九州における主要なスギ在来品種のクローン識別および遺伝的類似性の評価

松井由佳里^{*1}・家入龍二²・森口喜成^{3,4}・松本麻子³・高橋 誠^{5,6}・津村義彦³

近年、DNA 分析により、九州地方のスギ在来品種は一つの品種が複数のクローンで構成されていることが明らかとなったが、在来品種間や在来品種内-遺伝子型間の遺伝的な類似性に関する研究は未だ行われていない。そこで、九州の主要な挿し木品種を対象に、マイクロサテライト (SSR) マーカーを用いたクローン識別および遺伝的類似性の評価を行った。9 遺伝子座の核 SSR マーカーを使用したクローン識別の結果、19 品種 (279 個体) のスギは 26 の遺伝子型に分類された。メアサ、アヤスギ、ヤブクグリ、オビアカは複数の遺伝子型で構成されており、それぞれ主なクローンが存在した。また、固有の遺伝子型を持たず他の品種と同じ遺伝子型を持っていたものがあった。遺伝的類似性については、19 の遺伝子型で、33 遺伝子座の SSR マーカー (9 個の核 SSR, 24 個の EST-SSR) を用いて評価した。その結果、九州の挿し木品種は比較的幅広い遺伝的変異を持っており、挿し木品種内-遺伝子型間には、比較的類似した遺伝変異を保有している傾向が明らかとなった。

キーワード：遺伝距離、挿し木品種、精英樹、マイクロサテライトマーカー、DNA

Yukari Matsui,^{*1} Ryuji Ieiri,² Yoshinari Moriguchi,^{3,4} Asako Matsumoto,³ Makoto Takahashi,^{5,6} Yoshihiko Tsumura³ (2013) Clone Identification of Major Cutting Cultivars in *Cryptomeria japonica* D. Don and Evaluation of their Genetic Relationship in Kyushu. J Jpn For Soc 95: 220–226 The cutting cultivars of *Cryptomeria japonica* in the Kyushu district usually consist of several different clones according to many recent reports using DNA markers. However, the genetic relationship between the cutting cultivars and genotypes within each cutting cultivar has not been studied well. Therefore, we examined clone identification and investigated the genetic relationship for major cutting cultivars in *C. japonica* planted in Kumamoto Prefecture Forestry Research Center using SSR markers. Clone identification using nine genomic SSRs showed that 279 individuals, representing 19 cutting cultivars, were classified into 26 genotypes. The cutting cultivars such as Measa, Ayasugi, Yabukuguri and Obiaka were clone-complex cultivars of major clones. In addition, we found the same genotypes with different cultivar names, which were presumably derived from misclassification. After excluding such suspected individuals, 19 genotypes were analyzed using 33 SSR markers (the previous nine genomic SSRs and an additional 24 EST-SSRs) to investigate their genetic relationship. Our results showed that the cutting cultivars in the Kyushu region have relatively large genetic variations and suggested multiple origins of their cultivars.

Key words: cutting cultivar, DNA, genetic distance, microsatellite marker, plus tree

I. は じ め に

九州地方では、古くから挿し木によるスギの造林が行われてきたため、多くの挿し木在来品種が存在している。これらの中には、九州地方の林分に生育していた個体が選抜されて現在に至った品種や、吉野など九州以外の地域から移入された実生スギから選抜・育成された品種があるとされている (宮島 1989)。

挿し木品種の呼称は地方や時代によって様々で、同一品種が複数の名称で呼ばれたり (異名同種)、異なる品種が同一の名称で呼ばれる (同名異種) ことがあり、混乱の原因となっている (宮島 1989)。これまで、挿し木品種の分

類には、針葉や枝条、樹皮、樹幹の形態的特徴、挿し木発根性、着花性、成長型などの造林上の特徴が用いられてきた (宮島 1989)。しかし、植栽環境や樹齢によって表現型に変異がみられることから、正確な品種の識別・分類は極めて困難である。そのため、アイソザイムマーカー (奥泉・大庭 1990)、RAPD マーカー (高田・白石 1996; 後藤ら 1999; 家入 2003; 小山 2006)、CAPS マーカー (草野ら 2006)、MuPS マーカー (久枝 2003; 草野 2007) による分析によって挿し木品種の分類が行われてきた。その結果、挿し木品種の中には複数のクローン (遺伝子型) で構成されるものがあることが明らかにされたが、品種内のクローン数の推定は適切な造林品種を推奨していく上で非常に重

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

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

² 熊本県森林保全課 〒862-8570 熊本市中央区水前寺 6-18-1 (Kumamoto Prefecture Government, Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Forestry Conservation Division, 6-18-1 Suizenji, Kumamoto 862-8570, Japan)

³ 独立行政法人森林総合研究所 〒305-8687 つくば市松の里 1 (Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba 305-8687, Japan)

⁴ 現在: 新潟大学大学院自然科学研究科 〒950-2181 新潟市西区五十嵐二の町 8050 (Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050 Igarashi 2-Nocho, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan)

⁵ 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 熊本県合志市須屋 2320-5 (Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 2320-5 Suya, Koshi, Kumamoto 861-1102, Japan)

⁶ 現在: 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター 〒319-1301 日立市十王町伊師 3809-1 (Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi 319-1301, Japan) (2012 年 7 月 5 日受付, 2013 年 6 月 13 日受理)

要である。また、九州地方では、挿し木品種の中から複数の精英樹が選抜されていることから、アイソザイムマーカー、RAPD マーカー、MuPS マーカーで精英樹と挿し木品種との遺伝的関係の解明も行われてきた（奥泉・大庭 1990；後藤ら 1999；久枝 2003；小山 2006）。これが解明されれば、単に同一クローンが別クローンとして利用される危険性を避けるだけでなく、挿し木品種として蓄積された知見の精英樹への活用や、精英樹採穂園からの挿し木品種の採穂などに役立つ。そして、今後人工交配によって新たな特性を持った品種を作出する上でも、これらの育種母材の DNA マーカーによる品種分類は不可欠である。

近年、クローン識別や親子解析にはマイクロサテライト（別名 SSR；Simple Sequence Repeats）マーカーが用いられてきた。スギでは、核 DNA ライブラリーから SSR 領域を探索してマーカー化された核マイクロサテライトマーカー（以下、核 SSR マーカー）と発現遺伝子（別名 EST；expressed sequence tag）の塩基配列情報からマーカー化された EST-SSR マーカーがすでに多数開発されている（Moriguchi *et al.* 2003, 2009；Tani *et al.* 2004；Ueno *et al.* 2012）。これらのマーカーは、多型性・再現性の高い共優性マーカーで、識別能力が高い。そのため、スギのクローン識別だけでなく、育種母材の整理や今後の人工交配の交配組み合わせを検討する際の基礎情報となる育種母材間の遺伝的類似性の評価に効果的に利用できる。本研究では、九州で造林に用いられている主要なスギ挿し木品種をマイクロサテライトマーカーで分析し、九州におけるスギの挿し木品種と精英樹との関係、挿し木品種間および挿し木品種内遺伝子型間の遺伝的類似性を明らかにすることを目的とした。

II. 材料と方法

1. 試料の採取

供試した材料は、熊本県林業研究指導所の菊陽苗畑（菊池郡菊陽町原水）に設定されたスギ遺伝子保存林に植栽されているスギ挿し木品種 19 品種 279 個体である（表-1）。これらは、林木育種センター九州育種場に集植されているスギ精英樹および、熊本県内各地の人工林から採穂し挿し木で増殖したもので、1 クローン当り 1～5 本で列状に植栽されている。

2. DNA の抽出とクローン識別

DNA の抽出は、針葉約 0.1 g から DNeasy Plant Mini Kits (Qiagen) を使用して行った。

本研究では、9 遺伝子座の核 SSR マーカーを遺伝子保存林のクローン識別に使用した（表-2；Moriguchi *et al.* 2003；Tani *et al.* 2004）。PCR 増幅は、各 Primer 0.4～10 μ M、2× Multiplex PCR master mix (Qiagen)、5 ng の鋳型 DNA を含む 10 μ L の反応系で 95°C 15 分のあと、94°C 30 秒・60～62°C 1 分 30 秒・72°C 1 分を 35 サイクル、60°C 30 分というプログラムで Gene Amp PCR System Model 9700 (Applied Biosystem 社製) を使用して行った。核 SSR マーカーの

表-1. 熊本県林業指導所のスギ遺伝子保存林に植栽されているスギ挿し木品種

品種名 (ラベル記載)	植栽 本数	採取源 (本数)			精英樹名
		判明		不明	
		精英樹	精英樹以外		
アカエド	5	0	2	0	—
アカバ	4	2	0	0	県甘木 4, 福岡署 2
アヤスギ	67	5	31	0	県浮羽 8, 県藤津 14, 県白杵 12, 県阿蘇 5, 県阿蘇 1
イワオスギ	4	1	0	0	県佐賀 3
オビアカ	48	12	0	0	県肥前 1, 県日南 4, 県日南 7, 県東白杵 11, 都城署 5, 県始良 3, 県始良 4, 県佐伯 9, 県日南 2, 県日置 2, 県東白杵 13, 宮崎署 4
カワシマ	5	1	1	0	県球磨 11
クモトオシ	7	0	0	7	—
クロエド	6	0	3	0	—
ゲンベエ	7	1	0	0	県日南 1
シチゾウ	2	1	0	0	県八女 9
シャカイン	12	1	1	4	県下益城 1
タノアカ	4	0	0	4	—
トサアカ	3	1	0	0	県東白杵 12
ヒキ	6	2	0	0	県西白杵 3, 県始良 12
ホンスギ	7	1	0	3	県唐津 6
メアサ	51	13	11	0	県始良 25, 県始良 26, 県始良 30, 県薩摩 17, 県竹田 15, 県竹田 5, 都城署 3, 県肝属 7, 県肝属 9, 川内署 1, 県日置 1, 県始良 35, 県薩摩 11
ヤクノシマ	4	0	1	0	—
ヤブクグリ	30	10	0	0	県阿蘇 2, 県浮羽 4, 県玖珠 1, 県玖珠 12, 県玖珠 2, 県竹田 3, 県竹田 4, 県竹田 9, 県四日市 3, 県竹田 11,
リュウノヒゲ	7	1	1	0	県菊池 3
計	279	52	51	18	

表-2. スギ挿し木品種のクローン識別に使用した核マイクロサテライトマーカーの概要

マーカー名	モチーフ	対立遺伝子数	PI	引用文献
Cjgssr121	(CT) ₂₅	22	0.020	Moriguchi <i>et al.</i> (2003)
Cjgssr175	(CT) ₁₆	14	0.039	Moriguchi <i>et al.</i> (2003)
Cjgssr78	(GA) ₂₁	11	0.065	Moriguchi <i>et al.</i> (2003)
CJS0333	(GA) ₂₆	19	0.033	Tani <i>et al.</i> (2004)
CS1219	(GT) ₁₀	5	0.187	Tani <i>et al.</i> (2004)
CS1281	(CT) ₁₅	16	0.034	Tani <i>et al.</i> (2004)
CS1525	(CA) ₁₈	14	0.035	Tani <i>et al.</i> (2004)
CS1579	(TG) ₁₁	7	0.088	Tani <i>et al.</i> (2004)
CS2245	(GA) ₉	5	0.316	Tani <i>et al.</i> (2004)

遺伝子型の決定には、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem 社製) を使用した。

本研究で使用した各核 SSR マーカーのクローン識別能力の指標として Probability of identity (PI) を用い、数値の算出には GenAlex ver. 6.2 (Peakall and Smouse 2006) を用いた。クローン識別では、核 SSR マーカーの解析で得られた各個体の 9 遺伝子座に由来する 18 の対立遺伝子がすべて一致したペアは同一クローンとした。ただし、一つの対立遺伝子のみが 2 bp 以下の違いで異なったペアに関しては、突然変異の可能性も考慮して本研究では同一クローンとみなした。また、過去の研究で誤植が問題化されているため（川内・後藤 1999；森口ら 2005）、サンプル採

表-3. 9 座の核マイクロサテライトマーカーで検出された遺伝子型

主座標分析および 遺伝的血縁度 の対象	遺伝子型名	植栽 本数	ラベルに記載されていた 挿し木品種名 (本数)	採取源 (本数)			精英樹名 (ラベルに記載されていた挿し木品種名)
				判明		不明	
				精英樹	精英樹以外		
○	アカエド アヤスギ-1	5 62	アカエド(5) アヤスギ(58), ヤクノシマ(4)	0 4	2 31	0 0	— 県藤津 14 (アヤスギ), 県臼杵 12 (アヤスギ), 県阿蘇 5 (アヤスギ), 県阿蘇 1 (アヤスギ)
○	アヤスギ-2	17	アカバ(4), アヤスギ(9), ホンスギ(4)	4	1	0	県浮羽 8 (アヤスギ), 県甘木 4 (アカバ), 福岡署 2 (アカバ) 県唐津 6 (ホンスギ)
○	イワオスギ	4	イワオスギ(4)	1	0	0	県佐賀 3 (イワオスギ)*
○	オビアカ-1	31	オビアカ(24), ゲンベエ(7)	6	0	0	飯肥署 1 (オビアカ), 県日南 4 (オビアカ), 県日南 7 (オビアカ), 県 東臼杵 11 (オビアカ), 都城署 5 (オビアカ), 県日南 1 (ゲンベエ)
○	オビアカ-2	11	オビアカ(11)	3	0	0	県始良 3 (オビアカ), 県始良 4 (オビアカ), 県佐伯 9 (オビアカ)
○	オビアカ-3	2	オビアカ(2)	1	0	0	県日南 2 (オビアカ)*
○	オビアカ-4	3	オビアカ(3)	1	0	0	県日置 2 (オビアカ)*
○	オビアカ-5	4	オビアカ(4)	1	0	0	県東臼杵 13 (オビアカ)*
○	オビアカ-6	4	オビアカ(4)	1	0	0	宮崎署 4 (オビアカ)*
○	カワシマ	5	カワシマ(5)	1	1	0	県球磨 11 (カワシマ)
	クモトオシ	7	クモトオシ(7)	0	0	7	—
	クロエド-1	3	クロエド(3)	0	2	0	—
	クロエド-2	3	クロエド(3)	0	1	0	—
○	シチゾウ	2	シチゾウ(2)	1	0	0	県八女 9 (シチゾウ)*
○	シャカイン	12	シャカイン(12)	1	1	4	県下益城 1 (シャカイン)
	タノアカ	4	タノアカ(4)	0	0	4	—
○	トサアカ	3	トサアカ(3)	1	0	0	県東臼杵 12 (トサアカ)*
	ホンスギ	3	ホンスギ(3)	0	0	3	—
○	メアサ-1	36	メアサ(34), ヒキ(2)	8	10	0	県始良 25 (メアサ), 県始良 26 (メアサ), 県始良 30 (メアサ), 県薩 摩 17 (メアサ), 県竹田 15 (メアサ), 県竹田 5 (メアサ), 都城署 3 (メ アサ), 県西臼杵 3 (ヒキ)
○	メアサ-2	9	メアサ(9)	3	0	0	県肝属 7 (メアサ), 県肝属 9 (メアサ), 川内署 1 (メアサ)
○	メアサ-3	2	メアサ(2)	1	0	0	県薩摩 11 (メアサ)*
	メアサ-4	1	メアサ(1)	0	1	0	—
○	ヤブクグリ-1	37	ヤブクグリ(28), メアサ(5), ヒキ(4)	12	0	0	県阿蘇 2 (ヤブクグリ), 県浮羽 4 (ヤブクグリ), 県玖珠 1 (ヤブクグ リ), 県玖珠 12 (ヤブクグリ), 県玖珠 2 (ヤブクグリ), 県竹田 3 (ヤ ブクグリ), 県竹田 4 (ヤブクグリ), 県竹田 9 (ヤブクグリ), 県四日 市 3 (ヤブクグリ), 県始良 35 (メアサ), 県日置 1 (メアサ), 県始良 12 (ヒキ)
○	ヤブクグリ-2	2	ヤブクグリ(2)	1	0	0	県竹田 11 (ヤブクグリ)*
○	リュウノヒゲ	7	リュウノヒゲ(7)	1	1	0	県菊池 3 (リュウノヒゲ)
合計		279		52	51	18	

* 林木育種センター九州育種場が所有する精英樹と遺伝子型を比較した 9 個体の精英樹 (材料と方法参照)。

取箇所 (採取源) が 1 カ所の 9 精英樹については, 林木育種センター九州育種場 (以下, 九州育種場) が所有する精英樹と遺伝子型を比較して誤りがないことを確認した (表-3)。

3. 遺伝子型名の決定

9 座の核 SSR マーカーの遺伝子型情報に基づいて, 279 個体を遺伝子型名別に整理した (表-3)。同一クローンには同じ遺伝子型名をつけて, 遺伝子型名は基本的にその品種名とした。同じ品種でも遺伝子型が異なる場合は, その品種名に枝番号を付した遺伝子型名とした。逆に, 異なる品種でも遺伝子型が一致した場合は, その中で最も個体数の多かった品種名を遺伝子型名とした。

4. 遺伝的類似性の評価

本研究では, 今後人工交配の組合せを検討するために必要となる基礎情報を得るため, 育種母材の遺伝的類似性を評価した。

解析に用いた 279 個体は, 9 座の核 SSR マーカーによって 26 の遺伝子型に分類された (表-3)。このうちサンプル

表-4. 比較のために追加した九州外の精英樹 6 サンプル

精英樹名	個体数	所在地
中 4 号	1	神奈川県秦野市大字寺山字船山 1311
珠洲 2 号	1	石川県珠洲市宝立町柏原 116 の 11
中頸城 4 号	1	新潟県中頸城郡柿崎町大字雁海字大天上 949
東頸城 4 号	1	新潟県東頸城郡松代町大字犬伏字柿木平 2789
由利 10 号	1	秋田県由利郡東由利村大字館合字滝ノ沢 61
青森 2 号	1	青森県青森市内真部字山下 82

に精英樹を含まない 7 の遺伝子型は, 採取したサンプルが確かにその品種であることを客観的に判断する方法がないため, 遺伝的類似性の解析から除外した。また, 九州の主要挿し木品種の遺伝的類似性を評価するため, 九州以外から選抜された精英樹 6 個体 (表-4) を追加した。

各遺伝子型間の遺伝的類似性の評価は, 上記の 9 遺伝子座の核 SSR マーカーに, 24 遺伝子座の EST-SSR マーカー (Moriguchi *et al.* 2009; Ueno *et al.* 2012) を追加し (表-5), 合計 33 遺伝子座で行った。遺伝的類似性を表す指標として, 対立遺伝子頻度から集団間の遺伝距離 (shared allele distance (DAS); Chakraborty and Jin 1993) を計算

表-5. 主座標分析の際に加えた EST-SSR マーカーの概要

マーカー名	モチーフ	対立遺伝子数	引用文献
BJ939325	(GCA) ₄	2	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BP175537	(CGA) ₅	2	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BW993777	(TA) ₇	2	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BY883611	(AG) ₆	2	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BY883996	(CCA) ₃ (GC) ₃	3	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BY896143	(TA) ₄ catc(TA) ₄	2	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BY899142	(TC) ₂₀ (AC) ₈	6	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BY910397	(TA) ₆	3	Moriguchi <i>et al.</i> (2009)
BW993010	(GCC) ₃ CAGATT(TCT) ₈	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
CC1194F	(TGA) ₃ GGTCGCCACTGCTATCCTCAA(GAA) ₄	4	Ueno <i>et al.</i> (2012)
CC2791F	(TC) ₃ TGGCCACGGGTC(CGG) ₅	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
CC3416R	(GAA) ₅	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
CLFL016_K16_f	(TC) ₈ (TA) ₃ TTTTTTAGCTAAT(TGT) ₃	11	Ueno <i>et al.</i> (2012)
CP10755R	(TGGAGG) ₃ (GGA) ₆	3	Ueno <i>et al.</i> (2012)
GJG3JC001EJ99E	(TA) ₇	3	Ueno <i>et al.</i> (2012)
GJG3JC002F5IHM	(CTT) ₇	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
GJG3JC002GO77S	(TA) ₅ TG(TA) ₅	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
GJG3JC002I1JVA	(AC) ₇ (TC) ₆	5	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_c18926	(GAT) ₆ TGTGTCGAATTCGATGATGATGACGACGACGATGATGATGATTGTGTCATCGAATTC(GAT) ₉	6	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_c43410	(TCT) ₄	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_c47387	(TCG) ₅	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_c49514	(ACC) ₅	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_c70698	(TG) ₅ CGTGTGCGTGCA(TG) ₆	2	Ueno <i>et al.</i> (2012)
HS4_rep_c17715	(ATG) ₇ (ATA) ₈	4	Ueno <i>et al.</i> (2012)

図-1. 挿し木品種メアサ、アヤスギ、ヤブクグリ、オビアカの遺伝子型構成比 (%)

採取源数に基づいて作成した。メアサ-1型にはヒキ（一部）、アヤスギ-1型にはヤクノシマ、アヤスギ-2型にはアカバとホンスギ（一部）、ヤブクグリ-1型にはメアサとヒキ（一部）、オビアカ-1型にはゲンベエも含めた。

し、得られた DAS 遺伝距離に基づいて主座標分析(Principal Coordinates Analysis; PCO)を行った。DAS 遺伝距離の計算は Populations ver. 1.2.30beta (Langella 2007) を用い、主座標分析は GenAlex ver.6.2 (Peakall and Smouse 2006) を用いた。

さらに、各遺伝子型の遺伝的血縁度の最尤推定値 (r ; Blouin 2003) を ML-Relate ver. 090408 (Kalinowski *et al.* 2006) を用いて算出した。この値は、クローン間では 1、親子間や全兄弟間では 0.5、半兄弟間では 0.25 となる。

III. 結 果

1. 挿し木品種および精英樹のクローン識別

本研究で使用了 9 遺伝子座の核 SSR マーカーの概要を

表-2 に示す。各マーカーの PI は 0.020 から 0.316 で、すべての遺伝子座を用いた場合の PI は 0.0001 未満であった。

本研究に供試した 279 個体のスギは 26 の遺伝子型に分類された (表-3)。挿し木品種メアサ、アヤスギ、ヤブクグリ、オビアカは複数の遺伝子型に分類され、最も多い遺伝子型はそれぞれ 79.2, 87.5, 92.3, 46.2% を占めた (図-1)。オビアカは他の 3 品種に比べて、構成クローン数が多く、最も頻度の高い遺伝子型であっても割合は 50% を下回った。

固有の遺伝子型に分類できなかったのはヤクノシマ 4 個体、アカバ 4 個体、ゲンベエ 7 個体、ヒキ 6 個体の合計 21 個体であった。ラベルにヤクノシマと記載されていた 4 個体は、すべてアヤスギ-1 型と同じ遺伝子型を示した。同様に、アカバと記載されていた県甘木 4 および福岡署 2 はアヤスギ-2 型に、ゲンベエと記載されていた県日南 1 はオビアカ-1 型に分類された。ヒキと記載されていた県西臼杵 3 はメアサ-1 型に、県始良 12 はヤブクグリ-1 型と、ヒキ以外の二つの遺伝子型に分類された。一方、品種固有の遺伝子型があるにもかかわらず別品種の遺伝子型に分類された個体は、ホンスギ (県唐津 6) 4 個体、メアサ (県始良 35, 県日置 1) 5 個体の合計 9 個体であった。ホンスギと記載されていた県唐津 6 は、ホンスギの遺伝子型に分類されたものとは異なり、アヤスギ-2 型と同じ遺伝子型を示した。メアサと記載されていた県始良 35 および県日置 1 は、メアサの遺伝子型とは異なり、ヤブクグリ-1 型に分類された。

以上のように、ラベルに記載されている挿し木品種名と異なる品種に分類されたものは、30 個体 (約 10.8%) であった。

2. 挿し木品種の遺伝的類似性の評価

遺伝的類似性の解析対象とした 19 の遺伝子型と(表-3)、九州地域以外の精英樹である 6 個体を合わせた 25 遺伝子型について主座標分析を行った。主座標分析の第一および第二主座標の寄与率はそれぞれ 23.31% と 20.75% であ

図-2. 遺伝距離 (DAS) を用いた主座標分析の結果

第一および第二主座標の寄与率はそれぞれ 23.31% と 20.75%。□は九州外の精英樹、◆は在来挿し木スギ系、■は在来実生スギ系、▲は移入種の実生ヨシノスギ系、●は移入種のオビスギ群を示す (宮島 1989)。

た。解析の結果、九州の挿し木品種は、今回比較のために追加した九州外の精英樹に比べて、幅広い遺伝的変異を持つことが示された (図-2)。また、挿し木品種内の遺伝子型間では、ある程度の遺伝的差異はみられるものの、比較的類似した遺伝変異を保有している傾向が見受けられた。オビアカ-3 型やメアサ-3 型は同じ品種内の他の遺伝子型と少し異なることが示された。宮島 (1989) は、九州の挿し木品種をその成立の由来により、在来挿し木スギ系、在来実生スギ系、移入種のヨシノスギ系およびオビスギ群の四つに分類している。今回の主座標分析の結果では、アヤスギを除く在来挿し木スギ系 (ヤブクグリ, メアサ) とオビスギ群が異なる座標に散布される傾向がみられた。

各遺伝子型間の遺伝的血縁度を表-6 に示す。最も高い遺伝的血縁度は、ヤブクグリ-1 型とヤブクグリ-2 型の間で 0.94 という値であった。このように、挿し木品種内-遺伝子型間では、アヤスギ-1 型とアヤスギ-2 型の間 (0.50)、メアサ-2 型とメアサ-3 型の間 (0.50)、オビアカ-1 型とオビアカ-4 型の間 (0.50) など多くの組み合わせで高い遺伝的血縁度を示したが、オビアカ-5 型とオビアカ-6 型のように遺伝的血縁度が 0 という組み合わせもあった。一方で、挿し木品種間でもアヤスギ-1 型とリュウノヒゲ型 (0.50) やアヤスギ-2 型とイワオスギ型 (0.50) のように高い遺伝的血縁度を示す組み合わせがあった。九州の挿し木品種と九州地域以外の精英樹との遺伝的血縁度はほとんどが 0.1 未満で、最も高いものでもメアサ-2 と東頸城 4 号の 0.2 であった (JSTAGE 電子付録付表-1)。

表-6. 9 座の核マイクロサテライトマーカーおよび 24 座の EST-SSR マーカーで検出された遺伝子型の血縁度

	アヤスギ ₁	アヤスギ ₂	イワオスギ	カワシマ	メアサ ₁	メアサ ₂	メアサ ₃	オビアカ ₁	オビアカ ₂	オビアカ ₃	オビアカ ₄	オビアカ ₅	オビアカ ₆	リュウノヒゲ	シチゾウ	シャカイン	トサアカ	ヤブクグリ ₁	ヤブクグリ ₂	青森 ₂ 号	東頸城 ₄ 号	中頸城 ₄ 号	珠洲 ₂ 号	由利 ₁₀ 号	
アヤスギ-1	1																								
アヤスギ-2	0.50	1																							
イワオスギ	0.06	0.50	1																						
カワシマ	0	0	0	1																					
メアサ-1	0.04	0	0	0.12	1																				
メアサ-2	0	0	0	0.15	0.43	1																			
メアサ-3	0	0	0	0	0.06	0.50	1																		
オビアカ-1	0	0	0	0	0.02	0	0	1																	
オビアカ-2	0	0	0.13	0	0	0	0	0.45	1																
オビアカ-3	0	0	0	0.03	0	0	0.17	0.05	0.13	1															
オビアカ-4	0	0.06	0.03	0	0	0	0	0.50	0.08	0	1														
オビアカ-5	0	0	0.03	0	0.10	0	0	0.50	0.08	0	0.21	1													
オビアカ-6	0	0.03	0	0	0	0	0	0.50	0.11	0.03	0.12	0	1												
リュウノヒゲ	0.50	0.10	0.07	0	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0	1											
シチゾウ	0.10	0.02	0.02	0.02	0	0	0	0	0	0	0.01	0.02	0	0	1										
シャカイン	0.26	0.11	0.01	0.02	0.09	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0.26	0	1									
トサアカ	0	0	0.01	0	0	0	0	0.55	0.14	0	0.36	0.12	0.18	0	0	0	1								
ヤブクグリ-1	0	0	0.01	0	0.14	0	0.50	0.07	0	0.30	0	0.02	0	0.01	0	0	0	1							
ヤブクグリ-2	0	0	0.01	0	0	0	0.50	0	0	0.30	0	0	0	0.01	0.02	0	0	0.94	1						
青森 ₂ 号	0.02	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.04	0	0	0.03	0	0	1					
東頸城 ₄ 号	0	0	0	0	0	0.20	0	0	0	0.02	0	0	0.07	0	0	0	0.02	0	0	0.05	1				
中頸城 ₄ 号	0	0.06	0	0.05	0	0	0	0	0.04	0	0	0	0.08	0.04	0.11	0.06	0	0	0	0	0.08	1			
中頸城 ₄ 号	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.15	0	0	0	0	0.08	0	0	1		
珠洲 ₂ 号	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0.11	0	0	0	0	0	0.11	0	0	1	
由利 ₁₀ 号	0	0	0	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0.07	0.05	0	0	0.07	1

IV. 考 察

1. マイクロサテライトマーカーによるクローン識別の有効性

これまで、精英樹と挿し木品種との遺伝的関係の解明はアイソザイムマーカー（奥泉・大庭 1990）や RAPD マーカー（後藤ら 1999；家入 2003；小山 2006）、MuPS マーカー（久枝 2003）によって行われてきた。しかし、RAPD マーカーは、PCR 条件（使用する *Taq* ポリメラーゼおよび緩衝液の種類、PCR 機器など）によっては、同じ品種でも DNA フラグメントバンドパターンが変わる可能性が指摘されている（Ellsworth *et al.* 1993；津村 2004）。一方、マイクロサテライトマーカーは、共優性で、多型性およびフラグメントパターンの再現性が高く、Multiplex PCR によって少数回の PCR で済むことから、効率的に確度の高いクローンの同定が可能である（津村 2004）。本研究で使用した 9 遺伝子座の核 SSR マーカーをすべて用いた場合の *PI* は 0.0001 未満で、非常に高い確率でクローン識別が可能であった。開発にコストと時間を要するが、信頼性の高いクローン識別を効率的に行うにはマイクロサテライトマーカーを使用する必要がある。

奥泉・大庭（1990）はアイソザイム 4 座で精英樹の県四日市 3、県竹田 3、県玖珠 12、県竹田 9 を三つの遺伝子型に分類したが、本研究はこれらの精英樹はすべて同じ遺伝子型であるという久枝（2003）の結果を支持した（ヤブクグリ-1 型）。一方、家入（2003）は RAPD マーカー 14 プライマー（14 バンド）でメアサのクローン識別を行い、県肝属 7 と県肝属 9 の保有する遺伝子型（2 型）は川内署 1 の遺伝子型（21 型）と異なることを示したが（14 バンドのうちの 1 バンド違い）、久枝（2003）は MuPS マーカー（19 バンド）でクローン識別を行い、県肝属 7 と川内署 1 が同じ遺伝子型であることを示した。本研究ではこれらの三つの精英樹はすべて同じ遺伝子型（メアサ-2 型）であった。このように、一部例外もあったが、これらを除けば、本研究のクローン識別の結果は従来研究のものとほぼ同じであった。

2. 挿し木品種名と遺伝子型との不一致

本研究のクローン識別の結果、挿し木品種メアサ、アヤスギ、ヤブクグリ、オビアカは複数の遺伝子型に分類されたが、特定の 1 遺伝子型が 40～90% を占めた。この結果は、メアサやシャカイン、アヤスギで行われた先行研究の結果と一致する（家入 2003；草野ら 2006；草野 2007）。たとえば草野（2007）は、熊本県内各地の 151 個体のアヤスギを MuPS マーカーで調査し、それらを 18 の遺伝子型に分類したが、1 遺伝子型が 71.5% を占めた。

一方、これまでは別品種と考えられていたものが同じ品種の遺伝子型に分類されたケースもあった。後藤ら（1999）は、福岡県内の 12 品種 65 個体のスギを 14 個の RAPD マーカーを用いてクローン識別し、アヤスギとアカバの遺伝子型が異なることを報告した（精英樹の県甘木 4（アカバ）、

福岡署 2（アカバ）、県浮羽 8（アヤスギ）を含む）。しかし、本研究のアヤスギ-2 型には、アヤスギの一部、アカバおよびホンスギが含まれていた。アヤスギ・アカバ・ホンスギは針葉の外部形態や分布域が非常に類似しており（宮島 1989）、これらの品種を利用する過程で混同が生じてしまったのではないかと考えられる。また、熊本県小国地方ではアヤスギをヤクノシマとも呼ぶことから（宮島 1989）、ヤクノシマがアヤスギ-1 型を保有していたのは挿し木品種の地方名（異名同種）による可能性が高い。また、ラベルとは異なる品種の遺伝子型に分類されたケースもあった。たとえば、メアサのラベルがついていた精英樹の県始良 35 がヤブクグリ-1 型を保有していたが、その理由としては、この精英樹が精英樹特性表ではヤブクグリとされていたが、宮島（1989）はメアサとしていることが挙げられる。オビアカ-3 型やメアサ-3 型の主座標分析の結果もこのようなミス判定に起因するのかもしれない。このような参考となる資料の相違はクローン集植所におけるラベル表記ミスにつながり、誤った品種管理や集植所の穂木を使用した植栽地での更なる誤植を生み出すなど深刻な事態を引き起こす。これらのクローンについては、各個体の外部形態を再度調査し、その個体につけられた品種名の信頼性を確認する必要がある。さらに、このような混乱を避けるため、九州の育種母材をマイクロサテライトマーカーで再評価し、遺伝子型のデータベースを構築して公開するとともに、後藤ら（1999）が指摘しているように各挿し木品種の基準木を定める必要があると考えられる。また、ニーズに応じて適切な品種や品種内の遺伝子型を推奨していくため、データベースに成長や材質、形態などの形質の情報を加えていくことも重要だろう。シャカインを構成する主要な三つの遺伝子型については形質に有意な違いは検出されなかったが（草野ら 2009）、遺伝子型間で形質に違いがある場合、それらの情報が明らかにされなければ、クローンによる品質管理型林業を目指す上で障害となりうる。今後、シャカイン以外の挿し木品種でも挿し木品種内の各遺伝子型の形質の評価を行い、情報を蓄積することが期待される。

3. 挿し木品種の遺伝的類似性

本研究では、九州の挿し木品種間や挿し木品種内の遺伝子型間の遺伝的な類似性を明らかにするため、挿し木品種に九州外の精英樹を加えて主座標分析を行った。解析に使用した精英樹は東日本のものが多いため、日本全体のスギの遺伝的な特徴を反映していないが、これらの変異幅に比較して、九州の挿し木品種が幅広い遺伝的変異を持つことが示された（図-2）。後藤ら（1997）は RAPD マーカーでハゼノキの品種識別を行い、七つの在来品種がクラスター分析で二つに分かれた原因が原産地の違い（九州原産と四国・近畿原産）にあることを示唆した。九州の挿し木品種の中には屋久島や四国から移入されたとされる品種や、ヨシノスギ系のものも多数含まれている（宮島 1989）。今後、それらの原産地に近い地域のサンプルを加えた詳細な解析が期待される。

Goto *et al.* (2008) は、ヒノキの挿し木品種ナンゴウヒ内で検出された遺伝子型間の遺伝的類似性は非常に高いことを示した。しかし本研究の結果では、九州のスギの挿し木品種間には幅広い遺伝的変異が存在し、挿し木品種内の遺伝子型間では、類似するもののナンゴウヒほど遺伝的変異は小さくなかった。ヒノキの発根性は一般的に低く、発根性の高い、遺伝的に近縁な個体のみがナンゴウヒとして選抜されてきたのに対し、スギは元来発根性が高いため、多様な個体から挿し木品種が構成されたと考えられる。

遺伝的血縁度の結果は、九州の挿し木品種と九州外の精英樹との間の遺伝的血縁度は一般的に低いこと、挿し木品種内-遺伝子型間の遺伝的血縁度は挿し木品種ごとに大きく異なること、挿し木品種間でも遺伝的血縁度が高い組み合わせがあることを示した。遺伝的血縁度は、人工交配によって新たな次世代品種の開発に取り組む際に有用な知見となりうる可能性があるため、今後情報を蓄積していく必要があると考えられる。

V. ま と め

本研究では、熊本県林業研究指導所の「スギ遺伝子保存林」内に植栽されている挿し木品種を対象に、クローン識別および遺伝的類似性の評価を行った。メアサ、アヤスギ、ヤブクグリ、オビアカが、複数の遺伝子型で構成されていることが改めて確認された。ヤクノシマ、ゲンベエ、ヒキ、アカバは固有の遺伝子型に分類されなかったが、これらの在来品種について今回はサンプル数が充分でなかったため(表-1)、九州各地からサンプリングを行って分析を行えば、固有の遺伝子型が検出される可能性がある。今後は、主要な挿し木品種について、主な採穂源すべてを対象に解析を行う必要がある。主座標分析の結果、九州の挿し木品種は比較的幅広い遺伝的変異を持つことが示された(図-2)。また、挿し木品種内の遺伝子型間には、比較的類似した遺伝変異を保有している傾向が見受けられた。九州の挿し木品種の中には屋久島や四国、吉野地方などから移入されたとされる品種もあるので(宮島 1989)、今後、それらの地域のサンプルを加えた詳細な解析が期待される。最後に、遺伝的血縁度は、人工交配によって新たな品種を作出する際の基礎情報となる。今後主要な挿し木品種について、より多くの情報を蓄積することが重要である。

引用文献

- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol Evol* 18(10): 503-511
 Chakraborty R, Jin L (1993) Determination of relatedness between individuals using DNA fingerprinting. *Hum Biol* 65: 875-895
 Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycutt RL (1993) Artificial

- variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217
 後藤 晋・渡辺敦史・池田浩一 (1997) RAPD マーカーによるハゼノキの品種識別. *日林誌* 79: 229-233
 後藤 晋・家入龍二・宮原文彦 (1999) 福岡県におけるスギ挿し木品種と精英樹の RAPD 分析. *日林誌* 81: 187-193
 Goto S, Takahashi M, Matsumoto A, Ieiri R, Tsumura Y (2008) Genetic relationships and origin of commercial clones of Nangouhi, a vegetatively propagated cultivar of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Breed Sci* 58: 411-418
 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
 家入龍二 (2003) RAPD マーカーによるスギ挿し木品種メアサのクローン分析. *日林誌* 85: 142-146
 Kalinowski ST, Wagner AP, Taper ML (2006) ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Mol Ecol Notes* 6: 576-579
 川内博文・後藤 晋 (1999) 鹿児島県マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園におけるクローン管理モニタリング. *日林誌* 81: 338-340
 小山孝雄 (2006) 鹿児島県におけるスギ挿し木品種と精英樹の RAPD 解析. *鹿児島林試研報* 9: 1-6
 草野僚一 (2007) MuPS によるスギ挿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・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挿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・松永孝治・森口喜成・白石 進 (2009) スギ挿し木品種シャカインを構成するクローン特性. *日林誌* 91: 259-265
 Langella O (2007) POPULATIONS (version 1.2.30). <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
 宮島 寛 (1989) 九州のスギとヒノキ. 九州大学出版会
 Moriguchi Y, Iwata H, Ihara T, Yoshimura K, Taira H, Tsumura Y (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theor Appl Genet* 106: 751-758
 森口喜成・後藤 晋・高橋 誠 (2005) 分子マーカー情報に基づく採種園の遺伝的管理. *日林誌* 87: 161-169
 Moriguchi Y, Ueno S, Ujino-Ihara T, Futamura N, Matsumoto A, Shinohara K, Tsumura Y (2009) Characterization of EST-SSRs from *Cryptomeria japonica*. *Conserv Genet Resour* 1: 373-376
 奥泉久人・大庭喜八郎 (1990) アイソザイムの 4 遺伝子座の遺伝子型による集積されたオビスギ系 14 品種、ヤブクグリおとびメアサの挿し木品種内クローン数の推定. *日林誌* 72: 501-507
 Peakall R, Smouse PE (2006) GENEALX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Note* 6: 288-295
 高田克彦・白石 進 (1996) RAPD マーカーを用いた九州地方のスギ挿し木品種の分類. *九大演報* 75: 1-14
 Tani N, Takahashi T, Ujino-Ihara T, Iwata H, Yoshimura K, Tsumura Y (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) from microsatellite enriched libraries. *Ann For Sci* 61: 569-575
 津村義彦 (2004) マイクロサテライトマーカーの樹木の遺伝育種研究への利用. *日林誌* 86: 184-190
 Ueno S, Moriguchi Y, Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Futamura N, Sakurai T, Shinohara K, Tsumura Y (2012) A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSR markers for a conifer, *Cryptomeria japonica*. *BMC Genomics* 13: 136