

# DNA マーカーを利用した静岡県産スギ精英樹の分類

山田晋也・山本茂弘・袴田哲司・池田潔彦

農林技術研究所森林・林業研究センター

## Classification of plus-tree clones of sugi (*Cryptomeria japonica*

D. Don) using DNA markers in Shizuoka prefecture

Shinya Yamada, Shigehiro Yamamoto, Tetsuji Hakamata and Kiyohiko Ikeda

Forestry and Forest Products Research Center / Shizuoka Res. Inst. of Agric. and For.

### Abstract

Using simple sequence repeat (SSR) markers, which are simple codominant markers, we attempted to identify 50 sugi plus-trees that had been selected to date in Shizuoka prefecture. As a result, the 50 sugi plus-trees were divided into 46 DNA types. In addition, with the provided genotypic information, we were able to estimate the seed parent / pollen parent. This study showed that SSR marker analysis could be a useful tool for identification of sugi clones.

キーワード： スギ 精英樹 DNA マーカー

## I 緒 言

スギは我が国の重要な造林樹種の一つであり、静岡県では人工林の約 40%がこの樹種で占められている。昭和 32 年度から始まった精英樹選抜育種事業により、静岡県では現在までに 51 個体がスギ精英樹として選抜され<sup>1)</sup>、県下 24 ヶ所に設定された次世代検定林において検定が行われている<sup>1)2)3)9)</sup>。また、上述の精英樹を用いて採種園・採種園が造成され、そこから生産された種苗は造林事業に用いられている<sup>1)</sup>。さらに、それら精英樹の特性について評価がされ<sup>4)5)6)</sup>、雄花着花量の少ない精英樹等が選抜されている。このように、選抜された精英樹を用いて育種が進められているところであるが、近年、設定から長期間が経過し、検定林とそれ以外の林分との境界がわかりにくくなるなど、適切な維持管理の対策が緊急の課題となっている<sup>9)</sup>。また、採種園での誤植を指摘する報告が最近

多く見られることから、採種園実生苗が植栽される次代検定林では、種子親家系のチェックも必要であると思われる<sup>8)</sup>。

近年、DNA 鑑定技術の向上に伴い、樹木においても DNA 遺伝子型を用いた系統管理システムの構築が有効と考えられ、マイクロサテライト(あるいは SSR (simple sequence repeat)、以下“SSR”と記す)マーカーは、共優性で多型性の高いため様々な樹種で開発されおり、効率的に個体識別をするためのツールとして期待されている<sup>8)</sup>。そこで、本研究では SSR マーカーを用いて静岡県産スギ精英樹の遺伝子型を決定した。また、決定した遺伝子型を用いて、圃場内に仮植している精英樹交配苗が目的の精英樹間で行われているものか確認を行った。

## II 材料及び方法

### 1 植物材料

表1 供試した精英樹 50 系統の概要

精英樹名	選抜地※	精英樹名	選抜地※
伊豆1号	田方郡中伊豆町沢口県営林	大井9号	榛原郡本川根町藤川奥日カケ
伊豆2号	賀茂郡松崎町池尻	大井10号	榛原郡川根町笹間上大郡
伊豆3号	田方郡中伊豆町大幡野県営林	大井11号	小笠郡菊川町東富田幸端
伊豆4号	田方郡中伊豆町大幡野県営林	天竜1号	天竜市横山舟の沢
伊豆5号	伊東市鎌田奥野古沢空沢入口	天竜2号	天竜市横山舟の沢
伊豆6号	伊東市鎌田野田半	天竜3号	天竜市横山オトビアナ
伊豆7号	田方郡天城湯ヶ島町雲金畑	天竜4号	天竜市西雲名大沢
伊豆8号	田方郡天城湯ヶ島町持越ツンボラ	天竜5号	磐田郡竜山村大嶺横畑
伊豆9号	賀茂郡松崎町岩科北側杉戸	天竜6号	磐田郡竜山村大嶺上休戸
伊豆10号	賀茂郡西伊豆町大字一色字君沢山	天竜8号	磐田郡佐久間町半場ヤゴシ
伊豆11号	賀茂郡松崎町大字船田字大平戸	天竜9号	磐田郡佐久間町奥領家カンバゴ
安倍1号	静岡市八重沢	天竜10号	天竜市二俣町神沢ナベクラ
安倍2号	静岡市足久保相沢アロオド	天竜11号	天竜市小川スソバチ久保
安倍3号	清水市両河内中河内大太尾	天竜12号	磐田郡佐久間町相月ホヒラ
安倍4号	清水市小島穴原大林	天竜13号	磐田郡竜山村大嶺サルノトビス
安倍5号	静岡市落合ソダツパ	天竜14号	磐田郡水窪町地頭方大平
安倍6号	静岡市落合ソダツパ	天竜15号	周智郡森町大字三倉字下山
大井1号	榛原郡中川根町藤川用留	天竜16号	天竜市横山シンハヤシ
大井2号	榛原郡本川根町文沢カネクボ	天竜17号	天竜市横山ヤマテクボ
大井3号	榛原郡中川根町田之口細古山	天竜18号	磐田郡佐久間町浦川シデツパ
大井4号	榛原郡中川根町田之口吉永	天竜19号	天竜市神沢東
大井5号	榛原郡中川根町田之口石原	富士1号	富士宮市北山山宮藤木
大井6号	榛原郡金谷町小鮎川	富士2号	富士宮市北山山宮藤木
大井7号	榛原郡川根町家山藤谷	富士3号	駿東郡裾野町深良沢入日陰
大井8号	志太郡岡部町殿市宇戸	富士4号	富士宮市北山下組

※選抜された当時の地名で表記している

1. 精英樹:2009年1月下旬に、静岡県農林技術研究所森林・林業研究センターの構内に植栽されている、静岡県産スギ精英樹 50 クローン(天竜7号を除く)標柱裏の各個体より葉を採取した(表1)。それらは、70%エタノールで汚れを取り除いた後、約50mgずつポリ袋に小分けをして実験に供するまで-20℃で保存した。

2. 交配苗:2001年春に交配させた伊豆8号(♀)×天竜8号(♂)2個体、伊豆8号(♀)×天竜4号(♂)2個体、伊豆8号(♀)×天竜9号(♂)、天竜4号(♀)×天竜8号(♂)、天竜4号(♀)×天竜9号(♂)より葉を採取した。それらは、70%エタノールで汚れを取り除いた後、約50mgずつポリ袋に小分けをして実験に供するまで-20℃で保存した。

## 2 DNAの抽出

採取した葉より、DNA Plant Mini Kit (QIAGEN) に付属のプロトコールに従って全DNAを抽出し、2%アガロースゲルで電気泳動(100V, 20分)し、エチジウムブロマイドで染色後、UV230nmを照射しDNAを確認した。

## 3 SSR マーカーによる遺伝子型の分析

SSR マーカー<sup>11,12)</sup>を用いて、PCRを行ない目的の遺伝子領域の増幅を確認した。プライマーとして、CS1226, Cjgssr0077, Cjgssr0175, Cjs0333の4遺伝子座を増幅するセットを用いた(表2)。さらに、分類出来ないものにつ

いてはCS1525, CJS0520, CS1522, Cjs0201の4遺伝子座を増幅するセットを用いた。PCRは10μlの反応系で、以下の組成で行った。鋳型DNA5ng, DNAポリメラーゼ(AmpliTaq Gold® DNA Polymerase: アプライドバイオシステムズ社)0.75unit, dNTPs (25mM) 1μl, MgCl<sub>2</sub>(50mM)0.6μl, 10×buffer 1μlを用いた。PCR条件は98℃8分, (94℃45秒, 55℃45秒, 72℃1分)25サイクル, 72℃7分で行った。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動(100V, 20分)し、エチジウムブロマイドで染色後、UV230nmを照射しDNA増幅を確認し、室温25℃の条件下でジェネティックアナライザーABI PRISM model 310 (アプライドバイオシステムズ社)を利用して検出し、GeneScan 650 LIZ Size Standard (アプライドバイオシステムズ社)を内部マーカーとして、DNAフラグメント解析ソフトウェアであるGene Mapper (アプライドバイオシステムズ社)を用いて増幅フラグメントサイズを読み取ることで遺伝子型を決定した。

表2 実験に使用したプライマー

遺伝子座	Forward primer 5'to3'	Reverse primer 5'to3'
CS1226	CTC TAG TCC TCA ATG GTG GT	TAT TAA GCA TTT TCC CTC TC
Cjs0333	AGG AGA TTA GGA TGG TGG G	GGT TTG CCT CTT CTA TGA G
Cjgssr0175	ACC CTT TGA ATT ATT CCT TGA G	AGC GGA AAA AAC TAC ATC AGA
Cjgssr0077	CCT TGT ACA CTT ATT TGT ACC T	AGG GAG GAG AAA TAG ACA T
CS1525	ATG AAG TGC CCT TGG TTT GT	ATC GCC TCC TCT TTT ATC CT
CJS0520	TCC CTT TTG GTA TTT TAC AC	ACT CAA ATT GGG ATA ATC TC
CS1522	AAA GTT TGA TTA GGG CAG GG	AAA CGT GGG TGC TAT CCT TC
Cjs0201	CTC CTT GTA ATC TTA TTC CC	GTA TGA GCC TAC ACA AAT ACT C

表 3 精英樹 50 系統の遺伝子型

精英樹名	遺伝子座							
	CS1226		Cjgssr0077		Cjgssr0175		Cjs0333	
伊豆1号	141	193	111	135	189	223	247	249
伊豆2号	145	181	111	137	189	191	242	254
伊豆3号	167	185	109	155	190	244	234	242
伊豆4号	133	145	105	129	191	199	260	273
伊豆5号	141	151	109	137	191	193	231	253
伊豆6号	129	143	111	119	191		247	251
伊豆7号	141	145	109	143	183	186	243	259
伊豆8号	143	157	109	165	185	190	254	258
伊豆9号	149	171	141	153	185	189	252	260
伊豆10号 <sup>1)</sup>	143	193	119		191	242	255	
伊豆11号 <sup>1)</sup>	143	193	119		191	242	255	
安倍1号	143	163	153	157	189	230	250	258
安倍2号	141	193	111	135	189	223	248	250
安倍3号	133	165	111	129	189	203	260	266
安倍4号	133	145	105	129	191	199	258	271
安倍5号	157	198	109	111	191	242	255	257
安倍6号 <sup>2)</sup>	151	153	137	147	195	209	255	288
大井1号	177	181	111	115	189	190	260	273
大井2号	141		111	135	191	232	248	316
大井3号	133	147	109	111	189	195	257	268
大井4号 <sup>2)</sup>	151	153	137	147	195	209	255	288
大井5号	133	149	109	149	187.189	192	258	264
大井6号	133	143	109	111	220		240	254
大井7号 <sup>3)</sup>	133	151	111	131	189	191	241	255
大井8号 <sup>3)</sup>	133	151	111	131	189	191	241	255
大井9号	141		109	111	189	193	255	257
大井10号	143	145	137	145	191	211	234	248
大井11号	149	173	113	149	189		241	282
天竜1号	196	198	109	115	197	209	234	292
天竜2号	133	143	109	111	191	203	241	281
天竜3号	141	145	111	139	182	189	251	281
天竜4号	141	171	151	171	188	209	231	239
天竜5号 <sup>4)</sup>	141	143	109	111	189	219	234	321
天竜6号 <sup>4)</sup>	141	143	109	111	189	219	234	321
天竜8号	141	149	151	171	191	209	253	255
天竜9号	151	181	109	155	189	190	241	259
天竜10号	143	173	111	147	184	189	273	281
天竜11号	145	147	109	182	189	191	258	296
天竜12号	133	141	109	113	191		241	249
天竜13号	171	181	109	111	189	191	251	265
天竜14号	145		109	111	183	199	232	254
天竜15号	141	173	111	171	191		239	272
天竜16号	141	176	109	128	221	250	234	272
天竜17号	133		105.109	111	184	192	257	261
天竜18号	141	198	121	155	183	189	239	
天竜19号	133	143	111	145	191	193	242	271
富士1号	143	145	153	157	190	227	268	288
富士2号	133	143	109	111	191	203	239	280
富士3号	141	177	111	141	188	189	257	268
富士4号	141	151	113	151	189	190	259	
対立遺伝子数	21		25		25		37	

<sup>1)~4)</sup> 同じ遺伝型を示す精英樹を同じ数字で示した。

#### 4 交配苗の種子親・花粉親の推定

各交配苗の遺伝子型について、それぞれ種子親(♀)から交配苗の遺伝子型を供給できる場合、その対立遺伝子を種子親由来のものとし、残りの対立遺伝子型を花粉親(♂)から供給されたものとした。種子親由来の遺伝子型を決定する際に、交配苗の遺伝子座において種子親の2つの対立遺伝子が該当する場合は、花粉親の遺伝子型の決定を先に行ってから決定することとした。

### Ⅲ 結果及び考察

#### 1 SSRマーカーによる遺伝子型の分析

静岡産精英樹 50 クローンを CS1226, Cjgssr0077, Cjgssr0175, Cjs0333 の4マーカーで分析し遺伝子型を決定した結果、46タイプに分類された(表3)。CS1226, Cjgssr0077, Cjgssr0175, Cjs0333 の対立遺伝子数はそれぞれ 15, 20, 17, 30 であり、対立遺伝子のサイズ範囲は 105 - 182 bp, 129-196 bp, 182-250 bp, 231-321 bp, であった。伊豆10号と伊豆11号, 安倍6号と大井4号, 大井7号と大井8号, 天竜5号と天竜6号の計4ペアはそれぞれ同一の遺伝子型となった。これら4ペアについては、さらに CS1525, CJS0520, CS1522, Cjs0201 の4マーカーで分類を試みたが表4に示すとおり同一の遺伝子型となった。同一の遺伝子型を示した4組について、それぞれ遺伝的に近いことが示されたが、形態的特性等が調べられ違いが明らかにされているため、これら4組は精英樹選抜後に圃場へ誤植をした可能性も考えられる。今後、選抜地に残っている母樹や、森林総合研究所林木育種センターに保存してある静岡県産スギ精英樹と照合する必要があると考えられた。

#### 2 種子親・花粉親の推定

表5に示すとおり No.1, 3, 4, 6, 7 の遺伝子型は、それぞれメンデル遺伝に従った分離を示しており、例えば No.1 の遺伝子型の 143, 109, 185, 258 は種子親の伊豆8号由来であり、141, 151, 191, 255 は花粉親の天竜8号由来であることが示され、それぞれ交配関係に矛盾は認められないことが確かめられた。しかし、No.2, 5 の遺伝子型は、伊豆8号・天竜8号・天竜9号にはない遺伝子型を示しており、遺伝子型から推定して No.2 の交配苗は、天竜10号と天竜5号または天竜6号との交配苗であることが考えられた。また、No.5 の交配苗は、精英樹の中に存在しない遺伝子型があることから、外部の種子が混入したことが考えられた。以上の結果より、今回決定した精英樹の遺伝子型を用いることで、遺伝子型を分類できなかった上述の4組を除いて、精英樹間の交雑後代の種子親・花粉親を推定することができた。

#### 3 まとめ

本研究により、静岡県産スギ精英樹 50 クローンを 46 タイプの遺伝子型に分類することができ、2 クローンで構成される4組はそれぞれ同じ遺伝子型であった。表3に示す遺伝型の一覧ができたことから、今後、不明なクローンが出てきた際は、分類のできなかった4組8クローンを除く42クローンおよびその交雑後代については SSR マーカーにより識別が可能である。また、本結果を用いることにより、採種園において生産される種子にどの程度外からの花粉が混入しているか明らかにできるため、今後の採種園管理に活用できると考えられた。

表4 精英樹8系統の遺伝子型

精英樹名	遺伝子座						
	CS1525		CJS0520		CS1522		Cjs0201
伊豆10号 <sup>1)</sup>	199	205	192	194	215	225	131
伊豆11号 <sup>1)</sup>	199	205	192	194	215	225	131
安倍6号 <sup>2)</sup>	185	199	192		223	225	111
大井4号 <sup>2)</sup>	185	199	192		223	225	111
大井7号 <sup>3)</sup>	189	196	194		223	227	127
大井8号 <sup>3)</sup>	189	196	194		223	227	127
天竜5号 <sup>4)</sup>	141	208	194		219	229	101 139
天竜6号 <sup>4)</sup>	141	208	194		219	229	101 139

<sup>1)~4)</sup> 同一遺伝型を示す精英樹を同じ数字で示した。

表 5 交配苗と交配に用いた精英樹の遺伝子型

No.	交配の組み合わせ	遺伝子座							
		CS1226		Cjgssr0077		Cjgssr0175		Cjs0333	
1	伊豆8号(♀)×天竜8号(♂)	141	143	109	151	185	191	255	258
2	伊豆8号(♀)×天竜8号(♂)	143	173	111		189	219	234	281
3	伊豆8号(♀)×天竜4号(♂)	141	157	151	165	185	188	231	254
4	伊豆8号(♀)×天竜4号(♂)	157	171	109	151	185	209	239	254
5	伊豆8号(♀)×天竜9号(♂)	141	173	105	109	191	195	270*	283*
6	天竜4号(♀)×天竜8号(♂)	141		171		188	191	231	255
7	天竜4号(♀)×天竜9号(♂)	141	151	171	109	188	189	231	259
交配に用いた精英樹		遺伝子座							
		CS1226		Cjgssr0077		Cjgssr0175		Cjs0333	
伊豆8号		143	157	109	165	185	190	254	258
天竜8号		141	149	151	171	191	209	253	255
天竜4号		141	171	151	171	188	209	231	239
天竜9号		151	181	109	155	189	190	241	259

※静岡県産スギ精英樹には無い遺伝型

#### IV 摘 要

静岡県で選抜されているスギ精英樹 50 個体について、分析が容易であり、共有性マーカーであるマイクロサテライト(SSR)マーカーを用いて個体識別を試みた。その結果、4組 8 クローンを除く 42 クローンを分類することが可能であった。また、得られた遺伝子型の情報を用いて、種子親・花粉親の推定をすることが可能であった。

#### 謝 辞

本研究を実施するにあたり(独)森林総合研究所林木育種センター渡邊敦史氏・宮本尚子氏・坪村美代子氏には DNA マーカーに関する情報を提供していただいた、ここに感謝の意を表す。

#### 引用文献

- 井出雄二(1981):スギ次代検定林10年目の生長について。林木の育種。特別号:4~7。
- 井出雄二(1981):スギ精英樹次代検定林の成績(I)一植栽後10年目までの結果一。静岡県林業試験場研究報告。第12号:1~14。

- 近藤晃・山本茂弘・井手雄二(1990):スギ精英樹次代検定林の成績(II)一植栽後15年目までの結果一。静岡県林業技術センター研究報告。第18号:1~13。
- 近藤晃(1994):静岡県産スギ精英樹クローンの特性評価に関する研究(III)一樹幹の通直性と自然落枝性一。静岡県林業技術センター研究報告。第25号:1~9。
- 近藤晃(1995):静岡県産スギ精英樹クローンの特性評価に関する研究(II)一樹幹の心材率と真円性一。静岡県林業技術センター研究報告。第23号:1~6。
- 近藤晃・袴田哲司(2007):静岡県産スギ精英樹クローンの特性評価に関する研究(V)一少花粉スギ選定を目的とした雄花重量の遺伝変異一。静岡県林業技術センター研究報告。第35号:7~11。
- Moriguchi, Y., Iwata, H., Ujino-Ihara, T., Yoshimura, K., Taira, H. and 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号:161-169。
- 大森昭壽・池田清彦(1995):スギ精英樹の材質と強度性能一 次代検定林の間伐木による調査一。静岡県林業技術センター研究報告。第23号:21~36。
- 岡田恭一(2005):CAPSマーカーによる愛媛県産スギ精英樹の個体識別。日林誌。87号:58-62。
- 静岡県森林整備室(2000):静岡県の林木育種。

- 
- 12) Tani, N., Takahashi, T., Ujino-Ihara, T., Iwata H., Yoshimura, K. and Tsumura, Y. (2004) : Development and characterization of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatelliteenriched libraries. Ann. For. Sci. 61 : 569-575.