

【第3回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

生育地の分断化が森林植物の繁殖様式および遺伝的多様性に 及ぼす影響に関する研究

菊地 賢^{*,1}

はじめに

野生生物種の存続を脅かす主な原因のひとつに、人間活動による生育地の分断化が挙げられる。生育地の分断化は、生育地を直接破壊するだけにとどまらず、残された生育地断片でも、集団の偶発的絶滅、周縁効果による物理的環境の改変や、生物間相互作用の変化など、さまざまな要因によって集団の存続に悪影響を及ぼす恐れがある。

生育地の分断化が種や集団の存続にもたらす遺伝的リスクについても、1980年代頃から注目されるようになってきた (Ellstrand and Elam 1993)。生物集団の遺伝的多様性が減少すると、短期的には遺伝的負荷による繁殖成功の低下、長期的には環境変動に対する適応能力の低下などを招き、集団の存続可能性に負の影響をもたらすと考えられている。

集団の遺伝的多様性の維持に重要な役割を果たしているのが、遺伝子流動である。固着性の植物の場合、おもし送粉や種子散布がその役割を担っている。遺伝子流動を介した個体・集団間の遺伝的な連結性が遮断されたとき、遺伝的隔離が生じて集団の存続可能性に遺伝的リスクが発生する。そのため保全遺伝学においても、分断化に伴う遺伝子流動の変化を直接捉えようというのがひとつの潮流となった (Sork et al. 1999)。その強力なツールとして急速に普及したのがマイクロサテライトであった。

私が卒論研究を始めた20世紀末はまさに、生態学でもマイクロサテライトを利用した遺伝子流動研究が台頭し始めていた頃であった。私も、観察では捉えきれない花粉・種子の移動や遺伝的多様性を詳らかにできるこの新しい技術に魅力を感じ、遺伝解析研究に身を投じた。

本稿で紹介するのは、私が森林総合研究所に就職し

てから携わった2つの研究である。ともに保全遺伝学の立場から、生育地の分断化が植物の遺伝子流動に与える影響を解明しようとするものであった。1つは、LTER サイト (Long-term ecological research site) である北茨城の小川試験地周辺で、冷温帯の主要樹種のひとつイタヤカエデを対象に、その交配様式と、森林の分断化が送粉過程に及ぼす影響を扱った (Kikuchi et al. 2009 ; Kikuchi et al. 2015)。もう1つはエビソヤナギという河畔性の絶滅危惧種を対象とした。こちらは、景観レベルの分断化が遺伝的連結性に及ぼす影響に焦点を当てることにした (Kikuchi et al. 2011)。

森林の分断化がイタヤカエデの 交配様式に及ぼす影響

有性繁殖を行う植物にとって、送粉は種子繁殖に必須の過程であり、同時に遺伝子流動を担う重要な要素でもある。顕花植物の多くは、昆虫や鳥などの動物が花粉を媒介する動物媒の送粉様式をもち、効果的に受粉をおこなっている。生育地の分断化によって有効な送粉が阻害されたとき、種子繁殖の低下や自殖の増加、後継世代の遺伝的多様性の減少といった影響が生じ、長期的には集団の存続可能性の低下が懸念される。

「生育地の分断化が植物の送粉過程にどのような影響を及ぼすか？」という問題は、長年盛んに研究がなされてきたテーマである。その結果、送粉者共生系は生育地の分断化に対して脆弱で、分断化は多くの場合、送粉や種子生産に負の影響を及ぼすことが明らかになってきた。しかし、分断化が逆に送粉を促進する例も多く報告されており (例えば、White et al. 2002)、分断化が送粉系におよぼす影響は決して一様ではない。この影

* E-mail: kikurato@affrc.go.jp

¹ きくちさとし 森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域

響の違いをもたらす要因については未だ説明がなされていないが、植物の繁殖様式との関連も指摘されている (Aguilar et al. 2006)。

イタヤカエデ (*Acer mono Maxim.*) は、日本の冷温帯落葉樹林の代表的樹種のひとつである。その花は虫媒花だが、その開花様式は一風変わっている。基本的に、単性花が集散花序につく。このとき、繁殖個体は雄花しかつけない雄個体と、雄花と雌花の両方をつける両性個体とに分かれ、両性個体はさらに、まず雌花が開花する雌性先熟個体と、雄花が先に咲く雄性先熟個体とに分かれる。このように雄性先熟個体と雌性先熟個体とが共存する性表現は、雌雄異熟異型 (heterodichogamy) と呼ばれる。被子植物のうち 11 科でしか報告されていない珍しい開花様式である (Renner 2001) が、そこにはクルミ科やカエデ科のような冷温帯の代表的樹種が含まれる。

雌雄異熟異型は、異系交配を促進して自殖を回避する機構であると考えられている。このような交配相手を限定する繁殖様式は、生育地の分断化の影響をより受けやすいかもしれない (異型花柱性や雌雄異株を想像するとわかりやすい)。しかし雌雄異熟異型性植物の交配様式は、オニグルミで詳細な研究がなされてきた (例えば、Bai et al. 2007) くらいで、よく理解されていない。

そこでここでは、雌雄異熟異型性を示すイタヤカエデを材料に、遺伝解析によってその繁殖様式を解明するとともに、森林の分断化が送粉過程におよぼす影響について検証した。

まずは、マイクロサテライトの開発である。詳細は割愛するが、当時はまだ Magnetic beads を使った濃縮法が主流であった。13 座の多型マーカー開発に成功し (Kikuchi and Shibata 2008)、のちの研究では、このうちの 6 座と、既にカエデ属の別種で開発されていたマーカーのなかから 2 座、計 8 座のマイクロサテライトを用いた。

次に、繁殖様式の解明に着手した。北茨城市・小川学術参考林内の 6 ha プロットで開花個体の開花フェノロジー調査を行うとともに、6 ha プロットとその周縁、合計 12 ha から成木 78 個体の葉のサンプリングを行い、うち 4 個体を母樹として、1000 個あまりの種子を採取して遺伝解析を行った。

イタヤカエデの開花には、雄性先熟個体と雌性先熟個体との間で相補的な同調性がみられた (図-1)。とはいえ、雌性先熟個体でも雄性先熟個体でも雄期と雌期の分離は明瞭ではなく、また雌性先熟個体の一部では、雌期から雄期の移行期に、個体内に雌花と雄花が共存する両性期がみられた。自殖率は 9.8% と低く、プロット内で花

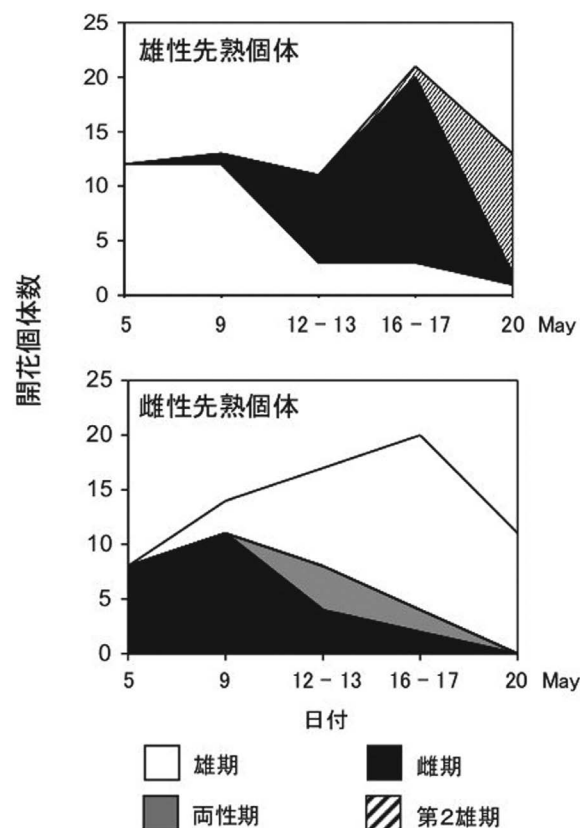


図-1 イタヤカエデの開花フェノロジー。小川学術参考林 6 ha プロット内の開花個体について、雄性先熟個体・雌性先熟個体の別に、観察日 (2003 年) ごとに、各開花ステージ (雄期・雌期・両性期・第 2 雄期) にある個体数を示した。Kikuchi et al. (2009) を改変。

粉親が特定できた種子の 72.0% が異系交配に由来していた (図-2)。この実際の異系交配率は、開花フェノロジーに基づいて算出した異系交配の潜在可能性 69% にほぼ一致した。このように、イタヤカエデの雌雄異熟異型は、開花タイプ間の開花フェノロジーを相補的に同調させることによって、自家不和合性のような強制的機構を要せずに、他殖を促進する機構であると考えられた。

この結果を土台として、いよいよ分断化がイタヤカエデの送粉過程に及ぼす影響の検証にとりかかった。

小川学術参考林の北東側に広がる国有林は、その多くが 1980 ~ 90 年代に植林されたスギ・ヒノキの人工林となっており、尾根や沢筋を中心に、天然性の広葉樹林が帯状に残されている。ここではこれらを「保残帯」として、学術参考林を対照区としてイタヤカエデの交配パターンを比較した。あらたに保残帯約 29 ha の成木個体の葉をサンプリングし、母樹も全部で 17 個体に増

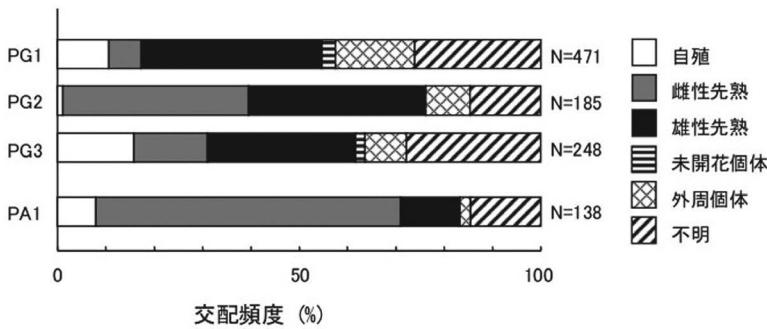


図-2 小川学術参考林 6 ha プロット内のイタヤカエデの開花 4 個体から採取した種子について、花粉親の内訳を示す。Kikuchi et al. (2009) を改変。

やした。

まず、交配距離の変化を見てみよう。保残帯では個体密度の変化が大きく、孤立木もあれば、局所的に密集している箇所もある。そこで保残帯については、低密度区と高密度区とを区別した。すると、高密度区では自殖が 4.0% に過ぎず、30 m 圏内からの送粉が 53.3% を占めた。いっぽう低密度区（孤立木）では自殖率は高い（19.4%）ものの、他殖種子の送粉距離は長く、60～90 m および 120～150 m が最も頻繁（4.7%）であった。

では、交配パターンの変化によって、種子の遺伝的組成はどのように変化しただろうか。Ritland の繁殖パラメータ (Ritland 1989) は、古典的であるが繁殖の質的側面を知ることができる有用なパラメータである。そこで MLTR ソフトウェアを用いて、母樹ごとに t_m 、 t_s および r_{pm} の 3 種のパラメータを算出した。ここで t_m は他殖率を示し、自殖率 s は $s = 1 - t_m$ として求めることができる。また、 $t_m - t_s$ は二親性近親交配率を示している。 r_{pm} （父性相関）は種子親を同じくする任意の 2 種子が同じ花粉親由来である可能性を示す。逆数 $1/r_{pm}$ は有効な花粉親数を示し、種子の遺伝的多様性を示す指標に用いられる。

母樹周辺の個体密度とこれらの繁殖パラメータとの関係を示したものが、図-3 である。いずれの繁殖パラメータも個体密度と相関関係にあり、周辺個体密度の減少とともに自殖率が増加する一方、二親性近親交配は減少し、種子の遺伝的多様性は増加する傾向が得られた。

本研究の内容からは外れるが、結実率の変化にも触れておこう。同じ調査地で行われた先行研究では、最近隣個体までの距離と未熟種子・シイナ率の間には正の相関が見られ、分断化に伴う個体の孤立化が有効な送粉を阻害して結実率を減少させることが明らかとなった。

これらの結果から、森林の分断化がイタヤカエデの

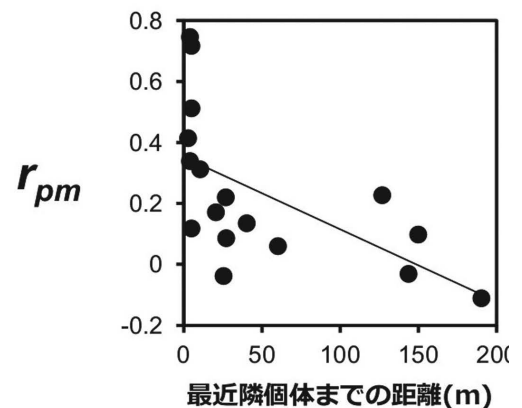
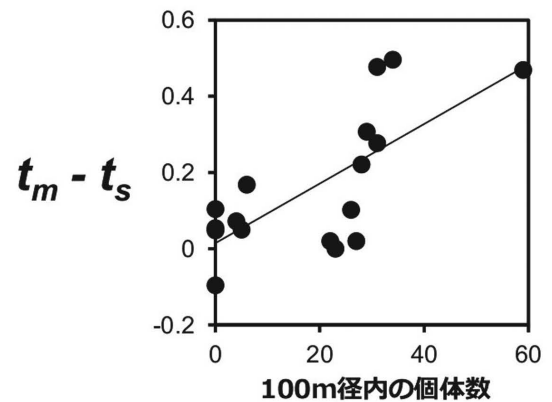
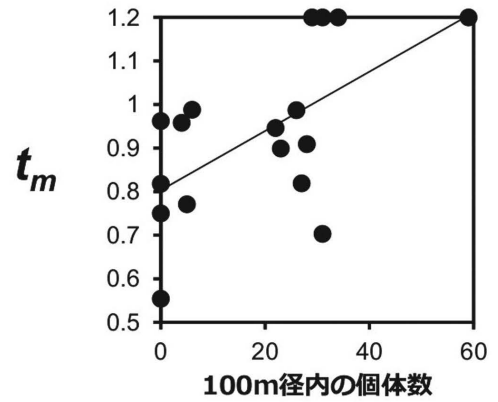


図-3 イタヤカエデ種子集団の繁殖パラメータ (t_m 、 $t_m - t_s$ 、 r_{ps}) と各母樹の近隣個体密度との相関関係。個体密度として、母樹から 100 m 圏内にある繁殖個体数、もしくは母樹から最近隣にある別の繁殖個体までの距離を用いた。Kikuchi et al. (2015) を改変。

種子生産に及ぼす質的・量的変化が明らかになってきた。繁殖個体の孤立化は有効な送粉を阻害し自殖率を増加、結実率を減少させる一方、低頻度の長距離送粉が遺伝的多様性を維持する効果も明らかになった。個体の局

在化が、近隣の血縁個体との二親性近親交配を増加させ、かえって遺伝的多様性を減少させるということも分かった。

分断化にともなう自殖・近親交配の増加は、たしかに集団の存続可能性に負の影響を与えるかもしれない。しかし、低頻度の長距離送粉による遺伝的多様性の維持は、こうした負の影響を相殺する方向に働く。また、種子生産の低下は、被食率の減少によって相殺されていた (Shibata et al. 2009)。これらを踏まえたとき、この規模の森林の分断化がイタヤカエデ集団の存続可能性に及ぼす影響は、限定的だと考えられた。

小川学参林周辺の保残帯では、既にホオノキやハリギリなど分断化の影響が調べられている (例えば、Isagi et al. 2007)。それらと比較しても、イタヤカエデの送粉共生系は分断化に対して敏感であるようだ。一般的に、生育地の分断化が植物の種子繁殖に及ぼす影響は、植物の自家不和合性の有無に左右されるといわれ、自家不和合性植物では種子生産が低下する一方、自家和合性植物では自殖による繁殖補償が可能である。部分的に自殖可能な雌雄異熟異型性を持つイタヤカエデがこれらの中間的な結果を示した点も、興味深かった。

絶滅危惧種ユビソヤナギの遺伝子流動と 河畔景観の分断化

水辺林とは、河川などの水辺域に成立する森林群集のことを指す。湿性で、季節的な増水などによる物理的攪乱を受ける水辺域には特殊な生物相を含んだ生物群集が成立し、高い生物多様性を有している。また水辺林は、生物種の移動・分散のコリドーとしての役割を果たしているといわれる (溪畔林研究会 2001)。近年の治山治水を目的とした河川改修は、こうした水辺林の連続性を断つとともに、生物群集の成立基盤である河川の自然攪乱体制を改変してしまう。現在、日本の水辺林は急速に分断化が進み、劣化の一途を辿っている。

ヤナギ属は、日本の水辺林には欠かせない存在である。柳絮という言葉に象徴されるように、綿毛のついた種子を風に乗せて大量に飛ばすヤナギ属は、広範な種子散布によって遠く離れた生育適地に侵入が可能であるように思われる。しかし、ヤナギ属植物の遺伝子流動の規模についてはよく分かっておらず、生育地の分断化が集団の存続可能性に及ぼす影響は未知数であった。

ユビソヤナギ (*Salix hukaoana* Kimura) は、河畔性のヤナギ属高木である。その自生地は極めて限られている

(Sakio and Tamura 2008)。本州北部の脊梁山脈から日本海側にかけての多雪地域に分布し、河川のなかでも上流部の、広い氾濫原を持つ原生的な山地河川でしか見られない。このような河川環境は、まさに河川改修の場でもある。現在、ユビソヤナギの自生地でも河川改修が進行し、生育地の縮小・分断化が進んでいる。河川景観の分断化が種の存続を脅かす可能性のある事例である。

そこで、ユビソヤナギを材料に、河川景観の分断化が遺伝的多様性や遺伝子流動に及ぼす影響を解析することにした。ここでもまず、マイクロサテライトの開発から行った。ここでは8座のマーカーを開発した (Kikuchi et al. 2005)。

研究を開始した頃は5箇所しか自生地が知られておらず、その全てを対象にした。景観の分断化の程度は自生地によって異なり、湯檜曾川 (群馬県) が最も原生的でユビソヤナギの生育が連続的なのに対し、他の2河川では疎らとなり、さらに他の2河川ではユビソヤナギは非常に狭い範囲に取り残されているのみである。これらの自生地から、林分1箇所 (分集団) につき10個体程度、合計80箇所851個体から葉のサンプリングを行った。

遺存種ということもあつたか、マイクロサテライトといえども多型性は低い。遺伝子座あたりの対立遺伝子数は、各集団2.5~8.5個程度であった。そのため、必然的に空間的遺伝構造の解析が中心となった。まず、ユビソヤナギの遺伝子流動の様態を探るため、湯檜曾川集団の遺伝構造を見てみよう。図-4はいわゆる isolation-by-distance、すなわち分集団間の地理的距離と遺伝的距離との相関関係を示したものである。通常、この解析には遺伝的距離として F_{ST} が用いられることが多いが、本研究では、最近の個体の移住を効果的に推定することができるといわれる尤度比距離 D_{LR} (Paetkau et al. 1997) を用いた。結果を一目見ると、非常に強い遺伝構造があることが分かる。「ヤナギの種子は遠くまで飛ぶ」という先入観に反し、ユビソヤナギの遺伝子流動は空間的にかなり制限されているようであった。

次に、遺伝子流動の方向性である。河川性の植物では、水流散布によって個体や配偶体が下流方向に移動する可能性があるため、遺伝子流動の方向性が問題になる。湯檜曾川でも下流ほど遺伝的多様性が高く、下流方向の遺伝子流動が示唆されていたが、もう少し解析的に検証したい。分集団の多い系なので、演算に時間のかかる MIGRATE を使うのも難しい。そこでフィールド調査で推定された各林分の林齢を利用して、下流方向の遺伝子流動を示すペアと上流方向への遺伝子流動を示

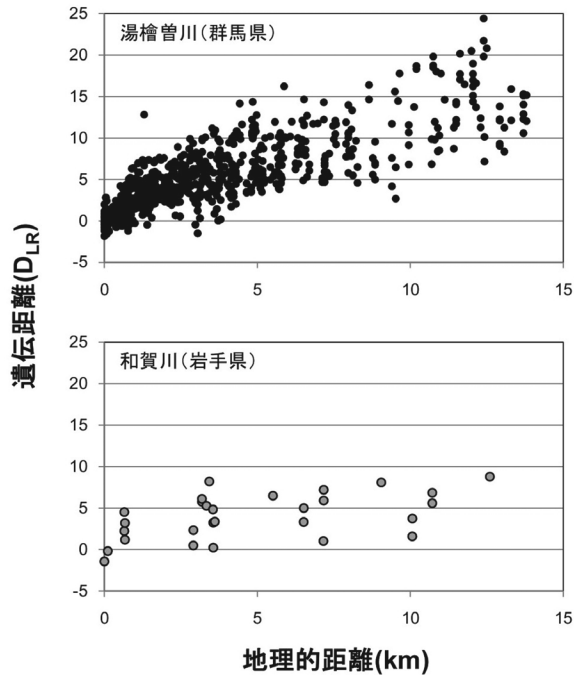


図-4 湯檜曾川と和賀川における、ユビソヤナギ集団の遺伝構造。分集団間の地理的距離と遺伝距離 D_{LR} との相関関係を示した。Kikuchi et al. (2011) より作成。

すペアとに区別して IBD を検証してみたところ、下流方向の遺伝子流動を示すペアの方が回帰直線の傾きが有意に弱くなり、下流方向の遺伝子流動がより強い証拠が得られた。このように、湯檜曾川では、ユビソヤナギの遺伝子流動は空間的に制限され、かつ下流方向への方向性がある、ということが示されたのである。

では、景観の分断化にしたがって遺伝構造はどのように変化するのだろうか。例として、和賀川流域 (岩手県) の遺伝構造を示す (図-4)。このように、分断化に伴い遺伝的距離と地理的距離との相関は弱くなり、遺伝子流動が広範となることが示唆された。風に乗って遠くまで飛ぶように思えるヤナギの種子も、大部分は種子源の近隣に散布される (Gage and Cooper 2005)。そのため生育パッチが密であるときは近距離の遺伝子流動が卓越し、強い遺伝構造を生じるが、疎になるにつれ長距離の遺伝子流動が有効となると考えられる。河畔性ヤナギ属植物の遺伝構造に関する研究はほとんどなく、本研究は、その遺伝子流動を理解するうえでも重要な知見となった。

また、孤立した分集団や縮小の著しい江合川 (宮城県) 集団では遺伝的変異が減少し、分断化の進行とともに

遺伝的浮動の影響が認められた。他の先駆樹種と競合関係にあるヤナギ属においては、遺伝的多様性の減少による遺伝的リスクだけでなく、散布種子の不足が実生更新に悪影響を及ぼす可能性もある。分断化にともなう生態的・遺伝的リスクも踏まえて、ユビソヤナギの長期的保全を検討していく必要があるだろう。

おわりに

本稿で紹介した2つの研究は、前者が送粉過程、後者が景観レベルの遺伝的連結性に着目したものであるが、分断化が遺伝子流動を量的に制限するいっぽう、長距離の遺伝子流動を促進する効果が見られた点で、共通していた。周囲からの移住による個体の補充が局所集団を絶滅から守る現象は、救済効果 (rescue effect) と呼ばれる。近年、外部からの遺伝子流動が、たとえ少量であっても、小集団を近交弱勢や適応度の減少などの遺伝的負荷の影響を緩和する効果を持つことがわかってきた。このように遺伝子流動が集団の遺伝的劣化を軽減させる遺伝的救済効果は、多くの植物で報告され、認知されるようになってきている (Tallmon et al. 2004) が、その定量的評価や植物の散布様式、景観要素との関連など、理解は進んでいない。

植物の遺伝子流動研究は、国内ではかつての流行も落ち着いた感がある。事例研究は増えたが、時空間スケールの問題や植物の生活史、種子散布者・送粉者など複雑な要因が絡み、一般的な知見が得られにくいことが背景にあるのかもしれない。分類群ごとに開発が必要なマイクロサテライトは案外、比較研究が難しいのかもしれない。

蓋を開けてみれば、解決すべき問題はまだまだ多い。今後もフィールド調査や遺伝解析技術の進歩を見据えつつ、森林科学に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

この度、第3回森林遺伝育種学会奨励賞を頂き、誠に光栄に思っております。ご推薦くださった京都大学の井鷲裕司教授、森林総合研究所の伊原徳子室長、選考にあたりご高配を賜った学会の皆様、篤く御礼申し上げます。また、これまでの研究活動にあたりご指導・ご支援下さった、田端英雄元京都大学生態学研究センター助教授や諸先輩方、森林総合研究所森林遺伝領域

や森林植生研究領域の方々、只見の自然に学ぶ会の皆様、
ほか多くの方々に、この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Aguilar R, Ashworth L, Galetto L, Aizen MA (2006) Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecology Letters* 9: 968–980
- Bai W-N, Zeng Y-F, Zhang D-Y (2007) Mating patterns and pollen dispersal in a heterodichogamous tree, *Juglans mandshurica* (Juglandaceae). *New Phytologist* 176: 699–707
- Ellstrand NC, Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 24: 217–242
- Gage E, Cooper D (2005) Patterns of willow seed dispersal, seed entrapment, and seedling establishment in a heavily browsed montane riparian ecosystem. *Canadian Journal of Botany* 687: 678–687
- Isagi Y, Tateno R, Matsuki Y, Hirao A, Watanabe S, Shibata M (2007) Genetic and reproductive consequences of forest fragmentation for populations of *Magnolia obovata*. *Ecological Research* 22: 382–389
- 溪畔林研究会 編 (2001) 水辺林管理の手引き 基礎と指針と提言. 日本林業調査会, 東京
- Kikuchi S, Suzuki W, Ban N, Kanazashi A, Yoshimaru H (2005) Characterization of eight polymorphic microsatellites in endangered willow *Salix hukaoana*. *Molecular Ecology Notes* 5: 869–870
- Kikuchi S, Shibata M (2008) Development of polymorphic microsatellite markers in *Acer mono* Maxim. *Molecular Ecology Resources* 8: 339–341
- Kikuchi S, Shibata M, Tanaka H, Yoshimaru H, Niiyama K (2009) Analysis of the disassortative mating pattern in a heterodichogamous plant, *Acer mono* Maxim using microsatellite markers. *Plant Ecology* 204: 43–54
- Kikuchi S, Suzuki W, Sashimura N (2011) Gene flow in an endangered willow *Salix hukaoana* (Salicaceae) in natural and fragmented riparian landscapes. *Conservation Genetics* 12: 79–89
- Kikuchi S, Shibata M, Tanaka H (2015) Effects of forest fragmentation on the mating system of a cool-temperate heterodichogamous tree *Acer mono*. *Global Ecology and Conservation* 3: 789–801
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL, Craighead L, Strobeck C (1997) An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics* 147: 1943–1957
- Sakio H, Tamura T (ed) (2008) *Riparian Forests in Japan: Disturbance, Life History, and Regeneration*. Springer, Japan
- Renner SS (2001) How common is heterodichogamy? *Trends in Ecology and Evolution* 16: 595–597
- Ritland K (1989) Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43: 848–859
- Shibata M, Kikuchi S, Tanaka H, Sueyoshi M, Yoshimaru H, Niiyama K (2009) Effects of population density, sex morph, and tree size on reproduction in a heterodichogamous maple, *Acer mono*, in a temperate forest of Japan. *Ecological Research* 24: 1–9
- Sork VL, Nason J, Campbell DR, Fernandez JF (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 219–224
- Tallmon DA, Luikart G, Waples RS (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 489–496
- White GM, Boshier DH, Powell W (2002) Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2038–2042