

植栽年代の異なるクヌギ人工林の遺伝的組成

— 大陸産種苗植栽の可能性 —

齊藤陽子¹・瀬戸康弘²・井出雄二¹

Genetic composition of *Quercus acutissima* stands between two planted ages in Japan — Possibility of usage of seeds from the Continent —

Yoko SAITO¹, Yasuhiro SETO², Yuji IDE¹

1. はじめに

人工林は人間が作り管理する林である。そのため、その林を構成する林冠木の種組成を人間が決定する。さらには、より利用価値の高い生産物をつくるため、特定の森林から種子を採集する母樹林制度、形質の優れた個体を選抜し、それらを集積して交配させ種子を得る精英樹選抜育種、遺伝的に同一の個体を育成するクローン林業が、国内においてはスギやヒノキなどの主要な造林樹種について行われている。このような施業や施策は、林冠木の遺伝的な組成にも影響を与える。これまでに、ヒノキでは実生人工林の遺伝的多様性はその採種源となった母樹林のそれと比較して偏りがあること（湯ら, 1998）、長野県戸隠神社の社叢林のスギにはクローンが多いことや天然林とは異なる遺伝的組成をしていること（木村ら, 2013）が明らかになっている。このように人工林の遺伝的な組成は多かれ少なかれ施業、特に植栽種苗の遺伝的組成の影響を受けていると考えられる。一方、人工林の適切な管理については、環境変動に対する安定性の観点から、遺伝的多様性の維持が必要である（Ledig and Kitzmiller, 1992）と考えられるようになり、今後は人工林の遺伝的多様性を把握しておく必要がある。

また、人工林造成は必ずしも在来種苗が用いられるとは限らない。日本においては、主要な造林樹木であるスギ・ヒノキ・アカマツ・クロマツ以外は、林業種苗法による配布区域の定めがなく、広葉樹については最近になって研究者らによりガイドライン（津村・陶山, 2015）が提示された。無制限に種苗を移動することの問題点は、植林先の環境に適応できないため健全に育たず植林が失敗することと、植林地の近くに自生している同種の植物が本来持っている遺伝的な多様性や適応的な遺伝子を攪乱してしまうこと（津村・陶山, 2015）がある。そのため、現状では由来が不明である人工林でも、どのような由来の種苗が用いられたのかを明らかにしておく方が望ましいと考えられる。国内の広葉樹の人工林については、葉緑体 DNA の解析により、長野県および静岡県内に植栽されたブナ集団には近隣の天然林集団とは全く異なる系統のものが含まれていることが明らかになっており、遺伝子攪乱の恐れが指摘された（小山, 2011; 片井ら, 2014）。

1 東京大学大学院農学生命科学研究科生圏システム学専攻
Department of Ecosystem Studies, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
2 株式会社マイナビ
Mynavi Corporation

さらに、地域産でない個体は先枯れ発生率が高いことも示されている（小山, 2011）。

種苗の遺伝的多様性や由来を明らかにする研究では、葉緑体 DNA 解析と核 DNA 解析のどちらもそれぞれの利点がある。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）。そのため、種苗の由来を推測しやすく、これまでも葉緑体 DNA を用いた植栽個体の由来を検証する研究が、アオキ（矢野ら, 2005）、ブナ（小山, 2011; 片井ら, 2014）、ハナノキ（菊地ら, 2015）などで行われている。一方、両性遺伝する核 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（津田, 2012）。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や種内系統間の混合の推定が可能であり（津田, 2012; Hodel *et al.*, 2016）、植栽集団と由来となった集団とが同じクラスターを形成することが期待される。この手法は品種間の関係や品種の由来の推測などに利用例 ミカン（Shimizu *et al.*, 2016）、サクラ（金澤ら, 2016）がある。

クヌギは、植物遺体が縄文時代などの遺跡から発掘されている（島地・伊東, 1998）など、我が国において長年、人によって利用されている。その材は、古くから炭の原料として重宝されており（服部ら, 2005）、江戸時代にはすでに植林されていたとの記録がある（藤原, 1972）。さらに、明治時代にシイタケの人工栽培方法が確立されて以降（中村, 1983）、シイタケ原木としての需要が生じ、シイタケ原木として優良な個体を作成するための精英樹選抜や採種園造成など育種事業も行われてきた（安盛・小池, 1977; 田中, 1977; 森林総合研究所林木育種センター, 2016）。また、スギ、ヒノキ、カラマツといった主要な造林樹種の中で、人工林面積および蓄積のデータが収集される数少ない広葉樹であり、2012 年時点で、全国にあるクヌギ人工林は約 66,000ha（林野庁, 2016）とされている。このようにクヌギは、日本の広葉樹の中でも、とりわけ有用樹種として利用・植林されてきた。クヌギの造林は、1960 年代に生シイタケの生産量が急増し、原木の不足が生じたことに伴って、それ以降盛んに行われた（中村, 1983; 大庭・山手, 1977; 新谷, 1973）。さらに、このクヌギ造林面積の拡大から、クヌギの輸入種子による苗木生産が増えた（戸田ら, 1986）。これにより、クヌギ人工林の遺伝的組成に何らかの変化が生じた可能性がある。

そこで本研究では、1960 年代以前に植林されたクヌギ人工林と 1960 年代以後に植林されたクヌギ人工林の遺伝的組成を核 SSR マーカーと葉緑体 SSR マーカーを用いて明らかにし、急激な造林拡大によりクヌギ人工林の遺伝的組成が変化したか否かを検証した。特に、文献（戸田ら, 1986; 片野田ら, 2005）で示されている外国産種苗の植栽したことが遺伝解析からも検出できるか、また人工林の遺伝的組成が外国産種苗の影響を受けているか否かを明らかにするため、対照として、大陸の天然林集団を用いた。

2. 材料と方法

2.1 材料

静岡、山口、大分の 3 地域において、1960 年代以前に植栽された高齢のクヌギ林分を計 6 林分と 1960 年代以後の壮齢のクヌギ林分 12 林分、さらに大陸の韓国天然林 1 集団、中国天然林 2 集団の全 990 個体から葉を採取した。葉は DNA 抽出までシリカゲル入りのビニール袋の中で保管した。林分の位置、林齢区分、サンプル数を表 1 に示す。植栽時期は各県の森林簿によった。

表 1 解析に用いた日本のクスギ人工林 19 林分および大陸 3 集団の林齢区分, サンプル数, 位置, 遺伝的多様性および遺伝的分化係数

Table 1. Age category, number of samples, location, genetic diversity and genetic differentiation of 19 plantations in Japan and three continental populations of *Quercus actissima*

地域	林分	林齢区分	サンプル数	緯度(N)	経度(E)	核DNA			葉緑体DNA				
						H_E	A_R	F_{IS}	n	h	ht	G_{ST}	
静岡	静岡1	高齢林	48	35° 01'03	138° 59'00	0.662	8.58	0.094	2	0.041			
	静岡2		40	34° 53'19	139° 06'18	0.662	9.06	0.013	1	0			
		合計	88			0.662	8.82		2	0.020	0.022	0.092	
	静岡3		48	35° 57'49	138° 52'15	0.650	8.34	0.040	2	0.153			
	静岡4	壮齢林	48	35° 58'01	138° 52'06	0.689	9.69	0.029	8	0.701			
	静岡5		30	34° 57'12	138° 56'35	0.675	9.32	0.048	1	0			
		合計	126			0.671	9.12		8	0.285	0.425	0.330	
	山口	山口1	高齢林	40	34° 16'38	131° 18'58	0.693	9.75	-0.028	1	0		
	山口2		47	34° 16'39	131° 18'59	0.681	9.42	0.000	1	0			
	山口3		48	34° 16'04	131° 18'06	0.650	8.15	0.068	5	0.158			
	合計	95			0.665	8.79		5	0.079	0.082	0.037		
日本	大分1		47	33° 11'11	131° 16'38	0.683	9.16	-0.007	8	0.489			
	大分2	高齢林	48	33° 08'46	131° 16'23	0.678	8.57	0.079	1	0			
	大分3		47	33° 19'48	130° 57'16	0.675	9.36	0.077	5	0.161			
		合計	142			0.679	9.03		9	0.217	0.234	0.076	
	大分4		47	33° 07'32	131° 17'12	0.669	9.31	0.066	2	0.042			
	大分5		43	33° 07'31	131° 17'13	0.677	9.83	0.064	2	0.089			
	大分6		47	33° 07'31	131° 17'18	0.695	10.10	0.077	11	0.821			
	大分7		48	33° 07'03	131° 17'01	0.686	10.04	0.049	7	0.543			
	大分8	壮齢林	48	33° 07'29	131° 17'09	0.693	10.05	0.100 *	8	0.671			
	大分9		48	33° 09'27	131° 14'44	0.679	9.25	0.021	8	0.729			
	大分10		32	33° 09'43	131° 15'13	0.674	8.50	0.115	2	0.219			
大分11		46	33° 19'46	130° 57'15	0.671	9.15	0.092	6	0.560				
	合計	359			0.675	9.19		12	0.459	0.571	0.196		
大陸	韓国	韓国	48	37° 12'34	126° 59'25	0.689	9.35	0.059	8	0.623			
	中国1	天然林	45	27° 33'54	120° 19'07	0.836	11.96	0.058	6	0.642			
	中国2	天然林	47	30° 19'23	119° 49'51	0.868	13.08	0.067 *	7	0.652			
		合計	140			0.798	11.46		11	0.639	0.834	0.234	

H_E : ヘテロ接合度の期待値, A_R : アレリックリッチネス, F_{IS} : 固定指数, n : ハプロタイプ数, h : 林分の遺伝子多様度, ht : グループの遺伝子多様度, G_{ST} : 遺伝的分化係数

2.2 DNA 解析

採取した葉から DNA を改変 CTAB 法 (Lian *et al.*, 2003) により抽出した。遺伝マーカーとして、核 SSR マーカー 7 座, bcqm42 (Mishima *et al.*, 2006), ssrQpZAG15, ssrQpZAG36, ssrQpZAG110 (Steinkellner *et al.*, 1997), CsCAT15 (Marinoni *et al.*, 2003), QM50, QM69-2M1 (Isagi and Suhandono, 1997), および葉緑体 SSR マーカー 6 座, $\mu dt1$, $\mu dt3$, $\mu dt4$, $\mu cd4$, $\mu cd5$, $\mu kk4$ (Deguilloux *et al.*, 2003) を用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit (Qiagen co.) を用い、各プライマーの濃度が 0.2 μM となるよう反応液を調整した。PCR 条件は、初期活性化 95°C · 15 分の後、熱変性 94°C · 30 秒、アニーリング 54°C (核マーカー) または 48°C (葉緑体マーカー) で 90 秒、伸長反応 72°C · 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°C 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。

2.3 遺伝データ解析

核 SSR のデータを基に、各対立遺伝子の頻度と遺伝的多様性の指数 (A_R , H_E , F_{IS}) を F_{STAT} (Goudet, 1995) で求めた。地域間あるいは林齢区分によって遺伝的多様性が異なるかを、1000 回の permutation によって F_{STAT} (Goudet, 1995) を用いて検証した。また、Pritchard *et al.* (2000) のアルゴリズムに基づいて開発された STRUCTURE2.3.4 (2009) を用いてベイジアンクラスターリングを行った (以下、STRUCTURE 解析)。クラスター数 K は 1 から 8、100,000 回の burn-in 期間の後、マルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションを 100,000 回行った。STRUCTURE HARVESTER (Earl *et al.*, 2012) を用いて ΔK (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 SSR6 座のフラグメントサイズに基づいて、ハプロタイプを分類し、各個体の葉緑体ハプロタイプを決定した。各林分のハプロタイプ頻度を基に、林分の遺伝子多様度 (h), 全林分の遺伝子多様度 (ht), および遺伝的分化係数 (G_{ST}) を求めた。 h に地域間差があるかを明らかにするため、Kruskal-Wallis 検定で、林齢区分間に差があるかを Mann-Whitney 検定で検定した。また Populations (Langella, 2007) を用いて林分間の遺伝距離 ($\delta \mu$)² (Goldstein *et al.*, 1995) を算出し、近隣結合法による系統樹を 1000 回のブートストラップを行って作成した。

3. 結果

日本 19 林分, 中国大陸 3 集団, 全 990 個体について核 SSR マーカー 7 座を用いて解析した結果は, 表-1 のとおりである。日本の人工林の A_R は 8.15 (山口 3) ~ 10.10 (大分 6), H_E は 0.650 (静岡 3, 山口 3) ~ 0.695 (大分 6) の間であった。これら A_R と H_E の多様性指数については, 地域別では H_E , A_R ともに静岡 < 山口 < 大分であったが, 有意な差ではなかった (表-2)。また, 高齢林, 壮齢林の林齢区分でも差がなかった。また, 韓国集団 A_R が 9.35, H_E は 0.689 と日本の人工林と同程度であったが, 中国の 2 集団 (A_R : 11.96, 13.08, H_E : 0.836, 0.868)

表-2 日本のクヌギ人工林 19 林分の地域別, 林齢区分別の遺伝的多様性および遺伝的分化係数
Table 2. Genetic diversity and genetic differentiation of area or age category of 19 plantations in Japan

	集団数	サンプル数	核DNA					葉緑体DNA			
			H_O	H_S	A_R	F_{IS}	F_{ST}	h_s	ht	G_{ST}	
地域別	静岡	5	214	0.637	0.667	8.997	0.045	0.014	0.179	0.282	0.365
	山口	3	135	0.664	0.674	9.108	0.015	0.032	0.053	0.058	0.095
	大分	11	501	0.636	0.680	9.392	0.065	0.023	0.393	0.495	0.206
林齢区分	高齢林	6	270	0.634	0.673	9.319	0.058	0.011	0.115	0.135	0.147
	壮齢林	13	580	0.648	0.675	9.078	0.041	0.050	0.360	0.480	0.249

H_O : ヘテロ接合度の観察値, H_S : ヘテロ接合度の期待値, A_R : アレリックリッチネス, F_{IS} : 固定指数, F_{ST} : 遺伝的分化係数, h_s : 林分の遺伝子多様度, ht : グループの遺伝子多様度, G_{ST} : 遺伝的分化係数

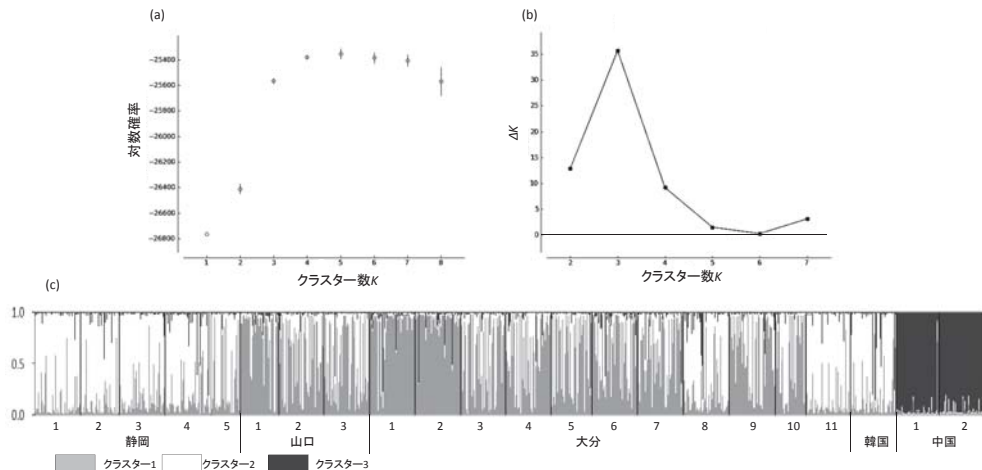


図-1 STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリング (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) クヌギ 22 林分における各個体ごとの 3 つのクラスターの混合割合

Fig. 1 Bayesian clustering using STRUCTURE. (a) Changes in the log probability of the data and (b) ΔK statistic. (c) Admixture proportions of two and three genetic clusters in 22 populations of *Quercus actissima*

は突出して高かった。集団の分化は、日本国内で地域別の F_{ST} を比較すると山口>大分>静岡の順で分化係数が高く、高齢林より壮齢林の方が高かったが、いずれも有意ではなかった。STRUCTURE によるベイジアンクラスタリングの結果、データの対数確率は K が 5 まで上昇した (図-1)。また ΔK はクラスター数が 3 の時最大となった。 K が 3 のとき、韓国集団の個体はクラスター2、中国2集団の個体はクラスター3に属した。日本の人工林はクラスター2が優占する林分 (静岡 1, 2, 3, 4, 大分 8, 11), クラスター1が優占する林分 (山口 1, 大分 1, 2) と、クラスター1と2の混合の林分とがあった (図-1)。それぞれのクラスターの F_{ST} はクラスター1で 0.0547, クラスター2で 0.0572, クラスター3で 0.0353 と、クラスター3が最も低かった。解析を行った $K = 2 \sim 8$ の範囲で、韓国集団が日本集団と明確に異なるクラスターを形成することはなかった。

表-3 検出された 16 ハプロタイプと各地域における頻度

Table 3 Sixteen haplotypes detected in *Quercus actissima* and the frequency in Japanese and continental populations

マーカー ハプロタイプ	μcd4	μcd5	μdt1	μdt3	μdt4	μkk4	ハプロタイプ頻度			
							日本		大陸	Total
							高齢林	壮齢林		
a	100	81	90	127	137	115	-	0.005	-	0.003
b	101	81	90	126	137	115	0.007	0.009	0.036	0.012
c	101	81	90	127	136	115	0.004	-	-	0.001
d	100	81	90	127	138	115	0.004	0.031	0.036	0.024
e	101	81	90	127	137	115	0.004	0.002	0.029	0.006
f	101	81	90	128	136	115	0.022	0.164	0.200	0.130
g	101	81	90	129	135	115	-	0.002	-	0.001
h	101	81	90	127	138	115	-	0.009	-	0.005
i	101	81	90	128	137	115	0.007	0.002	0.214	0.033
j	102	81	90	128	136	115	-	0.010	0.243	0.040
k	102	81	90	127	138	115	0.007	0.009	0.007	0.008
l	102	81	90	129	136	115	0.004	0.007	0.014	0.007
m	103	81	90	127	137	115	-	-	0.100	0.014
n	101	81	90	129	138	115	0.011	0.036	0.057	0.032
o	101	81	90	129	139	115	0.930	0.700	0.064	0.673
p	102	82	91	128	137	115	-	0.016	-	0.009

表-4 日本のクスギ人工林 19 林分および大陸 3 集団のハプロタイプ頻度

Table 4 Frequency of haplotypes in 19 plantations in Japan and three continental populations of *Quercus actissima*

地域	林分名	林齢区分	サンプル数	ハプロタイプ頻度																
				a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	Total
静岡	静岡1	高齢林	48	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.98	-	1.00
	静岡2	高齢林	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
	静岡3	高齢林	48	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	0.92	-	1.00
	静岡4	壮齢林	48	-	-	-	0.10	0.02	0.35	-	-	-	-	0.02	0.02	-	0.06	0.40	0.02	1.00
	静岡5	壮齢林	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
	山口1	高齢林	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
	山口2	高齢林	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
	山口3	壮齢林	48	0.02	-	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	0.92	0.02	1.00
	大分1	高齢林	47	-	0.02	-	0.02	0.02	0.11	-	-	0.04	-	0.04	-	-	0.04	0.70	-	1.00
	大分2	高齢林	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
	大分3	高齢林	47	-	0.02	-	-	-	0.02	-	-	-	-	0.02	-	-	0.02	0.91	-	1.00
大分4	高齢林	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.98	-	1.00	
大分5	高齢林	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	0.95	-	1.00	
大分6	高齢林	47	0.02	0.04	-	0.13	-	0.30	-	0.06	-	0.02	0.02	0.02	-	0.06	0.23	0.09	1.00	
大分7	高齢林	48	-	0.02	-	0.04	-	0.25	-	-	0.02	-	0.02	-	-	0.02	0.63	-	1.00	
大分8	壮齢林	48	-	-	-	-	-	0.33	-	0.02	-	0.02	0.04	0.04	-	0.04	0.46	0.04	1.00	
大分9	壮齢林	48	0.02	0.02	-	0.06	-	0.35	-	-	0.06	-	-	-	-	0.10	0.35	0.02	1.00	
大分10	壮齢林	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.88	-	1.00	
大分11	壮齢林	46	-	0.02	-	0.04	-	0.30	-	0.02	-	0.02	-	-	-	-	0.59	-	1.00	
大陸	韓国	韓国	48	-	0.02	-	-	0.04	0.58	-	-	0.06	0.02	0.04	-	0.15	0.08	-	1.00	
	中国	中国1	45	-	-	-	0.04	0.04	-	-	-	0.09	0.53	-	-	0.24	-	0.04	-	1.00
		中国2	47	-	0.09	-	0.06	-	-	-	-	0.55	0.15	-	-	0.06	0.02	0.06	-	1.00

葉緑体 DNA を解析した結果、日本 19 林分、大陸 3 集団、全 990 個体から 16 個のハプロタイプが検出された (表-3)。そのうち、日本国内では 15 個のハプロタイプが検出され、ハプロタイプ *m* のみ日本になかった。大陸集団からは 11 個のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ *o* が日本において高齢林 0.930、壮齡林 0.700 と最も頻度が高かった。また日本の林分のうち、高齢林 3 林分、壮齡林 2 林分がハプロタイプ *o* に固定されていた (表-4)。林分ごとの遺伝子多様度 (*h*) は、ハプロタイプ *o* に固定されていた林分があるため、日本では 0 から 0.821 (大分 6) と幅があった (表-1)。大陸では 0.623 から 0.652 と高い値であった。日本の林分の地域ごとの遺伝子多様度 (*ht*) は山口<静岡<大分、林齢区分ごとでは、高齢林<壮齡林であった (表-2)。また、それぞれの地域ごとでも、高齢林<壮齡林であった (表-1)。集団間の分化は地域別では山口<大分<静岡、林齢区分では高齢林<壮齡林となった (表-2)。($\delta \mu$)² に基づく近隣結合法による系統樹では、日本の林分のクレードと大陸集団のクレードの間に壮齡の大分の 5 林分と静岡 4 が位置したが (図-2)、これらが別のクレードを形成することはなかった。

4. 考察

4.1 クヌギ人工林の遺伝的な地域性について

核 DNA および葉緑体 DNA、いずれも大分で多様性が高い傾向があった。特に葉緑体 DNA

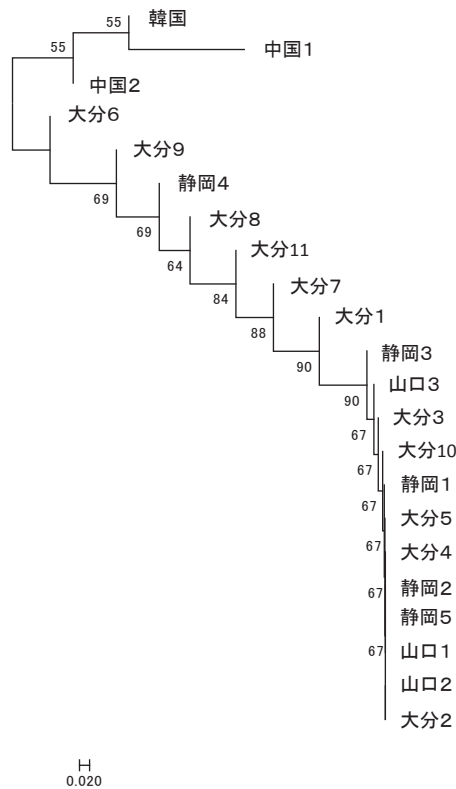


図-2 クヌギ 22 林分の葉緑体 DNA の ($\delta \mu$)² に基づく NJ デンドログラム

Fig. 2 Dendrogram of 22 populations of *Quercus actissima* based on ($\delta \mu$)² of chloroplast haplotypes

では、ハプロタイプ *o* に固定されている林分が静岡は 5 林分中 2 林分、山口は 3 林分中 2 林分であるが、大分は 11 林分中 1 林分のみであったことが、葉緑体 DNA の多様度の高さにつながったものと考えられる。齊藤ら（印刷中）が解析した宮城県、埼玉県、岡山県にそれぞれ生育するクスギの天然更新 3 集団全てがこのハプロタイプ *o* に固定されており、本州のクスギ林に広域的に分布しているハプロタイプであると考えられる。静岡では 1 林分を除く 4 林分および山口の 3 林分のクスギ林はこれら本州の一般的なクスギ天然更新集団と同じ遺伝的由来の種苗が植栽されたと考えられる。一方、大分ではハプロタイプ *o* が優占している林分が多いものの、その他のハプロタイプも比較的高い比率を占める林分もある。これらの林分は、ハプロタイプの系統樹では、大陸集団と静岡・山口の林分との間に位置していた。また、表-4 からも、これらの集団は、韓国集団に高頻度で見られるハプロタイプ *f* が比較的高頻度で見られた。このことから、大分では大陸と遺伝的に近い種苗も使用したクスギ林が多いと考えられる。このような遺伝的組成を持つ種苗が大分に植栽された背景には次の 2 つのシナリオが考えられる。

- 1) 大分の在来集団は、大陸集団と遺伝的に近縁であった。
- 2) 大分の人工林の一部は、大陸からの輸入種苗を植栽した。

一つ目のシナリオの場合は、大分の林分は互いにより似通った組成になり、系統樹では日本のクレードと大陸のクレードとの間に連続的に位置するのではなく、独立したクレードを形成すると期待される。また、大分 2、大分 4、大分 5 のようなハプロタイプ *o* の頻度が非常に高く、本州の天然林と同じような組成の林分も同時に存在することに疑問が持たれる。一方、シナリオ 2 は、九州地方の在来集団のデータがないため結論付けることが難しい。しかし、宮崎県に 1966 年植栽（戸田ら、1986）、熊本県に 1976 年植栽（戸田ら、1989）の韓国産種苗の植栽林分があり、鹿児島県には 1994 年植栽の中国産種苗の植栽林分がある（片野田ら、2005）ことが報告されている。したがって、このような外国産種苗を大分でも植栽し、本研究の結果は植栽した人工林の遺伝的特徴を検出したと考えても矛盾はない。また、大分の林分は外国産種苗の混合割合の程度によりハプロタイプ頻度が林分ごとに異なったため、系統樹も日本と大陸の 2 つのクレードの中間的な位置になったと解釈できる。

一方、核 DNA の STRUCTURE 解析からは、日本のクスギ人工林は中国とは遺伝的に全く異なっているが、韓国とは同じクラスターに属することが明らかとなった。そのため、大分が大陸と遺伝的に近い在来種苗を利用したものであるというシナリオ 1 と矛盾しない。一方で、シナリオ 2 であった場合、大分では中国産ではなく主に韓国産種苗が用いられた可能性が高いと考えられる。

4.2 クスギ人工林の遺伝的な世代間差について

国内全林分をまとめて解析した結果では、核 DNA および葉緑体 DNA の林分の遺伝子多様性 (h) では世代間で有意な違いは見られなかった。しかし、葉緑体 DNA の全林分の遺伝子多様性 (ht) では高齢林より壮齢林で遺伝子多様性が高かった（表-2）。特に地域ごとに見ると静岡および大分で壮齢林の ht が高齢林の ht より明らかに高かった（表-1）。これも上記のように壮齢林では、ハプロタイプ *o* の頻度が相対的に低く、検出されるハプロタイプ数が複数であることが多いためである。これらの壮齢林は、クスギの急激な造林に伴って、広範な種苗の流通が行われたためと考えられ、上記のように遺伝的に大陸産種苗に近い種苗が使用されたと考えられる。

核 DNA の STRUCTURE 解析では、山口の高齢林および大分の高齢林 2 林分でクラスター 1 が優占していた。このクラスター 1 は静岡の高齢林および韓国集団ではほとんど見られないことから、西日本の林分で古くから利用されている種苗に由来するものの可能性がある。

以上をまとめると、静岡、山口、大分の 3 地域において山口は壮齢林であってもハプロタイプ o が非常に高頻度であり、在来集団由来の種苗のみ使用されていたと推察された。また、静岡では 1960 年代以降の造林が盛んであったころ、遺伝的に大陸に近い林分も見られ、一部に大陸産種苗が利用されたことが考えられる。一方、大分では、1960 年代以降のみならず、より古い時期からハプロタイプの多様性が高く、遺伝的に大陸の林分に近い林分があるため、早くから大陸産種苗を利用していた可能性があるというように、地域、時代によってクヌギ種苗の入手先が異なっていたことが考えられる。このことにより、遺伝的多様性の地域間差、世代間差が明確ではない一方、地域ごとの G_{ST} の大小にも反映されたのであろう。また農林省統計表によると 1970 年の全国のシイタケ原木の生産量は、大分県 1 位、静岡県 3 位、山口県は 27 位（農林省 1971）であった。したがって、1960 年代以降の急激な造林は、クヌギ人工林の遺伝的な特性に影響を与えたが、その影響の程度は地域の社会的な状況、おそらくシイタケ生産が盛んであるか否か、により異なっていたと言える。

外国産あるいは国内であっても在来でない種苗の利用については、自生種であっても遺伝子攪乱の恐れから避けるべき（日本緑化工学会, 2002）と言われている。しかし、クヌギについては、本研究およびその他の記録（戸田ら, 1989; 大久保・片野田, 2007）から以前から導入されて各地に植栽されてきたことが明らかである。さらに、クヌギが日本に天然分布しているか疑問も呈されている（倉田, 1973; Fukamachi *et al.*, 2003）。これらのことから、クヌギについてはすでに人為による攪乱が大きく、地域の在来ではない種苗を利用することによる影響は小さいという考え方もありうる。しかし、一方で、クヌギの近縁種でクヌギと交雑するアベマキは、日本の在来種であると考えられているが、広島県から山形県までの範囲の 7 集団で葉緑体ハプロタイプを調べたところ、クヌギと同じ葉緑体ハプロタイプ（ハプロタイプ o）に全集団が固定されており（齊藤ら, 印刷中）、また現在でも両種が同所的に生育する場所では交雑を行っている可能性が高い（齊藤ら, 印刷中; 齊藤・井出, 2017）。そこに、葉緑体ハプロタイプが異なるクヌギの種苗が導入されると、アベマキにこれまで存在しなかった葉緑体ハプロタイプが取り込まれて、アベマキに対する遺伝子汚染が起こる可能性がある。したがって、アベマキが近くに分布する地域にクヌギを植栽する際には、種苗の入手先や遺伝的組成に留意する必要がある。

謝辞

本研究は平成 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。遺伝解析に際してご助言いただきました津田吉晃博士に感謝申し上げます。

引用文献

Deguillous, M., Dumolin-Lapegue, S., Gielly, L., Grivet, D. and Petit, J. (2003) A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3: 24-27.

- Earl, D. A. and Bridgett, M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005) Detecting the number of cluster of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611-2620.
- 藤原正人 (1972) 明治前期産業発達史資料 補巻 33. 290pp., 明治文献資料刊行会, 東京
- Fukamachi, K., Oku, H., and Rackham, O. (2003) A comparative study on tees and hedgerows in Japan and England. In *Landscape Interfaces*. Palang, H. and Fry, G. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 53-69.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavallo-Sforza, L.L. and Feldman, M.W. (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellites loci. *Genetics* 139:463-471.
- Goudet, J (1995) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.
- 服部保・南山典子・松村俊和 (2005) 猪名川上流域の池田炭と里山林の歴史. *植生学会誌* 22: 41-51.
- Hodel, R., Segovia-Salcedo, M., Landis, J., Crowl, A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M., Douglas, N., Germain-Aubrey, C., Chen, S., Soltis, D., Soltis, P. (2016) The Report of My Death was an Exaggeration: A Review for Researchers Using Microsatellites in the 21st Century. *Applications in Plant Sciences* 4: 1-13.
- Isagi, Y. and Suhandono, S. (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6: 897-899.
- 金澤弓子・亀山慶晃・李景秀・濱野周泰・鈴木貢次郎 (2016) 早咲きのサクラ品種とカンヒザクラ地域集団の遺伝的關係. *園芸学研究* 15:129-138.
- 片井秀幸・山田真也・平岡宏一・星川健史・戸丸信弘・高橋誠 (2014) 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. *森林遺伝育種* 3:101-110.
- 片野田逸郎・森田茂・小山孝雄 (2005) 中国産クヌギの形質的特性とシイタケ原木としての特性. *九州森林研究* 58:109-114.
- 菊地賢・金指あや子・大曾根陽子・澤田興之・野村勝重 (2015) 絶滅危惧種ハナノキの自生地域における近縁外来種アメリカハナノキの植栽混入. *日緑工誌* 40: 457-464.
- 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.
- 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－. *長野県林総セ研報* 25:45-64.
- Langella, O. (2007) Populations 1.2.31: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). <http://bioinformatics.org/populations/>
- Legis, F.T., and Kitze, J.H. (1992) Genetic strategies for reforestation in the face of global climate change. *For. Ecol. and Management* 50:153-169.
- Lian, C.L., Oishi, R., Miyashita, N., Nara, K., Nakaya, H., Wu, B.Y., Zhou, Z.H., and Hogetsu, T. (2003) Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 609-618.
- Marinoni, D., Akkai, A., Boundous, G., Edwards, K.J. and Botta, R. (2003) Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding* 11: 127-136.
- Mishima, K., Watanabe, A., Isoda, K., Ubukata M. and Takata, K. (2006) Isolation and characterization of microsatellite loci from *Quercus mongolica* var. *crispula*. *Molecular Ecology Notes* 6: 695-697.
- 中村克哉 (1983) シイタケ栽培の史的研究. 502 pp., 東京出版, 東京.
- 日本緑化工学会 (2002) 生物多様性保全のための緑化植物の取り扱いに関する提言. *日本緑化工学会誌* 27: 481-489.
- 農林省 (1971) XI 林業の部 (2) 素材交通量 (5) しいたけなめこ原木生産. 259pp., 第47次農林省統計表, 農林統計協会, 東京.
- 大庭喜八郎・山手広太 (1977) シイタケ原木用クヌギの育種. *林木の育種* 103: 7-14.
- Pritchard, J., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

- 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.
- 齊藤陽子・津田吉晃・内山憲太郎・福田知秀・井出雄二 (印刷中) 日本産アベマキ (*Quercus variabilis*) の遺伝構造. 森林遺伝育種学会誌
- 島地謙・伊東隆夫 (1988) 日本の遺跡出土木総覧. 259 pp., 雄山閣出版, 東京.
- Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Kaminuma, E., Nakamura, Y. (2016) Hybrid Origins of *Citrus* Varieties Inferred from DNA Marker Analysis of Nuclear and Organelle Genomes. PLoS ONE11: e0166969
- 新谷安則 (1973) シイタケ原木としてのクヌギの育種. 林木の育種 79:6-8.
- 森林総合研究所林木育種センター (2016) 平成 28 年度版林木育種の実施状況及び統計. 90pp., 大成印刷, 茨城.
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E., and Glössl, J. (1997) Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. Molecular Ecology 6: 1189-1194.
- 林野庁 (2016) 森林・林業統計要覧. 260pp.
- 田中勝美 (1977) シイタケ原木の育種. 林木の育種 103: 15-18.
- 湯定欽・池田裕行・渡邊良弘・村瀬一隆・井出雄二 (1998) 異なる繁殖方法により造成されたヒノキ人工林分の遺伝的多様性. 東京大学農学部演習林報告 99: 125-132.
- 戸田忠雄・藤本吉幸・西村慶二・山手廣太 (1986) 輸入種子による 18 年生クヌギ林分の調査結果. 九州林木育種場年報 13: 100-106.
- 戸田忠雄・西村慶二・藤本吉幸・山手廣太 (1989) 輸入種子によるクヌギ 10 年生林分の調査結果. 九州林木育種場年報 17:69-73.
- 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.
- 津村義彦・陶山佳久 (2015) 地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン. 170pp., 文一総合出版, 東京.
- 矢野初美・小沼明弘・芝池博幸・井手任 (2005) アオキ (*Aucuba japonica* Thunb.) の遺伝的解析を通してみた緑化植物の流通の現状. 環境情報科学学術研究論文集 19:291-296.
- 安盛博・小池茂男 (1977) シイタケ原木の育成と生成. 林木の育種 103:19-23.

(2017 年 9 月 14 日受付)

(2017 年 11 月 15 日受理)

要旨

クヌギは、1960 年代以降シイタケ原木として需要が高まり、急激に造林が進んだ。この時代の前後でクヌギ人工林が遺伝的に異なるかを明らかにするため、静岡、山口、大分で、クヌギ高齢人工林 6 林分、壮齢人工林 13 林分および対照として大陸の韓国 1 集団、中国 2 集団、計 990 個体を核 SSR マーカー 7 座および葉緑体 SSR6 座で解析した。その結果、核 DNA の多様性は中国集団が高く、日本の人工林では林齢区分や地域による明確な違いはなく、韓国集団と同程度であった。また STRUCTURE 解析では、 $K=3$ の時、中国集団が異なるクラスターを形成した。葉緑体ハプロタイプは 16 個検出され、静岡 5 林分中 4 林分、山口全 3 林分、大分 11 林分中 4 林分で同じ特定のハプロタイプの頻度が 90% 以上であった。一方、大陸ではそのハプロタイプの頻度は低かった。葉緑体の $(\delta \mu)^2$ に基づき近隣結合法により作成した系統樹では、大陸と日本の 2 つのクレードが形成されたが、その中間に位置する人工林もあった。ハプロタイプの多様度は、高齢林より壮齢林で高い傾向があった。これらのことから、地域によっては 1960 年代前後でクヌギ人工林の遺伝的特性が異なり、韓国産種苗がそれにかかわっていた可能性があることが示唆された。

キーワード：シイタケ原木、種苗流通、葉緑体ハプロタイプ、核 SSR、地域性

Summary

The number of *Quercus acutissima* plantations increased after the 1960s due to rising demand for logs for shiitake mushroom cultivation. To clarify the genetic differences among stands before and after the 1960s, we analyzed six old plantations and 13 mature plantations in Shizuoka, Yamaguchi, and Oita, one population in Korea, and two continental populations in China, (a total of 990 individuals), using seven nuclear microsatellite markers and six chloroplast microsatellite markers. The genetic diversity of nuclear DNA was high in Chinese populations and no clear differences were detected between old and mature plantations in Japan. The results of STRUCTURE analysis showed three genetic clusters, one each for the Chinese populations and Japanese plantations and the Korean populations were an admixture of the other two clusters. Sixteen chloroplast haplotypes were detected and one specific haplotype dominated all Japanese plantations; however, its frequency was low among continental populations. The proportions of plantations in which the frequency of the dominant haplotype exceeded 90% for old and mature plantations respectively, were 4/5 in Shizuoka, all 3 in Yamaguchi, and 4/11 in Oita. The neighbor-joining dendrogram showed two clades, one for Japanese populations and the other for continental populations, with several Japanese plantations between the two clades. Holotypic diversity was higher in mature plantations than in old ones. The genetic characters of *Q. acutissima* plantations in Japan changed after the 1960s, perhaps due to the influence of Korean seeds and seedlings.

Keywords: mushroom log, seed and seedling distribution, chloroplast haplotype, nuclear SSR, area