

【第2回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

森林植物の交配様式と更新過程およびそれらの保全に関する研究

木村 恵^{*1}

はじめに

森林資源の持続的な利用と長期的な保存を進めるには森林を構成する樹木の交配様式と更新過程を明らかにすることが重要である。種子植物の多くは更新に関する繁殖様式として、種子繁殖に代表される有性生殖 (sexual reproduction) と栄養繁殖 (vegetative reproduction) を行うことが知られており、栄養繁殖を行う植物はクローナル植物と呼ばれ、温帯域に生育する植物の約7割を占める (van Groenendael and de Kroon 1990)。森林の主要な構成種である樹種もまた栄養繁殖として萌芽や伏条などのクローナル成長を行うため、個体性の判別が難しく更新過程を明らかにすることは難しい。また、樹木は大型で長命なため、有性生殖によって生産された種子の品質に関する、自殖率や送粉範囲などを直接観察することも困難である。1990年代以降、マイクロサテライトマーカー (Simple sequence repeat, SSR) などに代表されるDNAマーカーを活用することによって、直接的な観察だけでは調べることが困難であった交配様式や栄養繁殖による更新過程の実態など、樹木の繁殖に関する様々な現象が明らかになってきた (津村 2012)。

私自身も野外での経年的な調査に加えて、これらのパワフルなDNAマーカーを用いることで森林植物の生活史を明らかにしてきた。例えば、河畔性樹木のオニグルミにおいて、集団内に開花タイミングの異なる2つのタイプが存在し、相補的に交配するという特異な開花システムを明らかにした (Kimura et al. 2003)。さらにDNAマーカーを用いた花粉流動解析により、オニグルミの密度が低い集団ではタイプ内交配や自殖のようなイレギュラーな交配が生じることを明らかにし、生息域の断片化が個体群の維持にとって脅威となる可能性を示した (Kimura et al. 2012)。

最近ではスギの更新過程に着目し、複数の天然スギ

のクローン解析を行うことで、スギのクローン生産性には環境要因と遺伝的要因の両方が影響していることを明らかにした (Kimura et al. 2013a)。さらに、この研究成果を発展させることで長野県の戸隠神社奥社叢に成育するスギの遺伝解析を行い、現存の文献情報では抑えきれない森林利用の過程を明らかにした (木村ら 2013)。この他にも外来樹種ニセアカシヤなど多様な植物種を対象に研究を行ってきたが (例えば Kimura et al. 2013b)、本稿では先に述べたオニグルミの繁殖様式とスギの更新過程に関する成果について詳しく紹介したい。

河畔性樹木オニグルミの繁殖様式に関わる研究

近年、河畔林は人為的な攪乱により分断化と消失が進んでいる。様々な公益的機能を有する河畔林生態系について保全方法や管理方法を確立するためには、基礎情報として河畔林構成樹種の生活史を明らかにする必要がある。大学院に進学したばかりの私は、主要な河畔林の構成樹種としてオニグルミに着目し、その種子サイズの決定要因を探るというテーマで修士論文を開始した。オニグルミは雌花と雄花をつける雌雄異株同株植物である。開花や受粉のタイミングといった開花フェノロジーに焦点を当て観察を開始したが、これが簡単にはいかなかった。側芽として着生する雄花は開花前であっても容易に見分けられるが、雌花は頂芽の葉に包まれているため、展葉するまでわからない。しかもオニグルミの枝振りなどほとんどみたことが無い状態でのスタートである。半ば博打のような気分でマーキングした枝の観察を続けていた。雪解け後の5月、次々に展葉が始まり予想していなかったことが起こった。マーキングしていた半分の個体が雄花だけを開花させ、残りの半分の個体が雌花だけを開花さ

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

¹ きむら めぐみ 森林総合研究所林木育種センター

せたのだ(図-1)。興奮した私は研究室のメンバーに「図鑑には雌雄異花同株植物って書いてあるけど、実際には雌雄異株植物のようです!」と報告した。しかし、2週間もすると更に奇妙なことが起こった。最初は雄花を開花させていた個体でも雌花が成長し、次々に開花し始めた。同じく最初は雌花を開花させていた個体も雄花を伸長し開花した(図-1)。研究室のメンバーには「やっぱり図鑑の通りオニグルミは雌雄異花同株植物でした。」とあっさり前言撤回するも、この不思議な現象に心を奪われ、研究のテーマを種子サイズの決定要因から繁殖様式の解明にシフトして調査を進めることにした。

オニグルミでみられたように、集団内に雌性先熟個体と雄性先熟個体のふたつの開花タイプが存在する繁殖様式はヘテロダイコガミーと呼ばれ、様々な分類群で報告されている(Renner 2001)。2年にわたる詳細な野外調査から、オニグルミは雌花と雄花の開花時期をずらすことで自家受粉や同じ開花タイプ同士の交配を回避し、異なる開花タイプ間で相補的に開花することで、他殖を行っていると考えられた。また、開花タイプは一組の対立遺伝子で決定していると考えられており、劣性ホモ(*aa*)の場合は雄性先熟個体に、優性の場合(*AA*, *Aa*)は雌性先熟個体になると考えら

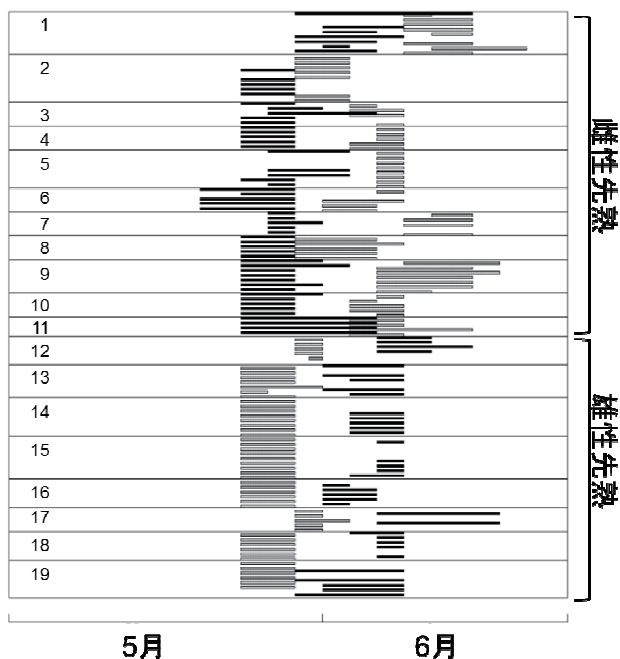


図-1 2000年の宮城県鬼首におけるオニグルミ19個体の開花期間。数字とボックスは個体を、黒線は雌花序、白線は雄花序を示す。Kimura et al. 2003を改変。

れている(Gleeson 1982)。ただし、集団内での交配は基本的には開花タイプ間でのみ生じるため、優性ホモ(*AA*)は生じず、雌性先熟個体はヘテロ(*Aa*)であると期待される。さらにヘテロの雌性先熟個体と劣性ホモの雄性先熟個体との交配から生じる次世代の開花タイプの比率は1:1となる。調査を行ったオニグルミ集団においても、ふたつの開花タイプはほぼ同じ頻度でみられており、この予測を支持していた。

このように、ヘテロダイコガミーは実に良くできた開花様式のように思われるが、一方で1回の開花イベントで交配相手を集団内の半分の個体に限定しているというリスクもある。この開花様式は集団内の繁殖個体数が少ない場合においても機能するのであろうか。そこで、開花個体の密度が低い調査地においてマイクロサテライトマーカーを用いた種子の親子解析を行うことによって、実際に種子生産に寄与している送粉について調べた。その結果、個体群密度の低い集団であっても開花タイプ間での交配が卓越しており、効率的に他殖を行っていることがわかった(図-2)。また、送粉距離に着目すると基本的には近距離交配が卓越していることもわかった。しかし、頻度は少ないものの、個体群密度が低下すると自殖やタイプ内交配といったイレギュラーな交配も生じていることが観察された。これらの結果は、繁殖可能な個体数を制限するような生息域の断片化はオニグルミ個体群の維持にとって脅威となる可能性を示している。

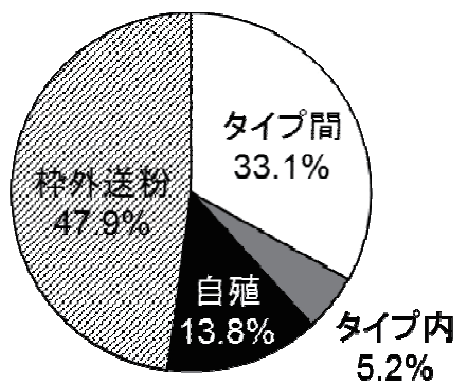


図-2 低密度のオニグルミ集団における交配様式の内訳。Kimura et al. 2012を改変。

スギ天然林における伏条繁殖のパターンと 遺伝要因と環境要因の影響

スギ(*Cryptomeria japonica*)は風媒、風散布の針葉

樹で、日本で最も重要な林業樹種のひとつである。その天然林は青森県鮭ヶ沢から鹿児島県屋久島まで広く多様な環境下に生育している。当初、私たちは日本各地のスギ天然林の存続の可能性を明らかにするため、林分全体を対象とした遺伝的多様性の評価と調査枠を設定し毎木調査による林分構造と遺伝構造を調査していた。道なき道を超えてたどり着いた先で、天然スギの大径木が雄大に生育する様は圧巻である。15 mの測管の先に鎌をくくりつけ、DNAサンプル用に針葉を採取する。0.25 haの調査区を設定し、その中に生育する全ての幹(ラメット)から針葉を採取し、遺伝構造を調べるサンプルとした。このような調査を秋田から徳島までのスギ天然林13集団で行った。ラメット数の平均値は67.4ラメットで、最少で24ラメット(徳島木頭)、最多で106ラメット(島根匹見1)であった。核マイクロサテライトマーカー8遺伝子座(*Cjg0077*, *Cjs0333*, *CS1219*, *CS1525*, *CS1364*, *CS1579*, *CS2169*, *Cjs0520*; Moriguchi et al. 2003; Tani et al. 2004)を用いた遺伝構造解析の結果を見てみると、このうち10集団で複数の幹が同じ遺伝子型(ジェネット)を示すこと、つまりクローナル繁殖が生じていることがわかった。また、同じ遺伝子型を示したラメットは比較的サイズが小さく、集中して分布していたことから、伏条や萌芽などによって更新したものだと考えられた。クローナル繁殖は植物の個体群動態と遺伝構造を特徴付ける重要な要因である。そこで私たちはスギ天然林のクローナル繁殖に着目して解析を進めることにした。

これまで伏条によるスギのクローナル繁殖は高標高(Taira et al. 1997; Moriguchi et al. 2001)や多雪地帯(Hirayama and Sakimoto 2008; Shimizu et al. 2002)などで報告されていたが、今回の調査では解析した13集団のうち10集団で観察された。つまり、スギ天然林においてクローナル繁殖による更新は一般的な現象であるといえる。しかし、クローナル繁殖の頻度は集団によって異なっており、調査区内に生育する半分以上のラメットがクローナル繁殖によって更新している集団もあれば(図-3a)、クローナル繁殖が全くみられない集団もみられた(図-3b)。

こうしたクローナル繁殖の頻度の違いはなぜ生じるのだろうか。まず、クローナル繁殖を行うかどうかは、生育地の環境によって変化すると考えられる。例えば積雪が多い場所では雪圧で幹や枝が地面に押し付けられて、クローナル繁殖が生じやすいかもしれない。しかし、積雪量が異なるほど地理的に離れてい

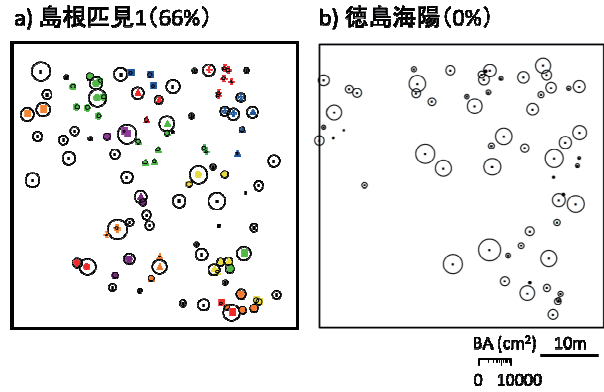


図-3 スギ天然林におけるラメットとジェネットの位置図。(a) 島根匹見1、(b) 徳島海陽。カッコ内の数値はクローナル繁殖によって生じたラメットの割合を、円のサイズは胸高断面積(BA)を示す。異なる色かつ異なるシンボルはそれぞれ異なるジェネットを、黒点はクローナル繁殖のみられなかったラメットを示す。Kimura et al. 2013を改変。

る集団はそもそも遺伝的にも異なる遺伝グループに属していて、伏条のしやすさも違うとも考えられる。そこでまず、屋久島を除く全国のスギ天然林36集団について遺伝子型を元にStructure解析(Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; Earl and vonHoldt 2012)を行うと、天然スギ集団は北日本型、日本海型、太平洋型の3つの遺伝グループに分かれることがわかった($K=3$)。次にクローナル繁殖の頻度を調べた13集団に属する全てのジェネットについて、遺伝グループの要素の組成(Q 値)を計算した。ジェネットごとの太平洋型の要素($Q_{\text{太平洋}}$ 値)を遺伝要因として、メッシュ気候値(気象庁 2002)から抽出した集団の積雪量を環境要因として着目し、伏条繁殖の頻度に与える影響を一般化線形混合モデルによって解析した。具体的には説明変数に環境要因(積雪深)、遺伝要因($Q_{\text{太平洋}}$ 値)、さらに個体サイズ(胸高断面積合計: BA)を用い、目的変数に各ジェネットが伏条繁殖するか否かとジェネットあたりのラメット数の2項目を用いて一般化線形混合モデルによりモデル選択を行った。その結果、伏条するか否かには $Q_{\text{太平洋}}$ 値、積雪深との交互作用、BAが選択され、積雪の多い地域では個体サイズが小さく、太平洋側要素の少ないジェネットほど伏条を行うという結果が得られた。またジェネットあたりのラメット数はBAが小さいほど増加する傾向がみ今回検出された遺伝グループはその地域環境に適応

してきた長い歴史を反映している可能性が考えられる。CAPSマーカーやSNPマーカーを用いた先行研究においても、全国の天然林は太平洋側と日本海側の遺伝グループに分かれる結果が示されており、それぞれの局所環境に適応してきた可能性が示唆されている (Takahashi et al. 2005 ; Tsumura et al. 2007 ; Tsumura et al. 2012)。例えば、北日本型、日本海型がみられる地域において、氷期のような厳しい環境下で個体群を維持するための重要な更新様式として伏条が機能してきたのかもしれない。このように、長い歴史の過程で生じた環境適応の可能性を示した結果は、今後の保護管理や育種開発において活用が期待される成果である。

戸隠神社奥社叢林に生育するスギの遺伝的多様性と遺伝的特性

戸隠奥社スギ並木を守る会 (以下、「守る会」) の方から、戸隠神社奥社参道のスギ並木の遺伝解析について問い合わせをいただいたのは、上記の調査と解析を進めている最中だった。守る会の方々は、貴重な文化遺産であり観光資源でもある奥社参道のスギ並木の景観を維持するため、社叢林の毎木調査を行い、倒木によって生じた隙間に補植を進めていく模索している有志の団体である。スギの生態に詳しい研究者を呼んで勉強会を開催し、今後の管理について議論されていた。その中で、補植用の苗を生産するためにスギ並木から選定した母樹が遺伝的に偏っていることを懸念され、DNAマーカーを用いて評価出来ないかとの相談をうけたのである。当時、マイクロサテライトマーカーによって全国の天然林の多様性を評価していた経緯から、私がお手伝いすることになった。守る会の方々と解析を進めていくうちに、またもや「クローナル繁殖」に関する興味深い結果が明らかになった。そこで戸隠神社奥社スギ並木を含む戸隠地方の社叢林の成立要因に注目し、新たな解析に舵を切ることにした。

戸隠神社奥社参道のスギ並木のように、神社や仏閣の境内に植栽、もしくは自生によって成立した林分は社叢林や社寺林と呼ばれ、社殿再建用の用材源として、また地域住民にとって象徴的な森林として祭事などの伝統・文化を支える場として活用されてきた。近年ではこれらの森林が有する防災、環境調節機能、オープンスペース、レクリエーション、動植物のハビタットなど様々な機能についても重要視されてい

る (稲垣ら 2004) 社叢林が保有するこれらの多面的機能を高めるためには、より自然林に近い形で維持・管理することが望ましいが (坂本 1999 ; Nakamura et al. 2005)、自然科学的な見地によって成立要因を検討された例は限られている (例えば金田 2009)。そこで本研究では戸隠神社社叢に生育するスギの保護・管理の基礎的なデータを得るために林分構造と遺伝的多様性・特性を調べ、その成立要因について考察した。

参道に沿って 500 m × 100 m のプロットを設定し、プロット内に生育する胸高直径 3 cm 以上のスギについて位置と胸高直径を調べたところ、直径階分布は二山型を示した (図-4)。この結果から、多くの個体は限られた時期の植林によって成立しており、現在の樹高成長量は低く、今後は補植が必要になると考えられた。前述の研究と同じ核マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座を用いて遺伝解析を行ったところ、解析した 60 ラメットは 21 ジェネットで構成され、このうち 5 ジェネットは複数のラメットで構成された。10 m 以上離れたラメットであっても同一のジェネットに属していたことから、挿し木による植林の可能性が示された。また、解析したジェネットごとのラメット数には偏りがあることから、特定のジェネットの挿し木定着率が高かった可能性が考えられる。さらに周囲の神社の社叢林のスギ (9 箇所 20 幹) と長野県の在来挿し木品種クマスギ (60 幹) を加えて血縁解析 (Colony2.0.3.3, Wang 2004 ; Wang and Santure 2009 ; Jones and Wang 2010) を行ったところ、奥社参道内、参道と周囲の社叢林、参道とクマスギとで血縁関係 (親

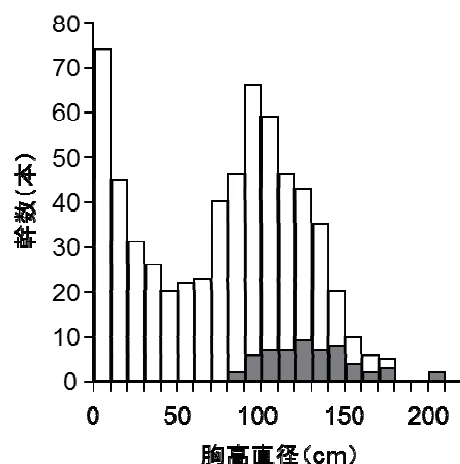


図-4 戸隠神社奥社叢林におけるスギの胸高直径階分布。毎木調査区内における胸高直径 3 cm 以上の全幹 (617 本、白抜き) と遺伝解析に用いた幹 (60 本、グレー)。木村ら (2013) を改変。

子、兄弟)が検出された。これら奥社参道のジェネットにおける遺伝的多様性の指数は天然林と同程度だが、Neiの遺伝距離 (D_A , Nei et al. 1983) に基づく主座標分析では天然林とは異なる特異な遺伝的特性を示しており、限られた母樹からの苗木による創始者効果の可能性が示された。

以上の結果を踏まえると、現在の奥社参道の社叢林が保持する遺伝的多様性・特性を維持するには、挿し木や血縁関係にある幹の重複を避けて母樹を選定し、苗木を生産することが有効であると考えられる。また、出現頻度は低いものの、600 m以上離れたラメットや、直線で約3 km離れた異なる社叢に生育するラメットであっても同じ遺伝子型を示し、挿し木によって長距離の移動を行ったと考えられるジェネットも存在した。これらのラメットは社殿に近い象徴的なスギであることから、信仰的な理由で挿し木されたと考えられる。戸隠神社社叢林の遺伝的多様性を維持するには、歴史を反映するこれらの遺伝子型の保存も重要であろう。戸隠神社社叢林の成立要因について調べたこれらの結果は、地域住民が古くから地域の森林を活用してきた経緯を示しており、日本文化における森林のあり方を考えさせる成果のひとつである。

おわりに

基本的に固着性である植物にとって、交配と更新のステージは数少ない「動ける」ステージであるため、その生活史は多様で進化的にも興味深い。今回紹介したオニグルミの交配様式やスギの更新過程に関する研究のように、詳細な野外調査の結果から生じた疑問や仮説が、DNA ツールを用いることで解き明かされていく過程は非常にエキサイティングである。これからも野を駆け、鎌とピペットを握り締めながら新たな研究の成果を発信することで森林科学と林業・育種の発展に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

この度、第2回森林遺伝育種学会奨励賞を賜り、これまでの研究が評価されたことを大変嬉しく思っております。これを励みに、今後さらに邁進したいと思います。ご推薦下さいました森林総合研究所の永光輝義室長、東北大学の陶山佳久准教授、選考にあたりご

高配頂きました森林遺伝育種学会の皆様に厚く御礼申し上げます。また、こうして研究を続けてこられたのは筑波大学の津村義彦教授はじめ森林総合研究所森林遺伝研究領域のメンバー、東北大学の清和研二教授、東京大学の練春蘭准教授、後藤晋准教授ほかここには書ききれない多くの方々のご指導、ご支援があったことです。この場をお借りして心より感謝申し上げます。最後に、いつも励まし支えてくれる家族に心より感謝いたします。

引用文献

- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method
- 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
- Gleeson S (1982) Heterodichogamy in walnuts: inheritance and stable ratios. *Evolution* 36:892–902
- Hirayama K, Sakimoto M (2008) Clonal structure and diversity of *Cryptomeria japonica* along a slope in a cool-temperate, old-growth mixed forest in the snowy region of Japan. *Canadian Journal of Forest Research* 38: 2804–2813
- 稲垣修・松本康夫・三宅康成 (2004) 多面的機能を継承する社叢林の保全管理の課題. 農業土木学会誌 72: 35–38
- Jones OR, Wang J (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology and Resource* 10: 551–555
- Kimura M, Goto M, Suyama Y, Seiwa K, Matsui M, Woeste K (2012) The effects of local density, sexual morph, and tree size on mating system and pollen dispersal in a low-density population of a wind-pollinated heterodichogamous tree, *Juglans ailanthifolia*. *Plant Ecology* 213: 1477–1487
- Kimura MK, Kabeya D, Saito T, Moriguchi Y, Uchiyama K, Migita C, Chiba Y, Tsumura Y (2013a) Effects of genetic and environmental factors on clonal reproduction in old-growth natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Forest Ecology and Management* 304: 10–19
- Kimura MK, Lian C, Hogetsu T (2013b) Isolation and characterization of chloroplast microsatellite markers in the invasive tree species *Robinia pseudacasia* L. *Silvae*

- Genetica 62: 4–5
- Kimura M, Seiwa K, Suyama Y, Ueno N (2003) Flowering system of heterodichogamous *Juglans ailanthifolia*: three-years study on two natural populations. *Plant Species Biology* 18: 75–84
- 木村恵・中村千賀・林部直樹・小山泰弘・津村義彦 (2013) 戸隠神社奥社社叢林に生育するスギの遺伝的多様性と遺伝的特性. *日本森林学会誌* 95: 173–181
- 金田憲明 (2009) 川上・川下から一神宮宮域林の管理運営-. *林木の育種* 233: 19–22
- 気象庁 (2002) メッシュ気候値 2000
- Moriguchi Y, Iwata H, Ujino-Ihara, T, Yoshimura K, Taira H, Tsumura Y (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theoretical Applied Genetics* 106: 751–758
- Moriguchi Y, Matsumoto A, Saito M, Tsumura Y, Taira H (2001) DNA analysis of clonal structure of an old growth, isolated forest of *Cryptomeria japonica* in a snowy region. *Canadian Journal of Forest Research* 31: 377–383
- Nakamura A, Morimoto Y, Mizutani Y (2005) Adaptive management approach to increasing the diversity of a 30-year-old planted forest in an urban area of Japan. *Landscape and Urban Planning* 70: 291–300
- Nei M, Tajima F, Tateno Y (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution* 19: 153–170
- Pritchard JK, Stephens M., Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959
- Renner SS (2001) How common is heterodichogamy? *Trends in Ecology and Evolution* 16:595–597
- 坂本圭児 (1999) 都市林の保全と管理. 岡田光正・大沢雅彦・鈴木基之編, 環境保全・創出のための生態工学, 32–42. 丸善, 東京
- Shimizu Y, Ando M, Sakai F (2002) Clonal structure of natural populations of *Cryptomeria japonica* growing at different positions on slopes, detected using RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 733–748
- Taira H, Tsumura Y, Tomaru N, Ohba K (1997) Regeneration system and genetic diversity of *Cryptomeria japonica* growing at different altitudes. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 447–452
- 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 Plant Research* 118: 83–90
- Tani N, Takahashi T, Ujino-Ihara T, Iwata H, Yishimura K, Tsumura Y (2004) Development and characteristics of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Annals of Forest Science* 61: 569–575
- 津村義彦 (2012) DNA マーカーの種類とその利用法. 津村義彦・陶山佳久編, 森の分子生態学2, 179–192. 文一総合出版, 東京
- Tsumura Y, Kado T, Takahashi T, Tani N, Ujino-Ihara T, Iwata H (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics* 176: 2393–2403
- 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
- Wang J (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: 1963–1979
- Wang J, Santure AW (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: 1579–1594
- van Groenendael J, de Kroon H (1990) Preface. In: van Groenendael J, de Kroon H (eds) *Clonal growth in plants: regulation and function*. Academic Publishing, Hague