【原著論文】

# 日本産アベマキ (Quercus variabilis) の遺伝構造

齊藤 陽子\*,<sup>1</sup>·津田 吉晃<sup>2</sup>·内山 憲太郎<sup>3</sup>·福田 知秀<sup>4</sup>·井出 雄二<sup>1</sup>

# Genetic structure of Quercus variabilis in Japan.

Yoko Saito<sup>1</sup>, Yoshiaki Tsuda<sup>2</sup>, Kentaro Uchiyama<sup>3</sup>, Tomohide Fukuda<sup>4</sup>, Yuji Ide<sup>1</sup>

要旨:アベマキは二次林構成種であり、人里近くに多く見られる。本研究では本州のアベマキを対象に、7集団について核DNAおよび葉緑体DNA由来のSSRマーカーを用いて遺伝構造を調べた。葉緑体DNAではアベマキの全個体が1つのハプロタイプに固定しており、過去のボトルネックの経験と近年の急速な分布拡大が示唆された。アベマキの核DNAの遺伝的多様性は高く(平均R<sub>s</sub>=4.58、H<sub>E</sub>=0.694)、ある程度の集団間分化もみられた(F'sr = 0.087-0.100)。STRUCTURE解析では、アベマキから2つのクラスターが検出され、東北の1集団を除いて、これら2クラスターの混合パターンがみられた。一方、日本原産の多くの樹種とは異なり明確な空間遺伝構造は見られず、人為の影響は否定できなかった。近縁種であるクヌギとの種間関係も評価したところ、葉緑体DNAはアベマキと同一のハプロタイプに固定されている一方、核DNAでは明確な種分化がみられた。また両種が同所的に生育する集団では種間混合パターンが見られた。これらのことからアベマキの遺伝構造の理解には過去の分布変遷の他、人間活動の影響や種間交雑も考慮すべきことがわかった。

Abstract: The genetic diversity of seven populations of *Quercus variabilis*, which grows in secondly forests, was analyzed using 10 nuclear simple sequence repeat (SSR) markers and 6 chloroplast (cp) SSR markers. Only one cpDNA haplotype was detected from all individuals suggesting historical bottleneck and resent rapid expansion. Nuclear genetic diversity was high (average  $R_s$ =4.58,  $H_E$ =0.694) and the populations were differentiated moderately ( $F'_{ST}$  = 0.087-0.100). The STRUCTURE analysis detected two clusters, and all populations, except for northenmost population, showed admixure of these two clusters. The phylogeographic structure, which many Japanese natural trees exhibited, was not observed in *Q. variabilis*. These results did not conflict to human impacts on the genetic structure of *Q. variabilis*. The influence of hybridization with closely related species, *Quercus acutissima*, was evaluated. All individuals of *Q. acutissima* had the same single cpDNA haplotype as *Q. variabilis*. Nuclear DNA analysis showed clearly differentiation between two species, but genetic admixture was observed in two populations which they grew sympatrically. These results suggest that not only historical distribution changes but also impacts of human activity and hybridization with *Q. acutissima* have to be considered to comprehend the genetic structure of *Q. variabilis*.

Keywords: nuclear SSR Markers, chloroplast SSR Makers, Quercus acutissima, introgressive hybridization

<sup>\*</sup>E-mail: yoko@es.a.u-tokyo.ac.jp

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> 筑波大学山岳科学センター菅平高原実験所 Sugadaira Research Station, Mountain Science Center, University of Tsukuba, 1278-294 Sugadairakogen, Ueda, Nagano 386-2204, Japan

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute, Matsunosato 1, Tsukuba 305-8687, Japan

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>NTT データ先端技術株式会社 NTT DATA Intellink Corporation, Tsukishima 1-15-7, Chuo, Tokyo 104-0052, Japan 2017 年 5 月 24 日受付、2017 年 9 月 23 日受理

# はじめに

生物種の遺伝構造は、その種の分布変遷、環境適応、他種との交雑等などにより形成される(Tsuda et al. 2017)。また、人による環境改変、種苗移動や育種なども樹木の遺伝構造に影響を与える(Baldoni et al. 2006; Gunn et al. 2011)。わが国では天然林構成樹種(ブナFujii et al. 2002;スギTsumura et al. 2012;ミズナラ Kanno et al. 2004;ウダイカンバTsuda et al. 2015;トウヒ類 Aizawa et al. 2007)や希少種(シデョブシTamaki et al. 2008)などで遺伝構造や分布変遷に関する研究が蓄積されてきた。しかし、天然林と人間活動との境界に位置する二次林に主に生育する樹種に関する研究は少ない。日本列島における森林の形成過程を明らかにするためには、このような二次林構成樹種についての遺伝構造の解明が求められる。

樹木の遺伝構造の研究では両性遺伝する核 DNA と母 性遺伝する葉緑体 DNA(針葉樹の一部ではミトコンド リア DNA)の両方を用いることが望ましい(Tsuda and Ide 2010)。核 DNA の場合は多型性が高いマイクロサテ ライト (SSR) マーカーを使用することが一般的である。 核 SSR マーカーを用いると、集団内の遺伝的多様性や 集団間分化の程度を評価できるだけでなく、個体ベース のクラスタリング法により祖先集団の推測、種内系統間 の混合や種間交雑の推定が可能となる(津田2012)。一方、 葉緑体 DNA は被子植物では母性遺伝するため、種子に よる遺伝子流動を反映し、核 DNA よりも明瞭な遺伝構 造の検出が期待される (Petit et al. 1993)。さらに異なる 種間で葉緑体ハプロタイプを共有することは浸透交雑 あるいは祖先多型を意味し、種の分化や交雑を考察す る際の重要な知見が得られる。特に近縁種と交雑する 場合、種間で遺伝子流動があれば種間の遺伝的な分化 程度は低下すると考えられていたが、Petit and Excoffier (2009) は種間の遺伝子流動と種間の遺伝的分化程度に は種内集団間の遺伝子流動の程度が大きく関係してい ることを理論的に明らかにした。このようなことから、 近縁種との交雑の可能性がある樹種の場合には核およ び葉緑体 DNA 由来の遺伝様式および遺伝子流動パター ンの異なるマーカーを評価しないと、本来の種間、種 内の遺伝構造を誤って評価してしまうリスクがある。

アベマキ(Quercus variabilis)は、朝鮮、中国、台湾 (上原 1961)に分布するブナ科コナラ属クヌギ節の落葉 高木である。日本では山形県以西の本州、四国、九州 に生育する(大場 1989)が、瀬戸内海沿岸地域、中国 地方および中部地方の太平洋側丘陵地帯以外では分布 度は非常に低く、静岡県以東の分布は激減する(松原・ 広木 1980)。一方で、本州中部の平野部から丘陵地帯の 二次林では重要な構成樹種になっており(松原・広木 1980)、どのような遺伝構造を形作っているかは興味深 い。またアベマキは近縁種のクヌギと種間交雑する(齊 藤・井出 2017)。そのため、アベマキの遺伝構造にはク ヌギとの浸透交雑が影響を与えている可能性がある。ま た、材のみでは近縁種のクヌギとの識別が困難であるが、 縄文時代などの遺跡からクヌギ節の材が出土しており (伊東ら 1987)、人による利用の歴史は古いと考えられる。 明治時代以降には樹皮がコルクの代替品として利用さ れており(倉田 1951)、人間活動とのかかわりの深いア ベマキの遺伝構造には何らかの人為的影響が考えられ る。

本州中部以西の日本集団を含めた東アジアのアベマ キの集団遺伝構造に関する葉緑体 DNA シークエンスを 用いた先行研究(Chen et al. 2012)では、日本集団は全 て同一の葉緑体ハプロタイプに固定されていた。一般に 葉緑体 SSR は塩基置換に比べ突然変異率が高い(Bagnoli et al. 2016)。そのため、葉緑体 DNA シーケンスでは検出 されない変異も葉緑体 SSR マーカーを用いれば検出さ れる可能性がある。そこで、本研究では日本産のアベ マキについて核 SSR および葉緑体 SSR マーカーを用い て遺伝構造を明らかにし、その形成要因を考察するこ とを目的とした。

# 材料と方法

#### サンプル採取

アベマキの山地林、河畔林の天然更新集団および植 栽集団の計7集団に生育する個体から葉を採取し、シ リカゲルを入れたビニール袋に個別に入れ乾燥した。西 日本のアベマキは、確実に天然更新と考えられる林木 遺伝子資源保存林と河畔林を採取したため集団ごとの 個体数が少なくなった。山形県盃山の集団は、里山林 であるが植栽木に起因する可能もあるため由来不詳と した。アベマキの大井川集団と末光山集団はクヌギと 同所的に生育していた。対照としたクヌギは河畔林の2 集団および山地林の1集団の天然更新集団を用いた。各 集団の位置および採取個体数を図-1および表-1に示す。 乾燥した葉は DNA 抽出まで、室温で保管した。

# DNA 抽出と遺伝分析

乾燥した葉から、改変 CTAB 法で DNA を抽出した。核 SSR マーカーとして、QM50-3M、QM69-2M1



図-1 調査対象集団の位置。白丸はアベマキ集団、黒 丸はクヌギ集団、二重丸は両種の集団を示す。

(Isagi and Suhandono 1997), ssrQpZAG15, ssrQpZAG36, ssrQpZAG110 (Steinkellner et al. 1997), bcqm42 (Mishima et al. 2006), CsCAT14, CsCAT15 (Marinoni et al. 2003), EMCs2、EMCs10 (Buck et al. 2003) の10マーカー用いた。 また葉緑体 SSR マーカーとしては、µdt1、µdt3、µdt4、  $\mu$ cd4, $\mu$ cd5, $\mu$ kk4 (Deguilloux et al. 2003)  $\mathcal{O}$  6  $\mathcal{O}\mathcal{O}\mathcal{P}$ - $\mathcal{D}$ -を用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit (Qiagen co.) を用い、核プライマーの終濃度が 0.2µM となるよう反 応液を調整した。PCR条件は、初期活性化95℃15分の 後、熱変性94℃30秒、アニーリング54℃(核マーカー) または48℃(葉緑体マーカー)で90秒、伸長反応72℃ 90秒を1サイクルとし、合計30サイクル行い、その 後、最終伸長反応を 60℃で 30 分間行った。PCR 産物の 電気泳動および遺伝子型の決定には、ABI 社の Genetic Analyzer 3100 および多型解析ソフト GeneMapper を用い た。

# データ解析

# 核DNA

遺伝的多様性の指標として、集団ごとにアレリック リッチネス(Rs; El Mousadik and Petit 1996)、ヘテロ接合 度の期待値( $H_{\rm E}$ ; Nei 1987)および固定指数 $F_{\rm IS}$ を求め た。集団分化の程度は $F_{\rm ST}$ (Weir and Cockerham 1984)を 用いて評価した。 $F_{\rm IS}$ および $F_{\rm ST}$ が0から有意に偏って いるかについては 1,000回の対立遺伝子の無作為化によ り検定した。これらの算出には FSTAT ver. 2.3.9.2 (Goudet

表-1 アベマキおよびクヌギの対象集団の林分状況、位置、採取した個体数および核 SSR マーカー 10座で解析 した遺伝的多様性、ならびにアベマキ集団のボトルネック検定結果

種	集団名	所在地	林分状況	北緯	東経	個体数	<i>R</i> s <sub>[12]</sub>	$H_{\rm E}$	$F_{\rm IS}$	ボトルネック検定	
										IAM	TPM
アベマキ	1. 盃山	山形	由来不詳	38° 15'	140° 21'	32	4.66	0.721	0.051	0.005 <sup>e</sup>	0.492
	2. 大井川 ª	静岡	河畔林	$34^{\circ} 53'$	$138^{\circ}$ 05'	7	4.22	0.639	-0.073	0.570	0.910
	3. 瀬戸	愛知	植栽林	35° 14'	$137^{\circ}$ 04'	45	4.79	0.698	0.073	0.557	0.084
	4. 由良川	京都	河畔林	35° 30'	$135^{\circ}$ 17'	20	4.46	0.659	0.061	0.492	0.275
	5. 末光山 ª	岡山	山地林 <sup>b</sup>	$34^{\circ} 53'$	133° 25'	6	4.80	0.747	0.018	0.160	0.432
	6.釜ヶ峰	広島	山地林 <sup>b</sup>	$34^{\circ}55'$	$132^{\circ}$ 56'	24	4.32	0.681	-0.021	0.032 <sup>e</sup>	0.846
	7. 芦田川	広島	河畔林	34° 26'	133° 24'	9	4.82	0.694	0.119	0.492	0.770
	7 集団合計					143	4.58	0.694°	0.047		
クヌギ	8. 権現森	宮城	河畔林	$38^{\circ} 45'$	141° 23'	12	4.55	0.601	-0.012		
	9. 荒川	埼玉	河畔林	$36^{\circ} 07'$	139° 19'	35	4.06	0.627	0.123 <sup>d</sup>		
	10. 末光山 <sup>a</sup>	岡山	山地林	34° 53'	133° 25'	10	4.78	0.661	0.010		
	3集団合計					57	4.47	0.630 <sup>c</sup>	0.078		

 $Rs_{[12]}: アレリックリッチネス、H<sub>E</sub>: ヘテロ接合度の期待値、<math>F_{IS}: 近交係数、IAM: 無限対立遺伝子モデル、$ TPM: 二相モデル。

a:アベマキとクヌギが同所的に生育、b:遺伝資源保存林、c:有意に差がある (*p*<0.05)、d:有意に0より大きい (*p*<0.05)、e:有意なボトルネックが検出された (*p*<0.05)。

2002)を用いた。またマーカーの多型性の影響を受け ない $F_{ST}$ の補正値 $F'_{ST}$  (Meirmans and Hedrick 2011) を GenAlex6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012) により算出し た。アベマキとクヌギで遺伝的多様性が異なるのか評 価するために、FSTAT を用いて  $R_{\rm S}$ 、 $H_{\rm E}$ 、 $F_{\rm IS}$  および  $F_{\rm ST}$ を両種間で比較し、1,000回の無作為化検定により相違 の有意性について評価した。集団分化と地理的距離の 関係 (Isolation by distance, IBD, Wright 1943) については Rousset (1997) に従い、集団分化の指標に (F<sub>st</sub>/1-F<sub>st</sub>) を用いてマンテル検定を行った。地理的距離の算出お よびマンテル検定はGenAlEx6.5を用いて行った。ま た、個々の集団が最近のボトルネックを経験したか評 価するために、Bottleneck ver. 1.2.02 (Cornuet and Luikart 1997) を用いて無限対立遺伝子モデル (IAM) および二 相モデル (TPM: ステップワイズ変異モデル 70%、無限 対立遺伝子モデル 30% とした)を用い、Wilcoxon 検定 で検証した。個体レベルの遺伝構造を評価するために、 STRUCTURE 解析 (Pritchard et al. 2000) を用い、クラス ター数Kは1から10、10,000回のburn-in periodの後、 Markov chain Monte Carlo シミュレーション 100,000 回と した。STRUCTURE HARVESTER (Earl et al. 2012) を用 いて $\Delta K$  (Evanno et al. 2005) を計算し、最適なクラスター 数を推定した。

#### 葉緑体 DNA

葉緑体 SSR マーカーで PCR 増幅された各個体のフラ グメントサイズに基づいて、各個体のハプロタイプを 決定した。

#### 結果

#### 核DNA

使用したコナラ属で開発された 10 座の SSR マーカー の多型性は表-2 のとおりであった。いずれもアベマキ において多型的であり、1 マーカーのみヘテロ接合度の 観察値が期待値より有意に高かった。これらを用いてア ベマキ7集団 143 個体、クヌギ3 集団 57 個体の解析を行っ た結果、各集団の遺伝的多様性の指標の平均はアベマ キで  $R_{\rm S}$ =4.58、 $H_{\rm E}$ =0.694、クヌギで  $R_{\rm S}$ =4.47、 $H_{\rm E}$ =0.630 であった(表-1)。また、近交係数  $F_{\rm IS}$ は、アベマキが 0.047、 クヌギが 0.078 であった。アベマキは、由来不詳の盃山 集団と植栽の瀬戸集団も  $R_{\rm S}$ および  $H_{\rm E}$ はいずれも天然 集団の値の幅の範囲内であった。 $R_{\rm S}$ および  $H_{\rm E}$ はどちら もクヌギ集団に比べアベマキ集団の方が高く、 $H_{\rm E}$ は有

表-2 使用した核 SSR マーカー 10 座の多様性

	$N_{\rm A}$	$H_{\rm O}$	$H_{\rm E}$	$F_{\rm IS}$	HW
bcqm42	22	0.817	0.863	0.053	NS
CsCAT14	20	0.748	0.792	0.056	NS
CsCAT15	13	0.636	0.751	0.153	NS
QM50-3M	14	0.741	0.851	0.129	NS
QM69-2M1	9	0.700	0.705	0.007	NS
ssrQpZAG15	19	0.738	0.768	0.039	NS
ssrQpZAG36	7	0.621	0.657	0.055	NS
ssrQpZAG110	22	0.820	0.848	0.033	NS
EMCs2	3	0.129	0.209	0.383	ND
EMCs10	5	0.664	0.635	-0.046	**

 $N_{\rm A}$ :検出された対立遺伝子数、 $H_0$ : ヘテロ接合度の 観察値、 $H_{\rm E}$ : ヘテロ接合度の期待値、 $F_{\rm IS}$ : 近交係数、 HW: ハーディ・ワインベルグ平衡からのずれ、NS: 有 意でない、ND:検出限界以下、\*\*: p < 0.05。

意にアベマキ集団の方が高かった。最近のボトルネック については IAM モデル下では、盃山と釜ヶ峰の 2 集団 でボトルネックを検出したが、TPM モデルではボトル ネックが検出された集団はなかった(表-1)。集団間分 化は、アベマキ全集団の分化指数(F<sub>ST</sub>)は0.025 であり 有意であった(p<0.001)。また Meirmans and Hedrick(2011) のF'<sub>ST</sub>は0.087(不詳および植栽を除いた5集団で0.100) であった。クヌギ集団を含めた NJ系統樹(図-2)で は、大きくアベマキ集団とクヌギ集団とが分かれ、2種 は遺伝的に異なっていたが、アベマキの大井川集団は2 つのクラスターの間に位置していた。アベマキ集団は、 由良川と芦田川集団のノードのブートストラップ値の みが高かった。集団の地理的な位置関係と遺伝的な位 置には関連がなく、植栽の瀬戸集団および由来不詳の



図-2 遺伝距離 D<sub>A</sub>に基づいた NJ系統樹。下線はク ヌギ集団、数字はブートストラップ率(50以上 を記載)を示す。



図-3 ベイズクラスタリングを用いて分類したクラスター数(K)と尤度(LnP(X/K)、●)および変化率(ΔK、
○)の関係(上)およびクラスター数が2および3の場合の、アベマキ7集団およびクヌギ3集団の各個体の推定された各クラスターの割合(下)

盃山集団も特別な傾向はなかった。アベマキ集団の IBD については地理的距離が遠い集団間ほど遺伝的距離も 遠い傾向があるものの、相関は有意ではなかった。天 然林5集団のみを対象とした場合も有意な IBD は検出 されなかった。STRUCTURE 解析では事後確率はK =3まで高くなり、 $\Delta K$ はK = 2 で最も大きくなった(図 -3)。K = 2のとき、クラスター K2-1、K2-2 はそれぞ れアベマキ集団およびクヌギ集団に対応し、種間の遺伝 構造が明確に検出された。一方で、アベマキの大井川 および由良川の集団にはクヌギ集団で多いクラスター K2-2 が、クヌギの末光山集団ではアベマキ集団で多い クラスター K2-1 の割合が他の集団と比較して高く、種 間での混合パターンが検出された。さらにK=3のとき、 アベマキ集団は主に2つのクラスターK3-1、K3-3から 構成され、盃山集団のみクラスターK3-3の割合が高く、 大井川と由良川はクラスターK3-2も含まれていたが、 由良川のK3-2の割合は非常に低かった。一方、クヌギ 集団はクラスターK3-2で構成されていたが、末光山に はクラスターK3-1、K3-3も含まれていた。K=3の時の それぞれのクラスターの $F_{ST}$ の値は、クラスターK3-1 が 0.0630、クラスターK3-2 が 0.1082、クラスターK3-3 が 0.0958 であった。

#### 葉緑体 DNA

アベマキおよびクヌギの全個体から検出されたハプ ロタイプは1つだけであった。すなわち、全ての集団 が同一のハプロタイプに固定されており、集団間およ び集団内に変異がなかった。葉緑体 SSR マーカーのフ ラグメントサイズは、µdt1:90bp、µdt3:129bp、µdt4: 139bp、µcd4:101bp、µcd5:81bp、µkk4:115bpであった。

# 考察

対象集団が東北地方から中国地方と広い地域に渡っ たにもかかわらず葉緑体は1つのハプロタイプのみが検 出され、クヌギも同一のハプロタイプであった。これは、 これまで報告されている多くの日本産樹木種(たとえば Fujii et al. 2002; Kanno et al. 2004; Tsuda and Ide 2010)の葉 緑体 DNA が多型と地域性を持っていたのと異なる。多 型がない要因として、使用した葉緑体 SSR マーカーが 両種で単型である可能性がある。また、本研究では対 象としていない九州および四国に異なるハプロタイプ が存在する可能性はある。しかし、ユーラシア大陸の クヌギでは、同じ葉緑体 SSR マーカーで本研究でのハ プロタイプを含め計20個のハプロタイプが検出されて いる (Saito et al. submitted)。そのため、用いたマーカー が単型の原因であるとは考えづらい。さらに、東アジ アのアベマキの葉緑体 DNA シーケンスでも、日本では 変異が検出されなかった(Chenetal. 2012)。これらから、 調査対象地域のアベマキは強いボトルネックを経験し たと考えられる。

アベマキとクヌギとが同じ葉緑体ハプロタイプを共 有していることは、両種が浸透交雑した歴史があると 考えられる。日本産コナラ属コナラ節のコナラ、ミズ ナラ、カシワ、ナラガシワもハプロタイプ共有が見られ、 4種の間では種間交雑が生じている(Kanno et al. 2004)。 本研究では中国地方から東北地方まですべての調査地 域でアベマキとクヌギがひとつのハプロタイプであっ た。日本におけるクヌギ、アベマキの自然分布について は不明な点が多く(山中2011)、特にクヌギは天然分布 していないとの見解もあり(倉田 1976; Fukamachi et al. 2003)、両種の分布から交雑の歴史を類推するのは困難 である。どちらかの種が一つのハプロタイプのみを持 ち分布を全国へ拡大し、もう一方の種が花粉親として のみ浸透交雑を行うことにより分布を拡大していった 可能性と、両種が全国的に広がる前に交雑して葉緑体 を共有し、そのエリアからそれぞれ分布を拡大していっ た可能性の二通りが考えられる。また、葉緑体 DNA に 変異がないことから、いずれの場合でも種子による分 布拡大が起きてから多型が生じるのに十分な時間を経 ていないと考えられる。

一方、核 DNA では、アベマキ集団は天然林または植 栽に限らず高い遺伝的多様性を保持しており任意交配 集団とみなせた。集団間分化は、F'sr は 0.087(植栽を 除く5集団では0.100)であり、ある程度の集団間分化 がみられた。これは日本産重力散布樹種のミズナラの 本州中部以北集団と同程度であり(G'sr=0.090; Ohsawa et al. 2011)、分布域全体を網羅したブナ G'sr=0.168 (Hiraoka and Tomaru 2009) より低かった。国内の天然林樹種には 有意な IBD のパターン(ヤチダモ Hu et al. 2010; ウダイ カンバ Tsuda and Ide 2005;ヒノキ Tsumura et al. 2007)が 多くみられる。また、日本海側と太平洋側でのクラス ター (スギ Uchiyama et al. 2014; ブナ Hiraoka and Tomaru 2009)、東と西とのクラスター(イロハモミジ吉丸・松 本2015)、東北中部を境にした南北のパターン(ハイマ ツ Tani et al. 1996; ウダイカンバ Tsuda et al. 2015) などが みられる。これらは、日本列島の地史や気候変動の影 響を受けた分布変遷とその後の遺伝子流動の結果と考 えられているが、アベマキ集団ではこのような明確な 空間構造はみられなかった。他方 STRUCTURE 解析で は*K*=3のとき主にクラスターK3-1、K3-3の混合となっ ているが、最北の盃山集団はクラスターK3-3 で優占さ れていた。また、クラスターK3-3はF<sub>st</sub>の値がクラス ターK3-1より高く、遺伝的浮動の影響をより強く受け ていると考えられる。これらのことからアベマキは氷 期にクラスターK3-1とK3-3にそれぞれ対応する2つ のレフュージアが存在し、そのうちクラスターK3-3は より小さく、より北にあり、最終氷期以降北方に分布 拡大した可能性が考えられる。 ウダイカンバ (Tsuda and Ide 2005; Tsuda et al. 2015) やスギ (Kimura et al. 2014) で は最終氷期最盛期における東北地方などの北方生残が 示唆されており(岩崎ら2016)、この仮説は他樹種の知 見と矛盾しない。また、盃山集団は IAM 条件下のみで はあるが有意なボトルネックが検出されている。創始 者効果など分布変遷の過程で急激に個体数が減少した 集団がボトルネックテストにより検出される(コナラ Ohsawa et al. 2011; ヤチダモ Hu et al. 2010)。このことは、 クラスターK3-3がより小さなレフュージア由来である ことを支持する。しかし、古生態学的なデータが乏しく、 これら仮説の詳細な検証は難しい。また葉緑体ハプロタ イプが単一であることから、レフュージアあるいは現 在の分布の母集団は2つではなく、1つの祖先集団から

北方に分布拡大する際に、ごく少数の個体が由来となっ て盃山集団を形成したと考える方が妥当であろう。山形 市付近のアベマキは植栽からの逸出である(齋藤 1975) との見解もあり、そのことが盃山集団のSTRUCTURE 解析やボトルネックの結果に反映された可能性がある。

人為による種苗の移動による樹木種の遺伝的特性に 与える影響は、異なる産地の種苗を同所的に植えるため 集団内の遺伝的多様性を高める(König et al. 2002; Gong et al. 2008)、集団間の遺伝的分化を低下させる(Mohanty etal. 2001; König et al. 2002; Gong et al. 2008)、系統地理学 的構造を損なう (Mohanty et al. 2001) などがある。本研 究では、アベマキの遺伝構造が人為による種苗移動の 影響を受けているとする明確な結果は得られていない。 しかし、国内産樹種で報告されている遺伝構造パター ンとは異なり、遺伝的多様性の地理的パターンや空間 遺伝構造はみられない一方で、ある程度の集団間分化 はみられた。これはボトルネックや STRUCTURE 解析 のFst 値からも示唆されたように、個々の集団への遺伝 的浮動の影響のためと考えられる。他のコナラ属樹種 ではこのようなパターンはみられなかったことから、こ れら結果は、二次林構成種であるアベマキの分布およ び遺伝的多様性への人為の影響は否定できず、その必 要条件は満たしているといえる。今後より多くのアベ マキ集団を供試し、集団動態の推定を行うことで、人 為の影響をより詳細に評価できると期待できる。

クヌギとの交雑の影響に関しては、STRUCTURE 解 析でも系統樹でも両種間で明確な遺伝的分化がみられ た。このことは樹木では母性遺伝するマーカーでは浸透 交雑と種内の集団間の遺伝子流動の低さにより種間識 別が難しく、両性遺伝する核 DNA マーカーでは種内集 団間の遺伝子流動の高さにより種間の遺伝構造が形成 されやすいという先行研究の知見と一致する (Petit and Excoffier 2009; Tsuda et al. 2017)。一方で、現在でも両種 が同所的に生育する大井川集団はNJ系統樹でクヌギ集 団に最も近く、また STRUCTURE 解析でもクヌギとの 混合構造がみられた。そのため、最近でも2種間で雑 種形成がおこっている可能性が示唆され、部分的にア ベマキの遺伝構造にクヌギとの交雑の影響があること もわかった。しかし、同様に2種が同所的に分布する 末光山では、K=2または3のときアベマキ集団ではク ヌギに多いクラスターK2-2またはK3-2がほとんどなく、 クヌギ集団ではアベマキに多いクラスターK2-1または K3-1 が混合している。このことは、一方向の遺伝子流 動の可能性を示唆する。方向性のある交雑については、 同じコナラ属では集団内の種の頻度が方向性に影響を

与える例が報告されており(Lepais et al. 2009)、本研究 の結果も個体数の違いによるものかもしれない。加えて、 STRUCTURE 解析でみられる混合構造は祖先多型や他 集団のボトルネック、採取していないあるいはすでに 消滅した集団の影響による"みかけ"の混合構造が検 出されることもある(Sousa et al. 2013; Tsuda et al. 2015; Falush et al. 2016)。以上のように、浸透交雑が樹木種の 遺伝構造に与える影響は複雑であるが、今後、両種の 集団をより多く供試し、ゲノムワイドな解析を行うこ とにより、より深く理解できるだろう。また、二次林 構成種の遺伝構造の解釈は、天然の分布変遷と人為的 影響の区分けが難しいため、今後も多くの事例を重ね て総合的に議論していく必要がある。

# 謝 辞

本研究の一部は平成17~21年度環境省地球環境保全 試験研究費「自然再生事業のための遺伝的多様性の評価 技術を用いた植物の遺伝的ガイドラインに関する研究」 により実施されたものである。

## 引用文献

- Aizawa M, Yoshimaru H, Saito H, Katsuki T, Kawahara T, Kitamura K, Kaji M (2007) Phylogeography of a northeast Asian spruce, *Picea jezoensis*, inferred from genetic variation observed in organelle DNA markers. Molecular Ecology 16: 3393–3405
- Bagnoli F, Tsuda Y, Fineschi S, Bruschi P, Magri D, Zhelev P, Paule L, Simeone M, González-Martínez S, Vendramin G (2016) Combining molecular and fossil data to infer demographic history of *Quercus cerris*: Insights on European eastern glacial refugia. Journal of Biogeography 43: 679–690
- Baldoni L, Tosti N, Ricciolini C, Belaj A, Arcioni S, Pannelli G, Germana M, Mulas M, Porceddu A (2006) Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean Basin. Annals of Botany 98: 935–942
- Buck EJ, Hadonou M, James CJ, Blakesley D, Russell K (2003) Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Molecular Ecology Notes 3: 239–241
- Chen D, Zhang X, Kang H, Sun X, Yin S, Du H, Yamanaka

N, Gapare W, Wu H, Liu C (2012) Phylogeography of *Quercus variabilis* Based on Chloroplast DNA Sequence in East Asia: Multiple Glacial Refugia and Mainland-Migrated Island Populations. PLoS ONE 7: e47268

- Cornuet JM, Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001–2014
- Deguilloux M, Dumolin-Lapegue S, Gielly L, Grivet D, Petit J (2003) A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. Molecular Ecology Notes 3: 24–27
- Earl DA (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation genetics resources 4: 359–361
- 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, Van Dorp L, Lawson D (2016) A tutorial on how (not) to over-interpret STRUCTURE/ADMIXTURE bar plots. bioRxiv, doi: http://dx.doi.org/10.1101/066431
- Fujii N, Tomaru N, Okuyama K, Koike T, Mikami T, Ueda K (2002) Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan. Plant Systematics and Evolution 232: 21–33
- Fukamachi K, Oku H, Rackham O (2003) A comparitive study on tees and hedgerows in Japan and England. Palang H and Fry G (eds.) , Landscape Interfaces, 53–69. Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Gong W, Zeng Z, Chen YY, Chen C, Qiu YX, Fu CX (2008) Glacial refugia of Ginkgo biloba and human impact on its genetic diversity: evidence from chloroplast DNA. Journal of Integrative Plant Biology 50: 368–374
- 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 (2012年8月20日アクセス)
- Gunn B, Baudouin L, Olsen K (2011) Independent origins of cultivated coconut (*Cocos nucifera* L.) in the old world

tropics. PLOS ONE 6: e21143

- 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: 269–282
- Hu L, Uchiyama K, Saito Y, Ide Y (2010) Contrasting patterns of nuclear microsatellite genetic structure of *Fraxinus mandshurica* var. japonica between northern and southern populations in Japan. Journal of Biogeography 37: 1131–1143
- Isagi Y, Suhandono S (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. Molecular Ecology 6: 897–899
- 伊東隆夫・山口和穂・林昭三・布谷知夫・島地謙(1987) 日本の遺跡から出土した木材の樹種とその用途.木 材・研究資料23:42-210
- 岩崎貴也・阪口翔太・津田吉晃(2016)分子系統地理 学に生態ニッチモデリングがもたらす新展開と課 題. 植物地理・分類研究64:1-15
- Kanno M, Yokoyama J, Suyama Y, Ohyama M, Itoh T, Suzuki M (2004) Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. Journal of Plant Research 117: 311–317
- Kimura MK, Uchiyama K, Nakao K, Moriguchi Y, San Jose-Maldia L and Tsumura Y (2014) Evidence for cryptic northern refugia in the last glacial period in *Cryptomeria japonica*. Annals of Botany 114: 1687–1700
- König AO, Ziegenhagen B, Van Dam BC, Csaikl UM, Coart E, Degen B, Petit RJ (2002) Chloroplast DNA variation of oaks in western Central Europe and genetic consequences of human influences. Forest Ecology and Management 156: 147–166
- 倉田益二郎(1951)有利で将来性あるアベマキの栽培. 農業世界 46:72-76
- 倉田悟(1976)植物と文学の旅.地球社,東京
- Lepais O, Petit RJ, Guichoux E, Lavabre JE, Alberto F, Kremer A, Gerber S (2009) Species relative abundance and direction of introgression in oaks. Molecular Ecology 18: 2228–2242
- Marinoni D, Akkak A, Bounous G, Edwards KJ, Botta R (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.) . Molecular Breeding 11: 127–136
- 松原輝男・広木詔三(1980)ブナ科植物の生態学的研

究 II. アベマキの分布と種子期の性質. 日本生態学 会誌 30:85-98

- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure:  $F_{ST}$  and related measures. Molecular Ecology Resources 11: 5–18
- Mishima K, Watanabe A, Isoda K, Ubukata M, Takata K (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Quercus mongolica* var. *crispula*. Molecular Ecology Notes 6: 695–697
- Mohanty A, Martin JP, Aguinaglade I (2001) A population genetic analysis of chloroplast DNA in wild populations of *Prunus avium* L. in Europe. Heredity 87: 421–427
- Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia university press, New York
- Ohsawa T, Tsuda Y, Saito Y, Ide Y (2011) The genetic structure of *Quercus crispula* in northeastern Japan as revealed by nuclear simple sequence repeat loci. Journal of Plant Research 124: 645–654
- 大場秀章(1989)ブナ科. 佐竹義輔・亘理俊次・原寛・ 冨成忠夫編, 日本の野生植物 木本 I, 66–78. 平凡社, 東京
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288–295
- 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
- Petit R, Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. Trends in Ecology and Evolution 24: 386–393
- Petit R, Kremer A, Wagner D (1993) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. Theoretical and Applied Genetics 87: 122–128
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. Genetics 145: 1219–1228
- 齋藤員郎(1975)蔵王山西斜面森林植生の人為的圧 迫による退行ー二次林と植林. 吉岡邦二編,蔵王 山の環境破壊による生物群集の動態に関する研究, 14-26. 東北大学理学部,仙台
- 齊藤陽子・井出雄二(2017)長野県飯島町周辺に生育 するクヌギとアベマキの葉裏の星状毛密度と浸透性

交雑. 東京大学農学部演習林報告 136:1-13

- Sousa V, Hey J (2013) Understanding the origin of species with genome-scale data: modelling gene flow. Nature Reviews Genetics 14: 404–414
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glössl J (1997) Conservation of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci between *Quercus* species. Molecular Ecology 6: 1189–1194
- Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N (2008) Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors influencing the level of withinpopulation genetic variation. Heredity 100: 415–423
- Tani N, Tomaru N, Araki M, Ohba K (1996) Genetic diversity and differentiation in populationas of Japanese stone pine (*Pinus pumila*) in Japan. Canadian Journal of Forestry Research. 26: 1456–1462
- 津田吉晃(2012)遺伝構造データ解析.津村義彦・陶 山佳久編,森の分子生態学2,345–387.文一総合出版, 東京
- Tsuda Y, Ide Y (2005) Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. Molecular Ecology 14: 3929–3941
- Tsuda Y, Ide Y (2010) Chloroplast DNA phylogeography of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in Japan. Journal of Plant Research 123: 343–353
- Tsuda Y, Nakao K, Ide Y, Tsumura Y (2015) The population demography of *Betula maximowicziana*, a cool-temperate tree species in Japan, in relation to the last glacial period: Its admixture-like genetic structure is the result of simple population splitting not admixing. Molecular Ecology 24: 1403–1408
- Tsuda Y, Semerikov V, Sevastiani F, Vendamin G, Lascoux M (2017) Multispecies genetic structure and hybridization in the *Betula* genus across Eurasia. Molecular Ecology 26: 589–605
- Tsumura Y, Matsumoto A, Tani N, Ujino-Ihara T, Kado T, Iwata H, Uchida K. (2007) Genetic diversity and the genetic structure of natural populations of *Chamaecyparis obtusa*: implications for management and conservation. Heredity 99: 161–172
- Tsumura Y, Uchiyama K, Moriguchi Y, Ueno S, Ihara-Ujino T (2012) Genome scanning for detecting adaptive genes along environmental gradients in the Japanese conifer, *Cryptomeria japonica*. Heredity, 109: 349–360

- 上原敬二(1961) あべまき. 樹木大図説 I, 780. 有明 書房, 東京
- Uchiyama K, Miyamoto N, Takahashi M, Watanabe A, Tsumura Y (2014) Population genetic structure and the effect of historical human activity on the genetic variability of *Cryptomeria japonica* core collection, in Japan. Tree Genetics & Genomes 10: 1257–1270
- Weir, BS, Cockerham, CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358– 1370

- Wright S (1943) Isolation by distance. Genetics 28: 114-138
- 山中典和(2011)ナラ林構成種の生態と生理. 鳥取大 学広葉樹研究刊行会編,広葉樹資源の管理と活用, 7-24. 海青社,大津
- 吉丸博志・松本麻子 (2015) イロハモミジ.津村義彦・ 陶山佳久編,地図でわかる樹木の種苗移動ガイドラ イン,149–151. 文一総合出版,東京