

## スギ不定根形成に関連する要因の解明に向けた遺 伝・育種学的研究

福田, 有樹

<https://doi.org/10.15017/2534496>

---

出版情報：九州大学, 2019, 博士（農学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：

スギ不定根形成に関連する要因の解明に向けた遺伝・  
育種学的研究

福田 有樹

2019

## 目次

第1章 緒言	5
第1節 我が国の林業におけるスギ	5
第2節 我が国におけるスギの育種の現状	6
第3節 林業生産におけるさし木増殖の有用性	8
第4節 さし木増殖における不定根形成と根系発達	10
第5節 本研究の目的	12
第2章 スギ精英樹における不定根形成特性および根系形質および林業用形質との関連性	15
第1節 緒言	15
第2節 材料と方法	17
1. 供試材料	17
2. 形質測定	18
3. データ解析	19
第3節 結果	20
1. スギ精英樹における根系形質の遺伝的変異	20
2. 根系形質における相互の関連性	20
3. スギさし木発根と初期成長量との関連性	21
第4節 考察	22
第5節 小括	25

第3章 スギにおける不定根形成特性および根系形質に関連する遺伝的多型・・・38

第1節 緒言・・・38

第2節 材料と方法・・・39

1. 供試材料・・・39
2. 表現型データの取得・・・40
3. 遺伝子型データの取得・・・40
4. 遺伝的構造解析・・・41
5. ゲノムワイド関連解析・・・41
6. 各遺伝子型における表現型分布の比較・・・42

第3節 結果・・・43

1. 遺伝的構造・・・43
2. 各形質と有意に関連する遺伝的多型の抽出・・・43
3. 遺伝子型ごとの表現型分布・・・43

第4節 考察・・・44

第5節 小括・・・45

第4章 スギの不定根形成における遺伝子発現変動・・・52

第1節 緒言・・・52

第2節 材料と方法・・・53

1. 供試材料・・・53
2. マイクロアレイデザイン・・・54

3. RNA 抽出およびマイクロアレイ分析	55
4. データ解析	56
5. 定量的 PCR	57
第 3 節 結果	58
1. 不定根形成における遺伝子発現変動	58
2. 発現変動する遺伝子群の詳細	59
3. 炭水化物・植物ホルモン代謝関連遺伝子群の発現変動	60
第 4 節 考察	60
第 5 節 小括	64
第 5 章 総合考察	78
要旨	84
謝辞	87
引用文献	88

## 第1章 緒言

### 第1節 我が国の林業におけるスギ

スギ (*Cryptomeria japonica*) は、日本固有の針葉樹種であり、南北に長い我が国の気候に適応して、青森県の鱒ヶ沢から鹿児島県の屋久島にかけてその天然林が分布しており (津村 2012)、古くから御神木や地域のシンボル等としても広く親しまれてきた。また、その成長性や通直性の良さ、加工の容易さ等の利点を有することから、古くから建築用材や工芸品の材料等として利用されてきた (高桑 2012)。京都の北山、奈良の吉野、宮崎の飫肥等、その木材生産が盛んな林業地が全国各地に形成されており、これらの地域において生産されるスギは、いわゆるブランドスギとしての地位を確立しているものもある (高桑 2012)。現在においても、我が国における、スギの人工林面積は約 440 万 ha であり、総人工林面積の約 44% (総森林面積の約 18%; 国土面積の約 12%) を占めている (林野庁<sup>a</sup> 2018)。このように、スギは、我が国の林業において最も重要な樹種の一つである。この人工林面積の大きさは、主に拡大造林期と呼ばれる 1950、60 年代に、戦中の必要物資や戦後の復興資材として建築用材の需要が増大したことに伴い、大量に伐採された森林を復旧するための治山事業が実施されたことに起因している。特に、1960 年においては山行き苗木の生産量は実に約 13 億本に達し、造林面積は 7,000ha を超えることとなった (林野庁 2014)。上記のように、スギは木材生産に適した特徴を有するために、特に盛んに造林に用いられ、当時の山行き苗木の総生産量の約 4 割を占めた (林野庁 2014)。このようにして造成された人工林の多くが、50 年以上の時を経て、主伐期を迎えつつあることに伴い、国産用材の供給量は、2002 年における 1,608 万 m<sup>3</sup> を底に増加傾向にあり、2016 年においては 2,236 万 m<sup>3</sup> となっている (林野庁<sup>b</sup> 2018)。一方で、外材の輸入等によって木材価格が低迷し、採算性の悪さから林業経営

意欲が喪失されることによって、主伐後に再造林が実施されないケースが存在する (Sakai et al. 2006; Nagashima et al. 2009)。再造林放棄地においては、草本類は灌木類が繁茂するために、それらを餌とするシカが増加し、ひいては周囲林分におけるシカ害等の増加するといった問題が生じる。また、森林は、木材生産のほか、災害防止・国土保全、水源涵養、木材等の物質生産等の様々な公益的機能を有している (林野庁<sup>b</sup>2018)。これらの機能を十分に発揮させるためにも、主伐期に至った林分を伐採し、伐採後に再造林を確実に実施することにより、森林資源を循環的に利用していくことが重要である (大政ら 2018)。国際社会全体の普遍的な取り組みとしても、2015 年に国際連合において採択された「持続可能な開発のための 2030 アジェンダ」のなかで、持続可能な森林の経営が、開発途上国および先進国に共通する目標として位置付けられており、世界全体で新規植林及び再植林を大幅に増加させることが掲げられているように、その重要性が認識されている。我が国においても、近年、主伐と主伐後の再造林により人工林資源の循環利用を計画的に実施していく段階に入っているとされている (林野庁<sup>b</sup>2018)。そのため、主伐期に至った森林の伐採量の増加に伴って、再造林等に用いるための苗木の需要量が増加しつつあり、苗木を安定的に供給することが重要な課題となっている。2017 年度において、スギは最も苗木生産量の多い樹種であり、その苗木生産量は全山行き苗木生産量の 3 割以上を占める約 2,000 万本に上る (林野庁<sup>a</sup>2018)。しかしながら、その需要量は生産量を大きく上回る約 2,350 万本であり、生産量のさらなる拡充が求められている現状にある。

## 第 2 節 我が国におけるスギの育種の現状

これまで、我が国においては、スギを始めとする造林樹種を対象として、林業生産性や病虫害抵抗性等に関連する形質の向上を目的として、優れた遺伝的特性を有する個体の選

抜に向けた育種が行われてきた（田島 2001; 井出・白石 2012; 星ら 2013）。我が国における造林樹種の育種は、拡大造林期にあたる 1954 年に全国から精英樹を選抜することに始まり（星ら 2013）、以下のような過程によって行われている。精英樹とは、いわゆる「やまいち」のような、天然林あるいは人工林のなかで、成長性等が特に優れた個体のことであり、スギにおいては、現在までに 3,500 個体以上が選抜・収集されている（田島 2001）。こうして選抜・収集された個体は、第 1 世代精英樹と呼ばれ、現在の林木育種事業における根幹となる育種素材として扱われている。成長性等の形質における遺伝的改良効果は、優れた遺伝的特性を示す個体の選抜とそのような個体同士の交配を繰り返すことによって蓄積される（井出・白石 2012; Cowling 2013; Grattapaglia et al. 2018）。精英樹のような育種素材の有する遺伝的特性を正確に評価するためには、各個体が植栽された立地環境の影響を排除したうえで形質評価を行う必要がある（藤澤 2015）。そのため、育種素材における遺伝的特性の評価は、対象個体のクローン苗、実生苗を用いて造成される検定林（一般次代検定林）における、形質測定・評価に基づいて行われる。その後、一般次代検定林における結果に基づいて選抜された個体を親とする人工交配により、創出・育成された個体群を用いて造成される検定林（育種集団林）における形質測定・評価に基づいて、より優れた遺伝的特性を有する次世代の精英樹が選抜される。こうした、選抜と交配を繰り返すことによって、例えば、関東地方における平均 10 年次林分材積については、非選抜集団である地スギと比較して、第 1 世代精英樹集団では約 1.5 倍、第 2 世代精英樹集団（第 1 世代精英樹同士を交配してできた優良個体群）では約 3.5 倍の値を示した（藤澤ら 2010）ように、成長性や材質等の優れた個体が選抜されてきている（星ら 2013）。造林に際して、成長性等において優れた遺伝的特性を有する個体を利用することは、植栽本数や下刈り回数の削減、伐期の短縮等に

も繋がると期待されることから、林業生産性の向上に対して非常に有用であると考えられる（星ら 2013）。また、近年においては、成長性や材質等の優れた個体だけでなく、国民病とも呼ばれる花粉症への育種的観点からの対策として、花粉生産量の少ない、あるいは花粉を生産しない個体等も合わせて選抜されている（斎藤 2010）。

### 第3節 林業生産におけるさし木増殖の有用性

我が国におけるスギの苗木生産には、一般的に、効率の面を考慮して、採種園や採穂園を造成し、そこから得られた種子や穂が用いられる（井出・白石 2012; 藤澤 2014）。したがって、優良な山行き苗木を生産するためには、先述したような検定林における遺伝的特性評価の結果に基づいて、生産元となる採種園や採穂園を構成する母樹の選定および改良（入れ替え）を行うことが重要である（戸田 1971）。そのためには、採種園や採穂園を構成する母樹が有する遺伝的特性を明確にしておくことが欠かせない。

林木育種は、選抜された個体が植栽されることによって、その遺伝的な改良効果を林業生産性に反映させることを最終的な目的として行われる（坂口・岡田 1961; Libby et al. 1969; 田口 1980; Ruotsalainen 2014）。したがって、選抜された個体が有する優れた遺伝的特性を速やかに林業生産性に反映させるためには、選抜された個体を早期に数多く増殖・普及させることが求められる。一般に、スギの苗木は、主に実生苗、さし木苗、接ぎ木苗という3つの種類によって増殖される。一方、一般的にスギのような針葉樹種は、世代時間が長い、他殖性である、育種における世代更新が進んでいないといった特徴を有することから、林業生産において重要な形質に関連する遺伝子を固定する、すなわち、純系を作出することが難しい（石川 1975; 津村 1996; Jaramillo-Correa et al. 2010）。したがって、育種により選抜された個体が有する遺伝的特性を林業生産性に確実に反映させるために

は、採種園や採穂園を構成するための苗木は、両親と異なる遺伝子型となる有性生殖ではなく、母樹の遺伝子型（遺伝的特性）をそのまま継承する（クローン化する）ことができる無性生殖に依って増殖することが望ましい（Barber and Dorman 1964; Sweet 1995）。先述した3種の苗木を増殖する手法のうち、無性生殖に依る手法であることを満たすのは、さし木増殖と接ぎ木増殖である。しかしながら、穂木の一本一本を台木に接ぐという作業を要する接ぎ木増殖は、増殖の確実性が比較的高いという長所を有するものの、手間がかかることから、生産速度については芳しくないという短所を併せ持っている（藤澤・植田 2012）。対して、さし木増殖は、一般的には母樹から採取したさし穂を土壌等の基質にさし付け、育成することによる増殖方法であり、作業そのものは技術的に比較的簡便であるという長所を有する（植田・藤澤 2013）。したがって、育種により選抜された個体等、特定の個体が有する遺伝子型を継承した個体を早期に数多く増殖するという観点においては、さし木増殖はより適している手法であると考えられる（井出・白石 2012）。

さし木増殖は、「植物体から茎と根の兼ね備わっていない一部分をとり、繁殖材料とし、不定根あるいは不定芽の発生を促すことによって、茎と根を兼ね備えた完全な独立個体に仕立てあげる無性繁殖法」と定義される（森下・大山 1972）。我が国におけるさし木苗を用いた造林は、少なくとも約600年前から行われていることが報告されており（Toda 1974）、1,600年代には既に「憲教類典抄」等の複数の文献において、さし木増殖手法に関する記述がある（森下・大山 1972）。我が国は世界で最も針葉樹のさし木苗木生産量が多い国の一つであり（Ritchie 1991）、特に、古くからさし木苗を用いた造林が盛んに行われてきた九州地方においては、これまでにさし木増殖に適したアヤスギ、オビアカ、シャカイン、ヤブクグリ等の在来品種（栽培の過程での自然選択または無意識

な人為選択によって生じた優良個体群)が選抜されている(相馬 1936; 宮島 1989)。こうしたいくつかの在来品種が古くから選抜されてきた背景には、さし木苗木は高温多湿の環境により発生しやすい赤枯れ病に罹病しにくい(野原・陣野 1952; 田中 1962; 植田・藤澤 2013)ことから積極的に用いられたこと、効率的かつ低コストな造林に向けた苗木生産のためには、高い得苗率(さし付けた穂の本数に対して最終的に苗木として得られる本数の割合)を得ることが重要であることが挙げられると考えられる。このように、特に、スギにおける全山行き苗木生産量のおよそ5割を生産している九州地域においては(全国山林種苗協同組合連合会 2018)、伝統的に造林用種苗としてさし木苗が用いられる(相馬 1936; 宮島 1989; 全国山林種苗協同組合連合会 2019)ことを踏まえても、さし木増殖は我が国における林業にとって非常に重要な増殖手法であると言える。

#### 第4節 さし木増殖における不定根形成と根系発達

さし木増殖においては、根を伴わないさし穂を材料とすることから、植物体として完全な苗木を得るためには、さし穂からの発根が必須の生理学的プロセスである(Pop et al. 2011; Guan et al. 2015; Steffens and Rasmussen 2016)。一般に、胚に形成される幼根が発達してできる主根、および、主根から分枝してできる側根は合わせて定根と呼ばれ、さし穂から発生する根のような定根以外の根は全て不定根と呼ばれる(Bellini et al. 2014; Steffens and Rasmussen 2016)。したがって、さし穂からの発根は、生物学的には不定根形成と定義することができる。この生理学的プロセスの成否は様々な要因に影響されるという性質を有しており(Leakey and Storeton-West 1992; Li et al. 2009; da Costa et al. 2013; Porfirio et al. 2016; de Almeida et al. 2017)、この性質は結果的に得苗率の不安定性に直結するため、苗木の増殖・普及を妨げる要因となる。また、一概に不定根形成と言えども、さし付けてから

同一期間を経たとしても、少数の根のみが形成される場合から、数多くの細根を伴った根系が発達する場合まで、根系の形態・動態は条件によって様々であることが知られている（糟谷 1995; Kaul 2008; Vășcă-Zamfir et al. 2017; Khruengpatee et al. 2018）。根系は、植物体の固着・支持、養分・水分の吸収、代謝物の生産、同化物の貯蔵等の機能を有しており（根の事典編集委員会 2009）、植物体の生存や成長のために非常に大きな役割を担っている（Lynch 1995; McPhee 2005; Colombi and Walter 2017）。したがって、より成長性や健全性の高い苗木を生産するという観点において、不定根形成後に形作られる根系形質についても、さし木増殖において重要な形質であると考えられる。

さし木増殖による、成長性や健全性の高い苗木の効率的な生産に向けて、不定根形成や根系発達といった形質を改良するためには、それら形質に関連する要因を解明することが重要である。スギにおいても、特に、さし木増殖による苗木生産において決定的な役割を担う不定根形成に関連する要因の解明に向けた研究が、拡大造林期を中心として数多く行われてきた。その結果、スギにおける不定根形成には、遺伝子型（宮島 1951; 右田 1955）や母樹の樹齢（佐藤ら 1953; 横山・前田 1956）等の材料特性、および、基質（森下 1964; 大平ら 2016）や温度（阿部ら 1957; Shibuya et al. 2014）等の育成環境等が影響すること、あるいは、さし付け時におけるオーキシン添加（石川・田中 1970; 大山・上中 1970）等の処理により不定根形成が促進されることが明らかにされてきた。しかしながら、こうした研究の多くにおいては、不定根を形成したさし穂の割合（発根率）や形成された不定根の数といった、さし付けてから一定期間後の形態学的な結果のみから、供試条件による不定根形成に対する影響を評価するという方法が採られている。そのため、諸条件が不定根形成に適している、あるいは適していない生物学的な理由については、依然として不明な部分が多い。今後、より確実にさし木増殖の効率化、安定化を図るためには、

不定根形成や根系発達に関連する要因を十分に理解することが重要であると考えられる。

## 第5節 本研究の目的

一般に、遺伝学においては、「 $P=G+E$ 」と表現されるように、表現型 (P) は遺伝子型 (G) と環境 (E) の効果によって決定づけられると考えられている (Via and Lande 1985; Gagneur et al. 2013)。すなわち、表現型 (フェノーム) の発現は、DNA (ゲノム) によって表される遺伝子に、環境による効果が RNA (トランスクリプトーム)、タンパク質 (プロテオーム)、代謝物 (メタボローム) といった分子の制御への作用を通して加わることによって起こる (Fukushima et al. 2009; Moreno-Risueno et al. 2010; Langridge and Fleury 2011)。したがって、不定根形成や根系発達のような表現型に関連する生物学的な要因として、遺伝子型や環境の効果を分子レベルで明らかにすることは、表現型を改良するうえで、非常に重要である。先述したように、スギにおける不定根形成についても、クローン (同一の遺伝子型を有する個体群) によって表現型が異なる (クローン間差が存在する) ことが明らかにされていることから (宮島 1951; 右田 1954)、遺伝子型の効果が存在していると考えられる。表現型に対する遺伝子型の効果を十分に理解するためには、遺伝的変異や遺伝率等の遺伝的パラメーターを解析することが基本となる (Tibbits and Hodge 1998; Fries 2012; Hung et al. 2015)。DNA は各個体において常に不変であることから、表現型に対する遺伝子型の効果は、DNA における塩基配列の違い (遺伝的多型) に起因する (Brachi et al. 2011; Ogura and Busch 2015; Ya-fang et al. 2015)。したがって、表現型に関連する遺伝的多型を明らかにすることができれば、遺伝的多型を解析することによる表現型予測等が可能になることが期待される (Desta and Ortiz 2014; Schmidt et al. 2016) ことから、育種学的観点における意義は大きいと考えられる。

また、RNA やタンパク質、代謝物といった分子の変化は、環境の効果を受けて起こる (López-maury et al. 2008; Walker et al. 2017)。したがって、これら分子の動態は、生体に対する環境の効果を推し量るための指標となる (Gracey and Cossins 2003; Marchand et al. 2013)。また、一般的に、DNA から表現型に至るプロセスにおける最初の制御である転写によって合成される分子である RNA (Watson et al. 1965 (Molecular Biology of the Gene)) を定量化することは遺伝子の発現を解析することと同義であるとされる。遺伝子の発現量は様々な刺激に反応して大きく変動する性質も持ち合わせており (Kilian et al. 2007; Goda et al. 2008)、各遺伝子における塩基配列の相同性に基づいて、その機能を推測することが可能である。そのため、遺伝子発現解析を行うことにより、解析されたサンプルについて、直接的あるいは間接的に多くの生物学的な情報を分子レベルで得ることができると期待できることから、生体に対する環境の効果を推し量るための指標として、特に有用である (Nagano et al. 2012)。

そこで本研究では、スギにおける不定根形成特性に関連する要因としての遺伝子型および環境の効果の解明に向けた分子レベルにおける基盤情報を構築することにより、不定根形成特性の向上、ひいては、さし木増殖における得苗率の向上に資する情報を得ることを目的とし、以下の研究を行った。第2章では、不定根形成特性に関連する諸形質における遺伝子型による効果を明らかにするために、多数のスギ精英樹クローンを用いてさし木増殖に関連する不定根形成特性や根系形質を定量的に測定し、諸形質における遺伝的特性を明らかにするとともに、諸形質に関連する遺伝的多型を明らかにするための基礎データを得た。第3章では、さし木増殖に関連する諸形質における効率的な遺伝的改良に向けて、諸形質に関連する遺伝的多型を明らかにすることを目的として、第2章で測定した各形質における定量的データを用いて、ゲノムワイド関連解析を行い、各形質に関連する遺伝的

多型およびそれが座乗する遺伝子を統計遺伝学的に同定するとともに、遺伝的多型に基づく表現型予測の可能性について検討した。第4章では、不定根形成における好適環境の解明に向けて、不定根形成における分子レベルの変化を明らかにするために、マイクロアレイ分析によって、不定根形成における遺伝子発現を網羅的にプロファイルし、スギの不定根形成における遺伝子発現に関する基盤情報を構築した。第5章では、第2章から第4章における結果をもとに、不定根形成特性の向上、さし木増殖における得苗率の向上に向けた遺伝学的・分子生物学的知見の重要性、および、それら知見を用いた実用化に向けた将来展望について総合考察を行った。

## 第2章 スギ精英樹における不定根形成特性および根系形質および林業用形質との関連性

### 第1節 緒言

さし木増殖による苗木生産においては、さし穂から不定根を形成させることが必須である (Pop et al. 2011; Guan et al. 2015; Steffens and Rasmussen 2016)。したがって、さし木増殖に用いる材料の有する不定根形成特性を改良することは重要であり、一般的に不定根形成特性は発根率を指標として評価される (大山 1948)。また、苗木生産においては、林野庁により「山林用主要苗木の標準規格」が定められているように、苗木の規格 (大きさ) は重視される要素の一つである。したがって、完全な植物体となるための決定的な制限要因となる不定根形成特性と合わせて、一定期間内に定められた規格 (大きさ) に到達するための、育苗段階における地上部器官の成長性も重要な形質である。また、さし付けてから一定期間後の根系の形態・動態は条件によって様々であることが知られている (糟谷 1995; Kaul 2008; Vășcă-Zamfirk et al. 2017; Khruengpatee et al. 2018)。地下部器官である根系形質は養分・水分を吸収する機能を通して、地上部器官の成長性に対して大きな影響を与えている (Lynch 1995; McPhee 2005; Colombi and Walter 2017)。一般に、地上部器官の成長に関与する地下部器官の形質としては、根の数や長さだけでなく、根の分枝構造や太さ等も重要であり (Comas et al. 2002; Comas et al. 2004)、土壌中の水分や養分を吸収する能力は、より細い根の方が高いとされている (McCormack et al. 2015)。このように、根系形質は植物体全体の成長性等に大きく影響する形質として重要であることから (Palta et al. 2011; White et al. 2013)、さし木増殖においても重要な形質であると考えられる。栽培作物を中心とするいくつかの草本植物では、根系形質を植物体全体の成長性や健全性、農作物の生産性に関連する重要な形質であると位置付けることにより、遺伝資源集団における基盤情報の充実を目的とした大規模な根系形質の評価

が行われている (Chen et al. 2011; Burton et al. 2013; Narayanan et al. 2014; Lalitha et al. 2015) ほか、植物体全体の成長性の向上を目的として根系形質における遺伝的改良にも着手されている (de Dorlodot et al. 2007; Hammer et al. 2009)。

木本植物においても、地上部器官と地下部器官の成長や生理活性の関連性が報告されていることから (佐々 1985; Alameda and Villar 2012)、草本植物と同様に、これら器官間の相互作用が存在し、根系形質は苗木の生存や成長に大きく影響すると考えられる。特に、その成長性が重視される造林樹種においては、根系形質を評価することの重要性は高いといえる。我が国においては、スギをはじめとする造林樹種において、その地上部器官の成長形質について遺伝的変異が明らかにされているが (外山 1994; 蓬田 1999)、地下部器官の形質との関連性については不明な部分が多い。スギにおいても、地下部器官における根長や根径、根の分枝構造といった様々な形質の遺伝的変異が、地上部器官の成長性や健全性に関与している可能性が考えられる。したがって、さし木増殖における得苗率の向上に向けて、根系形質と地上部器官の成長性との関連性を明らかに遺伝的要因意義後太植物種において不定根形成特性および根系形質に最も強く影響する要因の一つである (Kondo et al. 2003; MacMillan et al. 2006; Narayanan and Prasad 2014; Tate and Page 2018)。スギにおいても、不定根形成特性 (発根率) についてはクローンによって異なることが明らかにされており (宮島 1951; 右田 1954)、すなわち、これらの形質に関して遺伝的要因が存在することが示唆されている。また、同様に、さし付けてから一定器官後における根系形質についてもクローンによって異なることや地上部成長性に関連することが経験的に示唆されているものの、定量的な解析については不足している現状にある。

そこで、本章では、さし木増殖に適した根系の解明、および、その遺伝的要因の解明に

向けた基礎的知見の取得を目的として、重要な育種素材である多数の精英樹を用いて、さし木増殖あるいは不定根形成に関わる形質である発根率、根系形質、苗高を定量的に測定し、スギのさし木増殖における不定根形成特性や根系形質における遺伝的特性、および、地上部成長性との関連性を明らかにした。

## 第2節 材料と方法

### 1. 供試材料

本研究では、東北・関東・関西・九州の各育種基本区内で選抜されたスギ精英樹のなかから、様々な成長性を示す 193 クローンを用いた（表 1）。供試クローンの選抜地は、47 クローンが東北育種基本区、54 クローンが関東育種基本区、43 クローンが関西育種基本区、49 クローンが九州育種基本区であり、幅広い遺伝的変異を含むことが期待できるように材料を選定した。2016 年 3～4 月の間に、森林総合研究所林木育種センター（茨城県日立市）（以下、林木育種センター）、森林総合研究所林木育種センター東北育種場（岩手県滝沢市）、森林総合研究所林木育種センター関西育種場（岡山県勝田郡勝央町）および森林総合研究所林木育種センター九州育種場（熊本県合志市）において、それぞれの組織が管轄する育種基本区内で選抜されたスギ精英樹のさし穂を採取し、林木育種センター内で全てのさし穂をクローンあたり原則 24 本ずつさし付けた。さし付けにあたっては、長さ 20cm 程度に整えたさし穂の切り口にオキシベロン粉剤 0.5（0.5%インドール酪酸、バイエルクロップサイエンス株式会社）を粉衣し、鹿沼土小粒で満たした育苗箱にさし付けた後、ガラス温室内で育成した。育成期間中においては、ブーム式頭上散水装置（アクアウイング、株式会社誠和）を日中 2 時間おきに 6 回往復させることによって灌水を行った。

## 2. 形質測定

さし付け当年の11月に全てのさし穂を掘り取り、発根の有無を確認し、クローンごとにさし付けたさし穂数に対する発根したさし穂数の割合を発根率(%)として算出した。根系形質はさし付け当年の成長休止期(Fernandez and Caldwell, 1975; Burke and Raynal, 1994; 佐藤 1995)にあたる2016年12月下旬から2017年3月上旬に測定した。測定は、少なくとも複数本の不定根が確認されたさし穂(苗木)のうち、各クローン内において根系がより充実していると認められた、クローンあたり原則6本(一部、4本もしくは5本)の苗木を対象とした。水洗いによって用土を落とした苗木の根系全体をスキャナー(Epson Perfection V700 Photo、セイコーエプソン株式会社)でTIFF形式の画像(図1)として取り込み、根画像解析ソフトWinRHIZO Reg 2009c(Regent Instruments Inc.)に供試することによって行った。根画像解析ソフトにおける既定のアルゴリズムに従って、根長(cm)、直径(mm)、根端数(個)および分枝数(個)を計測し、根長および直径の値をもとに表面積( $\text{cm}^2$ )および体積( $\text{cm}^3$ )を算出した。本研究では、直径が0.5mm以下の根を細根と定義し、全ての根長を合計した総根長に対する細根の長さの割合を細根率(%)として算出した。また、根端数および分枝数をそれぞれ総根長で除すことにより、根端密度(単位根長あたりの根端数; 個/cm)および分枝密度(単位根長あたりの分枝数; 個/cm)を算出した。すなわち、本研究においては、根量に関連する形質(総根長、表面積、体積)、根径に関連する形質(平均直径、細根率)、根系構造に関連する形質(根端密度、分枝密度)の3つの形質カテゴリーに分類される7つの根系形質を測定した。根系をスキャン・形質測定した苗木は、ガラス温室内で再び仮植し、根系形質を測定した苗木およびこれらの苗木と同程度の根系形成が認められた苗木を合わせたクローンあたり原則8本(一部、5~7本)の苗木を、2017年4月に林木育種センター内の苗畑に移植した。移植してから1成長

期後（さし付けてから2成長期後）の成長休止期にあたる2017年11月に初期成長量を示す形質として地表から頂端までの苗高を測定した。なお、育成中に枯死した個体および成長していないと判断された個体（活着が不十分であると考えられる個体）については測定の対象外とした。また、本研究においては、各形質ともクローンごとの平均値を各クローンの代表値とした。

### 3. データ解析

本研究におけるデータ解析には、解析ソフトウェアである R version 3.4.1 (R Development Core Team 2017) を用いた。各形質における遺伝的な効果を、以下の線形混合モデルにより予測した。

$$y_{ij} = \mu + c_i + e_{ij}$$

ここで、 $y_{ij}$  はクローン  $i$  の個体  $j$  の各形質値、 $\mu$  は全個体の平均値（固定効果）、 $c_i$  はクローン  $i$  の変量効果、 $e_{ij}$  は残差である。

lme4 パッケージ中の lmer 関数を用いて、各要因の分散成分を REML (Restricted Maximum Likelihood) 法により推定し (Bates et al. 2015)、次式によって広義の遺伝率（または反復率;  $h^2$ ）を求めた。

$$h^2 = \sigma_c^2 / (\sigma_c^2 + \sigma_e^2)$$

ここで、 $\sigma_c^2$  はクローン分散、 $\sigma_e^2$  は残差分散である。

発根率、根系形質、初期成長量間の相関を調べるために、psych パッケージ中の pairs.panels 関数を用いて、各形質間におけるピアソンの積率相関係数 ( $r$ ) を算出した。地上部成長量に対する根系形質の関連性をより詳細に調べるために、重回帰分析を行った。重回帰分析にあたっては、根系形質間の多重共線性を考慮し、各形質における単位が異なる

ることから標準化を行ったうえで、prcomp関数を用いて主成分分析を行った。plsパッケージ中のpcr関数を用いて、交差検証によって算出したRMSEP（Root Mean Squared Error of Prediction）値が最も小さくなったことから、潜在変数を2として、主成分得点を説明変数、苗高を目的変数として、lm関数を用いて重回帰分析を行った。さらに、同パッケージ中のjack.test関数を用いて、ジャックナイフ法（Martens and Martens 2000）により、導出した標準回帰係数の有意性を検定した。

### 第3節 結果

#### 1. スギ精英樹における根系形質の遺伝的変異

総根長、表面積、体積における変動係数はいずれも0.3以上であり、それらの最大値は最小値のそれぞれ約4.6倍、約4.5倍、約6.9倍であった（表2）。平均直径、根端密度、分枝密度、細根率における変動係数はいずれも0.2以下であり、それらの最大値は最小値のそれぞれ2、3倍程度であった。根系形質における広義の遺伝率（ $h^2$ ）は、根系構造に関連する形質（根端密度、分枝密度）において比較的高く（それぞれ0.48、0.42）、根径に関連する形質（平均直径、細根率）においてはいずれも0.34、根量に関連する形質（総根長、表面積、体積）においては0.32以下であり、形質カテゴリー別にみると根系構造に関連する形質が最も高い値が得られた（表2）。

#### 2. 根系形質における相互の関連性

根量に関連する形質である総根長、表面積、体積の間にはそれぞれ強い正の相関が認められた（ $r > 0.71$ 、 $p < 0.001$ ）（図2）。これらの形質は分枝密度との間にも比較的強い正の相関が認められた（ $r > 0.50$ 、 $p < 0.001$ ）（図2）。また、総根長と細根率の間、あるいは体

積と平均直径の間には正の相関が（それぞれ  $r=0.41$ 、 $0.45$ 、いずれも  $p<0.001$ ）、細根率と平均直径の間には強い負の相関が認められた（ $r=-0.87$ 、 $p<0.001$ ）（図2）。

標準化した各根系形質の値を用いた主成分分析の結果、第1主成分および第2主成分の寄与率はそれぞれ47.6%および32.4%であり、累積寄与率は80.0%となった（図3）。また、第1主成分に対する寄与（因子負荷量）は表面積（0.98）、体積（0.91）、総根長（0.90）、分枝密度（0.66）、根端密度（-0.49）の順に、第2主成分に対する寄与（因子負荷量）は細根率（-0.97）、平均直径（0.92）の順に大きかった（図3）。

### 3. スギさし木発根と初期成長量との関連性

苗高との相関係数は、絶対値の大きいものから順に表面積（ $r=0.52$ ）、総根長（ $r=0.50$ ）、体積（ $r=0.45$ ）、分枝密度（ $r=0.35$ ）および細根率（ $r=0.22$ ）であった（いずれも  $p<0.01$ ）（図2）。一方、平均直径および根端密度については苗高との相関係数がそれぞれ-0.06、-0.14であり、有意な相関は認められなかった（図2）。また、根系形質の値に基づく主成分得点を説明変数、苗高を目的変数とした重回帰分析を行った結果、各根系形質における標準回帰係数の絶対値は、総根長（1.73）、表面積（1.62）、分枝密度（1.33）、体積（1.29）、細根率（0.89）、根端密度（-0.55）、平均直径（-0.44）の順に大きく、ジャックナイフ法により平均直径を除く形質については苗高との有意な相関が認められた（ $p<0.05$ ）（図4）。

発根率については、最も高いクローンにおいて100%、最も低いクローンにおいて29.17%であった（表2）。苗高との相関係数は0.39（ $p<0.001$ ）であり、各根系形質との相関係数の絶対値は総根長（0.27）、表面積（0.24）、細根率（0.24）、平均直径（-0.18）、体積（0.17）、分枝密度（0.17）、根端密度（-0.06）の順に大きく、根端密度以外の形質との

相関は有意であると認められた ( $p < 0.05$ ) (図 2)。

#### 第 4 節 考察

根系形質における広義の遺伝率については、高いものから根系構造に関連する形質、根径に関連する形質、根量に関連する形質という順になった (表 2)。つまり、これらのカテゴリーのうち根系構造に関連する形質は、他のカテゴリーに分類される形質と比較すると、より強く遺伝的な要因に支配されている形質であると考えられる。他の植物種においても、広義の遺伝率については、総根長、表面積、体積よりも平均直径において高いこと (Ribeiro et al. 2016) や、根端数や分枝数における広義の遺伝率が比較的高いこと (Jahufer et al. 2008) が報告されている。本研究において、これら既報と同様の傾向が認められたことから、この特徴は植物種、樹齢、個体サイズに関わらず、普遍的なものであると考えられる。以上のことより、草本植物 (Kumar et al. 2012; Ristova and Busch 2014) と同様に、木本植物 (針葉樹種) であるスギのさし木苗における根系形質についても遺伝的変異が存在し、特に根系構造に関連する形質における遺伝性が強いことが示された。これらの結果は、今後、スギの根系形質に関する研究材料や育種素材等を選定する際の重要な基礎的知見になるとともに、根系形質を対象とした遺伝的改良を行うことができる可能性があることを示唆するものであると考えられた。

根系形質感の関連性については、総根長、表面積、体積の 3 形質間、あるいは体積と平均直径の間に強い正の相関が認められた (図 2、3)。この結果は、表面積や体積は、根長と直径を基に算出していることに起因するものであることを示唆していると考えられる。一方で、分枝密度と根量に関連する形質との間にも強い正の相関が認められる結果が得られた (図 2、3)。根系のサイズや形状は根の分枝の程度に強く影響されることが示されて

おり (Nibau et al. 2008)、本研究における結果は、この知見を支持するものであると考えられる。さらに、細根率は総根長、平均直径、分枝密度のいずれの形質との間にも強い相関が認められたという結果は (図 2、3)、根が分枝することで細根をより多く形成し、根系を発達させたクローンは相対的に平均直径が小さくなることを示唆していると考えられる。根径や分枝密度といった形質は根系構造を規定する基本的な形質であり (田中ら 1990)、また、細根は根系の機能を理解するうえで非常に重要な形質である (Jackson et al. 1997; Hishi 2007)。本研究では、こうした重要な形質が互いに関連していることが示された。同様の関連性はいくつかの草本植物においても示されており (例えば、Jahufer et al. 2008; Kumar et al. 2012; Li et al. 2015)、針葉樹種であるスギにおいても当てはまることが示唆されたと考えられる。

根系形質における広義の遺伝率については、苗高において 0.60 であり (表 2)、比較的遺伝的要因の影響が大きいことが示唆された。これまでもスギの初期成長量にクローン間変異があることが報告されており (外山 1994; 蓬田 1999)、それら既報と一致する結果であった。本研究に用いたスギ精英樹 193 クローンにおける苗高との相関は、総根長や表面積、体積といった根量に関連する形質と強いことが示唆された (図 2、3)。分枝密度や細根率はそれらの形質に次いで苗高との相関が強く、分枝密度については根量に関連する形質との相関も同様に強かった (図 2、3)。さらに、根系形質データに基づいた主成分得点を説明変数、苗高を目的変数とした重回帰分析を行った結果、苗高に対しては総根長、表面積、分枝密度、体積、細根率、根端密度の順に強く、かつ有意な関連があることが認められた (図 4)。つまり、スギの育苗段階における初期成長には、根量に関連する形質が大きいことに加えて、根系構造や根径に関連する形質、すなわち、分枝密度や細根率の高さも重要であることが示唆された。地上部器官の成長速度が異なる 11 の近縁樹種における

成木を用いた研究においては、地上部器官の成長が早い樹種は遅い樹種に比べて、比根長（単位根重あたりの根長）がより大きく、平均直径がより小さく、分枝密度がより高いことが報告されており（Comas et al. 2004）、本研究では既報とよく類似した結果が得られた。本研究の結果は、スギの育苗段階における地上部器官の成長の遺伝的変異については、地下部器官の形質の特性が要因の一つである可能性があることを示唆するものであると考えられる。つまり、さし木苗木における成長性を向上させるためには、根量が多い、細根率が高い、分枝密度が高い根系を形成する苗木を生産することが望ましいと考えられる。

本研究において算出された発根率は、平均値が約 90%と高い値を示した一方で、30%以下となったクローンも確認された（表 2）。また、発根率と苗高の間の相関係数は 0.39 であり、苗高に対する有意な関連が認められた根系形質とも相関が認められた ( $|r| > 0.17$ ,  $p < 0.05$ )（図 2）。さし付けてから一定期間後において、不定根の形成が認められなかった要因としては、乾燥や腐敗などによって不定根形成能力を喪失していることのほか、その時点までに不定根形成に至らなかったことが挙げられる。したがって、さし付けてから一定期間後における発根率の高さは、不定根形成に要する期間の長さ（不定根を形成する速度）も反映していると考えられる。一定期間内において、不定根形成に要する期間が短ければ、根系をより発達させられると考えられ、結果として根系形質が関連する地上部成長量の増大に結びつくものであると推測される。したがって、さし木増殖における得苗率の向上に向けて、不定根形成特性を向上させることは、優れた根系の発達を通して、成長性の向上にも間接的に関連することが期待されることから、より重要であると考えられる。

## 第5節 小括

本章においては、さし木増殖における不定根形成特性、根系形質、地上部成長量の関連性およびそれら形質における遺伝的特性を明らかにすることを目的として、193のスギ精英樹クローンのさし木苗における、発根率、根系形質、苗高について定量的に測定した。その結果、根系形質、特に、根量に関連する形質や細根率、分枝密度は地上部成長量との関連性が認められたことから、さし木増殖における得苗率を向上させるためには、根量が多い、細根率が高い、分枝密度が高い根系を形成する苗木を生産することが望ましいことが示唆された。また、発根率は、根端密度を除く根系形質と相関性が認められたことから、不定根形成特性は、根系形質への関連を通して、地上部成長性にも間接的に関連する可能性があることから、さし木増殖における得苗率の向上にとって、より重要な形質であると考えられた。

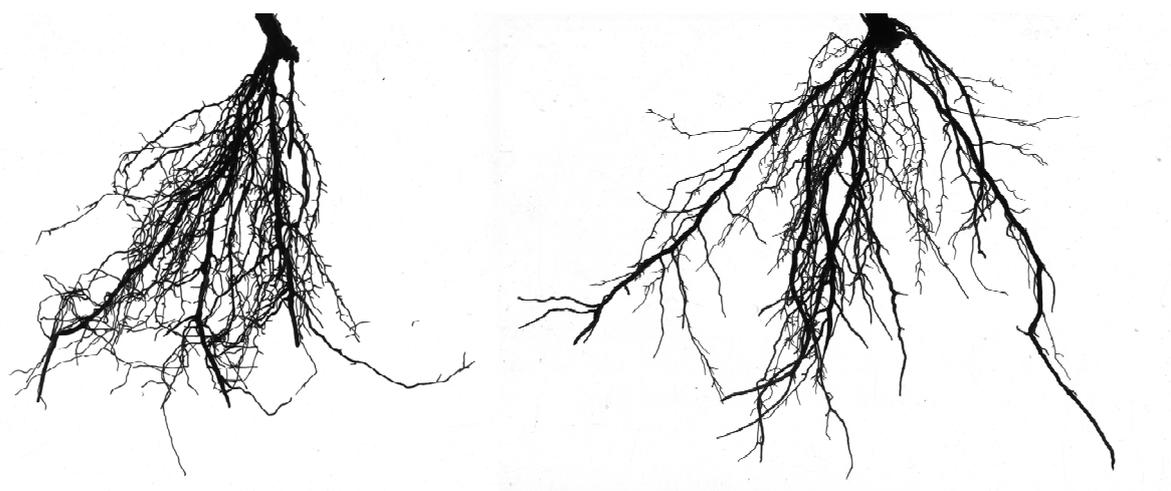


図1 根系のスキャン画像の例

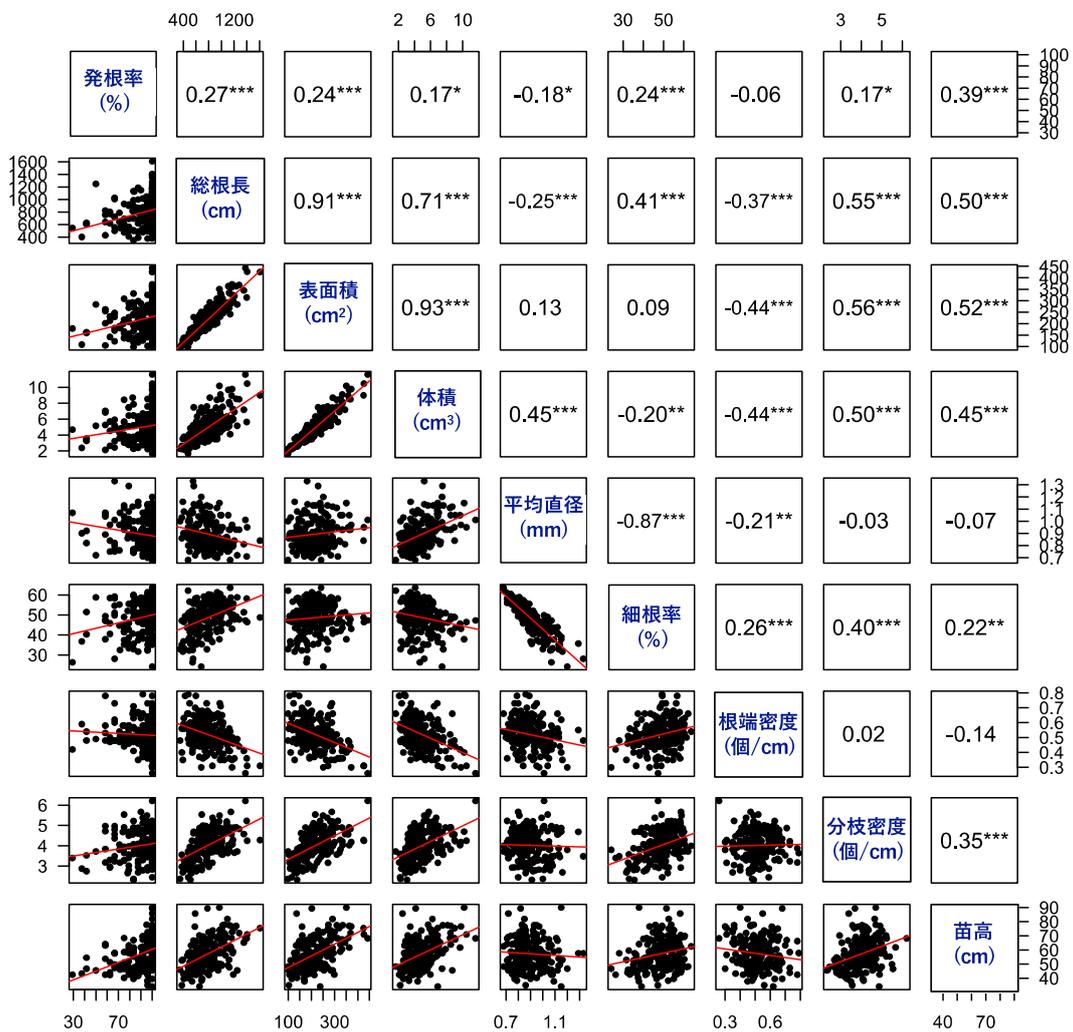


図2 発根率、根系形質、苗高における散布図行列および相関係数

上三角行列、下三角行列はそれぞれ各形質間の相関係数および散布図を示す。各プロットは各クローンにおける平均値を表す。\*, \*\*, \*\*\*はそれぞれ5%、1%、0.1%水準で有意であることを示す。

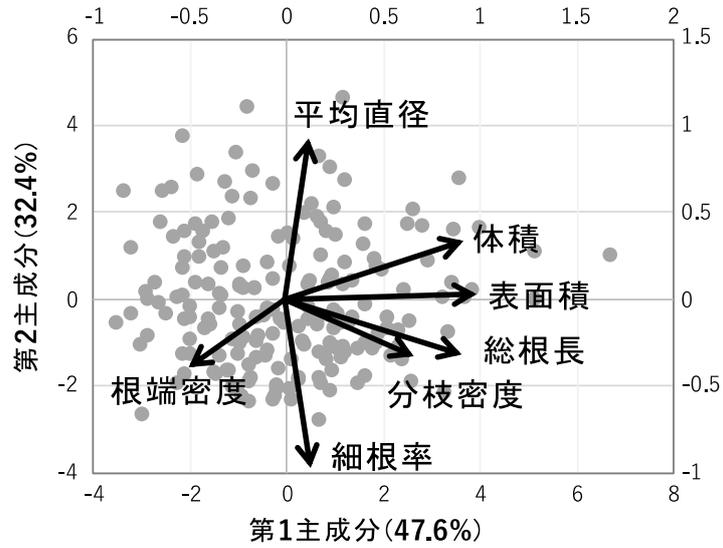


図3 根系形質を因子とした主成分分析における主成分得点と因子負荷量

グラフの下側および左側の数値は各クローンにおける第1主成分および第2主成分の主成分得点を、上側および右側の数値は各形質における第1主成分および第2主成分の因子負荷量をそれぞれ示す。

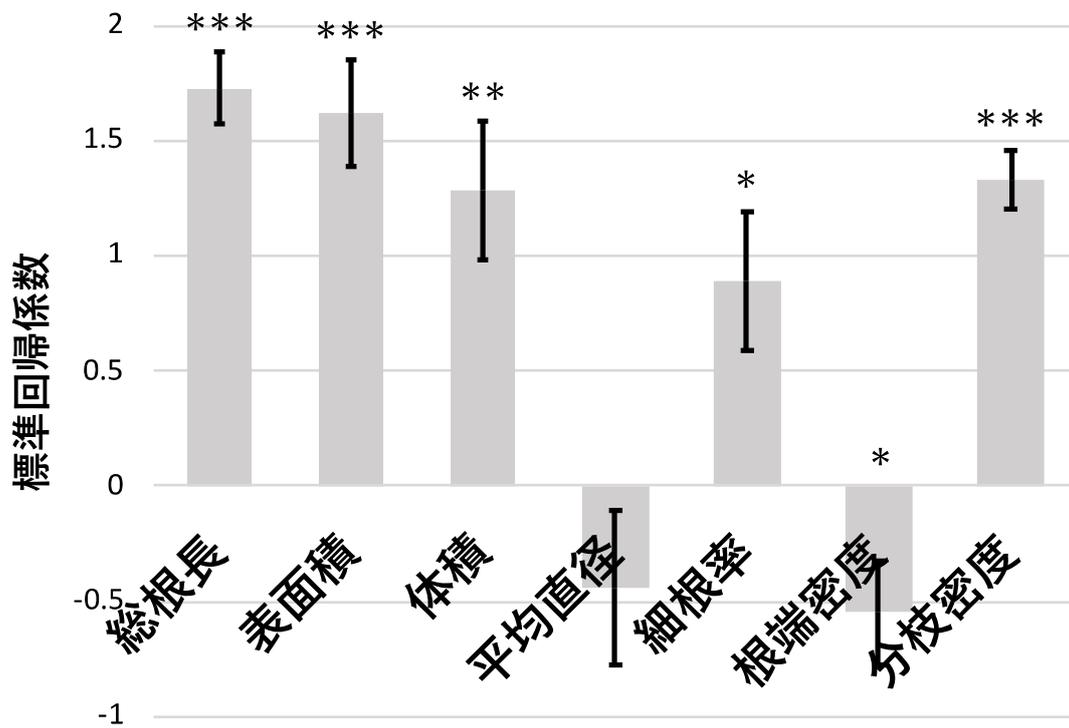


図4 根系形質を説明変数、苗高を目的変数とした主成分回帰分析結果

エラーバーは標準偏差を示す。\*, \*\*, \*\*\*はそれぞれ5%、1%、0.1%水準で有意であることを示す。

表1 供試クローンの一覧およびその選抜地

クローン名	選抜地			ゲノムワイド関連解析
	育種基本区	育種区	都道府県	
エ花巻5号	東北	東北東部	岩手県	○
エ岩泉1号	東北	東北東部	岩手県	○
エ宮古1号	東北	東北東部	岩手県	○
エ水沢6号	東北	東北東部	岩手県	○
ケ岩手11号	東北	東北東部	岩手県	○
ケ岩手4号	東北	東北東部	岩手県	○
ケ気仙5号	東北	東北東部	岩手県	○
ケ上閉伊3号	東北	東北東部	岩手県	○
ケ東磐井1号	東北	東北東部	岩手県	○
エ古川1号	東北	東北東部	宮城県	○
エ古川6号	東北	東北東部	宮城県	○
エ石巻1号	東北	東北東部	宮城県	○
エ中新田2号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ加美1号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ宮城3号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ玉造3号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ栗原5号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ柴田1号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ柴田5号	東北	東北東部	宮城県	○
ケ白石2号	東北	東北東部	宮城県	○
エ横浜2号	東北	東北東部	青森県	○
エ金木4号	東北	東北東部	青森県	○
エ弘前4号	東北	東北東部	青森県	○
エ増川4号	東北	東北東部	青森県	○
エ碓ヶ関2号	東北	東北東部	青森県	○
エ碓ヶ関7号	東北	東北東部	青森県	○
ケ三戸2号	東北	東北東部	青森県	○
ケ三戸7号	東北	東北東部	青森県	○

ケ南津軽 3 号	東北	東北東部	青森県	○
エ山形 3 号	東北	東北西部	山形県	○
エ酒田 3 号	東北	東北西部	山形県	○
ケ最上 4 号	東北	東北西部	山形県	○
ケ西村山 1 号	東北	東北西部	山形県	○
ケ田川 4 号	東北	東北西部	山形県	○
ケ東南置賜 3 号	東北	東北西部	山形県	○
エ合川 1 号	東北	東北西部	秋田県	○
エ大館 1 号	東北	東北西部	秋田県	○
エ能代 1 号	東北	東北西部	秋田県	○
ケ北秋田 1 号	東北	東北西部	秋田県	○
ケ雄勝 1 号	東北	東北西部	秋田県	○
エ村松 1 号	東北	東北西部	新潟県	○
エ六日町 1 号	東北	東北西部	新潟県	○
ケ中頸城 2 号	東北	東北西部	新潟県	○
ケ中頸城 6 号	東北	東北西部	新潟県	○
ケ長岡市 1 号	東北	東北西部	新潟県	○
ケ東蒲原 5 号	東北	東北西部	新潟県	○
ケ東蒲原 6 号	東北	東北西部	新潟県	○
碓氷 2 号	関東	北関東	群馬県	○
甘楽 1 号	関東	北関東	群馬県	○
勢多 3 号	関東	北関東	群馬県	○
勢多 5 号	関東	北関東	群馬県	○
河内 1 号	関東	北関東	栃木県	○
今市 2 号	関東	北関東	栃木県	○
上都賀 7 号	関東	北関東	栃木県	○
矢板 4 号	関東	北関東	栃木県	○
岩瀬 1 号	関東	北関東	福島県	○
双葉 2 号	関東	北関東	福島県	○
棚倉 2 号	関東	北関東	福島県	○
田村 2 号	関東	北関東	福島県	○

東白川 4 号	関東	北関東	福島県	○
東白川 9 号	関東	北関東	福島県	○
南会津 10 号	関東	北関東	福島県	○
久慈 11 号	関東	関東	茨城県	○
新治 2 号	関東	関東	茨城県	○
筑波 1 号	関東	関東	茨城県	○
爽春	関東	関東	茨城県	○
西川 7 号	関東	関東	埼玉県	○
秩父(県)4 号	関東	関東	埼玉県	○
三保 3 号	関東	関東	神奈川県	○
足柄上 5 号	関東	関東	神奈川県	○
丹沢 5 号	関東	関東	神奈川県	○
中 6 号	関東	関東	神奈川県	○
津久井 3 号	関東	関東	神奈川県	○
箱根 3 号	関東	関東	神奈川県	○
片浦 3 号	関東	関東	神奈川県	○
与瀬 3 号	関東	関東	神奈川県	○
郷台 1 号	関東	関東	千葉県	○
勝浦 1 号(千葉)	関東	関東	千葉県	○
北三原 3 号	関東	関東	千葉県	○
益田 2 号	関東	中部山岳	岐阜県	○
恵那 3 号	関東	中部山岳	岐阜県	○
山県 1 号(岐阜)	関東	中部山岳	岐阜県	○
大野 2 号(岐阜)	関東	中部山岳	岐阜県	○
揖斐 3 号	関東	中部山岳	岐阜県	○
揖斐 5 号	関東	中部山岳	岐阜県	○
塩山 1 号	関東	中部山岳	山梨県	○
大月 3 号	関東	中部山岳	山梨県	○
下伊那 3 号	関東	中部山岳	長野県	○
下高井 10 号	関東	中部山岳	長野県	○
松筑 1 号	関東	中部山岳	長野県	○

長水 12 号	関東	中部山岳	長野県	○
飯山 9 号	関東	中部山岳	長野県	○
飯田 1 号	関東	中部山岳	長野県	○
東加茂 3 号	関東	東海	愛知県	○
北設楽 1 号	関東	東海	愛知県	○
伊豆 6 号	関東	東海	静岡県	○
大井 9 号	関東	東海	静岡県	○
天城 4 号	関東	東海	静岡県	○
天竜 11 号	関東	東海	静岡県	○
天竜 9 号	関東	東海	静岡県	○
富士 1 号	関東	東海	静岡県	○
度会 9 号	関西	近畿	三重県	○
蒲生 2 号	関西	近畿	滋賀県	○
宇陀 34 号	関西	近畿	奈良県	○
吉野 56 号	関西	近畿	奈良県	○
吉野 8 号	関西	近畿	奈良県	○
伊都 5 号	関西	近畿	和歌山県	○
金沢 1 号	関西	日本海岸東部	石川県	○
高岡 1 号(富山)	関西	日本海岸東部	富山県	○
城端 1 号	関西	日本海岸東部	富山県	○
大野 3 号(福井)	関西	日本海岸東部	福井県	○
京北 1 号	関西	日本海岸西部	京都府	○
日野 15 号	関西	日本海岸西部	鳥取県	○
八頭 5 号	関西	日本海岸西部	鳥取県	○
隠岐 5 号	関西	日本海岸西部	島根県	○
鹿足 2 号	関西	日本海岸西部	島根県	○
仁多 2 号	関西	日本海岸西部	島根県	○
邑智 2 号	関西	日本海岸西部	島根県	○
美方 2 号	関西	日本海岸西部	兵庫県	○
美方 3 号	関西	日本海岸西部	兵庫県	○
苫田 15 号	関西	瀬戸内海	岡山県	○

苫田 20 号	関西	瀬戸内海	岡山県	○
苫田 21 号	関西	瀬戸内海	岡山県	○
高田 1 号	関西	瀬戸内海	広島県	○
山県 3 号	関西	瀬戸内海	広島県	○
庄原 1 号	関西	瀬戸内海	広島県	○
阿武 3 号	関西	瀬戸内海	山口県	○
美祢 10 号	関西	瀬戸内海	山口県	○
豊浦 4 号	関西	瀬戸内海	山口県	○
氷上 1 号	関西	瀬戸内海	兵庫県	○
宇和島署 1 号	関西	四国北部	愛媛県	○
安芸 10 号	関西	四国南部	高知県	○
高岡 2 号	関西	四国南部	高知県	○
高岡 4 号	関西	四国南部	高知県	○
川崎署 6 号	関西	四国南部	高知県	○
大柝署 4 号	関西	四国南部	高知県	○
中村署 3 号	関西	四国南部	高知県	○
本山署 2 号	関西	四国南部	高知県	○
海部 3 号	関西	四国南部	徳島県	○
三好 4 号	関西	四国南部	徳島県	○
三好 6 号	関西	四国南部	徳島県	○
勝浦 3 号	関西	四国南部	徳島県	○
那賀 20 号	関西	四国南部	徳島県	○
那賀 31 号	関西	四国南部	徳島県	○
県杵島 1 号	九州	北九州	佐賀県	○
県唐津 3 号	九州	北九州	佐賀県	
県唐津 5 号	九州	北九州	佐賀県	○
県唐津 7 号	九州	北九州	佐賀県	○
県藤津 14 号	九州	北九州	佐賀県	○
県藤津 17 号	九州	北九州	佐賀県	○
県藤津 24 号	九州	北九州	佐賀県	○
県藤津 25 号	九州	北九州	佐賀県	○

県藤津 2 号	九州	北九州	佐賀県	○
県藤津 6 号	九州	北九州	佐賀県	○
県早良 1 号	九州	北九州	福岡県	○
県浮羽 1 号	九州	北九州	福岡県	○
福岡署 2 号	九州	北九州	福岡県	○
県西白杵 4 号	九州	中九州	宮崎県	○
県西白杵 5 号	九州	中九州	宮崎県	○
県阿蘇 13 号	九州	中九州	熊本県	○
県阿蘇 8 号	九州	中九州	熊本県	
県佐伯 1 号	九州	中九州	大分県	
県竹田 11 号	九州	中九州	大分県	○
県日出 1 号	九州	中九州	大分県	○
県日田 1 号	九州	中九州	大分県	○
県日田 20 号	九州	中九州	大分県	○
綾署 1 号	九州	南九州	宮崎県	○
綾署 2 号	九州	南九州	宮崎県	○
宮崎署 6 号	九州	南九州	宮崎県	○
県東白杵 37 号	九州	南九州	宮崎県	○
県東白杵 5 号	九州	南九州	宮崎県	○
県東白杵 8 号	九州	南九州	宮崎県	○
県日南 2 号	九州	南九州	宮崎県	
県日南 3 号	九州	南九州	宮崎県	○
高岡署 4 号	九州	南九州	宮崎県	○
県球磨 5 号	九州	南九州	熊本県	○
水俣署 4 号	九州	南九州	熊本県	○
多良木署 1 号	九州	南九州	熊本県	○
県始良 11 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県始良 16 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県始良 21 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県始良 4 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県始良 5 号	九州	南九州	鹿児島県	○

県始良 6 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県肝属 2 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県薩摩 15 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県薩摩 16 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県薩摩 3 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県薩摩 7 号	九州	南九州	鹿児島県	
県指宿 1 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県鹿児島 1 号	九州	南九州	鹿児島県	○
県日置 5 号	九州	南九州	鹿児島県	○
大口署 1 号	九州	南九州	鹿児島県	○

---

表2 発根率、根系形質、苗高における基本統計量および広義の遺伝率

形質	平均値	最小値	最大値	中央値	標準偏差	変動係数	広義の遺伝率
発根率 (%)	90.25	29.17	100	95.83	13.72	0.15	-
総根長 (cm)	789.08	350.71	1608.36	765.1	240.2	0.3	0.32
表面積 (cm <sup>2</sup> )	217.93	98.69	442.97	208.35	68.1	0.31	0.3
体積 (cm <sup>3</sup> )	4.95	1.67	11.6	4.57	1.84	0.37	0.29
平均直径 (mm)	0.89	0.68	1.33	0.87	0.12	0.14	0.34
細根率 (%)	48.65	24.14	63.6	49.34	7.68	0.16	0.34
根端密度 (個/cm)	0.52	0.26	0.79	0.51	0.1	0.19	0.48
分枝密度 (個/cm)	4.02	2.32	6.21	4.03	0.7	0.18	0.42
苗高 (cm)	57.33	34.13	90	56.2	10.9	0.19	0.6

### 第3章 ゲノムワイド関連解析による、不定根形成特性および根系形質に関連する遺伝的多型の抽出

#### 第1節 緒言

さし木増殖は、母樹の遺伝子型を継承した苗木を技術的に比較的容易に増殖することができることから、育種によって選抜された優れた遺伝的特性を有する個体を増殖・普及するうえで、特に栽培植物や園芸植物、造林樹種等において非常に有用な増殖手法である。この増殖手法における得苗率には、不定根形成特性や根系形質が関連する。しかしながら、不定根形成特性や根系形質といったさし木増殖に関連する形質は様々な外生的、内生的な要因に影響される。遺伝的要因は、その主要要因のうちの一つであり、第2章においては不定根形成特性や根系形質における遺伝的特性について整理された。これら形質に関連する遺伝的多型を明らかにすることができれば、遺伝的多型を解析することによる表現型予測等が可能になることが期待される (Desti and Ortiz 2014; Schmidt et al. 2015) ことから、育種学的観点における意義は大きいと考えられる。

表現型に関連する遺伝的多型や量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci; QTL) を明らかにするための有用な手法として、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) や QTL 解析が挙げられる。これまでに、ユーカリ (*Eucalyptus*) 属やポプラ (*Populus*) 属等の造林樹種を含むいくつかの植物種において、不定根の形成や根系の発達に関連する量的形質遺伝子座について報告されている (Grattapaglia et al. 1994; Marques et al. 1999; Zhang et al. 2009)。一方、針葉樹であるハイブリッドマツ (*Pinus elliottii* × *Pinus caribaea*) (Shepherd et al. 2006) やスギ (Yoshimaru et al. 1998) においても、不定根形成特性に関連する量的形質遺伝子座について報告されているものの、遺伝的多型を検出するために用いられた DNA マーカーはそれぞれ SSR (simple sequence repeat) マーカー、RFLP

(restriction fragment length polymorphism) マーカーであり、密度についても決して高くはない。表現型に関連する遺伝的多型を検出するためには、遺伝子型および表現型を分離させた材料を用いる必要がある。一方で、GWAS はもともと種が保有する遺伝的多様性（クローン間差）を利用することにより、遺伝子型および表現型を分離させるための特別な集団の作成を伴わずに、集団内に含まれる全ての SNP (single nucleotide polymorphism; 遺伝的多型の一種) に対して QTL を探索することが可能であるという利点を有する

(Uchiyama et al. 2013)。スギを含む針葉樹においては、そのゲノムサイズの巨大さ (Ahuja and Neale 2005; De La Torre et al. 2014) や連鎖不平衡の程度の低さ (Neale and Savolainen 2004) ゆえに、GWAS の適用は他の動植物に比べて困難であるとされてきた。一方で、最近、シーケンス技術（塩基配列解読技術）やジェノタイピング技術（遺伝子型解析技術）の向上に伴って、スギにおいても約 70,000 以上の SNP を検出することのできるジェノタイピングパネルが構築され (Mishima et al. 2018)、雄花着花性や材質（応力伝播速度）、成長性に関して GWAS が適用され、その有効性が示されている (Uchiyama et al. 2013; Hiraoka et al. 2018)。

本研究では、スギにおける不定根形成特性や根系形質といったさし木増殖に関連する形質に関連する遺伝的要因 (QTL および遺伝子) を同定することを目的として、スギ精英樹 188 クローンをを用いてゲノムワイド関連解析を試行した。

## 第 2 節 材料と方法

### 1. 供試材料

本章においては、第 2 章において供試したスギ精英樹 193 クローンに含まれる 188 クローンをを用いた (表 1)。材料となるさし穂の取得方法および育成方法は、第 2 章第 1 節 1. に

記載した通りである。

## 2. 表現型データの取得

本章においては、第2章において測定した発根率および7つの根系形質を表現型データとして用いた。表現型データの取得方法は、第2章第1節2.に記載した通りである

## 3. 遺伝子型データの取得

遺伝子型データについては、これまでに林木育種センターにおいて得られているデータを利用した (Mishima et al. 2018、および、一部、未公表データ)。そのデータ取得方法の概要は以下の通りである。さし付けた直後に、各さし穂から新芽を採取し、DNA 抽出に供試するまで、-20℃に設定した冷凍庫内で保存した。DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて、一部改変したプロトコルによって、DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、73,640 個の SNP マーカーがデザインされているアレイである Axiom\_Cj\_70K\_ver. 2.0 (GEO: GSE95618) (Mishima et al. 2018) を用いた GeneTitan システム (Affymetrix) によって Axiom ジェノタイピング法を行った。解析にあたっては、解析ソフトウェア R version 3.5.0 (R Development Core Team 2018) を用いて、取得された SNP ジェノタイプデータ (メジャーホモ接合体、ヘテロ接合体、マイナーホモ接合体) を数値データ (-1、0、1) に変換した。rrBLUP パッケージ (Endelman 2011) 中の A.mat 関数を用いて、73,640 個の SNP ジェノタイプデータのうち、本研究で用いた 188 クローン内において多型が認められなかった SNP、または、データ欠損率が 10%以上であった SNP、または、マイナーアレル頻度が 5%未満であった SNP を除いた 43,205 個の SNP ジェノタイプデータを抽出した。同時に、欠損データについては、期待値最大化法 (expectation-maximization algorithm、EM

法)によってその遺伝子型を推測した。

#### 4. 遺伝的構造解析

本研究において用いた材料における遺伝的構造を明らかにするために、得られた SNPs の連鎖地図上の位置情報の推定を試みた。Mishima et al. (2018) において 6,629 SNPs を用いて連鎖地図が構築されており、本研究における GWAS に供試された 43,205 SNPs と重複している 6,380 SNPs についてはその連鎖地図上の位置情報を利用した。さらに、それらの SNP 以外の SNP については、genetics パッケージ中の LD 関数を用いて連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium, LD) の強度 ( $r^2$ ) を算出し、 $r^2$  値、p 値の閾値をそれぞれ 0.6、0.01 として、最も低い p 値を示した SNP と連鎖地図上における位置は同一であるとみなすことにより、各 SNP の連鎖地図上の位置を推定した。

次に、diveRsity パッケージ中の basicStats 関数 (Keenan et al. 2013) を用いて、ヘテロ接合度の期待値 ( $H_E$ ) および観察値 ( $H_O$ ) を算出した。マッピングされた 6,629 SNPs における、遺伝子型を推定する前のデータに基づいて、LEA パッケージ中の snmf 関数 (Frichot and Francois 2015) を用いて、集団の祖先解析を行った。クラスタ数 (K) を選択するために、 $K = 1-10$  として“entropy=TRUE”オプションを用いて snmf 関数によって算出された cross entropy criterion を使用した。また、prcomp 関数によって、供試された集団について主成分分析を行った (Patterson et al. 2006; Price et al. 2006)。

#### 5. ゲノムワイド関連解析

上記のストラテジーで抽出された 43,205 SNPs について、R において rrBLUP パッケージ中の GWAS 関数 (Endelman 2011) を用いて、各形質に対するゲノムワイド関連解析

(Genome-Wide association study; GWAS) を実施した。解析にあたっては、偽陽性である SNPs が検出されることを軽減させるために、“K”オプションおよび“n.PC”オプションによって集団構造および血縁構造の両方を考慮した混合モデル (Q+K モデル) を用いた (Yu et al. 2006)。K および n.PC における最適値は rrBLUP パッケージ中の A.mat 関数および prcomp 関数によってそれぞれ導出された。本研究においては、GWAS の結果、 $-\log_{10}(p) > 4$  であった SNP を各形質に対して統計的に有意である SNP とみなした。SNP が座乗する遺伝子の配列をクエリーとしてシロイヌナズナのタンパク質データベース (TAIR10-pep-20101214) に対して BLASTX による相同性検索を行い、閾値を  $1E-5$  として最も高い e 値を示した Isotig をスギにおけるホモログとみなし、そのタンパク質情報から各 Isotig の遺伝子としてのアノテーションを推測した。なお、本研究においては便宜的に Isotig を遺伝子として扱った。

## 6. 各遺伝子型における表現型分布の比較

各形質において有意に関連していると認められた SNP の関連性を確認するために、各 SNP について遺伝的多型ごと (メジャーホモ接合体、ヘテロ接合体、マイナーホモ接合体) の表現型分布を調べた。次に、遺伝子多型ごとの表現型分布を比較するために、R における aov 関数によって、一元配置分散分析 (analysis of variance; ANOVA) を実施し、p 値が 0.05 未満であった場合 (少なくとも 1 つの群の母平均が他の群の母平均と異なると認められた場合) に、R における TukeyHSD 関数によって、チューキー・クレーマー検定による多重比較 (Kramer 1956) を行った。

### 第3節 結果

#### 1. 遺伝的構造

平均ヘテロ接合度の予測値および観測値はそれぞれ 0.322 および 0.314 であった。祖先解析の結果、本研究の供試材料における祖先集団数は 6 であると推定された。

#### 2. 各形質と有意に関連する遺伝的多型の抽出

各形質においてそれぞれ 1~5 個の関連が有意な SNPs が抽出され、すなわち計 23 個の SNPs において、いずれかの形質と有意な関連が認められた ( $-\log_{10}(p) > 4$ ) (図 7、表 3)。本章においては、第 2 章における結果に基づき、さし木増殖においてより重要であるとみなされた形質である発根率、総根長 (根量に関連する形質における代表的形質)、細根率、分枝密度に、特に着目して解析を行った。発根率に対しては、3 つの SNP (AX-115713708、AX-115723236、AX-115668262 (それぞれ  $-\log_{10}(p) = 5.48$ 、 $4.52$ 、 $4.40$ )) との有意な関連が認められた。総根長に対しては、3 つの SNP (AX-116813086、AX-153640474、AX-153643252 (それぞれ  $-\log_{10}(p) = 4.39$ 、 $4.25$ 、 $4.01$ )) との有意な関連が認められた。細根率に対しては、1 つの SNP (AX-115673016 ( $-\log_{10}(p) = 4.84$ )) との有意な関連が認められた。分枝密度に対しては、1 つの SNP (AX-153646469 ( $-\log_{10}(p) = 4.22$ )) との有意な関連が認められた。

#### 3. 遺伝子型ごとの表現型分布

発根率 (平均  $\pm$  標準偏差) については、AX-115713708 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ  $76.67 \pm 21.68$ 、 $88.98 \pm 12.66$ 、 $95.27 \pm 7.75$  であり、AX-115723236 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ  $62.50 \pm 33.07$ 、 $82.27$

± 18.28、91.88 ± 11.49 であり、AX-115668262 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 92.54 ± 11.03、82.06 ± 18.48 であり、遺伝子型による違いが認められた ( $p < 0.05$ ) (図 8)。総根長 (平均 ± 標準偏差) については、AX-116813086 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 739.01 ± 230.72、817.93 ± 227.63、874.84 ± 253.07 であり、遺伝子型による違いは認められなかった ( $p > 0.05$ ) (図 8)。AX-153640474 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 534.14 ± 125.60 (CC 群)、736.51 ± 199.27 (TC 群)、820.83 ± 247.54 (TT 群) であり、CC 群と TT 群の間にのみ有意差が認められた ( $p < 0.01$ ) (図 8)。AX-153643252 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 564.58 ± 162.81 (AA 群)、720.92 ± 198.09 (AC 群)、833.33 ± 239.42 (CC 群) であり、AA 群と CC 群、AC 群と CC 群の間に有意差が認められた ( $p < 0.01$ ) (図 8)。細根率 (平均 ± 標準偏差) については、AX-115673016 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 45.66 ± 8.14 (CC 群)、48.51 ± 7.79 (CG 群)、50.85 ± 6.61 (GG 群) であり、CC 群と GG 群の間にのみ有意差が認められた ( $p < 0.01$ ) (図 8)。分枝密度 (平均 ± 標準偏差) については、AX-153646469 における各遺伝子型を示すクローン群において、それぞれ 4.28 ± 0.69 (AA 群)、4.25 ± 0.69 (AG 群)、3.79 ± 0.68 (GG 群) であり、AA 群と GG 群、AG 群と GG 群の間に有意差が認められた (それぞれ  $p < 0.05$ 、0.001) (図 8)。

#### 第 4 節 考察

発根率と最も有意に関連を示した AX-115713708 と最も強く連鎖している AX-11572889 は、第 5 連鎖群における 85.121cM に位置しており、AT5G42180 のホモログである reCj27623 上に座乗していた。AT5G42180 は Peroxidase superfamily protein をコードする遺伝子である。

根系形質については、GWAS によって形質の関連が認められたのにも関わらず、遺伝子型による有意差が認められなかった SNPs が散見された。この理由としては、対象形質がより多くの SNP（遺伝子）が関連する量的形質であることが挙げられる。

## 第 5 節 小括

本章においては、第 2 章で得られた不定根形成に関連するフェノタイプデータおよびこれまでに明らかにされているおよそ 7 万の SNP ジェノタイプデータ (Mishima et al. 2018 および一部、未公表データ) を用いて、各形質に関連する遺伝的多型の解明を試みた。その結果、計 23 の SNPs について、いずれかの形質と有意に関連することが認められた。さらに、本章においては、特にさし木増殖において重要な形質であると示唆された発根率、総根長、細根率、分枝密度に着目し、これらの SNPs における遺伝子型ごと (メジャーホモ接合体、ヘテロ接合体、マイナーホモ接合体) の表現型分布を比較したところ、概ね有意な相違が認められたことから、表現型に対する各 SNPs の関連性が確認された。また、発根率と最も有意に関連していると認められた SNP である AX-115713708 は、他の植物において不定根形成に関連していることが示唆されている Peroxidase superfamily protein をコードする遺伝子のホモログ上に座乗している可能性があることが明らかとなり、機能的な観点においてもその重要性が認められる結果となった。

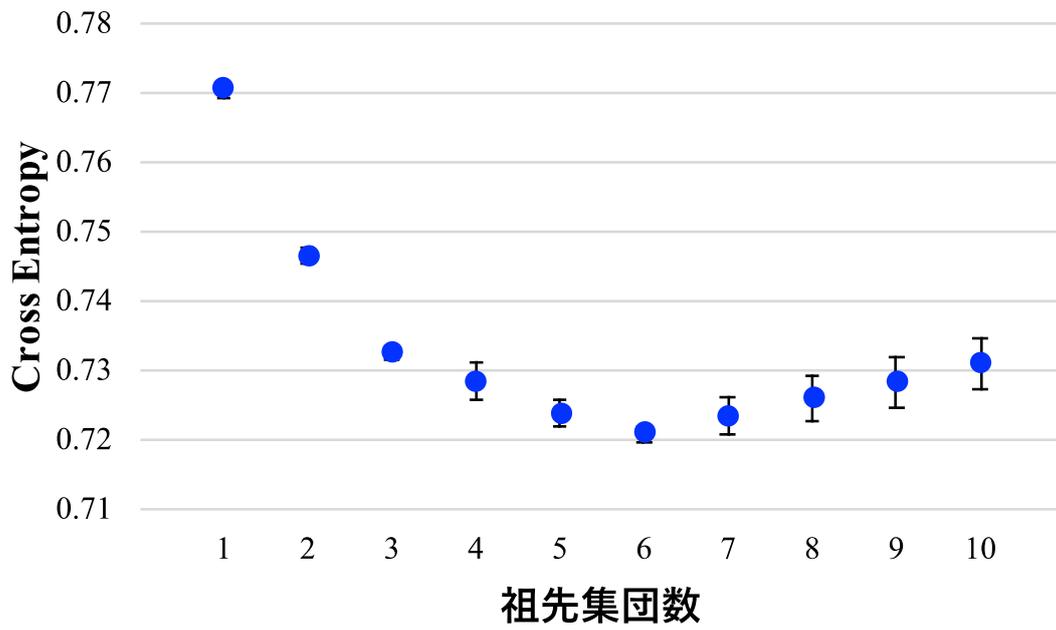


図5 遺伝的構造解析に用いられるクロスエントロピーと祖先集団の数 (K) の関係

エラーバーは標準偏差を示す。

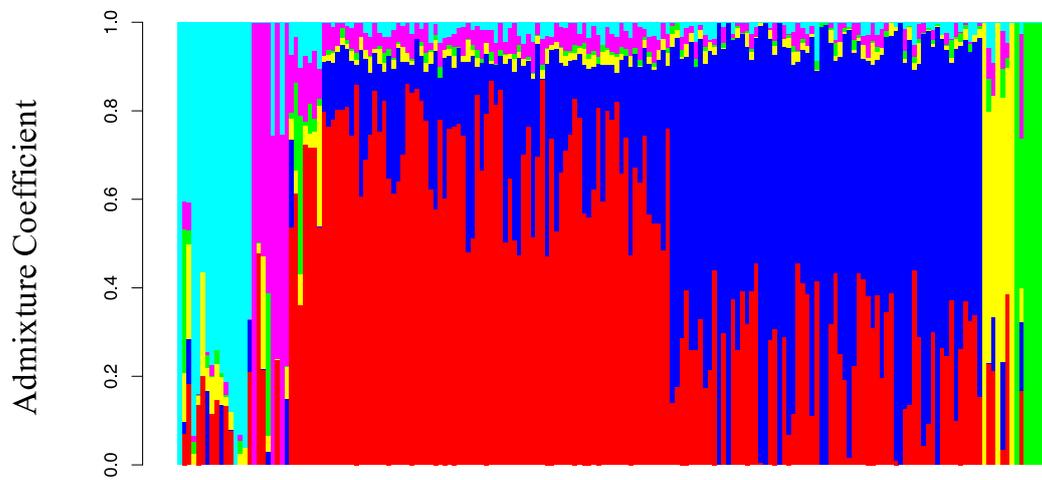


図 6 43,206SNP データに基づく、188 サンプルにおける遺伝的構造解析結果 (K = 6)

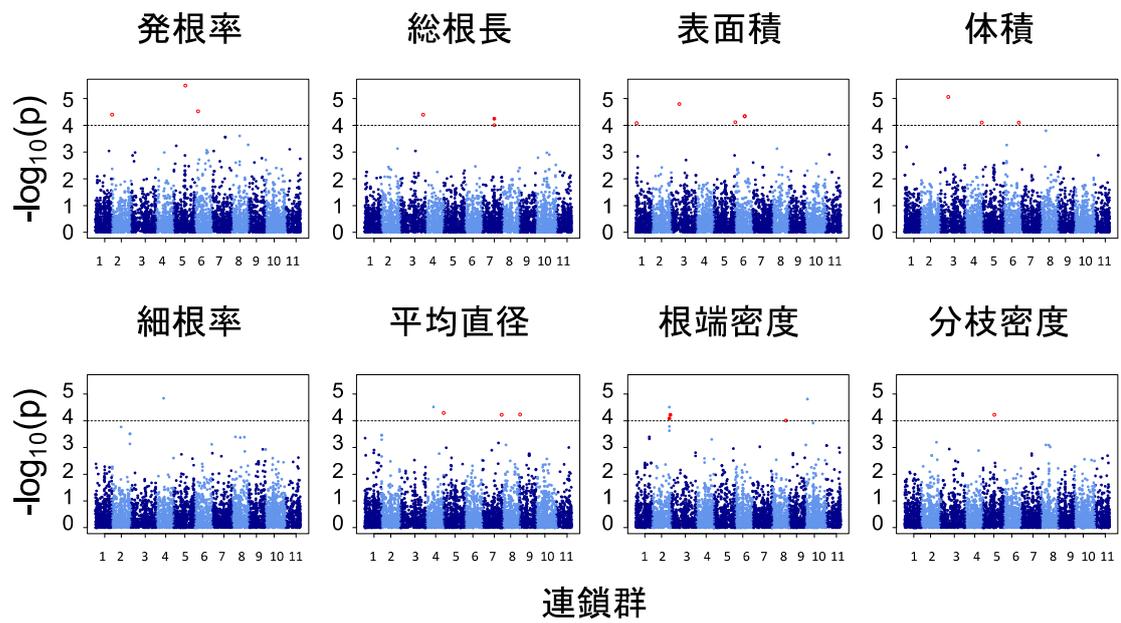


図7 ゲノムワイド関連解析に基づくマンハッタンプロット

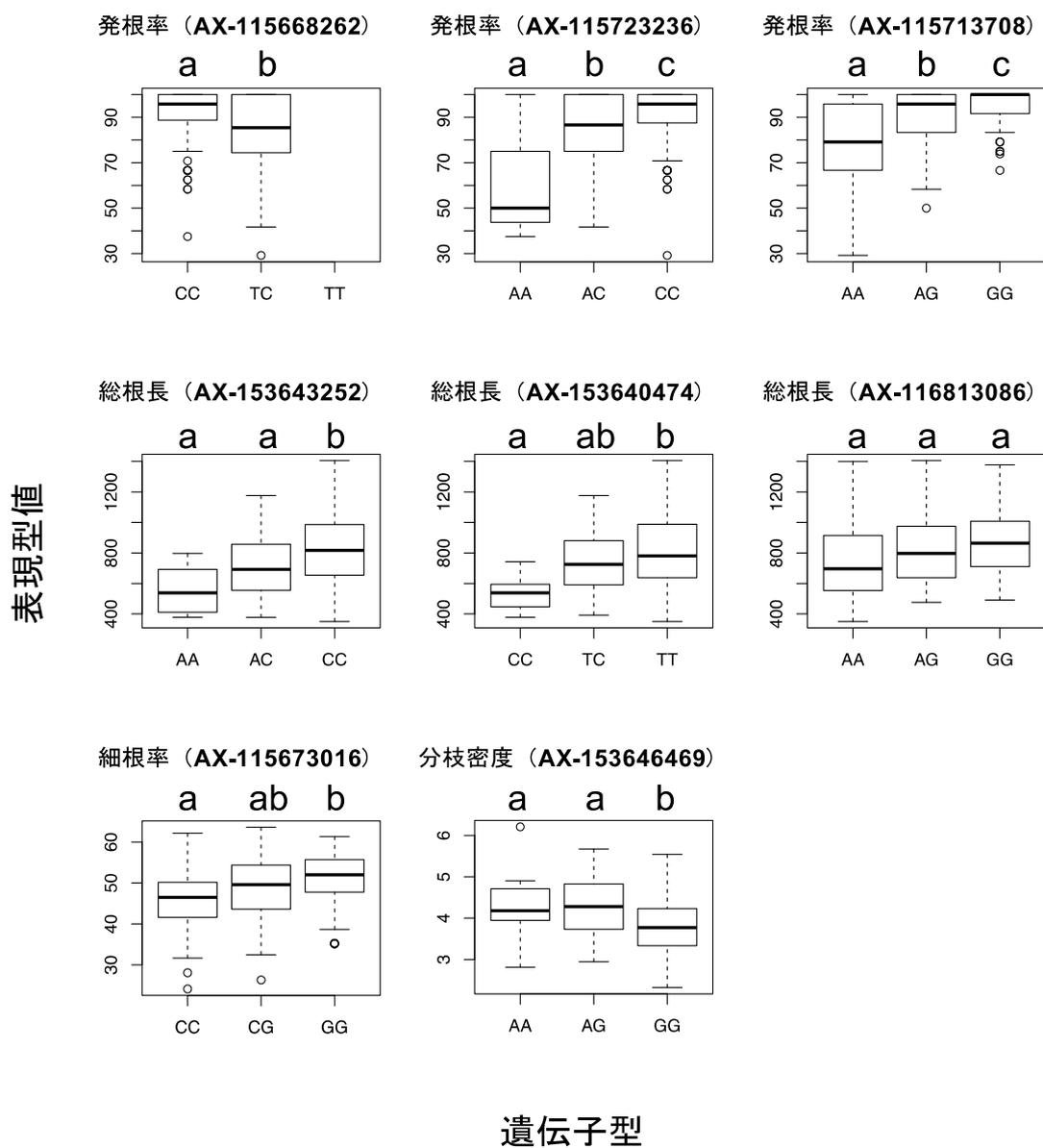


図8 各遺伝子型における表現型の分布

異なるアルファベットは、5%水準で有意差があることを示す。

表3 GWAS によって抽出された有意な SNP

形質	SNP	Paired SNP	連鎖不平衡係数 (r <sup>2</sup> )	連鎖群	位置 (cM)	-log <sub>10</sub> (p)
発根率	AX-115713708	AX-115728892	0.1244	5	85.121	5.4831
発根率	AX-115723236	AX-115681826	0.2066	6	23.756	4.5220
発根率	AX-115668262	AX-115693254	0.2476	2	0.265	4.3982
総根長	AX-116813086	AX-115704687	0.0734	3	162.308	4.3950
総根長	AX-153640474	AX-115722963	0.4360	7	84.71	4.2467
総根長	AX-153643252	AX-115722963	0.3781	7	84.71	4.0056
表面積	AX-153645290	AX-115688093	0.1413	3	58.539	4.7941
表面積	AX-153642894	AX-115713705	0.0821	6	70.314	4.3393
表面積	AX-153653343	AX-115713705	0.0821	6	70.314	4.3393
表面積	AX-153638749	AX-115715763	0.0767	6	1.587	4.1168
表面積	AX-115691153	AX-115708338	0.1936	1	6.107	4.0816
体積	AX-153645290	AX-115688093	0.1413	3	58.539	5.0618
体積	AX-115708815	AX-115693614	0.1466	4	120.397	4.1024
体積	AX-115722556	AX-115694016	0.2108	6	107.34	4.1006
平均直径	AX-115673016			4	55.269	4.5159
平均直径	AX-115724055	AX-115724833	0.1049	4	128.4	4.2898
平均直径	AX-153653444	AX-115699103	0.2027	9	3.444	4.2325
細根率	AX-115673016			4	55.269	4.8384
平均直径	AX-115685766	AX-115685840	0.0938	7	138.216	4.2234
根端密度	AX-115685359			10	14.268	4.8084
根端密度	AX-115677786			2	124.372	4.5082
根端密度	AX-153656589	AX-115693677	0.6970	2	131.636	4.2191
根端密度	AX-115683214	AX-115714689	0.9652	2	124.372	4.0832
根端密度	AX-115690143	AX-115672950	0.0821	8	100.335	4.0068
分枝密度	AX-153646469	AX-115726887	0.1376	5	83.49	4.2236

推測遺伝子名	相同遺伝子 (Arabidopsis thaliana)	E 値
Peroxidase superfamily protein(PER64)	AT5G42180	4.18E-138
C2H2-like zinc finger protein	AT5G63280	6.2E-87
plant/protein	AT3G27050	1.29E-48
tubulin folding cofactor A (KIESEL)(KIS)	AT2G30410	3.54E-40
RING/U-box protein	AT3G05670	3.65E-35
RING/U-box protein	AT3G05670	3.65E-35
hypothetical protein	AT5G47830	7.99E-52
GPI-anchored adhesin-like protein, putative (DUF936)	AT1G08760	9.37E-66
transmembrane/coiled-coil protein (DUF726)	AT4G36210	1.09E-164
hypothetical protein	AT5G47830	7.99E-52
seed maturation protein(SMP1)	AT3G12960	0.000822451
HAESA-like 1(HSL1)	AT1G28440	0
F-box/RNI-like superfamily protein	AT1G78760	0.764064
alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	AT3G48080	1.64E-61
hypothetical protein	AT2G28625	2.0586
Leucine-rich repeat protein kinase family protein	AT1G12460	0.11758
plastid transcriptionally active 16(PTAC16)	AT3G46780	8.1E-100

## 第4章 不定根形成における遺伝子発現変動

### 第1節 緒言

表現型は遺伝子型と環境の効果によって決定づけられることを踏まえると、さし木増殖における得苗率の向上に向けた、不定根形成特性の改良方法としては、遺伝的改良のほか、育成環境の制御や化学物質の添加のような処理による方法が考えられる。不定根の形成は、さし木増殖において不可欠な生理学的プロセスであるが、その成否は様々な要因に影響されることが明らかとなっている。スギにおいても、異なる環境における不定根形成特性の違いが明らかにされているが、違いが生じる要因については不明瞭な部分が多い。こうした要因を明らかにすることができれば、その知見に基づき、不定根形成により適した環境の解明につながると考えられることから、不定根形成過程において、環境の違いがさし穂に与える影響を明らかにすることは、重要である。そのためには、スギの不定根形成過程における生体内変化について、基盤情報を構築する必要がある。遺伝子発現解析は、網羅的に行うことができる、配列の相同性に基づいて個々の遺伝子の機能を推測することができるといった特徴を有することから、植物の生理現象を捉えるための非常に有用な手法の一つである (Alba et al. 2004)。これまでに、園芸植物など草本植物においては、不定根形成に過程における生体内変化の解明に向けて、多くの分子生物学的が行われてきた (Li et al. 2009; da Costa et al. 2013; Steffens and Rasmussen 2016; Druege et al. 2016)。その結果、草本植物においては、オーキシンは不定根形成の開始に中心的な役割を果たしていること (de Klerk et al. 1999; Pop et al. 2011; Gutierrez et al. 2012; Ahkami et al. 2013; Pacurar 2014)、炭水化物は不定根の発達・伸長のためのエネルギー源として重要であること (Haissig 1989; Li and Leung 2000; Ahkami et al. 2009; Klopotek et al. 2010) 等が明らかにされている。一方、針葉樹の不定根形成における遺伝子発現については、その研究

の数は限られており (Brinker et al. 2004; Han et al. 2014)、スギにおいてはほとんど明らかになっていないと言っても過言ではない。したがって、不定根形成過程における環境の効果を定量的に捉えるための指標としての遺伝子発現の利用に向けて、スギの不定根形成過程においては、どのような遺伝子がどのような発現挙動を示すのか、基盤となる情報を得る必要がある。さし穂の軸部分のうち、地中部にあたる基部と、その上部かつ地上部にあたる主軸部は切断前においては同等の機能を有する部位であるとみなされる一方で、さし付け後、一般的に不定根は基部において形成され、主軸部においては形成されない。したがって、不定根形成における基部と主軸部における遺伝子発現を含む生体内変化を比較することにより、不定根形成過程において重要な生体内変化を明らかにするための重要な知見が得られると考えられる。

本章では、スギの不定根形成における遺伝子発現に関するリファレンスを構築することを目的として、採穂時から不定根形成に至るまでの間の計 8 時点において、さし穂の基部 (発根部)、主軸部 (非発根部) における、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。

## 第 2 節 材料と方法

### 1. 供試材料

本研究には、不定根形成特性に優れたスギ精英樹の一つである筑波 1 号を用いた。2016 年 5 月 25 日の午前 9 時から 10 時の間に、林木育種センター内に植栽されている 18 年生の母樹からさし穂を採取し、第 2 章において記載した条件と同様の条件下でさし付け、および、育成を行った。遺伝子発現解析に供試するためのサンプルとして、採穂時、採穂後およそ 2 時間目に当たるさし付け時、さし付けてから 3 時間後、1 日後、3

日後、1 週後、3 週後、6 週後の計 8 時点において、さし穂の基部、主軸部を採取した（図 9）。6 週後においては、目視によって不定根の存在が確認された。採穂時以外は各時点とも午前 10 時から 12 時の間に採取した。各時点とも生物学的反復として 3 個体から採取し、したがって、本研究においては計 48 サンプル（2 部位 × 8 時点 × 3 反復）を得た。採取したサンプルは、直ちに液体窒素で凍結し、RNA 抽出に供試するまで -80°C に設定した冷凍庫内で保存した。

## 2. マイクロアレイデザイン

本研究で用いた DNA マイクロアレイは、Web ベースのアプリケーションである eArray（Agilent Technologies）を用いて、デフォルト設定の Base Composition Methodology（経験則に基づいて最適化した塩基組成を基準にプローブが選択される方法）に従って設計された。次世代シーケンサーの一つである GS-FLX（Roche (454 Life Sciences)）を用いて、様々なステージにおけるスギの各部位（シュート、雄花、木部、実生由来の根）から得られた発現遺伝子断片配列（expressed sequence tags; EST）情報をもとに構築された Isotig（Mishima et al. 2018）を利用してプローブを設計した。設計したプローブのうち、互いに高い相同性が認められたプローブを除いた 19,304 個のプローブが 3 反復ずつ搭載された DNA マイクロアレイである、SurePrint G3 Gene Expression Custom 8 × 60 K Array（Agilent Technologies）を用いた。CLC Genomic Workbench version 4.1.1（CLC bio）を用いて、各 Isotig の配列をクエリーとしてシロイヌナズナ (*Arabidopsis Thaliana*) のタンパク質データベース（TAIR10-pep-20101214）に対して BLASTX による相同性検索を行い、閾値を 1 E-5 として最も高い e 値を示したものをスギにおけるホモログであるとみなし、そのタンパク質情報から各 Isotig の遺伝子としてのアノテーションを推測した。なお、本研究において

は便宜的に Isotig を遺伝子として扱った。

### 3. RNA 抽出およびマイクロアレイ分析

採取した各サンプルから、RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて、RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いたカラム上における DNase 処理を伴う、メーカー推奨の方法を一部改変したプロトコルに従い、トータル RNA を抽出した。なお、目視によって不定根の形成が確認されたさし付け 6 週間における基部のサンプルについては、少量の不定根を含んだ試料から抽出した。抽出したトータル RNA の濃度を NanoDrop 2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) により測定し、品質 (RIN 値) を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) および Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent) により評価した。濃度 (> 80 ng/ul) および RIN 値 (> 7.0) に関して、遺伝子発現解析に適した基準を満すことが確認されたトータル RNA を用いて、メーカー推奨の方法に従って、以下のようにマイクロアレイ分析を行った。まず、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用いて、200 ng のトータル RNA を鋳型として、蛍光色素 Cyanine-3 (Cy3) をラベル化した cRNA を合成した。次に、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いて、600 ng のラベル化 cRNA を 60°C で 30 分間インキュベートすることにより断片化した後、ハイブリダイゼーションオープン (Agilent Technologies) 内において 60°C で 17 時間インキュベートすることによりマイクロアレイスライドへハイブリダイズした。さらに、Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) を用いて、ハイブリダイズしたマイクロアレイスライドを洗浄し、SureScan Microarray Scanner version 9.1 (Agilent Technologies) によってスキャンし、TIFF 形式画像を得た。最後に、Extraction software version 11.5 (Agilent Technologies) によ

て、画像上の各スポットの蛍光シグナル強度を数値化し、各プローブにおける3反復の蛍光シグナル強度の平均値を各遺伝子の発現量とした。

#### 4. データ解析

本研究においては、Subio platform version 1.21 (Subio Inc.) において、以下の過程に沿って、クオリティコントロールおよび解析を行った (図 10)。はじめに、アレイ間の比較を可能にするために、マイクロアレイにデザインされている全遺伝子 (リスト 0: 19,304 遺伝子) の発現量を 75 パーセントイルシフトにより正規化した後、底を 2 とする対数に変換し、それぞれの遺伝子発現量をデータセット内の各遺伝子の平均発現量で除すことによりスケールリングを行った。次に、発現解析データにおける信頼性をより向上させるために、データセット内の全てのサンプルにおいて、Extraction software version 11.5 によって評価されるデータクオリティに関する 3 つの項目 (gIsFeatNonUnifOLs、gIsBGNNonUnifOLs、gIsWellAboveBGs) について適切であるとされ、生シグナル値が 10 以上であった遺伝子群 (リスト 1: 11,909 遺伝子) を抽出した。さらに、不定根形成において発現変動しなかった遺伝子群を除くために、生物学的反復として同条件で採取した 3 つのサンプルにおける平均遺伝子発現量を各サンプルグループにおける遺伝子発現量とし、遺伝子発現量がいずれかのサンプルグループにおいて -0.5 以下あるいは 0.5 以上であった遺伝子群を対象に一元配置分散分析 (analysis of variance; ANOVA) を行い、Benjamini and Hochberg 法 (Benjamini and Hochberg 1995) による Q 値が 0.05 未満であった遺伝子群 (リスト 2: 9,620 遺伝子) を抽出し、以降の解析対象となる遺伝子群とした。解析にあたっては、まず、全体的な遺伝子発現変動の傾向を捉えるために、リスト 2 に含まれる遺伝子群における正規化後の発現量データを用いて、主成分分析と階層クラスタ

リング（類似度：ピアソン相関係数、凝集：群平均法）を行った。遺伝子発現量データに基づいた階層クラスタリング結果に基づいて、12 個のクラスターを同定した。各クラスターに含まれた遺伝子群のうち、BLASTX による相同性検索の結果、アノテーションが付与された遺伝子群について、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 6.8, <https://david.ncifcrf.gov>) (Huang et al. 2009) を用いて各遺伝子の名称を特定するとともに、遺伝子オントロジー解析を行い、GOTERM\_BP\_DIRECT に分類した。遺伝子オントロジー解析におけるエンリッチメント解析に際しては、リスト 1 に含まれた遺伝子群のうち、BLASTX による相同性検索の結果、アノテーションが付与された遺伝子群 ( $e$  値  $< 1E-5$ ) をバックグラウンドリストとして、遺伝子オントロジーのエンリッチメント解析のために改良された、フィッシャーの正確確率検定による  $p$  値である EASE スコア (Huang et al. 2009) に基づいて評価した。

## 5. 定量的 PCR

マイクロアレイ分析結果の確からしさを検証するために、いくつかの遺伝子についてリアルタイム PCR を行った。プライマーは Primer Express software v3.0 (Applied Biosystems) を用いて設計した (表 4)。High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) を用いて、メーカー推奨の方法に従い、マイクロアレイ分析に供試したトータル RNA と同一の、160 ng のトータル RNA を鋳型として逆転写を行い、cDNA を合成した。10 ul の 2× Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、5ul の 43 倍希釈した cDNA、250 nM のフォワードプライマー、250 nM のリバースプライマーを混合し、総量が 20 ul となるように超純水を加え、PCR 反応溶液を調製した。StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により、95°C で 10 分間変性した後、95°C で 15 秒間、

60°Cで1分間のセットを1サイクルとして40サイクル繰り返した。続いて、増幅産物の特異性を確かめるために60°Cから95°Cまで0.3°Cずつ上昇させ、その都度、蛍光強度をモニタリングすることにより、融解曲線解析を行った。各遺伝子発現量の相対定量は、*Ubiquitin* を内在性コントロール遺伝子 (Nose and Watanabe 2014, Mishima et al. 2014) とした比較 Ct 法 (Livak and Schmittgen 2001) により行った。各プライマー対の増幅効率、筑波1号由来のゲノム DNA を段階的に希釈したもの (125, 25, 5, 1, 0.2 ng) を鋳型 DNA として、上記と同様の組成の反応溶液、解析方法により求めた。

### 第3節 結果

#### 1. 不定根形成過程における遺伝子発現変動

主成分分析の結果、第一主成分の寄与率は43.2%、第二主成分の寄与率は25.3%であり、第二主成分までの累積寄与率は68.5%であったことから、図11により全遺伝子発現情報のおよそ7割を示しているとみなすことができる。主成分分析あるいはクラスタリングの結果、基部と主軸部における全体的な遺伝子発現は採穂時においてほとんど違いは見られなかった。一方、不定根形成の進行に伴い、両部位における全体的な遺伝子発現は、さし付けてから3時間後あるいは1日後を境に異なる挙動を示した (図11、12)。両部位における全体的な遺伝子発現の違いは、主に第一主成分軸方向における違いにより表されており、第二主成分軸方向における違いはより小さかった (図11)。また、基部における全体的な遺伝子発現の大きな変動は、さし付けてから3日後までに起こっており、それ以降の変動は比較的小さかった (図11、12)。

## 2. 発現変動する遺伝子群の詳細

先述したように（第4章第3節1.）、基部と主軸部における全体的な遺伝子発現変動の違いは、主に第一主成分軸方向の違いによって表されていた。第一主成分への寄与が大きい上位100遺伝子群はその発現変動パターンにより、大きく2群に分けることができた（図13）。一つは、採穂・さし付けに伴って両部位における発現量が増加し、その後、基部においては増加したまま維持されるが、主軸部においては採穂時における状態に戻る遺伝子群であり、もう一つは採穂・さし付けに伴って両部位における発現量が減少し、その後、基部においては減少したまま維持されるが、主軸部においては採穂時における状態に戻る遺伝子群であった（図13）。DAVIDソフトウェアを用いて、この2つの遺伝子群に含まれる遺伝子に対して遺伝子オントロジーを付与し、エンリッチメント解析を行った結果、前者においては、oxidation-reduction process (GO:0055114)、flavonoid biosynthetic process (GO:0009813)、metabolic process (GO:0008152)に関連する遺伝子群が、後者においては、photosynthesis (GO:0015979)、response to light stimulus (GO:0009416)に関連する遺伝子群が有意に多く含まれていた ( $p < 0.01$ )（表5）。

また、本研究においては、クラスタリングの結果、遺伝子発現変動パターンに基づいて12個のクラスター（クラスター1~12）が抽出された（図12、14）。DAVIDソフトウェアを用いて、この12個のクラスターに含まれる遺伝子群に対して遺伝子オントロジーを付与し、エンリッチメント解析を行った（表6）。これらのクラスターのうち、特にクラスター4、9、10、11、12に含まれる遺伝子群の発現変動パターンは基部と主軸部との間で異なることが確認された（図14）。

### 3. 炭水化物・植物ホルモン代謝関連遺伝子群の発現変動

tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)に関連する遺伝子群が、基部においてさし付け3時間後までに誘導され、その後、発現レベルが維持されていた遺伝子群で構成されるクラスター9に有意に多く含まれていた ( $p = 5.3E-03$ ) (図15、表6)。photosynthesis (GO:0015979)および関連するいくつかの遺伝子オントロジーに関連する遺伝子群が基部において時系列に沿って徐々に発現が抑制されていた遺伝子群で構成されるクラスター4に有意に多く含まれていた ( $p = 1.6E-16$ ) (図15、表6)。

tryptophan biosynthetic process (GO:0000162)および response to auxin (GO:0009733)に関連する遺伝子群が、基部において時系列に沿って徐々に発現が誘導されていた遺伝子群で構成されるクラスター11に有意に多く含まれていた (それぞれ  $p = 2.6E-03$ 、 $7.5E-03$ ) (図15、表6)。response to cytokinin (GO:0009735)に関連する遺伝子群が、基部において時系列に沿って徐々に発現が抑制されていた遺伝子群で構成されるクラスター4に有意に多く含まれていた ( $p = 4.2E-04$ ) (図15、表6)。

## 第4節 考察

一般的に、さし付けに伴って、不定根はさし穂の基部(地中部)からは形成されるが、主軸部(地上部)からは形成されない。本研究において用いた材料においても、同様の現象が確認された。主成分分析およびクラスタリングの結果、基部と主軸部における全体的な遺伝子発現は、採穂時においてほぼ同様であったことから、この時点においては、両部位は機能的に同一の器官であったことが確認された。両部位における全体的な遺伝子発現は1日後あたりを境に異なる挙動を示したという結果は、もともと同等の器官であったと考えられる両者が採穂(あるいはさし付け)という物理的・生理的な刺激に起因して、そ

それぞれの部位が異なる器官へと分化していくことを表していると考えられる。したがって、不定根形成過程において、基部と主軸部において異なる発現変動パターンを示した遺伝子群は、スギにおける不定根形成に関連する遺伝子群である可能性が高いことを示唆している。また、基部における遺伝子発現は3日後以降においては変動が比較的小さかった。このことは、不定根形成の進行に伴う主要な遺伝子発現変動の分岐点は、さし付けてから1日後あるいは3日後といった比較的早期のタイミングで迎えていると考えられる。一方、スギの不定根形成における組織学的な変化については、根原基の形成が18日目から、不定根の伸長は24日目から始まったこと、外見上の不定根形成（発根）は40日後に確認されたことが報告されている（佐藤 1948）。本研究における外見上の不定根形成（発根）が確認されたのは、さし付けてから35日後であり、既報（佐藤 1948）とほぼ同時期であったことから、本研究において用いた材料における組織学的な変化は、佐藤（1948）と類似したタイムスケールにおいて起こっていたと推測された。一般に、不定根形成過程は誘導期（Induction 期）、原基形成期（Initiation 期）、原基発達期（Extension 期）という3つの段階に分けられる（Kevers et al. 1997）。誘導期は組織学的な変化は起こらないが、不定根形成に向けた、分子レベルにおける生化学的な変化が起こる段階、原基形成期は分裂組織（meristem）の形成および原基（primordia）の構築が行われる段階、原基発達期は原基からの発達およびそれに伴う生体外への根の出現（発根）が起こる段階であると定義される（Kevers et al. 1997）。したがって、これらの知見を基づくと、本研究における不定根形成のプロセスは、採穂時から1週間までは誘導期、3週後は原基形成期、6週後は原基発達期にあたる考えられ、スギの不定根形成における遺伝子発現変動については、主に誘導期の早期に起こることが分かった。

炭水化物は、植物体における主たるエネルギー源であり、不定根形成に対しても強く関

連していることが知られている (Haissig 1989; Li and Leung 2000; Ahkami et al. 2009; Klopotek et al. 2010)。本研究においては、基部におけるクエン酸 (tricarboxylic acid; TCA) 回路に関連する遺伝子群の発現量はさし付け3時間後までに増加し、その後、発現レベルが維持されていた (図 14)。TCA 回路を含む呼吸経路は、好気性生物における炭素代謝 (エネルギー代謝) において中心的な役割を担っており、植物の生存や成長に必要な不可欠な代謝経路である (Tiwari et al. 2003)。Ahkami et al. (2013) はペチュニア (*Petunia hybrida*) における不定根形成における TCA 回路や同じく呼吸経路の1つである解糖系に関連する酵素の活性や代謝物含有量の変化について報告しており、不定根形成と呼吸が関連していることを示唆している。一方、基部における光合成に関連する遺伝子群の発現量は時系列に沿って減少していた (図 15)。この結果は、採穂・さし付けに伴って、基部における光合成機能が低下することを示唆していると考えられる。光合成機能の低下は、光の当たらない土壤中へさし付けられたことに起因する可能性があることも考えられる一方で、コントロールタマツ (*Pinus contorta*) (Brinker et al. 2004) やカーネーション (*Dianthus caryophyllus*) (Villacorta-Martín et al. 2015)、リョクトウ (*Vigna radiata*) (Li et al. 2015) といった他の植物種においても、採穂・さし付けに伴って不定根形成部位において光合成に関連する遺伝子群の発現量が減少したという同様の知見が得られている。さらに、基部におけるシンク能 (光合成産物を消費する能力) の増加あるいはソース能 (光合成産物を供給する能力) の低下が不定根形成に関連する重要な変化の一つであるとされており (Ahkami et al. 2009)、本研究における TCA 回路関連遺伝子群の発現量が増加し、光合成関連遺伝子群の発現量が減少したという結果はそれらの知見を支持するものであると考えられた。

不定根形成には植物ホルモンもまた強く関連しており、なかでもオーキシンは、細胞分裂

による根の原基の形成、発達のための刺激となることで、中心的な役割を担っていると考えられている (de Klerk et al. 1999; Pop et al. 2011; Gutierrez et al. 2012; Ahkami et al. 2013; Pacurar 2014)。さらに、スギを含む多くの植物種において、さし付け時に基部へオーキシン処理を施すことにより、発根率が上昇することが報告されている (石川・田中 1970; 大山・上中 1970; Swamy et al. 2002; Cristofori et al. 2010; Dash et al. 2011; Sevik1 and Guney 2013)。本研究においては、基部における、オーキシンの前駆体であるトリプトファンの生合成 (Zhao 2011) およびオーキシンに対する応答に関連する遺伝子群の発現量は時系列に沿って徐々に上昇していた。一方、基部における、サイトカイニンに対する応答に関連する遺伝子群の発現量は時系列に沿って徐々に減少していた (図 15)。サイトカイニンはオーキシンによるシグナルの伝達経路に影響し (Müller and Sheen 2008; Moubayidin et al. 2009)、不定根形成において阻害的な役割を有している (da Costa et al. 2013)。Villacorta-Martin et al. (2015) は、カーネーションの易発根性品種において、サイトカイニンの一つであるトランスゼアチンがさし付け時からさし付け 54 時間後の間でより高いレベルで存在することを示し、発根性はオーキシン量とサイトカイニン量の比率に関連していると結論付けている。さらに、エチレンも不定根形成においてオーキシンとの相互作用を有する (Druege et al. 2014; Veloccia et al. 2016)。しかしながら、エチレンは、オーキシンに対して阻害的な作用を有するサイトカイニンとは対照的に、遊離オーキシン蓄積の負の調節、根におけるオーキシン輸送の正の調節、およびシュートにおけるオーキシン輸送の負の調節を通して、助長的な役割を担っている (Negi et al. 2010)。また、エチレンは、傷害などのストレスに応じて生成が誘導されることも明らかにされている (Wang et al. 2002; Cheong et al. 2002)。本研究においては、クラスター5、8には“ethylene-activated signaling pathway” ( $p=4.8E-3$  (クラスター5)、 $1.3E-3$  (クラスター8)) が、クラスター10には“ethylene biosynthetic process” ( $p=6.3E-3$ ) がそれぞれ有意に多く含

まれており（表 6）、切断による誘導や不定根形成における助長的な機能を遺伝子発現レベルで反映したものであると考えられた。本研究における、これらのオーキシシン、サイトカイニン、エチレンといった植物ホルモンの代謝に関連する遺伝子群の、基部における発現挙動を踏まえると、針葉樹であるスギにおいてもまた他の植物と同様に不定根形成にはオーキシシンを中心とする植物ホルモン間の協調作用が重要であることがトランスクリプトームレベルから支持されたと考えられる。さらに、炭水化物や植物ホルモンの代謝に関連する遺伝子群の発現挙動は、不定根を形成する基部と形成しない主軸部の間において異なっており、このことはこれらの遺伝子群不定根形成における重要性を強調するものであると考えられる。

## 第 5 節 小括

第 4 章においては、不定根形成過程における環境の効果を反映する指標としての遺伝子発現の利用を目指し、不定根形成過程における網羅的遺伝子発現解析によって、遺伝子発現に関する基盤情報を構築した。その結果、不定根形成過程における主な遺伝子発現変動はさし付け 3 日後までに起こっていることが示唆された。また、不定根形成過程の進行に伴って、不定根形成部位である基部におけるオーキシシン応答関連遺伝子群や呼吸関連遺伝子群等の発現量は増加し、サイトカイニン応答関連遺伝子群や光合成関連遺伝子群等の発現量は減少することが示され、他の植物における不定根形成において重要性が示唆されている植物ホルモンや炭水化物は、スギにおいても同様に重要であることが遺伝子発現レベルで支持される結果となった。さらに、非不定根形成部位である主軸部におけるそれら遺伝子群の発現挙動と異なっていたことは、不定根形成におけるそれら遺伝子群の重要性を強調するものであると考えられた。

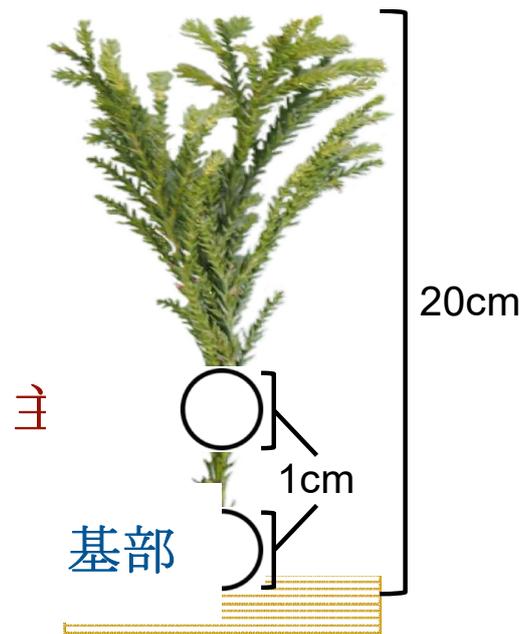


図9 マイクロアレイ分析への供試部位

## List 0: 19,304遺伝子

全サンプルにおいて

- データクオリティに関する警告が付与されなかった
- 生シグナル強度が10以上であった

## List 1: 11,909遺伝子

- いずれかの群において、正規化後シグナル値が-0.5から0.5までの範囲内にあった
- 分散分析によって、群間における有意な変動が認められた (FDR < 0.05)

## List 2: 9,620遺伝子

- ✓ 主成分分析
- ✓ クラスタリング

- 抽出したいずれかのクラスターに含まれた

## List 3: 8,206遺伝子

- ✓ GO解析

図10 マイクロアレイデータ解析のストラテジー

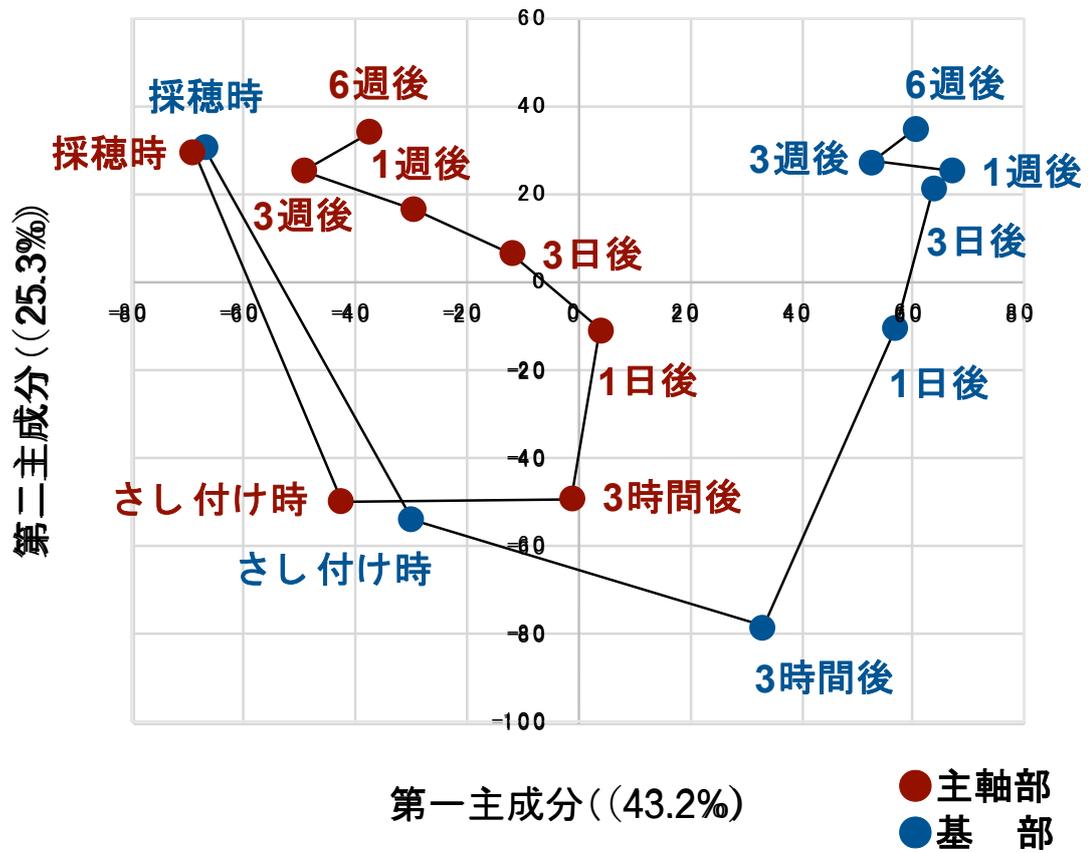


図 11 マイクロアレイデータに基づく主成分分析結果

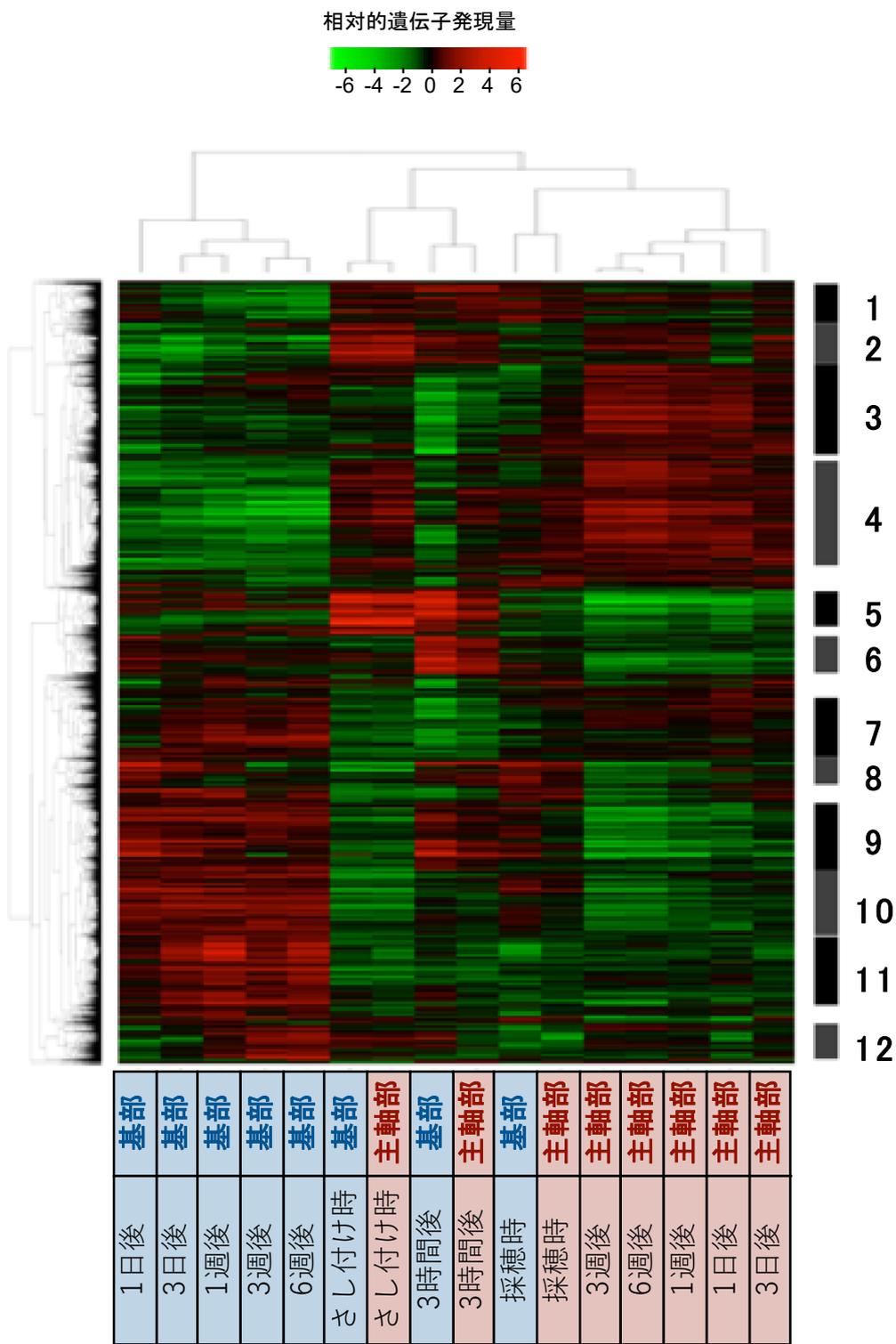


図12 マイクロアレイデータに基づく階層クラスタリング結果

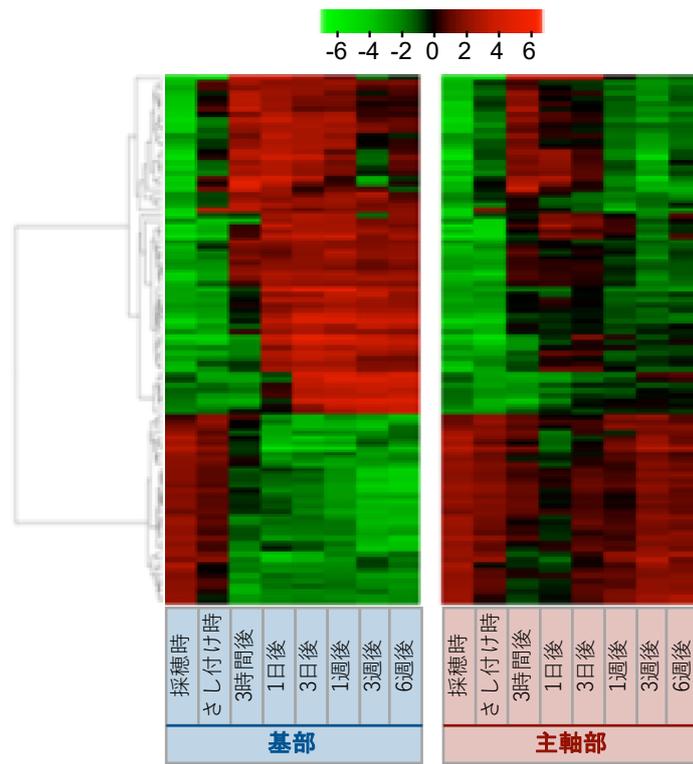


図 13 第一主成分因子負荷量上位 100 遺伝子の発現量データに基づく階層クラスタリング

結果

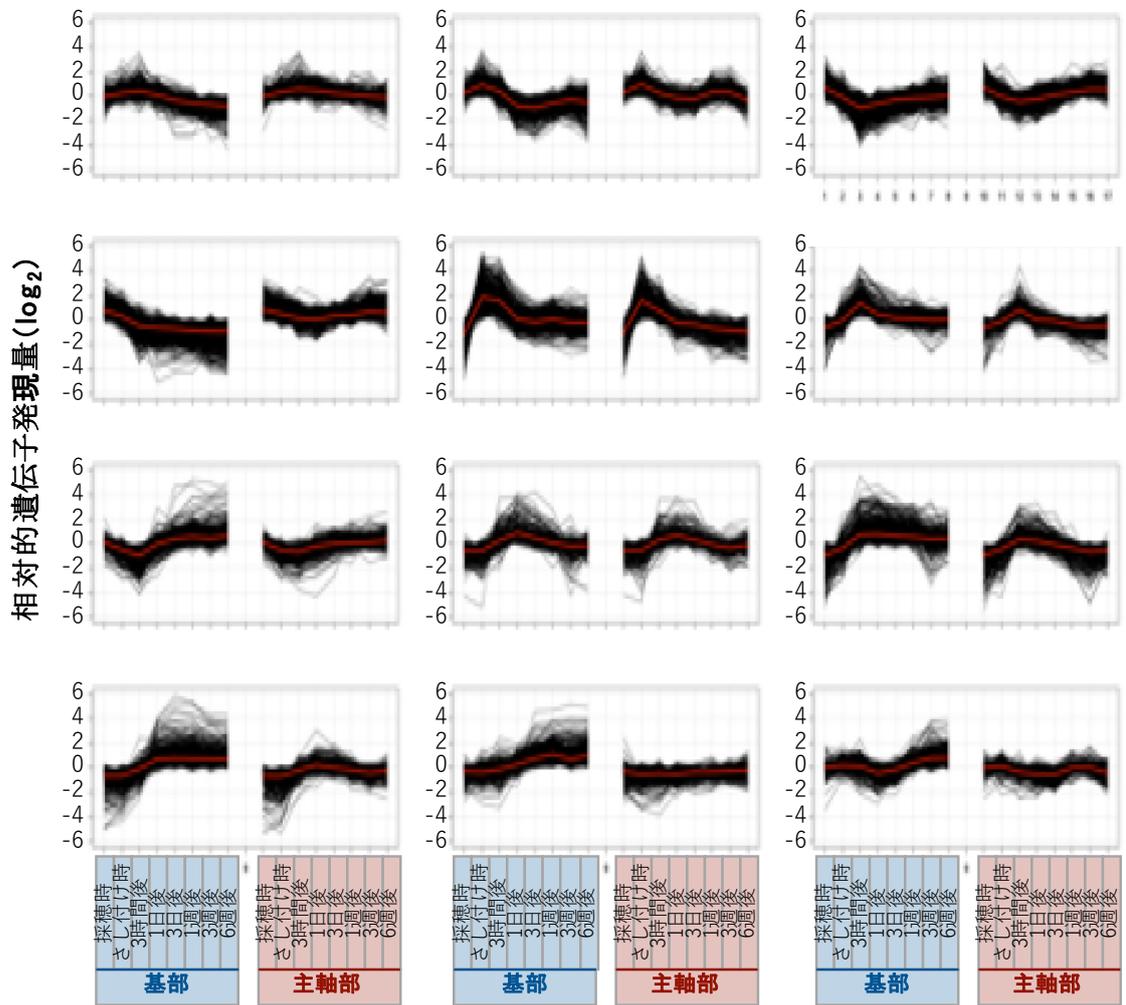


図 14 各クラスターにおける遺伝子発現プロファイル

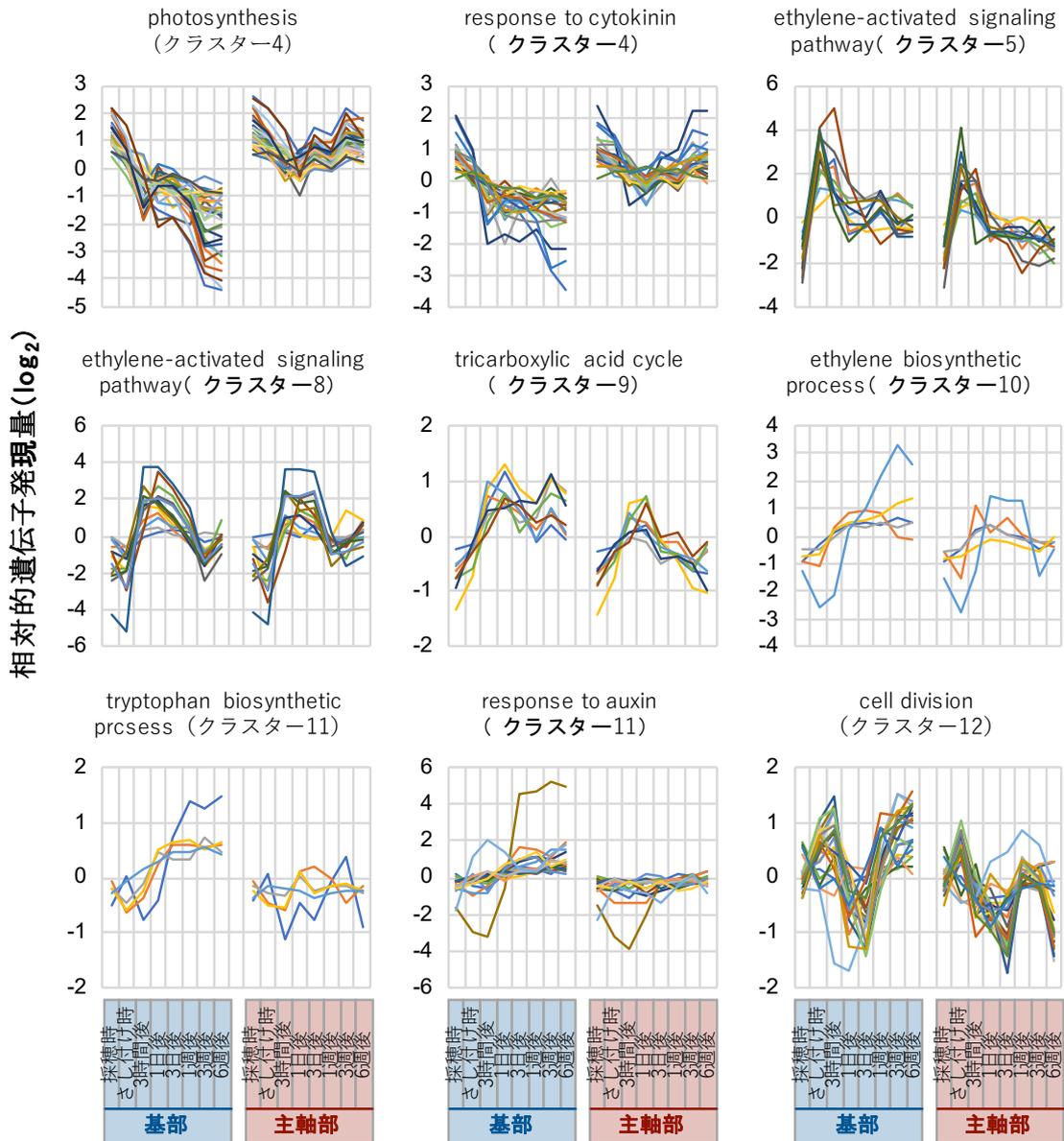


図 15 機能的に着目した遺伝子群の発現プロファイル

表 4 定量的 PCR のためのプライマー配列

EST	相同遺伝子 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	推定遺伝子名	E 値	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列
reCj18260	AT5G62000	auxin response factor 2	0	5'-AAGGCACGCTGATGAATGCT-3'	5'-TCTTTGGCCGCTAGCTCTTG-3'
reCj18826	AT1G30330	auxin response factor 6	0	5'-AGGTGCCCTCAAACACAGAGCTTTG-3'	5'-CAGCTACCTGTTCCGCTATGTCCTT-3'
reCj18758	AT1G70940	Auxin efflux carrier family protein	0	5'-GAGCCATGATGCCGAGAAT-3'	5'-TGAGGATAAGGCCGCTCATT-3'
reCj18051	AT3G43600	aldehyde oxidase 2	0	5'-GGCGTGTACGGTCATAAATATCTGA-3'	5'-AGGCCTGAGGCCACGAATTC-3'
reCj24821	AT4G37650	GRAS family transcription factor	7.3E-55	5'-AGTCGTGGAAGACGAGATGGA-3'	5'-ACCTCAGGCACCTCGCTGAA-3'
reCj22196	AT1G50420	scarecrow-like 3	3.5E-68	5'-GGCTGAGTGAGGCCCTTGAAC-3'	5'-GCTGCGGAAGCACAGATTC-3'
reCj20044	AT1G30100	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5	0	5'-GGTCGTCGTCATTGGGTC-3'	5'-GAGAGCTGCATCGGACTCATT-3'
reCj19463	AT1G77760	nitrate reductase 1	0	5'-GCCATGACCGTGAGATTGTTCA-3'	5'-GGTAGGGAGACCCAAAGTTTGA-3'
reCj31726	AT1G08380	photosystem I subunit O	1.7E-47	5'-GGGAAAGTCCTCTAAGAAAGCAAAA-3'	5'-CCTCAGCCAATCTCTGTGAAAAC-3'
reCj31076	AT1G28370	ERF domain protein 11	6.7E-22	5'-GCAAAGGCTAAGACGAATTTTCAG-3'	5'-CGTCGAAACAAGCCCTCAAAATTG-3'

3'

表 5 第一主成分因子負荷量上位 100 遺伝子における遺伝子オントロジー

係数	遺伝子オントロジー	アクセッション番号	p 値
正	oxidation-reduction process	GO:0055114	1.0E-04
	flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	2.0E-03
	metabolic process	GO:0008152	4.4E-03
	transcription, DNA-templated	GO:0006351	1.3E-02
	lignin biosynthetic process	GO:0009809	1.6E-02
	regulation of transcription, DNA-templated	GO:0006355	2.1E-02
	ethylene biosynthetic process	GO:0009693	5.4E-02
	defense response to fungus	GO:0050832	6.7E-02
	response to wounding	GO:0009611	8.5E-02
負	photosynthesis	GO:0015979	9.5E-04
	response to light stimulus	GO:0009416	1.8E-03
	ion transport	GO:0006811	7.8E-02

表6 各クラスターにおける遺伝子オントロジーエンリッチメント解析結果

クラスター	遺伝子オントロジー	アクセッション番号	p 値
1	translation	GO:0006412	2.5E-03
	MAPK cascade	GO:0000165	3.0E-03
2	defense response	GO:0006952	2.1E-10
	plant-type secondary cell wall biogenesis	GO:0009834	1.5E-08
	cell wall organization	GO:0071555	4.6E-06
	glucuronoxylan biosynthetic process	GO:0010417	8.6E-05
	microtubule-based process	GO:0007017	1.1E-04
	xylan biosynthetic process	GO:0045492	3.7E-04
	cellulose biosynthetic process	GO:0030244	5.7E-04
	stomatal closure	GO:0090332	6.4E-04
	signal transduction	GO:0007165	6.8E-04
	lignin catabolic process	GO:0046274	2.2E-03
	cortical microtubule organization	GO:0043622	5.4E-03
	biosynthetic process	GO:0009058	5.7E-03
	response to cold	GO:0009409	7.4E-03
3	protein phosphorylation	GO:0006468	3.1E-05
	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	GO:0007169	1.3E-04
	defense response	GO:0006952	6.6E-04
	flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	2.3E-03
	flavonoid glucuronidation	GO:0052696	4.2E-03
4	photosynthesis	GO:0015979	1.6E-16
	oxidation-reduction process	GO:0055114	1.3E-08
	photosystem II assembly	GO:0010207	1.2E-04
	cell redox homeostasis	GO:0045454	1.4E-04
	response to cytokinin	GO:0009735	4.2E-04
	thylakoid membrane organization	GO:0010027	4.3E-04
	chloroplast organization	GO:0009658	5.5E-04
	photosynthesis, light harvesting in photosystem I	GO:0009768	1.2E-03
	photosynthesis, light reaction	GO:0019684	1.2E-03
	flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	1.7E-03

	photoinhibition	GO:0010205	3.3E-03
	protein-chromophore linkage	GO:0018298	3.5E-03
	cellular response to oxidative stress	GO:0034599	4.5E-03
	defense response to bacterium	GO:0042742	6.0E-03
	photosynthetic electron transport chain	GO:0009767	7.0E-03
	phylloquinone biosynthetic process	GO:0042372	7.0E-03
	photosynthetic electron transport in photosystem II	GO:0009772	7.7E-03
	protein import into chloroplast thylakoid membrane	GO:0045038	7.7E-03
	response to high light intensity	GO:0009644	8.1E-03
5	defense response	GO:0006952	2.1E-07
	protein phosphorylation	GO:0006468	2.1E-06
	response to chitin	GO:0010200	2.5E-06
	response to salicylic acid	GO:0009751	1.1E-04
	protein autophosphorylation	GO:0046777	1.3E-04
	cell adhesion	GO:0007155	1.9E-04
	signal transduction	GO:0007165	4.4E-04
	positive regulation of cell death	GO:0010942	7.0E-04
	abscisic acid-activated signaling pathway	GO:0009738	3.9E-03
	ethylene-activated signaling pathway	GO:0009873	4.8E-03
	positive regulation of transcription, DNA-templated	GO:0045893	5.2E-03
	calcium-mediated signaling	GO:0019722	7.2E-03
	pectin biosynthetic process	GO:0045489	7.2E-03
	carbohydrate biosynthetic process	GO:0016051	9.6E-03
	regulation of jasmonic acid mediated signaling pathway	GO:2000022	9.6E-03
6	NA	NA	NA
7	flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	2.1E-08
	flavonoid glucuronidation	GO:0052696	3.8E-06
	metabolic process	GO:0008152	9.5E-05
	transcription, DNA-templated	GO:0006351	1.2E-03
	regulation of transcription, DNA-templated	GO:0006355	3.5E-03
8	translation	GO:0006412	5.6E-16
	ribosome biogenesis	GO:0042254	3.8E-10

	ribosomal small subunit assembly	GO:0000028	4.0E-04
	ethylene-activated signaling pathway	GO:0009873	1.3E-03
	translational elongation	GO:0006414	6.0E-03
	cytoplasmic translation	GO:0002181	9.2E-03
9	response to cadmium ion	GO:0046686	1.6E-08
	tricarboxylic acid cycle	GO:0006099	5.3E-03
	pollen tube reception	GO:0010483	9.3E-03
10	response to cadmium ion	GO:0046686	1.2E-04
	branched-chain amino acid biosynthetic process	GO:0009082	2.0E-04
	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase	GO:0033539	5.8E-04
	lipid homeostasis	GO:0055088	1.6E-03
	leucine biosynthetic process	GO:0009098	3.4E-03
	maturation of LSU-rRNA	GO:0000470	3.6E-03
	ER-associated ubiquitin-dependent protein catabolic process	GO:0030433	5.6E-03
	ethylene biosynthetic process	GO:0009693	6.3E-03
	metabolic process	GO:0008152	6.6E-03
	regulation of translation	GO:0006417	8.0E-03
11	regulation of transcription, DNA-templated	GO:0006355	3.0E-04
	mRNA processing	GO:0006397	1.7E-03
	tryptophan biosynthetic process	GO:0000162	2.6E-03
	DNA topological change	GO:0006265	2.6E-03
	vegetative to reproductive phase transition of meristem	GO:0010228	4.8E-03
	defense response	GO:0006952	7.2E-03
	transcription, DNA-templated	GO:0006351	7.3E-03
	response to auxin	GO:0009733	7.5E-03
	DNA repair	GO:0006281	8.1E-03
	regulation of cell shape	GO:0008360	9.9E-03
12	microtubule-based movement	GO:0007018	4.8E-10
	DNA replication	GO:0006260	3.1E-08
	cell division	GO:0051301	4.6E-08
	DNA recombination	GO:0006310	1.7E-06
	mitotic chromosome condensation	GO:0007076	2.8E-06

cell cycle	GO:0007049	5.7E-06
DNA replication initiation	GO:0006270	6.2E-06
mitotic nuclear division	GO:0000278	8.2E-06
regulation of cell cycle	GO:0051726	4.9E-05
cytokinesis by cell plate formation	GO:0000911	2.9E-04
chromosome separation	GO:0051304	6.3E-04
DNA unwinding involved in DNA replication	GO:0006268	9.0E-04
DNA repair	GO:0006281	1.0E-03
double-strand break repair via homologous recombination	GO:0000724	1.2E-03
protein phosphorylation	GO:0006468	1.2E-03
telomere maintenance	GO:0000723	2.9E-03
flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	3.5E-03
mismatch repair	GO:0006298	4.3E-03
cellular response to DNA damage stimulus	GO:0006974	4.7E-03

## 第5章 総合考察

本研究では、スギにおける不定根形成特性に関連する要因として遺伝子型および環境の効果の解明に向けた分子レベルにおける基盤情報を構築することにより、不定根形成特性の向上、ひいては、さし木増殖における得苗率の向上に資する情報を得るという目的のもとに、スギにおける不定根形成に関連する要因の解明に向けた遺伝学的・分子生物学的研究を行った。

第2章においては、多数のスギ精英樹のさし木苗における発根率、根系形質、苗高を定量的に測定することにより、さし木増殖に関連する形質としての根系形質の役割を明らかにするとともに、発根率および根系形質に関連する遺伝的多型の解明に向けた表現型データを取得した。その結果、さし木増殖における得苗率を向上させるためには、根量が多い、細根率が高い、分枝密度が高い根系を形成する苗木を生産することが望ましいこと、あるいは、不定根形成特性を改良することは、地上部器官における成長性にも間接的に関連する可能性があることが分かった。

第3章においては、第2章で得られた表現型データ（発根率および7つの根系形質）、および、これまでに明らかにされている遺伝子型データを用いて、発根率および根系形質に関連する遺伝的多型（SNP）の解明に向けたゲノムワイド関連解析を行った。その結果、計23個のSNPsにおいて、いずれかの形質と有意な関連が認められた。本章においては、特に発根率、総根長、細根率、分枝密度に着目し、これらのSNPsにおける遺伝子型ごと（メジャーホモ接合体、ヘテロ接合体、マイナーホモ接合体）の表現型分布を比較したところ、概ね相違が認められたことから、表現型に対する各SNPsの関連性が確認された。また、発根率と最も有意に関連していると認められたSNPであるAX-115713708は、他の植物において不定根形成に関連していることが示唆されている Peroxidase superfamily

protein をコードする遺伝子のホモログ上に座乗している可能性があることが明らかとなり、機能的な観点においてもその重要性が認められる結果となった。

第4章においては、不定根形成過程における環境の効果を反映する指標としての遺伝子発現の利用を目指し、不定根形成過程における網羅的遺伝子発現解析によって、遺伝子発現に関する基盤情報を構築した。その結果、基部における炭水化物や植物ホルモンの代謝に関連する遺伝子群等の発現変動は、他の植物における分子生物学的・生化学的な知見と類似しており、また、主軸部におけるそれら遺伝子群の発現挙動と異なっていたことは、不定根形成におけるそれら遺伝子群の重要性を強調するものであると考えられた。

これらの研究を通して、スギの不定根形成に関連するゲノム・トランスクリプトームレベルにおける要因を解明に資する基盤情報が構築されたと考えている。一方で、本研究においては、限られた環境下における解析に留まった。一般的に、表現型を決定づける要因の一つとして環境要因が挙げられ、実際、スギを含む多くの植物種において、不定根形成の動態は環境によって変化することが示されている（阿部ら 1957; Welander 1994; Shibuya *et al.* 2014）。このことを踏まえれば、不定根形成に関連するゲノム・トランスクリプトームレベルにおける真の要因を解明するためには、環境の影響を考慮した条件設定のもとで、表現型の測定や遺伝子発現解析を行い、知見を集積していく必要があると考えられる。今後、研究を積み重ねることにより、そうした要因が明らかになれば、以下に示すような3つの方法によって、将来的に実用化されることが期待される。

1つ目は、遺伝的多型情報を利用した、さし木増殖の効率化である。第1章で言及したように、昨今、再生林に向けた苗木の需要量が増加している。我が国におけるスギのさし木増殖は、比較的成本を要しない等といった利点を有することから、多くの場合、露地（屋外）で行われている。しかしながら、露地では環境が安定していないために、用いる

系統によっては生産効率が安定しない場合が存在する。そのため、実際には、苗木需要量を満たすためには、需要量の数倍量のさし穂をさし付けることを余儀なくされており、結果として、必要以上の労力等を要している。そうした課題に対する対策として、生産効率の安定化を図るために、閉鎖型の人工環境を利用したさし木増殖も試みられているが、これには施設の整備・維持のためのコストを要することとなる。したがって、両者の特徴を踏まえて、適切に育成環境を選択することにより、需要量を満たすための生産を行う必要がある。つまり、不定根形成特性の優れるクローンについては、露地においてより需要量に近い量のさし穂をさし付けることにより、必要とされる労力を軽減し、一方、不定根形成特性の劣るクローンについては、閉鎖型の人工環境に供試することで、生産効率の安定化を図ることが望ましい。不定根形成特性と関連する遺伝的多型情報を利用すれば、さし木増殖に供試する材料における不定根形成特性を一定の精度で事前に予測することができる可能性があり、各材料に適した育成戦略を選択することにより、さし木増殖の効率化に繋がると考えられる。

2つ目は、遺伝子発現を指標とした、新たなさし木増殖技術の開発である。成長性の優れる、あるいは雄花着花量の少ない等といった遺伝的特性を有する特定のクローンが求められている。そうしたクローンは、必ずしも不定根形成特性に優れているとは限らないため、その増殖のためには、何らかの処理を施すことにより、不定根形成を促進させることが求められる。こうした対策はこれまでも行われてきたが、依然として、どのような材料においても安定して高い得苗率が得ることができるような方法は確立されておらず、今後も引き続き、そうした方法を確立するための研究を推進する必要がある。一方で、先述したように、これまでは様々な条件下でさし付けを行い、事後の結果から条件の影響を評価するという、いわゆるトライアンドエラーを繰り返してきた。こうした状況を打破するた

めの方法として、不定根形成過程における遺伝子発現解析は有用であると考えている遺伝子発現解析によって、事後の結果とともに、不定根形成過程における生体内変化を明らかにすることで、その結果が導かれたバックグラウンドとなる情報を得ることができれば、さし木増殖における条件の適否を合理的に評価することができ、ひいては育成条件の評価における確実性の向上が望めると考えられるためである。そのことによって、新たな条件の検討に際しても、一定の生物学的な根拠をもとに条件を設定することができ、不定根形成を促進するための技術開発を効率的に行うことを可能にすると期待される。また、従来のさし木増殖は、多くの場合、育成期間を通して一定の環境下で行われてきた。しかしながら、例えば、オーキシンは、不定根の原基の形成の開始においては中心的な役割を担うと考えられている一方で (de Klerk et al. 1999; Pop et al. 2011; Gutierrez et al. 2012; Ahkami et al. 2013; Pacurar 2014)、高濃度のオーキシンは根系発達に対しては負の作用をもたらすという報告もある (da Costa et al. 2013; Druge et al. 2014; Steffens and Rasmussen 2016)。また、炭水化物は不定根形成、根系発達におけるエネルギー源として重要な分子であるため (Haissig 1989; Li and Leung 2000; Ahkami et al. 2009; Klopotek et al. 2010)、その生産反応である光合成は水を必要とする (Taiz and Zeiger 1991 (植物生理学)) ために、根が発生していない不定根形成過程の初期においては、その機能が過度に活性化することは返って適切であるとする報告もある (町田ら 1977)。スギにおいても、光合成機能に関わるような、さし穂の枝葉率や育成中の光強度が、不定根形成に関連していることが示されている (権藤ら 1959; 黒木 1967)。したがって、不定根形成における事後の結果だけでなく、遺伝子発現変動のような不定根形成過程に関する知見を集積していくことによって、不定根形成過程の進行に応じた適切な環境・処理の解明にも繋がる可能性があると考えられる。

3つ目は、不定根形成特性を考慮した優良なクローンの選抜である。これまでの我が国

におけるスギを対象とした育種においては、成長性や材質、あるいは雄花着花性等が主な育種対象形質とされてきた（田島 2001）。しかしながら、成長性等について優れた遺伝的特性を有しているにも関わらず、不定根形成特性が劣るがために、増殖・普及に適しておらず、実用に向いていないケースが存在する。本研究の成果を発展させることができれば、今後、成長性や材質といった形質と並行して、不定根形成特性についても、いわゆるゲノム育種を行うことができる可能性もあり、選抜される優良なクローンを効率的に増殖していくことができると考えられる。

このように、不定根形成のような表現型に関連する遺伝子群（遺伝子領域）を明らかにする（遺伝子を単離する）ことは、育種学的観点においても非常に重要となる（Elfstrand et al. 2001; Vida et al. 2009; Ishikawa et al. 2012）。関連する遺伝子群を明らかにすることができれば、その情報を利用した、いわゆるゲノム育種を行うことができるようになり、有用形質における遺伝的改良をより効率的に進めることができる（Landjeva et al. 2007; Troggio et al. 2012; Rasheed and Xia 2019）。全ゲノム情報が明らかにされているようなモデル生物等においては、その情報量を武器に、より精密な DNA マーカーの作成、マッピング、関連遺伝子群の単離等が行われている（Nadeem et al. 2017; Jha 2018）。一方で、スギにおいては、ゲノムサイズが大きい、繰り返し配列を多く含む（Neal and Savolainen 2004; Tamura et al. 2015）といった理由から、依然として全ゲノム解読には至っていない。スギを含む非モデル生物においては、突然変異系統の作出や遺伝子の導入が可能となっているモデル生物と同様の方法によってゲノム育種を遂行することは難しいと考えられる。一方で、近年のシーケンス技術の発達に伴って、非モデル生物においても、大量の DNA 配列を取得することは比較的容易になりつつある（Ellegren 2014; Unamba et al. 2015）。スギにおいてもこれまでに数多くの EST 情報が収集されており、その情報を基盤情報とすることにより、

本研究（第4章）や過去の研究（Nose and Watanabe 2014; Mishima et al. 2014; Tsubomura et al. 2016）において行われたように、網羅的な遺伝子の発現挙動を明らかにすることが可能となる。非モデル生物において関連遺伝子を単離するためには、こうした遺伝子発現解析を行うとともに、QTL解析やゲノムワイド関連解析に基づく順遺伝学的研究を組み合わせることが有効であると考えられる（Boerjan 2005; Kloosterman et al. 2010; Ribeiro et al. 2016）。

## 要旨

スギ (*Cryptomeria japonica*) は、成長性等が優れていることから、古くから我が国の林業における最も重要な樹種の一つとされてきた。近年、拡大造林期に造成された人工林の多くが主伐期を迎えており、再造林に向けた苗木生産量の拡充が求められている。一方、これまでの育種によって選抜された、優れた遺伝的特性を有する個体を利用することは、林業生産性の向上に対して有用であると考えられる。したがって、山行き苗木や、採種園や採穂園を構成するための苗木には、優れた遺伝的特性を有する個体を用いることが望ましい。さし木増殖は、母樹の遺伝子型（遺伝的特性）を維持した苗木を比較的簡便な作業によって生産することができることから、特定の遺伝子型を有する個体を早期に数多く増殖するという点において、より重要な増殖手法である。一方、さし木増殖においては、生物学的には不定根形成と定義される、さし穂からの発根が必須であるが、スギを含む多くの植物において、不定根形成特性は様々な要因に影響されることが明らかにされており、この特徴は結果として増殖効率の不安定性に直結する。また、根系は養水分の吸収能等を持つことから、植物体全体の成長性等に対して、重要な役割を果たすと考えられている。一方、さし付けてから一定期間後における根系形質についても、条件によって異なることが示されている。しかしながら、スギにおける不定根形成や根系発達に関する研究の多くは、さし付けてから一定期間後の形態学的な結果のみに基づいて、要因の関連性を評価しており、それら要因がスギにおける不定根形成や根系発達に関連する生物学的な根拠については、依然として不明な部分が多い。今後、より確実にさし木増殖の効率化、安定化を図るためには、不定根形成や根系発達に関連する要因を十分に理解することが重要であると考えられる。

一般に、遺伝学においては、不定根形成特性や根系形質のような表現型は遺伝子型と環

境の効果によって決定づけられると考えられている。すなわち、表現型の発現は、DNA によって表される遺伝子型に、環境による効果が RNA、タンパク質、代謝物といった分子の制御への作用を通して加わることによって起こる。したがって、不定根形成特性や根系形質に関連する生物学的な要因として、遺伝子型や環境の効果を分子レベルで明らかにすることは重要となる。特に、RNA を定量化することを意味する遺伝子発現解析は、比較的網羅性に優れており、各遺伝子の機能を塩基配列の相同性に基づいて推測することが可能であること等から、生体に対する環境の効果を推し量るために、特に有用であると考えられる。そこで本研究では、スギにおける不定根形成特性や根系形質に関連する要因としての遺伝子型および環境の効果の解明に向けた分子レベルにおける基盤情報を構築することにより、さし木増殖における効率化、安定化に資する情報を得ることを目的とし、以下の研究を行った。

第 2 章では、根系形質と地上部成長量との関連性および不定根形成や根系発達に対する遺伝子型による効果を明らかにするために、193 のスギ精英樹クローンを用いて、不定根形成特性、根系形質、地上部成長量を定量的に測定し、諸形質間の相関性および諸形質における遺伝的特性を明らかにした。その結果、根系形質、特に、根量に関連する形質（総根長、表面積、体積）や細根率、分枝密度は地上部成長量と関連していることが明らかとなり、さし木増殖における根系形質の重要性が示唆された。さらに、いずれの形質においても遺伝子型による違い（クローン間差）が確認され、広義の遺伝率については、根系構造に関連する形質（根端密度、分枝密度）において比較的高いことが示された。

第 3 章では、不定根形成特性、根系形質に関連する遺伝的多型（SNP; Single Nucleotide Polymorphism）を明らかにすることを目的として、第 2 章で測定した各形質における定量的データを用いて、ゲノムワイド関連解析を行った。その結果、計 23 の SNP がいずれか

の形質に有意に関連すると認められた。さらに、これらの SNP における遺伝子型ごとの表現型を比較したところ、いくつかの SNP について有意な相違が認められたことから、遺伝的多型に基づく表現型予測並びにマーカー利用選抜が行える可能性があることが示唆された。

第4章では、さし木増殖における生産効率に対して決定的な制限要因となりうる不定根形成に対する環境による効果の解明に向けて、不定根形成過程における遺伝子発現に関する基盤情報を構築した。その結果、不定根形成過程における主な遺伝子発現変動はさし付け3日後までに起こっていることが示唆された。さらに、他の植物における不定根形成において重要性が示唆されている植物ホルモンや炭水化物は、スギにおいても同様に重要であることが遺伝子発現レベルで支持される結果となった。

第5章では、第2章から第4章における結果をもとに、不定根形成特性の向上によるさし木増殖における効率化、安定化に向けた遺伝学的・分子生物学的知見の重要性、および、それら知見を用いた実用化に向けた将来展望について総合考察を行った。

## 謝辞

本研究の遂行および取りまとめに当たり、指導教員として終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、九州大学大学院農学研究院の渡辺敦史准教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文の副査を務めていただき、大変有意義な御助言を頂きました九州大学大学院農学研究院の久米篤教授および同松村順司教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、森林総合研究所林木育種センターの平尾知士博士、三嶋賢太郎博士ならびに高橋誠博士、倉本哲嗣博士、大平峰子博士には、常日頃より御指導およびをいただきました。ここに、格別の感謝を申し上げます。同様に、多大なる御指導を賜りました、森林総合研究所林木育種センター前基盤技術研究室長の平岡裕一郎博士に心より感謝申し上げます。また、基盤技術研究室の皆様を始めとする、森林総合研究所林木育種センターの皆様には、ご協力および励ましのお言葉をいただきました。ここに記して深く感謝の意を表します。

また、九州大学植物代謝制御学研究室の後藤栄治助教、田村美帆博士、山口莉未氏ならびに先輩、同輩、後輩の皆様には、深謝いたします。

## 引用文献

阿部正博, 今井元政, 島田一美, 電熱温床によるスギ老令樹さし木試験. 日本林学会誌. **39**, 245–248 (1957).

A. H. Ahkami *et al.*, Molecular physiology of adventitious root formation in *Petunia hybrida* cuttings: involvement of wound response and primary metabolism. *New Phytologist*. **181**, 613–625 (2009).

A. H. Ahkami *et al.*, Distribution of indole-3-acetic acid in *Petunia hybrida* shoot tip cuttings and relationship between auxin transport, carbohydrate metabolism and adventitious root formation. *Planta*. **238**, 499–517 (2013).

M. R. Ahuja, D. B. Neale, Evolution of genome size in conifers. *Silvae Genetica*. **54**, 126–137 (2005).

D. Alameda, R. Villar, Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environmental and Experimental Botany*. **79**, 49–57 (2012).

R. Alba *et al.*, ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: tools for dissecting plant physiology and development. *Plant Journal*. **39**, 697–714 (2004).

J. C. Barber, K. W. Dorman, Clonal or seedling seed orchards. *Silvae Genetica*. **13**, 11–17 (1964).

D. Bates, M. Mächler, B. M. Bolker, S. C. Walker, Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software*. **67**, 1–48 (2015).

C. Bellini, D. I. Pacurar, I. Perrone, Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*. **65**, 639–666 (2014).

Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. **57**, 289–300 (1995).

W. Boerjan, Biotechnology and the domestication of forest trees. *Current Opinion in Biotechnology*. **16**, 159–166 (2005).

B. Brachi, G. P. Morris, J. O. Borevitz, Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. *Genome Biology*. **12**, 232 (2011).

M. Brinker *et al.*, Microarray analyses of gene expression during adventitious root development in *Pinus contorta*. *Plant Physiology*. **135**, 1526–1539 (2004).

M. K. Burke, D. J. Raynal, Fine root growth phenology, production, and turnover in a northern hardwood forest ecosystem. *Plant and Soil*. **162**, 135–146 (1994).

A. L. Burton, J. P. Lynch, K. M. Brown, Spatial distribution and phenotypic variation in root cortical aerenchyma of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*. **367**, 263–274 (2013).

Y. L. Chen *et al.*, Phenotypic variability and modelling of root structure of wild *Lupinus angustifolius* genotypes. *Plant and Soil*. **348**, 345–364 (2011).

Y. H. Cheong *et al.*, Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **129**, 661–677 (2002).

T. Colombi, A. Walter, Genetic diversity under soil compaction in wheat: root number as a promising trait for early plant vigor. *Frontiers in Plant Science*. **8**, 420 (2017).

L. H. Comas, T. J. Bouma, D. M. Eissenstat, Linking root traits to potential growth rate in six temperate tree species. *Oecologia*. **132**, 34–43 (2002).

L. H. Comas, D. M. Eissenstat, Linking fine root traits to maximum potential growth rate among 11 mature temperate tree species. *Functional Ecology*. **18**, 388–397 (2004).

W. A. Cowling, Sustainable plant breeding. *Plant Breeding*. **132**, 1–9 (2013).

V. Cristofori, Y. Roupael, E. Rugini, Collection time, cutting age, IBA and putrescine effects on root formation in *Corylus avellana* L. cuttings. *Scientia Horticulturae*. **124**, 189–194 (2010).

C. T. da Costa *et al.*, When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings. *Frontiers in Plant Science*. **4**, 133 (2013).

G. K. Dash, S. K. Senapati, G. R. Rout, Effect of auxins on adventitious root development from nodal cuttings of *Saraca asoka* (Roxb.) de Wilde and associated biochemical changes.

*Journal of Horticulture and Forestry*. **3**, 320–326 (2011).

M. R. De Almeida *et al.*, Environmental control of adventitious rooting in *Eucalyptus* and *Populus* cuttings. *Trees*. **31**, 1377–1390 (2017).

S. de Dorlodot *et al.*, Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Science*. **12** (2007).

G. de Klerk, W. van der Krieken, J. C. de Jong, The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. **35**, 189–199 (1999).

A. R. De La Torre *et al.*, Insights into conifer giga-genomes. *Plant Physiology*. **166**, 1724–1732 (2014).

Z. A. Desta, R. Ortiz, Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends in Plant Science*. **19**, 592–601 (2014).

U. Druege, P. Franken, M. R. Hajirezaei, Plant hormone homeostasis, signaling, and function during adventitious root formation in cuttings. *Frontiers in Plant Science*. **7**, 381 (2016).

U. Druege *et al.*, Transcriptomic analysis reveals ethylene as stimulator and auxin as regulator of adventitious root formation in petunia cuttings. *Frontiers in Plant Science*. **5**, 494 (2014).

W. El Kayal *et al.*, Molecular events of apical bud formation in white spruce, *Picea glauca*. *Plant Cell and Environment*. **34**, 480–500 (2011).

M. Elfstrand *et al.*, Identification of candidate genes for use in molecular breeding - A case study with the Norway spruce defensin-like gene, Spi 1. *Silvae Genetica*. **50**, 75–81 (2001).

H. Ellegren, Genome sequencing and population genomics in non-model organisms. *Trends in Ecology and Evolution*. **29**, 51–63 (2014).

J. B. Endelman, Ridge regression and other kernels for genomic selection with R package rrBLUP. *Plant Genome*. **4**, 250–255 (2011).

O. A. Fernandez, M. M. Caldwell, Phenology and dynamics of root growth of three cool semi-desert shrubs under field conditions. *Journal of Ecology*. **63**, 703–714 (1975).

A. Fries, Genetic parameters, genetic gain and correlated responses in growth, fibre dimensions and wood density in a Scots pine breeding population. *Annals of Forest Science*. **69**, 783–794 (2012).

藤澤義武、河崎久男、三浦真弘、山田浩雄、倉本哲嗣 (2010) 森林総合研究所平成 22 年版研究成果選集

藤澤義武, 林木育種の現場の ABC (8) 採種園 (造成準備). 森林遺伝育種. **3**, 179–184 (2014).

藤澤義武, 林木育種の現場の ABC (11) 次代検定林 (造成). 森林遺伝育種. **4**, 121–127 (2015).

A. Fukushima, M. Kusano, H. Redestig, M. Arita, K. Saito, Integrated omics approaches in plant systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*. **13**, 532–538 (2009).

J. Gagneur *et al.*, Genotype-environment interactions reveal causal pathways that mediate genetic effects on phenotype. *PLoS Genetics*. **9** (2013).

H. Goda *et al.*, The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant Journal*. **55**, 526–542 (2008).

権藤久, 原田辰丙, 河野俊光, スギ穂木の枝葉率と発根率の関係について. 日本林学会九州支部研究論文集. **12**, 29–31 (1959).

A. Y. Gracey, A. R. Cossins, Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. *Annual Review of Physiology*. **65**, 231–259 (2003).

D. Grattapaglia *et al.*, Quantitative genetics and genomics converge to accelerate forest tree breeding. *Frontiers in Plant Science*. **9**, 1693 (2018).

L. Guan *et al.*, Physiological and molecular regulation of adventitious root formation. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **34**, 506–521 (2015).

L. Gutierrez *et al.*, Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell*. **24**, 2515–2527 (2012).

B. E. Haissig, Carbohydrate relations during propagation of cuttings from sexually mature *Pinus banksiana* trees. *Tree Physiology*. **5**, 319–328 (1989).

G. L. Hammer *et al.*, Can changes in canopy and/or root system architecture explain historical maize yield trends in the U.S. corn belt? *Crop Science*. **49**, 299–312 (2009).

H. Han, X. Sun, Y. Xie, J. Feng, S. Zhang, Transcriptome and proteome profiling of adventitious root development in hybrid larch (*Larix kaempferi* × *Larix olgensis*). *BMC Plant Biology*. **14**, 305 (2014).

Y. Hiraoka *et al.*, Potential of genome-wide studies in unrelated plus trees of a coniferous species, *Cryptomeria japonica* (Japanese Cedar). *Frontiers in Plant Science*. **9**, 1332 (2018).

T. Hishi, Heterogeneity of individual roots within the fine root architecture: causal links between physiological and ecosystem functions. *Journal of Forest Research*. **12**, 126–133 (2007).

星比呂志, 倉本哲嗣, 平岡裕一郎, 今後のエリートツリーの活用による育種の推進. 森林遺伝育種. **2**, 132–135 (2013)

D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. **4**, 44–57 (2009).

T. D. Hung *et al.*, Estimates of genetic parameters for growth and wood properties in *Eucalyptus pellita* F. Muell. to support tree breeding in Vietnam. *Annals of Forest Science*. **72**, 205–217 (2015).

井出雄二・白石進（編）（2012） 森林遺伝育種学 文永堂出版

石川広隆, 田中郁太郎, 発根困難なスギ精英樹のさし木に及ぼすインドール酪酸の効果. 日本林学会誌. **52**, 99–101 (1970).

石川広隆, 林木育種と器官培養. 材料. **24**, 806–815 (1975).

S. Ishikawa *et al.*, Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**, 19166–19171 (2012).

R. B. Jackson, H. A. Mooney, E.-D. Schulze, A global budget for fine root biomass, surface area, and nutrient contents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 7362–7366 (1997).

M. Z. Z. Jahufer *et al.*, Genotypic variation for root trait morphology in a white clover mapping population grown in sand. *Crop Science*. **48**, 487–494 (2008).

J. P. Jaramillo-Correa, M. Verdú, S. C. González-Martínez, The contribution of recombination to heterozygosity differs among plant evolutionary lineages and life-forms. *BMC Evolutionary Biology*. **10**, 22 (2010).

- U. C. Jha, Current advances in chickpea genomics: applications and future perspectives. *Plant Cell Reports*. **37**, 947–965 (2018).
- 糟谷信彦, 異なる土壌条件におけるスギ・ヒノキ細根の分岐様式. 京都府立大学学術報告. **47**, 12–15 (1995).
- K. Kaul, Variation in rooting behavior of stem cuttings in relation to their origin in *Taxus wallichiana* Zucc. *New Forests*. **36**, 217–224 (2008).
- K. Keenan, P. McGinnity, T. F. Cross, W. W. Crozier, P. A. Prodöhl, DiveRsim: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. **4**, 782–788 (2013).
- C. Kevers, J. F. Hausman, O. Faivre-Rampant, D. Evers, T. Gaspar, Hormonal control of adventitious rooting- Progress and questions. *Journal of Applied Botany*. **71**, 71–79 (1997).
- J. Khruengpat, J. Khonghinta, P. Songsri, N. Jongrungrak, Root characteristics of sugarcane cuttings derived from different stalk parts and their relationships with plant growth. *Asian Journal of Plant Sciences*. **17**, 204–212 (2018).
- J. Kilian *et al.*, The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant Journal*. **50**, 347–363 (2007).

B. Kloosterman *et al.*, From QTL to candidate gene: genetical genomics of simple and complex traits in potato using a pooling strategy. *BMC Genomics*. **11**, 158 (2010).

Y. Klopotek, K.-T. Haensch, B. Hause, M.-R. Hajirezaei, U. Druege, Dark exposure of petunia cuttings strongly improves adventitious root formation and enhances carbohydrate availability during rooting in the light. *Journal of Plant Physiology*. **167**, 547–554 (2010).

M. Kondo *et al.*, Genotypic and environmental variations in root morphology in rice genotypes under upland field conditions. *Plant and Soil*. **255**, 189–200 (2003).

C. Y. Kramer, Extension of multiple range tests to group means with unequal numbers of replications. *Biometrics*. **12**, 307–310 (1956).

B. Kumar, A. H. Abdel-Ghani, J. Reyes-Matamoros, F. Hochholdinger, T. Lübberstedt, Genotypic variation for root architecture traits in seedlings of maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Plant Breeding*. **131**, 465–478 (2012).

黒木晴輝, スギのさし木試験 (その 1) –カルス形成と光の作用–. 日本林学会九州支部研究論文集. **21**, 55–56 (1967).

N. Lalitha *et al.*, Assessing genetic variability for root traits and identification of trait specific germplasm in chickpea reference set. *Crop Science*. **55**, 2034–2045 (2015).

S. Landjeva, V. Korzun, A. Börner, Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica*. **156**, 271–296 (2007).

- P. Langridge, D. Fleury, Making the most of “omics” for crop breeding. *Trends in Biotechnology*. **29**, 33–40 (2011).
- R. R. B. Leakey, R. Storeton-West, The rooting ability of *Triplochiton scleroxylon* cuttings: the interactions between stockplant irradiance, light quality and nutrients. *Forest Ecology and Management*. **49**, 133–150 (1992).
- M. Li, D. W. M. Leung, Starch accumulation is associated with adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Pinus radiata*. *Journal of Plant Growth Regulation*. **19**, 423–428 (2000).
- R. Li *et al.*, Genetic variation for maize root architecture in response to drought stress at the seedling stage. *Breeding Science*. **65**, 298–307 (2015).
- S.-W. Li, R.-F. Shi, Y. Leng, De novo characterization of the mung bean transcriptome and transcriptomic analysis of adventitious rooting in seedlings using RNA-Seq. *PLoS ONE*. **10**, e0132969 (2015).
- S.-W. Li, L. Xue, S. Xu, H. Feng, L. An, Mediators, genes and signaling in adventitious rooting. *Botanical Review*. **75**, 230–247 (2009).
- W. J. Libby, R. F. Stettler, F. W. Seitz, Forest genetics and forest-tree breeding. *Annual Review of Genetics*. **3**, 469–494 (1969).
- K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. **25**, 402–408 (2001).

- L. López-maury, S. Marguerat, J. Bähler, Tuning gene expression to changing to evolutionary adaptation. *Nature Reviews Genetics*. **9**, 583–593 (2008).
- J. Lynch, Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology*. **109**, 7–13 (1995).
- 町田英夫, 大石惇, 細井寅三, 小松春喜, 鴨田福也, さし穂の光合成に関する研究 (第1報) 数種の見かけの光合成速度の変化について. 園芸学会雑誌. **46**, 274–282 (1977).
- K. MacMillan, K. Emrich, H.-P. Piepho, C. E. Mullins, A. H. Price, Assessing the importance of genotype x environment interaction for root traits in rice using a mapping population. I: a soil-filled box screen. *Theoretical and Applied Genetics*. **113**, 977–986 (2006).
- G. Marchand *et al.*, A biomarker based on gene expression indicates plant water status in controlled and natural environments. *Plant, Cell and Environment*. **36**, 2175–2189 (2013).
- C. M. Marques *et al.*, Genetic dissection of vegetative propagation traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*. *Theoretical and Applied Genetics*. **99**, 936–946 (1999).
- H. Martens, M. Martens, Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food Quality and Preference*. **11**, 5–16 (2000).
- M. L. McCormack *et al.*, Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytologist*. **207**, 505–518 (2015).

K. Mcphee, Variation for seedling root architecture in the core collection of pea germplasm. *Crop Science*. **45**, 1758–1763 (2005).

右田一雄, 清澄オオスギのサシキとヒカゲについて. 日本林学会誌. **37**, 53–54 (1955).

K. Mishima *et al.*, Transcriptome sequencing and profiling of expressed genes in cambial zone and differentiating xylem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *BMC Genomics*. **15**, 219 (2014).

K. Mishima *et al.*, Identification of novel putative causative genes and genetic marker for male sterility in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *BMC Genomics*. **19**, 277 (2018).

宮島寛, スギの挿木に於ける発根と品種の關係に就て. 九州大學農學部學藝雜誌. **13**, 277–281 (1951).

宮島寛 (1989) 九州のスギとヒノキ 九州大学出版会

M. A. Moreno-Risueno, W. Busch, P. N. Benfey, Omics meet networks - using systems approaches to infer regulatory networks in plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **13**, 126–131 (2010).

森下義郎, さし木の腐敗とその防止および回避. 林業試験場研究報告. **165**, 3–293 (1964).

森下義郎・大山浪雄 (1972) さし木の理論と実際 地球出版

- L. Moubayidin, R. Di Mambro, S. Sabatini, Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science*. **14**, 557–562 (2009).
- B. Müller, J. Sheen, Cytokinin and auxin interplay in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*. **453**, 1094–1097 (2008).
- M. A. Nadeem *et al.*, DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. **32**, 261–285 (2018).
- A. J. Nagano *et al.*, Deciphering and prediction of transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Cell*. **151**, 1358–1369 (2012).
- K. Nagashima, S. Yoshida, T. Hosaka, Patterns and factors in early-stage vegetation recovery at abandoned plantation clearcut sites in Oita, Japan: possible indicators for evaluating vegetation status. *Journal of Forest Research*. **14**, 135–146 (2009).
- S. Narayanan, A. Mohan, K. S. Gill, P. V. V. Prasad, Variability of root traits in spring wheat germplasm. *PLoS ONE*. **9**, e100317 (2014).
- S. Narayanan, P. V. V. Prasad, Characterization of a spring wheat association mapping panel for root traits. *Agronomy Journal*. **106**, 1593–1604 (2014).
- D. B. Neale, O. Savolainen, Association genetics of complex traits in conifers. *Trends in Plant Science*. **9**, 325–330 (2004).

S. Negi, P. Sukumar, X. Liu, J. D. Cohen, G. K. Muday, Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin-dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *Plant Journal*. **61**, 3–15 (2010).

C. Nibau, D. J. Gibbs, J. C. Coates, Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist*. **179**, 595–614 (2008).

野原勇太, 陣野好之, 杉の赤枯病防除に関する研究 (第 I 報) . 林業試験場研究報告. **52**, 159–179 (1952).

M. Nose, A. Watanabe, Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D.Don). *BMC Plant Biology*. **14**, 308 (2014).

T. Ogura, W. Busch, From phenotypes to causal sequences: Using genome wide association studies to dissect the sequence basis for variation of plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. **23**, 98–108 (2015).

大平峰子 *et al.*, 用土の理学的性質がスギのさし木発根性に及ぼす影響. 日本森林学会誌. **98**, 265–272 (2016).

大政康史, 野口正二, 岡田康彦, 飯田真一, 森林資源循環利用の推進に向けた森林整備の取り組み. 水文・水資源学会誌. **31**, 414–427 (2018).

大山浪雄, さし木困難樹種の発根能力増進に関する研究. 林業試験場研究報告. **145**, 3–141 (1962).

大山浪雄, 上中久子, 発根困難なスギ, ヒノキの精英樹のさし木に対するエクベロン (インドール酪酸) の効果. 日本林学会誌. **52**, 374–376 (1970).

D. I. Pacurar, I. Perrone, C. Bellini, Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*. **151**, 83–96 (2014).

J. A. Palta *et al.*, Large root systems: are they useful in adapting wheat to dry environments? *Functional Plant Biology*. **38**, 347–354 (2011).

N. Patterson, A. L. Price, D. Reich, Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genetics*. **2**, 2074–2093 (2006).

T. I. Pop, D. Pamfil, C. Bellini, Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. **39**, 307–316 (2011).

S. Porfirio, M. D. R. G. da Silva, M. J. Cabrita, P. Azadic, A. Peixe, Reviewing current knowledge on olive (*Olea europaea* L.) adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*. **198**, 207–226 (2016).

A. L. Price *et al.*, Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*. **38**, 904–910 (2006).

- A. Rasheed, X. Xia, From markers to genome-based breeding in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. **132**, 767–784 (2019).
- C. L. Ribeiro *et al.*, Integration of genetic, genomic and transcriptomic information identifies putative regulators of adventitious root formation in Populus. *BMC Plant Biology*. **16**, 66 (2016).
- 林野庁 (2014) 平成 25 年度森林・林業白書
- 林野庁<sup>a</sup> (2018) 森林・林業統計要覧
- 林野庁<sup>b</sup> (2018) 平成 29 年度森林・林業白書
- D. Ristova, W. Busch, Natural variation of root traits: from development to nutrient uptake. *Plant Physiology*. **166**, 518–527 (2014).
- G. A. Ritchie, The commercial use of conifer rooted cuttings in forestry: a world overview. *New Forests*. **5**, 247–275 (1991).
- S. Ruotsalainen, Increased forest production through forest tree breeding. *Scandinavian Journal of Forest Research*. **29**, 333–344 (2014).
- 斎藤真己, スギ花粉症対策品種の開発. 日本森林学会誌. **92**, 316–323 (2010).
- 坂口勝美, 岡田幸郎, 林木の育種. 育種学雑誌. **11**, 177–181 (1961).
- A. Sakai, T. Hirayama, S. Oshioka, Y. Hirata, Effects of elevation and postharvest disturbance on the composition of vegetation established after the clear-cut harvest of conifer plantations in southern Shikoku, Japan. *Journal of Forest Research*. **11**, 253–265 (2006).

佐々朋幸, アカマツ苗木における新梢, 針葉および根の生長の経時変化とその相互関係. 林業試験場研究報告. **332**, 21–37 (1985).

佐藤大七郎, 根岸賢一郎, 中村賢太郎, スギのサシホをとる木のトシとネヅキの関係一クローンをつかった実験一. 日本林学会誌. **35**, 69–70 (1953).

佐藤清左衛門, スギ挿木根の起源に就いて. 東京大学農学部演習林報告. **36**, 55–62 (1948).

佐藤孝夫, 樹木の根系の成長に関する基礎的研究. 北海道林業試験場研究報告. **32**, 1–54 (1995).

M. Schmidt *et al.*, Prediction of malting quality traits in barley based on genome-wide marker data to assess the potential of genomic selection. *Theoretical and Applied Genetics*. **129**, 203–213 (2016).

H. Sevik, K. Guney, Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. *Scientific World Journal*, 909507 (2013).

M. Shepherd *et al.*, Congruence in QTL for adventitious rooting in *Pinus elliottii* x *Pinus caribaea* hybrids resolves between and within-species effects. *Molecular Breeding*. **18**, 11–28 (2006).

T. Shibuya, T. Taniguchi, S. Tsukuda, S. Shiozaki, K. Itagaki, Adventitious root formation of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) cuttings is stimulated by soaking basal portion of cuttings in warmed water while cooling their apical portion. *New Forests*. **45**, 589–602 (2014).

相馬丑五郎, 九州に於ける挿杉の種類とその類別. 日本林學會誌. **18**, 103–127 (1936).

B. Steffens, A. Rasmussen, The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*. **170**, 603–617 (2016).

S. L. Swamy, S. Puri, A. K. Singh, Effect of auxins (IBA and NAA) and season on rooting of juvenile and mature hardwood cuttings of *Robinia pseudoacacia* and *Grewia optiva*. *New Forests*. **23**, 143–157 (2002).

G. B. Sweet, Seed orchards in development. *Tree Physiology*. **15**, 527–530 (1995).

田口豊, 森林遺伝学の意義と課題. 日本林學會北海道支部講演集. **28**, 137–139 (1980).

Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger (2002) *Plant Physiology*, 3<sup>rd</sup> edition Sinauer Associates

田島正啓, 林木育種研究と最近の成果. 育種学研究. **3**, 103–108 (2001).

高桑進, 杉と日本人のつながりについて. 研究紀要. **25**, 19–40 (2012).

M. Tamura *et al.*, Analyses of random BAC clone sequences of Japanese cedar, *Cryptomeria japonica*. *Tree Genetics and Genomes*. **11**, 50 (2015).

田中茂, 国有林造林技術の展開とその考察. 北海道大学農学部演習林研究報告. **22**, 253–272 (1962).

田中典幸, 窪田文武, 有馬進, 光浩 田口, ダイズにおける根系の量的解析. 日本作物学会紀事. **59**, 270–276 (1990).

H. T. Tate, T. Page, Cutting propagation of *Santalum austrocaledonicum*: the effect of genotype, cutting source, cutting size, propagation medium, IBA and irradiance. *New Forests*. **49**, 551–570 (2018).

W. Tibbits, G. Hodge, Genetic parameters and breeding value predictions for *Eucalyptus nitens* wood fiber production traits. *Forest Science*. **44**, 587–598 (1998).

S. B. Tiwari, G. Hagen, T. Guilfoyle, The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell*. **15**, 533–543 (2003).

戸田良吉, 日本における, 国の事業としての林木育種概観. 日本林学会誌. **53**, 222–226 (1971).

R. Toda, Vegetative propagation in relation to Japanese forest tree improvement. *New Zealand Journal of Forestry Science*. **4**, 410–417 (1974).

外山三郎 (1994) スギの遺伝子保存と育種 ながと印刷

M. Troggio *et al.*, Apple, from genome to breeding. *Tree Genetics and Genomes*. **8**, 509–529 (2012).

M. Tsubomura, M. Kurita, A. Watanabe, Determination of male strobilus developmental stages by cytological and gene expression analyses in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Tree Physiology*. **36**, 653–666 (2016).

津村義彦, 森林植物のゲノムマッピングの現状と将来性. 計量生物学. **17**, 19–33 (1996).

津村義彦, 日本の森林樹木の地理的遺伝構造 (1) スギ (ヒノキ科スギ属). 森林遺伝育種. **1**, 17–22 (2012).

K. Uchiyama *et al.*, Demonstration of genome-wide association studies for identifying markers for wood property and male strobili traits in *Cryptomeria japonica*. *PLoS ONE*. **8**, e79866 (2013).

植田守, 藤澤義武, 林木育種の現場の ABC (2) クローン苗の養成技術 ーさし木ー. 森林遺伝育種. **2**, 18–23 (2013).

C. I. N. Unamba, A. Nag, R. K. Sharma, Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Frontiers in Plant Science*. **6**, 1074 (2015).

D. Vâșcă-Zamfir, M. C. Pomohaci, L. Ilie, The influence of different rooting substrates on the root system of *Abutilon Hybridum Hort.* new plants obtained by cuttings. *Scientific Papers, Series B, Horticulture*. **LXI**, 365–368 (2017).

- A. Velocchia *et al.*, Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. **67**, 6445–6458 (2016).
- S. Via, R. Lande, Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution*. **39**, 505–522 (1985).
- G. Vida *et al.*, Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*. **170**, 67–76 (2009).
- C. Villacorta-martín *et al.*, Gene expression profiling during adventitious root formation in carnation stem cuttings. *BMC Genomics*. **16**, 789 (2015).
- L. Walker *et al.*, Changes in gene expression in space and time orchestrate environmentally mediated shaping of root architecture. *Plant Cell*. **29**, 2393–2412 (2017).
- K. L.-C. Wang, H. Li, J. R. Ecker, Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*. **14**, S131–S152 (2002).
- James D. Watson, Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick (2008) *Molecular Biology of the Gene*, 6<sup>th</sup> Edition Pearson Education, Inc.
- M. Welander, Influence of environment , fertilizer and genotype on shoot morphology and subsequent rooting of birch cuttings. *Tree Physiology*. **15**, 11–18 (1995).
- P. J. White *et al.*, Matching roots to their environment. *Annals of Botany*. **112**, 207–222 (2013).

Z. Ya-fang *et al.*, Genome-wide association studies reveal new genetic targets for five panicle traits of international rice varieties. *Rice Science*. **22**, 217–226 (2015).

横山緑, 前田千秋, スギ精英樹繁殖に関する研究 (I) . 日本林学会誌. **38**, 301–305 (1956).

蓬田英俊, 岩手県に設定されたスギ精英樹クローン検定林の 1~20 年次までの成長形質の解析. 岩手県林業技術センター研究報告. **8**, 15–25 (1999).

H. Yoshimaru *et al.*, Detection of quantitative trait loci for juvenile growth, flower bearing and rooting ability based on a linkage map of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don). *Theoretical and Applied Genetics*. **97**, 45–50 (1998).

J. Yu *et al.*, A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*. **38**, 203–208 (2006).

B. Zhang *et al.*, Detection of quantitative trait loci influencing growth trajectories of adventitious roots in *Populus* using functional mapping. *Tree Genetics and Genomes*. **5**, 539–552 (2009).

Y. Zhao, Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*. **61**, 49–64 (2010).