

【原著論文】

山梨県と新潟県におけるブナの天然林と天然林産実生苗の遺伝的評価

松本 麻子^{*1}・金谷 整一²・塚原 雅美³・西川 浩己⁴・Pakkad Greuk¹・吉丸 博志⁵

Genetic evaluation of *Fagus crenata* natural populations and the seedlings

derived from them in Niigata and Yamanashi Prefectures

Asako Matsumoto^{*1}, Seiichi Kanetani², Masami Tsukahara³,

Hiroki Nishikawa⁴, Pakkad Greuk¹, and Hiroshi Yoshimaru⁵

要旨：山梨県と新潟県で採種林として利用されているブナ天然林集団とそれらから生産された実生苗集団について、核DNAのマイクロサテライトを用いて遺伝的多様性、遺伝的組成および集団間の遺伝的関係について解析した。新潟県では採種林集団とほぼ同等の遺伝的多様性を保有する実生苗が生産されていた。山梨県山中湖実生苗集団でもアレリックリッチネスの値は採種林集団より低かったもののヘテロ接合度は高く、遺伝的多様性が採種林集団よりも低いとは言えなかった。STRUCTURE解析の結果では、新潟県の津南、滝首、安田および山中湖において、採種林と実生苗集団間でクラスターの割合に違いがみられ、遺伝的組成が異なる可能性が示唆された。特に山中湖では、実生苗集団の近縁度が採種林集団と比べて高まっており、限られた母樹から採種した影響が考えられた。両県の結果から、遺伝的多様性を確保するには現在の採種方法ではほぼ問題はないが、実生苗集団が地域の天然林と同様の遺伝的組成を保有するためには、採種母樹数、採種箇所数を増やすことが望ましいと考えられた。

キーワード：遺伝的組成、遺伝的多様性、マイクロサテライト

Abstract: We have investigated the genetic diversity, genetic components, and genetic relationships among the *Fagus crenata* natural populations that are used as seed stands, and the seedlings derived therefrom in Niigata and Yamanashi Prefectures, by using nuclear microsatellite markers. Seedlings showing almost the same level of genetic diversity as that of the related seed stand populations have been produced in Niigata Prefecture. Although the value of allelic richness in the Yamanakako seedling population in Yamanashi Prefecture was lower than its seed stand population, the value of heterozygosity was comparable. STRUCTURE analysis revealed that the seedling populations in Tsunan, Takigashira and Yasuda in Niigata Prefecture, and Yamanakako showed differences in the ratio of each cluster from the related seed stand populations, suggesting a possibly different genetic composition between them. In particular, the relatedness among individuals in the seedling population of Yamanakako was higher than that in its seed stand population. The possible impacts of seeds from limited mother trees were also considered. The results of this study suggest that the

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

¹ 森林総合研究所森林遺伝研究領域 Department of Forest Genetics, Forestry and Forest Products Research Institute, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

² 森林総合研究所九州支所 Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 4-11-16 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto, Kumamoto 860-0862, Japan

³ 新潟県森林研究所 Niigata Prefectural Forest Research Institute, 2249-5 Unotoro, Murakami, Niigata 958-0264, Japan

⁴ 山梨県森林総合研究所 Yamanashi Forest Research Institute, 2290-1 Saishoji, Fujikawa, Yamanashi 400-0502, Japan

⁵ 森林総合研究所多摩森林科学園 Tama Forest Science Garden, Forestry and Forest Products Research Institute, 1833-81 Todorimachi, Hachioji, Tokyo 193-0843, Japan

2012年9月19日受付、2013年4月20日受理

current methods of seed collection have almost no problems relative to maintaining genetic diversity, but the number of mother trees and/or seed collecting sites should be increased in order to maintain genetic compositions similar to those found in natural forests in these regions.

Keywords: genetic component, genetic diversity, microsatellite

はじめに

近年、森林に対するニーズの多様化や地域特有の森林再生などのため、広葉樹の植栽が増加傾向にある。1970年以降、針葉樹を含めた造林面積は減少しているが、広葉樹の造林面積は第二次世界大戦後にわずかに増加し、その後今日まで年間5,000haほどで推移している(林野庁2011a)。つまり、全造林面積に対する広葉樹の比率が高まっていると言える。広葉樹造林の目的は、用材生産が主である針葉樹とは異なり、皆伐地やのり面、崩壊地の緑化造林などであり、環境の再生または復元を意図している(小山2012)。それらの行為は、公共事業として行政が主導する場合や、自然保護運動に関わるNPO法人や市民団体が主導して環境教育と関連させて育苗や植栽を行うなど場合などがあり、年々活動が盛んになっている(林野庁2011b)。

このような広葉樹造林において重要なことは、その植栽地に対して「適した苗木」を植栽することである(吉丸・山中2010)。まずは、たとえ環境条件として生育可能な植物種であっても、その場所に自生しない場合には導入しないことである。次いで、植栽する苗木が自生集団と同種であるだけでなく、その周辺地域の集団と同程度の遺伝的多様性を有し、遺伝的にも同質であることである。生育環境が似た地域から導入された苗木でも遺伝的組成が異なるなど遺伝的背景が著しく異なる場合には、植栽された個体の生育は順調に見えるものの、自生個体との交配で形成された後代で適応度が低下し、遺伝子攪乱が引き起こされて数世代のうちに集団が衰退に向かう可能性がある(Hufford and Mazer 2003)。また、導入した苗木の遺伝的多様性がその地域の遺伝的多様性に比べて著しく低下していれば、再生・復元された森林は、将来、被り得る気象害や環境変動などに対する適応能力が不十分になり、衰退に向かう可能性があると考えられる(Koyama et al. 2012)。このように、植栽の際にどのような苗木を導入するかは重要であるが、スギ(*Cryptomeria japonica*)やヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)のような針葉樹が昭和14(1939)年に制定された林業種苗法によって採種時期や配付域が決められているのに対し、広葉樹では採種方法、育苗方法、種苗の配付などに関する法的規

制はなく、それらの方法や種子の採取地(産地)は種苗生産業者に依存している。そのため、現時点で植栽に利用されている広葉樹の種苗が、その地域の遺伝的背景を反映したものか、遺伝子攪乱を引き起こす恐れがあるかなどの情報は非常に不足している(Koyama et al. 2012)。

ブナ(*Fagus crenata*)はブナ科ブナ属の落葉広葉樹で、北海道南部から鹿児島県高隈山系まで天然分布する日本固有種である(Horikawa 1972)。ブナ天然林は、日本海側の多雪地帯では大面積で純林を形成することが多く、太平洋側では他樹種と混交林を形成する(福島・岩瀬2005)。形態の特徴も太平洋側と日本海側で異なり、例えば葉面積においては、北海道南西部・北東北から北陸にかけては非常に大きく、南東北太平洋岸から中部内陸部、中国地方では中程度、関東太平洋岸から東海、近畿、四国、九州では小さい傾向がある(萩原1977)。他にもブナの形態の地理的変異については多くの研究結果が報告されているとともに(Hiura et al. 1996; Maruta et al. 1997; 小池・丸山1998)、アロザイム、ミトコンドリアDNA、葉緑体DNAおよび核DNAのマクロサテライトなど遺伝マーカーを用いた地理的変異の研究も進められている(Takahashi et al. 1994; Tomaru et al. 1997; Tomaru et al. 1998; Koike et al. 1998; Fujii et al. 2002; Okaura and Harada 2002; Hiraoka and Tomaru 2009)。これらの研究成果から、ブナは形態的ならびに遺伝的に日本海側と太平洋側で分化していることが示唆されている。このように、ブナは我が国における広葉樹の中でも生態学的ならびに遺伝学的な情報が最も豊富な樹種の1つであり、種苗の遺伝的多様性の程度や遺伝的特徴を判断することが可能である。

そこで本研究では、ブナを対象として、苗木生産を行っている山梨県ならびに新潟県を事例とし、種子源となる天然林および従来の方法で生産された実生苗をマイクロサテライトマーカーで解析し、遺伝的多様性および遺伝的組成を評価することを目的とした。

材料と方法

調査したブナ天然林および実生苗

山梨県と新潟県で採種林として利用されている合計6

カ所のブナ天然林（以後、採種林集団と呼ぶ）とそれらから生産された実生苗（実生苗集団）を対象とした。また、山梨県では、さらに2カ所のブナ天然林（天然林集団）も対象とした。

山梨県：山中湖採種林集団、および採種林候補である富士山麓の天然林と清八峠の天然林の2天然林集団について調査した（表-1、図-1A）。各集団で32~35個体の成木から葉を採取した。実生苗の生産は、2006年に山中湖の採種林集団内で無作為に抽出した10母樹の樹冠下に落下した種子を集め、山梨県森林総合研究所富士吉田試験園（富士吉田市）にて播種・育苗した。個体数は数千個体だった。DNA分析には2年生実生苗46個体の葉を用いた。

新潟県：津南、川西、高根、滝音および安田の5採種林集団について調査した（表-1、図-1B）。安田は正式には採種林候補であるが、すでに採種に利用されているため本研究では採種林集団とした。各集団で個体間距離が10m以上離れるように成木を32個体選び、葉を採取した。採種および育苗は新潟県山林種苗協会が行った。2005年に、各集団内3~4カ所に敷いたブルーシート（5×5m）内に落下した種子を回収して集団ごとに混合し、それらを新潟市、十日町市、阿賀野市で播種・育苗した。なお、採種・播種・育苗については、従来種苗協会が行う方法に基づいた。各集団から集めた種子から育苗した個体数は数千個体で、DNA分析には2年生実生苗44~65個体の葉を用いた。

DNA 分析

葉からのDNA抽出は、DNeasy Plant mini kit (QUIAGEN)を用いて行った。核マイクロサテライトマーカー10遺伝子座 (mfc5、mfc12、sfc7-2、sfc18、sfc36、sfc195-2、sfc378、

sfc1063、sfc1105、sfc1143) (Kenta et al.1999;Asuka et al. 2004)（表-2）を用いた。PCR増幅は、各プライマー0.4~10 μM、2× Multiplex PCR Master Mix (QUIAGEN)、5 ng の鋳型DNAを含む6 μLの反応液を作成し、95 °C 15分間の後、熱変性94 °C (30秒間)、アニーリング60~62 °C (90秒間)、伸長反応72 °C (60秒間)を1サイクルとして合計32~35サイクルを行った。最終伸長反応は60 °C 30分間行った。PCR反応に使用したサーマルサイクラーはGeneAmp PCR System Model 9700 (Applied Biosystems)、PCR産物の電気泳動はABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で行い、フラグメント長の決定には解析ソフトGeneScan (Applied Biosystems)およびGenotyper (Applied Biosystems)を用いた。

データ解析

マイクロサテライトマーカーの遺伝的多型性について、山梨県および新潟県の採種林・天然林集団の遺伝子型データを用いてヘテロ接合度の期待値 (H_E)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、近交係数 (F_{IS})、および集団間の遺伝的分化程度を示す固定指数(F_{ST})を算出した。採種林・天然林集団および実生苗集団の遺伝的多様性を示す指標として、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、観察値 (H_O)、アレリックリッチネス (AR)、集団の任意交配からのずれを示す近交係数 (F_{IS}) を算出した。集団内個体間の遺伝的関係は、Queller and Goodnight (1989) による近縁度 (r) を算出して評価した。近縁度 (r) は-1から1の値をとり、個体と同じ母親に由来する半兄弟の場合、 r の値は0.25となる。これらの値の算出には、プログラム FSTAT ver. 2.9.3.2 (Goudet 2002) および GenAlEx ver.6.2 (Peakall and Smouse 2006) を用い、採種林集団と実生苗集団の有意差検定には FSTAT のグループ間検定を用いた。採種林・天

表-1 調査したブナ天然林の位置

集団名	略号	林分種別	緯度 (N)	経度 (E)	標高 (m)
山梨県					
山中湖	YN	採種林	35° 24' 14"	138° 53' 41"	1000
富士	FJ	天然林 (採種林候補)	35° 25' 29"	138° 41' 27"	1750
清八峠	KY	天然林	35° 34' 10"	138° 47' 57"	1500
新潟県					
津南	TS	採種林	37° 02' 16"	138° 35' 54"	720
川西	KN	採種林	37° 09' 56"	138° 43' 39"	230
滝音	TG	採種林	37° 33' 07"	139° 30' 39"	450
安田	YD	採種林 (採種林候補)	37° 46' 11"	139° 17' 46"	360
高根	TN	採種林	38° 23' 00"	139° 41' 57"	700

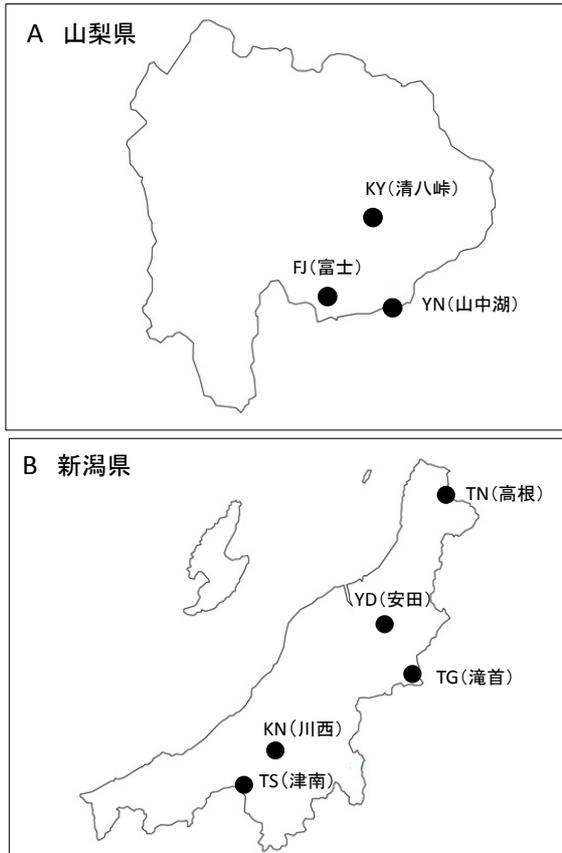


図-1 本研究で対象とした (A) 山梨県および (B) 新潟県のブナ天然林

天然林集団間の遺伝的関係については、遺伝距離 D_A (Nei 1983) に基づき近隣結合法により系統樹を作成した。 D_A の算出および系統樹の作成には解析プログラム Populations ver. 1.2.30beta (Langella 2007) を用いた。さらに、採種林・実生苗集団の遺伝的関係については、集団間の遺伝距離 D_A について主座標分析を行い、第1、第2主座標を用いて散布図に表した。また、採種林・天然林・実生苗集団における遺伝構造の検出はプログラム STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003) を用いて県ごとに行い、混合モデル、 F モデルの組合せで、対数尤度 $[\text{LnPr}(X|K)]$ に基づき最適なクラスター数 (K) を推定した。

結 果

マイクロサテライトマーカーの遺伝的多型性

ブナのマイクロサテライトマーカー10 遺伝子座の多型

性評価の結果を表-2 に示す。山梨県の1 採種林と2 天然林、新潟県の5 採種林の合計8 集団251 個体の遺伝型データが得られた。検出された対立遺伝子数は、mfc5 で最も多く ($N_A=31$)、sfc195-2 で最も少なかった ($N_A=10$)。ヘテロ接合度の期待値 (H_E) は0.438 - 0.894、観察値 (H_O) は0.331 - 0.880、固定指数 (F_{ST}) は0.026 - 0.249 で、mfc12 で最も高い値を示した。近交係数 (F_{IS}) は-0.034 - 0.329 で、mfc12 (0.235) および sfc1105 (0.329) では、有意に0 から偏っていた ($P<0.01$)。また、mfc12 については F_{ST} の値も高く自然選択に対して中立ではない遺伝子座の可能性が考えられた。これら2 遺伝子座は、全ての集団で近交係数が高い値を示したことから、ヌル対立遺伝子の影響を受けている可能性が高いため、以後の解析から除外した。

採種林・天然林集団の遺伝的多様性

山梨県および新潟県の採種林・天然林の合計8 集団の遺伝的多様性を評価した (表-3)。山梨県の集団では、 H_E は0.789 - 0.821、 H_O は0.697 - 0.789、アレリックリッチネスは9.05 - 9.78 だった。 F_{IS} は0.040 - 0.127 で清八峠の値が最も高かったが有意に0 から偏ってはいなかった。新潟県の集団では、 H_E が0.787 - 0.828、 H_O は0.757 - 0.802、アレリックリッチネスの値は8.80 - 10.45 であった。 F_{IS} は、-0.011 - 0.066 で有意に0 から偏った集団はなかった。

実生苗集団の遺伝的多様性

実生苗集団の遺伝的多様性評価の結果を表-3 に示す。山梨県の山中湖では、 H_E は0.813、 H_O は0.785、アレリックリッチネスは8.89、 F_{IS} は0.034 であった。新潟県の5 つの集団では、 H_E は0.780 - 0.837、 H_O は0.733 - 0.835、アレリックリッチネスは8.11 - 10.17、 F_{IS} は-0.034 - 0.084 であった。山梨県と新潟県の集団を通じて、 F_{IS} が0 から有意に偏った集団は検出されなかった。アレリックリッチネスの値自体は、新潟県の川西と安田では実生苗が採種林よりも高かったが、それ以外ではいずれも実生苗の方が低かった。しかしながら、採種林と実生苗の集団間のグループ間検定を行ったところ、 H_E 、 H_O 、 F_{IS} だけでなくアレリックリッチネスでも有意差は検出されなかった。

採種林・天然林集団および実生苗集団の遺伝的関係

山梨県および新潟県の8ヶ所の採種林・天然林集団について、集団間の遺伝距離 (D_A) に基づき近隣結合法で系統樹を作成したところ、山梨県と新潟県の集団は遺伝的

表-2 山梨県と新潟県のブナ採種林・天然林集団におけるマイクロサテライト 10 遺伝子座の遺伝的多様性

遺伝子座	対立遺伝子 サイズ (bp)	対立遺伝子 数 (N_A)	H_E	H_O	F_{IS}	F_{ST}
mfc5	271-331	31	0.894	0.879	0.017	0.031
mfc12	272-384	29	0.438	0.335	0.235	0.249
sfc7-2	140-191	19	0.808	0.834	-0.034	0.044
sfc18	154-200	20	0.764	0.743	0.027	0.042
sfc36	98-37	29	0.870	0.865	0.005	0.052
sfc195-2	178-195	10	0.564	0.496	0.123	0.043
sfc378	227-257	27	0.848	0.807	0.051	0.036
sfc1063	191-230	20	0.848	0.756	0.109	0.028
sfc1105	122-151	19	0.494	0.331	0.329	0.026
sfc1143	96-139	27	0.876	0.880	-0.004	0.039

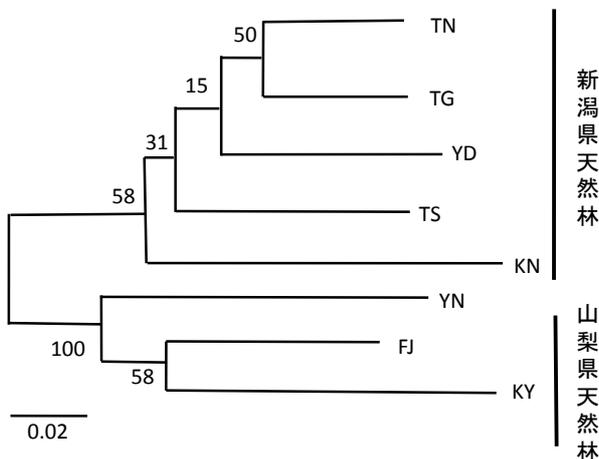


図-2 D_A 距離に基づくブナ採種林・天然林集団の遺伝的關係

に明確に分化していることが示唆された (図-2、ブートストラップ値 100%)。

各県の採種林・天然林集団と実生苗集団の遺伝的組成を比較するために行った STRUCTURE 解析の結果では、山梨県の集団の最適な K の値は 2 であり、2つのクラスターの混合割合は個体ごとに様々であった (図-3)。清八峠天然林ではクラスター2 が優占する個体が比較的多い一方、山中湖採種林ではクラスター1 が優占する個体も多かった。山中湖の実生苗集団では、採種林と比べてクラスター1 が優占する個体の割合がさらに増加していた。新潟県では、 $K=1$ が最適となり、明確な遺伝構造は検出されなかった。しかしながら $K=2$ の場合をみると、各採種

林集団とその実生苗集団におけるクラスターの混合割合は異なる傾向にあり、特に津南実生苗集団ではクラスター2 の割合が、滝首、安田の実生苗集団ではクラスター1 の割合が採種林集団に比べて増加していた (図-4)。また、採種林と実生苗集団の遺伝的距離について主座標分析を行った結果では、第 1 種座標で山梨県と新潟県が大まかに区別された (図-5)。しかしながら、新潟県では、実生苗集団のうち、川西、滝首、安田は、それらの採種林集団と位置が離れた。

集団内個体間の近縁関係

各集団における集団内個体間の近縁度 (r) の平均値を算出した (表-3)。その結果、採種林集団では 0.009 - 0.083、実生苗集団では 0.016 - 0.095 で、新潟の川西を除き、実生苗は採種林に比べて近縁度が高かった。新潟県では、採種林と実生苗の集団間でグループ間検定を行ったが、近縁度の平均値に有意差はみられなかった。しかしながら、近縁度 (r) の値が 0.25 以上を示す個体組合せ数の割合をみると、山梨県山中湖の実生苗集団で最も高く (22.48%)、採種林集団の約 3 倍の値を示した。一方、最も低かったのは新潟県高根の実生苗集団 (6.05%) で、採種林集団 (5.04%) と同程度であった。

さらに、各採種林集団での出現頻度が 5% 以下の稀な対立遺伝子については、そのうちの 15.69% から 57.41% が実生苗集団では検出されなかった (表-4)。また、稀な対立遺伝子の一部は実生苗集団での出現頻度が 10% を越え、その割合は検出された稀な対立遺伝子のうちの 1.85 - 12.24% に相当した (表-4)。

表-3 ブナ採種林・天然林集団と実生苗集団におけるマイクロサテライト 8 遺伝子座による遺伝的多様性の推定値

集団名	略号	解析 個体数	ヘテロ接 合度期待 値 (H_E)	ヘテロ接 合度観察 値 (H_O)	アレリッ クリッチ ネス (AR)	近交係数 (F_{IS}) ^a	近縁度の 平均値 (r)	$r > 0.25$ の割合 (%) ^b
採種林・天然林集団								
山梨県								
山中湖	YN	34	0.817	0.747	9.78	0.091	0.020	7.86
富士	FJ	25	0.821	0.789	9.72	0.040	0.039	5.80
清八峠	KY	32	0.789	0.697	9.05	0.127	0.069	10.89
新潟県								
津南	TS	32	0.787	0.757	9.75	0.058	0.069	8.67
川西	KN	32	0.788	0.792	8.80	-0.011	0.083	7.66
滝首	TG	32	0.827	0.776	10.45	0.066	0.020	3.83
安田	YD	32	0.828	0.802	10.13	0.035	0.009	4.43
高根	TN	32	0.819	0.788	9.91	0.045	0.011	5.04
実生集団								
山梨県								
山中湖	YNN	46	0.813	0.785	8.89	0.034	0.065	22.48
新潟県								
津南	TSN	46	0.804	0.835	9.60	-0.034	0.073	14.11
川西	KNN	85	0.797	0.733	9.57	0.084	0.055	13.50
滝首	TGN	47	0.780	0.797	8.11	-0.028	0.095	18.34
安田	YDN	64	0.837	0.795	10.17	0.059	0.016	14.90
高根	TNN	44	0.810	0.803	9.67	0.010	0.036	6.05

^a $P > 0.05$.

^b 各集団内の全個体のうち、近縁度 (r) が 0.25 より大きな値を示し組合せ数の割合。

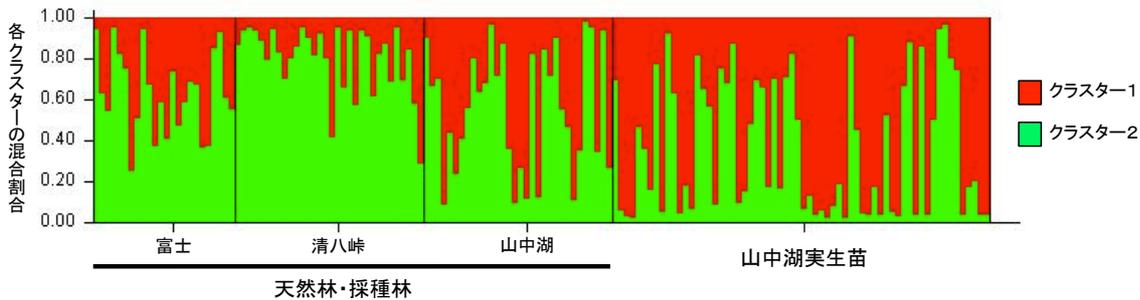


図-3 山梨県のブナ採種林・天然林集団と実生苗集団の STRUCTURE 解析の結果
各バーは個体を表す。クラスター1 と 2 の混合割合が個体ごとに異なる。

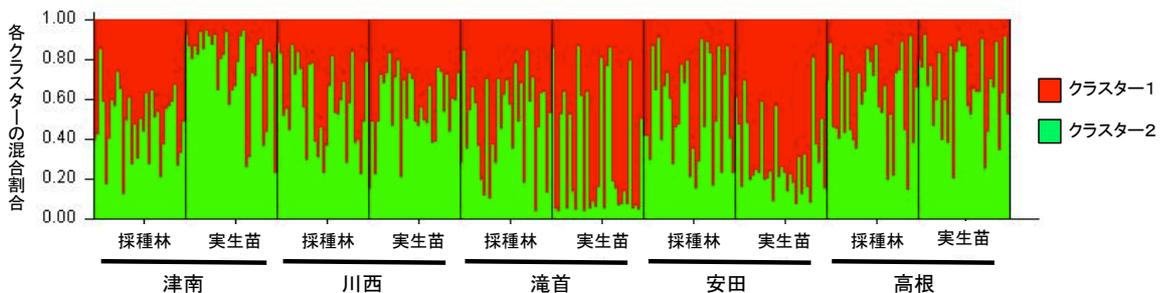


図-4 新潟県のブナ採種林集団と実生苗集団における STRUCTURE 解析の結果
各バーは個体を表す。クラスター1 と 2 の混合割合が個体ごとに異なる。

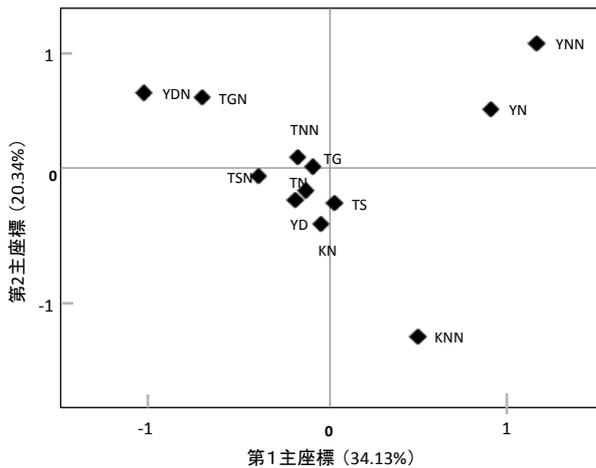


図-5 D_A 遺伝距離に基づいたブナ採種林と実生苗集団の遺伝的關係についての主座標分析結果

考 察

本研究では、山梨県(太平洋側でブナは他樹種と混交し、不連続分布)と新潟県(日本海側の多雪地帯でブナが優占し、連続分布)において設定された採種源となる天然林の遺伝的多様性を解析し、さらに、豊作時にそれぞれの林分から生産された実生苗の遺伝的組成について評価した。

遺伝的多様性

核マイクロサテライトマーカー8遺伝子座を用いた解析によって、山梨県と新潟県の天然林は遺伝的に明確に分化していることが示された。この結果は、これまでのブナの分布域を網羅した集団解析の結果(Hiraoka and Tomaru 2009)を支持した。本研究では、この結果を受け、山梨県と新潟県で天然林の遺伝的分化が明確であり、かつ採種方法が異なっていることから県ごとに解析を行った。結果としては、いずれの県においてもヘテロ接合度やアレリックリッチネスからみた採種林の遺伝的多様性は同程度に高く、生産された実生苗も採種林に劣らぬ遺伝的多様性を保持していることが明らかになった。よって、遺伝的多様性の点からは、実生苗は植栽する上で問題は無いと思われた。

遺伝的組成

新潟県の高根を除く実生苗では半兄弟以上の遺伝關係を示す個体の組み合わせ数が採種林と比べて1.5倍以上に高まり、稀な対立遺伝子の一部消失、稀な対立遺伝子の頻度の大幅な上昇など、遺伝的組成の変化が検出され

表-4 ブナの採種林集団においてマイクロサテライト8遺伝子座で検出された稀な対立遺伝子のうち実生苗集団で不検出の対立遺伝子数および頻度が著しく増加した対立遺伝子数

採種林 集団名	稀な対 立遺伝 子数 ^a	検出されな かった対立遺 伝子数 ^b (%)	頻度が増加 した対立遺 伝子数 ^c (%)
山梨県			
山中湖	46	18 (39.1)	1 (2.17)
新潟県			
津南	52	24 (46.15)	4 (7.69)
川西	49	21 (42.86)	6 (12.24)
滝首	54	31 (57.41)	1 (1.85)
安田	51	8 (15.69)	1 (1.96)
高根	51	24 (47.06)	3 (5.88)

^a 採種林で出現頻度が5%以下の対立遺伝子数

^b 採種林における稀な対立遺伝子のうち実生集団で全く検出されなかった対立遺伝子数

^c 採種林集団における稀な対立遺伝子のうち実生苗集団での出現頻度が10%以上になった対立遺伝子数

た。山梨県山中湖の実生苗では、半兄弟以上の近縁個体の割合が山中湖の採種林(7.86%)と比べて22.48%と著しく増加し、STRUCTURE解析では採種林と種苗の間でクラスター1と2の混合割合が異なった。山中湖の採種林は別荘地の開発により個体数が減少した林分であり、個体密度は60個体/haでほぼ単木的に分布する。そのうちの10個体の樹冠下で採種したため、収集された種子は、ほぼこれら10個体が母樹であったと推定される。そのため、限られた母樹の影響が実生苗に現れたと考えられた。

一方、新潟県では、STRUCTURE解析の最適なKの値は1であり、明瞭な遺伝構造は検出されなかった。平成18年の新潟県広葉樹候補母樹林調査表によると、本研究で対象とした採種林のうち滝首、川西および津南では個体密度が調査されており、各々312本/ha、302本/ha、672本/haで、山梨県山中湖の採種林と比べると高密度だった。個体密度が高い林内では、一定の範囲内に遺伝的に類似した実生個体が集中したとしても、それらが互いにオーバーラップしていること(Asuka et al. 2005)から、林内に設置したブルーシート(5×5m)内に落下し回収された種子は複数の母樹に由来していると考えられる。よって、林内3~4ヶ所に設置した場合、母樹数は山中湖の実生苗と比べて多くなり、限られた母樹数の影響は山中湖に比べて小さいと推察される。しかしながら、実生苗における稀な対立遺伝子の欠落と出現頻度の変化

は新潟県の実生苗でも検出されている。これは、ボトルネックを受けた集団の対立遺伝子数の減少はヘテロ接合度の減少より早く現れるという現象 (Nei et al. 1975) であり、実生苗集団が採種・育苗の過程で何らかのボトルネックを受けたために、集団内の対立遺伝子の構成が変化したのかもしれない。主座標分析の結果からも、採種林集団とそこから生産された実生苗集団間の遺伝的距離が比較的遠い関係が示されており、実生苗集団での遺伝的組成が変化した可能性が推測された。

採種林の設定について

新潟県内では本研究で対象とした以外に4ヶ所の天然林が採種林として設定されているが、そのうちの一つ、低地の孤立林である朝日村早稲田 (標高85 m) では、他の林分に比べて遺伝的多様性も有意に低く、集団の縮小によるボトルネックを受けたと考えられている (S. Kanetani unpublished)。このような林分から生産される実生苗は、採種・育苗の際にさらなるボトルネックを受けることになり、植栽することで周囲の天然林に比べて著しく遺伝的多様性が低下し、対立遺伝子の構成が異なった森林が再生される可能性がある。

種苗生産業者が採種源を設定する際には、採種作業の効率をあげるためアクセスの良い場所などが選択されやすく、地域の天然林を代表するような遺伝的多様性を保持した林分であるかなどの配慮がされない可能性がある。本研究結果からは、事例となった山梨県と新潟県のようなブナの分布の連続性や密度が異なる林分の場合でも、極度の孤立集団でない限り、遺伝的多様性は高く保たれていることが明らかになった。一方、実生苗では、集団間で程度の差はあったものの、稀な対立遺伝子が実生苗に受け継がれていなかったり、近縁個体の割合が採種源に比べて高かったりなどした。実生苗は遺伝的多様性が低下しないように配慮されるだけでなく、遺伝的に採種林と同質であることが望ましいと考えられることから、山梨県と新潟県で実施した2つの採種方法では、遺伝的に同質な実生苗集団を確保することは不十分であり、母樹数および採種箇所数をこれまでより増やすことが対応策の1つとなるかもしれない。植栽した森林がどのように再生・復元されたかを評価、検証するには長い年月を要するため、基本的にこれまでに議論してきた地域の遺伝的多様性および遺伝的組成が担保された実生苗を用いることがリスクを可能なかぎり回避する一手段として妥当であると考えられる。さらに、ブナのように豊凶がある樹種では、必要時に必要数の実生苗を確保することが難しい場合がある。豊作年で確保した実生苗を複数年に渡っ

て植栽に利用出来るよう、体制を整備することも広葉樹植栽において重要である (塚原ら 2011)。本研究では、一度の豊作年で生産された実生苗の解析結果のみで議論したが、規模の異なる豊作年に生産された実生苗についてもさらなる調査を行い、遺伝的多様性や遺伝的組成について比較を行うことが必要であると思われる。

謝辞

本研究を行うにあたり、新潟県山林種苗協会には、採種・育苗方法に対する聞き取り調査へのご協力および解析対象とするブナ実生苗を提供いただいた。心より感謝申し上げます。この研究は、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業 (農林水産省農林水産技術会議)「研究課題名：広葉樹林化のための更新予測および誘導技術の開発」により行われたものである。

引用文献

- Asuka Y, Tani N, Tsumura Y, Tomaru N (2004) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Molecular Ecology Notes* 4: 101-103
- Asuka Y, Tomaru N, Munehara Y, Tani N, Tsumura Y, Yamamoto S (2005) Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech-dwarf bamboo forest. *Molecular Ecology* 14: 2565-2575
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1687
- Fujii N, Tomaru N, Okamura K, Koike T, Mikami T, Ueda K (2002) Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) *Plant system and Evolution* 23: 21-33
- Goudet J (2002) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- 萩原信介 (1977) ブナに見られる葉面積のクラインについて. *種生物学研究* 1: 39-51
- Hiraoka K, Tomaru N (2009) Genetic divergence in nuclear genomes between populations of *Fagus crenata* along the Japan Sea and Pacific sides of Japan. *Journal of Plant Research* 122: 226-228
- Hiura T, Koyama H, Igarashi T (1996) Negative trend between

- seed size and adult leaf size throughout the geographical range of *Fagus crenata*. *Ecoscience* 3: 226-228
- Horikawa Y (1972) Atlas of the Japanese flora, an introduction to plant sociology of East Asia. Gakken, Tokyo
- Hufford KM, Mazer SJ (2003) Plant ecotype: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecological Evolution* 18: 147-155.
- 福嶋司・岩瀬徹 (2005) 図説 日本の植生. 朝倉書店, 東京
- Koike T, Kato S, Shimamoto Y, Kitamura K, Kawano S, Ueda K, Mikami T (1998) Mitochondrial DNA variation follows a geographic pattern in Japanese beech species. *Botanica Acta*. 11: 87-91
- 小池孝良・丸山温 (1998) 個葉からみたブナ背腹性の生理的側面. *植物地理・分類研究* 46: 23-38
- 小山泰弘 (2012) ブナの保全単位の設定に関する保全遺伝学的研究. 名古屋大学大学院生命農学研究科博士論文
- Koyama Y, Takahashi M, Murauchi Y, Fukatsu E, Watanabe A, Tomaru Y (2012) Japanese beech (*Fagus crenata*) plantations established from seedlings of non-native genetic lineages. *Journal of Forest Research* 17: 116-120
- Langella O (2007) Populations 1.2.30: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>
- Maruta E, Kamitani T, Okabe M, Ide Y (1997) Desiccation-tolerance of *Fagus crenata* Blume seeds from localities of different snow fall regime in central Japan. *Journal of Forest Research* 2: 45-50
- Nei M, Maruyama T, Charabarty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153-170
- Okaura T, Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 322-329
- Peakall R, Smouse P (2006) Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic makers. *Evolution* 43: 258-275
- 林野庁 (2011a) 森林・林業統計要覧 2011. 日本森林林業振興会, 東京
- 林野庁 (2011b) 平成 22 年度 森林・林業白書
- Takahashi M, Tsumura Y, Nakamura T, Uchida K, Ohba K (1994) Allozyme variation of *Fagus crenata* in northeastern Japan. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 1071-1074
- Tanaka K, Tsumura Y, Nakamura T (1999) Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. Japonica*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 11-15
- Tomaru N, Takahashi M, Tsumura Y, Uchida K, Ohba K (1997) Genetic diversity in *Fagus crenata* (Japanese beech) influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity* 78: 241-251
- Tomaru N, Takahashi M, Tsumura Y, Takahashi M, Ohba K (1998) Interspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (*Fagaceae*) mitochondrial DNA. *American Journal of Botany* 85: 629-636
- 塚原雅美・松本麻子・金谷整一・西川浩己・吉丸博志 (2011) ブナ苗の成長期における根系切断の影響. 第 122 回日本森林学会大会, Pal-9
- 吉丸博志・山中高史 (2010) 広葉樹林化のための更新予測と誘導技術 (3) 植栽等による人口誘導技術. *GR 現代林業* 12 月号: 42-45