熊本県産スギ在来品種「シャカイン」における流通苗木と採穂源のクローン分析

草野 僚一^{*1}・松永 孝治²・倉本 哲嗣²・白石 進³

スギさし木品種シャカインの苗木および採穂木のクローン分析を簡便な DNA マーカーである MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers) を用いて調べた。本品種の主要クローンであり、材質特性が類似する 3 クローンは単一の MuPS 型を示した。熊本県内の 3 苗木生産業者から購入した苗木を調べたところ、2 業者の苗木から複数の MuPS 型が検出された。また、3 生産業者の採穂源に植栽されている採穂木を調査したところ、すべての採穂源において複数の MuPS 型が検出された。今後、シャカイン材の品質均一性を維持するためには、採穂源におけるクローン管理の必要性が示された。

キーワード：スギ、クローン管理、MuPS、採穂源、さし木品種、シャカイン

Ryonichi Kusano,^{*1} Koji Matsunaga,² Noritsugu Kuramoto,² Susumu Shiraishi³ (2011) Clone Analysis of Rooted Cuttings and Scion Stools of Shakain, a Cutting Cultivar of *Cryptomeria japonica* in Kumamoto Prefecture. J Jpn For Soc 93: 244-247 Clone composition of commercial rooted cuttings and scion stools of Shakain, which is a cutting cultivar of *Cryptomeria japonica*, was investigated by MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers) assay. Three major clones of Shakain which are similar in wood properties were identified as the same MuPS type. Three cutting lots purchased in Kumamoto Prefecture were analyzed, and some MuPS types different from the major clones were identified in two of three lots. The MuPS analysis of the scion stools also revealed frequent clone contamination in three scion sources. Adequate management of clones for scion sources is essential to achieve the required uniformity of lumber quality in Shakain.

Key words: clone management, cutting cultivar, scion source, Shakain, MuPS

I. は じ め に

シャカインは、熊本県の主要なスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) さし木品種であり、主に熊本県中央部の美里町 (旧砥用町, 旧中央町) および八代市 (旧泉村) で広く造林されてきた。

本品種は、根元曲りや幹曲りがほとんどなく、樹幹断面が正円で、心材が鮮紅色、形状比が大きいなどの特徴を有することから (宮島 1989)、近年、県内各地で造林面積比率が急増している。1995 年時点での県内スギ造林地のうち、シャカインは約 17% を占めており (東 1995)、2008 年度の熊本県樹苗協同組合の調査では、熊本県産スギ造林用苗木の 76.7% (約 808 千本) がシャカインである。また、九州他県においても好んで造林されており、大分県では、日田地方の推奨品種の一つに指定されている (坂本 2008)。

シャカインは、複数のクローンで構成されるクローンコンプレックス品種であることが既に報告されており、これまでに 29 クローンが確認されている。このうちの出現頻度の高い 3 クローン (I, IV, V 型) は類似した材質特性を示す。このことから、品種の木材品質 (とりわけ均一性) を確保するためには、シャカインの構成クローンをこれら

3 クローンのみに誘導する必要があることが提案されている (草野ら 2006, 2009)。

近年、木材品質、さらにはこれを加工した製品の品質向上のために、さし木品種がもつ特性を生かして、より高度な林業経営戦略の展開を図ろうとする品質管理型林業が提案されている (藤澤 1995, 1999)。この実現のためには、厳正なクローン管理が要求される。特にクローンコンプレックス品種では、個々の構成クローンの特性を把握し、望まれる特性を備えたクローンに整理することが重要である。

一方で、熊本県のスギ造林用種苗は、在来品種のさし木苗が主体となっているため、林業種苗法 (林業種苗研究会 2007) で定められている指定採取源の利用割合が低く (林木育種センター 2007)、苗木生産者が造林地から採穂する事例が多い (草野 2009)。このため、実際の苗木生産現場において、どのようなクローンが採穂木として利用され、苗木が生産されているか不明である。そこで本研究では、複数の苗木生産者が生産したシャカイン苗木について、簡便なクローン鑑定法である MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers; 久枝ら 2003) を用いて構成クローンを調査した。また、あわせて複数の苗木生産者の採穂源 (採穂木) についても同様の調査を行った。

* 連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: kusano-r@pref.kumamoto.lg.jp

¹ 熊本県林業研究指導所 〒 860-0862 熊本市黒髪 8-222-2 (Kumamoto Prefecture Forestry Research Center, 8-222-2 Kurokami, Kumamoto 860-0862, Japan)

² 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター九州育種場 〒 861-1102 合志市須屋 2320-5 (Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 2320-5 Suya, Koshi 861-1102, Japan)

³ 九州大学農学研究院 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1 (Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

(2010 年 11 月 12 日受付; 2011 年 8 月 22 日受理)

表-1. シャカインの主要3クローンを含む7クローンのMuPS型

CAPS マーカーによる DNA タイプ*	CAPS マーカーバンドパターン	調査個体数	構成比率 (%)	MuPS 型	同一の MuPS 型をもつ在来品種あるいは精英樹
I	ABBBAAABBBAB	3	45.0	001000-1010010-010110	県下益城 1 号
IV	ABBBAAABABAB	3	8.2		
V	AABBBAAABBBAB	3	34.5		
III	ABBBAAABBBAA	1	2.3	001010-0000010-010110	該当なし
VI	BBBBAAABBBAB	1	1.4	100000-1010001-010011	該当なし
VII	BBABBBAAABAA	1	0.9	199001-1000011-110011	該当なし
XI	ABBBAAABBBBB	1	0.9	101000-1010001-010011	該当なし
XII	AABBBAAABABAB	1	1.4	100000-1000000-100000	該当なし
XXVIII	ABABABBBABAB	1	0.9	001110-1000110-010110	該当なし

*草野ら（2009）による CAPS マーカーによる DNA タイプとその出現数の比率。

II. 材料と方法

1. 供試材料

苗木と採穂木の MuPS 型を調べるにあたり、草野ら（2006, 2009）が一つのクローン群として扱えるとした主要な3クローン（CAPS（Cleaved Amplified Polymorphic Sequence）マーカーにより識別された I, IV, V 型）およびそれ以外の6クローンの MuPS 型を調査した。主要3クローン以外の6クローンは、草野ら（2009）の報告で、出現頻度が約1~2%と低いが、他の少数派クローン（0.5%）に比べれば頻度（0.9~2.3%）は高い（表-1）。

採穂木については、山都町（旧清和村）、錦町および水上村の3箇所の苗木生産者所有の採穂源からシャカインの外見的特徴を有する個体をそれぞれ62, 26, 44個体、合計132個体を選び調査した。このうち、山都町の採穂源は、台木仕立てをして、採穂園として整備されている。一方、錦町、水上村の採穂源は一般造林地（採穂林）の造林木を採穂木として使用していた。苗木については、2007年に熊本県の山都町（旧清和村）、錦町および天草市（旧本渡市）の苗木生産者からそれぞれ27, 24, 33個体、合計84個体を購入し、調査した。

これらの苗木は、通常熊本県で行われているように、前年4月にさし付け、翌年3月に出荷された2年生（満1年生）苗である。山都町の苗木は、山都町の採穂園から採穂されたものであり、錦町の苗木は錦町および水上村の採穂林から採穂されたものである。

なお、購入苗木について、熊本県林業研究指導所職員と熊本県樹苗協同組合職員により、針葉形態や樹皮形態の特徴（宮島1989）に基づいた品種確認を行った。また、採穂木についても同様に品種確認した。これらはいずれも宮島（1989）が述べているシャカインの外見的特徴を備えていた。

2. MuPS 分析

これまで CAPS 型が報告されている主要3クローンとそれ以外の6クローンの MuPS 分析には、草野ら（2009）と同一のゲノミック DNA を鋳型 DNA として用いた。苗木と採穂木については、Plant Genomic DNA mini（VIOGENE 社）により全 DNA を抽出して鋳型 DNA とした。MuPS 分析は久枝ら（2003）の方法に従った。なお、プライマー

は市販品（MuPS Primer Mix Set, 林木育種協会）の3セットを使用した。PCR 増幅後、2.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、UV トランスイルミネーターでバンドを検出し、MuPS 型を決定した。なお、MuPS 型の判定は、久枝ら（2003）に従い、各フラグメント（バンド）が明瞭に検出されたものを1、フラグメントが検出されなかったものを0、フラグメントが不明瞭なものを9として標記した。

III. 結 果

1. シャカイン主要3クローンの MuPS 型

シャカインの主要3クローンの、I, IV, V 型はいずれも同じ MuPS 型を示した。この MuPS 型は久枝ら（2003）の報告にある精英樹「県下益城1号」と同じであった（表-1, 以下主要型）。県下益城1号は、シャカインの中から選抜された精英樹であり、草野ら（2006）の報告でも最も構成比率が高いクローンである。一方、CAPS マーカーで確認された六つの少数派クローン（III, VI, VII, XI, XII, XXVIII 型）は、すべて異なる MuPS 型を示した（表-1）。

2. シャカイン苗木と採穂木のクローン構成

今回供試した苗木のうち、84個体中91.6%（77個体）が主要型と同様のバンドパターンを示した。また、その他の8.4%（7個体）は四つの異なる MuPS 型（苗木2, 3, 4, 5型）を示した。これまでにこれらの MuPS 型は九州産スギ在来品種および精英樹では確認されていない（久枝ら2003）。生産者別でみると、山都町の生産者の苗木において主要型以外の MuPS 型個体の出現率が18.5%（27個体中5個体）と最も高かった（表-2）。

また、採穂木では、13種類の MuPS 型が出現し、132個体中58.3%（77個体）が主要型と同じ MuPS 型を示した。残りの採穂木（55個体）は12種類の MuPS 型を示したが、その中には久枝ら（2003）の報告でヒタアカスギとされた MuPS 型（採穂木7型）をもつ個体が2.2%（3個体）含まれていた。山都町と錦町の採穂木における主要型の割合はそれぞれ48.4%と50.0%とわずか半数にとどまった。一方、水上村の採穂木は主要型の比率が高く、77.3%を占めた（表-3）。今回調査した苗木と採穂木の MuPS 型に関して、主要型以外は、苗木と採穂木の間で共通する MuPS 型はなかった。

表-2. シャカイン苗木において出現した MuPS 型とその構成比率

MuPS による DNA タイプ	MuPS 型	構成比率 (%)	構成比率 (出現数)		
			山都町	錦町	天草市
主要型	001000 1010010 010110*	91.6 (77)	81.5 (22)	100 (24)	94.0 (31)
苗木 2 型	001000 1010010 011011	3.5 (3)	11.1 (3)	—	—
苗木 3 型	001000 1010010 000000	2.5 (2)	3.7 (1)	—	3.0 (1)
苗木 4 型	001000 1010010 019110	1.2 (1)	3.7 (1)	—	—
苗木 5 型	001000 0000000 010110	1.2 (1)	—	—	3.0 (1)
合計		100 (84)	31.1 (27)	28.6 (24)	39.3 (33)

*久枝ら (2003) の県下益城 1 号と同一の MuPS 型。

表-3. シャカイン採穂母樹において出現した MuPS 型とその構成比率

MuPS による DNA タイプ	MuPS 型	全体比率 (個体数)	地域別出現率 (個体数)		
			山都町	錦町	水上村
主要型	001000 1010010 010110*	58.3 (77)	48.4 (30)	50.0 (13)	77.3 (34)
採穂木 2 型	001000 0000010 010110	12.1 (16)	25.8 (16)	—	—
採穂木 3 型	001000 1010010 000110	10.6 (14)	3.3 (2)	23.1 (6)	13.7 (6)
採穂木 4 型	001000 0010010 000110	6.0 (8)	—	23.1 (6)	4.5 (2)
採穂木 5 型	001000 0000010 010111	3.0 (4)	6.5 (4)	—	—
採穂木 6 型	001000 0000010 000110	2.2 (3)	4.8 (3)	—	—
採穂木 7 型	009100 1010101 010110**	2.2 (3)	4.8 (3)	—	—
採穂木 8 型	001000 1010000 010110	1.6 (2)	—	—	4.5 (2)
採穂木 9 型	001000 1010010 110110	0.8 (1)	—	3.8 (1)	—
採穂木 10 型	001000 0000010 000100	0.8 (1)	1.6 (1)	—	—
採穂木 11 型	001000 1011001 010110	0.8 (1)	1.6 (1)	—	—
採穂木 12 型	011000 1000010 010110	0.8 (1)	1.6 (1)	—	—
採穂木 13 型	011000 1000010 010010	0.8 (1)	1.6 (1)	—	—
計		100 (132)	47.0 (62)	19.7 (26)	33.3 (44)

*久枝ら (2003) の県下益城 1 号と同一 MuPS 型。 **久枝ら (2003) のヒタアカスギと同一 MuPS 型。

IV. 考 察

1. シャカイン主要 3 クローンの MuPS 型

これまでのシャカインのクローン分析には、CAPS マーカーが使用されてきた(草野ら 2006, 2009)。CPAS マーカーは共優性マーカーで、正確なクローン判別ができるなど利点も多いが、PCR 後に制限酵素処理を行う必要があり、さらに一度の PCR で 1 遺伝子座 (マーカー) の情報しか得られず、多検体のクローン識別を行う場合には、やや煩雑な方法である。そこで今回は、PCR とアガロースゲル電気泳動のみで簡便に分析でき、一度に複数 (6 個) の遺伝子座の情報が得られ、分析効率が高いとされる MuPS (久枝ら 2003) を用いて分析を行った。このスギ用 MuPS 分析系は 3 セットからなり、各セットは 6 個の SCAR マーカーで構成されている。PCR により増幅されるバンドの有無により、各サンプルの MuPS 型 (DNA 型) を 19 桁の 1/0 データとして表記できる。これまでに九州産スギ在来品種と精英樹の MuPS 型が調査され、データベースが整備されている (久枝ら 2003)。また、熊本県のさし木在来品種アヤスギではクローン構成比の推定に用いられる (草野 2007) など、九州のスギ在来品種鑑定法として定着している。

今回、草野ら (2006, 2009) が CAPS マーカーを用いて確認したシャカインの主要 3 クローンは同じ MuPS 型 (主要型) を示した。これら 3 クローンは精英樹県下益城 1 号と同一または 6 遺伝子座のうちの 1 座の遺伝子型が違

うのみである (草野ら 2006) ことから、シャカインのクローン群の中で、高い近縁関係にある可能性がある。一方、CAPS マーカーで確認された少数派の 6 クローンは、MuPS 分析でも異なるクローンと判定された (表-1)。この結果は、MuPS 分析によって造林地で比較的構成割合が高い (主要 3 クローン以外の) 6 クローンをこれまでより容易に検出できることを示す。シャカインのクローン管理の初期段階において MuPS 分析は有効な手法であると考えられた。

2. シャカイン苗木と採穂木のクローン構成

これまでにシャカインの造林地において造林木が主要 3 クローン以外を含む複数のクローンで構成されていることが報告されているが (草野ら 2006, 2009), 本研究はシャカインの流通苗木および採穂源においても主要 3 クローン以外の複数のクローンが存在することを明らかにした。今回調査したシャカイン苗木の 9 割以上が主要型の MuPS 型を示した。しかしながら、一部の苗木は主要型とは異なる MuPS 型を示した。採穂木では、主要型と同じ MuPS 型の占める比率は全体の 58.3% で、それ以外の MuPS 型の占める比率は 41.7% に達し、主要型の占める比率が苗木の場合と比較して低かった。天草市の生産者から購入した苗木については、採穂源の MuPS 型を調査していない。他の 2 カ所 (山都町および錦町) の業者から購入した苗木とその採穂源の MuPS 型の構成比が大きく異なる原因として、本研究で MuPS 型を調査した苗木の生産のための穂木が採穂源内の採穂木から均一に採取されず、特定の採穂木から偏って採穂された可能性がある。また、苗木生産業者が出荷時に無意識にまたは意識的に外観がシャカインと大きく異なる個体を排除している可能性も考えられる。

今回のすべての調査地 (山都町、錦町および水上村) の採穂木において主要型以外の MuPS 型が確認された。この結果はこれらの地域において生産される苗木には、材質特性において類似性が確認されている主要型以外のクローンが混入する可能性を示している。実際に、苗木の調査においても、山都町と天草市で主要型以外のクローンが確認された。今回は、苗木に占める主要型以外のクローンの比率は低かったが、採穂木に主要型以外が混入している比率が高いことから、実際には、多くの生産される苗木について、主要型以外の混入が発生していることが考えられる。さらには、前述のように、熊本県で一般造林地が採穂源 (採穂林) として多く使用されていることから、そのような苗木が植栽された造林地が、将来採穂源として使用された場合、シャカイン内部のクローン混入がさらに進むことが考えられる。このような場合、生産されるシャカイン材の品質均一性は低下するだろう。この結果を受け、熊本県では現在、行政と苗木生産者団体、および試験研究機関 (熊本県林業研究指導所) が協力し、熊本県内の主要な生産者が使用している採穂木について、全個体のクローン鑑定を実施しており、この取り組みを通じ、クローン管理の徹底を進

めている。今後、シャカインを用いたクローン林業においては、主要型を中心とした苗木生産、木材生産が実現できるものと考ええる。

本研究を行うにあたり多大なご協力をいただきました林木育種センター九州育種場の大平峰子博士、熊本県林業研究指導所の江上憲二所長、吉田正信前所長、馬把正美育林環境部長、緒方久美子氏、橋本佳明氏、高田琢也氏、熊本県農業研究センターの田中裕次郎氏および調査地の選定にご尽力いただきました熊本県樹苗協同組合の藤川繁留理事長、松川憲生参事、山口近雄氏、(有)石松樹苗園の皆様に厚く感謝申し上げます。

引用文献

- 藤澤義武 (1995) スギ品質管理型林業に適した材質育種. 林木の育種特別号: 53-56
- 藤澤義武 (1999) スギの品種と材質特性について. 林経協月報 450: 2-25
- 東 正彦 (1995) 熊本県における主なスギ在来品種の強度特性. 林木の育種特別号: 42-47
- 久枝和彦・白石 進・藤澤義武・宮原文彦・石松 誠・家入龍二・佐々木義則・三樹陽一郎・川内博文 (2003) 九州産スギ在来品種および精英樹の MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers) 型. 九大演報 84: 59-71
- 草野僚一・家入龍二・松本麻子・森口喜成・津村義彦 (2006) CAPS マーカーによるスギさし木品種シャカインのクローン識別. 日林誌 88: 169-173
- 草野僚一 (2007) MuPS によるスギさし木在来品種アヤスギのクローン構成比の推定. 九州森林研究 60: 118-120
- 草野僚一 (2009) さし木在来品種の分類と特性評価に関する研究. 熊本県林業研究指導所研究報告 35: 1-20
- 草野僚一・松永孝治・森口喜成・白石 進 (2009) スギさし木品種シャカインを構成するクローンの特性. 日林誌 91: 259-265
- 宮島 寛 (1989) 九州のスギとヒノキ. 九州大学出版会
- 林木育種センター (2007) 育種種苗の生産と普及の現況 (平成 17 年度). (林木育種の実施状況および統計 (H17). 林木育種センター編, 林木育種センター) 53-77
- 林業種苗研究会 (2007) 林業種苗法 (講習会テキスト 林業種苗の生産・配布に必要な知識. 林業種苗研究会編. 全国山林種苗協同組合連合会) 192-209
- 坂本修一 (2008) 品質管理型林業に向けたスギ推奨品種に関する実践的研究. 大分県農林水産研究センター林業試験場年報 50: 28