

【原著論文】

固有樹種シコクシラベの核 SSR マーカーに基づく遺伝的変異の評価

岩泉 正和<sup>\*,1</sup>・笹島 芳信<sup>1</sup>・磯田 圭哉<sup>2</sup>・那須 仁弥<sup>3</sup>・大谷 雅人<sup>4,5</sup>

Evaluation of genetic variation in endemic tree species *Abies veitchii* var. *shikokiana*  
based on nuclear SSR markers

Masakazu G. Iwaizumi<sup>\*,1</sup>, Yoshinobu Sasajima<sup>1</sup>, Keiya Isoda<sup>2</sup>, Jin'ya Nasu<sup>3</sup>,  
and Masato Ohtani<sup>4,5</sup>

**要旨:** 核 SSR マーカー 6 座に基づき、四国山地にわずか 3 集団分布する固有変種シコクシラベの遺伝的変異を、本州のシラビソ精英樹群も含めて評価した。遺伝的多様性はシラビソ精英樹群が最も高く、シコクシラベ内では東部の剣山集団が中央部の石鎚山および笹ヶ峰集団よりも高かった。広義のシラビソの西端に分布する後者 2 集団では、遺伝的浮動の進行により遺伝的多様性が低下していると考えられた。 $F_{ST}$  は 0.095 と比較的高い値を示し、集団間の遺伝的分化が進行していると考えられた。主座標分析によると剣山集団が比較的シラビソ精英樹群と近い遺伝的組成を示し、地理的位置が関係している可能性が考えられた。STRUCTURE 解析では本変種の 3 集団は明瞭に異なるクラスターで構成されており、異なる遺伝的背景の下でそれぞれ固有の遺伝的変異を保有していることが考えられた。以上の情報は、今後の本変種の遺伝的管理にかかる基礎的知見として重要である。

**キーワード:** シコクシラベ、固有樹種、遺伝的多様性、遺伝的構造、遺伝的浮動

**Abstract:** Genetic variation of the endemic tree species *Abies veitchii* var. *shikokiana* (*AVS*), which is distributed only around the top of three mountains in Shikoku, was evaluated together with plus trees of *A. veitchii* var. *veitchii* (*AVV*) in Honshu using six nuclear SSR

---

\* E-mail: ganchan@ffpri.affrc.go.jp

<sup>1</sup> 森林総合研究所林木育種センター関西育種場

Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 1043, Uetsukinaka, Shoo, Katsuta, Okayama 709-4335, Japan

<sup>2</sup> 森林総合研究所林木育種センター遺伝資源部

Genetic Resources Department, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1, Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301, Japan

<sup>3</sup> 森林総合研究所林木育種センター東北育種場

Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 95, Osaki, Takizawa, Iwate 020-0621, Japan

<sup>4</sup> 森林総合研究所林木育種センター北海道育種場

Hokkaido Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Bunkiyodai-Midori-machi 561-1, Ebetsu, Hokkaido 069-0836, Japan

<sup>5</sup> 現所属 (Present address): 兵庫県立大学自然・環境科学研究所

Nature and Environmental Sciences Research Center, University of Hyogo, 6, Yayoigaoka, Sanda, Hyogo 669-1546, Japan

2016 年 6 月 6 日受付、2016 年 8 月 8 日受理

markers. Genetic diversity statistics were the highest in *AVV* plus trees, and among the three *AVS* populations, the eastern Mt. Tsurugi population exhibited larger values than the two western populations (Mts. Ishizuchi and Sasagamine). The latter two populations have the westernmost distribution of *A. veitchii*, and their lower genetic diversity is presumably a result of isolation and strong genetic drift. The overall  $F_{ST}$  value (0.095) was relatively high, indicating genetic differentiation among populations. Principal coordinate analysis showed that the Mt. Tsurugi population has a more similar genetic composition to *AVV* plus trees, possibly related to its nearer geographic location to *AVV*. STRUCTURE analysis showed that the three populations of *AVS* belong to different main clusters, indicating that the original genetic variation occurred in different genetic backgrounds. The results obtained from the present study provide fundamental information to the ongoing programs for genetic management of *AVS*.

**Keywords:** *Abies veitchii* var. *shikokiana*, endemic species, genetic diversity, genetic drift, genetic structure

## はじめに

四国山地の亜高山帯は標高 2,000 m 弱と、西南日本では最も標高が高く、最終氷期以降の温暖化にともなう遺存種をはじめとして樹木も含め数多くの固有の植物相を有している (四国森林管理局 2013)。マツ科モミ属の常緑針葉樹であるシコクシラベ (*Abies veitchii* var. *shikokiana*) もその四国固有の分類群の一つであり、中部山岳地域に生育するシラビソ (*A. veitchii* var. *veitchii*) の変種とされている (Nakai 1928)。形態的には、球果がシラビソよりもやや小さく丸みを帯びる等の特徴が知られている (Nakai 1928; 中川 2001)。分布は非常に限られており、四国中央部の石鎚山、笹ヶ峰および東部の剣山のわずか 3 山の山頂周辺のみには生育する (図-1)。近年の地球温暖化の進行により分布適地の縮小が危惧されており、2100 年には本変種は消滅することが予測されている (Ogawa-Onishi et al. 2010)。本変種は、愛媛県では準絶滅危惧種、徳島県および高知県では絶滅危惧種Ⅱ類に指定されている (愛媛県 2014; 徳島県 2001; 高知県 2010)。このことから、本変種の遺伝的背景に配慮した生息域内外での保全方法の検討が必要である。

本変種は日本の *Abies veitchii* (シラビソおよびシコク

シラベを含む分類群; 以下、「シラビソ類」という) の地理的分布域の中では西南端に位置し、本州のシラビソとはもちろんのこと、現存する 3 集団間での地理的な集団隔離も著しい。一般に、分布の端に位置する集団は遺伝的隔離が進行し、遺伝的浮動の影響をより強く受けることから (Hamrick et al. 1992)、集団間の遺伝的分化は少なからず進行していると予想される。その集団隔離にともなうボトルネック効果等の遺伝的影響や集団間での程度の違いが、現在の各集団の遺伝的変異の状況に大きく影響を与えていると考えられる。そのため、現存する各集団の遺伝的変異を、中部山岳地域で分布域も広いシラビソとも比較しながら把握することが必要である。

これまで国内のシラビソ類の集団遺伝学的評価は、磯田 (2000) により、石鎚山のシコクシラベ集団も含めて、GapC 遺伝子イントロンマーカーおよび RAPD マーカーに基づき行われており、その結果、シコクシラベはシラビソと比べて集団内の遺伝的多様性が低いことが指摘されている。しかしながら、本変種内 3 集団を網羅した詳細な遺伝的変異は未だ明らかではないとともに、より高解像度な DNA マーカーに基づく遺伝的評価を行うことが詳細な遺伝的変異を理解するために有効である。それにより、現存する 3 集団間の遺伝的関係やシラビソとの関係等を明らかにし、その歴史的背景や遺伝的履歴について考慮することが、今後の本変種の遺伝的管理のための基礎的知見として不可欠と考えられる。

そこで本研究では、多型性が高く近年のあらゆる主要樹種を対象とした集団遺伝学的研究に広く適用されている核 SSR (simple sequence repeat) マーカーに基づき、シコクシラベ 3 集団に本州のシラビソの一部を含めてその遺伝的変異を評価した。各集団の遺伝的多様性を評価するとともに、集団間の遺伝的構造について明らかにした。得られた結果を基に、シラビソ類における本変種の遺伝的位置づけや集団間の遺伝的関係性、各集団の遺伝的背景等について考察した。

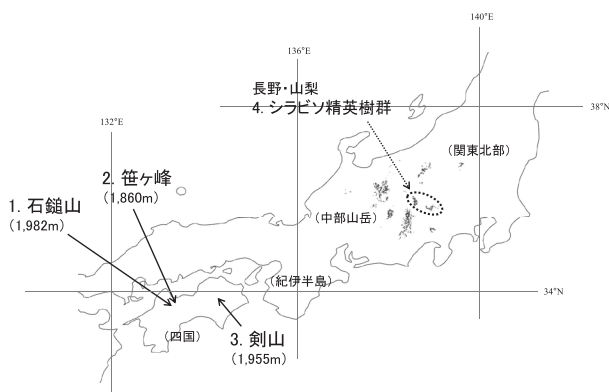


図-1 環境省第5回植生調査データに基づくシラビソ類の天然分布と分析対象とした集団の位置。

## 方 法

### 調査地とサンプリング

石鎚山集団はシラベ類で最も西端に位置し、石鎚山頂 (1,982 m) 周辺から西部の二ノ森 (1,929 m) に至る約 5 km の稜線上に生育しており、シコクシラベ 3 集団の中では最も生育規模が大きい。笹ヶ峰集団は石鎚山から北東へ約 30 km 離れた笹ヶ峰 (1,860 m) の山頂付近に位置し、山頂の標高が最も低く、集団の生育範囲は約 500 m と最も小さい。剣山集団はシコクシラベの中では唯一四国東部に位置し、剣山 (1,955 m) の山頂周辺の約 2 km の範囲に生育し、前者 2 集団の中間の生育規模である。

シコクシラベの生育する 3 集団のそれぞれにおいて、分布範囲を網羅する形でランダムに 181 個体 (石鎚山)、72 個体 (笹ヶ峰)、100 個体 (剣山) を選定し、DNA 分析試料として針葉を採取した。一方、対照としてシラビソの遺伝的変異と比較するため、林木育種事業において長野・山梨県内の天然林・人工林で選抜されたシラビソの精英樹 (集団の中で成長・幹の形状等が優れた個体) を供試した。林木育種センター長野増殖保存園 (長野県御代田町) 内に保存されている精英樹 25 系統のそれぞれから針葉を採取した。合計 378 の針葉サンプルは、DNA 抽出までの間  $-30^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### DNA 分析

各サンプルから全 DNA を改変 CTAB 法 (白石・渡辺 1995) により抽出した。シラビソ類では核 SSR マーカーが開発されておらず、そのため予備実験として、各集団から数サンプルずつを対象として、他モミ属 3 樹種で開発された核 SSR マーカーの適用試験を行った。モミ (*A. firma*) から 11 マーカー (Saito et al. 2005 ; Ohtani et al. unpublished)、トドマツ (*A. sachalinensis*) から 6 マーカー (Lian et al. 2007) およびヨーロッパに分布するノルドマンモミ (*A. nordmanniana*) から 4 マーカー (Hansen et al. 2005) を供試し、PCR 増幅の可否や変異の有無・多型性、ヌル対立遺伝子の有無等に基づき、シラビソ類への適用性を評価した。その中から適用可能と判断されたマーカーを用いて、QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen 社製) を使用して PCR 反応を行い、複数遺伝子座を一度に増幅した。PCR 産物は ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) を用いてピークを検出し、GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems 社製) を用いて遺伝子型の決定を行った。

### データ解析

#### 遺伝的多様性

得られた遺伝子型データを基に、各集団内の遺伝的多様性を評価するため、遺伝子座毎の対立遺伝子数 ( $n_a$ )、遺伝子多様度 ( $H_S$ ) および近交係数 ( $F_{IS}$ ) について GenAlEx version 6.5 (Peakall and Smouse 2012) を用いて算出した。また、アレリックリッチネス ( $AR$ : El Mousadik and Petit 1996) について、FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 2002) を用いて算出した。 $AR$  は最小サンプル数である 25 (50 遺伝子コピー数: El Mousadik and Petit 1996) に基づいて算出した。 $H_S$  と  $AR$  については、総当たり集団間での有意差を Wilcoxon 符号順位検定により解析した。 $F_{IS}$  については、ゼロからの有意な偏りを FSTAT を用いて検定した。

#### 遺伝的分化度および遺伝的構造

集団間の遺伝的分化度を評価するため、全遺伝子座における全集団間および総当たり集団間での Weir and Cockerham (1984) に基づく固定指数 ( $F_{ST}$ ) について、GenAlEx を用いて算出した。 $F_{ST}$  のゼロからの有意な偏りについて、FSTAT を用いて検定した。また、Nei (1973) に基づく遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) について、GenAlEx を用いて算出した。一方で、以上の分化度の統計量はマーカーの多型性の大小等に依存する (Hedrick 2005)。そのため、標準化された遺伝子分化係数として  $G'_{ST}$  (Hedrick 2005) について、GenAlEx を用いて算出した。また、3 集団とシラビソ精英樹群間の相対的な遺伝的関係を評価するため、集団ベースおよび個体ベースで総当たりの遺伝距離 (Nei 1973) を算出し、主座標分析 (Gower 1966) を GenAlEx を用いて行った。

3 集団とシラビソ精英樹群間の遺伝的構造を評価するため、STRUCTURE version 2.3.1 (Pritchard et al. 2000) を用いてベイズ推定に基づく各分析個体の遺伝的クラスターリングを行った。admixture ancestral model ( $F$ -model: Falush et al. 2003) および LOCPRIOR model (Hubisz et al. 2009) 下において、30,000 回の burn-in および 30,000 回の iteration によりパラメータ推定を行い、遺伝的クラスターの数 ( $K$ ) を 1 から 6 とし、それぞれの  $K$  につき 15 回の試行を行った。対数尤度 ( $\ln P(X|K)$ ) の平均およびその差分から  $\Delta K$  (Evanno et al. 2005) を算出し、最適な  $K$  の目安とした。各  $K$  において、それぞれのクラスターに割り振られる確率 ( $q$  値) を個体毎に推定した。15 回の試行間で  $q$  値のばらつきが小さいことを確認したのち、対数尤度の最も高い 1 試行での結果を選択し、DISTRUCT version 1.1 (Rosenberg 2004) を用いてバーブ

ロットを作成した。

## 結 果

### 他モミ属樹種の SSR マーカーの試用

他モミ属 3 樹種から計 21 の SSR マーカーを試用した結果、ほぼ全てのマーカーで PCR 増幅が可能であった一方で、変異が少ないマーカーが多く、ヌル対立遺伝子の存在が疑われたマーカーも多く見られた。結果として、モミの 1 マーカー bcaf0684 (塩基配列 F: ATGTCTAGAAGGTGGGGTGCT, R: TGAGTTTTCCTTGTGGATTGA)、トドマツの 3 マーカー As09、As13、As16 およびノルドマンモミの 2 マーカー NFF03、NFH03 が適用可能と判断され、計 6 マーカーを本分析に使用することとした。樹種別には、適用したマーカーの割合はトドマツ (6 座中 3 座) やノルドマンモミ (4 座中 2 座) で高く、モミではその割合が低かった (11 座中 1 座)。

### 遺伝的多様性

上記の選出した SSR マーカーに基づき遺伝子型を決定した結果、4 集団 (グループ) の計 378 サンプル全体では、 $n_a$  は 6 遺伝子座の平均で 14.0、 $H_s$  は平均 0.816、 $AR$  は平均 11.8、 $F_{IS}$  は平均 0.059 であった。遺伝的多様性を比較したところ、 $H_s$ 、 $AR$  とともにシラビソ精英樹群が最も高かった (表-1)。シコクシラベの中では剣山が最も高く、 $AR$  についてはシラビソ精英樹群と有意な差は認められなかった。対して、石鎚山および笹ヶ峰はともに遺伝的多様性が低く、前者 2 集団 (グループ) との値の差はいずれの統計量についても有意であった ( $P < 0.05$ )。一方、 $F_{IS}$  はシラビソ精英樹群が最も高く、石

鎚山および笹ヶ峰とともに有意な正の値を示した ( $P < 0.01$ )。剣山では有意なゼロからの偏りは見られなかった。

### 遺伝的分化度および遺伝的構造

全遺伝子座における全集団間の遺伝的分化度を算出したところ、 $F_{ST}$  は 0.097、 $G_{ST}$  は 0.078 であり、いずれも有意な正の値を示した ( $P < 0.01$ )。標準化された遺伝的分化度  $G_{ST}$  は 0.539 であり ( $P < 0.01$ )、 $G_{ST}$  の約 7 倍の値を示した。また、シコクシラベの 3 集団間のみで算出した上記分化度は、 $F_{ST} = 0.095$ 、 $G_{ST} = 0.069$ 、 $G'_{ST} = 0.446$  であった。総当たり集団間の  $F_{ST}$  および  $G_{ST}$  は、すべての集団ペア間で有意な正の値を示した ( $P < 0.01$ ; 表-2)。集団ペア間で  $F_{ST}$  を比較したところ、石鎚山、笹ヶ峰およびシラビソ精英樹群の 3 集団 (グループ) 間での値が比較的高かった一方で、剣山と他の 3 者間での値は比較的低かった。また、集団ベースで主座標分析を行った結果、第 1 および第 2 主座標の合計で 83.7% の寄与率が得られた。これら 2 座標により遺伝的關係を図示したところ (図-2a)、剣山が最も原点に近い座標に位置し、シラビソ精英樹群とは比較的近い位置関係にあった。対照的に、石鎚山および笹ヶ峰はそれぞれシラビソ

表-2 4 集団 (グループ) 間の総当たり遺伝的分化度

| 集団          | 石鎚山   | 笹ヶ峰   | 剣山    | シラビソ<br>精英樹群 |
|-------------|-------|-------|-------|--------------|
| 1. 石鎚山      | —     | 0.129 | 0.067 | 0.127        |
| 2. 笹ヶ峰      | 0.504 | —     | 0.102 | 0.121        |
| 3. 剣山       | 0.307 | 0.483 | —     | 0.075        |
| 4. シラビソ精英樹群 | 0.692 | 0.683 | 0.564 | —            |

上段:  $F_{ST}$ 、下段:  $G'_{ST}$ 。  
すべての集団間でゼロからの有意な差が認められた ( $P < 0.01$ )。

表-1 各集団 (グループ) の遺伝的多様性の統計量

| 集団          | $N$ | $n_a$           | $H_s$                     | $AR$                     | $F_{IS}$                   |
|-------------|-----|-----------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1. 石鎚山      | 181 | 13.83<br>(2.50) | 0.763 a<br>(0.069)        | 8.33 a<br>(1.72)         | <b>0.024</b> *<br>(0.015)  |
| 2. 笹ヶ峰      | 72  | 10.33<br>(2.49) | 0.759 a<br>(0.041)        | 7.76 a<br>(1.90)         | <b>0.042</b> *<br>(0.022)  |
| 3. 剣山       | 100 | 16.83<br>(2.24) | <b>0.839</b> b<br>(0.036) | <b>10.96</b> b<br>(1.76) | 0.013 ns<br>(0.034)        |
| 4. シラビソ精英樹群 | 25  | 15.00<br>(1.74) | <b>0.909</b> c<br>(0.016) | <b>13.82</b> b<br>(1.59) | <b>0.149</b> **<br>(0.089) |

$N$ : 分析個体数、 $n_a$ : 対立遺伝子数、 $H_s$ : 遺伝子多様度、 $AR$ : アレリックリッチネス、 $F_{IS}$ : 近交係数。値は 6 遺伝子座の平均と括弧内に標準誤差を示す。異なるアルファベットは集団間の有意な差があったことを示す (Wilcoxon 符号順位検定:  $P < 0.05$ )。\*\*, \* はゼロからの有意な差があったことを示す (それぞれ  $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )。



精英樹群から離れた方向に位置し、両者間の位置も離れていた。個体ベースでの主座標分析 (図-2b) においてもほぼ同様の傾向が見られ、剣山がシラビソ精英樹群と個体の重なりが多かった一方で、石鎚山および笹ヶ峰はそれぞれ別々にシラビソ精英樹群から離れた方向に位置していた。

STRUCTURE 解析において尤度 ( $\ln P(X|K)$ ) を推定した結果、 $K$  が 3、4 のときに試行間のばらつきが少なく、 $\Delta K$  も  $K$  が 3、4 のときに高かったことから (図-3)、これらの条件下での集団間の遺伝的構造を評価する

こととした。個体毎のクラスター割合を基にバープロットを作成したところ、特に  $K=4$  のとき、明瞭に 4 集団 (グループ) でそれぞれ異なるクラスターが優占した (図-4)。 $K=3$  のとき、剣山とシラビソ精英樹群で同一のクラスターが優占し、石鎚山および笹ヶ峰ではそれぞれ別のクラスターが優占した。このとき、共通祖先集団からの  $F$  値は、石鎚山および笹ヶ峰で優占するクラスター (3-1、3-2、4-1、4-2) が、剣山およびシラビソ精英樹群で優占するクラスター (3-3、4-3、4-4) に比べて非常に高い値を示した。

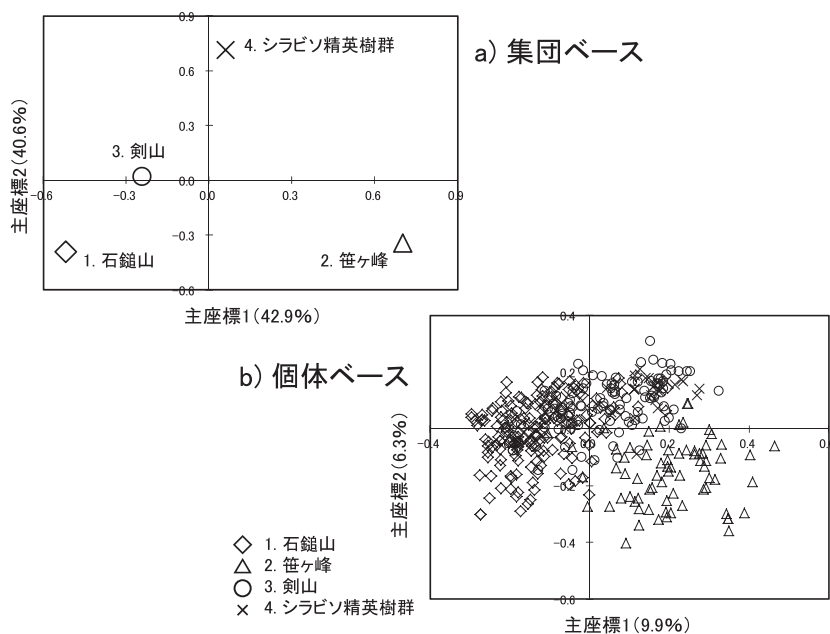


図-2 a) 集団ベースおよび b) 個体ベースの主座標分析に基づくシコクシラベ3集団とシラビソ精英樹群の遺伝的関係。

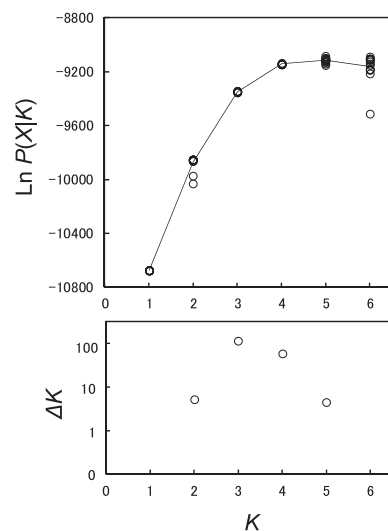


図-3 STRUCTURE 解析におけるクラスター数 ( $K$ ) と尤度 ( $\ln P(X|K)$ ) およびその変化率 ( $\Delta K$ ) の関係。

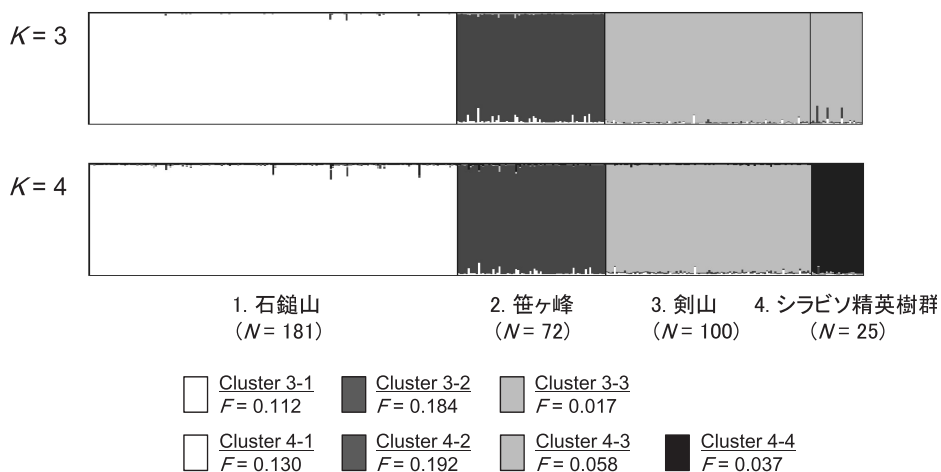


図-4 STRUCTURE 解析における  $K=3$  および  $4$  のときの個体毎のクラスター割合 ( $q$ )。各クラスターにおける値は共通祖先集団からの  $F$  値を示す。

## 考 察

今回、シラビソの精英樹群も含めてシコクシラベの遺伝的変異を評価するにあたり、他モミ属3樹種のSSRマーカーを利用することが可能であった。適用可能なマーカーの割合には樹種間で差が見られたが、四国にも生育するモミよりも地理的に離れている北海道のトドマツのほうが分子系統学的にはシラビソと近縁であることが指摘されている等 (Tsumura and Suyama 1998 ; Suyama et al. 2000)、種間関係の違い等が反映された可能性が考えられる。

### 遺伝的多様性

今回分析を行った4集団(グループ)間では、遺伝的多様性のレベルに明瞭な違いが観察された(図-2)。実際の天然集団ではないものの、シラビソ精英樹群の遺伝的多様性は最も高かったことから、シラビソが中部山岳地域での広範な分布と大きな集団サイズを維持してきたことを反映している。このシラビソ精英樹群は近交係数も高く、遺伝的構造をもつ系統群をグループ化していることによるワーランド効果(Wahlund effect)が反映されたものと考えられる。対して、石鎚山集団を解析した磯田(2000)の結果と同様に、シコクシラベの四国中央部の2集団(石鎚山および笹ヶ峰)の遺伝的多様性は有意に低かった。一般に、分布の端に位置する集団は遺伝的隔離が進行し、遺伝的浮動の影響をより強く受けるために遺伝的多様性は低い傾向にある(Hamrick et al. 1992)。集団サイズの大小(石鎚山-笹ヶ峰)に関わらずこれら2集団の遺伝的多様性は同様に低かったことから、シラビソ類の西端に位置する地理的位置がより遺伝的多様性に影響していることが考えられる。一方、ここで特筆すべきことの一つには、シコクシラベ内でも上記2集団とは対照的に、四国の東側に位置する剣山集団ではシラビソに近く高い遺伝的多様性を保有していた。このことから剣山集団では、遺伝的隔離や集団縮小等に伴う遺伝的浮動の影響が、他の2集団よりも緩やかである可能性が示唆される。今回、本変種の分布域を網羅した集団解析を行ったことにより、いずれも山頂付近のみに3集団しか現存しない固有樹種でも、集団間で遺伝的多様性の状況が異なっており、分布の変遷や集団サイズの増減といった集団の歴史性の違い等を反映している可能性が考えられた。

### 遺伝的分化度および遺伝的構造

これまでに報告されている、他の主要針葉樹種にお

ける核SSRマーカーに基づく遺伝的分化度は、スギ(*Cryptomeria japonica*)で $F_{ST}=0.028$ および $G_{ST}=0.125$ (Takahashi et al. 2005)、ヒノキ(*Chamaecyparis obtusa*)で $G_{ST}=0.040$ および $G_{ST}=0.188$ (Matsumoto et al. 2010)、アカマツ(*Pinus densiflora*)では $F_{ST}=0.013$ および $G_{ST}=0.122$ (Iwaizumi et al. 2013)であり、今回算出された本変種の遺伝的分化の程度(シコクシラベ3集団間での値: $F_{ST}=0.095$ ,  $G_{ST}=0.069$ ,  $G_{ST}=0.446$ )は非常に高いことがわかる。磯田(2000)で報告されている、石鎚山集団を含めたシラビソ類での遺伝的分化度は $G_{ST}=0.053$ 、石鎚山を除いたシラビソのみでの分化度は $G_{ST}=0.037$ であり、DNAマーカーの種別が異なるので単純に比較はできないものの、今回のシコクシラベでの値はそれよりも高い。他の希少針葉樹種における核SSRマーカーに基づく分化度と比較すると、ヤツガタケトウヒ(*Picea koyamae*)で $G_{ST}=0.410$ (Katsuki et al. 2011)、トガサワラ(*Pseudotsuga japonica*)では $G_{ST}=0.085$ (玉城ら2010)等となっており、これらとほぼ同程度の遺伝的分化が進行していると考えられた。

集団ペア毎の $F_{ST}$ (表-2)および主座標分析の結果(図-3)からは、剣山集団が比較的シラビソに近い遺伝的組成を有しているのに対し、石鎚山および笹ヶ峰集団はシラビソとの遺伝的異質性が高いことが伺える。またこの四国中央部の2集団は地理的には最も近い(約30km)にもかかわらず、両者間の $F_{ST}$ は総当たり集団(グループ)間で最も高く、主座標分析から見ると両者は第1主座標において両端に位置することから、地理的隔離の進行と強い遺伝的浮動の影響で、それぞれ別々の方向に遺伝的変異が偏っていることが考えられる。

STRUCTURE解析の結果では、 $K=3, 4$ において、本変種の3集団は明瞭にそれぞれ異なるクラスターで構成されており(図-4)、各集団が異なる遺伝的背景の下で固有の遺伝的変異を保有していることが考えられた。その中で、3集団間での遺伝的状況の違いも観察された。 $K=3$ のとき、剣山集団とシラベ精英樹群で同じクラスターが優占していることから、先述のように、地理的に本州のシラビソに比較的近い剣山集団が、シコクシラベの中では最もシラビソに近縁である可能性が示唆される。一方で、石鎚山および笹ヶ峰集団において優占するクラスターではいずれも $F$ 値が高く、これらの系統が集団分岐後に強度の遺伝的浮動を受けたことが予想される。この違いの一因として、最終氷期以降の温暖化等に伴う他集団との遺伝的隔離が、分布の西端である石鎚山および笹ヶ峰集団でより古い年代で起こった可能性が考えられる。今回の結果のみでは正確な集団分

岐年代等の推定は難しいが、幾つかの地域樹種における同様の研究でも、分布の端の集団では遺伝的偏りが大きく固定も進んでおり（トウヒ：Aizawa et al. 2009；ヤツガタケトウヒ：Katsuki et al. 2011；エゾマツ：Iwaizumi et al. 2015；アカエゾマツ：Aizawa et al. 2015）、集団隔離からの経過時間が長く孤立化が進行している可能性が考察されている。

## まとめ

これまでシラビソ類の集団遺伝学的解析では、変種間の違いについては評価されていたが（磯田 2000）、今回、シコクシラベの現存3集団を網羅した調査・解析を行い、詳細な本変種の遺伝的変異の状況が新たに明らかになった。これらの情報は、今後の本変種の遺伝的管理にかかる基礎的知見として重要であると考えられる。例えば、本変種の3集団はそれぞれ明瞭に異なる遺伝的変異を有しており、シラビソとも異なることが明らかになったことから、種内の多様性の保持のためには、それぞれの集団毎の多様性の保存管理が重要であると考えられる。

今後は、保全単位としてのシコクシラベの分類学的位置づけを再検討するため、本州中部や紀伊半島等のシラビソ集団も網羅した遺伝的変異の解析が必要と考えられる。また、集団内の空間配置やサイズ構造と遺伝的構造の関係や、次世代（種子や実生）の遺伝的多様性といった、集団内の遺伝的変異の状況を評価し、個々の集団レベルでの遺伝的保全の手法の検討に資するような知見を得ることが重要と考えられる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、森林総合研究所林木育種センターの生方正俊氏には原稿に対して貴重なコメントを頂いた。同センター関西育種場の河合慶恵氏には、GISソフトを用いてシラベ類の天然分布図を作成して頂いた。その他、同場の久保田正裕氏、三浦真弘氏をはじめ場職員の方々には現地調査やサンプリング等、研究全般にわたり終始協力を頂いた。また、同場の橋本玲恵氏、下山真由美氏および畝本ユカリ氏には針葉サンプルのDNA抽出および実験に際し補助を頂いた。なお、調査に際しては四国森林管理局および愛媛・徳島の各森林管理署の協力の下進められた。これらの方々

に厚く御礼申し上げる。

## 引用文献

- Aizawa M, Yoshimaru H, Saito H, Katsuki T, Kawahara T, Kitamura K, Shi F, Sabirov R, Kaji M (2009) Range-wide genetic structure in a north-east Asian spruce (*Picea jezoensis*) determined using nuclear microsatellite markers. *Journal of Biogeography* 36: 996–1007
- Aizawa M, Yoshimaru H, Takahashi M, Kawahara T, Sugita H, Saito H, Sabirov RN (2015) Genetic structure of Sakhalin spruce (*Picea glehnii*) in northern Japan and adjacent regions revealed by nuclear microsatellites and mitochondrial gene sequences. *Journal of Plant Research* 128: 91–102
- 愛媛県 (2014) 愛媛県レッドデータブック 2014 — 愛媛県の絶滅のおそれのある野生生物 — . <http://www.pref.ehime.jp/reddatabook2014/top.html> (2016 年 4 月 21 日アクセス)
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832–839
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587
- Goudet J (2002) FSTAT version 2.9.3, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices [computer program]. Available from: <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>. (2016 年 4 月 4 日アクセス)
- Gower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325–328
- Hamrick J, Godt M, Sherman-Broyles S (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95–124
- Hansen OK, Vendramin GG, Sebastiani F, Edwards KJ (2005) Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species

- amplification in the *Abies* genus. *Molecular Ecology Notes* 5: 784–787
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59: 1633–1638
- Hubisz M, Falush D, Stephens M, Pritchard J (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332
- 磯田圭哉 (2000) モミ属植物の分子系統学および集団遺伝学的研究. 九州大学学位論文
- Iwaizumi MG, Tsuda Y, Ohtani M, Tsumura Y, Takahashi M (2013) Recent distribution changes affect geographic clines in genetic diversity and structure of *Pinus densiflora* natural populations in Japan. *Forest Ecology and Management* 304: 407–416
- Katsuki T, Shimada K, Yoshimaru H (2011) Process to extinction and genetic structure of a threatened Japanese conifer species, *Picea koyamae*. *Journal of Forest Research* 16: 292–301
- 高知県 (2010) ～高知県の絶滅のおそれのある野生植物～ 高知県レッドリスト (植物編) 2010 年改訂版. <http://www.pref.kochi.lg.jp/soshiki/030701/redlist-syokubutu.html> (2016 年 4 月 21 日アクセス)
- Lian CL, Goto S, Hogetsu T (2007) Microsatellite markers for Sachalin fir (*Abies sachalinensis* Masters). *Molecular Ecology Notes* 7: 896–898
- Matsumoto A, Uchida K, Taguchi Y, Tani N, Tsumura Y (2010) Genetic diversity and structure of natural fragmented *Chamaecyparis obtusa* populations as revealed by microsatellite markers. *Journal of Plant Research* 123: 689–699
- 中川重年 (2001) マツ科. 高橋秀男・勝山輝男監修, 樹に咲く花 —合弁花・単子葉・裸子植物—, 554–611. 山と溪谷社, 東京
- Nakai T (1928) Notulae ad Plantas Japoniae and Koreae. *Botanical Magazine* 42: 451–479
- Nei M, (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321–3323
- Ogawa-Onishi Y, Berry PM, Tanaka N (2010) Assessing the potential impacts of climate change and their conservation implications in Japan: A case study of conifers. *Biological Conservation* 143: 1728–1736
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138
- Saito Y, Lian CL, Hogetsu T, Ide Y (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* and interspecific amplification in other Japanese *Abies* species. *Molecular Ecology Notes* 5: 234–235
- 四国森林管理局 (2013) 四国の保護林 —生命あふれる森—. 伸光堂, 高知
- 白石進・渡辺敦史 (1995) *rbcL* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. *日本林学会誌* 77: 429–436
- Suyama Y, Yoshimaru H, Tsumura Y (2000) Molecular phylogenetic position of Japanese *Abies* (Pinaceae) based on chloroplast DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 271–277
- 徳島県 (2001) 徳島県の絶滅のおそれのある野生生物 —徳島県版レッドデータブック—. 星印刷, 徳島
- Takahashi T, Tani N, Taira H, Tsumura Y (2005) Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *Journal of Plant Research* 118: 83–90
- 玉城聡・磯田圭哉・高橋誠・矢野慶介・山田浩雄・中森由美子・西村尚之 (2010) SSR マーカーによる希少樹種トガサワラの地理的な遺伝変異の推定. *日本森林学会大会講演集* 121: D09
- Tsumura Y, Suyama Y (2000) Differentiation of mitochondrial DNA polymorphisms in populations of five Japanese *Abies*. *Evolution* 52: 1031–1042
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370