

【特集】ゲノム情報に基づく林木育種の可能性 —スギを対象として—

スギの育種形質に対するゲノムワイド関連解析

内山 憲太郎^{*1}・岩田 洋佳²・伊原 徳子¹・上野 真義¹・木村 恵³・森口 喜成⁴・坪村 美代子³
・三嶋 賢太郎³・井城 泰一³・渡辺 敦史⁵・二村 典宏¹・篠原 健司⁶・津村 義彦¹

はじめに

林木の遺伝的改良はその長命性、個体サイズの大きさ、稚樹期間の長さなどにより大きく制限されている。特に、稚樹の間は多くの育種形質を安定して測定することができないことが、育種サイクルを完結させる世代時間を長期化させている (Zobel and Talbert 1984)。また、大規模検定林の維持コスト、育種形質の遺伝性の低さなども林木の遺伝的改良を妨げてきた。育種形質を支配するマーカーを用いた marker-assisted selection (MAS) は、野外における形質測定を必要とせず、育種を加速させる手段の一つとして期待される。しかしながら、実際には林木における MAS の利用は単純な遺伝性の形質のみに限られてきた (Strauss et al 1992)。これは、QTL マッピングを行う場合でも、林木の場合、育種集団の作成には上記のような困難さがある他、交配家系内で検出される QTL は用いた親間にある違いに依存するため、他の集団ではマーカーとして用いることが難しいことも理由の一つである。育種素材 (精英樹や自然集団) を対象に、QTL を検出し、有効に利用するためには bi-parental base を越えたマッピングが不可欠となる。

近年、モデル生物やその他の重要な生物種において、対象となる形質を支配する遺伝子の検出にゲノムワイドアソシエーション解析 (genome-wide association study、GWAS) が急速に用いられるようになってきた (Hirschhorn and Daly 2005 ; Atwell et al 2010 ; Huang et al

2011)。GWAS には QTL 解析にはない以下のような利点がある。1) 特別な分離集団の作成が必要ないこと、2) 候補遺伝子の事前情報が必要なく、より大きく、代表的な gene-pool を対象に、材料内に多型のあるすべての変異に対して QTL の探索ができること、3) QTL マッピングよりも高い解像度で解析が可能であること、などがあげられる。また、既に取得された形質データを利用することもでき、形質測定的时间とコストを最小化することが可能である。以上のように、アソシエーション解析は QTL-based MAS 特有の制限に打ち勝つ有用な方法として注目されている (Neale and Savolainen 2004)。一方で、針葉樹に対して GWAS を適応するには、そのゲノムサイズの巨大さ (> 10 Gb ; Murray et al 2004) と連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium、LD) の程度の低さ (数千 bp ; Neale and Savolainen 2004) が大きな問題となる。原因遺伝子と DNA マーカーとの LD を利用して QTL を検出する GWAS では、非常に大量の DNA マーカーをゲノム内に配置する必要がある。しかしながら、最近の次世代シーケンサーや SNP タイピング機器の高度化により、この問題はほぼ解消されてきている。森林総合研究所では GWAS のスギ (*Cryptomeria japonica*) への適応を目指した研究が進められており、本稿ではその結果の一部を紹介する。詳細は Uchiyama et al (2013) を参照されたい。

*E-mail: kruchiyama@ffpri.affrc.go.jp

¹ うちやま けんたろう、いはら とくこ、うえの さねよし、ふたむら のりひろ、つむら よしひこ 森林総合研究所

² いわた ひろよし 東京大学大学院農学生命科学研究科

³ きむら めぐみ、つぼむら みよこ、みしま けんたろう、いき たいいち 森林総合研究所林木育種センター

⁴ もりぐち よしなり 新潟大学大学院自然科学研究科

⁵ わたなべ あつし 九州大学大学院農学研究院

⁶ しのはら けんじ 理化学研究所

GWASの対象形質とSNP マーカー

GWASにはスギのコアコレクション (Miyamoto et al in press) 113 クローンを含む関東精英樹 427 個体を用いた。対象形質は雄花着花量 (坪村ら 2013)、材質 (応力波伝播速度) (三嶋ら 2011) を用い DNA マーカーにはスギの遺伝子配列断片情報から取得した 1,032 の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) を用いた (Uchiyama et al 2012)。スギのゲノム内から広く遺伝子をスクリーニングするために、1 遺伝子内に 1 つの SNP を設計した。スギのコアコレクションの選抜方法については Miyamoto et al. (in press) を、使用した SNP マーカーの探索については、Uchiyama et al. (2012) を、形質データの取得についての詳細は坪村ら (2013)、三嶋ら (2011) の各論文を参照されたい。

集団構造解析とアソシエーション解析

集団構造はアソシエーション解析においてしばしば擬陽性を導き、解析結果に大きな影響を与える (Lander and Schork 1994 ; Pritchard et al 2000)。作物種ではしばしば栽培化の過程や、地理的に起源が多様な材料を使用したことによる強い遺伝的構造が検出されることがある (Matsuoka et al 2002 ; Garris et al 2005)。そこで、まずスギの遺伝的構造について解析し、解析モデル内に組み込んだ。アソシエーションには、集団構造およびよりミクロな家系構造をモデルに組み込んだ efficient mixed model を使用した (Yu et al 2006 ; Bradbury et al 2007 ; Kang et al 2008)。検出された遺伝子について、NCBI の nr データベースに対して相同性検索を行い、機能を推定した。

集団構造解析の結果

針葉樹は集団間の遺伝的分化度も低く (Robledo-Arnuncio et al 2005 ; González-Martínez et al 2007)、スギの天然林における解析においても、集団間の分化度は非常に低いことが報告されている ($F_{ST}=0.0391$) (Tsumura et al 2012)。しかしながら、STRUCTURE 解析 (Pritchard et al 2000) の結果、スギのコアコレクションには日本海側と太平洋側で分かれる大きな二つのクラスターが、さらに北東北および屋久島を分けるクラスターがあることが示された (図-1)。この結果は、スギの天然林の解析結果 (Tsumura et al 2012 ; Uchiyama et al 2014) と一致するもの

であると考えられ、スギのコアコレクションは自然変異の分布を強く反映する遺伝的構造を示していると考えられた。スギは古くから人に利用されており、広く造林が行われてきたが、精英樹の選抜は最近 2 世代目からの選抜が始まったところであり (林木育種協会 2004)、スギの栽培化と育種は初期の段階にあるためと考えられた。また、スギのコアコレクション内には天然林と同程度に高い遺伝的多様性が保持されており、栽培化による遺伝的多様性の低下 (Hamblin et al 2011) は認められず、現在の精英樹は自然集団の変異を十分に保持していることも示されている (Uchiyama et al 2014)。

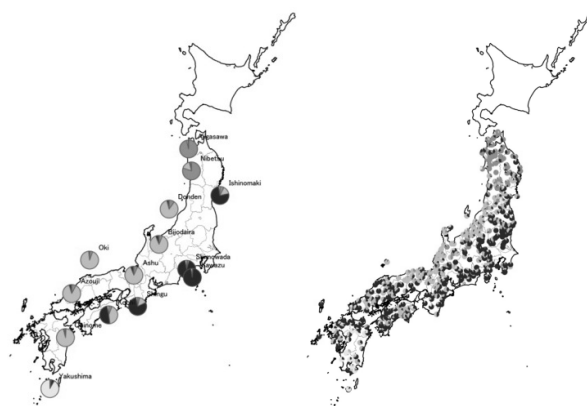


図-1 スギの天然林 (左) およびコアコレクション (右) で検出された遺伝的クラスター。各色はクラスターの種類を示す。Uchiyama et al (2014) より改変。

アソシエーション解析の結果

今回の解析では、種の持つ遺伝的な集団構造の補正に STRUCTURE 解析の Qmatrix を用いた。一方で、共通の親や兄弟などの血縁構造もまた擬陽性の原因となる (Astle and Balding 2009)。Yu ら (2006) によって集団構造と血縁構造を組み込んだ混合モデルによる解析が提唱され、多くの作物種 (Casa et al 2008 ; Ghavami et al 2011 ; Mamidi et al 2011) や樹木種 (González-Martínez et al 2007) でのアソシエーション解析において用いられている。その多くの場合で、集団構造と血縁構造のどちらも組み込んだモデルが最もよい結果を得ているが (Ghavami et al 2011 ; Mamidi et al 2011)、適したモデルは場合によって異なるため (Atwell et al 2010 ; Mamidi et al 2011)、今回は複数のモデルをテストした。アソシエーション解析の各モデルにおける擬陽性が含まれる程度について調べるため、

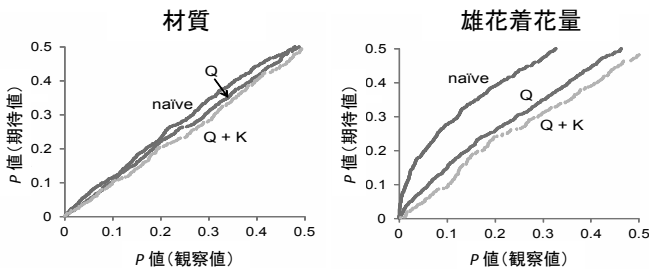


図-2 アソシエーション解析の各モデル (naive, Q, Q+K) における偽陽性の推定

P 値の期待値と観察値を各モデルについてプロットしたものが図-2 である。

この P-Pplot では、擬陽性のない理想的な場合には、 $y = x$ のラインで示される一様な分布が得られる (Yu et al 2006 ; Mamidi et al 2011)。雄花着花量、材質ともに naive モデルでは $y = x$ から大きく逸脱し、擬陽性が認められた。集団構造をモデルに組み込むことで (Q)、その程度は大きく改善したが、さらに血縁構造をモデルに組み込むことで (Q+K)、ほぼ $y = x$ のラインに乗るよい近似分布が得られた。

このことは、スギにおいては、集団構造だけでなく血縁構造もアソシエーションモデルに組み込む必要があることを示している。しかしながら、集団構造と家系構造を組み込むことで改善した程度は、形質によって大きく異なっていた。雄花着花量では、集団構造を考慮することで擬陽性が大幅に減少しており、この形質が材質よりも強く遺伝的構造の影響を受けていることを示している。1,032 座のアソシエーション解析の各モデルで検出された有意な遺伝子座数を表-1 に示す。P-P plot で示されたように、雄花着花量との解析で有意なアソシエーションが認められた遺伝子座数は集団構造を考慮することで大きく減少しており (87 座から 28 座)、その程度は材質での減少 (17 から 12) に比べて非常に高い (表-1)。

表-1 各モデルで検出された有意なアソシエーションを示した遺伝子座の数

モデル	モデルの説明	材質	雄花着花量
naive	単回帰	17	87
Q	集団構造を考慮	12	28
Q+K	集団構造と家系構造を考慮	5	1

表-2 アソシエーション解析で有意となった遺伝子座の詳細

形質	遺伝子座	SNP	SNPの種類	連鎖群	P 値	MAF	相同性が認められた遺伝子の機能	E 値
材質	gSNP01986	[A/T]	5'UTR	-	8.81E-05	0.334	microtubule-associated protein RP/EB family member 1-like	2.95E-84
	gSNP04252	[T/C]	synonymous	5	1.89E-03	0.175	lecithin cholesterol acyltransferase-like protein	1.81E-35
	gSNP03140	[A/C]	5'UTR	11	4.43E-03	0.269	RNA-binding protein 40-like	2.89E-25
雄花着花量	gSNP01022	[A/G]	synonymous	10	4.51E-03	0.269	cytochrome P450	2.07E-48
	gSNP01196	[T/C]	intron	-	9.98E-03	0.026	fatty acyl-CoA reductase	3.94E-45
	gSNP00856	[T/C]	synonymous	-	2.73E-03	0.155	CLIP-associating protein	8.76E-25

P-Plot の結果と合わせ、この雄花着花量の naïve モデルの結果には遺伝的構造が生み出した多くの擬陽性が含まれていると考えられ、その数は集団構造と血縁構造をモデルに組み込むことで大きく減少し、1座のみが有意となった。材質では5座で有意なアソシエーションが検出された。検出された遺伝子の詳細を表-2に示す。材質との解析で有意な相関が認められた gSNP01986 は、微小管に関わるタンパクをコードする遺伝子と相関があった。これは表層微小管の安定性を左右し、植物の細胞骨格の変化を調整すると考えられている (Staiger 2000)。その他にも、リグニン形成に関わる遺伝子や (gSNP01022)、コルク質の形成に関わる遺伝子などとの相関性が認められた (gSNP01196)。実際の遺伝子の機能を明らかにするためには、さらなる解析が必要である。今回検出された SNP のモデル上での説明力はいずれも数%程度と低く、これらの形質が多遺伝子支配であるという従来の報告と一致している (Thumma et al 2005 ; González-Martínez et al 2007 ; González-Martínez et al 2008 ; Ingvarsson et al 2008 ; Thumma et al 2009 ; Dillon et al 2010 ; Beaulieu et al 2011)。

針葉樹における GWAS の可能性

これまで、LD の低い針葉樹での GWAS は、大量の SNP マーカーが必要となることから (Neale and Kremer 2011)、現実的ではないとされており (Neale and Savolainen 2004)、主に候補遺伝子を対象としたアプローチがとられてきた (たとえば González-Martínez et al 2007 ; González-Martínez et al 2008 ; Beaulieu et al 2011 ; Cumbie et al 2011)。しかしながら、最近の報告では、針葉樹においても、非常に長い LD が報告され始めている (Eckert et al 2010 ; Pyhäjärvi et al 2011)。Moritsuka et al. (2012) によれば、スギにおいて非コード領域では 100kbp を越えて、LD が保たれる例も報告されている。また、多くの植物種では組み換え価はゲノムの領域により幅がある (総説として Gaut et al, 2007)。もし、スギのゲノム内の多くが長い LD のブロックとして存在しているのであれば、アソシエーション解析に必要な SNP マーカーはゲノムサイズが大きい針葉樹でもこれまでの予想より少ない数となり、GWAS も実現可能と考えられる (Ohri and Khoshoo 1986)。一方で、効果の小さな QTL の情報をいかに育種に利用するかについてはまだハードルがあるが、最近の genomic selection (GS) (Meuwissen et al 2001) がそのひとつの解決策になるかもしれない。スギを含めた林木育種における GS の利用についてはすでに議論されている (Grattapaglia and Resende

2011 ; Iwata et al 2011 ; Resende Jr et al 2012a ; Resende Jr et al 2012b ; Resende et al 2012)。GS では目的とする形質と多数のマーカーの遺伝子型との間で回帰モデルを作成するが、原因遺伝子の特定は必ずしも必要なく (Meuwissen et al 2001 ; Iwata et al 2011)、GWAS のために作成したゲノムワイドマーカーを直接 GS のモデル作成に使用することができる。MAS は GWAS で形質との関連が検出された SNP のみを利用するが、GS ではゲノムワイドに設定した高密度のマーカー全てを形質の予測モデルに使用するため、多くの QTL の効果を組み込むことができると考えられる。候補遺伝子の遺伝的多型の解析に基づく MAS は主働遺伝子によって支配されている形質に適し、育種形質が効果の小さな多くの多型によってコントロールされている場合は GS がより大きな可能性を持つ。よって、GS と GWAS は相補的にお互いの欠点を補う関係にあり、針葉樹の育種においても両方からのアプローチが有用であると考えられる。多検体を大量の DNA マーカーでタイピングするコストの問題は、次世代シーケンサーを利用した遺伝子型の決定が急速に普及してきている現在 (Davey et al 2011 ; Elshire et al 2011 ; Kilian and Graner 2012 ; Edwards et al 2013) においては、遠からず解決されるだろう。

謝辞

本研究で使用した SNP タイピング解析は農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センターの技術支援で実施した。また、スギコアコレクションの解析においては、材料ならびに情報の提供について、林木育種センターの宮本尚子博士、高橋誠博士にご支援を受けた。ここに厚くお礼申し上げる。なお、本研究は、生物系特定産業技術研究支援センターのイノベーション創出基礎的研究推進事業「スギ優良個体の選抜のためのゲノムワイドアソシエーション研究」の支援を得た。ここに感謝の意を表す。

引用文献

- Astle W, Balding DJ (2009) Population structure and cryptic relatedness in genetic association studies. *Statistical Science* 24: 451–471
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT (2010)

- Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465: 627–631
- Beaulieu J, Doerksen T, Boyle B, Clément S, Deslauriers M, Beauseigle S, Blais S, Poulin PL, Lenz P, Caron S (2011) Association genetics of wood physical traits in the conifer white spruce and relationships with gene expression. *Genetics* 188: 197–214
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633–2635
- Casa AM, Pressoir G, Brown PJ, Mitchell SE, Rooney WL, Tuinstra MR, Franks CD, Kresovich S (2008) Community resources and strategies for association mapping in sorghum. *Crop Science* 48: 30–40
- Cumbie WP, Eckert A, Wegrzyn J, Whetten R, Neale D, Goldfarb B (2011) Association genetics of carbon isotope discrimination, height and foliar nitrogen in a natural population of *Pinus taeda* L. *Heredity* 107: 105–114
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature reviews Genetics* 12: 499–510
- Dillon SK, Nolan M, Li W, Bell C, Wu HX, Southerton SG (2010) Allelic variation in cell wall candidate genes affecting solid wood properties in natural populations and land races of *Pinus radiata*. *Genetics* 185: 1477–1487
- Eckert AJ, Bower AD, González-Martínez SC, Wegrzyn JL, Coop G, Neale DB (2010) Back to nature: ecological genomics of loblolly pine (*Pinus taeda*, Pinaceae). *Molecular Ecology* 19: 3789–3805
- Edwards D, Batley J, Snowdon RJ (2013) Accessing complex crop genomes with next-generation sequencing. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 1–11
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6: e19379
- Garris AJ, Tai TH, Coburn J, Kresovich S, McCouch S (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169: 1631–1638
- Gaut BS, Wright SI, Rizzon C, Dvorak J, Anderson LK (2007) Recombination: an underappreciated factor in the evolution of plant genomes. *Nature Reviews Genetics* 8: 77–84
- Ghavami F, Elias EM, Mamidi S, Ansari O, Sargolzaei M, Adhikari T, Mergoum M, Kianian SF (2011) Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1: 209–218
- González-Martínez SC, Wheeler NC, Ersoz E, Nelson CD, Neale DB (2007) Association genetics in *Pinus taeda* L. I. Wood property traits. *Genetics* 175: 399–409
- González-Martínez SC, Huber D, Ersoz E, Davis JM, Neale DB (2008) Association genetics in *Pinus taeda* L. II. Carbon isotope discrimination. *Heredity* 101: 19–26
- Grattapaglia D, Resende MDV (2011) Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes* 7(2): 241–255
- Hamblin MT, Buckler ES, Jannink JL (2011) Population genetics of genomics-based crop improvement methods. *Trends in Genetics* 27: 98–106
- Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature reviews Genetics* 6: 95–108
- Huang X, Wei X, Sang T, Zhao Q, Feng Q, Zhao Y, Li C, Zhu C, Lu T, Zhang Z (2011) Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics* 42: 961–967
- Ingvarsson PK, Garcia M, Luquez V, Hall D, Jansson S (2008) Nucleotide polymorphism and phenotypic associations within and around the phytochrome B2 locus in European aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). *Genetics* 178: 2217–2226
- Iwata H, Hayashi T, Tsumura Y (2011) Prospects for genomic selection in conifer breeding: a simulation study of *Cryptomeria japonica*. *Tree Genetics & Genomes*: 1–12
- Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, Eskin E (2008) Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709–1723
- Kilian B, Graner A (2012) NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. *Briefings in Functional Genomics* 11: 38–50
- Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037–2048
- Mamidi S, Chikara S, Goos RJ, Hyten DL, Annam D, Moghaddam SM, Lee RK, Cregan PB, McClean PE (2011) Genome-wide association analysis identifies candidate genes associated with iron deficiency chlorosis in soybean. *The Plant Genome* 4: 154–164
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez J, Buckler

- E, Doebley J (2002) A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6080–6084
- Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157: 1819–1829
- 三嶋賢太郎・井城泰一・平岡裕一郎・宮本尚子・渡辺敦史 (2011) 関東育種基本区におけるスギ精英樹クローンの立木材質の評価. *木材学会誌* 57: 256–264
- Miyamoto N, Ono M, Watanabe A (in press) Construction of a core collection and evaluation of genetic resources for *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar) *Journal of Forest Research*: DOI 10.1007/s10310-014-0460-3
- Moritsuka E, Hisataka Y, Tamura M, Uchiyama K, Watanabe A, Tsumura Y, Tachida H (2012) Extended linkage disequilibrium in noncoding regions in a conifer, *Cryptomeria japonica*. *Genetics* 190: 1145–1148
- Murray BG, Leitch IJ, Bennett MD. (2004) Gymnosperm DNA C-values database (release .0, Dec. 2004). <http://www.kew.org/cvalues/>
- Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science* 9: 325–330
- Neale DB, Kremer A (2011) Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics* 12: 111–122
- Ohri D, Khoshoo TN (1986) Genome size in gymnosperms. *Plant Systematics and Evolution* 153(1): 119–132
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Pyhäjärvi T, Kujala ST, Savolainen O (2011) Revisiting protein heterozygosity in plants—nucleotide diversity in allozyme coding genes of conifer *Pinus sylvestris*. *Tree Genetics & Genomes* 7: 385–397
- Resende Jr MFR, Muñoz P, Resende MDV, Garrick DJ, Fernando RL, Davis JM, Jokela EJ, Martin TA, Peter GF, Kirst M (2012a) Accuracy of genomic selection methods in a standard data set of Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.). *Genetics* 190: 1503–1510
- Resende Jr MFR, Muñoz P, Acosta JJ, Peter GF, Davis JM, Grattapaglia D, Resende MDV, Kirst M (2012b) Accelerating the domestication of trees using genomic selection: accuracy of prediction models across ages and environments. *New Phytologist* 193: 617–624
- Resende MDV, Resende Jr MFR, Sansaloni CP, Petrolini CD, Missiaggia AA, Aguiar AM, Abad JM, Takahashi EK, Rosado AM, Faria DA (2012) Genomic selection for growth and wood quality in *Eucalyptus*: capturing the missing heritability and accelerating breeding for complex traits in forest trees. *New Phytologist* 194: 116–128
- Robledo-Arnuncio JJ, Collada C, Alia R, Gil L (2005) Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* L. in a Mediterranean refugial area. *Journal of Biogeography* 32: 595–605
- Staiger CJ (2000) Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Biology* 51: 257–288
- Strauss SH, Lande R, Namkoong G (1992) Limitations of molecular-marker-aided selection in forest tree breeding. *Canadian Journal of Forest Research* 22: 1050–1061
- Thumma BR, Nolan MF, Evans R, Moran GF (2005) Polymorphisms in cinnamoyl CoA reductase (CCR) are associated with variation in microfibril angle in *Eucalyptus* spp. *Genetics* 171: 1257–1265
- Thumma BR, Matheson BA, Zhang D, Meeske C, Meder R, Downes GM, Southerton SG (2009) Identification of a cis-acting regulatory polymorphism in a eucalypt COBRA-like gene affecting cellulose content. *Genetics* 183: 1153–1164
- 林木育種協会 (2004) 林木育種プロジェクト. 林木育種協会, 東京
- 坪村美代子・武津英太郎・渡辺敦史 (2013) 関東育種基本区におけるスギ精英樹クローン雄花着花量の評価. *日本森林学会誌* 95: 156–162
- Tsumura Y, Uchiyama K, Moriguchi Y, Ueno S, Ujino-Ihara T (2012) Genome scanning for detecting adaptive genes along environmental gradients in the Japanese conifer, *Cryptomeria japonica*. *Heredity* 109: 349–360
- Uchiyama K, Ujino-Ihara T, Ueno S, Taguchi Y, Futamura N, Shinohara K, Tsumura Y (2012) Single nucleotide polymorphisms in *Cryptomeria japonica*: their discovery and validation for genome mapping and diversity studies. *Tree Genetics & Genomes* 8: 1213–1222
- Uchiyama K, Iwata H, Moriguchi Y, Ujino-Ihara T, Ueno S, Taguchi Y, Tsubomura M, Mishima K, Iki T, Watanabe A, Futamura N, Shinohara K, Tsumura Y (2013) Demonstration of genome-wide association studies for identifying markers for wood property and male strobili traits in *Cryptomeria japonica*. *PLoS ONE* 8: e79866

Uchiyama K, Miyamoto N, Takahashi M, Watanabe A, Tsumura Y (2014) Population genetic structure and the effect of historical human activity on the genetic variability of *Cryptomeria japonica* core collection, in Japan. *Tree Genetics & Genomes* 10: 1257-1270

Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh Bi I, Yamasaki M, Doebley

JF, McMullen MD, Gaut BS, Nielsen DM, Holland JB (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics* 38: 203–208

Zobel B, Talbert J (1984) *Applied forest tree improvement*. John Wiley & Sons, New York