

ヒノキアスナロの林木育種にむけた優良品種採穂園のクローン解析

池田 虎三（金沢大学）

林木育種において個体の正確な管理は重要である。石川県のヒノキアスナロ優良品種採穂園は造成からおよそ 50 年が経過し、更新が必要時期になっているが、これまで在来品種ごとに管理されているため、どの個体を残存すべきかの判断ができない状況になっている。本研究では、採穂園におけるクローンおよびそれらの遺伝的な関係性を明らかにすることを目的として SSR による遺伝解析を行った。解析の結果、採穂園の 479 個体は 35 クローンで構成されており、一部のクローン間は遺伝的に非常に近縁な関係にあった。今後ヒノキアスナロの林業を長期的に発展させていくには、これらの遺伝情報に基づいて採穂園の管理および育種をおこなっていくことが重要である。

キーワード：ヒノキアスナロ、クローン、在来品種、採穂園

I はじめに

ヒノキアスナロ (*Thujaopsis dolabrata* var. *hondae*) はヒノキ科アスナロ属アスナロの 1 変種であり、石川県では「アテ」、青森県では「ヒバ」と呼称されている。石川県ではヒノキアスナロのクローン林業が古くから行われており、苗木の生産に空中取り木を利用するなど世界的にも特徴のある施業を実践している。石川県では発根性が高い個体が選抜され、それぞれの個体の外見的特徴から 30 をこえる在来品種名が存在しており、特にマアテ、クサアテ、エソアテ（スズアテ）、カナアテの 4 種は石川県の主要な在来品種とされている (3)。ヒノキアスナロの材質は強固であり、防蟻効果の高い芳香成分を豊富に含むため建築材や漆器の本地として重宝されている。これらの在来品種間の外見的特徴は非常に軽微なものもあり、外見で各品種を識別することは困難である。そのため在来品種の中には、成長が非常に遅い個体や、病虫害に罹患しやすい個体が含まれているが、これまで体系的な個体の管理がなされていない。

石川県羽咋郡志賀町にあるヒノキアスナロ優良品種採穂園は、ヒノキアスナロ（アテ）林業の発展を見据え、1967 年（昭和 42 年）に造成された。造成に用いられた苗木には、県内各地のヒノキアスナロ人工林から選抜された優良個体の挿し木苗が用いられている。現在までに、採穂園から多くの苗木が生産されてきたが、樹齢が高くなってきており、苗木の生産が困難になりつつある。採穂園としての機能を十分に発揮させるためには、更新の作業が今後必要になってきている。しかし、造成当時の配置図や、在来品種名が記載されている記録簿が既に失われており、どの個体を採穂木として残していくべきか判断できない状況になっている。また、配置図や記録簿が無いために、正確な品種が判断できず、誤った品種から苗木が生産されてしまう恐れがある。

近年、遺伝的な解析技術を用いることで在来品種に

含まれるクローンの識別が可能となっている。これまでスギ (9) やヒノキ (4, 5) の在来品種には複数のクローンが含まれていることが報告されている。採穂園の機能を十分に発揮するためには、採穂園内の在来品種およびクローンを明らかにし、遺伝的な情報に基づいた個体の管理が必要である。これらの情報は、将来の育種に必要な基礎的な情報となりうるとともに、クローンごとに管理することで、形質が優良であることが明らかなクローンからの苗木の生産が可能となる。

そこで、本研究においては、ヒノキアスナロ優良品種採穂園においてクローン解析を行い、クローンを明らかにするとともに、将来の育種に備えクローン間の遺伝的な近縁度を算出した。

II 試験材料および方法

1. ヒノキアスナロ優良品種採穂園

ヒノキアスナロ優良品種採穂園（以下、採穂園）は、優良な種苗を供給することを目的として、1967 年に石川県羽咋郡志賀町火打谷にある石川県緑化センターの敷地内の約 2ha を用いて造成された（図-1）。植栽当時の詳細な資料の存在が確認できなかったため、測量を行い採穂園内に現存している個体数およびその位置を調査した。全個体の位置を測量し、そのうち無作為に選んだ 479 個体から針葉を採取し、クローン解析に用いるサンプルとした。

2. DNA 抽出およびクローン解析

採穂園より採取した針葉 50mg と粒径 5mm のスチール製ビーズ（TAITEC 社）2 個とを 2ml マイクロチューブにいれ、Tissue Lyser（QIAGEN）を用いて 30Hz、30 秒間の条件で針葉を粉砕し、DNeasy Plant Mini Kit（QIAGEN）を用いて DNA を抽出した。その後、NanoDrop（Thermo Scientific）により DNA 濃度を測定し、各サンプルの DNA 濃度を 10ng/μL に調整した。クローン解析には 12 遺伝子座の EST-SSR マーカー ((11) ; Tdest 1, Tdest 3, Tdest 11, Tdest 14, Tdest 17, Tdest

21, Tdest 24, Tdest 35, Tdest 38, Tdest 42, Tdest 45, Tdest 53: (7) ; $CPD=1.000$) を用い解析をおこなった。DNA の増幅には three primer PCR approach (1) を用い、複数の遺伝子座でのマルチプレックス PCR をおこなった。PCR の条件は、95°C で 10 分間加熱後、1 サイクルあたり 95°C を 30 秒、60°C を 90 秒、72°C を 60 秒の条件で 30 サイクル行い、その後 72°C で 30 分間加熱した。PCR による DNA 増幅後、ABI 3130 シーケンサーにより PCR 産物の塩基長を測定し、GeneScan 600 LIZ を指標としてソフトウェア GeneMapper (Applied Biosystems) を用いて PCR 産物の塩基長を決定した。

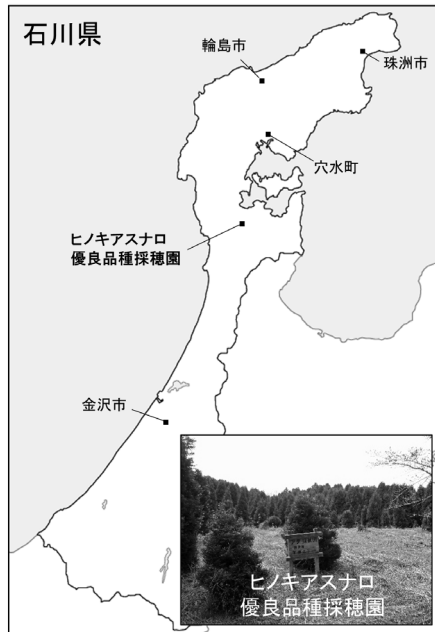


図-1. 試験地の位置図

3. データ解析

12 遺伝子座のジェノタイピングの結果に基づき、クローンを識別した。クローン間の遺伝的な近縁度 (r ; (2)) はソフトウェア ML-Relate (8) を用いて算出した。この値 (r) は、同一クローン間では 1.0、親子関係もしくは全兄弟間では 0.5、半兄弟間では 0.25、いとこ間では 0.125 の値をとる。クローンがどの在来品種に属するかを決定するために、(7) で解析した在来品種のジェノタイピングデータを用いた。

III 結果

1. ヒノキアスナロ優良品種採穂園のクローン解析

測量調査の結果、採穂園内には 952 個体が現存していた。採穂園の多くの個体は長期間にわたり管理が行われていないため、採穂園内部は林冠が閉鎖しており、林内は暗く下層植生も乏しかった。クローン解析の結果、479 個体は 35 クローン (C-1, 14, 54, 61~92) に分類された。1 クローン当たり平均個体数は 13.7 個体であった。個体数が 4 以上のクローンは 7 クローン (C-1, 14, 54, 61~64) であり、これら 7 クローンは全個体数の 91.9% (440 個体) を占めていた (表-1)。7 クロー

ンの内、2 クローン (C-1, 14) は石川県内のヒノキアスナロ人工林に存在しているクローン (7) と一致していた。各クローンの立木位置は、同一クローンごとにかたまっている場合もあるが、採穂園内に散らばって存在しているクローンも存在した (図-2)。

2. クローン間の遺伝的な近縁度

近縁度が 0.5 以上のクローンの組み合わせは、C-1 と C-61 ($r=0.551$), C-14 と C-62 および C-64 ($r=0.828$, 0.896), C-62 と C-64 ($r=0.859$) であった (表-2)。

表-1. ヒノキアスナロ優良品種採穂園に存在するクローンと個体数

在来 品種名	クローン名	個体数
マアテ	C-1	55
クサアテ	C-14	123
エソアテ	C-54	40
	C-61	105
	C-62	88
	C-63	25
	C-64	4
	C-65, C-66	各クローン 3
	C-67~C-73	各クローン 2
	C-74~C-92	各クローン 1

表-2. 主要な 7 クローンの近縁度 (r)

クローン名	C-1	C-14	C-54	C-61	C-62	C-63	C-64
C-1							
C-14	0.098						
C-54	0.161						
C-61	0.551	0.031	0.227				
C-62	0.075	0.828		0.031			
C-63	0.178	0.033		0.067	0.082		
C-64	0.098	0.896		0.031	0.859	0.058	

太字は $r \geq 0.500$ を示す。下三角行列の空欄は $r = 0.000$ を示す。

IV 考察

1. クローン解析

ヒノキアスナロ優良品種採穂園の 479 個体は 35 クローンを構成されていた。2 クローン (C-1, 14) を除く、その大半が現在の石川県内の人工林には存在していないクローンであった。採穂園の造成時に、林齢 60 年程度の林分から優良個体が選抜され、その個体から生産された挿し木苗が採穂園の造成に用いられたと考えると、採穂園のクローン構成は 1910 年 (明治 43 年) 頃の人工林のクローン構成を反映していると考えられる。このことは、過去のクローン林業では現在よりも多様なクローンを用いており、それらのクローンが栽培過程での自然選択または無意識的な人為選択等によって、

より少数のクローンのみが選抜されたと考えられる。

クローン林業では、優良な性質を有するクローンは長期間にわたり利用、保存される(10)。採穂園の35クローンの内、2クローン(C-1, 14)が現在の人工林のクローンと一致しており、ヒノキアスナロのクローン林業においても長期にわたり同じクローンが使用され続けていることが明らかになった。

採穂園の479個体の25.7%にあたる123個体が在来品種であるクサアテ(C-14)と同一クローンであった。クサアテは県内の人工林においては単一クローンで構成されており(7)、ヒノキアスナロの樹病の一つであるヒノキアスナロ漏脂病に罹患しやすい品種である(3)。クサアテが漏脂病に罹患すると、幹が腐朽および変形し、激害の場合は枯死する。一方で、クサアテは他の在来品種と比較して、成長が良くまた通直性が優れるため、柱材として重宝されていた品種である(12)。そのため、採穂園の造成時においても主要なクローンの一つとして取り扱われたと考えられる。

2. クローン間の遺伝的な近縁度

クローン林業では新たな品種を作出する場合に、優良な形質をもつ少数のクローン間の交配によって作出される場合がある。そのため、クローン間は遺伝的に近縁になりやすい(4)。採穂園内のクローン間では、C-61が人工林の在来品種であるマアテ(C-1)と近縁($r=0.551$)であり、C-62と64が人工林の在来品種であるクサアテ(C-14)と非常に近縁($r=0.828, 0.896$)であった。また、C-62とC-64も遺伝的に非常に近縁であった($r=0.859$)。C-1およびC-14はヒノキアスナロの古木にも存在しており、県内の代表的なクローンである(6)。ヒノキアスナロのクローン林業において

も、クローン間の交配により新たな個体が作出されていたと考えられる。

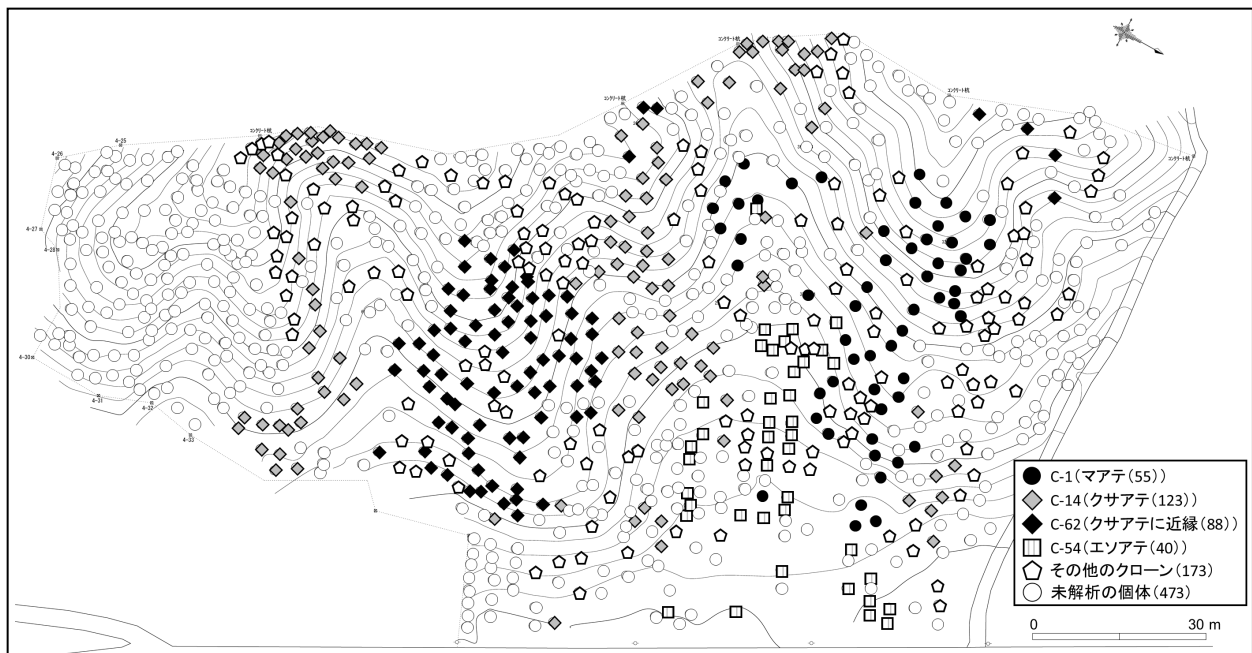
V おわりに

これまで採穂園においては、外見により在来品種を識別していたため、意図しない在来品種から苗木が生産される恐れがあった。本研究によりクローンおよびそれらの遺伝的な関係性、立木位置が明らかになり、遺伝情報に基づく個体ごとの管理が可能となった。クローンの中には、クサアテと遺伝的に近縁なクローンも存在しており、今後これらのクローンの形質を調査することで、成長や通直性に優れかつ漏脂病にも罹病しにくい形質をもつ新たなクローンが選抜できる可能性がある。

また、将来にわたりヒノキアスナロのクローン林業を発展させるためには、現在のクローンを保全しつつ、人工交配による優良個体の作出や、天然林からの再選抜等により、遺伝的多様性を向上させる必要がある。近年では石川県以外の地域においても、ヒノキアスナロの資源確保にむけて、優良品種採穂園・採穂園の新たな造成や整備が行われている。

謝辞

本研究は、石川県農林総合研究センター林業試験場からの情報提供および森林環境部の皆様のご協力をいただき調査を行いました。名古屋大学大学院生命農学研究科森林生態学研究室の戸丸信弘教授には、データ解析の助言をいただきました。ここに厚くお礼申し上げます。



図ー2. ヒノキアスナロ優良品種採穂園(石川県羽咋郡志賀町)の立木位置図
在来品種が明らかな4クローンのみを明示。凡例内の数値は個体数を示す。

引用文献

- (1) Blacket MJ, Robin C, Good RT, et al (2012) Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol Ecol Resour* 12:456–463
- (2) Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol Evol* 18:503–511
- (3) Forest Experiment Station Ishikawa Agriculture and Forest Research Center (2016) ATE (*Thujopsis dolabrata* var. *hondae*) in Noto. Ishikawa Prefectural Government, Kanazawa (In Japanese)
- (4) Goto S, Takahashi M, Matsumoto A, et al (2008) Genetic relationships and origin of commercial clones of Nangouhi, a vegetatively propagated cultivar of hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). *Breed Sci* 58:411–418
- (5) Ieiri R, Miyazima J (2000) Clone constitution of Nango-hi (a cutting cultivar of *Chamaecyparis obtusa* Endl.) using RAPD markers. *J Jpn Soc* 82:98–100
- (6) Ikeda T, Mishima K, Takata K, Tomaru N (2019) The origin and genetic variability of vegetatively propagated clones identified from old planted trees and plantations of *Thujopsis dolabrata* var. *hondae* in Ishikawa Prefecture, Japan. *Tree Genet Genomes* 15.
- (7) Ikeda T, Tokuda N, Tomaru N (2018) Identification of *Thujopsis dolabrata* var. *hondae* clones and their distribution across plantations in Ishikawa prefecture. *J For Res* 23:105–111
- (8) 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
- (9) Matsui Y, Ieiri R, Moriguchi Y, et al (2013) Clone Identification of Major Cutting Cultivars in *Cryptomeria japonica* D. Don and Evaluation of their Genetic Relationship in Kyushu. *J Jpn Soc* 95:220-226 (in Japanese with English summary)
- (10) Ohba K (1993) Clonal forestry with sugi (*Cryptomeria japonica*). In: Ahuja MR, Libby WJ (eds) *Clonal forestry II, conservation and application*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 66–90
- (11) Sato M, Hasegawa Y, Mishima K, Takata K (2015) Isolation and Characterization of 22 EST-SSR Markers for the Genus *Thujopsis* (*Cupressaceae*). *Appl Plant Sci* 3:
- (12) 斎藤晃吉 (ed) (1972) アテ造林史. 石川県林業試験場, 白山