

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年9月28日(28.09.2023)



(10) 国際公開番号

WO 2023/181985 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/6827 (2018.01) A01G 2/10 (2018.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/009250
- (22) 国際出願日: 2023年3月10日(10.03.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-046840 2022年3月23日(23.03.2022) JP
- (71) 出願人: 日本製紙株式会社 (NIPPON PAPER INDUSTRIES CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1140002 東京都北区王子1丁目4番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 新屋 智 崇 (SHINYA, Tomotaka); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP). 岩田 英治 (IWATA, Eiji); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP). 林 和典 (HAYASHI, Kazunori); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP). 陶山 健一郎 (SUYAMA, Kenichiro); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP).

宮内 謙史郎 (MIYAUCHI, Kenshiro); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP). 根岸 直希 (NEGISHI, Naoki); 〒1140002 東京都北区王子5丁目2 1 番 1 号 日本製紙株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁 理 士 法 人 酒 井 国 際 特 許 事 務 所 (SAKAI INTERNATIONAL PATENT OFFICE); 〒1000013 東京都千代田区霞が関3丁目8番1号 虎の門三井ビルディング Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: METHOD FOR SELECTING BREEDING PARENT FOR FOREST TREES

(54) 発明の名称: 林木用育種親の選抜方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for selecting, on the basis of genetic polymorphism information, a breeding parent for forest trees by which a rapid-growth population can be produced. The present invention provides a method for selecting a breeding parent for forest trees, the method including: a step (A) for obtaining genetic polymorphism information about each of two or more to-be-inspected plants constituting a breeding parent candidate group; a step (B) for calculating a genetic relationship matrix from the genetic polymorphism information obtained in step (A); a step (C) for subjecting the genetic relationship matrix calculation results obtained in step (B) to principal component analysis, extracting at least one principal component, and obtaining a principal component score therefor; and a step (D) for calculating the absolute value of the difference in principal component scores of the two or more to-be-inspected plants constituting the breeding parent candidate group, said scores having been obtained in step (C), and using the absolute value as an evaluation index for selecting a breeding parent.

(57) 要約: 本発明は、遺伝的多型情報に基づき、高成長個体群を生み出すことのできる林木用育種親の選抜のための方法を提供することを目的とする。本発明は、工程 (A): 育種親候補集団を構成する2以上の被検植物のそれぞれについて、遺伝子多型情報を得ること; 工程 (B): (A) で得られた遺伝子多型情報から、血縁行列を算出すること; 工程 (C): (B) で得られた血縁行列算出結果を主成分分析し、少なくとも第1主成分を抽出し、その主成分得点を得ること; 及び工程 (D): 育種親候補集団を構成する2以上の被検植物の、(C) で得られた主成分得点の差分の絶対値を算出し、これを選抜の評価指標として育種親を選抜することを含む、林木用育種親の選抜方法を提供する。

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： 林木用育種親の選抜方法

技術分野

[0001] 本発明は、林木用育種親の選抜方法に関し、詳しくは、林木用育種親の選抜方法、選抜された育種親を利用する苗、林木の生産方法、森林の造成方法に関する。

背景技術

[0002] 植林事業は、植栽から伐採、収穫するまでに長い年月を要し、成長性、木材品質に優れた植物個体を選定し、植栽することが求められている。また、最近では地球温暖化防止の観点から、植林木が高成長であることは、高CO₂固定能力であることにつながるとされ、植林木の成長性が注目されている。

[0003] 成長性の高い個体を作成する方法として、樹種の異なる両親の組合せで交配を実施し、交配後代（特に雑種一代目F₁）が両親よりも優れる特性を持つ現象（雑種強勢：ヘテロシス）が知られている。産業植林の主要樹種であるユーカリでは、ユーカリプタス・ユーロフィラ（*E. urophylla*）ユーカリプタス・グランディス（*E. grandis*）の雑種であるユーカリプタス・ユーログランディス（*E. urograndis*）が産業植林で実績を示し、雑種強勢を利用した育種は有効な手段とされている（例えば、非特許文献1）。

[0004] 特許文献1には、特定の複数の一塩基多型（SNP）に基づいてユーカリ属植物の種間雑種の樹種を識別することができ、優良品種を従来法と比べてより効率よく正確に選抜できることが記載されている。非特許文献2には、トウモロコシ（*m a i z e*）のSNP及びシリコD a r Tマーカーで算出した両親の遺伝的距離が雑種強勢と関連することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2011-130741号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：近藤 禎二（2016）森林遺伝育種、第5巻、第1～4頁

https://www.jstage.jst.go.jp/article/fgtb/5/1/5_1/_pdf-char/ja

非特許文献2：Agnieszka Tomkowiak et al. (2019) Plants (Basel). 2019 Sep 14; 8 (9) : 349. doi: 10.3390/plants8090349.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、特許文献1の方法により高成長個体群を生み出す家系を見つけるためには、樹種判定後、様々な組合せで人工交配を行い、得られた種子を播種して、実生個体の評価を行い、最適な組み合わせを決める必要があり、かなりの労力、時間、コストを必要とするため、高成長個体群を生み出す家系を見つけるための簡易な方法ではない。また、特許文献1は、所定の形質と関連するマーカーをあらかじめ抽出してから分析を行っており、後代個体の成長性を効率的に選抜する方法とは言えない。

また、非特許文献2は、トウモロコシのSNP及びシリコDartマーカーから、算出した遺伝的距離、およびマハラノビス距離と雑種強勢との関係を明らかにしているが、どういう条件で、遺伝的距離、およびマハラノビス距離を利用して、形質の優れる個体を選抜すればよいのか具体的には言及していない。

[0008] 本発明は、遺伝的多型情報に基づき、高成長個体群を生み出すことのできる林木用育種親の選抜のための方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、以下の〔1〕～〔11〕を提供する。

〔1〕（A）～（D）を含む、林木用育種親の選抜方法：

（A）：育種親候補集団を構成する2以上の被検植物のそれぞれについて

、遺伝子多型情報を得ること；

(B)：(A)で得られた遺伝子多型情報から、血縁行列を算出すること；

(C)：(B)で得られた血縁行列算出結果を主成分分析し、少なくとも第1主成分を抽出し、その主成分得点を得ること；及び

(D)：育種親候補集団を構成する2以上の被検植物の、(C)で得られた主成分得点の差分の絶対値を算出し、これを選抜の評価指標として育種親を選抜すること。

〔2〕(C)において、さらに第2、第3、第4主成分の少なくともいずれかを抽出し、その主成分得点を得ること、

(D)において、2つの育種親候補の第1主成分得点の差分と、第2、第3、及び第4主成分から選ばれる少なくとも1つの主成分得点との差分の合計を算出する、〔1〕に記載の選抜方法。

〔3〕育種親候補集団を構成する被検植物が、同属であって異なる品種又は系統の植物である〔1〕又は〔2〕に記載の選抜方法。

〔4〕遺伝子多型情報が、一塩基多型の情報である、〔1〕～〔3〕のいずれか1項に記載の選抜方法。

〔5〕遺伝子多型情報が、1,000以上の遺伝子多型部位における遺伝子多型の存在量である、〔4〕に記載の選抜方法。

〔6〕(D)工程において、2つの育種親候補の主成分得点の差分（絶対値）が、

最大値の1/2以上である育種親を選ぶ、〔1〕～〔5〕のいずれか1項に記載の選抜方法。

〔7〕被検植物がユーカリ属植物である、〔1〕～〔6〕のいずれか1項に記載の選抜方法。

〔8〕〔1〕～〔7〕のいずれか1項に記載の選抜方法により育種親を選抜し、選抜された育種親を交配して苗を生産する、林木用の苗の生産方法。

〔9〕苗は、実生苗又は挿し木苗である、〔8〕に記載の生産方法。

〔10〕〔8〕又は〔9〕に記載の生産方法により生産された苗を育成する、林木の生産方法。

〔11〕〔10〕に記載の生産方法により生産された林木を植樹し育成する、森林の造成方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、遺伝的多型情報に基づき、高成長個体群を生み出すことのできる林木用育種親を選抜でき、成長の良好な、高CO₂固定能力を有する苗の生産が可能となり、生産性を向上させることのできる方法を提供できるので、持続可能な木材資源の提供とともに地球温暖化抑制を実現できる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例1で得られた291個体の第1主成分得点（PC1）及び第2主成分得点（PC2）をプロットしたグラフである。

[図2]図2は、実施例1における両親の第1主成分得点の差分とF1の材積との関連を示すグラフである。

[図3]図3は、実施例1における両親の第1主成分得点と第2主成分得点の合計の差分とF1の材積との関連を示すグラフである。

[図4]図4は、実施例1における両親の第1主成分得点の差分とF1のパルプ収率との関連を示すグラフである。

[図5]図5は、実施例1における両親の第1主成分得点と第2主成分得点の合計の差分とF1のパルプ収率との関連を示すグラフである。

[図6]図6は、実施例3における両親の第1主成分得点と第2主成分得点の合計の差分とF1の樹高との関連を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] [1. 林木用育種親の選抜方法]

林木用育種親の選抜方法は、以下の（A）～（D）工程を少なくとも含む。

[0013] [1. 1 （A）：被検植物の遺伝子多型情報の入手]

工程（A）では、被検植物の遺伝子多型情報を得る。

[0014] 被検植物は、育種親候補であればよい。育種親候補は、林木として通常求められる形質（例えば、材積、樹高、容積重、パルプ収率）の観点から選抜できる。植物種としては、林木として用いることのできる木本植物が好ましく、山林樹種がより好ましい。例えば、スギ属（*Cryptomeria*）植物（スギ（*Cryptomeria japonica*）など）、ヒノキ属（*Chamaecyparis*）植物（ヒノキ（*Chamaecyparis obtusa*）など）、マツ科（*Pinaceae*）植物（マツ属（*Pinus*）植物（クロマツ（*Pinus thunbergii*）など）、カラマツ属（*Larix*）植物（カラマツ（*Larix kaempferi*）、グイマツ（*Larix gmelinii*）など）、モミ属（*Abies*）植物（トドマツ（*Abies sachalinensis*）など）、ユーカリ属（*Eucalyptus*）植物、サクラ属（*Prunus*）植物（サクラ（*Prunus spp.*）、ウメ（*Prunus mume*）、ユスラウメ（*Prunus tomentosa*）など）、マンゴー属（*Mangifera*）植物（マンゴー（*Mangifera indica*）など）、アカシア属（*Acacia*）植物、ヤマモモ属（*Myrica*）植物、クヌギ属（*Quercus*）植物（クヌギなど（*Quercus acutissima*））、ブドウ（*Vitis*）属植物、リンゴ（*Malus*）属植物、バラ属（*Rosa*）植物、ツバキ属（*Camellia*）植物（チャ（*Camellia sinensis*）など）、ジャカラランダ属（*Jacaranda*）植物（ジャカラランダ（*Jacaranda mimosifolia*）など）、ワニナシ属（*Persea*）植物（アボカド（*Persea americana*）など）、ナシ属（*Pyrus*）植物（ナシ（*Pyrus serotina* Rehder、*Pyrus pyrifolia*）など）、ビャクダン属（*Santalum*）植物（ビャクダン（サンダルウッド；*Santalum album*）など）が例示される。このうち、スギ属植物、ヒノキ属植物、マツ科植物（マツ属植物、カラマツ属植物、モミ属植物など）、ユーカリ属植物、ツバキ属植物、マンゴー属

植物、ワニナシ属植物が好ましく、スギ属植物、ヒノキ属植物、マツ属植物、カラマツ属植物、モミ属植物、ユーカリ属植物がより好ましい。被検植物は、同属植物であることが好ましく、同属の、異なる品種又は系統の植物であることがより好ましい。これにより、雑種強勢により、より高成長な個体の作出を期待できる。例えば、ユーカリ属植物としては、*Eucalyptus pellita*、*Eucalyptus brassiana*、*Eucalyptus urophylla*×*Eucalyptus grandis*、*Eucalyptus pellita*×*Eucalyptus brassiana*、*Eucalyptus urophylla*、*Eucalyptus grandis*、*Eucalyptus maculata*、*Eucalyptus tereticornis*、*Eucalyptus camaldulensis*、*Eucalyptus rudis*、*Eucalyptus resinifera*、*Eucalyptus propinqua*、*Eucalyptus sideroxylon*、*Eucalyptus botryoides*、*Eucalyptus viminalis*、*Eucalyptus saligna*、*Eucalyptus ovata*、*Eucalyptus globulus*、これらから選ばれる2以上の樹種のハイブリッドが挙げられる。

[0015] 被検植物は、2個体以上で育種親候補集団を構成しており、その数は、通常、5個体以上、好ましくは10個体以上、より好ましくは15個体以上、更に好ましくは20個体以上である。候補集団に含まれる被検植物の数の上限に特に制限はないが、通常、1000万個体以下、好ましくは10万個体以下、より好ましくは1万個体以下、更に好ましくは1000個体以下である。これにより、方法の実施が容易となり得る。被検植物は、遺伝的に近縁の個体（例えば、同一の家系に属する）及び遺伝的に異なる（例えば、異なる家系に属する）個体のいずれでもよく、いずれかのみ含んでも、または両方を含んでもよいが、遺伝的に異なる（例えば、異なる家系に属する）個体を少なくとも1つ、又は少なくとも2つ含むことが好ましく、遺伝的に互い

に異なる個体から構成されることがより好ましい。これにより、遺伝的距離が限定されることなく、様々な遺伝子型を有する育種親を選抜でき、良好な形質を有する個体群を生み出すことができる。

[0016] 遺伝子多型情報は、遺伝子多型に関する情報であればよく、例えば、被検植物が有する遺伝子多型の存在量（例えば、数、割合）が挙げられる。遺伝子多型は、同一種、近縁種の集団の中に複数存在する（例えば、1%以上の頻度で見られる）異なる遺伝子・塩基部分であればよく、例えば、一塩基多型（SNP）、制限酵素断片長多型（RFLP）、反復配列（サテライトDNA、ミニサテライト、マイクロサテライト）、塩基の欠失・付加、アミノ酸の置換・挿入・欠失が挙げられ、SNPが好ましい。遺伝子多型は、表現型に現れるもの（遺伝子の機能や発現を変化させる多型）でもよいし、現れないもの（遺伝子の機能や発現させるタンパク質を変化させない多型）でもよく、前者の場合表現型への影響の程度は問わないが、植物体の全ゲノムにわたり分布する遺伝子多型が好ましく、実質的に均一に分布する遺伝子多型がより好ましい。遺伝子多型情報が遺伝子多型の存在量である場合、通常は、1以上の遺伝子多型部位における遺伝子多型の存在量であり、例えば100以上、300以上、好ましくは500以上、700以上、又は800以上、より好ましくは1000以上、更に好ましくは5000以上又は10000以上の遺伝子多型部位（既知でも新規でもよい）における遺伝子多型の存在量である。上限は、多いほうが好ましいが、情報の取り扱いの容易性から、通常は500,000以下、例えば300,000以下、好ましくは200,000以下、より好ましくは100,000以下、更に好ましくは70,000以下である。遺伝子多型情報は、被検植物の遺伝子解析を行って得られる。遺伝子解析方法は特に限定されず、例えば、DNAチップを利用する方法、次世代シーケンサーを利用する方法が挙げられる。被検植物がユウカリ属植物を含む場合、EUCHIP60K（EMBRAPA（ブラジル農牧公社）が開発）等のSNPチップが用いられ得る。

[0017] 工程（A）は、育種親候補集団に含まれる被検植物それぞれについて実施

する。すなわち、育種親候補集団が n 個体の被検植物を含む場合、工程（A）の実施により n セットの遺伝子多型情報が得られる。

[0018] [1. 2 (B) : 血縁行列の算出]

工程（B）では、（A）で得られた各被検植物の遺伝子多型情報より、被検植物の血縁行列を算出する。遺伝的多型情報からの血縁行列の導出、行列の算出は、R（フリーソフト）等の解析ソフトウェアを用いて実施できる。

[0019] 工程（B）も、工程（A）と同様、育種親集団に含まれる被検植物それぞれについて実施する。すなわち、育種親集団が n 個体の被検植物を含む場合、工程（B）の実施により n セットの血縁行列算出結果が得られる。

[0020] [1. 3 (C) : 主成分分析]

工程（C）では、（B）で得られた血縁行列算出結果に対し主成分分析を行う。主成分分析では、（B）で得られた血縁行列の算出結果のうち、最も寄与率の高い主成分（第1主成分）を抽出し、その主成分得点（第1主成分得点）を少なくとも算出する。主成分は、複数抽出してもよい（寄与率の高いほうから、第2主成分、第3主成分・・・）。例えば、第4主成分まで抽出することにより、各主成分の主成分得点をもとに、選抜の精度を高めることができる。

[0021] 工程（C）も、工程（A）、（B）と同様、育種親候補集団に含まれる被検植物それぞれについて実施する。すなわち、育種親候補集団が n 個体の被検植物を含む場合、工程（C）の実施により n セットの主成分得点（第1、必要に応じて第2以降の主成分得点）が得られる。

[0022] 主成分分析による主成分の抽出、主成分得点の算出は、R（フリーソフト）等の解析ソフトウェアを用いて実施できる。

[0023] [1. 4 (D) : 育種親の選抜]

工程（D）では、育種親候補集団を構成する2以上の被検植物について、それぞれの主成分得点の差分の絶対値を算出し、これを選抜の評価指標として少なくとも1つの育種親（被検植物の組み合わせ）を選抜する。差分の絶対値が大きい被検植物の組み合わせを育種親として選抜することが好ましい

。育種親の選抜基準としては、例えば、育種親候補集団を構成する2以上の被検植物の前記差分の絶対値の最大値の $1/3$ 以上、又は $1/2$ 以上が挙げられる。

[0024] [2. 林木用の苗の生産方法]

選抜方法により選抜された育種親を交配し、得られる交配種の苗を育苗することにより、林木用の苗を生産できる。例えば、交配後代（F1）の種子から実生苗を育成できる。また、F1の種子から採穂母樹を育成して採穂し、これを挿し付けて、挿し木苗を得ることができる。苗の生産には、コンテナ、育苗ポット等の容器を使用してもよいし、露地栽培でもよい。温度、光照射、培土組成、肥料組成、施肥量、施肥間隔、灌水条件などの、育苗条件、挿し木苗の場合の発根条件は、常法に従えばよい。生産される苗は、良好な成長を示すことができるので、良好なCO₂固定能力を示すものとして、地球温暖化防止に貢献するものと期待される。

[0025] [3. 森林の造成方法]

苗の生産方法により生産された苗を、植林地等に植樹し、育成することにより、森林を造成できる。これにより、持続可能な木質資源の調達を推進することができる。

実施例

[0026] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は実施例に拘束されるものではない。

[0027] 実施例1

両親間の主成分得点の差分（絶対差）とその実生個体群の材積、パルプ収率との相関（30家系の両親）を検討した。具体的には、対象サンプルとして30家系の両親の主成分得点と、30家系の形質データを用い、両親間の主成分得点の差分（絶対差）と形質データの相関を確認した。

[0028] [(A) : 両親個体のSNPデータの取得]

アムセル社の育種親候補291個体から葉サンプルを採取しDNAを抽出した。その後SNPチップを利用して、約60,000個のSNPデータ（

一塩基多型データ)を取得した。育種親候補は、*E. grandis*、*E. urophylla*、*E. camaldulensis*、*E. pellita*、*E. brassiana*、*E. tereticornis*、*E. platyphylla*などのユーカリ属植物の親個体を含む。SNPチップは、ブラジルのEMBRAPA（ブラジル農牧公社）が開発したSNPチップEUChip60Kを利用した。EUChip60Kは、ブラジルの植林会社などから集められたユーカリ12品種の合計240個体から得られた約4,700万個のSNPから選抜したSNPをもとに作製されており（Silva et al. (2015) *New Phytologist* 206: 1527–1540）、ユーカリの11本の染色体に均一に存在する約60,904個のSNPが搭載されたSNPチップである。

[0029] [(B) 血縁行列及び(C) 主成分得点の算出]

得られた育種親候補291個体のSNPデータをもとに、統計解析ソフトRと、Rパッケージ（*rrBLUP*関数）を用いて、相加的血縁行列を算出した。その後、*eigen*関数を利用して、主成分得点を算出した。

[0030] この手順で291個体の第1主成分得点と第2主成分得点を得た（図1）。

[0031] [(D) 主成分得点の差分（絶対差）の算出]

上述の手順で得られた主成分得点をもとに、人工交配の組合せ30家系の両親（育種親候補に含まれる）の第1主成分の差分と、第2主成分得点の差分、第1主成分得点の差分と第2主成分得点の合計の差分（いずれも絶対差）を算出した（表1）。

[0032]

[表1]

表1 両親間の、第1主成分得点、第2主成分得点及びそれらの合計の差分（実施例1）

家系 No.	育種親候補		第1主成分得点			第2主成分得点			合計 差分
	母	父	母	父	差分	母	父	差分	
1	U2	H1	-0.151	0.482	0.634	-0.165	-0.097	0.068	0.702
2	H2	P2	-0.363	-0.489	0.126	-0.539	-0.053	0.486	0.612
3	U2	H2	-0.151	-0.363	0.212	-0.165	-0.539	0.374	0.585
4	H3	U2	0.136	-0.151	0.288	-0.081	-0.165	0.084	0.371
5	U2	H3	-0.151	0.136	0.288	-0.165	-0.081	0.084	0.371
6	P3	U2	-0.366	-0.151	0.215	-0.166	-0.165	0.001	0.215
7	P4	H2	-0.500	-0.363	0.137	-0.074	-0.539	0.465	0.602
8	H3	H2	0.136	-0.363	0.499	-0.081	-0.539	0.457	0.957
9	P2	H2	-0.363	-0.489	0.126	-0.539	-0.053	0.486	0.612
10	U2	U3	-0.151	-0.061	0.090	-0.165	-0.178	0.013	0.103
11	P1	U2	-0.508	-0.151	0.356	-0.077	-0.165	0.088	0.445
12	B1	P4	-0.340	-0.500	0.160	-0.734	-0.074	0.660	0.820
13	P6	U2	0.040	-0.151	0.191	-0.042	-0.165	0.123	0.315
14	P6	H2	0.040	-0.363	0.403	-0.042	-0.539	0.497	0.900
15	P4	U2	-0.500	-0.151	0.348	-0.074	-0.165	0.091	0.440
16	U1	H2	-0.363	0.211	0.574	-0.539	0.351	0.890	1.463
17	P3	H2	-0.366	-0.363	0.003	-0.166	-0.539	0.373	0.376
18	U2	P3	-0.151	-0.366	0.215	-0.165	-0.166	0.001	0.215
19	P6	U1	0.040	0.211	0.171	-0.042	0.351	0.393	0.563
20	P5	U1	-0.173	0.211	0.384	-0.114	0.351	0.465	0.849
21	P2	U2	-0.489	-0.151	0.338	-0.053	-0.165	0.112	0.450
22	H3	P3	0.136	-0.366	0.502	-0.081	-0.166	0.084	0.587
23	P5	U2	-0.173	-0.151	0.022	-0.114	-0.165	0.051	0.072
24	U2	U1	-0.151	0.211	0.362	-0.165	0.351	0.516	0.878
25	B1	U1	-0.340	0.211	0.551	-0.734	0.351	1.085	1.635
26	P2	U1	-0.489	0.211	0.700	-0.053	0.351	0.404	1.104
27	U1	P3	-0.366	0.211	0.577	-0.166	0.351	0.517	1.093
28	P3	U1	-0.366	0.211	0.577	-0.166	0.351	0.517	1.093
29	U1	P2	-0.489	0.211	0.700	-0.053	0.351	0.404	1.104
30	P4	U1	-0.500	0.211	0.710	-0.074	0.351	0.424	1.135

[0033] 表の注釈

B1 : *E. Brassiana*H1~3 : *E. urophylla* × *E. grandis*P1~6 : *E. pellita*U1~U3 : *E. urophylla*

差分：両親の、第1主成分得点の差分、第2主成分得点の差分であり、絶対値である。

[0034] [主成分得点の差分と形質データとの相関の確認]

実生林試験地（ブラジル）で3．0年生のユーカリ実生個体（30家系（表1）×16個体）の形質データ（材積、パルプ収率）を取得した。これらの個体は、上述の主成分分析の被検植物を親とするF1系統に相当する。

パルプ収率は、サンプルの実測パルプ収率と近赤外線スペクトルより予め作成した検量線モデルを用いて特定し、家系別での平均値を算出した。すなわち、チップを蒸解試験（回転式マルチダイジェスター使用、硫化度25％、液比2．5 L／kg、最高温度160℃、保持時間110分、Hファクター830）に供し求めた実測値132点（実測パルプ収率）と、それぞれの近赤外分光分析法（NIR）による近赤外線スペクトルとを取得し、統計的に関連付けた検量線モデルを作成した。一方、各ユーカリ実生個体の近赤外線スペクトルを測定し、検量線モデルに基づきパルプ収率を特定し、家系別の平均値を算出した。

[0035] この形質データ（材積、パルプ収率）と、上述の（D）で得られた両親間の主成分得点の差分（絶対差）との相関をExcelのCorrel関数を用いて確認した。その結果、材積と両親間の第1主成分得点の差分（絶対差）、第1、第2主成分得点の差分と材積に相関（それぞれ、 $R=0.582$ 、 $R=0.506$ ；それぞれT検定有意水準1％で有意差あり）があることを確認した（図2及び3）。同様に、パルプ収率と両親間の第1主成分得点の差分（絶対差）、第1、第2主成分得点の差分と材積に相関（それぞれ、 $R=0.381$ 、 $R=0.276$ ；前者は、T検定有意水準5％で有意差があることを確認した（図4及び5））。

[0036] 実施例2（利用する主成分の数）

実施例1において、主成分分析において第3、第4主成分も抽出し、第1～第3主成分得点の合計の差分、第1～第4主成分得点の合計の差分、第1及び第3主成分得点の合計の差分、第1及び第4主成分得点の合計の差分（いずれも絶対差）を算出した（表2）。その結果、第1～第3主成分得点の合計の差分、第1～第4主成分得点の合計の差分も、同様に材積とパルプ収率とに相関があることを確認した。

[0037] [表2]

表2 各主成分得点の差分と材積及びパルプ収率との相関

		実施例 1		実施例 2			
		両親の第 1 主成分得点の差分	両親の第 1 ～2 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 ～3 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 ～4 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 と第 3 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 と第 4 主成分得点の合計の差分
相関係数	材積	0.582	0.506	0.613	0.684	0.632	0.554
	パルプ収率	0.381	0.276	0.376	0.319	0.327	0.319

[0038] 実施例 3

材積以外の形質データについても、両親間の主成分得点の差分（絶対差）と相関がみられるかどうかを検証した。具体的には、対象サンプルとして 9 家系、合計 1 0 0 0 個体の、両親間の主成分得点を用いたほかは、実施例 1 と同様に行い、両親間の主成分得点の差分（絶対差）を算出した。

[0039] アムセル社の実生林試験地の、0. 5 年生のユーカリ実生個体（9 家系×約 2 0 ～1 0 0 個体）の形質データ（樹高）を取得し、樹高と両親の第 1 主成分得点と第 2 主成分得点の合計の差分との関係を確認した（表 3）。

[0040] [表3]

表3 両親間の、第 1 主成分得点、第 2 主成分得点及びそれらの合計の差分（実施例 3）

家 系 No.	育種親候補		第 1 主成分得点			第 2 主成分得点			合計 差分
	母	父	母	父	差分	母	父	差分	
T1	H2	P7	-0.363	-0.434	0.071	-0.539	-0.377	0.162	0.233
T2	P8	P7	-0.151	-0.434	0.283	0.260	-0.377	0.637	0.920
T3	H4	P7	-0.434	0.414	0.848	-0.377	0.053	0.430	1.278
T4	U1	P7	0.211	-0.434	0.645	0.351	-0.377	0.728	1.373
T5	U1	P8	0.211	-0.151	0.362	0.351	0.260	0.091	0.452
T6	P3	P8	-0.366	-0.151	0.215	-0.166	0.260	0.426	0.641
T7	P3	B2	-0.366	-0.183	0.183	-0.166	-0.026	0.140	0.323
T8	P8	B1	-0.151	-0.340	0.189	0.260	-0.734	0.994	1.183
T9	U1	B1	0.211	-0.340	0.551	0.351	-0.734	1.085	1.635

[0041] 表の注釈

B 1 ～ 2 : E. B r a s s i a n a

H 2、4 : E. u r o p h y l l a × E. g r a n d i s

P 3、7、8 : E. p e l l i t a

U 1 : E. u r o p h y l l a

差分：両親の、第 1 主成分得点の差分、第 2 主成分得点の差分であり、絶対値である。

[0042] この形質データと、上述の（D）で得られた両親間の主成分得点の差分（絶対差）との相関を確認した。その結果、両親間の第 1 主成分得点と第 2 主成分得点の合計の差分（絶対差）と樹高に相関（それぞれ、 $R = 0.795$ ）があることを確認した（図 6）。

[0043] 実施例 4（遺伝子多型情報として用いる SNP の数）

実施例 3 において、取得した 60,000 の SNP データのうち 1000 個を抽出して利用したほかは、実施例 1 と同様に主成分分析、形質データとの相関の確認を行った。その結果、両親間の第 1 主成分得点の差分（絶対差）、第 1、第 2 主成分得点の差分と材積に相関があること（それぞれ、 $R = 0.699$ 、 $R = 0.815$ ；後者は、T 検定有意水準 5 % で有意差あり）を確認した。

[0044] 実施例 5（利用する主成分の数）

実施例 3 において、主成分分析において第 3、第 4 主成分も抽出し、第 1 ～第 3 主成分得点の合計の差分、第 1 ～第 4 主成分得点の合計の差分（いずれも絶対差）を算出した（表 4）。その結果、第 1 ～第 3 主成分得点の合計の差分、第 1 ～第 4 主成分得点の合計の差分、第 1 主成分得点と第 3 主成分得点の合計の差分も、同様に材積に相関があることを確認した。

[0045] [表 4]

表 4 各主成分得点の差分と樹高との相関

	実施例 3		実施例 4		
	両親の第 1 主成分得点の差分	両親の第 1 ～2 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 ～3 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 ～4 主成分得点の合計の差分	両親の第 1 と第 3 主成分得点の合計の差分
相関係数	0.718	0.795	0.773	0.644	0.621

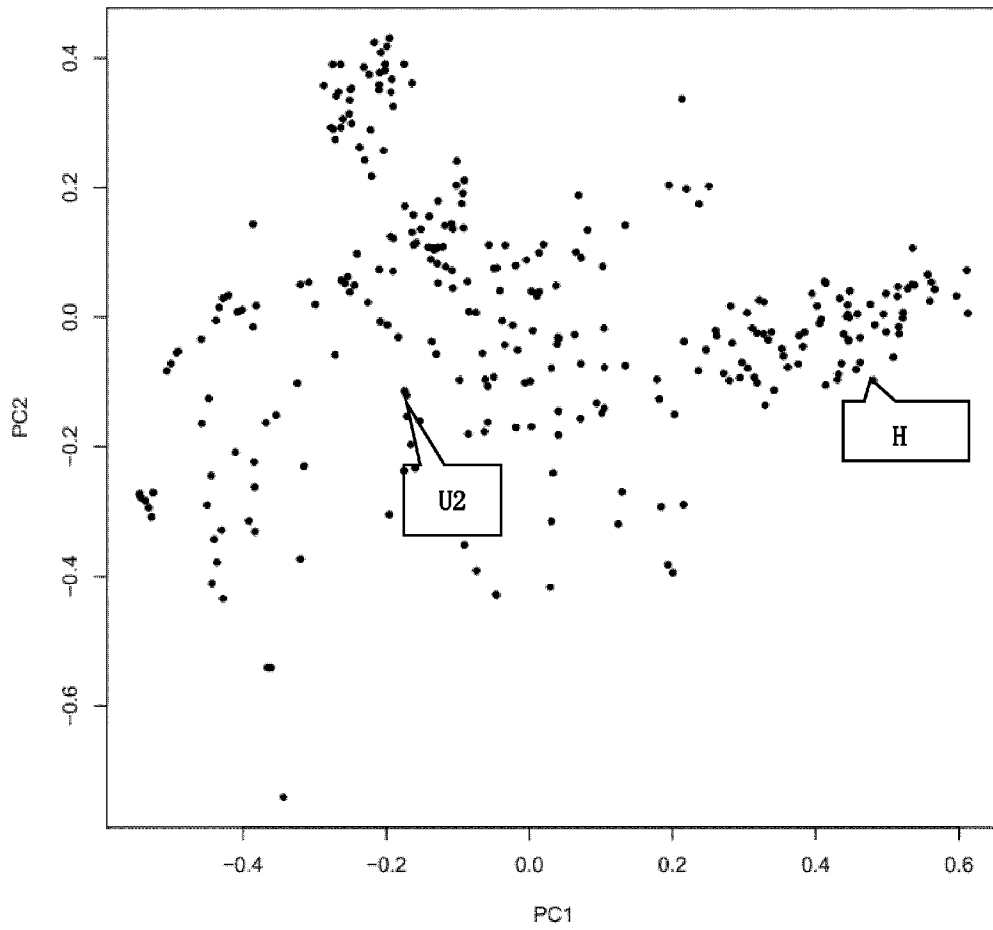
[0046] これらの結果は、本発明によれば、遺伝的多型情報に基づき、高成長個体群を生み出すことのできる林木用育種親を選抜できることが明らかである。

請求の範囲

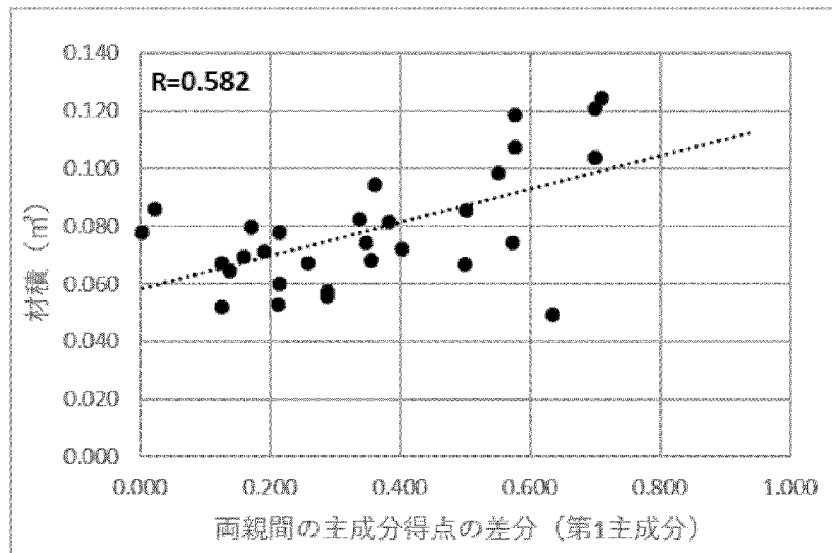
- [請求項1] (A) ～ (D) を含む、林木用育種親の選抜方法：
- (A)：育種親候補集団を構成する 2 以上の被検植物のそれぞれについて、遺伝子多型情報を得ること；
- (B)：(A) で得られた遺伝子多型情報から、血縁行列を算出すること；
- (C)：(B) で得られた血縁行列算出結果を主成分分析し、少なくとも第 1 主成分を抽出し、その主成分得点を得ること；及び
- (D)：育種親候補集団を構成する 2 以上の被検植物の、(C) で得られた主成分得点の差分の絶対値を算出し、これを選抜の評価指標として育種親を選抜すること。
- [請求項2] (C) において、さらに第 2、第 3、第 4 主成分の少なくともいずれかを抽出し、その主成分得点を得ること、
- (D) において、2 つの育種親候補の第 1 主成分得点の差分と、第 2、第 3、及び第 4 主成分から選ばれる少なくとも 1 つの主成分得点との差分の合計を算出する、請求項 1 に記載の選抜方法。
- [請求項3] 育種親候補集団を構成する被検植物が、同属であって異なる品種又は系統の植物である請求項 1 又は 2 に記載の選抜方法。
- [請求項4] 遺伝子多型情報が、一塩基多型の情報である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の選抜方法。
- [請求項5] 遺伝子多型情報が、1, 000 以上の遺伝子多型部位における遺伝子多型の存在量である、請求項 4 に記載の選抜方法。
- [請求項6] (D) 工程において、2 つの育種親候補の主成分得点の差分（絶対値）が、
- 最大値の $1/2$ 以上である育種親を選ぶ、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の選抜方法。
- [請求項7] 被検植物がユーカリ属植物である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の選抜方法。

- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項に記載の選抜方法により育種親を選抜し、選抜された育種親を交配して苗を生産する、林木用の苗の生産方法。
- [請求項9] 苗は、実生苗又は挿し木苗である、請求項8に記載の生産方法。
- [請求項10] 請求項8又は9に記載の生産方法により生産された苗を育成する、林木の生産方法。
- [請求項11] 請求項10に記載の生産方法により生産された林木を植樹し育成する、森林の造成方法。

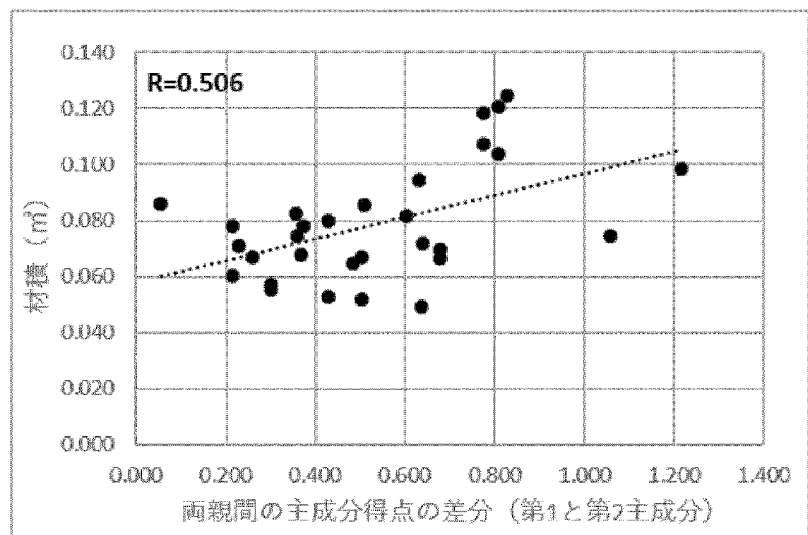
[図1]



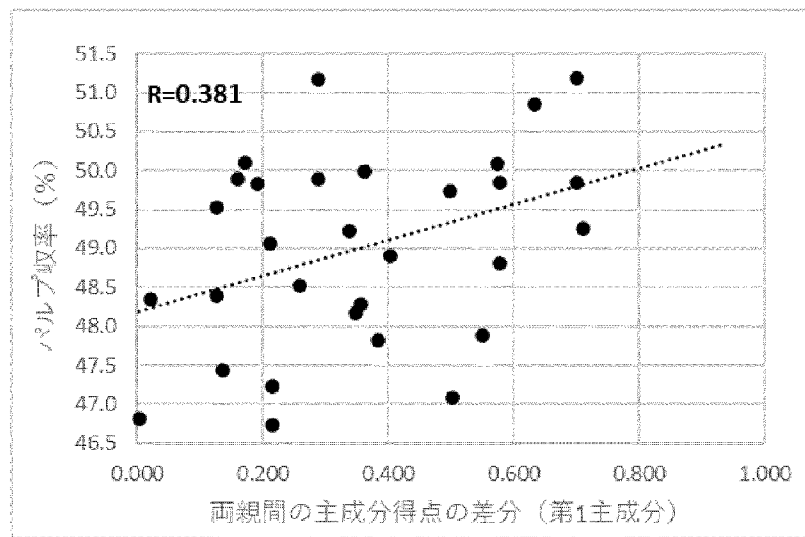
[図2]



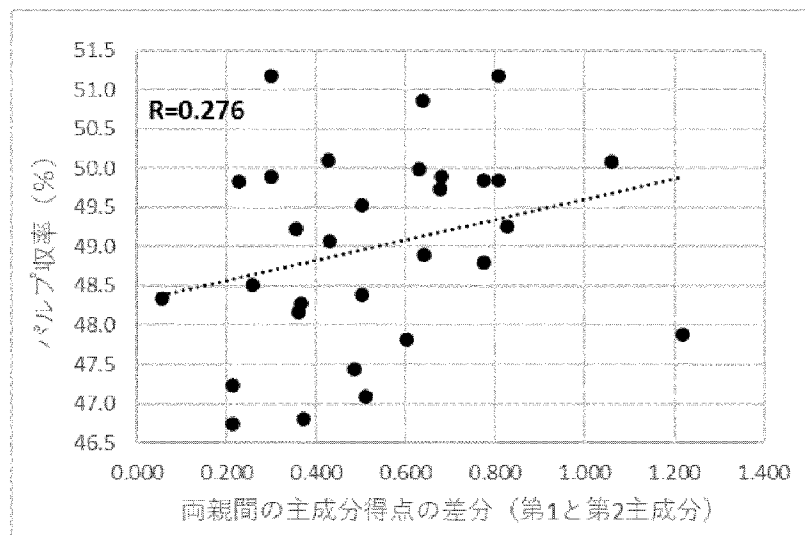
[図3]



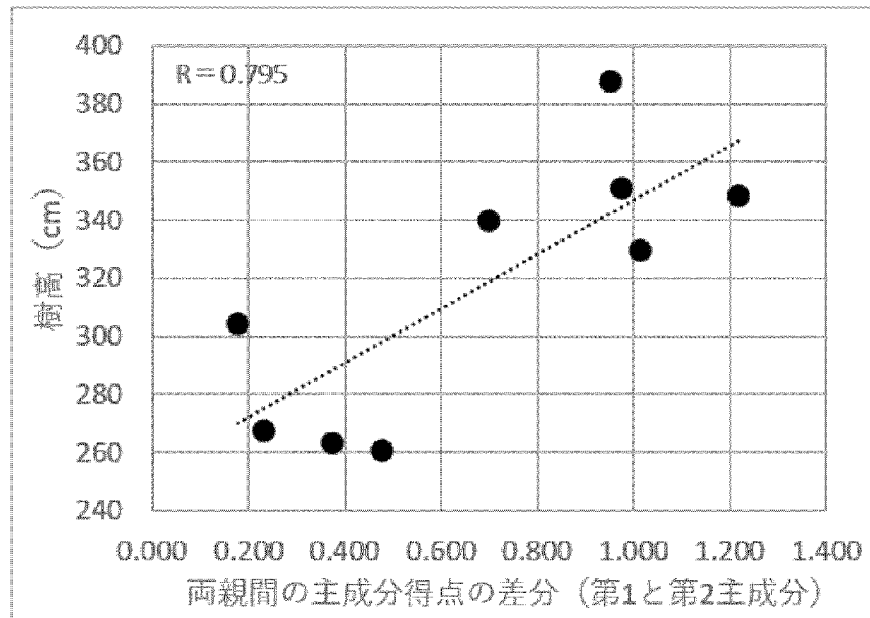
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12Q 1/6827**(2018.01)i; **A01G 2/10**(2018.01)i

FI: C12Q1/6827 Z; A01G2/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/6827

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	新屋智崇,他8名. ゲノミックセレクションによるユーカリの選抜育種. 森林遺伝育種. 25 July 2017, (Forest Genetics and Tree Breeding), non-official translation (SHINYA, Tomotaka et al. Selective Breeding of Eucalyptus Using Genomic Selection.) p. 98, line 1 to p. 100, line 8	1-11
Y	RESENDE, Jr. M.F.R. et al. Accuracy of Genomic Selection Methods in a Standard Data Set of Loblolly Pine (Pinus taeda L.). Genetics. 2012, vol. 190, pp. 1503-1510 abstract	1-11
Y	ISIK, F. et al. Genomic selection in maritime pine. Plant Science. 2016, vol. 242, pp. 108-119 abstract	1-11
Y	GRATTAPAGLIA, D. et al. Genomic selection in forest tree breeding. Tree Genetics & Genomes. 2011, vol. 7, pp. 241-255 abstract	1-11
Y	GRATTAPAGLIA, D. et al. Quantitative Genetics and Genomics Converge to Accelerate Forest Tree Breeding. Frontiers in Plant Science. 2018, vol. 9, Article 1693, pp. 1-10 abstract	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 May 2023

Date of mailing of the international search report

16 May 2023

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/009250

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, T. et al. Inbreeding depression in three generations of selfed families of silver birch (<i>Betula pendula</i>). Can J For Res. 1999, vol. 29, pp. 662-668 abstract	1-11
Y	近藤 禎二. 材木におけるヘテロシスとその育種法. 森林遺伝育種. 2016, vol. 5, pp. 1-4, (Forest Genetics and Tree Breeding), non-official translation (KONDO, Teiji. Heterosis in Timber and Breeding Methods Therefor.) in particular, Introduction, Cross-Breeding of Eucalyptus and Pine, Conclusion	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/6827(2018.01)i; A01G 2/10(2018.01)i FI: C12Q1/6827 Z; A01G2/10		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C12Q1/6827		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2023年 日本国実用新案登録公報 1996-2023年 日本国登録実用新案公報 1994-2023年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	新屋 智崇, 他8名, ゲノミックセレクションによるユーカリの選抜育種, 森林遺伝育種, 2017.07.25 98頁1行~100頁8行	1-11
Y	RESENDE, Jr. M.F.R. et al., Accuracy of Genomic Selection Methods in a Standard Data Set of Loblolly Pine (Pinus taeda L.), Genetics, 2012, Vol.190, pp.1503-1510 Abstract	1-11
Y	ISIK, F. et al., Genomic selection in maritime pine, Plant Science, 2016, Vol.242, pp.108-119 Abstract	1-11
Y	GRATTAPAGLIA, D. et al., Genomic selection in forest tree breeding, Tree Genetics & Genomes, 2011, Vol.7, pp.241-255 Abstract	1-11
Y	GRATTAPAGLIA, D. et al., Quantitative Genetics and Genomics Converge to Accelerate Forest Tree Breeding, Frontiers in Plant Science, 2018, Vol.9, Article 1693, pp.1-10 Abstract	1-11
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 01.05.2023		国際調査報告の発送日 16.05.2023
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 林 康子 4N 1195 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WANG, T. et al., Inbreeding depression in three generations of selfed families of silver birch (<i>Betula pendula</i>), Can J For Res, 1999, Vol.29, pp.662-668 Abstract	1-11
Y	近藤 禎二, 材木におけるヘテロシスとその育種法, 森林遺伝育種, 2016, 第5巻, pp.1-4 特に、はじめに、ユーカリとマツにおける種間交雑、おわりにの項	1-11