原因として, 不和合性 (incompatibility), 不稔性 (sterility) あるいは組み合わせ能力 (combining ability) などの配偶子選択 (gametic selection) や接合子致死 (zygotic lethality) が考えられる。すなわち, 受粉時から生殖年齢に達するまで何らかの選択が働き, 適応度 (fitness) に違いが生じたために期待値頻度からずれたものと考えられる。このように何らかの選択が働いている場合, 各遺伝子の平均適応度への寄与率 (contributed proportion) がわかれば, 選択前と後での各遺伝子頻度の変化量を知ることができる (Li 1955, 大島 1974, 大羽 1977, Mettler and Gregg 1971)。

本実験の場合, 理論的期待頻度は $f(F/S)=0.5$, $f(F/F)+f(S/S)=0.5$ であるのに対し, 観察値の大部分は $f(F/S)<0.5$, $f(F/F)+f(S/S)>0.5$, 更に $f(S/S)>0.5$ の傾向にあった。したがって, いま F/S 遺伝子型母樹上で F , S 遺伝子の配偶子選択を仮定し, その次代の F/S および F/F 遺伝子型子孫群に対する選択係数 (selection coefficient) をそれぞれ s および $\frac{1}{2}s$ と仮定すれば, 適応度 (relative fitness) は $1-s$, および $1-\frac{1}{2}s$ と表わされる。そうすると, 各遺伝子型に対する寄与率 (contributed proportion) が分かり, その総和は \bar{W} となる。Table-26 に示したモデル式の具体的な計算方法は以下に述べるとおりである。

現在分かっている値はモデル式中の F_1 , F_2 , F_3 および $f_2=\frac{1}{2}$ である。したがって,

$$\bar{W} = \frac{f_1 \cdot (1 - \frac{1}{2}s)}{F_1} = \frac{(1-s)}{2 \cdot F_2} = \frac{\frac{1}{2} - f_1}{F_3} \text{ となり, これから}$$

$$\begin{cases} (1-s) \cdot F_1 = 2 \cdot F_2 \cdot f_1 (1 - \frac{1}{2}s) \text{--- ①} \\ (1-s) \cdot F_3 = 2 \cdot F_2 \cdot (\frac{1}{2} - f_1) \text{--- ②} \end{cases}$$

となり, 更に

Table-26 Change of three genotype frequencies in the progenies before and after selection.

Genotypes	<i>F/F</i>	<i>F/S</i>	<i>S/S</i>	Total
Before selection	f_1	$f_2 (= \frac{1}{2})$	f_3	1
Relative fitness	$1 - \frac{1}{2}s$	$1 - s$	1	—
Contributed proportion	$f_1(1 - \frac{1}{2}s)$	$f_2(1 - s)$	f_3	$1 - (\frac{1}{2}f_1 + f_2)s$
	$= f_1(1 - \frac{1}{2}s)$	$= \frac{1}{2}(1 - s)$	$= \frac{1}{2} - f_1$	$= 1 - \frac{1}{2}(f_1 + 1)s = \bar{W}$
After selection	$F_1 = \frac{f_1}{\bar{W}}$	$F_2 = \frac{\frac{1}{2}(1 - s)}{\bar{W}}$	$F_3 = \frac{\frac{1}{2} - f_1}{\bar{W}}$	1

f_1, f_2, f_3 : Expected three genotype frequencies before selection.
 s : Selection coefficient.

F_1, F_2, F_3 : Observed three genotype frequencies after selection.
 \bar{W} : Mean fitness.

$$\textcircled{2} \text{式から } f_1 = \frac{F_2 - (1-s) \cdot F_3}{2 \cdot F_2} \textcircled{3}$$

が導かれ、 $\textcircled{3}$ 式を $\textcircled{1}$ 式に代入して

$$(1-s) \cdot F_2 = 2F_2 \cdot \frac{F_2 - (1-s) \cdot F_3}{2 \cdot F_2} \cdot (1 - \frac{1}{2}s)$$

となる。これを整理すると

Table-27 Estimation of frequency of natural self-fertilization from the expected frequencies which were calculated from the observed frequencies in five *F/S* genotype mother trees and pooled *F/S* genotype mother trees.
($p=0.1837, q=0.8163$)

Clones	Genotypes	<i>F/F</i>	<i>F/S</i>	<i>S/S</i>	Total	$\underline{S}(\%)$
Onga 1 (<i>F/S</i>)	Observed Freq.	0.1250	0.4135	0.4615	1.0000	19.13
	Expected Freq.	0.1221	0.5000	0.3779	1.0000	
Yamada 2 (<i>F/S</i>)	Observed Freq.	0.1389	0.4815	0.3796	1.0000	29.24
	Expected Freq.	0.1381	0.5000	0.3619	1.0000	
Ogi 2 (<i>F/S</i>)	Observed Freq.	0.1321	0.3208	0.5471	1.0000	21.40
	Expected Freq.	0.1257	0.5000	0.3743	1.0000	
Nagasaki 1 (<i>F/S</i>)	Observed Freq.	0.1176	0.3824	0.5000	1.0000	14.07
	Expected Freq.	0.1141	0.5000	0.3859	1.0000	
Kanzaki 4 (<i>F/S</i>)	Observed Freq.	0.1215	0.1862	0.6923	1.0000	13.12
	Expected Freq.	0.1126	0.5000	0.3874	1.0000	
Pooled fourteen <i>F/S</i> genotype mother trees	Observed Freq.	0.1176	0.4706	0.4118	1.0000	15.71
	Expected Freq.	0.1167	0.5000	0.3833	1.0000	

\underline{S} : Natural self-fertilization percentage

$F_3 \cdot s^2 + (F_2 - 3F_3 - 2F_1) \cdot s + 2(F_1 - F_2 + F_3) = 0$ となる。この式は s に関する二次方程式だから、 F_1 、 F_2 および F_3 の値をそれぞれ代入して s の値を求める (但し $0 < s < 1$)。得られた s 値を③式に代入して f_1 を求め、更に $f_3 = 0.5 - f_1$ から f_3 を求める。

このようにして、 F/S 遺伝子型 5 母樹の選択前の各遺伝子型別の推定頻度と、その頻度に基づいた自殖率の推定結果は Table-27 に示したとおりである。すなわち、自殖率 $S = 13.12 \sim 29.24\%$ となり、また、14母樹の子供群をプールした場合でも 15.71% であった。更にこの場合、 $f(F/S) = 0.5$ で $f(F/F) + f(S/S) = 0.5$ となっているため F および S いずれを標識遺伝子にしてもよく、各々の場合の自殖率の推定値は一致している。

3) 考 察

林木の自然自殖率の推定は、Moffett (1956) が *Acacia decurrens* と *A. mollissima* の自然交雑に関する研究の一環として、*A. mollissima* の他殖率を調べ、供試木21本のうち1本だけは 36% であったが、他は $62 \sim 94\%$ であったと言う報告を行なったのが最初である。その後、種々の方法で、またいろいろな見地から研究が行なわれてきた。

Squillace and Kraus (1963) は slash pine (*Pinus elliotii* var. *densa* Little and Dorman) で、また大庭 (1971c) はアカマツについて、自然林分内での自殖率を調べている。Sorensen (1971a, 1973) は Douglas-fir の分布域別による自殖率の違いを、同様に Koski and Malmivaara (1974) は *Picea abies* K. と *Pinus silvestris* L. の自然分布域の北限と南部での違いについて、また、Sorensen and Mile (1974) は Douglas-fir と ponderosa pine の樹種による違いについてそれぞれ報告している。更に、大庭 (1972b) はクロマツの同一母樹について年度別で自殖率が違うことを、Fowler (1965c) は *Pinus resinosa* Ait. を用いて、同一個体内でも樹冠の上・下部で自殖率が著しく違うことを報告している。

また、自殖率推定のために用いた標識遺伝子は、第3章、第2節で述べたような主動遺伝子による変異形質による場合がほとんどであるが、Franklin (1971a, 1971b) は種子の充実粒率に基づいて loblolly pine と *Pinus silvestris* L. の自殖率の推定を行なっている。更に近年、林木の遺伝育種学的研究にザイモグラフ法が応用されているが、Rudin et al. (1974)、Tigerstedt (1973)、Müller (1976) らは、それぞれこれらの手法によって自殖率あるいは近親交配の程度を調べている。

以上述べてきたように、自殖率の推定方法は必ずしも統一しておらず、樹種、年齢および個体などによって著しく異なっているが、その範囲は $0 \sim 30\%$ 位である。更に上記の研究は人工林分中の特定個体を対象としたものが大部分である。Fowler (1965d) は jack pine の採種園について調べ、自殖率が意外に高く、しかも樹冠下部では上部の2倍もの自殖が起こっていることから、樹冠型、樹形、配置などが大切であると述べている。

本実験は、ヒノキ採種園での自殖率に関する研究であるが、その結果 $0 \sim 29.75\%$ (Table-22) で、14本の母樹の平均でも 16.28% (Table-23) を示し意外に高い値が得られた。また、クローン集植園では 13.20% と 44.81% と著しく高くなり、しかもその程度は母樹の植栽密度などによって大きく影響を受けることが明らかとなったことは注目すべきことである。更に、これまでの自殖率は、単木的にしか行なうことができなかったが、本実験で用いたような標識遺伝子を使えば、採種園全体での平均的な自殖率を推定す

ることも可能である。

また、本研究では F 遺伝子を標識としたが、母樹の遺伝子型が F/S である場合は S 遺伝子を標識とした自殖率推定も理論的に可能で、しかも両者はその値が一致するはずである。その場合の推定式は ③-b) で示したように $\underline{S} = \frac{2f(S/S) - q}{0.5 - q}$ となる。その場合 $f(F/S) = 0.5$, $f(F/F) + f(S/S) = 0.5$ とならねばならない。しかし、本実験では Table-20 から明らかのように、 S 遺伝子の頻度 $q = 0.8163$ とあまりにも大きいために推定不可能であった。すなわち、推定式中 $q > 0.5$ の場合、分母は負となるから分子も $2 \cdot f(S/S) - q < 0$ となるはずである。これは次式で証明される。すなわち

$$2 \cdot f(S/S) - q = 2 \cdot \left\{ \frac{1}{4} \underline{S} - \frac{1}{2} q \cdot (1 - \underline{S}) \right\} - q = \frac{1}{2} \underline{S} + q(1 - \underline{S}) - q$$

では $p < q$, $q > \frac{1}{2}$ であるから $q = \frac{1}{2} + \alpha$ と仮定して (但し, $0 < \alpha < 0.5$), 上式に代入すると, $2 \cdot f(S/S) - q = -\alpha \cdot S$ となる。また, $\alpha > 0$, $S > 0$, だから結局 $2f(S/S) - q < 0$ である。したがって, 2つの遺伝子頻度 p と q の間で, $p < 0.5 < q$ の関係がある場合, 分子 $2f(S/S) - q < 0$ となるはずだから $q > 0.5$, $f(S/S) < \frac{1}{2}q$ を満足していなければ推定不可能となる。

5 母樹の各遺伝子型頻度は (Table-22), いずれも $f(F/S) \neq 0.5$ で, しかも $f(S/S)$ の値が異常に大きかった。このような“かたより”が生じた原因として, 受粉—受精—種子形成—発芽の過程で何らかの選択 (selection) が働き, 適応度に違いが生じたためだと考えられる。これは非常に興味ある現象であるが, このような現象は一般に動植物で認められている。

Nakagahra (1972) は, 日本型栽培イネと外国在来イネとの交雑で標識遺伝子の分離がたびたび乱れ, 劣性個体の頻度が有意に減少したり (減少分離型), 増加したり (増加分離型) する 2つのタイプを認めた。そしていろいろな型の交配の結果, 受精時に花粉の競争が起こり, 受精力の弱い花粉の遺伝子 ga (配偶体遺伝子) が, 標識遺伝子と連鎖 (linkage) しているために“ひずみ” (distorted segregation) を生じたものであることを明らかにした。また, Nakagahra (1977) は *Oriza sativa* のエステラーゼ・アイソザイム・バンドのうち, 12A と 13A のモノマー型バンドの分離が同様な理由で乱され, しかも組み合わせによってまちまちであったと述べている。更に, Gain et al. (1971) はハタネズミ (*Microtus ochrogaster*) のトランスフェリン (transferrin) の対立遺伝子 T_F^E と T_F^F による 3つの遺伝子型の適応力に違いがあることを明らかにしている。

適応度はそれぞれの遺伝子型に固有の値があるわけではなく, 環境が変われば適応度も変化する。また, 問題となっている遺伝子座以外の部分における遺伝子の状態, すなわち, 遺伝的背景 (genetic background) によっても左右されることが知られている (大羽1977)。したがって, 実際には個々の親木間の組み合わせによって, その度合は違ってくると思われる。しかし, 本実験のように母樹の遺伝子型が F/S である場合, その次代の各遺伝子型の理論的期待頻度は $f(F/S) = 0.5$, $f(F/F) + f(S/S) = 0.5$ である。 F/F および S/S 遺伝子型母樹の次代での理論的期待頻度は不明であるため, 個々の組み合わせでどのような選択が働いているかは明確でない。しかし, F/S 遺伝子型母樹に限れば,

Table-26 に示したような選択モデルを考慮しても差しつかえないと思われる。

次に、調査した子供群の個体数の問題があるが、一応各母樹当り少なくとも 100 個体以上用いることを原則とした。100 個体の場合、標識とした個体数の出現数が 1 個体増せば、その頻度は 0.01 だけ大きくなる。更に、自殖率推定においては 6.3% 増加することになり、自殖率に寄与する割合は相当に大きい。したがって、このような研究では調査個体数をできるだけ多くとる方がよいと思われる。本実験の場合、各母樹当りの調査個体数は 100~247 個体であった。また、*F/S* 遺伝子型母樹14本については 391 個体、*S/S* 遺伝子型母樹13本の場合は 356 個体であった。したがって、これらの推定値は一応信頼し得る数値を得ていると考えてよからう。

第 5 章 総 合 考 察

一般にヘテロ接合型である他殖性植物が、近親交配を行なうと、その後代では、①生長力などの著しい減退、②奇型子供群の出現、③表現型の分離、④ホモ接合体の増加などの現象が見られる。また逆に、他家受精を行なった場合は、①雑種強勢、②形質の組み合わせ、③環境に対する適応性の拡大、④優良個体出現の可能性などが期待される。このような現象は、今後林木育種を進めていく上で特に考慮されるべき問題である。

全国的規模で林木育種事業が始められ、公的試験研究機関にそれぞれ採種園が造成され、一応その基盤が整えられた。しかし、これらの採種園はまだ十分ではなく今後改善されるべき多くの問題点を残している。すなわち、今後の採種園に対して、特に遺伝的な面から次のような基本的考えが要求される。

①近親交配、特に自殖 (self-fertilization) ができるだけ起こらないようにする。②子供群はできるだけ遺伝的に優れていること、更にできるだけ遺伝変異に富んでいること。③母樹当りの採種量が多く、しかも毎年一定量の種子を提供できること。④採種はできるだけ労力を要せず、且つ安価に行なわれること。

以上のような点を考慮して、本論文では、1) 自殖による遺伝的弊害、2) 子供群の諸形質におよぼす母樹の影響、3) 自然条件下で起こる採種園での自殖率の 3 項目に集約して考察を行なった。

1) 自殖による遺伝的弊害

林木の近親交配に関する研究は、その最も端的な自殖子供群と自然受粉あるいは他殖子供群の諸形質とを比較することで行なわれる。これまでに調べられた形質は、成熟球果数、総種子数、充実種子数、シブ粒数、発芽率、種子重、発芽勢、上・下胚軸長、残存率、苗高そして成木の樹高、胸高直径および材積などである。本研究では、種子重、発芽率、子葉形態、上・下胚軸長、残存率および 2 年生苗高の 7 形質について、自殖と他殖による違いを調べた。その結果、そのいずれの形質でも自殖子供群の方が劣っていた。

このような現象は、トウモロコシ、キャベツあるいはクローバーなど、多くの他殖性 1 年生作物において一般に認められ (松尾 1969, 1972, 赤藤 1968, Brewbaker 1964), いわゆる自殖弱勢の効果である。しかしながら、その程度は必ずしも一定ではなく、同一個体でもそれぞれの形質によって異なることが認められている。例えば *Pinus taeda* L. で

は、充実種子量、発芽率、胚軸長および苗高（樹高）の3形質が特に自殖弱勢を受けやすく、他の形質では他殖または自然受粉の場合とそれほど変わらないと述べている（Franklin 1969a, 1969b）。同様なことは *Pseudotsuga menziesii* (Milb.) Franko. と *Pinus ponderosa* Laws. (Sorensen and Miles 1974) やアカマツ、クロマツ（勝田1964, 1966a）などでも認められている。更に、Franklin (1969a) や Fowler (1965a) らは、同一形質でも個体によりその程度が異なることを明らかにしている。

ヒノキの場合も同様で、自殖と他殖の比較において、ほとんど変わらないもの、あるいは自殖の方がかえってよい結果をもたらす個体も見られた（Fig.-2~Fig.-7）。調べた7形質のうち、胚軸長、発芽率および残存率の3形質の自殖弱勢の程度は特に大きく、その値はそれぞれ 0.91, 0.63 および 0.84 であった（Table-3）。このように、形質によって、また母樹によってその程度が異なるのは、Wright (1976) や他の多くの研究者が述べているように、これらの形質がポリジーン (polygene) 支配によるもので、それぞれの親木の遺伝子構成が異なることに起因するためと考えられる。また、2年生苗高の自殖弱勢の程度はそれ程大きくなかった (0.95) が、61年生の *Picea abies* (L.) Karst. (Eriksson et al, 1973) や、37年生スギ（外山 1976）の場合のように、樹齢とともにその程度は大きくなることが予想される。

種によって遺伝変異が異なることは周知のとおりである。このように遺伝変異が存在する限り、すべての遺伝子型の適応度 (fitness) は等しくなく、致死遺伝子 (lethal gene)、半致死遺伝子 (semi lethal gene) あるいはこれらと連鎖した遺伝子などの有害遺伝子によって適応度は著しく低下させられる。このように、その種の生存に害を与えるような遺伝子の存在を遺伝的荷重 (genetic load) と呼び、更に染色体当りの有害遺伝子を致死相当量 (数) (lethal equivalent) と言っているが、*Pinus resinosa* Ait. の荷重は小さく自殖弱勢の影響を受けにくい (Fowler 1965c)。他方、*Picea abies* (L.) Karst. と *Pinus taeda* L. (Koski 1973, Franklin 1972) はかなり大きく、更に、*Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii* (Franklin 1970) は非常に大きく、また、Sorensen (1969) は3~27致死相当量であることを明らかにしている。

ヒノキの場合、調べた7形質の自殖弱勢の程度は、ある形質に関する自殖集団と他殖集団の比率がいずれも1以下であった。更に、19クローンのうち10クローンで、白子苗や矮性苗などの色素や形態的異常が検出された。このように、生育上明らかに不利である致死や有害遺伝子が相当量内包されていることが分った。したがって、ヒノキは遺伝的荷重が大きく、自殖による悪影響を受けやすい樹種であろうと考えられる。

2) 子供群の諸形質におよぼす親木の影響

いろいろな型の交配方法が紹介されているが (Wright 1976, Namkoong 1972)、本研究で用いた方法は Griffing (1956) による総当り二面交配法 (complete diallel cross) である。この方法は、自殖および相反交雑 (reciprocal cross) を含む総当りであるため、各親木の遺伝的特性を詳細に知ることができる。しかし、 n 個の親木を使用すれば、次代の組み合わせは n^2 個となり、使用親木数が多いと、時間的、労力的に作業が困難であり、また、欠損区が生じることが許されないと云う欠点がある。したがって、林木ではまず部分二面交配 (partial diallel cross) によって、できるだけ数多くの親木についてそ

の特性を知っておく方が良いと考える。

本実験では、発芽率、上胚軸長、子葉形態および2年生苗高の4形質を調べた。その結果、次代に与える影響は母樹によって大きく異なることがわかった。同様なことは、スギ(本間 1975, 藤本・金子 1976, 長浜・野中 1975a, 明石・松永 1966), アカマツ(新谷 1971), クロマツ(塚原ら 1966) およびヒノキ(長浜・野中 1975b, 山手 1973) について調べられ、親木選抜の重要性を示唆している。

更に、原(1967, 1971, 1973), 戸田・西村(1971a)は特別な交配型ではないが、スギ精英樹間の交配を行ない雄親の重要性を示した。ヒノキの場合、雌・雄親に分けて子供群への影響を調べた結果、雌、雄親いずれも1%レベルで有意差が認められ、母樹のみならず花粉親の影響も相当大きいことが分かった(Table-7)。事実、外山ら(1977)は、36年生スギ F_1 の枯損率と生長量の2形質は特に組み合わせによる差異が著しい事を報告している。同様なことは Table-8, Table-10 の相反交雑の違いからも明白である。

また、スウェーデン南・北地方で選抜された *Picea abies* (L.) Karst. の F_1 では、生長力と耐寒性2形質の組み合わせのため産地間交配の方がはるかに優れていること(Nilsson 1974), *Pinus silvestris* L. では平均親(mid parent)より優れたもの、あるいは *phacidium infestant* の抵抗性に優れたものなど、明らかにヘテロシスと考えて、よい組み合わせのあることを報告している(Ehrenberg 1973)。更に、スギ5年生時 F_1 の樹高の遺伝率は37.2%で、交配による遺伝的獲得量は相当期待されると述べている(西村・大庭 1976)。このように、組み合わせの違いによる F_1 への影響は明らかに異なることが分かったが、採種園が造成された現在、個々の親木の遺伝的特性を明らかにすると同時に採種園全体についての組織立った解析が望まれる。

モロコシなどの他殖性農作物においては、優良系統間を一度に交配し、組み合わせ能力(combining ability)を調べ、そして雑種第1代を利用する積極的な育種方法によって数多くの成功をおさめている(Kambel and Webster 1965, Phul et al. 1974)。

組み合わせ能力は、一般組み合わせ能力(G. C. A.)と特定組み合わせ能力(S. C. A.)に分けられるが、ヒノキの場合そのいずれにも高い有意差が認められた(Table-8)。すなわち、ある母樹はどの花粉を用いてもよく、またある母樹は雄親の違いで良くもなり悪くもなる。同様なことは、他の樹種でも認められている(明石・村井 1976, Kraus 1973, Morgenstern 1974, Bingham et al. 1969)。また、Wilcox et al. (1975)。 *Pinus radiata* D. Don の S. C. A. に関して、樹高、胸高直径や *Naemacylus minor* の抵抗性で最も優れた組み合わせ(クローン番号 96×55)を見出している。

以上のようなことから、今後の採種園に対しては、特に組み合わせ能力を考慮に入れた採種園管理が必要であろう。数多くの母樹のなかには、雌・雄花の着生量が少なかったり、一方のみに偏ったり、あるいは開花期が著しくずれるものなどの存在が認められている(齊藤 1965, 本間 1975, 佐々木ら 1976, 山手 1973, 横山ら 1973)。更に、親木により和合性や稔性に著しい違いがあることが報告されている(松田 1975a, 1975b, 1976, 横山 1976, 勝田 1973)。したがって、各母樹のこのような遺伝的特性を十分知り、そして、できるだけ多くの母樹について組み合わせ能力を調べ、特に G. C. A. の優れた母樹を選定していくべきである。また、林木の生育環境は広大であるので、遺伝変異の幅はできるだけ広くし、更に他方では、抵抗性などの特殊目的のためには S. C. A. の優れたも

のを選定していくべきであろう。

3) 自然条件下で起こる採種園での自殖率

採種園では遺伝的獲得量の増大をはかると同時に、有害となる要因は取り除いてやることが望まれる。遺伝的有害要因の1つとして自殖の問題がある。特に採種園が事業的に活用されるに至った現在、採種園内でどの程度自然自殖が起っているかを知っておくことは今後の採種園管理において重要なことであり、基礎的な問題の1つである。

林木は一般に風媒植物で、他殖性であるが、実際には案外高い割合で自殖が起っているようである。これまでに多くの樹種について自殖率が調べられている。*Pinus elliottii* var. *elliottii* Engelm. では0~27% (Squillace and Kraus 1963), *Pseudotsuga menziesii* Franco では0.1~45%, 0~27% および6.4% (Sorensen 1971a, 1973, Sorensen and Miles 1974), そしてクロマツでは40.6% (大庭 1972b) と比較的高い自殖率が得られている。また、*Pinus ponderosa* Laws. では11.3% (Sorensen and Miles 1974), *Picea abies* (L.) Karst. で5% および14.7% (Koski and Malmivaara 1974, Müller 1976), *Pinus banksiana* Lamb. で10% (Sittmann and Tyson 1971), *Pinus taeda* L. で0~13.5% (Franklin 1971a, 1971b), *Pinus sylvestris* L. では5% (Koski and Malmivaara) およびアカマツでは5% (大庭 1971c) など比較的低い結果を得ている。以上のように、自殖率は必ずしも一定ではなく、樹種や供試木あるいは同一個体でも年度によって相当異なることが認められている。更に、Franklin (1971a, 1972b) は個体内の部位によっても異なることを明らかにしている。しかし、これらの報告はいずれも人工林や天然林の特定個体に関するものである。

本研究では、ヒノキ採種園を対象とした。その結果、0~29.75% の範囲で、相当高い自殖率が起っていることが明らかとなった。実際の採種園を対象とした報告は Fowler (1965d) が *Pinus banksiana* Lamb. について行なっているのみである。その結果、0~35.1% で、更に樹冠上部では13% であるのに対し、下部では26% であり、採種園の自殖は人工林や天然林に比べ高まると述べている。また、菊池・古越 (1976) もスギで同様な結果を得ている。自然自殖の起こる割合は、花粉密度や花粉の飛散距離あるいは植栽状態などによって大きく左右されると考えられる。

花粉の飛散距離は、ash, Douglas-fir, poplar, spruce, elm, pinyon, slash pine および Scotch pine など多くの樹種について調べられているが、数10マイルにも及ぶ遠距離まで飛散すると言う報告と、せいぜい数10フィートだと言う報告とがある (Wright 1953, Colwell 1951, Strand 1957, Wang et al. 1960, Silen 1967, Lanner 1966)。しかし、本研究でクローン集植園内の2母樹について自殖率を調べたところ、13.20%, 44.81% と非常に高い値が得られた。更に、2母樹に隣接している他の母樹の配置から (Fig.-13, Fig.-14), 植栽密度が疎のときは自殖率は低く、密の時は高く現われ、有効花粉密度と密接な関係があることが分かった。事実、*Picea abies* (L.) Karst. (Langner 1953) とスギ (菊池・古越 1976) で指標遺伝子を用いて受精に供した花粉の分布を調べた結果でも、有効花粉はせいぜい数m~10数m の範囲である事を明らかにしている。以上のことから、採種園内での交配様式は、任意交配 (random mating) を一応の前提としているが、実際の有効花粉は意外に狭い範囲のものに由来していると考えられる。

また、母樹の遺伝子型が F/S の場合、その子供群は F/F 、 F/S および S/S 遺伝子型のいずれかである。そして、理論的には F/S 遺伝子型子供群の出現期待値頻度は常に $f(F/S)=0.5$ である。しかし、現実はいずれも 0.5 以下で、しかも S/S 遺伝子型の方へ偏っていた (Table-22)。このような原因として、受粉—受精—種子に至る間の花粉間の競争などによる不和合や不稔が考えられる。松田 (1975a) と横山 (1976) はスギ胚珠の発育異常や雌性配偶体の異常などで成熟種子率は 19~47% に低下すること、また、雌性配偶体に起因する場合は 10% ぐらいだと述べている。したがって、ヒノキで見られたような現象は受精時に何らかの配偶子選択が起こったためではないかと考えられる。事実、イネの交雑において、標識形質の分離がしばしば乱され、減少分離型や増加分離型のあることが知られているが、Nakagahra (1972, 1977) は受精時に花粉の競争が起こり、受精力の弱い花粉、すなわち配偶体遺伝子 (ga) が標識遺伝子と連鎖していることを明らかにしている。

ヒノキの場合、その具体的な分析は行なっていないが、上記イネのような配偶子選択が、 F/S 遺伝子型母樹上で起きているとすれば、3 遺伝子型の偏りがうまく説明される。このことは今後、林木の不和合性や不稔性の問題に何らかの示唆を与えるものと思われる。

更に、これまで行なわれてきた自殖率の推定は、そのほとんどが主動遺伝子による形質、例えば、白子苗などを標識形質として研究されてきた。したがって、自殖率の調査はこれらの標識遺伝子をヘテロで持つ母樹に限られてくる。このような母樹はそんなに多いとは考えられない。その点、ヒノキで見られたような、モノマー型のパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドは自然淘汰に関して中立であり、すべての個体が 3 つの遺伝子型 (F/F 、 F/S および S/S) のいずれかを持ち、しかもその分離はメンデルの分離 (1 : 2 : 1) を示すので、今後ヒノキの集団遺伝学的研究においても有用な標識遺伝子となり得る。

摘 要

本研究はヒノキの自殖に関して、特に遺伝育種学的方向から、次に述べる 3 つの観点について実験ならびに調査を行なった。

1. まず、ヒノキのクローンごとの開花習性を調べ、受粉適期について検討した。更に、自殖と他殖、次代の諸形質に関する比較を行なった。
2. 精英樹クローン間の完全ダイアレル・クロスを行ない、4 形質について組み合わせ能力を調べ、更に、変異形質の検出とその遺伝子分析を試みた。
3. まず、発育段階でのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの消長を調べ、そして、特定バンドの遺伝様式を調べた。更に、現実の採種園とクローン集植園での自殖率の推定を試みた。

以上のことがらについて行なったこの研究の要点を総括的に記述すれば次のとおりである。

1. ヒノキの開花習性と自殖による諸形質の変異

- 1) クローンによって、雌・雄花の着生量が異なり、更に着生部位によっても差がある

ことが観察された。特に樹冠上部は雌花の着生が多かった。また、雌・雄花の発達程度は、同一個体内ではほぼ同じか、やや雌花の方が早く発達する傾向にあった。

2) 「ステージ4」を受粉適期として、クローン間の花芽の発達程度を調べた結果、かなりのずれがあることが分かった。すなわち、早いものと遅いものとは約2週間ほどのずれがあることが認められた。

3) 同一クローンについて、生育初期の7つの形質について、自殖/他殖の比を調べた。いずれの形質でも1より小さかった。これは明らかに自殖弱勢の効果によるものであると考えられた。

4) 自殖弱勢の程度は、同一の形質によっても異なっていた。更に、クローンによっては、自殖弱勢が見られない形質もあった。自殖の影響が特に大きく現われた形質は、種子重 (0.90)、発芽率 (0.63)、上胚軸長 (0.91) および残存率 (0.84) であった。

2. 組み合わせ能力の推定と劣性ホモ接合体の検出

1) 親木の違いによって、次代の形質は著しく異なってくるのがわかった。そこで8×8型(一部7×7型)完全ダイアレル・クロスを行ない、次代の4形質、すなわち、発芽率、上胚軸長、子葉形態および2年生苗高について両親の影響を調べた。いずれの形質も組み合わせによって著しい差異が認められた。特に発芽率と苗高でその影響が大きく表われていた。更にいずれの形質でも、一般組み合わせ能力(G. C. A.)と特定組み合わせ能力(S. C. A.)について1%レベルの有意差が認められ、また、相反組み合わせにも差があることがわかった。

2) 3形質の遺伝率は、胚軸長が0.330、子葉形態が0.335、そして2年生時苗高が0.333であった。更にこれを雌・雄別で調べると、いずれの形質も雌親の方が大きかった。

3) 19のクローン別播種試験の結果、白子苗、黄子苗、淡緑色苗などの色素変異苗と、矮性苗、初生葉が異常に多いもの、あるいは初生苗が融合したものなどの形態異常苗が検出された。全部で13種類の異常苗が、数多くのクローン(52%)で検出された。更に、これらのうち、O1とA27で検出された葉緑素変異苗は、それぞれ別々の単一劣性遺伝子によって支配されていることが分かった。他の形質の遺伝子分析は明確でないが、ヒノキのかなり多くの母樹が相当数の有害遺伝子を内包していると予想される。更に第1章、第2節で自殖弱勢がすべての形質で見られたことなどから、ヒノキの遺伝的荷重は大きく、樹種として受ける自殖弱勢の程度はかなり大きいと考えられる。

3. サイモグラムによる遺伝子分析と自殖率の推定

1) 発芽後、約1年間にわたり、ヒノキのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの消長を調べた結果、発芽後9月下旬までの生長期ではバンドの変化が認められた。しかし、生長休止期(10月以降)は、多少活性の変化はあるが非常に安定したバンドを生ずることが分かった。したがって、1年生苗であっても、活性が高く安定した特定バンドをとらえれば、その遺伝子分析は可能であるという見とおしを得た。

2) 精英樹クローンのパーオキシダーゼ・アイソザイム・バンドの変異を調べた。調べたすべてのクローンのRf 36~41の区域で、活性が高く、移動度を異にするバンドの存在が確認された。それらのバンドをFおよびSとすると、FあるいはSの1本だけ

と、 $F \cdot S$ の 2 本を持つ個体に分けられた。これらのバンドを持つ個体間の完全ダイアレル・クロスで得られた子供群を用いて、 F 、 S バンドの遺伝子分析を行なった。その結果、 F 、 S 各 1 本を持つ親木の遺伝子型は、それぞれ $P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^F$ 、 $P_{\alpha}^S/P_{\alpha}^S$ ホモ接合体で、 $F \cdot S$ 2 本のバンドを持つ親木は $P_{\alpha}^F/P_{\alpha}^S$ ヘテロ接合体であること、更に、その遺伝様式はモノマー型 (monomeric forms) であり、共優性 (codominant) であることがわかった。

3) P_{α}^F 、 P_{α}^S 遺伝子を標識遺伝子として、採種園における自殖率の推定を行なった。7 母樹について調べた結果、母樹によって大きな変動が見られ、その範囲は 0~29.75% であった。また、27 母樹から得られた混合子供群を用いて自殖率を調べた結果、採種園全体での平均自殖率は 9.80~16.28% であった。

更に、クローン集植園内の特定個体 2 本について自殖率を調べた結果、13.20%と 44.81% で非常に高くなることが分かった。そして、周囲木の配置から、自殖率は花粉密度と密接な関係があると考えられた。

4) F/S 遺伝子型の特定母樹から生じた F/S 遺伝子型子供群の理論的期待度は $f(F/S) = 0.5$ であるが、実際の観測頻度はそのほとんどが 0.5 よりも小さく現われる傾向にあった。その原因として、何らかの配偶子選択が働いた結果であると考えられた。そして、一般的選択モデルにもとづいて、 F/F 、 F/S および S/S の各遺伝子型頻度を求め、その頻度に基づいて自殖率を推定した結果、 F/S 遺伝子型 5 母樹の自殖率は 13.12~29.24% で、採種園全体の平均自殖率は 15.71% であった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたって、九州大学教授宮島寛博士、同助教授宮崎安貞博士からは終始直接ご懇篤なるご指導を賜わった。また、とりまとめに際して九州大学教授片山平博士、同助教授須崎民雄博士からご懇切なご校閲とご助言をいただいた。ここに深甚の謝意を表す。

更に、本研究の遂行に際し、各分野で有益なるご示唆をいただいた前鹿児島大学教授酒井寛一博士、同助教授林重佐氏、国立遺伝学研究所応用第二研究室長井山審也博士、林業試験場筑波分室遺伝育種課長大庭喜八郎博士、九州大学名誉教授木梨謙吉博士をはじめ、本研究の実験・調査の遂行上、多大のご援助をいただいた諸氏の芳名および諸研究機関名を記し、深甚の謝意を表す次第である。

九州大学教官矢幡久氏、同中尾登志雄氏、韓国林木育種研究所朴竜求博士、宮崎大学教官甲斐重貴氏、九州大学大学院生松田清氏、同近藤禎二氏、長崎県総合農林試験場育種科長伊集院博司氏、九州大学農学部造林学教室、九州大学農学部附属柏屋地方演習林、九州林木育種場、関西林木育種場四国支場、熊本県林業研究指導所、長崎県総合農林試験場、佐賀県林業試験場、福岡県林業試験場。

引用文献

- 青木幸一郎・中埜栄三・大井優一：「電気泳動実験法——チセリウスからディスクまで——」 広川書店 1972
- 明石孝輝・松永健一郎：精英樹の自然交配によるスギ次代検定林の調査結果 日林九支論 22 : 15—17, 1966
- 明石孝輝・戸田忠雄・西村慶二：スギ苗木の高さと根元直径についての遺伝分散と優性分散の分割 日林誌 54(1) : 12—16, 1972
- 明石孝輝・村井正文：産地の違いスギ個体間の組み合わせ能力 日林誌 58(12) : 462—464, 1976
- Allen, G. S. : Parthenocarpy, parthenogenesis and self-sterility of Douglas-fir. *J. Forestry* 40 : 642—644, 1942
- Andersson, E., Jansson, R. and Lindgren, D. : Some results from second generation crossings involving inbreeding in Norway spruce (*Picea abies*). *Silvae Genetica* 23(1-3) : 34—42, 1974
- 有田 学：枝張りの遺伝的性質に関する研究 日林誌 46(3) : 77—82, 1964
- Barner, H. and Christiansen, H. : The formation of pollen, the pollination mechanism and the determination of the most favourable time for controlled pollination in *Larix*. *Silvae Genetica* 9(1) : 1—11, 1960
- Barnes, B. V., Bingham, R. T. and Squillace, A. E. : Selective fertilization in *Pinus monticola* Dougl. II. Results of additional tests. *Silvae Genetica* 11 : 102—111, 1962
- Barnett, J. P. and Naylor, A. W. : Alcohol dehydrogenase activity and ethanol utilization in germinating Longleaf and Slash pine seeds. *Forest Science* 15(4) : 400—403, 1969
- Bartels, H. : Genetic control of multiple esterases from needles and macrogametophytes of *Picea abies*. *Planta* 99 : 283—289, 1971
- Becker, W. A. : “Manual of procedures in quantitative genetics.” Washington State University, Pullman, Washington, 1964
- Bergmann, F. : Experiments on possibilities for genetic certification of forest seed. *Proc. IUFRO Genetics-SABRAO Joint Symp.*, Tokyo A-6(V) : 1—5, 1972
- Bergmann, F. : Genetischer Abstand zwischen Populationen. II. Die Bestimmung des genetischen Abstands zwischen europäischen Fichtenpopulationen (*Picea abies*) auf der Basis von Isoenzym-Genhäufigkeiten. *Silvae Genetica* 23(1-3) : 28—32, 1974
- Bergmann, F. : Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung. II. Genetische Kontrolle von Esterase- und Leucinamino-peptidase-Isoenzymen im haploiden Endosperm ruhender Samen. *Theoretical and Applied Genetics*. 43 : 222—225, 1973
- Bingham, R. T. and Squillace, A. E. : Self-compatibility and effects of self-fertility in Western white pine. *Forest Science* 1 : 121—129, 1955
- Bingham, R. T. : Breeding blister rust resistant Western white pine. IV. Mixedpollen crosses of appraisal of general combining ability. *Silvae Genetica* 17 : 133—138, 1968
- Bingham, R. T., Olson, R. J. Becker, W. A. and Massden, M. A. : Breeding blister resistant Western white pine. V. Estimates of heritability, combining ability, and genetic advance based on tester matings. *Silvae Genetica* 18 : 28—38, 1969

- Birley, A. J. and Barnes, B. W. : Genetic variation for enzyme activity in a population of *Drosophila melanogaster*. I. Extent of the variation for alcohol dehydrogenase activity. *Heredity* 31 : 431-416, 1973
- Bramlett, D. L. and Popham, T. : Model relating unsound seed and embryonic lethal alleles in self-pollinated pines. *Silvae Genetica* 20 : 192-193, 1971
- Brewbaker, J. L. : "Agricultural Genetics" Prentice-hall, INC press, New Jersey U. S. A., 1964
- Brinster, R. L. : Lactate dehydrogenase isozymes in the preimplantation Rabbit embryo. *Biochemical Genetics* 9(3) : 229-234, 1973
- Carlisle, A. and Teich, A. H. : The Hardy-Weinberg law used to study inheritance of male inflorescence color in natural Scotch pine populations. *Canadian J. Botany* 48 : 997-998, 1970
- Chapman, V. M. : Expression of parental glucose phosphate isomerase-1 (Gpi-1) in preimplantation stages of mouse embryos. *Developmental Biology* 26 : 153-158, 1971
- Chen, S. L., Towill, L. R. and Loewenberg, J. R. : Isoenzyme patterns in developing *Xanthium* leaves. *Physiologia Plantarum* 23 : 434-443, 1970
- 千葉 茂 : スギ針葉の冬期における変異の遺伝 (第1報) 針葉の変色の観察およびアカスギ, ミドリスギの交雑 *日林誌* 35(8) : 286-289, 1953
- Chu, Y. E. : Variations in peroxidase isozymes of *Oriza perennis* and *O. sativa*. *Japan. J. Genet.* 42(4) : 233-244, 1967
- Coles, J. F. and Fowler, D. P. : Inbreeding in neighboring trees in two white spruce populations. *Silvae Genetica* 25(1) : 29-34, 1976
- Colwell, R. N. : The use of radioactive isotopes in determining spore distribution patterns. *American J. Botany* 38 : 511-523, 1951
- Conkle, T. : Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucineaminopeptidase isozymes in Knobcone pine. *Forest Science* 17(2) : 190-195, 1971a
- Conkle, M. T. : Isozyme specificity during germination and early growth of Knobcone pine. *Forest Science* 17(4) : 494-498, 1971b
- Critchfield, W. B. : The Austrian red pine hybrid. *Silvae Genetica* 12 : 187-192, 1963
- Dhillon, B. S. and Singh, J. : Diallel analysis of yield and other traits of Maize varieties. *SABRAO J.* 8(2) : 147-152, 1976
- Diechert, H. : Some investigations into self-fertility and inbreeding in Spruce and Larch. *Silvae Genetica* 13 : 77-86, 1964
- Donald, L. C. : Inheritance of megastrobile colors in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Canadian J. Botany* 50 : 2045-2048, 1972
- Duffield, J. W. : Techniques and possibilities for Douglas-fir breeding. *J. Forestry* 48 : 41-45, 1950
- Duffield, J. W. and Williams, B. C. : Dwarf seedlings from broomed Douglas-fir. *Silvae Genetica* 12 : 129-133, 1963
- Durzan, D. T. : Disc electrophoresis of soluble protein in the female gametophyte and embryo of Conifer seeds. *Canadian J. Botany* : 359-361, 1966
- Efron, Y. : Regulation of the activity of Alcohol dehydrogenase isozymes during the development of the Maize kernel. *Molec. Gen.* 111 : 97-102, 1971
- Eherenberg, C. E., Gustafsson, Å., Forshell, C. P. and Simak, M. : Seed quality and

- the principles of forest genetics, *Hereditas* 41 : 292-365, 1955
- Ehrenberg, C. : The effect of increased heterozygosity in pine plants (*Pinus sylvestris* L.), *IUFRO* division 2, S2. 03. 5, Symposium on genetics of Scotch pine : 1-17, 1973
- Endo, T. : Application of zymography to plant sciences, *SABCO J.* 2(3-4) : 50-56, 1966
- Endo, T. : Isozyme loci and a strategy of differentiation in plant. A review, *SEIKEN ZIHŌ*, Report of the Kihara Inst. Biol. Reser. 24 : 89-104, 1973
- 遠藤 徹 : アイソザイムの進歩と応用 遺伝 27(2) : 5-13, 1973
- 遠藤 徹 : 植物酵素多型の遺伝子支配 蛋白質・核酸・酵素 19(9) : 668-682, 1974
- Eriksson, G., Schelender, B. and Åkebrand, V. : Inbreeding depression in an old experimental plantation of *Picea abies*, *Hereditas* 73 : 185-194, 1973
- Eriksson, G. : Growth differences within full-sib families of *Picea abies* (L.) Karst., *Studia Forestalia Seucia* 130 : 1-24, 1976
- Fan, C. J. and Aycock, M. K. Jr. : Diallel crosses among Maryland cultivars, *Crop Science* 14 : 679-682, 1974
- Farge, T. L. : Genetic differences in stem form of Ponderosa pine grown in Michigan, *Silvae Genetica* 23(6) : 211-213, 1974
- Farmer, R. E. : Genetic variation among open-pollinated progeny of Eastern-cottonwood, *Silvae Genetica* 19 : 149-151, 1970
- Feret, P. P. and Stairs, G. R. : Peroxidase inheritance in Siberian elm, *Forest Science* 17(4) : 472-475, 1971
- Feret, P. P. : Peroxidase isoenzyme variation in interspecific Elm hybrids, *Canadian J. Forest Research* 2 : 246-270, 1972
- Feret, P. P. : Genetic differences among three small stands of *Pinus pungens*, *Theoretical and Applied Genetics* 44 : 173-177, 1974
- Forshell, C. P. : Seed development after self-pollination and cross-pollination of Scotch pine, *Pinus sylvestris* L., *Studia Forestalia Suecica* 118 : 1-37, 1974
- Fowler, D. P. : Pre-germination selection against a deleterious mutant in Red pine, *Forest Science* 10 : 335-336, 1964a
- Fowler, D. P. : Effects of inbreeding in Red pine, *Pinus resinosa* Ait., *Silvae Genetica* 13(6) : 170-177, 1964b
- Fowler, D. P. : Effects of inbreeding in Red pine *Pinus resinosa* Ait., II. Pollination studies, *Silvae Genetica* 14 : 12-23, 1965a
- Fowler, D. P. : Effects of inbreeding in Red pine, *Pinus resinosa* Ait., III. Factors affecting natural selfing, *Silvae Genetica* 14 : 37-45, 1965b
- Fowler, D. P. : Effects of inbreeding in Red pine, *Pinus resinosa* Ait., IV. Comparison with other northeastern species, *Silvae Genetica* 14 : 76-81, 1965c
- Fowler, D. P. : Natural self-fertilization in three Jack pines and its implications in seed orchard management, *Forest Science* 11(1) : 55-58, 1965d
- Fowler, D. P. and Lester, D. T. : The genetics of Red pine, *Forest Serv. Resear. U. S., Depart. Agric. WD-8* : 1-13, 1970
- Franklin, E. C. : Inbreeding depression in metrical traits of Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) as a result of self-pollination, *North Carolina State Univ. Sch. Forest Resour. Tech. Rep. No. 40* : 1-19, 1969a

- Franklin, E. C. Mutant forms found by self-pollination in Loblolly pine. *J. Hredity* 60(6) : 315-320, 1969b
- Franklin, E. C. : Inbreeding as a means of genetic improvement of Loblolly pine. Tenth South. Conf. Forest tree Impr. Proc. : 107-115, 1969c
- Franklin, E. C. : Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the family Pinaceae. USDA Forest Serv. Resear. Paper SE-61 : 1-21, 1970
- Franklin, E. C. : Estimating frequency of natural selfing based on segregating mutant forms. *Silvae Genetica* 20(5-6) : 193-194, 1971a
- Franklin, E. C. : Estimates of frequency of natural selfing and of inbreeding coefficients in Loblolly pine. *Silvae Genetica* 20(5-6) : 194-195, 1971b
- Franklin, E. C. : Genetic load in Loblolly pine. *American Naturalist* 106(948) : 194-195, 1972
- 藤本文弘・村松 正 : テンサイの合成品種育成法に関する研究 I. 母系選抜系統の多交配による一般組み合わせ能力の推定 *育種学雑誌* 20(4) : 223-229, 1970a
- 藤本文弘・村松 正 : テンサイの合成品種育成に関する研究 II. ダイアレルクロスによる一般および特定組み合わせ能力の推定 *育種学雑誌* 20(5) : 293-300, 1970b
- 藤本吉幸・金子 哲 : 静岡県の検定林成果 林木の育種 95(1) : 9-11, 1976
- 福田知明 : スギ精英樹間のダイアレルクロス 埼玉県林業試験場業務成績報告 15 : 17-19, 1972
- Gains, M. S., Myers, J. H. and Krebs, C. J. : Experimental analysis of relative fitness in transferrin genotypes of *Microtus ochrogaster*. *Evolution* 25(3) : 443-450, 1971
- Genys, J. B., Wright, J. W. and Forbes, D. C. : Intraspecific variation in Virginia pine, results of a provenance trial in Maryland, Michigan and Tennessee. *Silvae Genetica* 23(4) : 99-104, 1974
- Gregory, S. W., William, F. C. and Thomas, E. W. : The inheritance of tissue specific lactate dehydrogenase isozymes in interspecific Bass (*Micropterus*) hybrids. *Biological Genetics* 5 : 257-273, 1971
- Griffing, B. : Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Australian J. Biological Science* 9 : 463-493, 1956
- Gritton, E. T. : Heterosis and combining ability in a diallel cross of Peas. *Crop Science* 15 : 453-457, 1975
- Gupta, V. and Stebbins, G L. : Peroxidase activity in hooded and awned barley at successive stages of development. *Biochemical Genetics* 3 : 15-24, 1969
- Hagman, M. and Mikhala, L. : Observations on cross-, self- and interspecific pollinations in *Pinus peuce* Grieseb. *Silvae Genetica* 12(3) : 73-79, 1963
- Hagman, M. : Incompatibility in *Pinus*. *Hereditas* 52 : 245-246, 1964
- Hans, J. M. : Distinction of Douglas-fir provenances using peroxidase-isoenzyme patterns of needles. *Silvae Genetica* 23(1-3) : 71-76, 1974
- 原 信義 : スギ精英樹間の交雑による稚苗の生育について *日林九支論* 21 : 27-28, 1967
- 原 信義・山口和行 : スギ精英樹間の交配における苗木の生育について *日林九支論* 25 : 75-76, 1971
- 原 信義 : スギ精英樹間の人工交配における F₁ 苗の生長比較 林木の育種 80(7) : 13-15, 1973
- 橋詰隼人・岡田泰久 : 林木の交配に関する基礎的研究 (1). ヒノキの花粉の形成, 發育ならびに採取適期 *日林誌* 50(10) : 304-309, 1968b
- 橋詰隼人 : スギの開花と受粉 81回日林講 : 155-157, 1970

- Hayman, B. I. : The analysis of variance of diallel tables, *Biometrics* 10, June : 235-244, 1954
- Hayman, B. I. : The theory and analysis of diallel crosses, II, *Genetics* 43 : 63-85, 1958
- Hirano, H. : Organ specificity of peroxidase isozymes in Mulberry (*Morus spp.*) J. *Sericult of Science in Japan* 44(6) : 417-423, 1975
- 平野 久・和田 実 : コルヒチン処理したクワにおけるパーオキシダーゼアイソザイム 日蚕雑 44(6) : 495-496, 1975
- 平野 久・中島健次 : クワ科植物におけるパーオキシダーゼ・アイソザイムパターンの種属間差異 蚕糸研究 98 : 19-24, 1976
- 本間英樹 : スギ採種園のタネと苗木 林木の育種 94(1) : 13-14, 1975
- 細山田典明・管 道教・深江伸男・宮畑博行・中西幸一 : ヒノキ採種園の結実性について 日林九支論 28 : 71-72, 1975
- Huang, T. R., Aycock, M. K. Jr. and Mulchi, C. L. : Heterosis and combining ability estimates for air pollution damage, primarily ozone in Maryland Tobacco, *Crop Science* 15 : 785-789, 1975
- Hyun, S. K. : Forest tree breeding work in Korea, Institute of Forest Genetics, Suwon 1 : 1-16, 1956
- Hyun, S. K. : Considerations on forest tree breeding, *SABRAO Newsletter* 2(2) : 135-146, 1970
- Hyun, S.K. : The possibility of F_2 -utilization in pine hybridization, *IUFRO Genetics-SABRAO Joint Symposia, Tokyo, C-4(I)* : 1-10, 1972
- 伊集院博司 : ジベレリンの処理によるヒノキ精英樹クローンの着花促進について 日林九支論 29 : 67-68, 1976
- James, B. P. and Naylor, A. W. : Alcohol dehydrogenase activity and ethanol utilization in germinating Longleaf and Slash pine seeds, *Forest Science* 15(4) : 400-403, 1969
- Jinks, J. L. : The analysis of continuous variation in a diallel cross of *Nicotiana glauca* L, *Genetics* 39 : 767-788, 1954
- Johnson, L. C. and Critchfield, W. B. : Reduced vigour, chlorophyll deficiency and other effects of self-fertilization in *Pinus*, *Canadian J. Forest Research* 23(c) : 145-149, 1945
- Johnson, A. G. : Albinism in the Austrian pine, *J. Heredity* 39 : 9-10, 1948
- Johnson, L. C. and Critchfield, W. B. : A white-pollen variant of bristle cone pine, *J. Heredity* 65 : 123-124, 1974
- 甲斐重貴 : スギさし木品種子供群の変異について II. F_1 子供群における子葉数と夏期黄白苗の遺伝 日林九支論 28 : 83-84, 1975
- 甲斐重貴 : スギさし木品種子供群の変異について III. F_1 子供群における針葉形質の変異 日林九支論 29 : 71-72, 1976
- Kambel, A. E. and Webster, O. J. : Estimates of general and specific combining ability in grain sorghum, *Crop Science* 5 : 521-523, 1965
- 加藤善忠・三宅 勇・石川広隆 : ジベレリンによるスギ花芽分花の促進 日林誌 40(1) : 35-36, 1958
- 勝田 桓 : クロマツとアカマツの自家受精 東大農学部演習林 15 : 23-35, 1964
- 勝田 桓 : ふたたびクロマツ, アカマツの自家受粉したときのタネのできかたについて 東大農学

- 部演習林 16 : 35—41, 1966a
- 勝田 桓 : クロマツの自殖弱勢について 林木の育種 37 : 7—8, 1966b
- 勝田 桓 : マツ類での胚発達とシイナの形成について 林木の育種 77, 12—13, 1973
- 河村嘉一郎・山田二郎 : スギの交配技術に関する基礎的調査 III. 受粉の回数および時刻について
81回日林講 : 147—148, 1970
- Kemphorne, D. : The theory of diallel crosses, *Genetics* 41 : 451—459, 1956
- Khalil, M. A. : Genetics of cone morphology in White spruce (*Picea glauca*). *Canadian J. Botany* 52 : 15—21, 1974
- 菊池利喜夫・古越隆信 : スギの花粉飛散と受精範囲 87回日林講 : 179—180, 1976
- 小林 隆・今井元政 : アカマツ, クロマツの種間交雑試験 (第2報) 新潟県林試研報 6 : 29—39, 1963
- 近藤貞二 : スギサシキ品種のクローン性について 昭和51年度九州大学大学院農学研究科林業学
専攻修士論文1976
- Koski, V. : On self-pollination, genetic load and subsequent inbreeding depression in some Conifers. *Communic. Inst. For. Fenn.* 78 : 1—42, 1973
- Koski, V. and Malmivaara, E. : The role of self-fertilization in a marginal populations of *Picea abies* and *Pinus sylvestris*. *Proceedings, joint IUFRO Meeting, S. 02. 04. 1-3. (III)* : 155—160, 1974
- Kraus, J. F. and Squillace, A. E. : Selfing vs. outcrossing under artificial condition in *Pinus elliottii* Engelm. *Silvae Genetica* 13 : 72—76, 1964
- Kraus, J. F. : Estimates of general and specific combining ability for height and rust resistance from single-crosses of Slash pine. *Silvae Genetica* 22(4) : 121—124, 1973
- Langner, V. W. : Eine Mendelspaltung bei Aurea-Formen von *Picea abies* (L.) Karst. als Mittel zur Klärung der Befruchtungsverhältnisse im Walde. *Silvae Genetica* 2 : 49—51, 1953
- Langner, W. : Self-fertility and inbreeding in *Picea omorika*. *Silvae Genetica* 8(3) : 84—93, 1959
- Lanner, R. M. : Needed : A new approach to the study of pollen dispersion. *Silvae Genetica* 15 : 50—52, 1966
- Lester, D. T. : Self-compatibility and inbreeding depression in American elm. *Forest Science* 17(3) : 321—322, 1971
- Li, C. C. : "Population Genetics" The Univ. Chicago Press. 1955
- Lindgren, D. : Inbreeding-Disadvantage or tool in forest tree breeding. Dept. Forest Genetics, Research notes, Royal College of Forestry, S-104 05 : 1—28, 1975a
- Lindgren, D. : The relationship between self-fertilization, empty seeds and seeds originating from selfing as a consequence of polyembryony. *Studia Forestalia Suecica* 126 : 1—24, 1975b
- Lippert, L. F. : Heterosis and combining ability in Chili peppers by diallel analysis. *Crop Science* 15 : 323—325, 1975
- Lotan, J. E. : Cone serotiny of lodgepole pine near West yellowstone, Montana. *Forest Science* 13 : 55—59, 1967
- Lundkvist, K. : Inheritance of leucine aminopeptidase isozymes in *Picea abies* (L.) Karst. *Hereditas* 76 : 91—96, 1974
- Lundkvist, K. : Inheritance of acid phosphatase isozymes in *Picea abies* (L.) Karst.

- Hereditas 79 : 221-226, 1975
- Lyons, L. A. : The seed production capacity and efficiency of Red pine cones (*Pinus resinosa* Ait.), Canadian J. Botany 34 : 27-36, 1956
- Macdonald, T. and Brewbaker, J. L. : Isozyme polymorphism in flowering plants, VIII. Genetic control and dimeric nature of transaminase by hybrid maize isoenzymes. J. Heredity 63(1) : 11-14, 1972
- Macdonald, T. and Brewbaker, J. L. : Isozyme polymorphism in flowering plants, IX. The E_5-E_{10} esterase loci of maize. J. Heredity 65(1) : 37-42, 1974
- Marin, O. V. and Lippert, L. F. : Combining ability analysis of anatomical components of the dry fruit in Chili peper. Crop Science 15 : 326-329, 1975
- Markert, C. L. and Møller, F. : Multiple forms of enzymes : Tissu outogenetic and species specific patterns. Proceeding Natural Academy Science 45 : 753-763, 1959
- 松尾孝嶺 : 「育種学」 養賢堂 東京 1969
- 松尾孝嶺 : 「育種学要論」 養賢堂 東京 1972
- Matziris, D. I. and Zobel, B. J. : Inheritance and correlations of juvenile characteristics in Loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Silvae Genetica 22 : 1-2, 1972
- 松田 清 : 「スギの不稔性に関する組織解剖学的研究」 昭和49年度九州大学大学院農学研究科林業学専攻修士論文 1975a
- 松田 清 : スギの不稔性に関する基礎的研究 I. クモトオンにおける胚珠および胚形成の異常について 日林九支論 28 : 103-104, 1975b
- 松田 清 : スギの不稔性に関する基礎的研究 III. 胚珠内におけるヒノデ花粉の花芽, 花粉管伸長の異常 日林九支論 29 : 77-78, 1976
- Mergen, F., Burley, J. and Furnival, G. M. : Embryo and seedling development in *Picea abies* (Moench) voss, after self-, cross- and wind-pollination. Silvae Genetica 14 : 188-193, 1965
- Mettler, L. E. and Gregg, T. G. : 「集団遺伝学と進化」 共立出版 東京 1971
- 三上 進 : カラマツの同位酵素における産地間変異 第83回日林講 : 195-197, 1972
- Mikshe, J. P. : "Proceedings in life sciences mordern methods in forest genetics" Springer Verlarg Berlin Heidelber, New York, 1976
- Miyazaki, Y. and Sakai, K. I. : Use of zymography for identification of a clone in *Cryptomeria japonica* D. Don. J. Jap. For. Soc. 51(9) : 235-239, 1969
- Moffett, A. A. : Genetical studies in Acacias. I. The estimation of natural crossing in Black wattle. Heredity 10 : 57-67, 1956
- 百瀬行男 : カラマツの結実習性 北海道の林木育種 7(1) : 5-8, 1964
- Morgenstern, E. K. : Preliminary estimates of inbreeding in natural populations of Black spruce, *Picea mariana*, Canadian J. Genetic Cytology 14 : 443-446, 1972
- Morgenstern, E. K. : A diallel cross in Black spruce *Picea mariana* (Mill) B. S. P. Silvae Genetica 23(1-3) : 67-70, 1974
- Müller, G. : A simple method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. Silvae Genetica 25(1) : 15-17, 1976
- 中井 勇・藤本博次・稲森幸雄・伊佐義郎・宇野宇一 : マツ類の交雑育種に関する研究 (I) クロマツの種内交雑ならびに他のマツ類数種との種間交雑の可能性 京大演報 39 : 125-143, 1967a
- 中井 勇・藤本博次・伊佐義郎 : マツ類の種間交雑に関する研究, 受粉時期およびその回数と種子

- 稔性との関係 林業技術 299 : 25—27, 1967b
- 中井 勇 : クロマツ×アカマツおよびクロマツ×タイワンアカマツ雑種苗木の生長について 林木の育種 74(7) : 18—20, 1972
- 中井 勇 : リギダマツとテーダマツの正逆交雑の可能性とその雑種性 林木の育種 87(9) : 9—11, 1974
- 長浜三千治・加藤岩男 : ジベレリンの樹体注入による結実促進について 日林九支論 24 : 72—73, 1970
- 長浜三千治・野中重之 : スギ母樹別家系の5年生時の樹高 日林九支論 28 : 75—76, 1975a
- 長浜三千治・野中重之 : ヒノキ精英樹家系の5年生時の樹高 日林九支論 28 : 93—94, 1975b
- Nakagahra, M. : Genetic mechanism on the distorted segregation of marker genes belonging to the eleventh linkage group in cultivated rice, Japan, J. Breed. 22(4) : 232—238, 1972
- Nakagahra, M. : Genetic analysis for esterase isozymes in Rice cultivars, Japan, J. Breed. 27(2) : 141—148, 1977
- Namkoong, G. : “林木における量的遺伝の基礎. 林業への量的遺伝の応用に関する研修テキスト” 林業試験場刊行 1972
- Nicholls, J. W. P., Dadswell, H. E. and Fielding, J. M. : The heritability of wood characteristics of *Pinus radiata*, Silvae Genetica 13(3) : 68—71, 1964
- Nilsson, D. B. : Heterosis in an intraspecific hybridization experiment in Norway spruce (*Picea abies*). Proceeding joint IUFRO Meeting, S. 02. 04.(III) : 197—205, 1974
- 西村慶二・松永健一郎・枝本和子 : 精英樹におけるアカマツ・クロマツの種間交雑の試み 日林九支論 27 : 63—64, 1974
- 西村慶二・大庭喜八郎 : スギ精英樹人工交配家系の5年生時の樹高およびその遺伝率 日林九支論 29 : 63—64, 1976
- 西沢一俊・志村憲助 : 「入門酵素化学」 南江堂 東京 1967
- 野口常介・渡辺 操 : アカマツ精英樹クローンでの自家受精によるタネのでき方 日林誌 54(10) : 356—359, 1972
- 野間正紀 : 発生学におけるアイソザイム 遺伝 23(7) : 30—34, 1969
- 沼知健一 : 海洋学講座「資源生物学論」 東大出版会 : 5—36, 1973a
- 沼知健一 : 魚類のアイソザイム研究 海洋科学 5 : 35—42, 1973b
- 大庭喜八郎 : 林木の放射線感受性に関する研究 (V) スギの自殖種子, 他殖種子, および1つの標識遺伝子を持った放射線感受性のちがいについて 日林誌 49(2) : 45—52, 1967a
- 大庭喜八郎・村井正文・杉村義一・齊藤幹夫・岡本敬三・渡辺操・野口常介 : 林木の変異に関する研究 (III). クマスギと他のさし木スギ系統間の交雑親和性 F_1 幼苗の生長およびクマスギで検出された2個の単一劣性遺伝子について 日林誌 49(10) : 361—367, 1967b
- 大庭喜八郎・岡田幸郎・村井正文 : 温室育苗によるスギ世代促進 日林誌 53(3) : 133—137, 1971a
- 大庭喜八郎・村井正文 : クマスギの体細胞突然変異の誘起におよぼすガンマー線の照射時間, せん定および内部摘芽の効果 日林誌 53(6) : 170—176, 1971b
- 大庭喜八郎・岩川富夫・岡田幸郎・村井正文 : アカマツの葉緑素変異苗の発生ひん度による自然自殖率の推定および葉緑素変異苗の遺伝 日林誌 53(10) : 327—333, 1971c
- 大庭喜八郎 : メアサ, キリシマメアサおよびアオスギのミドリスギ劣性遺伝子 日林誌 54(1) : 1—5, 1972a
- 大庭喜八郎 : クロマツの黄子苗を生ずる劣性遺伝子および自然自殖率の推定 日林誌 54(1) : 28—29, 1972b

- 大庭喜八郎：ヒノキ葉緑素変異体の遺伝 日林誌 54(2) : 56—58, 1972c
- Ohba, K. : Mutation research with Forest tree species. *IUFRO Genetics-SABRAO Joint Symposia D-4(1)* : 1-15, 1972d
- 大庭喜八郎・百瀬行男・前田武彦：スギ精英樹からの異常苗の分離 林試研報 250 : 53—76, 1973
- 大庭喜八郎・前田武彦・福原樞勝：ヨレスギの遺伝およびヨレ遺伝子と白子苗，ミドリスギの両劣性遺伝子との連鎖 日林誌 56(8) : 276—281, 1974a
- Ohba, K. : Quantitative genetics in forest tree species in Japan. *IUFRO joint Meeting of the working parties (III)* : 59-68, 1974b
- 大羽 滋：「集団の遺伝」 東大出版会 1977
- 大島長造・井上英二・湯浅明・渡辺格：「集団の適応と進化」 朝倉書店 1974
- Orr-Ewing, A. L. : Inbreeding experiments with the Douglas-fir (*Pseudotsuga taxifolia* (Poir) Britton). *Forest Chronicle* 30 : 7-20, 1954
- Orr-Ewing, A. L. : Possible occurrence of viable unfertilized seeds in Douglas-fir. *Forest Science* 3 : 243-248, 1957a
- Orr-Ewing, A. L. : Further inbreeding studies with Douglas-fir. *Forest Chronicle* 33 : 318-332, 1957b
- Orr-Ewing, A. L. : Inbreeding and single crossing in Douglas-fir. *Forest Science* 11(3) : 279-290, 1965
- 朴 竜求・酒井寛一：マツのパーオキシダーゼに関する遺伝学的研究 I. 同位酵素の遺伝 82 回日林講 : 139—140, 1971
- Park, Y. G. : Developmental variation in the isoperoxidase of *Pinus densiflora*. *Korean J. Breeding* 4(1) : 15-22, 1972
- Paschall, E. H. and Wilcox, J. R. : Heterosis and combining ability in exotic Soybean germplasm. *Crop Science* 15 : 344-349, 1975
- Pattinson, J. V., Burly, J. and Greary, T. F. : Development of the ovulate strobilus in *Pinus kesiya* Royle ex Gordon (syn. *P. khasya* Royle) in relation to controlled pollination in Zambia. *Silvae Genetica* 18(4) : 108-111, 1969
- Perry, T. O. : Seasonal and genetic differences in fast, phenols, isoenzymes and pigment of Red-maple. *Forest Science* 17 : 209-212, 1971
- Phul, P. S., Nanda, G. S. and Gill, K. S. : Diallel analysis of leaf area, leaf number and stem thickness in Pearl Millet. *SABRAO J.* 6(2) : 163-168, 1974
- Pipkin, S. B. and Hewitt, N. E. : Effect of gene dosage on level of alcohol dehydrogenase in *Drosophila*. *J. Heredity* 63(6) : 331-336, 1972
- Price, H. J. and Stebbins, G. L. : The developmental genetics of the calcaroides gene in barley. II. Peroxidase activity in mutant and normal plants at progressive stages of development. *Genetics* 68 : 539-546, 1971
- Rasmuson, B. and Rudin, D. : Variations in esterase zymogram patterns in needles of *Pinus sylvestris* from provenances in northern Sweden. *Silvae Genetica* 20(1-2) : 39-41, 1971
- Robertson, D. S., Backmann, M. D. and Anderson, I. C. : Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. II. Studies on the effect of four modifiers of the albino mutant of maize. *Photochemical Photobiology* 5 : 797-805, 1966
- Rudin, D. and Rasmuson, B. : Genetic variation in esterases from needles of *Pinus*

- sylvestris* L. Hereditas 73 : 89-98, 1973
- Rudin D., Erikson, G., Ekerberg, L. and Rasmuson, M. : Studies of allele frequencies and inbreeding in Scotch pine populations by the aid of the isozymes technique. *Silvae Genetica* 23 : 10-13, 1974
- 齊藤幹夫・柳沢聡雄・丸岡富次郎・西岡利忠：カラマツ採種園における諸調査（第1報）．採種園の土壤管理と採種木の成長 北海道林木育種 7(1) : 16-27, 1964
- 齊藤幹夫・丸岡富次郎・西岡利夫：カラマツ採種園における諸調査（第2報）．採種木の着花状態と開花期・花粉飛散期・タネの稔性などについて 北海道の林木育種 7(2) : 13-25, 1965
- Saito, A. : Electrophoretic composition on soluble pollen proteins of *Alnus* in relation to inter- and intraspecific identification, Japan. *J. Forestry* 52(10) : 291-295, 1970
- 齊藤幹夫・岩川盈夫・渡辺操：クロマツの近親交配における球果・タネおよび苗木のできかた 林試研報 255 : 31-46, 1973
- 齊藤幹夫：クロマツの近親交配 林木の育種 80(7) : 16-18, 1973
- Sakai, K. I. and Hatakeyama, S. : Estimation of genetic parameters in forest trees without raising progeny. *Silvae Genetica* 12 : 152-157, 1963
- Sakai, K. I., Miyazaki, Y. and Matsuura, L. : Genetic studies in natural populations of forest trees, I. Genetic variability on the enzymatic level in natural forest of *Thujaopsis dolabrata*. *Silvae Genetica* 20(5-6) : 168-173, 1971
- Sakai K. I. and Park, Y. : Genetic studies in natural populations of forest trees. III. Genetic differentiation within a forest of *Cryptomeria japonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 41 : 13-17, 1971
- Sakai, K. I., Iyama, S., Miyazaki, Y. and Iwagami, S. : Genetic studies in natural population of Forest trees. Proc. *IUFRO Genetics-SABRAO Joint Symp.*, Tokyo A-4(1) : 1-3 1972
- Sakai, K. I. and Miyazaki, Y. : Genetic studies in natural populations of forest trees. II. Family analysis : A new method for quantitative genetic studies. *Silvae Genetica* 21(5) : 149-154, 1972
- 坂岸良克：「ゲル電気泳動法—ポリアクリルアミドゲルおよびデンプンゲルによる—」 東京化学同人出版 1974
- 佐々木忠兵衛・倉橋昭夫・浜谷稔夫：カラマツの受粉適期の判別 北海道の林木育種 19(2) : 12-16, 1976
- Sato, K. : Some physiological actions of gibberellins on forest trees. *FAO/FORGEN* 63-5/2 : 1-15, 1963
- Scandarios, J. G. : Tissue specific isozymes variations in Maize. *J. Heredity* 55 : 281-285, 1964
- Scandarios, J. G. : Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants : A review. *Biochemical Genetics* 3 : 37-79, 1969
- Schwartz, D. : Genetic studies on mutant enzymes in Maize. IV. Comparison of pH 7.5 esterases synthesized in seedling and endosperm. *Genetics* 49 : 373-377, 1964a
- Schwartz, D. : Genetic studies on mutant enzymes in Maize. V. In vitro intervariation of allelic isozymes. *Proceeding of the National Academy of Science* 52 : 222-226, 1964b
- Schwartz, D. : Genetic studies on mutant enzymes in Maize. VI. Elimination of allelic isozyme variation by glyceraldehyde treatment. *Genetics* 52 : 1295-1302, 1965

- 関山 太・山懸弘忠：水稲パーオキシダーゼザイモグラムの器官特異性について II. 器官の種類および発育相によるザイモグラムパターンの変異 育種学雑誌 23, 別冊1: 76-77, 1973
- Shahi, B. B., Chu, Y. E. and Oka, H. I.: Analysis of genes controlling peroxidase isozymes in *Oriza sativa* and *O. perennis*, Japan, J. Genetics 44(5): 321-328, 1969
- 赤藤克己：「作物育種学汎論」養賢堂 東京 1968
- Shannon, L. M.: Plant isozymes. Annual Review of plant physiology 19: 187-210, 1968
- Shaw, C. R.: Isozymes: classification, frequency and significance. International Review of Cytology 25: 297-332, 1969
- Silen, R. R.: Pollen dispersal conditions for Douglas-fir. J. Forestry 60: 790-795, 1962
- 新谷安則：精英樹採種園のタネによるアカマツ次代検定林の4年目の調査結果 日林九支論 24: 69-71, 1971
- Sittmann, K. and Tyson, H.: Estimates of inbreeding in *Pinus banksiana*. Canadian J. Botany 49: 1241-1245, 1971
- Smithies, O.: Zone electrophoresis in starch gels. Biochemical J. 61: 629-640, 1955
- Smith, J. H. C., Durham, L. J. and Wurster, C. F.: Formation and bleaching of chlorophyll in albino corn seedlings. Plant Physiology 34: 340-345, 1959
- Smith, W. J.: The heritability of fibre characteristics and its application to wood quality improvement in forest trees. Silvae Genetica 16(2): 41-50, 1967
- Snyder, E. B. Seed yield and nursery performance of self-pollinated Slash pines. Forest Science 14: 68-74, 1968
- Sorensen, F. C.: Linkage between marker gene and embryonic lethal factor may cause disturbed segregation ratios. Silvae Genetica 16: 132-134, 1967
- Sorensen, F. C.: Embryonic genetic load in coastal Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* var. *menziesii*. American Naturalist 103(932): 389-398, 1969
- Sorensen, F. C.: Estimate of self-fertility in coastal Douglas-fir from inbreeding studies. Silvae Genetica 20(4): 115-120, 1971a
- Sorensen, F. C.: White seedlings: A pigment mutation that affects seed dormancy in Douglas-fir. J. Heredity 62(2): 127-130, 1971b
- Sorensen, F. C.: Frequency of seedlings from natural self-fertilization in coastal Douglas-fir. Silvae Genetica 22(1-2): 20-24, 1973
- Sorensen, F. C.: Self-pollination effects on Douglas-fir and Ponderosa pine seedlings. Silvae Genetica 23(5): 135-138, 1974
- Sorensen, F. C. and Miles, R. S.: Self-pollination effects on Douglas-fir and Ponderosa pine seedling. Silvae Genetica 22(1-2): 20-24, 1974
- Sorensen, F. C., Frankline, J. F. and Woollard, R.: Self-pollination effects on seed and seeding traits in Noble-fir. Forest Science 22(2): 155-159, 1976
- Squillace, A. E. and Bingham, R. T.: Selective fertilization in *Pinus monticola* Dougl. I. Preliminary results. Silvae Genetica 7: 188-196, 1958
- Squillace, A. E. and Kraus, J. F.: The degree of natural-selfing in Slash pine as estimated from albino frequencies. Silvae Genetica 12: 46-50, 1963
- Squillace, A. E., Bingham, R. T., Namkoong, G. and Robinson, H. F.: Heritability of juvenile growth rate and expected gain from selection in Western white pine. Silvae Genetica 16(1): 1-6, 1967
- Steinhoff, R. J. and Hoff, R. J.: Estimates of the heritability of height growth Western

- white pine based on parent-progeny relationships, *Silvae Genetica* 20(5-6) : 141-143, 1971
- Steinhoff, R. J. : Inheritance of cone color in *Pinus monticola*, *J. Heredity* 65 : 60-61, 1974
- Steward, F. C., Lyndon, R. F. and Barber, J. T. : Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins. A study on pea seedlings in relation to development, *American J. Botany* 52(2) : 155-164, 1965
- Strand, L. : Pollen dispersal, *Silvae Genetica* 6 : 129-136, 1957
- 高山芳之助 : アカマツ採種園に関する研究 (Ⅲ) 開花日におけるクローン間差異 日林誌 50(4) : 103-108, 1968
- 田淵和夫・野口常介・村上要助 : ハンノキ属の交雑について 北海道の林木育種 10(1) : 25-32, 1967
- 田中勝美・服部文明・石崎厚美 : クヌギの開花・結実およびジベレリンの影響 日林九支論 25 : 49-50, 1971
- Teich, A. H. and Holst, M. T. : Genetic control of cone clusters and proecocious flowering in *Pinus sylvestris*, *Canadian J. Botany* 47 : 1081-1084, 1969
- Teich, A. H. : Cone serotiny and inbreeding in natural populations of *Pinus banksiana* and *Pinus contrata*, *Canadian J. Botany* 48 : 1805-1808, 1970
- Tigerstedt, P. M. A. : Studies on isozyme variation in marginal and central populations of *Picea abies*, *Hereditas* 75 : 47-60, 1973
- 戸田良吉・明石孝輝 : 自然交配種子によるクロマツ次代検定林調査結果 日林九支論 17 : 62-63, 1963
- 戸田忠雄・西村慶二 : スギ精英樹間の交雑稔性と F₁ 苗の生長 日林九支論 27 : 62-63, 1971a
- 戸田忠雄・西村慶二 : スギ精英樹間人工交配による種子生産量と F₁ 苗の生長について 日林九支論 25 : 62-63, 1971b
- 戸田忠雄・西村慶二 : ヒノキ人工交配苗の成長について 日林九支論 26 : 121-122, 1973
- Toda, R. : Variation and heritability of some quantitative characters in *Cryptomeria*, *Silvae Genetica* 7 : 87-93, 1958
- Toda, R., Nakamura, K. and Satoo, D. : The heritability of tree height and stem girth in *Cryptomeria* through sexual reproduction, *Silvae Genetica* 13 : 43-49, 1964
- 外山三郎・戸田義宏・福田延男・永田順蔵・進 敏彦 : スギの交雑試験 I. 自家交配木の特性 日林九支論 29 : 75-76, 1976
- 外山三郎・戸田義宏・福田延男・永田順蔵・進 敏彦 : スギの交雑育種 II. 交雑 F₁ 36年生時の枯損と生長 日林九支論 30 : 79-80, 1977
- 塚原初男 : スギの栄養系ニンジンバに関する造林学的研究 九大演報 37 : 1-84, 1954
- 塚原初男・菊池秀夫・戸田忠雄 : 自然交雑種子による 5 年生時クロマツ次代検定林の調査結果 日林九支論 20 : 19-20, 1966
- Wann, C. W., Perry, T. O. and Johnson, A. G. : Pollen dispersion of Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) with special reference to seed orchard management, *Silvae Genetica* 9 : 65-92, 1960
- 渡辺 操・岩川盈夫 : マツ類の人工受粉技術ならびに種間交雑について 林試研報 244 : 125-126, 1969
- Wilcox, M. D., Sheibourne and Firth, A. : General and specific combining ability in eight selected clones of Radiata pine, *Newzealand J. Forestry Science* 5(2) : 219-

225, 1975

Whitt, G. S. : Plant isozyme. SABCO J. 3 : 1-50, 1967

Wright, J. W. Pollen dispersion apprications. J. Forestry 53 : 114-118, 1953

Wright J. W. : Pollen dispersion studies : Some practical apprications. J. Forestry (Ferb.) : 114-118, 1967

Wright, J. W. : "Introduction to Forest Genetics" Academic press, New York, 29-46, 1976

山手広太 : ヒノキ採種園の結実特性 日林九支論 26 : 153-154, 1973

矢幡 久・宮島 寛・野上寛五郎 : ヒノキの遺伝的変動について (I) 日林九支論25 : 68-69, 1971

矢幡 久・宮島 寛・野上寛五郎 : ヒノキの遺伝的変動について (II) 日林九支論 26 : 157-158, 1972

Yates, F. : Analysis of data from all possible reciprocal crosses between a set of parental lines. Heredity 1 : 287-309, 1947

横山敏孝・金子富吉・伊藤昌司・山崎 忍・浅川澄彦 : アカマツの受粉適期と受粉回数 林試研報 253 : 39-53, 1973

横山敏孝・金子富吉・伊藤昌司 : 1日間の自然受粉でカラマツ雌・雄花周辺に飛来した花粉粒と胚珠の受粉率 日林誌 57(6) : 194-196, 1975

横山敏孝 : スギにおける不稔種子の形成 林木の育種 97(5) : 13-15, 1976

Résumé

This investigation is a study concerning some genetics aspects of inbreeding problems in Hinoki, *Chamaecyparis obtusa* Endl.

Inbreeding occasionally causes the reduction of the various kinds of variability such as seed productivity, germinative ability and growing vigor etc. Especially, self-pollination in forest tree species brings many problems to push forward the forest tree improvement.

1. Flowering habits of Hinoki plus trees and variation of several phenotypic characters of progenies which were produced by selfing.
 - 1) Differences of flower-bearing habits and bearing position of male and female flowers in each clone were recognized. Considerable amount of flowers were omnipresented in the upper part of the tree crown. Particularly, majority of female flowers were beared in this part. The matured stage of male and female flower was almost the same time within individuals though female flower developed a little earlier.
 - 2) Though the developmental stage-4 in male and female flowers was thought to be the optimum time for natural pollination within individuals, the differences of the most favorable time of natural pollination among each clone were observed. The difference in time between the earliest and the latest matured clone was about two weeks.
 - 3) The ratio of self-pollination to cross-pollination in each of seven characters of progenies during two years after germination were examined. This was calculated by dividing performance value (family mean) of self-pollination by that of cross-pollination. All the values calculated was less than one. It was concluded that this result was brought about by effects of selfing, in other words inbreeding depression.
 - 4) The degree of inbreeding depression of seven characters was not always the same among colnes. Further, some clones did not indicate effects of inbreeding depression. Characters which indicated effective inbreeding depression were seed weight (0.90), germination percentage (0.63), hypocotyl length (0.91) and survival percentage (0.84).
- II. Estimation of combining ability and detection of recessive homozygous characters.
 - 1) Eight parents of Hinoki plus tree were crossed in complete diallel and four character of their progenies, that is, germination percentage, hypocotyl length, cotyledon slenderness (cotyledon length divided by cotyledon width), and two-year-seedling height were examined. It was concluded that of estimated values of combining ability was remarkably differed by each cross.

The values for four characters in self-pollination of eight parent were smaller than any other values in cross-pollination. Especially, germination percentage

and seedling height were suspected of influence by crossing.

All of G. C. A. (general combining ability), S. C. A. (specific combining ability) and Recipro. (reciprocal effects) for four characters was significant at 1% level from a result of analysis of variance respectively.

- 2) Heritability of three characters, that is, hypocotyl length, cotyledon slenderness and two-year-seedling height were 0.330, 0.335 and 0.333 respectively. Further heritability of female parent was higher than that of male in all of these characters.
- 3) Sowing experiments of nineteen clones were practiced and a large number and many kinds of variants were observed. These variants might be divided into two groups. One was chlorophyll deficient variants which included albino, xantha, light green seedlings, and so on. The other was morphological variants which included dwarf, having numerous primary leaves, fasciation primary leaves seedling, and so on. Altogether, thirteen kinds of variants were detected in 52% among tested nineteen clones. In them, chlorophyll deficient variants which were detected on O1 (light green primary leaves, no lethal) and A27 (light green cotyledon and primary leaves, lethal) clones were controlled by major gene respectively though these two variants were apparently quite alike each other.

However gene analysis of the other variants were not able to conduct, it was recognized that many clones of Hinoki had involved considerable number of deleterious gene for their living. Therefore, it seems to be concluded that Hinoki, *Chamaecyparis obtusa* Endl. was susceptible of inbreeding depression and its genetic load to be fairly large.

- III. Gene analysis of peroxidase isozyme bands by means of zymography and estimation of frequency of natural self-pollination.
 - 1) Raise and fall of peroxidase isozyme bands during about one year after germination were examined. They were very changeable during growing season till September but became stable fall season. Though enzymatic activity changed seasonably, it was recognized that stable isozyme band pattern appeared after October when seedlings stopped to grow. Therefore, it was concluded that gene analysis of several bands with stable activity was surely possible even though the age of seedling was less than one year.
 - 2) Peroxidase isozyme bands variation of Hinoki plus tree were examined. Two bands with relatively height activity and different mobility were presented in specific region of Rf 36-41. These two bands were named *F* (fast migrated) and *S* (slow migrated) respectively. The patterns composed by these two bands could be classified into three types, that is, single band type of *F* and that of *S*, and double bands type of *F*•*S*. The inheritance of these two peroxidase isozyme bands in Hinoki was investigated by making use of four parental trees

and 412 progenies which produced from 4×4 complete diallel cross. Consequently, genotypes of individuals with F or S single isozyme band were symbolized as P_x^F/P_x^F and P_x^S/P_x^S which were homozygotes respectively, while those with $F \cdot S$ double bands were symbolized P_x^F/P_x^S which was heterozygote. It was very interesting that the genetic behavior of these allelic isozyme bands subjected to monomeric forms (monomer) and that of codominance which should never indicate dominant nor recessive relation of P_x^F - and P_x^S -gene.

- 3) Estimation of frequency of natural self-fertilization was investigated by making use of P_x^F - and P_x^S -marker gene. First of all, genotypes of all mother trees composing experimental seed orchard were examined and frequencies of P_x^F - and P_x^S - allele which expected to be fertilized randomly were calculated from genotype frequencies of mother trees in a experimental seed orchard and a clone stock garden respectively. Genotype frequencies of more than 100 individuals of open-pollinated progenies which were originated from every mother tree that had investigated their genotypes were examined. And then, frequency of natural self-fertilization were estimated based on the experimented genotype frequencies of these progenies.

As a result, ratio of natural self-fertilization in five F/S genotype mother trees were ranged from 16.28 to 29.75%. While, mean frequency of natural self-fertilization of a seed orchard which based on mixed progenies from fourteen F/S genotype mother trees and thirteen S/S genotype mother trees was 16.28 and 9.80% respectively.

Further, frequency of natural self-fertilization of one F/S and one S/S genotype mother tree in a clone stock garden where the same clones were set in two or three rows was examined. The ratio of natural self-fertilization of these trees were 13.20 and 44.81% respectively.

Frequency of natural self-fertilization in actual seed orchard was unexpectedly high. And it seemed that frequency of natural self-fertilization in the clone stock garden was extremely influenced by pollen produced from neighboring clonal individuals.

- 4) Theoretically expected frequency of F/S genotype offsprings which originated from each five F/S genotype mother trees should certainly be $f(F/S)=0.5$ at any case, but actual observed frequency tended to be smaller than 0.5.

For a reason of this distortion, it was supposed that the distorted frequencies of F/S genotypes observed in progenies might be based on the disturbance of gamets which was caused by linkage between a marker gene and a certation or a fertility gene (gametic selection or zygotic lethality) at fertilization. Gamatic selection at fertilization on the F/S genotype mother trees might cause such frequency to be distorted. Therefore, frequency of F/F , F/S and S/S genotypes before selection were able to calculate in conformity with the general

selection model.

As a result, ratio of frequency on natural-fertilization for five mother trees were ranged from 13.12 to 29.24%, and mean frequency of natural self-fertilization of this seed orchard was estimated about 15.71%.