

## 【第3回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

## 温帯広葉樹における花粉と種子を介した遺伝子散布に関する研究

中西 敦史<sup>\*,1</sup>

## はじめに

Wright (1943, 1946) のモデルでは、種子と花粉を介した遺伝子散布 (gene dispersal) は植物種の有効な集団サイズ ( $N_e$ ) に影響し、 $N_e$  は集団内の遺伝的変異に影響する (Crawford 1984)。さらに、個体間の遺伝的変異は各個体の環境条件への反応の差異を生じさせるため、個体群動態に影響する (Silvertown and Charlesworth 2001)。これらのことから、植物集団の進化的動態および個体群動態をより詳細に理解するためには、種子と花粉を介した遺伝子散布およびそれらの遺伝子散布が集団の遺伝的変異と構造に影響する過程を調べる必要がある。

本稿の調査地である長崎県対馬龍良山は古来人為による撈乱がなく約 100 ha もの照葉樹林が原生状態を保っている。そのため、本調査地における研究は照葉樹林構成樹種の本来の遺伝子散布特性を明らかにできる。本調査地では、これまで主要構成樹種であるウラジロガシ (*Quercus salicina*)、スダジイ (*Castanopsis sieboldii*) およびヤブツバキ (*Camellia japonica*) を対象にマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた集団遺伝学的研究が行われてきた (Nakanishi et al. 2004, 2005, 2009, 2012, 2015 ; Ueno et al. 2000, 2002, 2006)。

本稿では著者が担当したウラジロガシ (Nakanishi et al. 2004, 2005, 2009) とスダジイ (Nakanishi et al. 2012, 2015) の集団遺伝学的研究についてそれぞれ一部抜粋して紹介する。詳細は原著論文を参照されたい。また、ウラジロガシにおける花粉を介した遺伝子散布については、過去に中西 (2007) でとりまとめたものの、本稿では、その後に得られた成果とあわせて紹介する。なお、2 樹種とも同一の 4 ha プロットで研究されているが、ウラジロガシについては成木の調査範囲を 11.56 ha に拡大した。

## ウラジロガシにおける種子と花粉を介した遺伝子散布

## 花粉を介した遺伝子散布

ウラジロガシの花粉を介した遺伝子散布パターンと各種子親が受け取る花粉プールの種子親間および繁殖年間の遺伝的異質性を検証するため、排除法による父性解析 (Chakraborty et al. 1974) と TwoGener 解析 (Smouse et al. 2001) を行った。11.56 ha プロット内に生育する成木 111 個体、8 種子親から単繁殖年に採取した種子 276 個、および 6 種子親から 2 ~ 5 繁殖年に採取した種子 777 個 (単繁殖年に採取した 276 個の種子と構成は一部重複している) についてマイクロサテライト 7 遺伝子座の遺伝子型を決定した。父性解析の結果、52.2% の交配がプロット外からの 100 m を超える花粉流動によるものであった。一方で、プロット内の交配は両親間の距離に依存し、交配頻度は両親間距離の負の指数関数で説明された (図-1)。また、種子の両親間の血縁度 (Queller and Goodnight 1989) はランダムなペアに比べ有意に高かった。このことは、互いに近隣に位置する 2 個体の成木は空間遺伝構造が存在するため近縁で、さらに、局所スケールにおける距離に依存した交配パターンにより、高頻度に交配したためと考えられる。これらのことからウラジロガシの有効な花粉散布は長距離花粉流動と局所スケールにおける距離に依存した花粉散布の 2 つの過程から構成されていると考えられる。このことは他のコナラ属の研究 (Streiff et al. 1999) と一致し、風媒花粉散布の特性と考えられる。また、TwoGener 解析の結果、各種子親が受け取る花粉プールは種子親間で遺伝的組成が異なり、その遺伝的分化の程度 ( $\Phi_{FT}$ ) は種子親間の距離と有意な正の相関があった (図-2)。このことは局所スケールにおける花粉散布距離が制限されているため、近隣の種子親は遺伝的に似た花粉プールを受け取るためと考えられる。また、プロット外からの花粉プー

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

<sup>1</sup> なかにし あつし 森林総合研究所北海道支所森林育成研究グループ

ルはプロット内のものと遺伝的組成が異なったことから、長距離花粉流動はプロット内に新しいまたはプロット内で低頻度な遺伝子を導入し、局所集団の遺伝的多様性を高めると考えられる。さらに、各種子親が受け取る花粉プールの遺伝的組成は繁殖年間で異なった。このことから、花粉親の構成に年変動があり、この年変動が有効な花粉親数を増加させると考えられる。以上の結果から、長距離花粉流動および花粉散布の年変動が次世代の遺伝的多様性を高めていると考えられる。

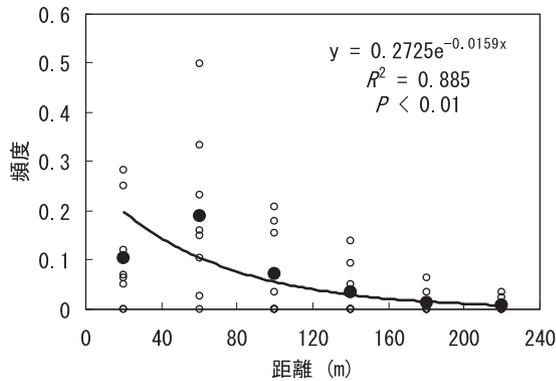


図-1 ウラジロガンにおける距離階級毎の交配頻度の分布。白丸は各種子親における交配頻度を示し、黒丸は全種子親における交配頻度の平均を示す。交配頻度は、種子親毎に各距離階級における交配回数を全交配回数で割ることで算出した。曲線は全種子親における交配頻度の平均を両親間距離の指数関数で説明したものである。Nakanishi et al. (2004) を改変。

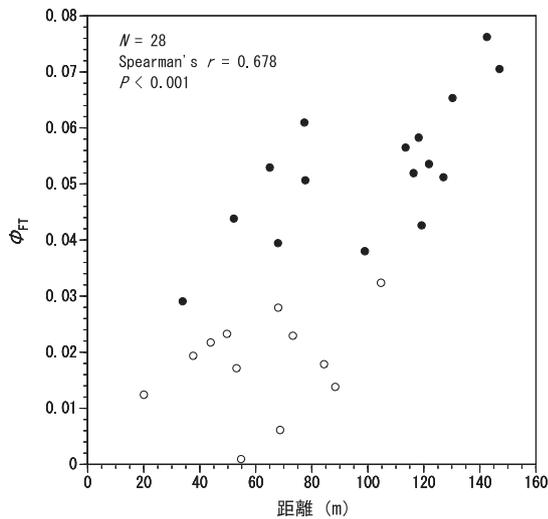


図-2 ウラジロガン種子親間の空間距離と花粉プールの遺伝的分化 ( $\Phi_{FT}$ ) の関係。黒丸は有意な  $\Phi_{FT}$  を、白丸は有意ではない  $\Phi_{FT}$  を示す。Nakanishi et al. (2004) を改変。

### 種子と花粉を介した遺伝子散布が稚樹の遺伝構造に与える影響

ウラジロガシの種子と花粉を介した遺伝子散布のそれぞれが稚樹の空間遺伝構造に与える影響を検証した。成木 111 個体および稚樹 226 個体について、10 マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型を基に最尤法による親子解析 (Gerber et al. 2000 ; Meagher and Thompson 1986) を行った。その結果、稚樹は両親の内、近い方の片親周囲に集中して分布していた (図-3)。また、全兄弟 (両親が同じ) および半兄弟 (片親が同じ) ペアの多くは近隣の稚樹間で構成され、両親を決定できた 83 個体の稚樹では、全兄弟ペアの 91.2% が互いに 25 m 以内に位置する稚樹 2 個体のペアで検出された (図-4)。この結果から、制限された種子散布により種子親周囲に母系半兄弟が密集するが、その母系半兄弟は近距離高頻度の交配に起因する correlated mating [同一母系内の異なる稚樹が同じ父親を共有する (Hardy et al. 2004)] により、花粉親も共有する全兄弟を含んでいると考えられる。また、稚樹個体間の同祖係数 ( $F_{ij}$ ; Loiselle et al. 1995) を調べた結果、強い空間遺伝構造が検出された。さらに、種子散布と花粉散布のそれぞれの影響を明らかにするため、稚樹の両親の内、稚樹に近い片親を種子親と仮定し、

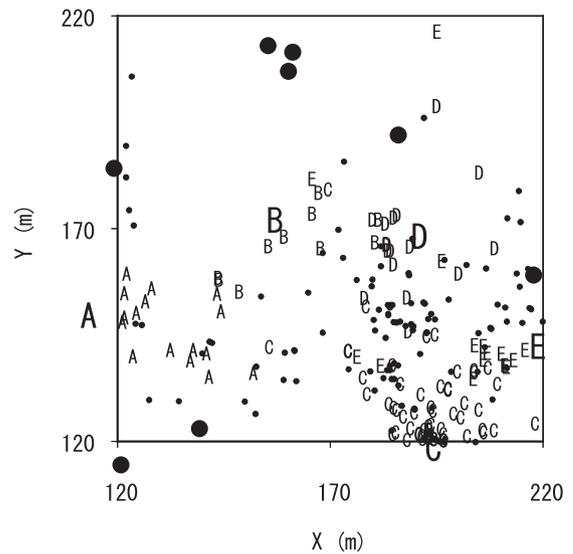


図-3 1-ha コアプロット内のウラジロガシ稚樹とそれらの近いほうの親の位置 (種子親と仮定される親)。大きいアルファベットは、小さい同じアルファベットで示される稚樹の親で、かつ、10 個体以上の稚樹を持つ親を示す。大きいまたは小さい黒丸はそれぞれ、1-ha コアプロット内および周辺の他の成木及び稚樹を示す。Nakanishi et al. (2009) を改変。

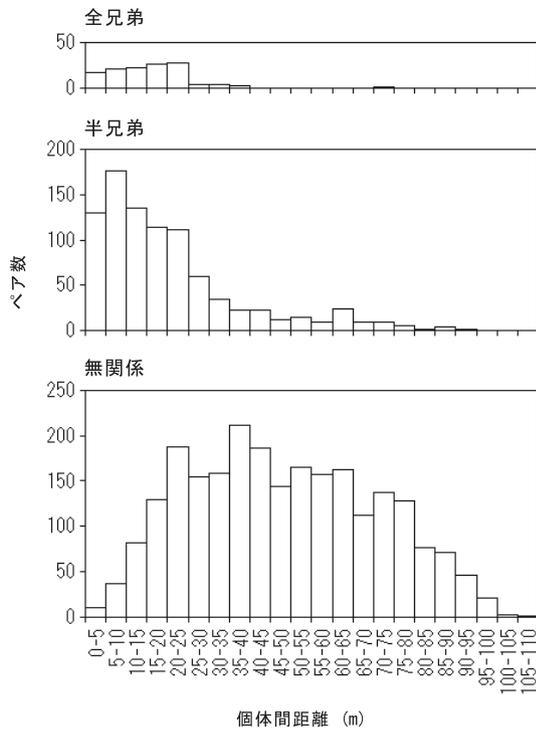


図-4 各距離階級における全兄弟、半兄弟および無関係のウラジロガシ稚樹のペア数。解析は両親を決定できた83稚樹で行った。Nakanishi et al. (2009) を改変。

稚樹の遺伝子を種子親由来と花粉親由来に区別し、それぞれについて空間遺伝構造を調べた。その結果、当然のことながら、種子親由来の遺伝子には強い空間遺伝構造がみられたが、花粉親由来の遺伝子にも弱い空間遺伝構造が検出された(図-5)。以上の結果から、種子散布だけではなく花粉散布もまた、correlated mating を通して全兄弟の集中分布に寄与することで、空間遺伝構造の程度に影響すると考えられる。

### スタジイにおける種子と花粉を介した遺伝子散布

#### 花粉を介した遺伝子散布

高密度に生育する高木樹種集団における虫媒花粉散布の研究は少ない。繁殖個体密度は有効な花粉散布に影響するため (Hardy et al. 2009)、虫媒であっても、高密度集団においては高頻度に近距離交配が起きていると考えられる。この予想を検証するため、4 ha プロット内に生育する花粉親候補 145 個体および 11 種子親から採取した種子 439 個について 8 マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型を基に集団遺伝学的解析を行った。指数べき乗関数を仮定し、改変ネイバフッドモデル (Adams and Birkes 1991 ; Burczyk et al. 2002 ; Chybicki and Burczyk 2010) により花粉散布カーネルを推定した結果、花粉散布はファットテール (指数関数に比べ減少はゆるやか) な散布カーネルで示されるように (形状母数 0.537)、潜在的に長距離散布であることが示された。しかし、最尤法による父性解析 (Gerber et al. 2000 ; Meagher and Thompson 1986) の結果、局所スケールにおける花粉散布距離は短く (35.1 m ± 28.4 SD)、累積された受粉パターンは距離に強く依存していた (図-6)。Hardy (2009) は次のように述べている。花粉散布カーネルは「1つの花粉が花粉源個体から離れたある場所に着陸する確率密度」、すなわち「基本的な散布パターン (pattern of primary dispersal)」を反映するが、有効な花粉散布はカーネルと受粉適地の配置 (本研究の場合、受粉可能な種子親の位置) に依存する。さらに、花粉散布は花粉が同種に受粉した時のみ有効であるため、個体密度および同種の空間配置は有効な花粉散布に影響し、成木個体密度が高いまたは成木個体が集中分布する場合、有効な花粉散布距離の平均は短くなることが期待されると述べている。これらのことから、局所スケールにおける平均受粉距離が短かったことは、成木個体密度が高く種子親近くに成木が存在したためと考えられる。また、

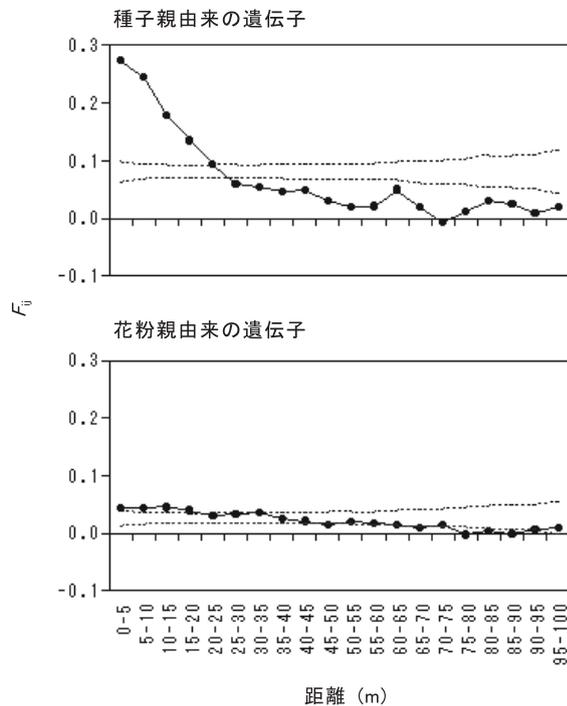


図-5 ウラジロガシ稚樹の種子親由来と花粉親由来の対立遺伝子における平均  $F_{ij}$  のコロログラム。破線は1000回の無作為化で作出した95%信頼区間。Nakanishi et al. (2009) を改変。

交配した両親間の平均同祖係数 ( $F_{ij}$ ; Loiselle et al. 1995) は任意交配ペアに比べ有意に高かった。このことは、互いに近隣に位置する2個体の成木は空間遺伝構造が存在するため近縁であり、さらに、局所スケールにおける距離に依存した交配パターンにより、高頻度に交配したためと考えられる。

### 稚樹段階で検出された近交弱勢と遺伝的影響

多くの森林樹木種集団における研究において、繁殖個体間に空間遺伝構造が存在する状況で近距離高頻度の交配が検出されている (Bittencourt and Sebbenn 2007; Isagi et al. 2007; Nakanishi et al. 2004, 2012)。この状況は、近親交配の頻度を高め、次世代の空間遺伝構造を強めると考えられる。しかしながら、一般的に森林樹木種集団で見られる空間遺伝構造は強くないことから (Vekemans and Hardy 2004)、近交弱勢などの要因が上記の過程を制限していると考えられる。この仮説を検証するため、成木個体間に空間遺伝構造が存在し、近距離高頻度の交配が確認されているスダジイ集団 (Nakanishi et al. 2012) において、稚樹段階における近交弱勢を検証した。成木125個体および稚樹899個体について、8マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型を基に集団遺伝学的解析を行った。稚樹の個体レベルにおける近交係数 [ $F_{is}$ ; 個体内の遺伝子間同祖係数 (Hardy and Vekemans 2002)] は成木より有意に高かった。しかし、稚樹の樹高階級毎の平均  $F_{is}$  を調べた結果、110 cm以上の樹高階級の平均  $F_{is}$  は、他の低い樹高階級 (30-50 cm ~ 90-110 cm) に

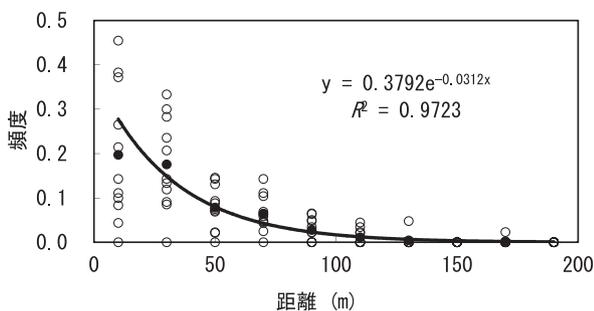


図-6 スダジイにおける距離階級毎の交配頻度の分布。白丸は各種子親における交配頻度を示し、黒丸は全種子親における交配頻度の平均を示す。交配頻度は、種子親毎に各距離階級における交配回数を全交配回数で割ることで算出した。曲線は全種子親における交配頻度の平均を両親間距離の指数関数で説明したものである。Nakanishi et al. (2012) を改変。

くらべ低くなった。さらに、林冠状態 (ギャップまたは閉鎖林冠下) を考慮した共分散分析の結果、稚樹の  $F_{is}$  は樹高に有意な負の影響を与えていた (図-7)。これらことから、実生定着後の近交弱勢に起因する稚樹の枯死または成長阻害により、サイズ段階が進むに従い、 $F_{is}$  が減少したと考えられる。以上の結果から近交弱勢が、次世代の近親交配のレベルの上昇や空間遺伝構造の強化を抑制すると考えられる。

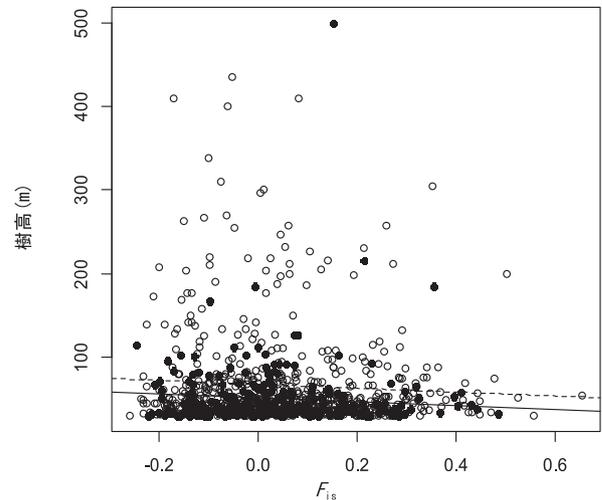


図-7 スダジイ稚樹における個体レベルの近交係数 ( $F_{is}$ ) と樹高の関係。黒丸と白丸はそれぞれ閉鎖林冠下と林冠ギャップ下の稚樹について示す。実線及び破線はそれぞれ閉鎖林冠下と林冠ギャップ下における樹高を  $F_{is}$  で線形回帰したものである。Nakanishi et al. (2015) を改変。

### おわりに

本研究では広く連続した集団を研究することで樹種本来の遺伝子散布を明らかにした。そのため本研究の成果は、孤立・小集団化が進む森林樹木集団の研究における重要なリファレンスとなり得る。今後は孤立・小集団化した集団について研究し、本研究の成果と比較することで、人為による影響を明らかにしたい。また、著者らの研究を含むこれまでの多くの局所スケールにおける遺伝子散布の研究では、核マーカーを使用するため、次世代の両親を種子親と花粉親に区別することが難しく、種子を介した遺伝子散布を直接的に明らかにできたものは少ない。そのため種子散布から定着・成長までの過程や種子親の次世代への影響などについて不明な点が多い。今後はオルガネラ遺伝マーカーを用いた

解析等により、直接的に種子散布パターンを明らかにし、種子散布パターンや母性繁殖成功のばらつきなどが集団の遺伝的変異や動態に与える影響を検証したい。最後に、鳥媒花粉散布樹種ヤブツバキについて、より詳細に遺伝子散布を明らかにし、ウラジログシおよびスダジイの成果とあわせて比較検討することで、花粉媒介者の違いによる遺伝子散布パターンの違いを検証し、照葉樹林主要樹種における遺伝的多様性維持機構をとりまとめた。

## 謝 辞

第3回森林遺伝育種学会奨励賞を賜り、大変光栄に思います。評価していただいた森林遺伝育種学会の皆様には厚く御礼申し上げます。また、長崎県対馬龍良山照葉樹原生林での研究を通し、懇切な指導を賜りました名古屋大学大学院生命農学研究科の戸丸信弘教授、岡山大学理事の山本進一教授、森林総合研究所の吉丸博志博士、河原孝行コーディネーター、上野真義チーム長および三浦真弘室長、北九州市立自然史博物館の真鍋 徹課長、群馬大学の西村尚之教授、住友林業の藤田孝志氏、およびその他ご協力いただいた多くの関係者に心より御礼申し上げます。

## 引用文献

- Adams WT, Birkes DS (1991) Estimating mating patterns in forest tree populations. In: Fineschi S, Malvolti ME, Cannata F, Hattemer HH (ed) , Biochemical markers in the population genetics of forest trees, 157–172. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands
- Bittencourt JVM, Sebbenn AM (2007) Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99: 580–591
- Burczyk J, Adams WT, Moran GF, Griffin AR (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Molecular Ecology* 11: 2379–2391
- Chybicki IJ, Burczyk J (2010) NM+: software implementing parentage-based models for estimating gene dispersal and mating patterns in plants. *Molecular Ecology Resources* 10: 1071–1075
- Crawford TJ (1984) The estimation of neighbourhood parameters for plant populations. *Heredity* 52: 273–283
- Chakraborty R, Shaw M, Schull WJ (1974) Exclusion of paternity: the current state of the art. *American Journal of Human Genetics* 26: 477–488
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, Bodenes C, Kremer A (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9: 1037–1048
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618–620
- Hardy OJ, Gonzalez-Martinez SC, Colas B, Freville H, Mignot A, Olivieri I (2004) Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae) . II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics* 168: 1601–1614
- Hardy OJ (2009) How fat is the tail? *Heredity* 103: 437–438.
- Isagi Y, Saito D, Kawaguchi H, Tateno R, Watanabe S (2007) Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *Journal of Ecology* 95: 983–990
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae) . *American Journal of Botany* 82: 1420–1425
- Meagher TR, Thompson E (1986) The relationship between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction. *Theoretical Population Biology* 29: 87–106
- Nakanishi A, Tomaru N, Yoshimaru H, Kawahara T, Manabe T, Yamamoto S (2004) Patterns of pollen flow and genetic differentiation among pollen pools in *Quercus salicina* in a warm temperate old-growth evergreen broad-leaved forest. *Silvae Genetica* 53: 258–264
- Nakanishi A, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S (2005) Interannual genetic heterogeneity of pollen pools accepted by *Quercus salicina* individuals. *Molecular Ecology* 14: 4469–4478
- 中西敦史 (2007) ウラジログシにおける花粉を介した遺伝子散布 . 林木の育種 224: 18–24
- Nakanishi A, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S (2009) Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina*

- saplings. *Heredity* 102: 182–189
- Nakanishi A, Yoshimaru H, Tomaru N, Miura M, Manabe T, Yamamoto S (2012) Patterns of pollen flow in a dense population of the insect-pollinated canopy tree species *Castanopsis sieboldii*. *Journal of Heredity* 103: 547–556
- Nakanishi A, Yoshimaru H, Tomaru N, Miura M, Manabe T, Yamamoto S (2015) Inbreeding depression at the sapling stage and its genetic consequences in a population of the outcrossing dominant tree species, *Castanopsis sieboldii*. *Tree Genetics & Genomes* 11: 62
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43: 258–275
- Silvertown JW, Charlesworth D (2001) Introduction to plant population biology, 4th edn. Blackwell Science, Oxford
- Smouse PE, Dyer RJ, Westfall RD, Sork VL (2001) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. I. Male gamete heterogeneity among females. *Evolution* 55: 260–271
- Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8: 831–841
- Ueno S, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S (2000) Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. *Molecular Ecology* 9: 647–656
- Ueno S, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S (2002) Size-class differences in genetic structure and individual distribution of *Camellia japonica* L. in a Japanese old-growth evergreen forest. *Heredity* 89: 120–126
- Ueno S, Tomaru N, Yoshimaru H, Manabe T, Yamamoto S (2006) Effects of canopy gaps on the genetic structure of *Camellia japonica* saplings in a Japanese old-growth evergreen forest. *Heredity* 96: 304–310
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology* 13: 921–935
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138
- Wright S (1946) Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39–59