

# 森林遺伝育種学会大会 第4回

## 講演要旨集

平成27年(2015) 11月6日(金)

東京大学農学部キャンパス

弥生講堂アネックス・セイホクギャラリー

## 発表課題と講演者

- 1) エリートツリーの性能評価試験 –育苗時における家系間差–  
加藤一隆（森林総合研究所林木育種センター）ほか
- 2) 植栽後7年生ヒノキつぎ木苗の剪定方法の検討  
小林沙希（千葉県農林総合研究センター森林研究所）
- 3) 伐採後のブナの萌芽能力に地域間差は存在するか？ –産地試験地を用いた検証–  
後藤晋（東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林）ほか
- 4) Transcript level analysis of secondary cell wall formation in *Eucalyptus urophylla* x *E.grandis*  
南藤和也（日本製紙(株)研究開発本部）ほか
- 5) 東アフリカの有用樹種 *Melia volkensii* における根挿し増殖の成功条件  
花岡 創（森林総合研究所林木育種センター）ほか
- 6) カラマツ属の樹冠に着生している球果数の簡易推定方法の開発  
田村明（森林総合研究所林木育種センター育種部育種第一課）ほか
- 7) 岐阜県春日のチャノキ地域栽培系統の遺伝的変異と集団動態  
玉木一郎（岐阜県立森林文化アカデミー）ほか
- 8) 21年生コウヨウザンの成長と材のヤング率の関係  
近藤禎二（森林総合研究所林木育種センター）ほか
- 9) 青森県カラマツ採種園の着花特性と BAP 処理効果  
田中功二（青森県産業技術センター林業研究所）
- 10) 関西育種基本区におけるヒノキ第2世代精英樹候補木の多様性評価  
岩泉正和（森林総合研究所林木育種センター関西育種場）ほか
- 11) 英国で保存されているサクラの栽培品種について  
勝木俊雄（森林総合研究所多摩森林科学園）
- 12) 抵抗性品種開発に向けたクロマツの遺伝的多様性評価  
宮田翔介(九州大学大学院生物資源環境科学府)ほか
- 13) 温度と日長がスギ木部遺伝子発現に与える影響  
福田有樹(九州大学大学院生物資源環境科学府)ほか
- 14) マイクロアレイを利用したスギさし木の遺伝子発現プロファイル  
田中杏奈(九州大学農学部)ほか
- 15) 爽春家系における雄性不稔個体識別マーカーの開発  
郷田乃真人（九州大学大学院生物資源環境科学府）ほか
- 16) 全国から収集したマツノザイセンチュウの特性評価  
小林玄（九州大学生物資源環境科学府）ほか
- 17) ダイアレル分析による静岡県産スギ精英樹の特性  
山田晋也（静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター）ほか
- 18) マツ材線虫病抵抗性クロマツの挿し木発根性における母樹からの採穂部位、挿し

- 穂の重量、冬芽数、針葉伸長の影響  
袴田哲司（静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター）ほか
- 19) *Bursaphelenchus xylophilus* の継代培養に伴う対立遺伝子頻度の変化  
泉湧一郎（九州大学農学部）ほか
- 20) クロマツ生体防御遺伝子群の発現とマツノザイセンチュウの樹体内における挙動との関連性  
山口莉未（九州大学大学院生物資源環境科学府）ほか
- 21) クロマツ種子発芽におけるエタノール精選と灯油精選の比較  
山野邊太郎（森林総合研究所林木育種センター）ほか
- 22) スギ F1 クローン若齢木の断幹処理による萌芽発生数について  
倉本哲嗣（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）ほか
- 23) 抵抗性クロマツの最適な採種園設計に向けた近親交配の影響解析  
松永孝治（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）ほか
- 24) カラマツ採種園で行った環状剥皮と施肥の着果量に対する影響並びに環状剥皮後の樹勢回復のために行った巻き込み促進処理の効果  
蓬田英俊（岩手県林業技術センター）
- 25) パルプ生産のために選抜された *Eucalyptus camaldulensis* の木材性質の家系間変異  
石栗 太（宇都宮大学農学部）ほか
- 26) 森林樹木種における効率的なゲノムワイドマーカーの開発  
内山憲太郎（森林総合研究所）ほか
- 27) ウイルスベクターを用いた針葉樹における機能未知遺伝子の逆遺伝学的解析システム  
小長谷賢一（森林総合研究所森林バイオ研究センター）ほか
- 28) マツ材線虫病に対するクロマツ生体防御反応の解明に向けた遺伝子発現解析  
平尾知士（森林総合研究所森林バイオ研究センター）ほか
- 29) マツ材線虫病に対するクロマツ生体防御反応の解明に向けた遺伝子発現解析  
平尾知士（森林総合研究所森林バイオ研究センター）ほか
- 30) シデコブシとコブシ間の雑種形成  
行年恭兵（名古屋大学大学院生命農学研究科）ほか
- 31) DNA マーカーによるスギ精英樹の個体識別の効率化に向けた検討  
柳原尚貴（九州大学大学院生物資源科学府）ほか
- 32) 八甲田山に分布する北限周辺のスギ孤立集団における葉緑体と核の SSR マーカーを用いたクローン解析  
長谷川陽一（秋田県立大学木材高度加工研究所）ほか
- 33) 本邦に生息するニホンジカ (*Cervus nippon*) のミトコンドリアゲノム多型  
白石 進（九州大学大学院農学研究院）
- 34) 高温ストレス下におけるスギ実生の遺伝子発現比較解析  
伊原徳子（森林総合研究所）

- 35) 横打撃共振法による九州地方のスギ精英樹の心材含水率の推定  
倉原雄二 (森林総合研究所林木育種センター九州育種場)
- 36) 「越の彼岸」の遺伝的起源に関する考察  
加藤珠理 (森林総合研究所多摩森林科学園) ほか
- 37) ヒノキの挿し穂で発現する遺伝子について  
上野真義 (森林総合研究所) ほか
- 38) スギ遺伝子に基づく SNP の収集とマーカー開発  
田村美帆 (九州大学大学院農学研究院) ほか
- 39) QTL 解析に向けたマッピング集団の形質評価  
井城泰一 (森林総合研究所林木育種センター東北育種場) ほか
- 40) GWAS に向けた第一世代精英樹の形質評価  
高島有哉 (森林総合研究所林木育種センター) ほか
- 41) 大規模ジェノタイピングによるスギ連鎖地図作成と育種形質の QTL 解析  
三嶋賢太郎 (森林総合研究所林木育種センター) ほか
- 42) スギにおける組織・季節・樹齢別の大規模遺伝子発現プロファイル  
能勢美峰 (森林総合研究所林木育種センター) ほか
- 43) スギ精英樹における GWAS とゲノミック予測  
平岡裕一郎 (森林総合研究所林木育種センター) ほか
- 44) 成長速度に優れた種苗の多様な施業下での成長解析  
宮崎潤二 (佐賀県林業試験場) ほか
- 45) 統計遺伝学的解析手法の改良による遺伝的能力の予測精度向上の試み  
武津英太郎 (森林総合研究所林木育種センター九州育種場) ほか
- 46) 新世代林業種苗を迅速に増殖するための取り組み  
大平峰子 (森林総合研究所林木育種センター) ほか
- 47) 室内種子生産技術の実用化に向けた諸条件の検討と交配実態の把握  
栗田学 (森林総合研究所林木育種センター九州育種場) ほか
- 48) コンテナ育苗における少花粉ヒノキサシ木苗の成長比較  
茂木靖和 (岐阜県森林研究所) ほか
- 49) 多産性カラマツ後代の着花性の評価  
三浦真弘 (森林総合研究所林木育種センター関西育種場) ほか
- 50) 温暖化がグイマツ×カラマツ雑種家系「クリーンラーチ」の直径成長に及ぼす影響  
来田 和人 (北海道立総合研究機構林業試験場) ほか
- 51) スンダ地域におけるリュウノウジュ (*Dryobalanops aromatica*) の遺伝構造と系統地理  
原田光 (愛媛大学農学部) ほか
- 52) 簡易検定手法による無花粉スギ実生苗生産  
齋藤央嗣 (神奈川県自然環境保全センター)

## エリートツリーの性能評価試験 ―育苗時における家系間差―

加藤一隆・大平峰子（森林総合研究所林木育種センター）

森林総合研究所林木育種センターでは、成長形質に優れ雄花着生量も少ないエリートツリー（第二世代精英樹）を選抜中であるが、今後これらの種苗を普及するためには性能評価を行い公表する必要がある。そこで、エリートツリー同士の交配によって得られた 12 家系の種子をコンテナ（150cc 及び 300cc）及び苗畑で育苗し、定期的に苗高、地際径を調査後、これらの値及び形状比（苗高/地際径）に関して家系間差を解析した。コンテナ及び苗畑両条件で育苗した苗とも、苗高、地際径及び形状比は有意な家系間差がみられた。また、育苗 12 か月後のコンテナにおけるデータと育苗 15 か月後の苗畑におけるデータについて家系平均に関して育成条件（コンテナ vs 苗畑）間の相関関係を解析したところ、苗高、地際径及び苗高と地際径の関係は育成条件に関わらず有意な正の相関がみられたが、形状比、形状比と苗高、及び形状比と地際径の関係では一定の傾向がみられなかった。したがって、伸長や肥大の成長スピードは育成条件に関わらず家系ごとに一定の傾向はあるものの、伸長成長と肥大成長の投下割合は育成条件で異なることが示唆された。

## 植栽後 7 年生ヒノキつぎ木苗の剪定方法の検討

小林沙希（千葉県農林総合研究センター森林研究所）

ヒノキのミニチュア採種園の実用化にあたり、最も重要な着花促進技術は開発された。しかし、剪定後に不定芽が発生しにくい性質を持つことから、ヒノキに適した断幹、剪定技術は開発されていない。このため、剪定と関連する植栽間隔についても明らかにされておらず、管理技術を確立していく必要がある。

そこで、植栽後 7 年生ヒノキつぎ木苗を対象に、2014 年 5 月下旬に幹から水平方向 30 cm、40 cm、50 cm の長さで円筒状に枝を剪定し、約 1 年後、幹から二方向の枝張長と樹高を測定した。なお、断幹はすべて高さ 130 cm とし、剪定と同時に実施した。その結果、剪定 30 cm の枯損率は約 45% と高く、断幹、剪定によるダメージが大きいことが判明した。また、水平方向の伸長量は剪定 40 cm で最長の平均 53.9 cm となった。

さらに剪定を、スギの場合に通常行われている採種 2 年前ではなく、採種前年に行うことが可能か検討するため、剪定後の 2014 年 7 月下旬に着花処理を試みたが、剪定による影響が大きく、十分な着花効果は得られなかった。以上のことから、40 cm で剪定する場合、採種前年、採種年にそれぞれ約 50 cm 枝が伸長すると、植栽間隔は 2.8m 必要と考えられた。

### 伐採後のブナの萌芽能力に地域間差は存在するか？

#### －産地試験地を用いた検証－

後藤 晋（東京大学大学院農学生命科学研究科）、高橋 誠（林木育種センター）、  
大谷雅人（林木育種センター北海道育種場）

萌芽再生とは、樹木の地上部が大きな損傷を受けた際に、その残存部分からシュート（萌芽枝）が生じて地上部が再生される現象である。多雪地では冠雪による幹折れが頻発するため、寡雪地と比較して萌芽再生能力の高い個体がより適応的な可能性がある。しかし、樹木の萌芽再生能力の地域間差を検証した例はほとんどない。ブナでは各地に産地別試験地が設定され、葉の大きさや開葉フェノロジーに産地間差があることが知られており、これらの変異には生態的に適応的な意義がある可能性が考えられている。山梨県山中湖村に設定されたブナ産地別試験地を2014年に皆伐したところ、伐根から萌芽枝が出現した。そこで、2015年7月に伐根高を記録するとともに、発生した萌芽枝を全て収穫した。収穫した萌芽枝は、60℃で48時間処理し、乾燥重量を求めた。萌芽枝の乾燥重量に各個体の胸高直径（DBH）、伐根高、産地の積雪量（1981～2010年の平年値）が及ぼす影響を調べた結果、DBHと伐根高に有意な効果はなかったが、積雪量は有意な正の効果があることが示された。すなわち、積雪量の多い産地に由来する個体ほど萌芽枝の発生量が多い傾向が認められた。

### Transcript level analysis of secondary cell wall formation in *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*

南藤 和也、新屋 智崇、陶山健一郎、岩田英治、福田雄二郎、小野木晋一 河岡明義（日本製紙(株)研究開発本部）、林和典、Antonio C. Rosa（Amapa Florestal e Celulose S.A. (AMCEL), Forest Research Division）

ユーカリのハイブリッド種（*Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*）は、その材特性やパルプ適正から、製紙産業にとって最も重要な樹種の一つとなっている。ブラジルの植林・チップ製造会社であるAMCEL社の実生林選抜試験地の964系統の材質を近赤外分光法にて測定したところ、 $\alpha$ セルロース含量が37.7～59.0%のばらつきがあった。それら系統から様々な $\alpha$ セルロース含量の18系統を選定し、形成層からRNA抽出した。次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)を用いて、RNAseqによる網羅的遺伝子発現解析を行い、2次細胞壁合成に関連する遺伝子の転写レベルと $\alpha$ セルロース含量との間の相関性を調査した。その結果、正の相関が、セルロース合成遺伝子（*CesA*）と $\alpha$ セルロース含量の間で認められた。さらに、スクロース合成遺伝子（*Susy*）の転写レベルについても $\alpha$ セルロース含量と明確な相関があった。これらの結果、*CesA* や *Susy* 等の細胞壁合成関連遺伝子が $\alpha$ セルロース含量と関連している可能性が示された。

## 東アフリカの有用樹種 *Melia volkensii* における根挿し増殖の成功条件

花岡 創、大平峰子、松下通也(林木育種センター)、Jason Kariuki(KEFRI)

*Melia volkensii* は東アフリカの半乾燥地域に分布する樹木であり、成長性、耐乾燥性、材質等に優れる優良木である。近年には、それらの形質がより優れた品種を開発するための育種研究が取組まれており、一定の成果を収めつつある。それら育種による開発品種の普及にあたってクローン増殖技術が必要とされるが、*Melia volkensii* は挿し木によるクローン増殖が難しいことが経験的に知られており、簡便かつ成功率の高いクローン増殖技術が求められていた。本研究では、根の断片を用いた根挿しによるクローン増殖手法に着目し、根挿しが成功する（不定芽形成に至る）ための条件について、主に用いる根断片のサイズという観点から検討を行った。根挿しに用いる根断片の切断面の直径および生重と不定芽の形成率との関係について調査した結果、それら両方の値が大きくなるほど不定芽の形成率が高くなることを明らかにした。根の切断面の直径が15mm以上かつ生重が20g以上の根断片を用いることで不定芽の形成率は約80%となり、これが根挿しに用いる根断片の一つの基準になると考えられた。

## カラマツ属の樹冠に着生している球果数の簡易推定方法の開発

田村明、松下通也（森林総合研究所林木育種センター育種部育種第一課）、矢野慶介（森林総合研究所林木育種センター北海道育種場）、来田和人、今博計、石塚航（北海道立総合研究機構 森林研究本部林業試験場森 林資源部）

近年、カラマツの育種種苗の需要が増加してきている。採種園にあるカラマツの育種種子の生産量を推定するために、まずは樹冠に着生している球果数を簡易に推定する方法を開発する必要がある。2014年6月に北海道育種場構内に植栽されていた樹齢11年から58年のカラマツ属（カラマツとグイマツ）53個体の樹冠に着生していた球果数を推定する手法を検討した。解析用のインデックスとして高所作業車による実測、5段階指数（北海道育種場方式）、樹冠中3箇所の部分実測（道総研林業試験場方式）、幹材積を用いた。推定方法として階層ベイズモデルを用いた。この階層ベイズモデルは、複数の異なるインデックスを統合することができ、樹冠に着生している球果数を推定する手法として利用できると思われる。

## 岐阜県春日のチャノキ地域栽培系統の遺伝的変異と集団動態

玉木一郎，久世達紀，廣田桂子（岐阜県立森林文化アカデミー），水野瑞夫（岐阜薬科大学）

日本のお茶畑の9割以上はクローン品種で構成されているが、残り1割以下の地域栽培系統のお茶畑では、昔から種子で増やされてきているため、貴重な遺伝的多様性を保持している。岐阜県春日では数百年前から10集落で地域栽培系統が栽培されている。核マイクロサテライトを使い、これら10集団の遺伝的多様性と遺伝的分化の程度、集団動態を調べた。全10集団は同程度の遺伝的多様性を示し、また有意な遺伝的分化は認められず、全体で一つの大きな集団を形成していた。春日の遺伝的多様性を京都の地域栽培系統の集団と比較したところ、同程度の値を示した。一方、中国との比較では、春日は特に低い値を示した。遡上合同理論に基づいて春日集団の過去の集団動態を推定した結果、春日集団は965年前に急激な集団サイズの減少が生じ（減少前の0.1%まで減少した）、その後増加して現在に至ることが分かった。この集団サイズ縮小のタイミングと強度は、古い文献にある9～12世紀に仏僧が中国からチャノキをもたらしたという伝承に一致する。従って、日本の低い遺伝的多様性は中国からもたらされた時の少数の創始個体に起因すると考えられる。

## 21年生コウヨウザンの成長と材のヤング率の関係

近藤禎二（森林総合研究所林木育種センター）・藤澤義武（鹿児島大学農学部）・山田浩雄・磯田圭哉・大塚次郎・飯田啓達・飯野貴美子・木下敏・生方正俊（森林総合研究所林木育種センター）

茨城県日立市に所在する林木育種センター構内に植栽されている21年生のコウヨウザン6系統の樹高、胸高直径、単木材積およびファッコップによりその前年に測定し、スギの生材密度を用いて推定したヤング率は、それぞれの平均が、樹高17.0m、胸高直径25.3cm、単木材積0.316m<sup>3</sup>、ヤング率8.73GPであった。林縁を除く144本から推定した林分材積は423m<sup>3</sup>/haとなり、20m<sup>3</sup>/ha・年を超えるきわめて良好な成長を示した（近藤ほか2015）。各形質とヤング率の散布図を見ると、樹高、胸高直径、単木材積の値の大小にかかわらずヤング率はほぼ一定の値を示し、それら成長形質とヤング率との相関係数は、それぞれ、0.13、0.08、0.12と、有意ではなかった。以上のことから、コウヨウザンが早生樹として大変有望であり、成長、ヤング率ともに優れたものを選抜できる可能性があると考えられた。



## 青森県カラマツ採種園の着花特性と BAP 処理効果

田中功二 ((地独) 青森県産業技術センター林業研究所)

青森県では、近年再造林樹種として、スギに比較し成長や材価面で有利なカラマツの人気の高い。そのため、当研究所に苗木生産事業者から、スギやマツ類と同様にカラマツ育種種子の配布要望が頻繁に寄せられてきた。しかし、当研究所ではカラマツ造林がピークであった昭和 30 年代後半に 4.5ha の採種園を造成したものの、カラマツ造林の減退に伴い採種園の一部を廃止したことから、現在は 1.0ha しかなく、事業者の要望に応えられていない。本研究では、今後の採種園の再整備に向けて、効率的な種子生産を図るため、平成 23～27 年に採種園に植栽されている精英樹 67 クローン (1～4 本/クローン) について、雌雄花の着生状況を調査し、着花性、環状剥皮処理の効果を評価した。クローン間で雌雄花それぞれの着生量に差があり、また環状剥皮処理による着花促進効果は認められたが、種子増産が期待される雌花量の増加は無かった。さらに、クロマツ等で着花促進効果が確認されている BAP 処理を、精英樹 5 クローンで 6 月中旬から 8 週間に渡り実施した。その結果、BAP 効果とみられる雄花抑制と雌花誘導が特定のクローンで観察されたので紹介する。

10

## 関西育種基本区におけるヒノキ第二世代精英樹候補木の多様性評価

岩泉正和、河合慶恵、三浦真弘 (森林総研林育セ関西)、井城泰一 (森林総研林育セ東北)、磯田圭哉 (森林総研林育セ)、渡辺敦史 (九大院農)

次世代育種を進める上では、世代の進行に伴う育種集団サイズの減少による近親交配やボトルネックを回避し、遺伝的多様性や血縁の偏り等に配慮した次世代候補木の選抜を行う必要がある。林木育種センターでは平成 18 年より、スギ・ヒノキ精英樹等遺伝資源の DNA 遺伝子型の評価 (タイピングプロジェクト) を進めてきたが、このうち、ヒノキのニーズが高い関西育種基本区では近年、第二世代精英樹候補木等のヒノキの次世代育種素材についても評価が進められている。このような遺伝子型評価は、しばしば混在是正や系統管理等という目的が表立っている一方で、上記のような育種集団の遺伝的管理という意義づけが大きいことに注視する必要がある。こうした背景から、本研究では、ヒノキの第一世代および第二世代精英樹 (候補木) 集団のジェノタイプングデータを利用して、各世代の遺伝的多様性について解析するとともに、DNA 親子解析により両者の血縁関係について明らかにした。本発表では、対立遺伝子の有効数やヘテロ接合体率、近交係数といった遺伝的多様性の統計量について世代間の比較を行うとともに、第二世代に寄与する第一世代親の組成等について報告する。

## 英国で保存されているサクラの栽培品種について

勝木俊雄（森林総合研究所多摩森林科学園）

花を観賞するサクラの栽培品種は、江戸時代に数多く生まれたと考えられている。明治時代になると、多くが消失する危機に瀕し、東京の荒川堤コレクションなどを経由することで保存され、伝統的なサクラの栽培品種は現在に伝わっている。一方、江戸時代末から日本のサクラは海外に輸出され、C. Ingram などによって紹介され、現在でも栽培されている。その後も欧米に導入されたサクラについて分類学的な研究はあるが、十分なものではなく、現在でも欧米と日本とで分類体系に違いがある。分類体系が異なると栽培品種の利用に大きな阻害となるので、共通の体系を再構築する必要がある。また、日本で失われた栽培品種が海外で残されている可能性もある。そこで、海外のサクラの現況を検討するため、2015年4月に英国の主なサクラの収集機関である Kew 植物園や Keele 大学、Hazel 農園などにおいて、花の観察をおこなった。形態観察の結果、英国での‘Shimidsu’は‘松月’、‘Hokusai’は‘渦桜’と考えられた。一方、‘Asano’や‘Daikoku’など、日本では失われた可能性があるサクラも確認された。

## 抵抗性品種開発に向けたクロマツの遺伝的多様性評価

宮田翔介（九大院生資環）、岩泉正和（森総研林育セ関西）、井城泰一（森総研林育セ東北）、田村美帆（九大院農）、渡辺敦史（九大院農）

クロマツ (*Pinus thunbergii*) は、海岸林を構成する主要な造林樹種である。クロマツ林はマツノザイセンチュウ被害の拡大により全国各地で壊滅的被害を被ってきた。被害地ではマツ材線虫病に対して抵抗性を有するいわゆる抵抗性マツ種苗等を中心に植栽が行われているが、抵抗性種苗を植栽することによって遺伝的多様性の減少や人工植栽による遺伝的多様性のかく乱を招く可能性がある。上記を考慮し、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業では、保全生態学的観点から積極的に導入し、抵抗性と遺伝的多様性の保全の両面から事業を推進する方向へ軌道修正されつつある。

本研究では、全国の有名松原をはじめとして、それぞれの地域を代表する主要なクロマツ林から採取した約 2000 個体を対象に SSR マーカーを利用して、遺伝構造の解明を行った。その結果、日本のクロマツ林は、地域間で遺伝構造の相違が存在し、過去の人工植栽の履歴を反映している可能性が示唆された。さらに、抵抗性品種についても分析を行い、現存するクロマツ林と抵抗性品種の遺伝構造の比較や種苗配布区域を含む抵抗性育種戦略について検討した。

### 温度と日長がスギ木部遺伝子発現に与える影響

福田有樹（九大院生資環）・三嶋賢太郎（森研総研林育セ）・田村美帆・渡辺敦史（九大院農）

樹木の成長に環境要因が影響することは周知である一方で、種々の環境要因がどのように樹木の動態に影響を及ぼすかについては不明な点が多い。仮に環境要因に対する樹木の成長動態の反応を定量化できる手法を開発できれば、その理解は飛躍的に進む可能性があり、一つの解決策として、環境シグナルに応答する遺伝子発現量を利用する手法の有効性を検討してきた。冬期から春期にかけて温度・日長処理区を複数組み合わせ、リグニン生合成関連遺伝子群を利用してスギ木部における遺伝子発現応答を解析し、発現量を定量化した。その結果、形成層の休眠期から活性期への移行には温度が多大な影響を与える (Oribe *et al.*, 1997) とした既報を支持すると共に、遺伝子発現量の相違により日長も影響する可能性を明らかにした。本研究では、さらに夏期から秋期にかけて温度および日長を制御した環境下で生育したスギ3年生苗の木部における遺伝子発現動態について、新たな視点からスクリーニングした遺伝子を加えた上で解析し、木部形成休止期における温度および日長の影響について検討したので報告する。

### マイクロアレイを利用したスギさし木の遺伝子発現プロファイル

田中杏奈（九大農）・栗田学（森研総研林育セ九州）・渡辺敦史（九大院農）

スギのさし木によるクローン化は、親クローンの特性を維持できる点で、長年月の育成が必要な林木では極めて有効な増殖形態と言える。しかし、重要性にも関わらず、スギのさし木発根メカニズムに関する研究は極めて少ない。本研究では、さし木後定期的に地下部のシュートを採取した。形成されたカルスおよび根を取り除き、RNAを抽出した。抽出したRNAを利用して、スギ各器官で発現する約2万遺伝子が搭載されたマイクロアレイチップを利用して、時系列に沿った遺伝子発現プロファイルを構築した。さし木後4週目に発根が目視で認められ、このさし木後発根するまでのステージでは、2週目と4もしくは5週目間で特に発現の強さが異なる遺伝子が認められた。5週目以降の根系発達するステージでは、さし付けした地下部と地上部での遺伝子発現の違いは経過時間よりも地上部・地下部間で大きく、この頃には器官分化が生じている可能性が示唆された。また、さし木発根に関与するホルモン関連遺伝子群に着目したとき、ジベレリン関連の遺伝子の発現は経過時間に伴って減少し、オーキシシン関連は増加していることが示唆された。

### 爽春家系における雄性不稔個体識別マーカーの開発

郷田乃真人（九大院生資環）・坪村美代子（森林総研林育セ）・栗田学（森林総研林育セ九州）田村美帆（九大院農）・渡辺敦史（九大院農）

雄性不稔スギ「爽春」の不稔形質は一对の劣性遺伝子により支配されることが明らかとなり、 $F_2$ では3 : 1の割合で可稔形質と不稔形質に分離する。従って、幼苗期に不稔形質の実生苗を安価で簡便に識別できれば、効率的に雄性不稔スギを苗畑でスクリーニングすることができる。本研究では、「爽春」実生後代を用い、識別マーカーの開発を試みた。約7万 SNP マーカーを用いて、QTL 解析を行った結果、不稔形質に対して高い LOD スコアを示す複数の SNP を検出した。このうち、一つの SNP が座乗する遺伝子構造の決定を試みた結果、巨大なイントロンを含め、ゲノム中では遺伝子全体で 15kbp 以上になる事が明らかとなった。次に、この SNP を簡便にジェノタイピングするため Allele specific PCR マーカーの開発を試みた。プライマーは 3' 末端に 1 塩基ミスマッチを加えたものと、2 塩基ミスマッチを加えたものの 2 種類をそれぞれ 24bp および 27bp で作成した。その結果、2 塩基ミスマッチを加えたプライマーで可稔形質と不稔形質で増幅に明瞭な違いが確認された。

### 全国から収集したマツノザイセンチュウの特性評価

小林玄（九大院生資環）・松永孝治（森総研林育セ九州）・泉湧一郎（九大農）・山口莉未（九大院生資環）・渡辺敦史（九大院農）

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus* 以下、線虫) による被害の拡大に伴い、高緯度・高標高地や初期の抵抗性林分でも被害が報告されるようになった。次世代抵抗性育種でも、線虫の多様化や強毒化を考慮して使用する線虫系統の再検討が必要である。そこで、新たに全国 249 箇所から線虫を収集し、このうち 70 系統を増殖性と病原性の 2 つの観点から特性評価した。増殖性は、*botrytis* 菌叢上で 3 つの視点から評価し、増殖特性の多様性を確認した。いくつかの系統では、温度によって増殖特性の感受性が異なっていた。もう一つの評価軸である病原性については、抵抗性家系と精英樹それぞれの 2 年生苗に 1 万頭接種することで評価した。その結果、従来の抵抗性育種に用いられてきた Ka4 や島原系統よりも病原性の高い系統が存在した。しかし、病原力と増殖力間には、明確な相関が認められなかった。本報告では、これら 2 つの観点からの結果を詳細に示すと共に、マツノザイセンチュウの遺伝資源評価に向けた分子データ等収集状況について報告する。

### ダイアレル分析による静岡県産スギ精英樹の特性

山田晋也、山口 亮、近藤 晃（静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター）

交雑育種や採種園の改良、また育種方法を選択する上で、精英樹の組合せ能力を推定することは重要である。そこで、静岡県産スギ精英樹クローン間の人工交配を行い、その交配家系について、生育ステージごとのヤング率および諸形質の組合せ能力等を推定する試験を実施した。

静岡県産スギ精英樹5クローン、すなわち伊豆2号、富士1号、富士2号、安倍4号および大井9号を用いて、1990年に総当りの交配を行って作出した自殖を除く家系を使用した。各家系苗は、2生育期間にわたり養苗した後、1993年4月に周智郡森町三倉へ単木混交で植栽した。2004年、2009年、2013年に応力波伝播法によるヤング率、胸高直径、樹高を計測した。

ヤング率のダイアレル分析の結果、静岡県産スギ精英樹の中で最もヤング率が高い富士1号の一般組合せ能力は他の家系と比べて最も高い傾向があったが、一般組合せ能力および特定組合せ能力に有意差は認められなかった。ヤング率の育種効果を得るためには、複数の高ヤング率の母樹で採種園を構成する必要性が示唆された。

### マツ材線虫病抵抗性クロマツの挿し木発根性における母樹からの採穂部位、挿し穂の重量、冬芽数、針葉伸長の影響

袴田哲司（静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター）・平岡裕一郎（森林総合研究所林木育種センター）山本茂弘（静岡県農林大学校）・加藤公彦（静岡県農林技術研究所）

抵抗性クロマツの効率的な挿し木増殖を実現するための知見を得るため、発根性（発根率、発根量）に影響する要因について検討した。LRA解析やGLM解析の結果、家系によって発根率は異なり、母樹からの採穂部位は発根率に有意に影響し、母樹の下部から採穂した挿し穂で発根率が高かった。しかし、挿し穂の重量、冬芽の数は発根率と関係がなかった。一方、発根量には家系、採穂部位、穂重、冬芽数が影響しなかったが、挿し付け後新梢から伸長した針葉の長さが有意に影響していた。針葉の長さとは発根量には有意な正の相関が認められた。下部枝の挿し穂で発根率が高かったこと、挿し付け後に伸びた針葉の長さとは発根量に相関関係があったことは、別の試験でも認められた。

### *Bursaphelenchus xylophilus* の継代培養に伴う対立遺伝子頻度の変化

泉 湧一郎(九大農)・小林 玄(九大院生資環)・松永 孝治(森総研林育セ九州)・  
渡辺 敦史(九大院農)

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*、以下、線虫) が北米から日本に侵入し、100 年以上経過したことや線虫の世代時間を考慮すれば、日本各地で独自に進化している可能性が考えられる。実際、最近の被害は、高緯度・高標高地や初期抵抗性林分で報告されるようになった。既報や予備試験でもまた、地域間でのアレル頻度の違いが認められる一方で、同一地域での多様性は低いことが示唆されている。本研究では、増殖力の異なる 4 つの系統を等量混合し、継代培養を繰り返すことで、線虫の対立遺伝子頻度や特性の変化が認められるかどうかの実証試験を行った。異なる増殖特性を保有する線虫を継代培養した結果、10 代培養後の対立遺伝子頻度に大きな変化は認められなかったが、増殖特性には変化が認められた。対立遺伝子頻度に相違が認められなかった理由として、初期および継代培養時の混合頭数が十分量であったことが考えられる。そこで、継代培養時における菌叢上から切り出した培地に存在する線虫頭数を測定した。

### クロマツ生体防御遺伝子群の発現とマツノザイセンチュウの樹体内における挙動との関連性

山口莉未 (九大院生資環)・平尾知士 (森林総研森林バイオ)・松永孝治 (森林総研林育セ九州)・  
渡辺敦史 (九大院生資環)

クロマツ (*Pinus thunbergii*) にマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*、以下、線虫) を接種した際、クロマツは PR タンパク質等の生体防御に関連する遺伝子群を速やかに高レベルで発現することが報告されている (Hirao *et al.* 2012)。この線虫-クロマツの相互作用が線虫侵入後のクロマツ側における過敏感反応と位置づけた場合、過敏感反応が線虫侵入後に直ちに全身に誘導されているのか、線虫の移動と増殖に伴って誘導されるのかについては不明であった。そこで本研究では、線虫 (系統名: Ka4) 1 万頭を 2 年生クロマツの地際に接種し、接種経過日数に伴う線虫の移動・増殖過程とクロマツ樹体内で発現する PR タンパク質等遺伝子の発現量の関係について分析した。その結果、線虫が樹体内で増加し、全身へ移動するのに伴って、PR タンパク質等の遺伝子発現量もまた、樹体各部位で増加する傾向にあった。この結果は、樹体内での線虫の挙動とクロマツの遺伝子発現には密接な関連性があり、過敏感反応は線虫の挙動に応じて誘導されることを示している。

### クロマツ種子発芽におけるエタノール精選と灯油精選の比較

山野遼太郎（森林総合研究所林木育種センター）・太田清隆（太田苗圃）・佐藤靖（佐藤苗圃）・  
小山邦夫（宮城県農林種苗農業協同組合）・今野幸則（宮城県林業技術総合センター）・宮本尚子・  
那須仁弥・織部雄一郎（森林総合研究所林木育種センター東北育種場）

東北から関東の太平洋海岸クロマツ林は2011年の東日本大津波により激しく損壊した。これら被害林分の機能を復旧するためにクロマツの植栽が進められている最中である。クロマツは海岸植栽に適応しやすく防災・保安機能を植栽後最も早く発揮できる樹種であるが、マツ材線虫病感受性が極めて高いためマツノザイセンチュウ抵抗性種苗を選択することが望ましい。しかし、必要とされる苗木数に対して、日本国内の抵抗性クロマツ生産量は圧倒的に少ない。そこで発表者らは農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（課題番号25084c 東北地方海岸林再生に向けたマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ種苗生産の飛躍的向上）の中で各種取り組みを実施している。今回は、クロマツの充実種子を判別する精度が高いエタノールによる比重選について、比重が同程度でより安価な灯油による種子精選への改変が可能であるか否かを検討した。

### スギ F1 クローン若齢木の断幹処理による萌芽発生数について

倉本哲嗣、栗田学、武津英太郎、倉原雄二、松永考治（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、千吉良治（森林総合研究所西表熱帯林育種技術園）

九州育種場では特定母樹等優良種苗の原種の供給とともに、より多くの需要に応えるため原種園の整備を行っており、今後断幹整枝を行って採穂台木へと樹形誘導を実施していく予定である。しかし特定母樹やエリートツリーは、通常の苗に比べて樹体の成長が速いので、これまでよりも若い樹齢で採穂台木として樹形誘導を開始する必要があると予想されるが、断幹後の樹形誘導に必要な萌芽枝発生等について明らかではない。そのため九州育種場では、採穂台木育成技術開発に向け、基礎情報の収集を開始している。今回はエリートツリーの母集団であるスギ精英樹 F1 クローンを対象に、①これまでの断幹開始樹高である 2.3m に到達した段階での断幹で萌芽枝の発生があるか、②通常断幹を実施する 4 年生と、それよりも 1 年早い 3 年生における断幹後の萌芽枝発生には差が存在するか検証した。その結果、断幹前の樹高が 2.3m を超えたものではほぼ全ての個体で萌芽枝が発生し、かつこれまでより 1 年早い 3 年生のクローンでも 4 年生クローンと同等の萌芽枝の発生をみたことから、これまで行ってきた断幹開始条件が妥当であることを示唆する結果を得た。

## 抵抗性クロマツの最適な採種園設計に向けた近親交配の影響解析 - 交配設計と cpDNA マーカー開発 -

松永孝治（森林総研林育セ九州）、柳原尚貴（九大院生物資源環境科学府）、  
栗田学（森林総研林育セ九州）、田村美帆（九大院農）、渡辺敦史（九大院農）

マツ材線虫病対策の一つとして始まったマツノザイセンチュウ抵抗性育種では、近年、第1世代品種間の後代等から第2世代品種の開発を進めている。第2世代以降の品種を含む採種園の設計は各品種の種子生産や抵抗性に関する特性情報だけでなく、品種間の血縁関係を加味して、採種木の構成とその空間配置を決める必要がある。既存の研究は近親交配が結果率や充実率の低下を引き起こすことを示しているが、実際の採種園は様々な個体の花粉が同時に存在するため、採種園設計に血縁関係の影響を反映させるためには、血縁関係にない個体の花粉が共存する条件下における近親交配の影響を明らかにする必要がある。ここでは抵抗性クロマツにおける最適な採種園設計に向けて、近親交配の影響を解析するために現在取り組んでいる、1) 近縁個体間における人工交配および2) 花粉親同定のためのマーカー開発の実施状況について報告する。

## カラマツ採種園で行った環状剥皮と施肥の着果量に対する影響 並びに環状剥皮後の樹勢回復のために行った巻き込み促進処理の効果

蓬田英俊（岩手県林業技術センター）

【はじめに】岩手県の採種園は、設定後50年を越え、樹勢が衰え枯れる木が増えている一方、種子の需要は増大しており、最大限の採種が必要となっている。カラマツ採種園の採種量増大と樹勢回復のため、環状剥皮時期と施肥、また環状剥皮からの樹勢回復の方法の検討を行った。【材料と方法】環状剥皮時期と施肥の検討では、岩手県内2カ所の採種園で、環状剥皮は2013年の4月上旬、5月中・下旬の3回に時期を変えて行い、施肥は同一箇所でも5月に、マルモリ11号、過リン酸石灰、硫酸カリの3種類を1回行い、処理の翌年に着果量の調査を行った。また、2011年には環状剥皮の後、剥皮箇所にトップジンペースト処理を行い翌年の巻き込み状況を調査した。【結果】環状剥皮時期による着果量の差は、明確ではなかった。施肥成分による差は、有意ではないがマルモリ11号と過リン酸石灰施肥区での着果量が多かった。トップジンペースト処理は、剥皮を実施してから約1ヶ月後にペースト処理した場合、翌年の巻き込みが良かった。



### パルプ生産のために選抜された *Eucalyptus camaldulensis* の木材性質の家系間変異

石栗 太 (宇都宮大学農学部)、サピット ディロクスムブン (カセサート大学森林学部)、  
相蘇春菜 (宇都宮大学農学部)、横田信三 (宇都宮大学農学部)

近年、東南アジア地域では、経済発展に伴い、木材需要量も増加傾向にある。これらの地域では、*Eucalyptus* などの早生樹の植林を盛んに行い、木材資源の生産量を増加させる試みがなされている。しかしながら、早生樹から得られる木材資源の用途は、パルプチップが主であり、製材などに利用されることはほとんどない。本研究では、早生樹から得られる木材資源をパルプチップに加えて、製材などにも利用できるようにすることを目的とした。そのために、タイにおいてパルプチップ生産を目的として選抜された4年生の *Eucalyptus camaldulensis* 8家系を対象に、成長特性(胸高直径および樹高)および木材性質(応力波伝播速度、丸太の動的ヤング率、生材含水率、容積密度、収縮率および交錯木理)の家系間変異を調査した。また、成長特性と木材性質の関係についても調査した。収縮率を除く調査したすべての木材性質において、家系間有意な差が認められた。一方、胸高直径と木材性質の間には、有意な関係は認められないか、正の相関関係が認められた。これらの結果から、パルプチップ生産のために選抜された *E. camaldulensis* 家系の中から、木材性質の優れた家系を選抜できる可能性が示唆された。

### 森林樹木種における効率的なゲノムワイドマーカーの開発

内山憲太郎 (森林総合研究所)、加藤珠理 (森林総合研究所多摩森林科学園)、上野真義 (森林総合研究所)、松本麻子 (森林総合研究所)

第2世代シーケンサーが安価に利用できるようになり、どのような生物種においてもゲノムワイドに数千~数万のDNAマーカーを手軽に開発できるようになった。これらのゲノムワイドなマーカーは、種分化、系統解析、関連解析、自然選択の検出などの研究に広く用いられている。しかし、開発したDNAマーカーを多検体で再タイピングするには未だ多大なコストがかかり、多くの予算をつぎ込める産業上重要な種以外での利用は現実的ではない。この問題への解決策の一つとして2008年にBairdらが制限酵素断片の網羅的解析手法を開発した。これは制限酵素で断片化したゲノムに個体識別用のタグを付与し、第2世代シーケンサーにかけることで、数百検体×数万座の遺伝子型を一度に決定してしまうというものである。制限酵素サイト近傍のみにターゲットを絞り込むことで、ゲノムの巨大さと複雑性を回避した画期的な手法であった。研究の目的によって必要となるマーカーの数は様々であるが、今回はゲノムサイズの小さな種から大きな種まで比較的自由度高く解析遺伝子座数を調節できるddRAD (Petersonら2012)の手法を、複数の日本産樹木種に適用した結果を報告する。

## ウイルスベクターを用いた針葉樹における機能未知遺伝子の逆遺伝学的解析システム

小長谷賢一（森林総合研究所森林バイオ研究センター）、吉川信幸（岩手大学農学部）、  
谷口亨（森林総合研究所森林バイオ研究センター）

植物ウイルスベクターは、植物へ感染するウイルスを遺伝子の運搬体(ベクター)として用い、目的遺伝子を植物体内で発現制御できる系として、遺伝子の機能解析や形質の改変等に利用されている。本ベクターの最大の利点は遺伝子組換え植物を作製する工程が不要な点にあるが、針葉樹等の林木におけるウイルスベクターの利用例はこれまでに無い。前回、リンゴ小球形潜在ウイルス (*Apple latent spherical virus, ALSV*) が、スギおよびクロマツへ潜在感染することを明らかにした。今回、色素合成に関与するフィトエン不飽和化酵素と推定されるスギおよびクロマツの遺伝子を ALSV ベクターへ組込み、スギおよびクロマツの種子胚へ接種したところ、接種3週間程度で本葉がアルビノ様に白化することが確認された。この現象は植物ウイルスの感染によって誘導されるジーンサイレンシング(遺伝子発現抑制)と推定される。本実験系により標的遺伝子の発現を抑制することで、逆遺伝学的に遺伝子の機能を同定・解析することが針葉樹で可能になると考えられた。

## マツ材線虫病に対するクロマツ生体防御反応の解明に向けた遺伝子発現解析

平尾知士（森林総合研究所森林バイオ研究センター）、山口莉未・渡辺敦史（九大院農）

マツノザイセンチュウの感染に対する抵抗性クロマツ及び感受性クロマツにおける生体防御反応のメカニズムを明らかにするため、マイクロアレイを利用した大規模な遺伝子発現解析を進めている。これまでに抵抗性クローンでは、三崎90号(抵抗性ランク4)、波方37号(抵抗性ランク4)、志摩64号(抵抗性ランク3)を、感受性クローンではクロマツ精英樹である片浦1号を対象に解析を行ってきた。各クローンに対して、マツノザイセンチュウ(アイソレイト: Ka-4)を接種し、接種後1日目、3日目、7日目、14日目のサンプルからそれぞれ抽出した total RNA をもとにマイクロアレイ分析を行った。その結果、抵抗性グループと感受性個体間において接種後各時系列で10倍以上の発現差を示す遺伝子(発現誘導及び発現抑制の両方の遺伝子を含む)は1,982遺伝子であり、植物ホルモンに関連する遺伝子群や生体防御関連の遺伝子群をはじめとし、デンプンや糖代謝、フェニルプロパノイド合成系の遺伝子群で発現量や発現パターンに違いが見られた。本発表では、それらの分析によって得られたデータをもとに、抵抗性クロマツ及び感受性クロマツの特徴を考察し報告する。

### 早生樹種コウヨウザンの品種改良に向けて

生方正俊、近藤禎二、山田浩雄、磯田圭哉、木村恵、遠藤圭太、大塚次郎、木下敏、塙栄一、飯田啓達、飯野貴美子、安部波夫（森林総合研究所林木育種センター）、久保田正裕（森林総合研究所林木育種センター関西育種場）、倉本哲嗣（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、藤澤義武、鶴川信（鹿児島大学農学部）、涌嶋智、渡辺靖崇（広島県立総合技術研究所森林技術センター）、松岡秀尚（中国木材株式会社）

西南日本地域では、合板の表層に用いる強度を持ち、成長の優れた樹種が造林されておらず、外材に依存しなければならない状況にあることから、材の強度が高く、植栽から収穫までの期間が短い新たな造林用樹種・系統へのニーズが高まっている。我々は、過去の調査結果等から、導入樹種であるコウヨウザンに着目し、平成27年度から農林水産省の「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」において「西南日本に適した木材強度の高い新たな造林用樹種・系統の選定及び改良指針の策定」の課題名で研究を開始したところである。この研究課題の概要やコウヨウザンの優良系統の選定及び品種改良指針の策定の方向性について発表する。

### シデコブシとコブシ間の雑種形成

行年恭兵（名古屋大学大学院生命農学研究科）、石田清（弘前大学農学生命科学部）、戸丸信弘（名古屋大学大学院生命農学研究科）

雑種形成は雑種強勢などにより親種の個体数を減少させるだけでなく、遺伝子浸透による遺伝的同化や遺伝的固有性を消失させることがある。よって種の保全には雑種形成と遺伝子浸透の有無およびその方向性を明らかにすることは重要である。希少種シデコブシの自生地付近に本来分布しないコブシが植栽され、雑種形成が引き起こされている恐れがある。本研究ではシデコブシの自生地付近にコブシが植栽されている場所において、シデコブシとコブシ間の雑種形成の有無と種間交雑の方向性を明らかにすることを目的とした。愛知県昭和の森の最大幹長1.3m以上のシデコブシとコブシおよびその雑種と思われる個体、全297個体の葉からDNAを抽出し、核マイクロサテライトマーカー13座と葉緑体マイクロサテライトマーカー3座を用いて個体の遺伝子型とハプロタイプを決定した。STRUCTURE解析とNEWHYBRIDS解析の結果、シデコブシとコブシ間の雑種形成が確認された。また、推定雑種個体はシデコブシまたはコブシの葉緑体ハプロタイプを保持していたことから、シデコブシとコブシ間の種間交雑は両方向であることが明らかとなった。

### DNA マーカーによるスギ精英樹の個体識別の効率化に向けた検討

柳原尚貴（九大院生資環）・平尾知士（森総研森林バイオ）・栗田学（森総研林育セ九州）・渡辺敦史（九大院農）

林木育種センターでは、全国各地から選抜された約 3,600 クロンのスギ精英樹を保存しており、これら精英樹については、正確な系統管理を行うことを目的として SSR マーカーによる遺伝子型がデータベース化されている。しかし、現行の SSR マーカーセットでは、一部個体について遺伝子型のサイズ決定が容易ではないマーカーが存在する。そこで、Gene Mapper ソフトウェアを利用して、マーカーの精度を再評価し、編集作業が容易であった 4 マーカーを選抜した。この新たなマーカーセットを利用して関東および九州育種基本区内精英樹のジェノタイプングを実行した。さらに、これらマーカーの親子鑑定での精度を評価するため、1 母樹から採取した種子を利用して、親の遺伝子型と比較することで突然変異の有無を検証した。1 つのマーカーについては、ヌルアレル由来と考えられる非親型の出現が頻出したことから、親子鑑定には利用出来ないことが明らかとなった。さらに BwB (Breeding without Breeding) のスギへの適用を模索するため、実生後代の親子鑑定を行い新規マーカーセットの有効性を検証した。

### 八甲田山に分布する北限周辺のスギ孤立集団における葉緑体と核の SSR マーカーを用いたクローン解析

長谷川陽一(秋田県立大学木材高度加工研究所)、吉田明弘(鹿児島大学法文学部)、三嶋賢太郎(森林総合研究所林木育種センター)、高田克彦(秋田県立大学木材高度加工研究所)

八甲田山に隔離的に分布する高標高のスギ天然林集団(横沼・ソデカ谷地)のクローン構造を葉緑体 SSR マーカー 17 座と核 SSR マーカー 5 座を用いて明らかにした。また比較のために、低標高の 4 集団のスギ天然林において同様に解析を行った。横沼では、採集した 10 幹が全ての遺伝子座において同じ遺伝子型を示し、単一のクローンであった。ソデカ谷地では、45 幹から葉緑体 SSR マーカーを用いて 8 ジェネットが識別され、核 SSR マーカーでは 11 ジェネットであった。この違いは、核 DNA における体細胞突然変異とヘテロ接合の消失によって生じたと考えられた。従って、高標高の 2 集団では、葉緑体 SSR マーカーによって全ての個体が識別されたことになる。低標高の 4 集団では、採集した全ての幹が核 SSR マーカーによって異なるジェネットとして識別された一方で、葉緑体 SSR マーカーによるジェネットの識別率は 69–96%(平均 82%)に留まった。これらの結果から、北限に近い高標高の八甲田山のスギ集団は、クローン繁殖によって個体群を維持していることが示された。

### 高温ストレス下におけるスギ実生の遺伝子発現比較解析

伊原 徳子（森林総合研究所）

致死的でない高温ストレスを前もって与えることで個体が高温により強くなる、「耐暑性」の獲得が針葉樹を含めた樹木でも報告されている。本研究は耐暑性誘導処理や由来する地域が高温ストレス応答に関わる遺伝子発現に与える影響を明らかにすることを目的として行った。気象条件で4クラスタに分けられる地域由来の22母樹を選んで15ブロックにランダムに種子を播種した。暗期8時間(16°C)、明期16時間(25°C)で発芽を行い、ほぼ全ての実生で本葉が展開した時点で半分の実生に暗条件下で38°C・3時間の耐暑性誘導処理を2日間行った。処理終了から24時間後に実生のサンプリングを行い、さらに24時間後全ての個体に45°C2時間の高温ストレスを与えた。高温ストレス後25°Cに戻し、1時間後及び24時間後にサンプリングを行った。3回のサンプリングにおいて、耐暑性誘導処理あり・なし及び4つの気象クラスタから各2個体、計24個体について次世代シーケンサーでトランスクリプトーム解析を行った。総計423,735,176リード、約41Gbpのデータが得られた。他植物で熱ストレス応答制御の鍵となる転写因子ファミリーについて発現レベルを比較したところ、気象クラスタ間で発現パターンの異なる遺伝子が検出された。

### 横打撃共振法による九州地方のスギ精英樹の心材含水率の推定

倉原雄二（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）

スギの心材含水率は個体によって大きく異なることが知られている。この心材含水率の変動の一部は遺伝的なものであると考えられている。心材含水率の個体によるばらつきは人工乾燥の工程で支障となっており、スギの育種における改良目標のひとつである。立木状態での心材含水率の非破壊的な推定方法として横打撃共振法がある。この横打撃共振法は樹幹の直径と打撃による振動の周波数から心材含水率を推定する方法であり、非破壊的でありひとつの個体の調査に要する時間が短いことから多数の個体の調査に適している。

今回、森林総合研究所林木育種センター九州育種場内（熊本県合志市）の育種素材保存園に植栽されている九州育種基本区から選抜されたスギ精英樹に横打撃共振法を適用した。育種素材保存園は植栽後20年が経過しており、1クローンにつき平均2個体が植栽されている。このなかから著しく直径の小さい個体を除いて599クローン、1139個体の直径と共振周波数を測定し心材含水率を推定した。

### 「越の彼岸」の遺伝的起源に関する考察

加藤珠理（森林総合研究所多摩森林科学園）・勝木俊雄（森林総合研究所多摩森林科学園）・岩本宏二郎（森林総合研究所多摩森林科学園）・松本麻子（森林総合研究所）・吉丸博志（森林総合研究所）・大原隆明（富山県中央植物園）

「越の彼岸」は発見された当時は独立種として記載されたが、現在では形態的特徴からエドヒガンとオオヤマザクラあるいはカスミザクラ、キンキマメザクラの雑種と考えられている。花付きが良いため、各地で植栽されるなど、栽培系統としても広まっている。富山県では、野生個体も存在するが、複数のクローンが「越の彼岸」として栽培されていると考えられている。また、エドヒガンが関与することは確実であるが、もう片親については明らかではない。そこで、本研究ではSSRマーカーを用いたDNA分析によって、野生および各地で植栽されている「越の彼岸」のクローン性について整理する。また、野生種との比較解析によって、「越の彼岸」の親種について検討する。

### ヒノキの挿し穂で発現する遺伝子について

上野真義（森林総合研究所）、松井由佳里（熊本県林業研究指導所松本麻子）、  
松本麻子（森林総合研究所）

ヒノキは一般に挿し木が困難で発根性が低いと言われている。ナンゴウヒは熊本県の阿蘇地方で古くからさし木で増殖されてきた在来品種である。本研究では、このナンゴウヒに着目し、挿し穂の発根に際して、一般のヒノキとくらべてどのような遺伝子の発現に違いがあるのかを RNA-Seq 法で調べることを目的とした。一般ヒノキおよびナンゴウヒの挿し穂から総計 12Gb の発現遺伝子のリード配列を収集して 148,163 本の参照配列（平均長は 700bp）を作成した。参照配列のうち 993 個は、シロイヌナズナで側根と不定根の発生に関係があると報告されている 139 個の遺伝子と相同性があった。また遺伝子の発現量を参照配列にマップされたリードの本数として考え、一般ヒノキとナンゴウヒとの間でマップされたリード本数に違いのある配列を探索した。その結果、1,312 個の遺伝子の発現に違いがあると考えられた。発現量に違いがある配列について遺伝子オンロジーによりアノテーションを行ったところ、ストレスへの応答やシグナル伝達に関係する遺伝子が多く含まれていた。

### スギ遺伝子に基づく SNP の収集とマーカー開発

田村美帆（九大院農）・平尾知士（森林総研森林バイオ）・三嶋賢太郎（森林総研林育セ）・能勢美峰（森林総研林育セ）・坪村美代子（森林総研林育セ）・栗田学（森林総研林育セ九州）・平岡裕一郎（森林総研林育セ）・高橋誠（森林総研林育セ）・渡辺敦史（九大院農）

EST (expressed sequence tag) 配列を基にして SNP (single nucleotide polymorphism) マーカーを開発することで、スギでもゲノム全体を網羅し、大規模にマーカーを開発できることが既報によって明らかとされている。SNP ジェノタイピング技術もまた、その能力は飛躍的に向上し、現在では数万レベルのジェノタイピングが可能となっている。本研究では、シュート・木部・根・雄花から収集した EST 配列に基づいて構築したスギ遺伝子データをリファレンスとして、シュート・木部・雄花を対象としてリシーケンスを行い、SNP を大規模に収集した。Axiom (Affymetrix 社) システムを利用して SNP ジェノタイピングを行うため、システムに合致する SNP の同定と周辺配列の情報を抽出した。合計で約 7 万に及ぶ SNP マーカーを開発し、ジェノタイピングを行った結果、今後林木育種を行う上で有効であると確認されたマーカーは全体の 70%以上を占めた。一方で、有効とは認められなかったマーカーも存在しており、マーカー開発に向けたパイプライン及びその結果の詳細について報告する。

### QTL解析に向けたマッピング集団の形質評価

井城泰一（森林総合研究所林木育種センター東北育種場）  
 平岡裕一郎（林木育種センター）・三嶋賢太郎（林木育種センター）  
 坪村美代子（林木育種センター）・栗田学（林木育種センター九州育種場）  
 高島有哉（林木育種センター）・大平峰子（林木育種センター）  
 高橋誠（林木育種センター）・渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

林木育種センターでは、スギにおいて林業上有用な形質についてゲノムワイドアソシエーション解析や連鎖解析（QTL解析）に向け、大量の遺伝子情報を整備するとともに、第一世代精英樹や実生後代を中心に形質データの取得を進めてきた。QTL解析に向けては、林木育種センター内に植栽されている南那須2号×大田原1号のマッピング集団94個体を対象にして、成長および材質の測定を行い、約60形質について評価した。ここでは取得した形質について、変異、各形質の相互関係および正規性について検討したので報告する。

### GWAS に向けた第一世代精英樹の形質評価

高島有哉、井城泰一、平岡裕一郎、三嶋賢太郎、花岡 創、大平峰子、平尾知士、  
 坪村美代子、栗田 学、能勢美峰、高橋 誠（森林総合研究所林木育種センター）、  
 渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

近年、大量の DNA 情報と成長や材質等の表現型データを対応させることで、形質変異に関与する染色体領域を推定する手法であるアソシエーション解析（GWAS）が、テーダマツやユーカリなどで行われている。スギにおいても、GWAS に向けて第一世代のスギ精英樹やそれらの後代実生を中心に、形質データの取得が進められてきた。ここでは、主に関東育種基本区で選抜された第一世代スギ精英樹において、これまで取得された、樹高、胸高直径、応力波伝播速度等の有用形質データについて、形質別の変異や形質間の相関関係などについて報告する。また、成長の新たな特性評価の試みとして、林木育種センター内の苗畑において一年間を通して成長量を測定し、その成長パターンを明らかにしたので、その結果についても報告する。



## 大規模ジェノタイピングによるスギ連鎖地図作成と育種形質の QTL 解析

三嶋賢太郎、平尾知士、井城泰一、平岡裕一郎、坪村美代子、栗田学、能勢美峰、花岡創、大平峰子、高島有哉、高橋誠（森林総合研究所林木育種センター）、田村美帆、渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

材質および成長形質の改良は針葉樹の育種を進めていく上で最も重要な目標の一つである。そのため、当センターにおいては、精英樹の形質を評価するために検定林に植栽されたスギを中心に材質および成長に関わる諸形質を順次評価している。これらの取り組みに加え、ゲノム情報を利用した早期選抜手法についてもアプローチしている。これに加え、構築した各器官の cDNA ライブラリーをアッセンブルしてリファレンス配列とした上で、新たに数個体からリシーケンスすることによって、大量の SNP 情報を蓄積してきた。得られた大量の SNP 情報を基にマーカーし、Axiom genotyping system によって約 7 万の SNP マーカーをタイピングした。本発表では、作成した連鎖地図及び、約 60 形質の測定データを用いて QTL 解析の結果を報告する。

## スギにおける組織・季節・樹齢別の大規模遺伝子発現プロファイル

三嶋賢太郎、能勢美峰、栗田学、坪村美代子、平尾知士、平岡裕一郎、花岡創、井城泰一、大平峰子、高島有哉、松下通也、高橋誠（森林総合研究所林木育種センター）、田村美帆、渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

スギの形質は発現遺伝子によって制御されており、組織、季節、樹齢によって異なると推定される。本研究では、スギの 3 年生実生苗と 17 年生挿し木の各部位（シュート、頂端、形成層）を年 4 回（1、3、6、9 月）サンプリングし、抽出した RNA を用いて、マイクロアレイによる約 2 万遺伝子の発現プロファイリングを行った。クラスター解析の結果、組織による発現の違いが最も大きく、形成層とシュート・頂端がはじめに分岐した。続いて、季節による成長期（1、3 月）と休眠期（6、9 月）の違いが大きいことが明らかになった。樹齢による発現の違いはこれらに比べて小さかった。成木の部位による発現遺伝子の違いについて解析を行ったところ、各部位で共通して一定の発現量を示す遺伝子が存在する一方、組織特異的な発現を示す遺伝子が多く存在することが明らかになった。本研究で明らかになった遺伝子発現情報は、今後、スギの遺伝子研究を進める上で重要な基盤情報になると考える。

### スギ精英樹における GWAS とゲノミック予測

平岡裕一郎（森林総合研究所林木育種センター）・平尾知士（森林総合研究所森林バイオ研究センター）・三嶋賢太郎（林木育種センター）・田村美帆（九州大学大学院農学研究院）  
 武津英太郎（林木育種センター九州育種場）・井城泰一（林木育種センター東北育種場）  
 坪村美代子・能勢美峰（林木育種センター）・栗田学（林木育種センター九州育種場）  
 高橋誠・星比呂志（林木育種センター）・渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

林木は世代あたりの時間が長いことや、繁殖までに時間がかかることなどから、育種に長期間を要する。近年発達した DNA 解析技術を背景として、動植物のゲノム情報を活用した育種手法としてゲノムワイド関連解析（GWAS）やゲノミックセレクション（GS）が試行されている。これらは SNP（一塩基多型）等のゲノムワイドな大量 DNA マーカー情報と表現型との関連性を利用して、表現型に関与するマーカーを特定したり、表現型を予測（ゲノミック予測）し、系統・個体選抜を行うものであり、育種年限の短縮やコスト削減が期待されている。本研究では、スギの EST 情報から得られた 73,274 SNPs について、スギ第一世代精英樹の遺伝子型を決定した。対象形質は成長形質として 10 年次樹高、材質として応力波伝播速度とピロディン貫入量および雄花着花指数とし、それぞれの形質における GWAS を試行した結果、有意な SNP が多数検出された。さらに、ゲノム情報による選抜の可能性を検討するため、各形質におけるゲノミック予測を試行した。

### 成長速度に優れた種苗の多様な施業下での成長解析

宮崎潤二，挽地あい子（佐賀県林業試験場），佐藤嘉彦（大分県農林水産研究指導センター林業研究部），古澤英生，世見淳一（宮崎県庁），上杉基（宮崎県林業技術センター），宮里学（鹿児島県庁），永吉健作（鹿児島県森林技術総合センター），倉本哲嗣，武津英太郎（森林総合研究所林木育種センター九州育種場），千吉良治（森林総合研究所西表熱帯林育種技術園）高橋誠（森林総合研究所林木育種センター），渡辺敦史（九州大学），藤澤義武（鹿児島大学）

農林水産技術会議委託プロジェクト「新世代林業種苗を短期間で作出する革新的な技術の開発」では、試験地での成長と遺伝子情報に基づき、これまでの種苗に比べ成長が格段に優れる「新世代林業種苗」が選抜される予定である。この新世代林業種苗は優れた成長特性を生かして短伐期、さらには低密度植栽での利用が想定される。しかし、成長に優れた種苗の成長持続性や低密度植栽下での成長が不明であること、低密度植栽下での材質低下を懸念する向きがあることから、新世代林業種苗の選抜と利用に向けた基礎情報収集のため、①異なった植栽密度下でのスギの成長や材質の変化、②新世代林業種苗のような初期成長の速いスギの成長持続性、③新世代林業種苗候補（精英樹 F<sub>1</sub>）クローンの異なった生育環境下での成長・材質の変化、等について調査・解析を行った。本発表ではそれらの成果を紹介する。

### 統計遺伝学的解析手法の改良による遺伝的能力の予測精度向上の試み

武津英太郎（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、平岡裕一郎（森林総合研究所林木育種センター）、栗田学・倉本哲嗣（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

林木育種において選抜の効率や普及による育種効果に大きく影響するためクローン・個体の遺伝的能力の予測精度を高めることが求められる。本研究では、後代検定・クローン検定個体選抜や個体選抜において統計遺伝学的解析手法の改良による個体・クローンの遺伝的能力の予測精度の向上の程度について検討を行った。九州育種基本区で共通の 12 クローンが植栽された 37 試験地について、乱塊法モデル（従来モデル）と試験地内の空間的に相関を持った誤差を仮定したモデル（改良モデル）とで各試験地において各クローンの遺伝子型値を算出し、モデル毎に検定林総当りでの遺伝子型値の相関係数を算出し、モデル間で相関係数の比較を行った。その結果、改良モデルによる遺伝子型値がより多くの検定林組合せにおいて高い相関係数を示し、クローン検定における改良モデルの有効性を示した。また、個体選抜や後代検定についても精度向上の試みについて報告を行う。

### 新世代林業種苗を迅速に増殖するための取り組み

大平峰子、花岡創、平岡裕一郎（森林総合研究所林木育種センター）、三浦真弘（森林総合研究所林木育種センター関西育種場）、栗田学（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

分子育種技術の導入により、優れた成長を示す新世代林業種苗を短期間で作出する技術開発が行われ、新系統の選抜が始まろうとしている。開発された新世代林業種苗の高い性能を早期に活用するためには、採種園・採穂園の造成に供する原種のクローン苗を短期間で増殖することが求められる。そこで本研究では、クローン増殖手段としてさし木を前提とし、選抜された新世代林業種苗を迅速に増殖するための取り組みを行った。

原木から採取できるさし穂の数は限られるため、原種配布に必要とされる数に満たない。そこで、原木から採取したさし穂を発根させ、それを成長させて再増殖する手法を採用した。そのため、増殖の過程を発根および発根苗の成長促進に大別し、さらに発根の過程では、影響を与える要因を 1) 採穂木の生理特性、2) さし穂への処理、3) さし床の環境に分けて、それぞれの条件を検討した。また、成長促進の方法として、人工光・閉鎖型苗生産装置である苗テラス（三菱樹脂アグリドーム社製）で高 CO<sub>2</sub> 濃度、明期 16 時間、25°C の条件下で栽培を行い、成長および萌芽の発生への効果を測定した。これら条件の最適化により、採穂から 3 年で 1 本の原木から 100 本以上の苗を得ることができたので、詳細を報告する。

### 室内種子生産技術の実用化に向けた諸条件の検討と交配実態の把握

栗田 学（森林総合研究所林木育種センター九州育種場）、平岡裕一郎（森林総合研究所林木育種センター）、山野邊太郎（森林総合研究所林木育種センター）、田村美帆（九州大学大学院農学研究院）、平尾知士（森林総合研究所林木育種センター）、高橋 誠（森林総合研究所林木育種センター）、渡辺敦史（九州大学大学院農学研究院）

スギはわが国の主要な造林樹種であり、各種用材として広く利用され、古くから日本人の生活に深くかかわってきた。これまで検定林等を活用した形質調査により、第一世代精英樹の特性情報が明らかになり、それらの情報に基づき品種の次世代化を進めている。単一形質あるいは複数形質に優れた次世代品種を作出するためには、多様な組合せの交配を行い、その中から遺伝的に優れた個体を選抜していく必要がある。多様な複数の交配を簡便かつ高精度に行う方法として交雑温室を利用した室内種子生産技術の開発を進め、効果的な交配を行うために必要な環境条件（風、温室度等）の最適化や、選択できる交配手法の多様化（花粉投入方式：温室内に花粉を人工的に投入して交配を行う方式、相互交配方式：温室内の個体が生産する花粉のみで交配を行う方式）を進めてきた。本発表ではこれら取り組みの概要を報告するとともに、相互交配方式を行った際に花粉親として寄与する個体のランダム性について実生個体の遺伝子型情報から考察し、理想的な交配組合せの種子作出効率を高めるために考慮すべき諸条件について議論する。

### コンテナ育苗における少花粉ヒノキサシ木苗の成長比較

茂木靖和、渡邊仁志（岐阜県森林研究所）、袴田哲司（静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター）、原口雅人（埼玉県寄居林業事務所森林研究室）

少花粉ヒノキ品種のさし木苗を効率的に山行苗へ育成するため、少花粉ヒノキ品種4種類（益田5号、小坂1号、富士6号、西川4号）と対照品種（ナンゴウヒ）の発根苗を、マルチキャビティコンテナ（JFA-300）へ移植して約1年間育苗し、得苗時（2015年6月2日）における各品種の苗伸長量、根元直径、根鉢形成率（根鉢が容易に崩れない状態の苗数/供試数×100）を比較した。ここで供試した発根苗は15cmさし穂のさし木で得られたもので、育苗時の培地条件は標準培地に溶出日数700日の緩効性肥料（100g/10L）を混入したものである。少花粉ヒノキ品種間では、苗伸長量の平均値が小坂1号の20.9cm～益田5号の27.0cm、根元直径の平均値が益田5号の3.4mm～西川4号の3.8mm、根鉢形成率が富士6号の67%～益田5号の83%で、苗伸長量における益田5号と小坂1号との間を除き違いがみられなかった。ナンゴウヒは、苗伸長量、根元直径、根鉢形成率の値が少花粉ヒノキ品種より大きかった。コンテナ育苗による少花粉ヒノキ品種のさし木苗生産は、ナンゴウヒには及ばないものの可能であった。

### 多産性カラマツ後代の着花性の評価

三浦真弘（森林総研林育セ関西）、井城泰一（森林総研林育セ東北）、中田了五（森林総研林育セ北海道）、宮下智弘（山形県森林研究研修センター）

カラマツは、開花結実まで15–20年を要し、結実周期は、豊作年が3–7年に一度であり、採種時の枝切りのため、結実周期がさらに長くなる傾向がある。そのためカラマツの種子生産を安定させるために、機械的処理や化学的処理の研究や技術開発の取り組みが行われてきた。その結果、採種園経営では、ある程度成熟した採種木に3、4年ごとに環状剥皮処理を行い、処理木から種子を採取している。しかし環状剥皮は樹体へのダメージが大きく、連年の処理ができない欠点がある。カラマツは、幼齢時から、連年開花結実する個体がまれに発見される。このような個体はFL系統と呼ばれ、森林総合研究所林木育種センター長野増殖保存園、北海道育種場、東北育種場にそれぞれ収集・保存されている。カラマツの育種を行う上で、このような特性を持つ個体は、着花性の遺伝様式の解明や、事業的な種子生産のために利用できる可能性がある。そこで、今回は、カラマツのFL系統の成長性および着花の遺伝性について調べるために、東北育種場内に設定されたFL系統および精英樹を親とする交配家系が植栽されている試験地について調べた結果を発表する。

### 温暖化がグイマツ×カラマツ雑種家系「クリーンラーチ」の直径成長に及ぼす影響

来田 和人、内山 和子、今 博計、黒丸 亮（北海道立総合研究機構林業試験場）

炭素固定能が高いとして選抜されたグイマツ精英樹「中標津5号」を母樹とするグイマツ×カラマツ雑種家系「クリーンラーチ」が温暖化した将来にわたって良好な成長を維持できるのかを予測するため、直径成長モデルを開発し、温暖化の影響を検証した。道内5地域9箇所に造成されたグイマツ雑種次代検定林にあるクリーンラーチプロットの5-39年生成長量データを使って、期首の直径、個体間競争の強弱を表す胸高断面積合計、植栽樹種に対する植栽地の適性を反映する上層木の樹高成長、成長期間（4-9月）の気象要因（気温、降水量、日射量）を要因とする直径成長予測モデルを構築した。赤池情報量基準（AIC）により最適なモデルを選択した。選択されたモデルによると、今後想定される温暖化の範囲では、気温の上昇によりクリーンラーチの直径成長も増加すると予測された。また湿潤な北海道では、気候変動により降水量が減少したとしても直径成長が減少しないと予測された。これらの結果から、北海道においてクリーンラーチは、温暖化した将来にわたって高い炭素固定能を維持し、重要な造林樹種であり続けると考えられた。

## スンダ地域におけるリュウノウジュ (*Dryobalanops aromatica*) の遺伝構造と系統地理

原田光(愛媛大学農学部)・Fifi Gus Dwiyantri (愛媛大学大学院連合農学研究科)・Bibian Diway (マレーシア・サラワク州森林局)・Ying Fah Lee (マレーシア・サバ州森林局)・Iskandar Z. Siregar (インドネシア・ボゴール農科大学)・Atok Sbiakto (インドネシア・FORDA)・上谷浩一 (愛媛大学農学部)

マレー半島、スマトラ島、ボルネオ島の8集団から採集したフタバガキ科リュウノウジュ (*Dryobalanops aromatica*) 200個体についてマイクロサテライト11遺伝子座を用いた系統地理学的解析を行った。STRUCTUREによる解析から集団はマレー半島とスマトラ島、およびボルネオ島の遺伝的に分化した2つのグループに分けられた。このグループ間でIM解析を行った結果、2つのグループの分岐は7300~3600年前に起こったこと、また祖先集団の大きさは現在の集団の20倍程度大きかったことが推定された。これらの結果は最終氷期における低地フタバガキ林が陸地化したスンダランドで現在以上の大きな面積を占めていたこと、および、現在の集団がレフジア的な状態にあることを示唆する。

## 簡易検定手法による無花粉スギ実生苗生産

齋藤央嗣 (神奈川県自環保セ)

神奈川県では、2008年より県内で選抜した精英樹家系の雄性不稔スギを用い、閉鎖系採種園と人工交配により雄性不稔遺伝子をヘテロで持つ花粉を交配させた種子を生産し、種子を苗木生産者へ配布し雄性実生苗を育成し、育成した苗を簡易検定法(齋藤2011)により雄性不稔個体を分別して無花粉スギの生産を進めている。当初、雄性不稔スギの発現率が期待値の半分程度であったが、その後、花粉親の問題であることが判明し、閉鎖系採種園から雄性不稔ヘテロでないクローンを除去したことにより2015年には期待値をやや下回るものの41%に発現率が向上した。検定作業は、林業普及職員等の研修をかねて実施しているが、2015年春の作業効率は1人当38本/hであった。検定では不稔と判断した試料を再度実体顕微鏡で確認しているが、実施当初の2010年は誤判定率が2.5%あったものの、調査実施時期の調整等により、2015年には多くの初心者が調査者に含まれていたにもかかわらず誤判定が1本もなかった。このため、簡易検定による手法は、比較的修得が容易であり、無花粉スギの実生苗生産に有効であると考えられた。