

遺伝子組換えカンバと北海道産カンバ類の交雑リスクの推定

—遺伝子組換えカンバ原種花粉による交雑種子の発芽と実生の生育状況—

森林総合研究所北海道支所 倉本 恵生
森林総合研究所(現所属:ウプサラ大学) 津田 吉晃
王子製紙森林博物館 竹田 貴彦
森林総合研究所 篠原 健司

はじめに

樹木でも作物同様に遺伝子組換え体の開発が進められている。遺伝子組換え技術によって優れた性質を持つ樹木を効率的に育成できる一方で、遺伝子組換え樹木を野外植栽することで花粉や種子による組換え遺伝子の拡散やこれらを介した近縁野生種との交雑リスクが生じる(2,3)。樹木は長寿命であり、花粉や種子を長期にわたって拡散させるため、遺伝子組換え樹木の取り扱いにはとくに注意する必要がある。

遺伝子組換え生物をわが国に導入する場合には、国内の生物多様性に及ぼす影響を事前に評価するようカルタヘナ法(遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律)および関係法令で定められている(4)。しかし遺伝子組換え樹木の生物多様性影響を評価する手法の開発は十分に進んでいない(6,14)。遺伝子組換え樹木がわが国に導入された場合に、近縁野生種との交雑を起こす危険性が想定される系統群としてカバノキ属があげられる。本属の遺伝子組換え体は、ヨーロッパ～ロシアに分布する *Betula pendula* (シダレカンバ、以下 Bpen) を主な対象として既に開発が進められている(8,9,11,12)。一方、日本には野生種 11 種が分布し、シラカンバ、ダケカンバ、ウダイカンバの 3 種は北海道を中心に冷温帯に広く分布する主要構成種である。カバノキ属の種形成には近縁種間での雑種形成と浸透交雑が大きな要因となっていることや(13)、人工交配による雑種家系作出の実績から(14)、本属では現分布を越えた種の間でも交雑が起こる可能性が十分予想される。したがって、遺伝子組換えカンバの主な原種である Bpen とわが国の主要種との交雑性の検証は、遺伝子組換えカンバが近縁野生種に与える生態リスクを評価するうえで極めて重要である。

筆者らは、北海道に試験植栽されている Bpen の花粉を用い、北海道在来の上記 3 種への人工交雑試験を実施して交雑による種子形成を確認した(6)。この交雑種子が遺伝的に本当に雑種であるかの確認は交雑性の評価にとって不可欠である。また、交雑種子の発芽と実生の生育を明らかにすることも、交雑種の野外逸出を評価するために不可欠である。

本研究では、人工交雑試験で得られた種子を発芽させ、

発芽実生の遺伝解析により雑種の確認を行なうとともに、交雑種子の発芽状況と実生の初期成育について調査し、種内交配(対照)との比較を行なった。これらの結果をもとに、交雑性と野外逸出について考察する。

材料と方法

遺伝子組換えカンバの原種 Bpen の花粉を用いて、北海道に在来のカバノキ属主要 3 種(シラカンバ(Bp)、ダケカンバ(Be)、ウダイカンバ(Bm))の母樹各 2 本に人工交雑を行い(6)、得られた種子を研究材料とした。また各母樹に対してもう一方の同種母樹の花粉を用いて種内交配を行い(6)、対照種子とした。処理は開花量が多かった 2008 年に行い、Bpen 花粉は王子製紙森林博物館(栗山町)の植栽母樹 1 本を用いた。在来カンバ母樹は、森林総合研究所北海道支所実験林および隣接する北海道農業研究センター(札幌市)構内に選定した。

種子は 2008 年 9 月の採取直後に果序ごとに冷蔵保存し、2009 年 5 月に播き出しを行った。母樹と交配処理の組み合わせごとに、赤玉土と培養土を敷きつめた育苗トレイ(長さ 60cm×幅 45cm×深さ 6cm)に種子を播きつけ、ガラス室において散水を行って発芽させた。大量の種子を短期間で用意する必要があったため、各交配組み合わせで食害などの少ない果序を複数えらび、果序をほぐしながら内包種子をすべて播きつけた。果序あたりの種子数は樹種や母樹により違いがあっても交配処理間では異なるため(6)、果序数を揃えることで各母樹の処理間で種子数に大きな違いが出ないように考慮した。

7 月に発芽した実生を各交配組み合わせにつき 25 本選定して 1 本ずつポットに移植し、枯れた場合は適宜補植を行った。実生の初期生存率は移植苗の生存率から算出した。また、伸長停止がみられた 9 月に苗高を測定して初期成長量とした。

遺伝解析には、各交配組み合わせにつき最大 16 個体の実生を無作為に選び、本葉を採取した。供試個体数が 16 に満たない交配組み合わせについては全個体を供試した。計 230 個体の実生の本葉から DNA を抽出し、カバノキ属で開発された核 DNA のマイクロサテライト 19 遺伝子座(10,15)を用いて遺伝子型を決定した。DNA 抽出法、PCR および遺伝子型決定は Tsuda et al. (16)に従った。得

Shigeo KURAMOTO (Hokkaido Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), Sapporo 062-8516), Yoshiaki TSUDA (FFPRI, Tsukuba 305-8687, Present address: Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden), Takayoshi TAKEDA (Forest Museum, OJI Paper Group, Kuriyama 069-1508), Kenji SHINOHARA (FFPRI, Tsukuba 305-8687), Estimation of risk of hybridization between transgenic birch and native birch species in Hokkaido – Examination of germination and initial growth of hybrids between native species and silver birch, a species used in the development of transgenic.

られた実生の遺伝子型データを、花粉親・母樹の遺伝子型と照合して親子解析を行い、実生が計画した通りの交配後代となっているか推定した。

結果

1)発芽状況

交雑種子の発芽数は樹種と母樹によって異なり、同じ母樹の対照種子に比べて少ない傾向にあった(表-1)。シラカンバでは対照種子のトレイ上の発芽数が160-170個程度であったのに対し、交雑種子の発芽数は約半分の80個程度であった。ダケカンバ・ウダイカンバのそれぞれ1母樹(Be1・Bm1)では、対照種子は多数発芽した一方で交雑種子はほとんどないしまったく発芽しなかった。ダケカンバのもう一方の母樹(Be2)では対照種子はほとんど発芽せず対照種子もまったく発芽しなかった。ウダイカンバのもう一方の母樹(Bm2)では対照種子はほとんど発芽しなかったが、交雑種子は少数の発芽が見られた。ただしこれらの発芽個体は遺伝的には交雑ではなく混入花粉による交配であった(表-3参照)。

表-1. 各母樹と各交配処理の実生の発芽状況(まきつけ60日後のトレイ上の発芽数)

	シラカンバ		ダケカンバ		ウダイカンバ	
	Bp1	Bp2	Be1	Be2	Bm1	Bm2
交雑(HY)	80	78	9*	-	-	28**
対照(CR)	160	171	219	2	336	1
HY/CR	0.50	0.46	0.04			28.00

*遺伝解析の結果、本当の交雑個体は14.3%。**全てが交雑個体ではなかった(表-3参照)。-種子が得られなかった組み合わせ

2)初期生存

初期生存率は樹種や母樹によって異なり、全樹種や母樹を通じて交雑処理間で異なることはなかった(表-2)。対照種子の発芽実生の初期生存率は、発芽数の非常に少なかった2母樹では0%であった。これらの組み合わせを除くと、ダケカンバの初期生存率が交雑と対照のそれぞれで78, 72%, 次いでシラカンバが1母樹(Bp1)の交雑を除いて(16.0%), 57~66%であった。ウダイカンバ(母樹Bm1)の対照の初期生存率は49%とやや低く、

表-2. 各母樹と各交配処理の実生の初期生存率(7月に移植した実生の9月における生存率)

	シラカンバ		ダケカンバ		ウダイカンバ	
	Bp1	Bp2	Be1	Be2	Bm1	Bm2
交雑(HY)	16.0	63.6	77.8*	-	-	8.0**
対照(CR)	65.8	56.8	72.2	0.0	48.8	0.0

*遺伝解析の結果、本当の交雑個体は14.3%。**全てが交雑個体ではなかった(表-3参照)。-実生の得られなかった組み合わせ

交雑では8%(母樹Bm2)とさらに低かった。

3)遺伝解析

初期過程で生存していた実生の遺伝解析の結果(表-3), 対照処理で得られた種子はどの母樹でもほとんど(87.5~100%)が計画通りの交配(もう一方の同種母樹の花粉による交配)と推定された。一方で、交雑処理においては、シラカンバで半数程度(50~62%)が交配花粉親との交雑で残りは混入花粉による交配と推定された。ダケカンバやウダイカンバの交雑処理ではほとんど(母樹Be1)ないしすべて(母樹Bm2)が混入花粉による交配と推定された。

表-3. 各母樹と各交配処理の実生の遺伝解析結果(設計通りの交配になっていた割合)

	シラカンバ		ダケカンバ		ウダイカンバ	
	Bp1	Bp2	Be1	Be2	Bm1	Bm2
交雑(HY)	50.0	62.5	14.3	-	(0.0)*	0.0
対照(CR)	87.5	100.0	93.8	-	100.0	-

-実生の得られなかった組み合わせ。*生存率調査後に発芽した実生(1個体)による分析結果

4)初期成長

遺伝解析により確認された交雑実生と対照実生の初期成長として苗高を比較した。シラカンバでは2つの母樹とも交雑実生(平均3.6~4.7cm)のほうが対照実生(平均2.7~3.8cm)に比べて苗高が有意に大きかった(図-1, $p < 0.001$, $t = 4.826$, $df = 45$, GLM)。ダケカンバ(母樹Be1)では遺伝的に確定された交雑実生は1本で苗高は2.5cmであった。この苗高は対照実生の苗高(2.6 ± 0.4 cm)の範囲内にあった。ウダイカンバでは遺伝的に確定された交雑実生がなかった所以对照との初期成長の比較は行えなかった。

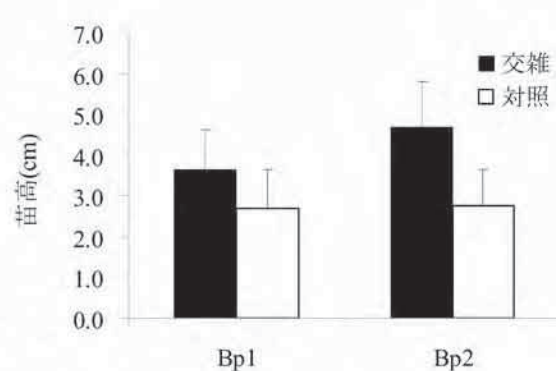


図-1. シラカンバ母樹の交雑実生と対照実生の初年度成長量(苗高)

考察

交雑処理で得られた種子には、混入花粉による交配(コンタミネーション) 種子が相当の割合で含まれていることが明らかになった。どの母樹でも対照処理ではほとんどの割合で計画通りの種内交配になっていたことから、袋掛けなどの操作に起因して交配率が低くなっていたのではないと考えられる。したがって、どの樹種や母樹においても Bpen 花粉による交配が同種の花粉による交配(対照)に比べて起こりにくかったと考えられる。また、遺伝解析結果を考慮した正味の交雑率に加え、種子の充実率も考慮すると交雑率は樹種によって大きく異なると考えられる。ダケカンバやウダイカンバでは交雑処理で形成された種子のうち遺伝的に交雑であった割合は非常に低かったが、交雑処理による種子の充実率も低かった(津田ら、未発表)。一方、シラカンバでは交雑処理で得られた種子のうち遺伝的に交雑であった種子は半数近くであり、交雑処理による種子の充実率もまた他の2種に比べてかなり高かった。これらのことから、北海道に分布する主要なカバノキ属樹種のうち、シラカンバは Bpen と交雑する可能性が最も高いと推定される。それに対し、ダケカンバやウダイカンバでは Bpen と交雑する可能性はかなり低いと推定される。

カバノキ属樹種の系統関係についてみると、Bpen とシラカンバは *Betula* 亜属に、ダケカンバは *Neurobetula* 亜属に、ウダイカンバは *Betulaster* 亜属に分類される(1)。特にシラカンバと Bpen (*B. pendula*) が近縁であることは、化学成分データおよび分子遺伝データのいずれを用いた系統分類学的研究からも支持されている(4,7)。一方亜属がそれぞれ異なるウダイカンバ、シラカンバおよびダケカンバの種間で雑種形成が起こりにくいことは、これら樹種の葉緑体 DNA 変異およびその種間共有について調べた系統地理学的研究からも支持される(17)。また Bpen とシラカンバおよびウダイカンバは2倍体で、ダケカンバは4倍体である(10)。これらのことから、カバノキ属樹木の種間交雑性には系統関係および倍数性が大きく関わっており、シラカンバは Bpen と倍数性が等しく、かつ近縁であるため、交雑を起こしやすいと考えられる。

交雑種子の発芽状況も樹種によって異なり、シラカンバが他の2樹種に比べて発芽が多かった。シラカンバの交雑種子の発芽数は対照に比べて半分程度ではあるが相当数の発芽がみられた。約10果序程度を播きつけに用いており、果序当たりの種子数が約200~400粒であることから、非充実種子を含む種子全数に対する発芽率は2~4%程度と概算される。母樹あたりの果序の着生量と、今回の発芽率をあわせて考えれば、Bpen 花粉とシラカンバとの交雑種子が周囲に飛散した場合には相当数が発芽すると考えられる。また、ダケカンバでは可能性は非常に低いながら交雑種子が確認されており、少数ながら発芽もみられるので、交雑に対する一応の注意は必要である。交雑種子の野外発芽の可能性をより正確に評価するには、充実率と充実種子の発芽率の両者に基づいた比較が必要である。

次に、発芽した実生の生存可能性について考察すると、

実生が相当するシラカンバでは母樹によって差があるが相当数の実生が生育初年に生存できると考えられる。今回の試験に用いた母樹2本のうち1母樹(Bp2)では生存率は対照よりもやや高い程度であった。生存できたものについて遺伝解析を行っているため、生存率の算定には遺伝的には交雑個体でなかったものも含まれている。しかしながら、生存実生の半数程度が交雑であったことから考えると、交雑実生の生存率としては過大評価されていないと思われる。

また、今回得られた生存率はあくまで生育初年のものである。しかしシラカンバ交雑実生の生育初年の成長量は対照実生よりも大きかった。シラカンバの当年の成長量は翌年の開葉量に影響するため、生育初年の成長量が大きいことは翌年の成長量が大きいことにつながり、成長量が大きいことで被圧による死亡率が減少すると考えられる。このことから、今回明らかにされた初期生存率と成長量から考えれば、交雑実生の翌年以降の生存率も高く成長量も大きいと予想される。

以上の結果を総合すると、Bpen との交雑の可能性はシラカンバで高く、交雑種子から相当数の実生が発生するうえ、実生は野外で十分に定着できるものと考えられる。したがって、Bpen を原種とする遺伝子組換えカンバが導入された場合、シラカンバと比較的に容易に交雑し、しかも交雑種が野外に定着する危険性が現実的に想定される。

引用文献

- (1) De Jong P. C. (1993) An introduction to *Betula*: its morphology, evolution, classification and distribution, with a survey of recent work. In D. Hunt (ed.), Proceedings of the IDS *Betula* symposium, 2-4 October 1992. International Dendrology Society, Richmond, UK.
- (2) Halis R. S. (2000) Genetically modified plants - the debate continues. Trends Ecol. Evol. 15: 14-18.
- (3) Halpin C., Thain S. C., Tilston E. L., Guiney E., Lapierre C. and Hopkins D. W. (2007) Ecological impacts of trees with modified lignin. Tree Genet. Genomes 3: 101-110.
- (4) Järvinen P., Palmé A., Morales L. O., Lännenpää M., Keinänen M., Sapanen T. and Lascoux M. (2004) Phylogenetic relationships of *Betula* species (Betulaceae) based on nuclear *ADH* and chloroplast *marK* sequences. Am. J. Bot. 91: 1834-1845.
- (5) 環境省ホームページ(日本版バイオセーフティクリアリングハウス) (2008) <http://www.bch.biodic.go.jp>, 2008.11.20
- (6) 倉本恵生・津田吉晃・篠原健司・竹田貴彦 (2009) ヨーロッパシラカンバと道産カンバ類3種の交雑における果実の形質. 日林北支論 57: 183-185.
- (7) Keinänen M., Julkunen-Tiitto R., Rousi M. and Tahvanainen J. (1999) Taxonomic implications of phenolic variation in leaves of birch (*Betula* L.) species. Biochem. Syst. Ecol. 27: 243-254.

- (8) Mohri T., Mukai Y. and Shinohara K. (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) Plant Sci. **127**: 53-60.
- (9) OECD (2003) Consensus document on the biology of European white birch (*Betula pendula* Roth). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. **28** : 48pp, OECD, Paris.
- (10) Ogyu K., Tsuda Y., Sugaya T., Yoshimaru H. and Ide Y. (2003) Identification and characterization of microsatellite loci in *Betula maximowicziana* Regel. Mol. Ecol. Notes **3**: 268-269.
- (11) Pasonen H. L., Vihervuori L., Sanna-Kaisa Seppänen S. K., Saarenmaa P. L., Ylioja T., Weissenberg K. and Pappinen A. (2008) Field performance of chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth): growth and adaptive traits. Trees **22**: 423-421.
- (12) Tiimonen H., Aronen T., Laakso T., Saranpää P., Chiang V., Ylioja T., Roininen H. and Häggman H. (2005) Does lignin modification affect feeding preference or growth performance of insect herbivores in transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth)? Planta **222**: 699-708
- (13) 津田吉晃 (2009) 分子マーカーを用いたカバノキ属の遺伝構造研究. 林木の育種 **230** : 1-6.
- (14) 津田吉晃・倉本恵生・毛利 武・吉田和正・松本麻子・津村義彦・竹田貴彦・幸田秀穂・井出雄二・篠原健司 (2009) 遺伝子組換えカンバの生物多様性影響評価に向けて—スカイバーチを用いた日本産カンバと外国産カンバの種間交雑性評価—. 北方林業 **61** : 108-111.
- (15) Tsuda Y., Ueno S., Ide Y. and Tsumura Y. (2009) Development of 14 EST-SSRs for *Betula maximowicziana* and their applicability to related species. Conserv. Genet. **10**: 661-664.
- (16) Tsuda Y., Sawada H., Ohsawa T., Nakao K., Nishikawa H. and Ide Y. (2009) Landscape genetic structure of *Betula maximowicziana* in the Chichibu mountain range, central Japan. Tree Genet. Genome. **10**.1007/s11295-009-0256-3.
- (17) Tsuda Y. and Ide Y. (2009) Chloroplast DNA phylogeography of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in Japan. J. Plant Res. DOI: 10.1007/s10265-009-0280-2..