

平成22年 1月31日現在

研究種目：	基盤研究（A）
研究期間：	2005年度～2008年度
課題番号：	17208014
研究課題名（和文）	吸収源 CDM で要求される「追加性」要件達成のためのアカシア林業の育種技術的対応
研究課題名（英文）	Constructing a new breeding system for afforestation CDM in tropical Acacia forestry
研究代表者	
	白石 進（SHIRAIISHI SUSUMU）
	九州大学・大学院農学研究院・教授
	研究者番号：70226314

## 研究成果の概要：

本研究で得られた成果は次の通りである。

- (1) 新育種システムの根幹となる DNA タイピング法（親子鑑定システムとクローン鑑定システム）を完成させた。
- (2) パルプ収量（容積密度等）およびパルプ化特性（リグニン含量）の個体間変異を評価し、プラス木の選抜を行った。
- (3) 第三世代以降の育種基盤となるアカシヤマンギウムとアカシヤアウリカリフォルミスの第二世代精英樹選抜集団林を、インドネシア・ボゴールに造成した。
- (4) 優良種間雑種創出の基盤となる雑種採種園（bi-species seedling seed orchard）をインドネシア・中部ジャワに整備した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
平成18年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
平成19年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
平成20年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
総計	35,000,000	10,500,000	45,500,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 森林学・森林科学

キーワード： 林木育種，地球環境，森林学，京都議定書，DNA マーカー，容積密度，繊維長，パルプ化特性

## 1. 研究開始当初の背景

1997年、第3回気候変動枠組条約締約国会議（COP3）において、温暖化ガス排出量を削減する京都議定書が採択され、その目標達成の仕組みとして、いわゆる「京都メカニズム」が採用された。この一つに、先進国が途上国で排出量削減プロジェクトを行う「クリーン開発メカニズム（CDM）」がある。

CDMとして、排出量を削減する排出源 CDM と共に、CO<sub>2</sub> を吸収するための新規植林、再植林（吸収源 CDM）も対象となっている。2003年12月のCOP9における最終合意において、吸収源 CDM には、「追加性」などの厳しい制約が課せられた。これにより、現行の「産業植林」は経常事業（business as usual）とみなされ、CDM としては認められない。CDM として認可されるために

は、従来の植林事業における技術的、経済的、投資的バリアのいずれかを克服すること(追加性)が要求される。

我が国の海外植林面積は40万haに達しており、その大半が製紙業界関連の植林プロジェクトである。しかし、熱帯・亜熱帯アジアでの植林面積は、わずか2万haで、我が国の吸収源CDMの主要対象地域と想定されるアジア諸国での植林実績はほとんどない。

## 2. 研究の目的

我が国の削減目標を達成するためには、吸収源CDMを最大限に活用する必要がある。そのためには、製紙業界関連プロジェクトが吸収源CDMに参加できる環境整備が不可欠である。一方、熱帯アジアでは、アカシア植林(*Acacia mangium* (以下, Am) およびその *A. auriculiformis* (以下, Aa) との雑種)が主流となっている。

本研究では、吸収源CDMで要求される追加性要件を育種技術の視点から達成するために、アカシア等を対象として、新たな林木育種システムの確立を行うと共に、今後育種事業を進める上で必要となる育種基盤の整備を行う。具体的には、アカシア等の植林に熱心なインドネシアをフィールドとして、以下の3課題を実施する。

(1) 実際の育種プロジェクトにおいて、DNA分子マーカーにより簡便にクローン/家系管理を行うための技術を開発する。これにより、林業経営の中で容易に実施できる林木育種システムを企業に提供する。

(2) アカシアのパルプ化特性を改善するための基盤情報となるアカシア材の物理的・化学的特性における種内・種間の変異性を評価する。

(3) 次(第二)世代選抜集団林の造成: 第二世代以降の育種基盤となるAmとAaの第二世代プラス木選抜集団林および両種間の雑種創出のための雑種採種園(bi-species seedling seed orchard)を造成し、将来世代の育種基盤を整備する。

なお、早成樹植林は、草地を森林に変えることにより、生物多様性の増大効果も期待できるが、潜在植生に比べ多様性が劣ることは否定できない。そこで、熱帯林再生の第一段階として、本研究により、熱帯林破壊によって出現した広大な草地を、企業の経済活動(パルプ原料生産)を活用して森林化するための育種システムの確立を目指している。次の段階(第2もしくは第3ローテーション後)として早成樹林からより多様性に富んだ郷土樹種林への誘導技術の開発研究も別途計画しており、本研究はこれと対をなしている。

## 3. 研究の方法

(1) DNA分子マーカーを導入した新林木育種システムの構築

*Acacia*(アカシア)類(特に *A. mangium* とその

種間雑種)および *Paraserianthes falcataria*(モルッカネム)におけるDNAマーカーを利用した新育種システムの基盤となる親子鑑定法、種間雑種鑑定法、クローン識別法の開発を行った。

① 家系管理のためのマイクロサテライトマーカーの開発: *Acacia*のゲノムDNAを用いて、TAC(triplex affinity capture)法を利用した2塩基繰返配列((CT)<sub>n</sub>)マイクロサテライト(SSR; simple sequence repeats)マーカーの開発を以下のように行った。

② AmとAa間の種間雑種鑑定のためのDNA分析系(鑑定法)の確立: Am, Aa両種間に特異的に出現するRAPD(random amplified polymorphic DNA)フラグメントを探索し、クローニングして塩基配列を決定した後、その情報を用いてSCAR(sequence characterized amplified region)マーカーを開発した。

③ Aaにおける簡便、正確で信頼性の高いクローン鑑定法の開発: Aaゲノム中の多型を示す領域をRAPD法で探索・クローニングし、塩基配列を決定した。その情報を用いてSCAR化を行い、さらにmultiplex PCR分析系を開発した。

④ *Paraserianthes falcataria*(モルッカネム)におけるSNP(一塩基多型)マーカーの開発と効率的なクローン鑑定法の構築: モルッカネムの核ゲノム中のSNPをRAPDフラグメントの塩基配列分析により探索し、得られたSNPをSNuPE(single nucleotide primer extension)法によりタイピングする。

(2) パルプ化特性関連形質の種内・種間変異性の評価

① 簡便な測定法の開発: パルプ品質の重要な因子である繊維長は計測する際に、解繊処理が必要なため、多くの時間を要する。本研究のように育種効果の評価を目的として多量のサンプルを扱う場合は、迅速な評価方法が必要となることから、繊維長の簡便な測定手法について放射方向の測定位置の数に注目して検討した。

供試木として、インドネシアジャワ島中部のオノギリ産地試験林より *A. mangium*(以下 Am) および *A. auriculiformis*(以下 Aa) 各10本を使用した。供試木の胸高部位よりウッドコアラー(CSIRO製 Treacor HW300)とエンジンドリル(STIHL社製 BT45)を用いて直径12mm、長さ150~200mmの木材コアを2本ずつ取り出した。

Am, Aaのコアを髄からの相対距離10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%の位置で小ブロックに6分割した。それぞれの小ブロックからマッチ軸状の小片を切り出し、解繊を行った。解繊は氷酢酸と30%過酸化水素の1:1混合液に浸し、80°Cで24時間加熱した。解繊後の繊維をサフランインで染色後、光学顕微鏡(対物レンズ4倍)、画像解析ソフト WinRoof(Mitani Corporation)を用いて30本の繊維長を計測し、平均値を求めた。

② 暫定プラス木の材質評価: 上記オノギリ試験林(植栽後11年)において、成長量、通直性が

共に優れている個体(暫定プラス木;Am で 203 個体, Aa で 123 個体)を対象として,これらの個体の胸高部位から材質評価用のコアサンプルを採取し,繊維長,気乾密度,リグニン量を調査した。

なお,リグニン量は,クラーソン法により測定した。リグニン量測定用ブロックを 60-80 メッシュの木粉にして,72%硫酸に室温で 4 時間処理した。その後,混合溶液が硫酸濃度 3%となるように蒸留水で希釈した。希釈液はイノシトールを添加して,121℃で1時間オートクレーブにかけた。次に,吸引濾過した沈殿物を熱水および蒸留水を用いて洗浄した。沈殿物を 105℃で一晩乾燥させて重量を計測し,この酸不溶性リグニン量をリグニン量とした。

(3) 第三世代選抜集団林と種間雑種採種園の造成

① 第一世代プラス木の選抜: 中部ジャワ・オノギリ産地試験林(11 年生)において成長量と樹幹通直性で選抜された暫定プラス木の中から,前記小課題(2)における結果(長繊維長,高気乾密度,低リグニン量)をもとにさらに選抜を加え,最終的なプラス木を選抜した。

② 第二世代育種集団林の整備: 次世代(第二世代)以降も,育種を進めるためには第一世代プラス木で構成する育種集団林を造成し,次世代プラス木の選抜を行う必要がある。第一世代プラス木より種子を採集し,育苗後,第二世代育種集団林に植栽する。

③ 雑種品種創出のための雑種採種園の整備: AmとAaの第一世代プラス木間での交配を高頻度で行わせ,優良な雑種個体を多数創出させるために,AmとAaが交互に配置された雑種採種園をデザインし,造成した。

#### 4. 研究成果

(1) DNA 分子マーカーを導入した新林木育種システムの構築

① 家系管理のためのマイクロサテライトマーカーの開発: TAC 法でエンリッチメントされた遺伝子ライブラリーより(CT)<sub>n</sub> 領域の単離を行った結果,合計 113 個のマイクロサテライト DNA 領域(繰返数が 10 回以上)が明らかとなった。このうち,高変異性が期待できる 20 回以上の繰返配列が 14 領域(12.4%)で認められた。

② Am と Aa 間の種間雑種鑑定のための DNA 分析系(鑑定法)の確立: 両樹種で PCR 増幅された RAPD(random amplified polymorphic DNA) フラグメントの塩基配列解析結果をもとに,Am と Aa で種特異的な対立遺伝子をもつ 5 個の SNP を明らかにした。これらの SNP を両樹種および雑種鑑別に利用し,5 個の SNP における対立遺伝子型を1回の DNA 分析で効率的にタイピングできるマルチプレックス SNUPE 分析系を構築した。また,種特異的 SCAR(sequence characterized amplified region;すべて優性マーカー)をそれぞれ3個,計6個を1回の PCR で増幅し,両種およ

びハイブリッドアカシアを迅速・簡便に識別するための樹種・雑種鑑定システムも完成した。

③ Aa における簡便,正確で信頼性の高いクローン鑑定法の開発: 多型性を示す RAPD フラグメントの塩基配列情報をもとに,6 個の SCAR マーカーを開発した。これらをマルチプレックス PCR し,その PCR 産物の電気泳動パターンから簡便にクローン鑑定を行うことのできる MuPS (multiplex-PCR of SCAR markers) 分析系を構築した。

④ *Paraserianthes falcataria*(モルッカネム)における SNP(一塩基多型)マーカーの開発と効率的なクローン鑑定法の構築: モルッカネムの核ゲノムから無作為に選ばれた 31 個の DNA 領域(合計 6,262bp)において SNP の探索を行った結果,平均で 63 塩基対(bp)当たり 1 個の SNP が確認され,SNP がゲノム中に高い頻度で存在していることから,本樹種における SNP マーカーの開発が比較的容易であることを明らかにした。さらに変異性の高い 12 個の SNP を選抜し,各 SNP における対立遺伝子型を効率的にタイピングできる 3 組(各組 4 個の SNP で構成)のマルチプレックス SNUPE 分析系を構築した。また,各 SNP における対立遺伝子頻度から本鑑定法の個体(クローン)識別能力(discrimination power)を算出したところ 0.9999 となり,高い識別能力を有していた。

以上,①~④により,熱帯地域の有用早成樹であるアカシア類とモルッカネムにおける DNA 分子マーカーによる家系/クローン管理が可能となり,「検定林レス次代検定」等を基盤とした新育種システムによる品種創出が可能となった。また,品種改良されたアカシア,モルッカネム苗を用いた産業植林は,吸収源 CDM として認められる可能性があり,わが国の CO<sub>2</sub> 排出量の削減に貢献できるものと考えられる。

(2) パルプ化特性関連形質の種内・種間変異性の評価

① 簡便な測定法の開発: AmとAaの繊維長の簡便な評価方法を検討し,髄からの相対距離が異なる2箇所の平均値と面積加重平均値との関係を調べた結果,髄からの相対距離が 50%と 70%および 70%と 90%(Am),30%と 50%,50%と 70%,70%と 90%(Aa)の平均値と面積加重平均値は1%水準で有意な正相関を示した。両樹種の結果を考慮して,相対距離が 50%と 70%および 70%と 90%を最適な測定位置と決定した。相対距離の異なる2箇所の繊維長の平均値を個体の繊維長として評価できることを明らかにした。

図 1 に Am と Aa の繊維長(Fiber length),気乾密度(Air-dried density),リグニン量(Lignin content)の度数分布を示す。これらは全て正規分布を示した。変動係数は Am では 4.67~8.84%,Aa は 6.48~7.04%の範囲となった。これらの結果から繊維長,気乾密度,リグニン量には,成長量で選抜された暫定プラス木間に大き

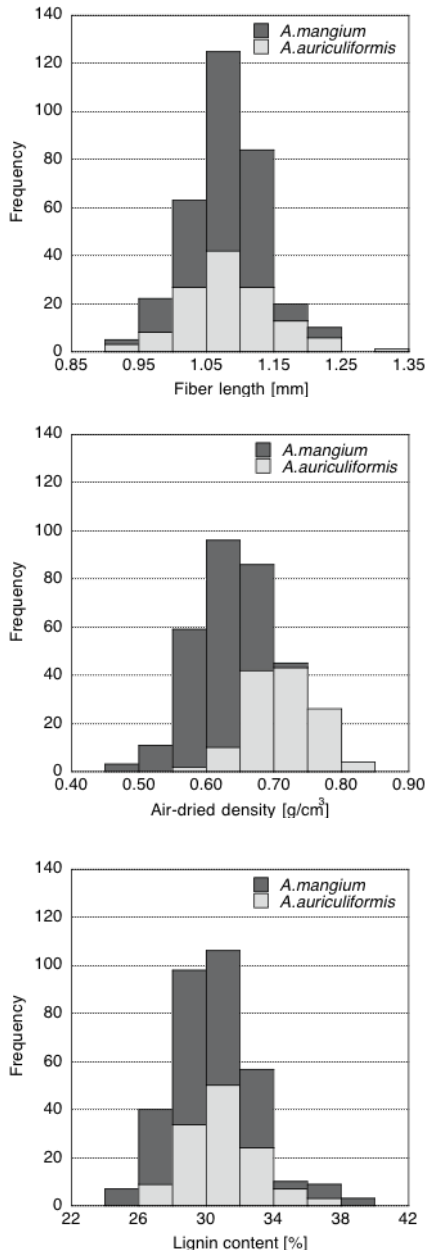


図1 暫定プラス木の繊維長、気乾密度、リグニン量における変異

な変異が認められた。さらに繊維長、材密度、リグニン量で選抜することにより、成長量に優れ、かつパルプ化特性にも優れた品種の創出が可能であることが示された。なお、Aa の気乾密度は  $0.711\text{g/cm}^3$  となり、Am の  $0.615\text{g/cm}^3$  より大きい値を示し、両者間には1%水準で有意差が見られた。繊維長の平均値はAaが1.08 mm、Amが1.07 mmであった。リグニン量はAmが30.2%、Aaが30.9%で、Amのリグニン量はAaより低かった ( $P < 0.01$ )。

(3) 第三世代選抜集団林と種間雑種採種園の造成

① 第一世代プラス木の選抜：既に成長量と樹幹通直性で選抜された暫定プラス木について、繊維長、気乾密度、リグニン量の調査(前記課

題(2))結果をもとに、最終的にAmで43個体、Aaで43個体のプラス木を選抜した。これらの個体は、成長が良く、樹幹が通直で、かつ繊維が長く、材密度が高く、材中リグニン量が少ないといったパルプ用原料生産に適した個体である。

② 第二世代育種集団林の整備：第二世代育種集団林は、第二世代プラス木の選抜母集団となることから、大規模で造成することが望ましい。西部ジャワのボゴールにあるインドネシア林業公社(Perum Perhutani)の管理地内の2林分(RPH Gunung Karang, BKPH Jonggol と RPH Maribaya, BKPH Parung Panjang)に合計180haの試験林を設定した。Amが160ha、Aaが20haである。

プラス木として選抜されたAm、Aa各43個体のうち、十分な種子量が確保されたAmの38家系、Aaの30家系がランダム配置で植栽されており、現在順調に生育している(写真1)。

③ 雑種品種創出のための雑種採種園の整備：Am、Aa共に第二世代育種集団林と同一の苗を使用した。各樹種2列を単位として、交互に配置されている。造成後1年が経ち、順調に生育している(写真2)。今後、植栽単位内個体間で強度の選抜を行い、優良個体のみからなる採種園への誘導を計画している。

以上、①～③により今後の新品種創出の基盤が整備された。4年後には、再び選抜が行われ第二世代プラス木と第一世代雑種品種が創出される予定である。これまで、アカシアにおいて、このような組織的な育種計画は行われていない。また、DNAによる家系管理技術(検定林レス次代検定方式)を導入した新しい育種システムの実践は世界的にみて初めての試みであり、この計画の成果が期待されている。なお、インドネシアでは森林火災が大きな問題になっており、今回整備した育種試験林の管理には十分な注意が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

(1) Yuskianti V., Shiraiishi S. (2010) Developing SNP Markers and DNA Typing Using Multiplexed Single Nucleotide Primer Extension (SNuPE) in *Paraserianthes falcataria*. *Breeding Science* (in press) [査読有り]

(2) Hasegawa M., Wakimoto R., Yoshida E., Shimizu K., Kondo R., Widyatmoko A., Nirsatmant A., Shiraiishi S. (2009) Provenance variation in growth and wood properties of *A. mangium* and *A. auriculiformis* in Central Java, Indonesia, *Bulletin of the Kyushu university Forests* 90, 25-37 [査読有り]

(3) 黄 発新, 張 変香, 白石 進 (2005) 共優性 SCAR マーカーによるハイブリッドアカシア (*Acacia mangium* × *A. auriculiformis*) の雑種鑑定. *日本森林学会誌* 87:149-152 [査読有り]



写真 1 第二世代育種集団林(造成 1 年後) 上, (Am); 下, (Aa)



写真 2 雑種採種園(造成 1 年後)

〔学会発表〕(計 1 件)

長谷川益己, 脇元理恵, 吉田絵美, 清水邦義, 近藤隆一郎, Anthonius Widyatmoko, Arif Nirsatmanto, 白石進, インドネシア中部ジャワ州産 11 年生 *Acacia mangium* と *Acacia auriculiformis* の成長と木材性質, 日本木材学会大会, 2009.03.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 進 (SHIRAISHI SUSUMU)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 17208014

### (2) 研究分担者

近藤 隆一郎 (KONDO RYUICHIRO)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 17208014  
長谷川 益己 (HASEGAWA MASUMI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 17208014

### (3) 連携研究者

伊藤 一弥 (ITO KAZUYA)  
王子製紙(株)・森林資源研究所・所長  
楠 和隆 (KUSUMOKI KAZUTAKA)  
王子製紙(株)・森林資源研究所・研究員  
A.Y.P.B.C. Widyatmoko  
インドネシア国森林バイオテクノロジー・林木育種研究センター・研究員