

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380093

研究課題名 (和文) 針葉樹の雑種苗の分子識別と起源推定

研究課題名 (英文) Molecular classification of hybrid larch seedling and origin of larch in Hokkaido Island

研究代表者

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長

研究者番号：20353774

研究成果の概要 (和文)：カラマツの育種には雑種個体である F1 個体の普及が望まれている。北海道では成長も早く、野鼠抵抗性のあるグイマツとカラマツの雑種品種が開発されている。しかし、形態での識別は完全でなく、DNA マーカーを用いた形質での識別の精度向上が求められている。そのためにカラマツ及びグイマツの種識別マーカーを葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA を用いて開発を行った。このマーカーはこれら 2 樹種を正確に識別することができた。また雑種採種園と新しく造成された単一クローン採種園で、雑種個体の生産性が異なり、単一クローン採種園で極めて高い雑種苗が生産されていることが明らかになった。また苗木の形態での識別方法の改良も行い、2 年生の同時枝数、1.2 年生の文枝高、1.2 年生の頂芽形成日、2 年生の根元径が安定して使える形質であることが明らかになった。またカラマツ天然林の遺伝的構造を調査した結果、北限の馬ノ神岳の集団でユニークな変異を持っており、東部の一部の集団が同様の変異を共有していた。しかし、母性遺伝のミトコンドリア DNA は大きな違いがみられたが、核 SSR (Simple Sequence Repeat) では馬ノ神岳の集団を除くと遺伝的分化程度はかなり低いものであった。また北海道の精英樹の起源は長野県の川上村の近傍の天然林と遺伝的組成が近く、この周辺が起源であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Various hybrids between *Larix* species have been used in commercial forestry around the world because they have heterotic advantages. In Japan, a hybrid between Kurile larch (*Larix gmelinii* var. *japonica*) and Japanese larch (*L. kaempferi*) is one of the most important afforestation species in Hokkaido Island. This hybrid larch combines desirable traits of both parental species, including fast juvenile growth, stem straightness and relatively strong resistance to gnawing by *Myodes rufocanus bedfordiae*. Therefore, it is important to distinguish the hybrid seedlings from pure *L. gmelinii* var. *japonica* × *L. gmelinii* (GG) seedlings. We identified diagnostic chloroplast DNA and mitochondrial DNA markers that can (i) discriminate between *L. gmelinii* var. *japonica* and *L. kaempferi*, and (ii) determine the maternal and paternal species of hybrids between them, by exploiting the difference in inheritance mode between the two genomes. We also investigated the hybridization rates at a site with two types of inter-specific seed orchard. - a new type with rows of a single maternal clone of *L. gmelinii* var. *japonica* amongst rows of *L. kaempferi*, and a "traditional" type with multiple, intimately mixed clones - in two years using chloroplast diagnostic DNA markers. The average hybridization rates in the SMC inter-specific seed orchards were higher than that in the traditional inter-specific seed orchards, because of the self-incompatibility of the *L. gmelinii* var. *japonica* clone. We detected significant differences in hybridization rates between the orchard types in both investigated years ( $P < 0.001$ , ANOVA). This finding suggests that SMC inter-specific seed orchards can reliably provide seeds with high proportions of hybrids. The discriminant analysis revealed that root collar diameter and number of sylleptic branches at 2-years-old, and day of terminal bud set at land 2-years-old have

high ability for hybrid classification of individual seedlings. These traits will be worked for improving the common method. The genetic structure of natural population of this species was weak but Mt. Manokami population has unique genetic diversity by both of SSRs and mitochondrial DNA analyses. The origin of plus tree population in Hokkaido Island was thought to be central Japan such as Kawakami village of Nagano prefecture by DNA analysis.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：カラマツ雑種、DNA 識別、オルガネラ DNA、北海道、精英樹、起源推定

#### 1. 研究開始当初の背景

カラマツ属樹種は北半球に広く分布しているが、現在その種数はわずかに 10 種である (Farjon 1990)。その多くは系統進化的には比較的近年に種形成が行なわれたと考えられている。そのため種間雑種がしばしば見られ、雑種強勢により純粋な種よりも成長特性などが優れていることが多い。しかしながら、雑種が形成される場合、それらの方向性またどのような条件で雑種が形成されやすいかについては明確になっていない。また、形質的に優れた雑種苗を造林種苗として利用するための研究が近年盛んに行われている。これは雑種強勢を利用した新たな林業形態として期待されている。しかしながら、自然交配ではこの優れた雑種苗も形態形質だけでは十分な識別ができず、苗木生産上の大きな問題点となっている。また我が国で唯一、雑種苗を用いた林業が行なわれているのはカラマツである。カラマツは冷温帯域の主要な造林樹種となっているが、その人工林に植林された種苗の起源がどこであるかも不明のまま、造林用の苗が供給されている。これは我が国に残存しているカラマツ天然林の本来持っている遺伝的多様性や構造が、周辺のカラマツ人工林からの遺伝子流入 (花粉流入) で破壊される危険性をはらんでいる。

#### 2. 研究の目的

カラマツ及びグイマツの種識別マーカー

の開発を父性遺伝する葉緑体 DNA 及び母性遺伝するミトコンドリア DNA を用いて行なう。これらの 2 つのゲノムの種間の違いを探索し、種識別マーカーを開発する。これにより、雑種個体の交雑の方向性 (どちらが花粉親か種子親か) が明らかにできる。

開発した種識別 DNA マーカーを用いて、我が国で多くのカラマツ雑種苗を供給している北海道のカラマツ雑種採種園で調査を行う。この採種園には、カラマツとグイマツをランダムに混植した一般雑種採種園と、新たに造成された優良なグイマツの単一クローンとカラマツ精英樹とを植栽した単一クローン雑種採種園が存在する。これら 2 種類の植栽形態の異なる雑種採種園で、複数年にわたり雑種率の調査を行う。一般雑種採種園ではカラマツ及びグイマツ母樹から種子を採取し、それぞれの種での雑種率の違いを調査し、雑種形成に方向性があるかどうかを明らかにする。また雑種形成の要因が開花量、開花フェノロジー (開花の時期) の違いによるものかどうかを明らかにする。単一クローン雑種採種園はグイマツの単一クローンを植栽し、その自家不和合性を利用して、雑種率を上げるために作られた採種園である。そのため一般雑種園に対して、雑種率改善にどの程度の改良効果があるかの調査を行う。

また形態形質で雑種苗と類似した形質を持つ個体を、簡易に識別する手法を確立するために形質でのデータと種識別マーカーと

のデータを比較する。その結果、最も効率の良い手法を簡易手法としての確立を目指す。これまでに雑種苗とその他を見分ける方法は、苗高、枝数、分枝高、冬芽形成時期が用いられてきた。どの表現型も完全には雑種個体を識別できない状況にある。そのためこれらの表現型と雑種識別マーカ結果と照合し、確立の高い表現型またはいくつかの組み合わせによって、簡易検定法の確立を目指す。

北海道のカラマツの起源は言い伝えによると長野県佐久地方のものだといわれている。この起源を探索するために全国のカラマツ天然林から集団サンプルを収集する。収集した天然林サンプルと北海道で現在使われているカラマツ精英樹集団との遺伝的な比較を行なう。また造林種苗の基になっている全国のカラマツ精英樹も分析し、それぞれの精英樹クローンがどの地域由来かの調査も行う。この分析には多型性の高いマイクロサテライトマーカと地域の識別が比較的明らかになりやすいオルガネラ DNA 多型を用いる。これらのマーカで得られた遺伝子型データをもとに、北海道のカラマツ精英樹個体がどの天然林集団に最も遺伝的に近いかをアサインメントテスト (Piry et al. 2003) を用いて個別別に調べ北海道カラマツの起源の推定を行なう。

### 3. 研究の方法

#### (1) カラマツ及びグイマツの種識別 DNA マーカの開発

Acheré et al. (2004) がヨーロッパカラマツとニホンカラマツで開発した葉緑体 DNA とミトコンドリア DNA で開発したマーカの応用から始める。葉緑体 DNA では彼らが調査した 3 領域 (rbcL、trnK と trnS-trnfM) について調査を行った。またミトコンドリア DNA については f-13 領域について調査を行った。これら 4 領域の調査は、既報の PCR プライマーを用いて、ニホンカラマツとグイマツで PCR 増幅を行ない、PCR 増幅の有無を確かめた。PCR 増幅が確認された領域については、ニホンカラマツとグイマツそれぞれ 8 個体 (種間多型スクリーニング集団) について塩基配列の解読を行った。種間で塩基配列に違いがある場合、この違いが種間で固定されているかどうかを確認するために、北海道で選抜されたグイマツ及びカラマツ精英樹全個体を用いた。この種間識別マーカがカラマツ天然林でも固定されているどうかの確認を、全国で収集したカラマツ天然林集団で行なった。また開発したマーカの遺伝性を確認するために、種間交雑家系である 4 家系を用いた。

#### (2) 雑種形成に関わる要因の解明と新雑種採種園の雑種率の改善効果

雑種率の算出のために一般雑種採種園の

カラマツ及びグイマツ 10 クローンから種子を収集した。1 母樹あたり 100 粒の充実種子を収集し、DNA を抽出した。また単一クローン雑種採種園では、グイマツの 10 母樹から、それぞれ充実種子を 100 粒収集し、DNA を抽出した。一般的に雑種苗はグイマツ×カラマツの交配の苗が用いられる。そのため、雑種率の改善はグイマツを母樹とする個体で評価を行った。

#### (3) 北海道カラマツ人工林と全国のカラマツ精英樹の起源の探索

北海道のカラマツ人工林の起源を調査するため、全国のカラマツ天然林から集団サンプルを収集した。対象とする天然林は残存するカラマツ天然林 20 集団である。それぞれの天然林から 20 個体母樹以上を対象に材料を収集する。また北海道以外の全国のカラマツ精英樹、約 300 クローンの材料も収集した。遺伝的多様性の調査は核 DNA 支配のマイクロサテライトマーカとオルガネラ DNA で単性遺伝であるミトコンドリア DNA を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) カラマツ及びグイマツの種識別 DNA マーカの開発

ヨーロッパカラマツで報告されているマーカの応用を試みた (Acheré et al. 2004)。また種識別の正確さを確認するためにグイマツ 97 クローン、カラマツ 40 クローンをを用いた。またカラマツ天然林由来の 70 個体の DNA サンプルも同時に使用した。その結果、既報のマーカがカラマツとグイマツの識別に有効であることが明らかとなった。葉緑体、ミトコンドリア DNA の PCR-RFLP 法を用いて解析した結果、カラマツ精英樹及び天然性由来の全個体がカラマツ型の DNA パターンを示し、グイマツ精英樹は 2 クローンを除いてグイマツ型のパターンを示した。グイマツ 2 クローンは DNA パターンが雑種型を示したが、これらは選抜の際の人為的な植栽ミスで生じた可能性が高いと判断された。その結果、今回使用したカラマツとグイマツ雑種識別マーカは、雑種識別に有効で確実に雑種が識別できることが明らかとなった。

#### (2) 雑種形成に関わる要因の解明と新雑種採種園の雑種率の改善効果

DNA マーカで評価した従来型雑種採種園における平均雑種率は、2004 年は 15.9 (±13.4) %、2005 年は 30.0 (±25.5) %であった。一方、単一クローン母樹雑種採種園におけるグイマツの平均雑種率は、2004 年は 84.2 (±9.4) %、2005 年は 94.1 (±3.9) %であった。単一クローン母樹雑種採種園の平均雑種率は、両年ともに、従来型雑種採種園より有意に高く (両年ともに  $P < 0.001$ , ANOVA)。本研究における単一クローン母樹雑種採種園の高い雑種率は、カラマツのグイマ

ツに対する樹高やラメット数の違いの影響も考えられるが、いずれにしても、単一クローン母樹雑種採種園の従来型雑種採種園からの著しい改良効果を実証された。両採種園において、2005年の雑種率は2004年よりも高かった。これは、2005年のカラマツのグイマツに対する相対的な花粉量が2004年より多かったことが原因と考えられる。この結果は、両種の相対的な花粉量が各年次の雑種率に影響を及ぼすことを示唆する。従来型雑種採種園における母樹間の雑種率の変異は、単一クローン母樹雑種採種園よりも高かった。この結果は、単一クローン母樹雑種採種園における採種母樹が2クローン（中標津3と中標津5）に限られていることに起因すると考えられる。また、従来型雑種採種園における各グイマツクローンの雑種率の順位には、年間で正の相関があった（Spearman  $\rho = 0.77$ ,  $P < 0.05$ ）。このことから、雑種率は、クローンがもつ比較的安定した特性と考えられる。

また苗木の形態での識別方法の改良も行い、2年生の同時枝数、1.2年生の文枝高、1.2年生の頂芽形成日、2年生の根元径が安定して使える形質であることが明らかになった。

### (3) 北海道カラマツ人工林と全国のカラマツ精英樹の起源の探索

カラマツ天然林の遺伝的構造を調査した結果、北限の馬ノ神岳の集団でユニークな変異を持っており、東部の一部の集団が同様の変異を共有していた。しかし、母性遺伝のミトコンドリアDNAは大きな違いがみられたが、核SSR (Simple Sequence Repeat) では馬ノ神岳の集団を除くと遺伝的分化程度はかなり低いものであった。また北海道の精英樹の起源は長野県の川上村の近傍の天然林と遺伝的組成が近く、この周辺が起源であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①San Jose-Maldia, L., Uchida, K., Tomaru, N. (2009) Mitochondrial DNA variation in natural populations of Japanese larch (*Larix kaempferi*). 58: 234-241

②森口喜成・来田和人・内山和子・黒丸亮・津村義彦 (2009) DNAマーカーを用いたグイマツ×カラマツ雑種採種園産種苗の雑種率の解析、林木の育種 229: 1-5

③Moriguchi, Y., K. Kita, K. Uchiyama, M. Kuromaru, Y. Tsumura (2008) Enhanced hybridization rates in a *Larix gmelinii* var. *japonica* x *L. kaempferi*

inter-specific seed orchard with a single maternal clone revealed by cytoplasmic DNA markers. *Tree Genetics and Genomics* 4:637-645

[学会発表] (計4件)

①San Jose-Maldia, L., Kita, K., Tsumura, Y., Kuromaru M. and Tomaru, N., Evaluation of genetic diversity and provenance identification of Japanese larch plus trees in Hokkaido basic breeding region. IUFRO Kuala Lumpur 2010, 2010年3月11日、Kuala Lumpur

②来田和人・内山和子・市村康裕、黒丸亮・森口喜成・津村義彦、グイマツ雑種F1苗木の雑種率の年次変動と選苗精度 日本森林学会、2009年3月27日、京都大学

③来田和人、内山和子、森口喜成、高垣和士、齊藤陽子、井出雄二、津村義彦、黒丸亮、DNAマーカーによる雑種苗木判定方法の検証、日本森林学会、2007年4月2日～4日、九州大学

④Kita, K., K. Uchiyama, Y. Moriguchi, M. Takagaki, Y. Saito, Y. Ide, Y. Tsumura, And M. Kuromaru, Verification of the morphological distinction method of hybrid larch seedling by DNA marker. IUFRO Larix2007, 2007年9月20日、Canada

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津村 義彦 (TSUMURA YOSHIHIKO)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長  
研究者番号：20353774

### (2) 研究分担者

戸丸 信弘 (TOMARU NOBUHIRO)  
名古屋大学・生命農学研究科・教授  
研究者番号：50241774

黒丸 亮 (KUROMARU MAKOTO)  
北海道立林業試験場・道北支場・支場長  
研究者番号：00414251