

## 【原著論文】

## 静岡県内に植栽されたブナ個体の遺伝的系統と遺伝的多様性

片井 秀幸<sup>\*,1,5</sup>・山田 晋也<sup>1</sup>・平岡 宏一<sup>2</sup>・星川 健史<sup>1</sup>・戸丸 信弘<sup>3</sup>・高橋 誠<sup>4</sup>Genetic lineage and diversity of *Fagus crenata* trees planted in Shizuoka PrefectureHideyuki Katai<sup>\*,1,5</sup>, Shinya Yamada<sup>1</sup>, Koichi Hiraoka<sup>2</sup>, Takeshi Hoshikawa<sup>1</sup>,Nobuhiro Tomaru<sup>3</sup> and Makoto Takahashi<sup>4</sup>

**要旨**：静岡県内に植栽によって造られたブナ集団（植栽集団）を対象に葉緑体 DNA と核マイクロサテライト（SSRs）の解析を行い、それらの遺伝的系統と遺伝的多様性を調べた。調査した 8 集団のうち 3 集団に、日本海側には分布するが県内には分布しない葉緑体 DNA ハプロタイプが検出された。そのうちの 2 集団については、核 SSR 座の遺伝子型を用いた STRUCTURE 解析でも日本海側系統に分類された。したがって、2 種類の遺伝マーカーによって県内天然林集団（太平洋側系統）とは異なる遺伝的系統の植栽集団が存在することが明らかとなった。これら 2 集団は、遺伝的な観点から植生回復の目的には適したものではないと考えられる。また、核 SSR 座を用いて植栽集団の遺伝的多様性を調べた結果、対立遺伝子の豊富さが 3 集団で県内天然林集団の平均値よりも低かった。遺伝的多様性を保持した植栽集団の育成には、植栽当初に遺伝的多様性の高い種苗の確保が必要であると思われる。

**キーワード**：核マイクロサテライト、植栽木、植生回復、保全遺伝、葉緑体 DNA ハプロタイプ

**Abstract**: The genetic lineage and diversity of *Fagus crenata* plantations established in Shizuoka Prefecture were surveyed by analyzing chloroplast DNA and nuclear microsatellites (nSSRs). Chloroplast DNA haplotypes, which are naturally distributed along the Sea of Japan side but not within the prefecture, were found in three out of the eight surveyed plantations. Two of the three plantations were also classified as the same lineage as the Sea of Japan by a STRUCTURE analysis of nSSR genotypes. Therefore, the two genetic markers used in this study revealed that the two plantations belonged to a different genetic lineage from that of the natural populations found within the prefecture (i.e. the lineage found on the Pacific Ocean side). It was concluded that these two plantations would not be suitable for the purpose of vegetation restoration from a genetic point of view. Furthermore, because of the estimated genetic diversity of the plantations using the nSSR loci, the values of allelic richness for all three plantations were lower than the average value of the natural populations in the prefecture. Therefore, we suggest that more genetically diverse seeds and seedlings are necessary to ensure more genetically diverse plantations.

**Keywords**: nuclear simple sequence repeat, planted trees, vegetation restoration, conservation genetics, chloroplast DNA haplotype

\*E-mail: hideyuki1\_katai@pref.shizuoka.lg.jp

<sup>1</sup> 静岡県農林技術研究所森林・林業研究センター Forestry and Forest Products Research Center, Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry, 2542-8 Negata, Hamakita, Hamamatsu, Shizuoka 434-0016, Japan

<sup>2</sup> 黒松内町ブナセンター Kuromatsunai Buna Center, 512-1 Kuromatsunai, Kuromatsunai, Sutttsu, Hokkaido 048-0101, Japan

<sup>3</sup> 名古屋大学大学院生命農学研究科 Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya, Aichi 464-8601, Japan

<sup>4</sup> 森林総合研究所林木育種センター Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301, Japan

<sup>5</sup> 現所属：静岡県農林技術研究所茶業研究センター Tea Research Center, Shizuoka Prefectural Research Institute of Agriculture and Forestry, 1706-11 Kurasawa, Kikugawa, Shizuoka 439-0002, Japan

## はじめに

近年、環境問題への関心の高まりや企業の社会的責任活動の一環として、ボランティア団体や企業による森林づくり活動（植生回復・復元などの森林の整備・保全活動、環境教育・啓発活動、社会貢献活動）が盛んになっている（林野庁 2012）。森林づくり活動で使用する植栽木には広葉樹が用いられることが多く、なかでもブナは森林づくりの象徴的な樹種として位置づけられている。スギ、ヒノキなどの造林用針葉樹では林業種苗法にもとづく種苗配布区域により種子・苗木の移動範囲が定められている一方、ブナをはじめとする10種の広葉樹では種苗移動の遺伝的ガイドラインが提案されているが（森林総合研究所 2011）、現行では法的拘束力を有する種苗配布区域は広葉樹では定められておらず、種苗が全国規模で流通している実態がある（茨城県林業技術センター 2005；小山 2005；兵庫県 2007）。

造林樹種の場合、苗木そのものが植栽地の環境に適応して成林するかどうか問題にされる。一方、植生の回復や復元の目的で植栽される広葉樹の場合には、環境に適応して成林することに加えて、遠交弱勢によるリスク回避、天然更新可能な立地の選定など次世代以降の環境適応性、さらにはその地域の天然林集団が保有する固有の遺伝的特性への影響（遺伝子レベルの攪乱防止）についても考慮する必要がある（Hufford and Mazer 2003；戸丸 2008）。しかし、前述のような流通実態を踏まえて考えると、我が国では広葉樹において環境への適応や遺伝子攪乱に配慮して植栽が行われているとは言い難い現状にある（吉丸 2004）。種内に遺伝的分化がみられる場合、環境への適応や遺伝的攪乱に配慮するには、遺伝的変異の地域性にもとづき、広葉樹の植栽に用いる種苗の遺伝的な由来と多様性に考慮した植栽が必要であるとされている（吉丸 2004；津村 2010）。産地を考慮しない種苗移動への対策として、種苗の移動区域のガイドラインや保全単位の設定がある（津田 2010）。種内の保全単位を検討するにあたって、適応的な形質の変異と、集団の歴史を刻んでいる中立な遺伝的変異の両面から検討する必要があると考えられており（戸丸 2008）、これらの変異に注目した概念として「進化的に重要な単位（evolutionarily significant unit；ESU）」などが提唱されている（Fraser and Bernatchez 2001）。

近年、オルガネラゲノムの多型を用いた系統地理学的研究がブナ（*Fagus crenata*）（Tomaru et al. 1998；Fujii et al. 2002；Okaura and Harada 2002 など）、コナラ節（section *Primus*）（Kanno et al. 2004；Okaura et al. 2007）などの広葉

樹で行われてきた。また、核のマイクロサテライト（microsatellite；simple sequence repeat, SSR）マーカーを用いた集団遺伝学的研究が、ブナ（Hiraoka and Tomaru 2009）、ヤマザクラ（*Cerasus jamasakura*）（Tsuda et al. 2009）などの樹種で行われてきた。これらの樹種では種内に遺伝的分化がみられ、遺伝的系統が地理的分布パターンを有していた。このような場合、種苗の遺伝解析を行うことにより、種苗の産地を地域レベルで特定できる可能性がある（Deguilloux et al. 2004）。

一方、樹木では遺伝マーカーなどの中立的な形質だけではなく、適応性に関係すると考えられる生理的・形態的形質に地理的変異があることが知られている。例えば、ブナでは、葉面積は西南日本から東北日本へ向かって増大する地理的勾配があることが知られている（萩原 1977）。さらに、分布域全体のブナを用いた産地試験では、開芽期のフェノロジーが概ね北海道・東北地方産、北陸・山陰地方産、関東以西の太平洋側産の順で遅くなる地理的変異が認められている（中田・中山 1995；橋詰ら 1996；梶・高橋 1999；布川・塚原 2005）。ブナの成長に被害を与える要因の一つに晩霜害があり、開芽期のシュートへの影響は大きく、成長の抑制（長谷川・相浦 2009）、さらには枯死に至る事例も報告されている（黒田ら 2001）。このため、開芽期が早い個体では晩霜に遭遇し被害を受けるリスクが高いと思われ、産地間で晩霜害の被害程度が異なることが考えられる。太平洋側と日本海側由来の苗木を用いたブナの移植試験では、種子産地と同様の環境下に植栽することで健全に生育するが、種子産地とは異なる環境へ植栽することで、成長が阻害された事例が知られている（小山 2012）。このように、種内の生理・形態特性の違いから植栽する地域により苗木は生育不良を起こして成林に失敗する恐れがあり、植栽木の成長に影響すると考えられる（Eriksson et al. 1980；Savolainen et al. 2007 など）。したがって、可能な限り、周辺地域に自生している天然林集団と遺伝的組成の近い種苗を導入することが望ましいと考えられる。

静岡県内においても、イベントや公共事業などにより広葉樹の植栽が行われてきた。これらは概して市民の環境教育・啓発や保健休養の場の提供、植生回復を意図したものと考えられる。しかし、苗木の流通実態（茨城県林業技術センター 2005；小山 2005；兵庫県 2007）から推察すると、これまでは植栽木の種苗を選定するときに遺伝的な由来や遺伝的多様性が必ずしも配慮されたとは言えない。また、これまで広葉樹の植栽木について遺伝的な視点で調査を行った事例は多くない（津村・岩田 2006；斎藤ら 2009；小山 2011；Koyama et al. 2012）。そ

ここで本研究では、静岡県内に植栽されたブナ個体について、葉緑体 DNA (chloroplast DNA ; cpDNA) と核 SSR の変異を調べ、それらの遺伝的な系統を推定するとともに、植栽によって造られた集団 (以下、植栽集団) と天然林集団との遺伝的多様性の差異の有無を調べた。得られた結果をもとにして、遺伝的な観点からブナの植栽集団が植生回復の目的に適したものかどうかを検討した。

### 材料と方法

#### 試料の採取と DNA 抽出

静岡県内でブナが植栽されている伊豆市、函南町、富士市 (I・II・III) および静岡市 6 箇所を調査地とした。伊豆市の調査地では、区画により葉の大きさや開芽フェノロジーなどの特性が異なる傾向を示したため、また静岡市の調査地では、区画により植栽履歴が異なっていると考えられたため、それぞれ I と II の区画に分けて調査した。したがって、本研究では、伊豆市 (I・II)、函南町、富士市 (I・II・III) および静岡市 (I・II) の 8 つの植栽集団を調査対象とした (表-1)。cpDNA 解析のために、各集団から 30~219 個体を選び、葉あるいは冬芽を採取して試料とした (表-1)。また、核 SSR 解析のために、今回の cpDNA 解析の結果にもとづき、静岡県内の天然林集団で確認されているハプロタイプを単一で存在していた 3 集団 (函南町、富士市 II、静岡市 I)、静岡県内の天然林集団では確認されていないハプロタイプが存在していた 3 集団 (伊豆市 II、富士市 III、静岡市 II) の計 6 集団を選び、1 集団当たり 30~34 個体の葉あるいは冬芽を採取して試料とした (表-2)。採取した試料から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) により全 DNA を抽出し、以下の分析に供試した。

#### 葉緑体 DNA 解析

*trnL* (UAA) 5' エクソンと *trnF* (GAA) の遺伝子間領域 (*trnL/trnF*)、*trnK* 全イントロン (*matK* 遺伝子を含む) および *trnS* と *trnf<sub>M</sub>* の遺伝子間領域 (*trnS/trnf<sub>M</sub>*) をそれぞれポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) により増幅した。*trnL/trnF* の PCR 増幅のために 5'-AATGCGATGCTCTAACCTCT-3' をフォワード・プライマーに、5'-GCCAGGAACCAGATTTGAA-3' をリバース・プライマーに用いた (陶山 未発表)。同様に、*trnK* については、5'-TTATTCTTAGCGGATCGGTCCA-3' と 5'-CCGTGCTTGCACTTTTCATTG-3' を (陶山 未発表)、*trnS/trnf<sub>M</sub>* については Grivet et al. (2001) のプライマー

表-1 静岡県内のブナ植栽集団の葉緑体 DNA ハプロタイプ

集団名	位置情報 <sup>1)</sup>	天然林集団との距離 <sup>2)</sup> (km)	天然林集団で		ハプロタイプ						
			検出されたハプロタイプ <sup>3)</sup>	植栽個体数	調査個体数	A	B	C	E	E-1	F
伊豆市 I	5238-26	0.7	E, E-1, O	83	83	0	0	0	50	9	24
伊豆市 II	5238-26	0.7	E, E-1, O	71	71	0	66	2	0	3	0
函南町	5239-50	1.2	E, E-1	56	56	0	0	0	56	0	0
富士市 I	5238-75	1.3	E	400 以上	219	0	0	0	203	16	0
富士市 II	5238-75	0.5	E	150 以上	40	0	0	0	40	0	0
富士市 III	5238-76	4.6	E <sup>-4)</sup>	500 以上	53	0	3	0	45	3	2
静岡市 I	5238-62	5.7	-	200 以上	30	0	0	0	30	0	0
静岡市 II	5238-62	5.7	-	約 50	33	33	0	0	0	0	0

<sup>1)</sup> 第 2 次メッシュコード。<sup>2)</sup> 片井ら (2011) が調査した天然林集団のうち、最も近隣に位置する集団との地理的距離。<sup>3)</sup> 片井ら (2011) および Katai et al. (2013) より引用した。<sup>4)</sup> 調査したブナ天然林集団がなかったことを示す。

表-2 核マイクロサテライト座における静岡県内のブナ植栽集団の遺伝的多様性

集団名	調査個 体数	対立遺伝子 数 (A)	対立遺伝子 の豊富さ (AR) <sup>1),4)</sup>	ヘテロ接合度の 観察値 (H <sub>O</sub> ) <sup>4)</sup>	ヘテロ接合度の 期待値 (H <sub>E</sub> ) <sup>4)</sup>	固定指数 (F <sub>IS</sub> ) <sup>2)</sup>
伊豆市II	34	14.23	12.56 n.s.	0.754 n.s.	0.797 n.s.	0.054 *
函南町	32	12.92	11.95 **	0.837 n.s.	0.846 n.s.	0.011
富士市II	30	14.00	13.09 n.s.	0.869 n.s.	0.862 n.s.	-0.008
富士市III	31	14.38	13.35 n.s.	0.832 n.s.	0.853 n.s.	0.025
静岡市I	30	11.08	10.30 **	0.895 n.s.	0.782 **	-0.145 **
静岡市II	30	6.62	6.33 **	0.711 n.s.	0.684 n.s.	-0.039
静岡県内天然林 7集団の平均 <sup>3)</sup>	31.0	14.31	13.26	0.823	0.859	

<sup>1)</sup> 対立遺伝子の豊富さは標準サンプル数を24個体(48対立遺伝子)として計算した。

<sup>2)</sup> 各集団のF<sub>IS</sub>について0からの偏りの有意性を並び替え検定(両側)によりシーケンシャルボンフェローニ補正して調べた。

<sup>3)</sup> Hiraoka and Tomaru (2009) から天然林1集団(Mt. Amagi) および片井ら(2011) から天然林6集団(長九郎山、富士山、三国山、鳥森山、蕎麦粒山、青崩峠)の計7集団の13遺伝子座での遺伝子型データを用いて計算した。

<sup>4)</sup> 植栽集団と静岡県内天然林の計7集団との平均値の差についてt検定(両側)によりシーケンシャルボンフェローニ補正して調べた。

n.s. 有意差なし、\*p<0.05、\*\*p<0.01。

セットNo.19を用いた。PCR(反応液量20μL)はDNAポリメラーゼとしてKOD Plus(Toyobo)を用い、10~30ngの全DNAを供試した。PCRの時間と温度の条件は、最初に94°C・2分間の初期変性の後、98°C・15秒(変性)、アニーリング温度・30秒(アニーリング)、68°C・2分20秒(伸長)の行程を35サイクルとした。アニーリング温度は*trnL/trnF*と*trnK*で57°C、*trnS/trnM*で55°Cとした。得られたPCR産物はExoSAP-IT(GE Healthcare Bioscience; GE)で精製後、一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)検出用の鋳型とした。

cpDNAハプロタイプを識別するため、11種類のSNP検出用プライマー(表-3; M. Takahashi unpublished)を用いてSNaPshot Multiplex Kit(Applied Biosystems; ABI)によりSNPを検出した。反応は試薬キットの説明書に従った。SAP(GE)で精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(ABI)で電気泳動し、GeneMapper Software ver.4.0(ABI)で解析した。cpDNAハプロタイプはFujii et al. (2002)によるA~Mに分類した(表-3)。さらに、静岡県の伊豆半島とその隣接地域に分布が確認され、この地域に固有の系統と考えられるハプロタイプOおよびハプロタイプEのサブタイプE-1を分類するために、*trnK*全イントロン中のSNPを検出するためのプライマー*trnK-R7*(5'-(T)<sub>33</sub>ATCTATCGAGTTCTAAATATCTTTGAAATT-3')および

*trnS/trnM*中のSNPを検出するためのプライマー*trnS<sub>M</sub>-F8*(5'-(T)<sub>44</sub>CTAGTTACCAGAATCAAACCTAAAT-3')(Katai et al. 2013)をそれぞれ用いた。

### 核SSR解析

核SSR解析では、Tanaka et al. (1999)が開発した3座(*mfc5*、*mfc11*、*mfc12*)とAsuka et al. (2004)が開発した10座(*sfc0007-2*、*sfc0018*、*sfc0036*、*sfc0109*、*sfc0195-2*、*sfc0305*、*sfc0378*、*sfc1063*、*sfc1105*、*sfc1143*)、計13座を用いた。フォワード側のプライマーには蛍光標識したものをを用いて、Tanaka et al. (1999)とAsuka et al. (2004)の方法でPCR増幅を行った。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(ABI)でPCR産物を電気泳動し、GeneMapper Software ver.4.0(ABI)で遺伝子型を決定した。集団内の遺伝的多様性を評価するために、13座の遺伝子型データをもとに、FSTAT ver. 2.9.3.2(Goudet 2002)を用いて対立遺伝子数(A)、対立遺伝子の豊富さ(allelic richness; AR)、ヘテロ接合度の期待値(H<sub>E</sub>)と観察値(H<sub>O</sub>)、固定指数(F<sub>IS</sub>)を計算した。なお、ARは標準サンプル数を24個体(48対立遺伝子)として計算した。各集団のF<sub>IS</sub>について0からの偏りが有意かどうかを、FSTATを用いてシーケンシャルボンフェローニ補正した並び替え検定(両側)で調べた。集団内の遺伝的多様性を静岡県内に

表-3 葉緑体 DNA 解析に用いた一塩基多型 (SNP) プライマーと検出される SNP にもとづくハプロタイプの分類

プライマー名	塩基配列 (5'→3')	ハプロタイプ												
		A	B	C	D	E	F	G/H	I/J	K	L	M		
tmlF671_RIN	TACAATCAGATCCATTGTAAAAAGA	T	T	T	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G
tmlF159_F2N	(T) <sub>12</sub> AAAAGGATAGGTGCAGAGACTC	G	G	G	G	G	A	A	A	A	A	A	A	A
tmlK1754_R3N	(T) <sub>14</sub> CTAGCAATTTGACTCCGGCACCCTGAAG	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
tmlK189_F5N	(T) <sub>9</sub> CGGTCCAAAACCTTGTGTTGAATCTTGACCGCTAAAAAAA	T	T	G	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
tmlK2089_R2N	(T) <sub>26</sub> CTTGGACGAAATCCGAACTACTTTTT	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	T	T
tmlF054_F3N	(T) <sub>14</sub> CTTACCAGTGATAACTTTCAAAATTCAGAGAAACCCTGGAATT	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
tmlK2353_R2	TCTATTATGAAATGTTTATTCAGTAAGCAT	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
tmlK851	(T) <sub>7</sub> GCTCATGATCATGGTTTCAATAGCTACA	T	T	T	T	T	C	C	T	C	T	T	T	T
tmlK232_F4	(T) <sub>8</sub> GAAATTAAGTTGGTTAAGTGAATAAATGGATAGAG	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
tmlF783_F2	(T) <sub>9</sub> AAAATAAGGATGATGCACCGGTAATGGTCGGATAGCTCAGC	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
tmlK2166_F2	(T) <sub>11</sub> CTTTACCGAGGAAAGGAGTTTCTTTGATCTTCCCAAGAA	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

SNP プライマーは M. Takahashi (unpublished) によった。供試したプライマーではハプロタイプ G と H、および I と J とは識別できない。

天然分布する集団と比較するために、Hiraoka and Tomaru (2009) で解析された天然林 1 集団 (Mt. Amagi) および片井ら (2011) で解析された天然林 6 集団 (長九郎山、富士山、三国山、鳥森山、蕎麦粒山、青崩峠) の遺伝子型データから本研究で用いたのと同じ 13 座の遺伝子型データを用いて同様の計算を行い、植栽集団ごとに静岡県内の天然林 7 集団との間で  $AR$ 、 $H_0$ 、 $H_E$  の平均値に有意な差があるかどうかをシーケンシャルボンフェローニ補正した  $t$  検定 (両側) により検定した。また、前記した静岡県の 6 つの植栽集団、Hiraoka and Tomaru (2009) で解析された天然林集団から選定した 10 集団 (各地方より 1 集団と Sado Island を除く中部地方の全集団; Kuromatsunai, Mts. Shirakami、Hatomachi Pass、Mt. Haku-san、Mt. Ohginosen、Mt. Amagi、Men-noki Pass、Mt. Ohdaigahara、Mt. Ishizuchi、Mt. Takakuma) および片井ら (2011) で解析された天然林 6 集団 (前記と同じ) の計 22 集団の 13 座の遺伝子型データを用いて STRUCTURE 解析を行った。計算には STRUCTURE ver.2.3.1 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) を用いた。解析は、混合モデル、 $F$  モデル、LOCPRIOR モデルの組合せで行い、燃焼 (burn-in) として 50,000 回試行の後、200,000 回のマルコフ連鎖モンテカルロ法のサンプリングをクラスター数 ( $K$ ) の値 (1~10) につき各 10 回行った。最適クラスター数は  $\Delta K$  による方法 (Evanno et al. 2005) により決定した。

### 結 果

#### 葉緑体 DNA 解析による植栽木のハプロタイプの分類

伊豆市 I 集団では cpDNA ハプロタイプ E (50 個体)、E-1 (9 個体) および F (24 個体) の 3 種類、伊豆市 II 集団ではハプロタイプ B (66 個体)、C (2 個体) および E-1 (3 個体) の 3 種類が存在し、また、富士市 I 集団ではハプロタイプ E (203 個体)、E-1 (16 個体) の 2 種類、富士市 III 集団ではハプロタイプ B (3 個体)、E (45 個体)、E-1 (3 個体) および F (2 個体) の 4 種類が存在し、同一植栽地内に複数のハプロタイプが存在した。一方、函南町集団ではハプロタイプ E (56 個体)、富士市 II 集団ではハプロタイプ E (40 個体)、静岡市 I 集団ではハプロタイプ E (30 個体)、静岡市 II 集団ではハプロタイプ A (33 個体) のみが検出された (表-1)。このように、8 つの植栽集団から 6 種類のハプロタイプ (A、B、C、E、E-1、F) が検出された。静岡県内の天然林集団には 5 種類のハプロタイプ (D、E、E-1、F、O) が存在することが報告されているが (片井ら 2011 ; Katai et al. 2013)、静岡県内の天然

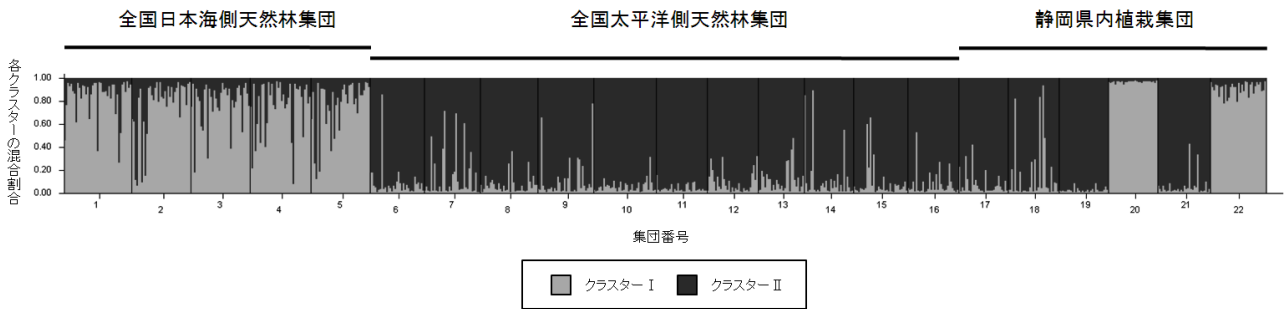


図-1 植栽集団と天然林集団における遺伝的構造。静岡県内のブナ植栽地 6 集団（図中の 17～22 の集団）、全国日本海側天然林 5 集団（図中の 1～5 の集団）および太平洋側天然林 11 集団（図中の 6～16 集団）について核 SSR13 座の遺伝子型にもとづいて STRUCTURE (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) の解析を行った。図はクラスター数  $K=2$  の結果を示した。図中の 6 および 11～16 の集団は静岡県内のブナ天然林集団である。図中の 1～10 の集団、11～16 の集団の核 SSR データは Hiraoka and Tomaru (2009)、片井ら (2011) からそれぞれ引用した。図中の集団番号の集団名：1、Kuromatsunai；2、Mts. Shirakami；3、Hatomachi Pass；4、Mt. Haku-san；5、Mt. Ohginosen；6、Mt. Amagi；7、Men-noki Pass；8、Mt. Ohdaigahara；9、Mt. Ishizuchi；10、Mt. Takakuma；11、富士山；12、蕎麦粒山；13、青崩峠；14、鳥森山；15、三国山；16、長九郎山、17、富士市Ⅱ；18、富士市Ⅲ；19、静岡市Ⅰ；20、静岡市Ⅱ；21、函南町；22、伊豆市Ⅱ。

林集団では存在しない 3 種類のハプロタイプ (A、B、C) も検出された。さらに、各植栽集団に隣接した天然林集団では検出されていないハプロタイプが、伊豆市Ⅰ集団ではハプロタイプ F、富士市Ⅰ集団ではハプロタイプ E-I がそれぞれ存在していた (表-1)。

### 核 SSR 解析による集団内の遺伝的多様性と遺伝的系統関係の推定

静岡市Ⅰ集団の  $AR$  と  $H_E$  はいずれも静岡県内の天然林集団の平均値と比べて低かった (表-2)。また、静岡市Ⅱ集団および函南町集団の  $AR$  も県内の天然林集団の平均値と比べて低かった。静岡市Ⅱ集団の  $H_E$  は 13 座の平均値が 0.684 と調査した植栽集団の中で最も低い値を示したが、県内の天然林集団の平均値との間に有意差はなかった。この植栽集団の  $mfc12$  座の値が 0.033 と他の座の値よりも低い値であったため、この座を除いて再度検定した結果、県内の天然林集団の平均値との間に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。各集団の  $F_{IS}$  は -0.145 から 0.054 の範囲内にあった。そのうち伊豆市Ⅱ集団は、 $F_{IS}$  が 0 より有意に高く、静岡市Ⅰ集団は 0 より有意に低かった。

6 つの植栽集団を含む 22 集団での STRUCTURE 解析を行った結果、 $\Delta K$  はクラスター数  $K=2$  のときに最大となった。伊豆市Ⅱおよび静岡市Ⅱの集団の全個体は、日本海側に天然分布するブナ集団で構成比率の高いクラスタ

ーⅠが優占し、集団として日本海側のブナ天然林集団と同じ系統に分類されることを示した (図-1)。特に、静岡市Ⅱ集団では全個体がクラスターⅠの構成比率が 0.94 以上であった。一方、函南町、富士市Ⅱおよび静岡市Ⅰ集団の全個体は、太平洋側に分布するブナ集団で構成比率の高いクラスターⅡが優占していた (図-1)。また、富士市Ⅲ集団でも多くの個体がクラスターⅡに割り当てられたが、3 個体のみクラスターⅠの構成比率が高かった。これらの個体のうち、2 個体はハプロタイプ B (クラスターⅠの比率は 0.936 と 0.842) であり、もう 1 個体はハプロタイプ E (クラスターⅠの比率は 0.823) であった。この集団でハプロタイプ B を示した 3 個体のうち、上記以外の 1 個体ではクラスターⅡの比率がⅠを上回った (クラスターⅡの比率は 0.769)。

## 考 察

### 静岡県内のブナ植栽集団の遺伝的系統

本研究では、静岡県内に植栽によって造られたブナ植栽集団を対象に調査を行ったところ、県内に天然分布しない 3 種類の cpDNA ハプロタイプ (A、B、C) を保有する系統が植栽されていた。ハプロタイプ A は静岡市Ⅱ集団に、ハプロタイプ B は伊豆市Ⅱ集団および富士市Ⅲ集

団に、ハプロタイプ C は伊豆市 II 集団でそれぞれ検出された。ハプロタイプ A、B、C の系統が天然分布する地域は、それぞれ北海道から東北地方の日本海側、北海道から山陰地方にかけての日本海側地域、山陰地方であることから (Fujii et al. 2002 ; M. Takahashi unpublished)、他地域産の種苗が静岡県内に流通し、植栽されたものと考えられた。伊豆市 II および静岡市 II 集団の各個体は cpDNA ハプロタイプだけではなく、核 DNA も日本海側に分布する天然林集団を構成するクラスターの割合が高く、静岡県の天然林集団の遺伝的組成とは異質であった。さらに、富士市 III 集団にはハプロタイプ B の系統が 3 個体確認されたが、これらのうち 2 個体の核 DNA は日本海側に分布する天然林集団と同様のクラスター組成を保有していた。このように、現在、静岡県内に植栽されているブナ植栽集団には、静岡県内の天然林集団とは全く異なる遺伝的系統のものが含まれていることが明らかとなった。本研究以外にも、植栽集団が近隣の天然林集団とは異なる遺伝的系統であった事例が報告されている (Koyama et al. 2012)。これらの植栽集団の遺伝的情報とブナの苗木の流通実態 (茨城県林業技術センター 2005 ; 小山 2005 ; 兵庫県 2007) から推察すると、本県だけではなく、他のブナ植栽地においても他地域由来の苗木が植栽されている可能性が考えられる。さらに、伊豆市 I 集団や富士市 I 集団では隣接した天然林集団では検出されないハプロタイプが存在したことから、これらの植栽地での種苗が静岡県内産であった場合でも、植栽地から離れた地域の遺伝的系統の異なる種苗が用いられて植栽されていた可能性がある。

このような産地を考慮しない種苗移動への対策として種苗の移動区域のガイドラインや保全単位の提案があり (津田 2010)、遺伝的変異に注目した考えの一つとして ESU がある。これにはいくつかの考えが提唱され (Fraser and Bernatchez 2001)、Moritz (1994) は種内の管理単位を遺伝マーカーによる遺伝的変異の情報を使って決定することを提案し、オルガネラ DNA で明確な分化 (単系統) を示し、また核の遺伝子座でも対立遺伝子頻度で明瞭な分化を示すならば、それらの集団は別々の ESU とすべきとしている。本研究で調査した 2 つの集団 (伊豆市 II および静岡市 II) は、cpDNA マーカーと核 SSR マーカーの複数の遺伝マーカーにおいて、静岡県内の天然林集団とは遺伝的に異なっていた。これは、静岡県の天然林集団とは異なる ESU に由来する個体が植栽されていたことを示すものである。日本海側の遺伝的系統であった伊豆市 II および静岡市 II の集団に隣接して、太平洋側の遺伝的系統であった伊豆市 I および静岡市 I の集団があり、将

来、これらの集団間で交配が起こる可能性がある。また、伊豆市および静岡市の植栽地と最も近隣に位置する天然林集団との地理的距離はそれぞれ 0.7 km と 5.7 km であり、ブナの花粉は 2 km 以上飛散して種子生産に寄与する場合があります (沼野・陶山 2006)、さらに、ブナ属の花粉は約 100 km 離れた場所まで風散布されること (Igarashi 1987) から考えると、これらの個体が周囲の天然林集団の個体と交配し、天然林ではまれな太平洋側と日本海側との交雑個体が生じ、遺伝子レベルの攪乱を生じる可能性があることを示唆していると思われる。もしそのようなことが起これば、交雑個体やその後代において遠交弱勢が発現し、集団が衰退していく恐れがある (Hufford and Mazer 2003 ; 河村ら 2009)。また、地域適応性の視点において、ブナの移植試験により日本海側産の苗木を太平洋側地域に植栽すると、先枯れが多く発生して樹高成長が悪くなることが報告され (小山 2012)、本研究で日本海側の系統と判定された 2 つの植栽集団 (伊豆市 II および静岡市 II) でも同様の環境不適応を示す可能性がある。立地条件が異なるが、隣り合わせに植栽されている伊豆市 I と伊豆市 II の集団では、伊豆市 II 集団の方が葉の日焼けや枝の先枯れの発生程度などが高い傾向にあった (片井ら未発表)。日本海側の系統が植栽されている伊豆市 II および静岡市 II の集団では、植栽個体やその後代では生育面で問題が危惧される。以上の議論にもとづくと、本研究で調査した植栽集団の植栽目的は明確ではなかったが、伊豆市 II および静岡市 II の集団は、遺伝的な観点から植生回復の目的には適したものではないと考えられる。

#### 静岡県内のブナ植栽集団の遺伝的多様性

本研究で調査したブナ植栽集団には、天然林集団と比べて  $AR$  が低い 3 つの集団 (静岡市 I、静岡市 II、函南町) があり、さらに静岡市 I 集団および静岡市 II 集団では  $H_E$  も低かった。その要因として下記の 2 つのうちどちらか一方、あるいは両方が考えられる。まず、母樹林自体の遺伝的多様性レベルが影響した可能性である。静岡市 II 集団の cpDNA ハプロタイプは A であり、これは北海道から東北地方の日本海側に分布する (Fujii et al. 2002)。これらの地域を含む東北日本のブナ集団は西南日本のブナ集団と比べて集団内変異が低い傾向にある (Hiraoka and Tomaru 2009)。このため、静岡市 II 集団で集団内変異が低い傾向にあるのは、遺伝的多様性のレベルが低い地域の集団から採取した種子を用いて育苗された苗木を植栽したためではないかという可能性である。もう一つの可能性は、苗木の育成に用いた種子の種子親数が少なかった可能性である。種子親数が少ない場合、花粉親は周囲

の個体から花粉を介して多様な対立遺伝子が供給されたとしても、種子親由来の対立遺伝子が限られることで、種子の遺伝的多様性が低下すると考えられる。静岡市I集団および函南町集団では、後者のような理由により、遺伝的多様性が低下した可能性があるのではないかとと思われる。

植生の回復や復元を目的として樹木が植栽された場合、植栽木が健全に生育して成林するだけでなく、天然更新により次世代以降も存続していくことが望まれる。ここでは、遺伝的な視点から植栽木の健全な生育について考えてみたい。ブナは、自殖した場合にはほとんどの種子がシイナになる(河野・向田 1994)。また、自殖以外の二親性近親交配でも近交弱勢が現れるとされている(向井 2008)。このような種では、集団サイズの減少は遺伝的多様性の減少をもたらすだけでなく、近交弱勢リスクの増大や、ひいては適応度の低下につながるものが危惧される(Frankham et al. 2007)。植栽集団の場合、種苗生産に用いた種子の矮小な遺伝子プールや植栽集団の孤立によってもたらされるボトルネックの影響で遺伝的多様性が低下するリスクもある(津田 2010)。種苗生産に用いた種子の矮小な遺伝子プールでは、育苗に用いる種子の採取時に限られた個体数の母樹から種子採取した場合に、種子段階において遺伝的変異がすでに減少している状況にあると考えられる。また、周囲に天然林集団が分布しない地域に植栽されることもあり、そのような場合には周囲からの遺伝子流動による遺伝的変異の上昇を期待することができない。このような場合、植栽後の遺伝的多様性の程度は、世代が進むにしたがって減少する傾向を示すものと推測されることから、植栽時の遺伝的多様性の程度は、将来世代の遺伝的多様性の相対的な大きさに影響する可能性がある。そのため、遺伝的多様性を維持した植栽集団にするためには、造成時に近隣の天然林集団と同程度の遺伝的多様性の高い種苗を確保して植栽する必要がある。しかしながら、本研究で遺伝的多様性について調査した6つの植栽集団のうち半数の3集団が天然林集団と比べて低かった。したがって、これら3集団は、遺伝的多様性の視点から問題があるだろう。今後、植栽計画時に育苗に用いる種子の遺伝子プールの遺伝的多様性を評価し、植栽集団の将来の遺伝的多様性を見据えた上で、育苗・植栽を進めることが望まれる。また、植栽時の苗木の遺伝的多様性が高い場合でも、植栽集団の個体数が少なければ、遺伝的多様性が低下すると予測される(Frankham et al. 2002)。植栽する際には、遺伝的多様性が高い苗木を確保するだけでなく、個体の成長による個体間競争により個体数が減少することも勘

案して植栽計画(植栽面積・植栽密度)を立案する必要があると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、東北大学陶山佳久准教授には有用な助言をいただいた。静岡県内のブナ植栽集団を管理する各位には試料採取にあたり便宜を図っていただいた。ここに記して謝意を表す。なお、本研究は静岡県プロジェクト研究事業により実施した。

## 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
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Petit RJ (2004) DNA-based control of oak wood geographic origin in the context of the cooperage industry. *Annals of Forest Science* 61: 97–104
- Eriksson G, Andersson S, Eiche V, Ifver J, Persson A (1980) Severity index and transfer effects on survival and volume production of *Pinus sylvestris* in Northern Sweden. *Studia Forestalia Suecica* 156: 1–32
- 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
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2007) 保全遺伝学入門. 西田睦監訳, 文一総合出版, 東京
- Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation : towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741–2752
- 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
- Goudet J (2002) FSTAT(ver.2.9.3.2). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Grivet D, Heinze B, Vendramin GG, Petit RJ (2001) Genome walking with consensus primer: application to the large single



- copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 345–349
- 萩原信介 (1977) ブナにみられる葉面積のクラインについて. *種生物学研究* 1: 39–51
- 長谷川幹夫・相浦英春 (2009) 豪雪地のブナ人工林における若齢期の霜害と群落構造との関係. *富山県農林水産総合技術センター森林研究所研究報告* 1: 10–15
- 橋詰隼人・李廷鎬・山本福壽 (1996) ブナの開芽期の産地および家系による差異. *日本林学会誌* 78: 363–368
- 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
- Hufford KM, Mazer SJ (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 147–155
- 兵庫県 (2007) 安全・安心な広葉樹種苗による造林事業の展開—郷土の広葉樹種苗安定供給体制整備検討委員会報告書—. 兵庫県, 神戸
- 茨城県林業技術センター (2005) 茨城県内での広葉樹の生産状況. *茨城県林業技術センター資料* 29: 1–48
- Igarashi Y (1987) Pollen incidence and wind transport in central Hokkaido (II). *Research Bulletins of the College Experiment Forests Hokkaido University* 44: 477–506
- 梶幹男・高橋康夫 (1999) 東京大学北海道演習林におけるブナ産地別フェノロジー—1998年の開葉期と晩霜害—. *日本林学会北海道支部論文集* 47: 54–57
- 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
- 片井秀幸・高橋誠・平岡宏一・山田晋也・山本茂弘・加藤公彦・袴田哲司・戸丸信弘 (2011) 葉緑体DNAと核マイクロサテライト変異にもとづく静岡県内ブナ集団の遺伝的系統の推定. *日本森林学会誌* 93: 73–78
- Katai H, Takahashi M, Hiraoka K, Yamada S, Tomaru N (2013) Indigenous genetic lineages of *Fagus crenata* found in the Izu Peninsula suggest that there was one of refugia for the species during the last glacial maximum. *Journal of Forest Research* 18: 418–429
- 河村功一・片山雅人・三宅琢也・大前吉広・原田泰志・加納義彦・井口恵一郎 (2009) 近縁外来種との交雑による在来種絶滅のメカニズム. *日本生態学会誌* 59: 131–143
- 河野耕蔵・向田稔 (1994) ブナの種内交配における堅果生産能力. *日本林学会東北支部会誌* 46: 117–120
- 小山泰弘 (2005) 長野県における広葉樹苗木の生産流通実態. *林木の育種 特別号*: 17–19
- 小山泰弘 (2011) 長野県におけるブナ人工林の地理的変異とその影響—健全な広葉樹林整備のための地域集団における遺伝的多様性の研究—. *長野県林業総合センター研究報告* 25: 45–64
- Koyama Y, Takahashi M, Murauchi Y, Fukatsu E, Watanabe A, Tomaru N (2012) Japanese beech (*Fagus crenata*) plantations established from seedlings of non-native genetic lineages. *Journal of Forest Research* 17: 116–120
- 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
- 黒田吉雄・内田煌二・佐藤美穂 (2001) ブナ・ミズナラの開芽・開葉に与える晩霜の影響. *森林立地* 43: 75–82
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3: 401–411
- 向井譲 (2008) ブナの受粉の分子生態学—自家不和合性と近交弱勢—. 寺澤和彦・小山浩正編, *ブナ林再生の応用生態学*. 文—総合出版, 東京, pp 71–79
- 中田誠・中山昇 (1995) 産地の異なるブナの成育状況とフェノロジー. *新潟大学農学部演習林研究報告* 28: 17–28
- 沼野直人・陶山佳久 (2006) 残存ブナ個体群における遺伝的多様性と空間的遺伝構造の大面积調査. *複合生態フィールド教育研究センター報告* 22: 31–37
- 布川耕市・塚原雅美 (2005) 産地別ブナの開葉時期. *新潟県森林研究所研究報告* 46: 19–22
- Okaura T, Harada K (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 322–329
- Okaura T, Quang ND, Ubukata M, Harada K (2007) Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica* var. *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes & Genetic Systems* 82: 465–477
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- 林野庁 (2012) 平成23年度森林・林業白書. <http://www.rinya.maff.go.jp/j/kikaku/hakusyo/23hakusyo/index.htm>
- 齋藤真己・長谷川幹夫・中島春樹 (2009) 富山県におけ

- るケヤマハンノキ天然林の遺伝的分化に基づく種苗配布区域の検討と地域性種苗の生産体制の安定化. 日本森林学会誌 91: 173–177
- Savolainen O, Pyhäjärvi T, Knürr T (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 595–619
- 森林総合研究所 (2011) 広葉樹の種苗の移動に関する遺伝的ガイドライン. 森林総合研究所, つくば
- 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, Takahashi M, Ohba K (1998) Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae) mitochondrial DNA. *American Journal of Botany* 85: 629–636
- 戸丸信弘 (2008) ブナ集団の遺伝的変異と遺伝的構造—地史的分布変遷の影響—. 寺澤和彦・小山浩正編, ブナ林再生の応用生態学. 文一総合出版, 東京, pp 187–211
- Tsuda Y, Kimura M, Kato S, Katsuki T, Mukai Y, Tsumura Y (2009) Genetic structure of *Cerasus jamasakura*, a Japanese flowering cherry, revealed by nuclear SSRs: implications for conservation. *Journal of Plant Research* 122: 367–375
- 津田吉晃 (2010) 森林樹木の遺伝的多様性保全と生態リスク. 日本生態学会誌 60: 349–359
- 津村義彦・岩田洋佳 (2006) 遺伝的データを用いた緑化のガイドラインとそれに基づく三宅島の緑化計画. 亀山章監修, 小林達明・倉本宣編, 生物多様性緑化ハンドブック. 地人書館, 東京, pp77–89
- 津村義彦 (2010) 広葉樹種苗配布の遺伝的ガイドライン. 林木の育種 235: 9–12
- 吉丸博志 (2004) 広葉樹の植林における遺伝子攪乱—地域性消失の危惧—. 林業技術 748: 3–7