

博士論文

日本におけるコナラ属クヌギ節樹木の遺伝構造と

その形成要因

齊藤 陽子

日本におけるコナラ属クヌギ節樹木の遺伝構造と その形成要因

第一章	緒言	1
1-1	はじめに	1
1-2	日本産コナラ属クヌギ節二種の特徴	2
1-3	本研究の目的と本論文の構成	5
第二章	樹木の遺伝構造	8
2-1	遺伝構造とその研究	8
2-2	遺伝マーカー	12
2-3	日本産樹木の遺伝構造の特徴	13
2-4	コナラ属樹木の遺伝構造	14
第三章	日本産クヌギの遺伝構造	17
3-1	はじめに	17
3-2	葉緑体 DNA	17
	材料と方法	18
	サンプル採取	18
	葉緑体 SSR 解析	18
	遺伝データ解析	18
	結果	21
	検出されたハプロタイプ	21
	ハプロタイプの地理的分布	21
	集団の遺伝的多様性と集団間分化	26
	集団間の遺伝的な関係	26
	考察	28
	クヌギの葉緑体 DNA の遺伝的多様性と遺伝構造	28
	遺伝的分化	31
3-3	核 DNA	32
	材料と方法	32
	サンプル採取	32
	核 SSR 解析	32
	遺伝データ解析	33
	結果	35
	集団の遺伝的多様性	35
	集団間分化と集団間の遺伝的な関係	38
	考察	43
	クヌギの核 DNA の遺伝的特徴	43
	遺伝構造	43
3-4	考察	46
	日本産クヌギの遺伝構造	46
第四章	日本産アベマキの遺伝構造	47
4-1	はじめに	47
4-2	材料と方法	47
	サンプル採取	47

	DNA 解析	50
	遺伝データ解析	50
	核 DNA	50
	葉緑体 DNA	51
4-3	結果	51
	核 DNA	51
	葉緑体 DNA	52
4-4	考察	55
第五章	クヌギとアベマキの浸透交雑	58
5-1	はじめに	58
5-2	材料と方法	59
	サンプル採取	59
	葉裏の星状毛数のカウント	60
	DNA 解析	60
	遺伝データ解析	61
5-3	結果	61
	葉裏の星状毛密度	61
	葉緑体 DNA のハプロタイプ	63
	核 DNA からみた遺伝的多様性	63
	遺伝的混合	64
	星状毛密度とクヌギまたはアベマキクラスターへの帰属 割合	66
5-4	考察	66
	葉裏の星状毛密度から見た交雑帯の存在	66
	交雑帯における浸透交雑	67
	星状毛密度から予想される交雑の程度と遺伝的混合との 関連	69
第六章	植栽年代の異なるクヌギ人工林の遺伝的組成	71
6-1	はじめに	71
6-2	材料と方法	73
	サンプル採集	73
	DNA 解析	73
	遺伝データ解析	73
6-3	結果	75
6-4	考察	80
	クヌギ人工林の遺伝的な地域性	80
	クヌギ人工林の遺伝的な世代間差	81
第七章	総合考察	83
7-1	クヌギおよびアベマキの遺伝構造に対する両種の浸透交雑の 影響	83
7-2	クヌギおよびアベマキの遺伝構造に対する人間活動の影響	85
7-3	クヌギ種苗の今後の取り扱い	88
	謝辞	90
	追記	91
	引用文献	92

第一章 緒言

1-1 はじめに

クヌギ(*Quercus acutissima*)あるいはアベマキ(*Quercus variabilis*)とされる植物遺体が、縄文時代から古墳時代にかけての遺跡から発掘されている(島地・伊東 1988)。一般にクヌギとアベマキの植物遺体は識別が困難であるため、クヌギ類またはクヌギ節と表記されることが多い。出土したクヌギ節木材の用途は、建築材、杭、作業台の他、農用の石斧直柄、横槌、横鋏などであった(伊東 1990)。

また、クヌギは、種子(どんぐり)が縄文時代(光永 2006)および弥生時代(光永 2007)の遺跡から出土しており、食用とされたと考えられている。その他、クヌギの古名をツルバミといい、その実のかさ(殻斗)の煮汁で衣を染めた(吉野 2009)。クヌギ材は古くから炭の原料として重宝されており、兵庫県と大阪府との県境地域は室町時代よりクヌギ炭の産地であり、その炭は池田炭と呼ばれの茶の湯に賞用されてきた(服部ら 2005)。熊本県でも江戸時代の1780年にクヌギによる製炭の記録がある(農林省 1933a)。またクヌギの植栽記録は江戸時代から存在し、現在の岩手県、茨城県、静岡県、三重県、大阪府、熊本県で見られる(徳川 1941)。ほかにも、徳島県(1837年)、茨城県(1840年)、神奈川県(1860年)(藤原 1972)、鹿児島県(1791年)(農林省 1933b)、福岡県(1794年)にクヌギを植栽したとの(農林省 1933c)記述があり、全国的に幅広く植栽されていた。

さらに、明治期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た。特に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、クヌギの造林が活発化した(中村 1983; 大庭・山手 1977; 新谷 1973)。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設置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、クヌギは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、全国のクヌギ人工林は約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、有用樹種としてもっとも大規模に利用されてきた。

他方、アベマキについては、クヌギほど情報は多くないが、江戸時代の1853年に鳥取県で植栽された記録がある(農水省1933d)。また、アベマキは、その樹皮がコルク質であることから、コルクの代替として、昭和初期には研究と利用が進められた(例えば野崎1936;佐多・豊東1939)。戦後になっても、コルクの代替品や炭としての利用が推奨された(倉田1951)。しかし、アベマキはクヌギと異なり、シイタケ原木として不適當であるとされる(橋詰・金川1988)。

以上のように、クヌギとアベマキは日本において、数千年にわたる利用の歴史がある。

1-2 日本産コナラ属クヌギ節二種の特徴

ブナ科コナラ属は、生態的にも経済的にも重要な分類群である(Aldrich and Cavender-Bares 2011)。北半球に400種ほどあり、5大陸に分布し、立木材積のかなりの部分を占めている(Aldrich and Cavender-Bares 2011)。材は多くの用途があり、古代から人間とのかかわりが深い(大場1989)。果実は食料や野生動物の重要な餌となる(大場1989)。コナラ属は、*Cyclobalanopsis* 亜属と *Quercus* 亜属とからなり、*Quercus* 亜属は、*Quercus* 節(コナラ節)、*Virentes* 節、*Lobatae* 節、*Cerris* 節(クヌギ節)で構成される(Manos et al. 2001)。さらに *Cerris* 節は *Brachylepides* 亜節と *Cerris* 亜節で構成され、クヌギとアベマキは、*Cerris* 亜節に属する(Manos et al. 2001)。日本において *Cerris* 節に属するのは、クヌギとアベマキの2種のみである。

クヌギは、本州(岩手県・山形県以南)四国、九州、琉球、朝鮮半島、中国、インドシナ半島からヒマラヤにかけての広い地域に分布する(大場1989)。コナラとともに関東の雑木林を構成する代表的な種として知られる(梶2012)。落葉高木で、樹皮は灰褐色で不規則に割れる(大場1989)。葉の形はクリによく似ているが、クリの葉の鋸歯は先端まで葉緑体があ

り緑色をしているのに対して、クヌギの鋸歯の先端はそれを欠き、褐色である点で区別できる(梶 2012)。

アベマキは、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いる(松原・広木 1980)。コルク層が比較的よく発達し、樹皮は灰褐色、縦に不規則に割れる(大場 1989)。

クヌギとアベマキはよく似ているが、クヌギはアベマキに比べ幹のコルク層の発達が良くない(梶 2012)。また葉の形態は、一般にクヌギよりアベマキの方が整生で幅が広く、クヌギの葉には腰細のものがある。クヌギは成葉の裏面に葉毛がほとんどないのに対し、アベマキは星状毛が密生する(橋詰・金川 1988)。

アベマキとクヌギは種間交雑を行うと考えられてきた(北村・村田 1979)。両種の間隔的な形質を備えた個体の存在が古くから知られており、ミヅアベ(倉田 1949)やアベクヌギ(橋詰・金川 1988)などと呼ばれる。間隔的な形質を示す個体は、中国地方など(橋詰・金川 1988)で見られるが、天竜川流域で現在でも両種が交雑していると考えられる交雑帯が存在することが、Hiroki and Kamiya (2005)によって指摘されている。

クヌギは日本において広域に分布するにもかかわらず、クヌギの由来は明らかとなっていない。実際には山地では天然更新しているものはほとんど見ることはできず、人間の居住地近くで見られる。倉田(1976)は、クヌギが日本の在来樹木であるかについて疑問を呈している。また、Fukamachi et al. (2003)も、クヌギはコナラやミズナラのような在来のナラとは異なり森林内でまれであり、里山では在来のナラは雑木林となっているがクヌギは通常刈り込まれていることから、クヌギは中国から導入されたものではないかと考察している。そのためか、クヌギの生態的位置に関する研究はほとんどないが、山中(1979)は、暖温帯の本来、カシ類、シイ類などを主とした常緑樹林であるところが人為によってコ

ナラ・クヌギ・アカマツになっているとしている。クヌギに関する研究としては、萌芽更新林分の植生(伊東ら 2010; 島田ら 2008)に関する研究、緑化用造林種苗の成長(Banez et al. 1999; 橋詰・韓 1993)や生理特性(山中ら 2007; 養父ら 1998)およびシイタケ原木としての育種(山田ら 2011)に関するものがある。一方、アベマキについては日本原産であることに疑問を呈している文献はない。研究としては種子生産性(Hiroki 2000)、萌芽能力(山瀬 2012)、緑化種苗としての発芽特性(橘ら 2010)などがあるが、クヌギ同様に生態的な位置に関する研究は少ない。しかし、分布の規定要因を解明するための種子や稚樹の生理生態学的研究がある(広木・松原 1977; 松原・広木 1980; 松原・広木 1985)。

両種の分布変遷に関しては、日本列島におけるクヌギ節の過去における分布解明につながる直接的な花粉分析データはない。しかし、クヌギの生育環境と考えられる暖温帯常緑樹林帯は最終氷期に九州の古屋久半島周辺に限定されていたことが花粉分析で示されている(Tsukada 1985)。また、今から約 6 千年前の最も気候が温暖な時に関東地方まで拡大したことが花粉分析から示されている(安田・三好 1998)。さらに、材や花粉の形態からクヌギとアベマキを識別することは困難であるため、いずれの種であるかは判断が難しいが、日本列島では縄文時代(16500 年前～3000 年前)からクヌギ節の植物遺体が発見されており(島地・伊東 1988)、関東地方での出土もある(鈴木・能代 1997)。Zhang et al. (2015)によるエコロジカルニッチモデリング(ENM)によれば、クヌギの生育地は最終氷期(ca. 21,000 years BP)には、日本列島には見られない。これらのことから、クヌギは最終氷期には日本列島には生育していなかったか、九州周辺の一部生育地に限られており、最も気候が温暖な時期に関東周辺まで北上したと考えられる。アベマキについては、Chen et al. (2012)で ENM が行われており、日本列島は不安定な生育地であったとされているが、南日本(Southern Japan)に最終氷期のレフュージアがあった可能性があると考えられている。

遺伝構造に関する研究では、中国のクヌギについて、葉緑体 DNA シーケンスと核 SSR 解析が行われており(Zhang et al. 2015)、過去の分布

変遷が推定されている。アベマキについては、日本、台湾、韓国、中国の葉緑体 DNA シーケンスが行われており (Chen et al. 2012)、最終氷期のレフュージアが中国中東部および朝鮮半島に存在したと推察された。また、日本列島に多型がなく、ボトルネックを受けていることが示唆された。

1-3 本研究の目的と本論文の構成

日本には 15 種のコナラ属樹木が生育し (大場 1989)、研究者にとって身近な存在であり、特に温帯域で生態的な研究が多く行われてきた (例えば Abrams et al. 1999; Sakai et al. 1999)。しかし、遺伝構造に関する研究は近年充実してきてはいるものの (例えば Kanno et al. 2004; Okaura et al. 2007; Ohsawa et al. 2011; San et al. 2017)、日本産コナラ属クヌギ節 2 種 (クヌギおよびアベマキ) については全く行われていない。次章で述べるように、生物種の遺伝構造は分布変遷や近縁種との交雑などの影響を受けるため、遺伝構造を解明することは対象種の履歴を推定するのに有効な手段である。また、両種は天然林ではなく、主に二次林に育成する。二次林とは一般的には、伐採や火災などにより森林が破壊された後に、自然に生じた森林をいい (只木 1993)、かつての農用林としての雑木林もこの二次林に含まれる。アベマキは中部以西の二次林に分布する主要な樹種である。人間活動の影響を強く受けるこのような二次林は日本列島に広域に分布するにもかかわらず、二次林に主に生育する種の遺伝構造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、天然林に主に生育する樹種のみならず、このような二次林の構成樹種についても遺伝構造の解明が求められる。

そこで、本研究では、クヌギとアベマキの遺伝的多様性と遺伝構造を葉緑体 DNA マーカーおよび核 DNA マーカーを用いて、両種の遺伝構造を包括的に明らかにし、その遺伝構造の形成に浸透交雑や人間活動が影響を与えた痕跡があるかを検証する。また、今後も植栽が行われると考えられるクヌギについて、留意すべき点について考察した。

本論文は、7章からなり、本章以降の構成は以下のとおりである。

第一章(本章)：緒言

クヌギおよびアベマキの日本人との関わり、2種の分類学上の位置、分布変遷についての既存研究について記述した。

第二章：樹木の遺伝構造とその研究

樹木の遺伝構造に関する一般的な知見と既存研究について、まとめる。また、種々の遺伝マーカの特徴と本研究で使用するマーカの利点について述べる。さらに、日本産樹木の遺伝構造の特徴および本研究の対象としたコナラ属樹木の遺伝構造に関する既存研究についてレビューする。

第三章：日本産クヌギの遺伝構造

日本全体のクヌギの遺伝的多様性と遺伝構造を把握することを目的とした。クヌギは河川沿いの肥沃な土壌の明るい立地に生育する他は、山地ではほとんど見ることができず、日本に天然分布であるか否かも疑いを持たれている(倉田 1976; Fukamachi et al. 2003)。そこで、天然更新集団のみならず人工林のクヌギの遺伝的特徴も同時に解明し、両者の遺伝的な関係も明らかにする。日本産のクヌギ人工林 17 集団および河川沿いに天然更新したクヌギ 28 集団を対象として、(3-1)葉緑体 DNA および(3-2)核 DNA について、それぞれ Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーを用いて解析を行った。比較対照として、韓国産および中国産のクヌギ 13 集団を用いた。

第四章：日本産アベマキの遺伝構造

日本産のアベマキの遺伝的多様性と遺伝構造を把握することを目的に、天然更新 5 集団、人工林 1 集団、由来不明 1 集団を対象として葉緑体 DNA および核 DNA、それぞれ SSR マーカーを用いて解析を行った。比較対照として、クヌギ天然更新 3 集団を用いた。

第五章：クヌギとアベマキの浸透交雑

クヌギとアベマキの遺伝構造の成立要因を解明するためには、両者の交雑の影響を明らかにすることが必須である。これまで両種の中間的な形態を示す個体が野外で観察されることから、交雑が起こっていると考えられてきた(北村・村田 1979; 橋詰・金川 1988)が、本当に交雑個体であるのかの証明はなされていなかった。本章では、両種の交雑帯として知られる長野県飯島町周辺(Hiroki and Kamiya 2005)のコナラ属クヌギ節樹木の葉の形態と遺伝的特徴を調べ、両種の交雑を遺伝的側面から明らかにすることを目的とした。

第六章：クヌギ人工林の植栽年代と遺伝的組成

クヌギは、長年、日本において人間に利用されている。特に、明治期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た。さらに 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、クヌギの造林は盛んに行われた(中村 1983; 大庭・山手 1977; 新谷 1973)。これにより、林分の遺伝的組成に何らかの変化が生じた可能性がある。そこで本章では、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特徴を核 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が遺伝的に変化したか否かを検証した。

第七章：総合考察

本章では、第三章から第六章までの結果を基に、クヌギおよびアベマキの分布変遷、遺伝構造に対する両種の浸透交雑および人間活動の影響について考察し、さらに今後のクヌギ種苗の取り扱いについて見解を述べた。

第二章 樹木の遺伝構造

2-1 遺伝構造とその研究

生物種の遺伝構造とは、種の遺伝的組成の空間分布パターンのことである(津村・陶山 2015)。遺伝構造は多くの生物種で見ることができ、樹木種にも存在している。種の分布変遷、環境適応、他種との交雑等などにより遺伝構造は形成される(Dumolin-Lapègue et al. 1997; Tsuda et al. 2017)。他方、自然のプロセスだけでなく、長年にわたる人間活動、例えば種苗の移動、育種、栽培化、環境改変なども樹木の遺伝構造に影響を与える(Gunn et al. 2011; Baldoni et al. 2006)。そのため、対象種の遺伝構造を明らかにすることにより、その種の分布変遷や種間交雑、人間活動の影響などが推察されてきた。

次に遺伝構造に影響を与える要因について、主要な既存研究をまとめる。多くの樹木では現在の遺伝構造の形成に最終氷期(およびそれ以前の氷期)における分布の縮小と、その後の温暖化に伴う分布拡大に代表される種の分布変遷が強く影響したことが知られている。多くの遺伝構造に関する研究は、このような分布変遷に関する研究であり、特にヨーロッパにおいてはこれまでに大規模かつ系統的な研究がなされてきた。Petit et al. (2003)は、同じ森林に生育する22の樹種および灌木について、25の森林において葉緑体DNAハプロタイプの多様性を調べた。その結果、森林内の遺伝的多様性はヨーロッパの南部である地中海沿岸の集団で高いが、各森林のハプロタイプ数はヨーロッパ中部で高くなっていた。このことは、これまで花粉分析から分かっている地中海エリアの小さな環境の良い場所だけでなく、南部の辺縁部にも氷期のレフュージアが存在しており、これら複数のレフュージアから分布拡大したものがヨーロッパ中部で混合したためと考えられた。また、同様に *Fagus sylvatica* について Magri et al. (2006)は、葉緑体ハプロタイプのみならず、花粉分析および大型植物化石のデータ、さらに核マーカであるアイソザイムデータを用いて、現在の遺伝構造とそれを形成した分布変遷を考察した。これにより、地中海レフュージアは中央および北部ヨーロ

ッパへの分布拡大には寄与しておらず、地中海レフュージアとは離れた場所にあった中央ヨーロッパのレフュージアから広く拡大したこと、山地帯は分布拡大の地形的な障壁にはならず、むしろ拡散を促進したことが推察された。さらに Bagnoli et al. (2016)は、*Quercus cerris* の葉緑体ハプロタイプ分布と花粉分析データから、これまでに指摘されていなかった地中海東部のレフュージアの存在を明らかにした。北米大陸においても遺伝構造と分布変遷に関する多くの研究がなされている。例えば、最終氷期以降のように *Populus balsamifera* が分布を拡大したかを明らかにするため、北アメリカの 34 集団について核 SNP マーカーで解析され、現在の分布の中心部から北および東に分布を拡大したと考えられた (Keller et al. 2010)。他方、*P. balsamifera* について同じ範囲で 40 集団について葉緑体 DNA のシーケンスを行い、Kellear et al.(2010)とは異なり現在の分布の南部に最終氷期のレフュージアが存在したと考察した (Breen et al. 2012)。針葉樹の *Abies balsamea* では、母性遺伝するミトコンドリア DNA と父性遺伝する葉緑体 DNA を用いて、氷期のレフュージアが 5 か所存在したことを明らかにし、それぞれの分布拡大経路を考察した (Cinget et al. 2015)。中国大陸においても、多くの樹種について遺伝構造が明らかにされつつある。Hu et al. (2008)は、中国東北部の *Fraxinus mandshurica* について核マイクロサテライトマーカーで解析し、明確な遺伝構造がなかったことから、最終氷期に複数のレフュージアがあったのではなく、一つの広いレフュージアがあったと考察した。また、北に行くに従い、遺伝的多様性が減少していることから、温暖期に規則的に分布を拡大したと推定された。より広いエリアでイタヤカエデ (*Acer mono* var. *mono*) について核 SSR マーカーを用いた研究がおこなわれており (Liu et al. 2014)、中国東北部では *F. mandshurica* と同様の傾向がみられたため、同じく一つのレフュージアから北方に分布拡大したと考えられ、これは中国東北部の樹木について一般的な傾向であろうとされた。一方、中国南部に分散しているイタヤカエデの集団は遺伝的分化が生じており、より古い中後期更新世に山脈や広大な平原、谷などといった地形に隔てられて遺伝構造が形成されたと推察された。この

ように、世界各地で樹木種の氷期のレフュージアの場所とその後の分布拡大経路について遺伝構造の研究を通じて明らかにされてきた。

次に、環境による遺伝構造については、Sexton et al. (2014)が、様々な分類群について距離による隔離(Isolation by distance: IBD Wright 1943)と環境による隔離(Isolation by environment: IBE)のどちらが見られるかをレビューしている。植物についての25の研究のうち、5つで有意なIBEがみられIBDは見られなかった。10の研究でIBDとIBEの両方が見られ、計15の研究でIBEが見られた。樹木でIBDが見られたのは、*Pinus taeda* (Echert et al. 2010) と *Quercus engelmannii* (Ortego et al. 2012)の2種で、*P. taeda*は乾燥と*Q. engelmannii*は気候データから算出した生育地の安定性との間に関連が見られた。

ところで、種間交雑とは、異なる種に属する個体間の交配であり、植物種ではしばしば見られる現象である(Mallet 2005)。近縁種との交雑により形成された遺伝構造研究の樹木種における研究例としては、広域的なものとして、カバノキ科樹木(Palme et al. 2004; Tsuda et al. 2017)やトウヒ属(Tsuda et al. 2016)など、地域スケールでは、*Pinus pumila* と *Pinus pariflora* var. *pentaphylla* の交雑帯についての研究(Watano et al. 2004)などがある。Palme et al. (2004)はヨーロッパに分布する3種のカバノキ科樹木(*Betula pendula*、*Betula pubescens*、*Betula nana*)について葉緑体DNA解析(PCR-RFLP)を行い、同所的に生育する*B. pubescence*と*B. pendula*および*B. pubescence*と*B. nana*はハプロタイプを共有することを示した。また、Tsuda et al. (2017)は、ユーラシア大陸および日本に生育する6種のカバノキ科樹木について核SSRマーカーを用いて解析し、*B. pendula*と*Betula platyphylla*および*B. pubescence*と*Betula ermanii*がシベリア周辺で交雑し、遺伝的な混合構造を持つこと、*B. pubescens*の親種の一つは*B. pendula*であることを示した。さらに、Tsuda et al. (2016)は、ユーラシア大陸北部の東部に分布する*Picea obovata*と西部に分布する*Picea abies*について母性遺伝するミトコンドリアDNAと両性遺伝する核DNAの解析を行い、両種の交雑帯よりも西にまで*P. obovata*の遺伝的な影響があること、*P.*

abies から *P. obovata* へのミトコンドリア DNA の浸透があることを示した。このように形態からだけではわからない交雑の実態が遺伝マーカーを用いて示されるようになってきている。

人間活動の影響に長年さらされた樹種の遺伝構造に関する研究は、近年増加しつつはあるが、比較的限られた研究報告しかない(例えば Baldoni et al. 2006; Fineschi et al. 2000; Gunn et al. 2011; König et al. 2002; Mohanty et al. 2001)。ヨーロッパで人為の影響を多大に受けていると考えられる種にオリーブ (*Olea uropaea*) とコルクガシ (*Quercus suber*) がある。Besnard et al. (2002) はアフリカと地中海のオリーブ集団は葉緑体に 5 つのクレードがあることを報告した。それぞれのクレードは、各々の地理的なゾーンにあった。しかし、地中海地域においては、東に起源がある葉緑体タイプが西に広がっており、人間による種子移動を示唆している。一方、コルクガシは地中海西部において、明確な系統地理学的な構造を持っており、期待されていたよりも人為の影響が小さいことが示された (Magri et al. 2007)。このことは恐らくコルクガシは新石器時代以前には現在とほぼ同じ分布をしており、人間による種子の運搬があまり行われなかったためであろうと考察されている (Magri et al. 2007)。日本においては、縄文時代より堅果が食用として、材が農工具として利用されてきたイチイガシ (*Quercus gilva*) は、葉緑体シーケンスの結果、一部に飛び石的な分布があるものの、明確な遺伝構造を持っていたことが明らかにされており (Sugiura et al. 2014)、コルクガシの例と同様、人間活動が分布にあまり影響を与えていない例であると考えられる。一方、アカマツ (*Pinus thunbergii*) は東部および北部へ行くほど多様性が低く、多くの集団でボトルネックテストが有意であったことから急激な分布拡大が示唆された。アカマツは陽樹でありオープンな環境を好むため、アカマツの分布拡大と稲作の拡大との関連が指摘された (Iwaizumi et al. 2013)。このように、直接的でなくとも人間活動が樹木種の遺伝構造に影響を与える可能性もある。これらの研究は、歴史的な人間の活動と価値のある樹種の遺伝構造は複雑な関係にあり、予想通りとは限らないことを示している。

2-2 遺伝マーカー

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とされている(Tsuda and Ide 2010)。

葉緑体 DNA (cpDNA)は特に定着ルートを明らかにするのに有用である。なぜならば、(i) 組み換えをしないため、次世代になってもハプロタイプはほぼ変化しない。(ii) 被子植物では母性遺伝のため種子のみで伝搬する(Dumolin-Lapègue et al. 1995; Petit et al. 1993; Rajora and Dancik 1992)。このように、cpDNA マーカーの集団間分化は、種子分散による定着ルートが花粉流動から分離され(Heuertz et al. 2004)、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)。しかし、葉緑体ゲノムは塩基置換が少ないため、集団間で有用な多型を検出することが困難である。葉緑体 Simple Sequence Repeats(SSR)マーカーはこの問題を回避する有用なマーカーであり、集団内集団間での高い変異を用いた研究例が多数ある(例えば Magri et al. 2007; Ebert et al. 2009; Bagnoli et al. 2016; Provan et al. 2001; Grivet et al. 2006)。

一方、核 DNA の場合は遺伝マーカーとして、アイソザイム、Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)法、Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法などが用いられたが(Magri et al. 2007)、特に多型性が高い SSR マーカーが開発されて以降、急激な研究の進展がみられた。近年、次世代シーケンサーが開発されて多量の遺伝情報が一度に得られるようになったが、今後とも SSR マーカーは効果的で経済的であり、重要なマーカーであり続ける(Hodel et al. 2016)と考えられる。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)。

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。これまで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。

2-3 日本産樹木の遺伝構造の特徴

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(例えばシデコブシ Tamaki et al. 2008)などで遺伝構造と分布変遷に関する研究が蓄積されてきた。多くの樹種で、特に母性遺伝する遺伝マーカー(ミトコンドリア DNA または広葉樹では葉緑体 DNA)で解析した場合に、氷期と間氷期との間の分布変遷により形成されたと考えられる系統地理学的な構造が検出されている(例えばウワミズザクラ Iwasaki et al. 2012; ブナ Fujii et al. 2002)。東北や中部で南北に分かれている(ウダイカンバ Tsuda and Ide 2010; ミズナラ Okaura et al. 2007)という共通した構造が見られる場合もある。一方で、核マーカーを用いた例では、集団間の遺伝子流動が母性遺伝よりも旺盛であるため構造が検出されにくい、日本海側と太平洋側でのクラスター(スギ Tsumura et al. 2012; 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)などが検出されている。戸丸(2013)は、日本に広域分布する落葉広葉樹の遺伝構造についてレビューし、その特徴をまとめた。アロザイムや SSR などの核マーカーで 11 種は、集団内の多様性は高いが、集団間の分化が低かった。一方、15 種のオルガネラで集団内の変異が低く分化程度が高かった。西日本の方が遺伝的多様性が高く、氷期・間氷期の気候変動の間、西日本で落葉広葉樹の集団が比較的安定的に維持できたと考えられた。また、東日本(あるいは北方)では集団間の遺伝的な構造があまりみられず、氷期の北限に分布していた系統が急

速に北方へ分布拡大したことを示した(戸丸 2013)。一方、同所的に分布している落葉広葉樹の系統地理学的構造には、特定の種群や種間に構造の類似性がみられるが、相違点も多かったことを示した(戸丸 2013)。このように我が国における天然林構成樹種についての遺伝構造の研究は十分に蓄積があり、実際的な種苗の移動に関わる指針として、「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」(津村・陶山 2015)に 15 科 46 樹種についてまとめられている。

2-4 コナラ属樹木の遺伝的多様性および遺伝構造

コナラ属は、ヨーロッパや北米大陸においても、生態的、経済的に重要な位置を占める(Aldrich and Cavender-Bares 2011)ため、研究者たちの興味を引き、これまで遺伝的多様性や遺伝構造に関する研究が世界的に数多く行われてきた。また、コナラ属は多くの種間交雑が報告され(Tamaki and Okuda 2014)、交雑に関する研究、さらに種間交雑と分布拡大の関係に関する研究がおこなわれている。まず、広域的な遺伝構造に関する研究では、Petit et al. (2002)が 8 種のコナラ属樹木、2613 集団の cpDNA のデータから、ヨーロッパ全体のコナラ属の系統地理学的な構造をまとめたものがある。やや小さなスケールでは氷期のレフュージアがあったとされる地中海沿岸での *Quercus ilex* (Lumaret et al. 2002)や *Quercus cerris* (Bagnoli et al. 2016)などの遺伝構造を明らかにした例がある。北米大陸では 7 種の常緑のコナラ属樹種について明らかにしたもの(Cavender-Bares et al. 2015)や、*Quercus rubra* の遺伝構造についてヨーロッパとの違いを論じたもの(Magni et al. 2005)がある。東アジアではアベマキ(Chen et al. 2012)、中国のクヌギ(Zhang et al. 2015)で広域的な遺伝構造を明らかにされている。日本ではミズナラ(Quang et al. 2008, Kanno et al. 2004, Okaura et al. 2007)、カシワ(Kanno et al. 2004)、コナラ(Kanno et al. 2004, Okaura et al. 2007, Ohsawa et al. 2007)、ナラガシワ(Kanno et al. 2004)、イチイガシ(Sugiura et al. 2015)、ウバメガシ(Liu et al. 2013)などが分布域を網羅した研究として挙げられる。

コナラ属の種間交雑を研究した例では、ヨーロッパ大陸では *Quercus robur* × *Quercus petraea* (Rushton 1978; Aas, 1993; Petit et al. 2003)、北米の 5 樹種間 (*Quercus alba*, *Quercus macrocarpa*, *Quercus michauxii*, *Quercus stellate* and *Quercus virginiana*)(Whittemore and Schaal 1991)、中米の *Quercus affinis* × *Quercus laurina* (Ramos-Ortiz et al. 2016)、朝鮮半島でのアカガシ・ウラジロガシ・アラカシの 3 樹種間 (Lee et al. 2014) など、数多くの研究が行われている。日本国内でもミズナラ・コナラ・カシワの 3 樹種間 (李ら 1996; 宮崎 1988; Matsumoto et al. 2009) やシラカシ・ウラジロガシ (北村・村田 1979) など相互の中間的な形質を持つ個体などが報告されている。コナラ属の交雑の研究では、従来は親種と雑種個体との形態変異 (Rushton 1978; 奥田ら 1995; 奥田ら 1996; Kremer 2002) やフェノロジー調査などによる自然交雑の可能性の検討 (李ら 1996)、人工交配による雑種個体の稔性の検証 (生方ら 1999) などが行われてきた。近年では DNA マーカーの進展やデータ解析手法の高度化に伴い、葉緑体 DNA が浸透交雑する種間で共有されていること (Okaura et al. 2007; Kanno et al. 2004) が実際に示された。また *Quercus crassifolia* と *Quercus crassipes* の交雑帯において、形態と同時に核マーカーを用いて交雑個体が推定 (Tovar-Sanchez and Oyama 2004) された。さらに、核 SSR マーカーとベイズクラスタリングを使った解析で、葉の形質によって 2 種に識別されるアカガシとツクバネガシの間に遺伝子流動があること (Tamaki and Okada 2014) も示された。

さらに種間交雑は種の分布拡大に大きな役割を果たすと考えられている。ヨーロッパに広域的に分布し種間交雑を行うコナラ属に *Q. robur* と *Q. petraea* の 2 種がある。両者は広域的のみならず各々の地域で葉緑体ハプロタイプを共有しているが、核マーカーでは遺伝的に分化している。この遺伝構造を説明するのに Petit et al. (2003) は両種の分布拡大について次のように考察している。*Q. robur* は *Q. petraea* よりカケスによる種子の分散距離が大きい。そのため、*Q. robur* が先に分布を拡大し、その後 *Q. petraea* が花粉親として *Q. robur* と交雑する。さらに

*Q. petraea*が花粉親として戻し交雑を繰り返す浸透交雑を行うことにより、*Q. petraea*が分布を拡大すると同時に *Q. robur*の葉緑体を取り込む。このような交雑による分布拡大の考え方により、日本のコナラ属のハプロタイプ共有も説明でき(Okaura et al. 2007)、同じような現象が生じていると考えられる。

第三章 日本産クヌギの遺伝構造

3-1 はじめに

クヌギは、日本以外では、朝鮮半島、中国、インドシナ半島からヒマラヤにかけての広い地域に分布する(大場 1989)。クヌギに関する広域的な遺伝構造の研究は、中国において Zhang et al. (2013)が核 SSR マーカーを用いて、また、Zhang et al. (2015)は葉緑体シーケンシングとエコロジカルニッチモデリング(ENM)を行った。核 SSR 解析の結果、中国集団は東西 2 つの遺伝的なグループに分けられ、それらは地理的あるいは歴史的な由来で説明でき (Zhang et al. 2013)、明瞭なランドスケープの違いが森林樹木の遺伝子型に影響を与えることが示唆された(Zhang et al. 2013)。また、AMOVA による集団間の遺伝的多様性は 16%、集団間分化の指数 F_{ST} は 0.144 と比較的高い値で、集団間分化が進んでいると考えられた(Zhang et al. 2013)。一方、葉緑体シーケンシングの結果では、中国産クヌギは葉緑体 DNA の多様性は高く ($H_T=0.791$)、遺伝的多様性の 59.54%が集団間にあり、集団間分化が進んでおり、弱い系統地理学的な構造がある ($N_{ST}=0.689 > G_{ST}=0.630$, $p > 0.05$) ことが明らかとなった(Zhang et al. 2015)。また、おそらく 12 万年から 37 万年の間に急激な分布拡大があったと考えられた。さらに、ENM の結果から、第四紀の氷期には中国の中央部と南部に複数のレフュージアが存在していたと考えられ、地理的なヘテロ性と気候変動により遺伝構造と系統地理学的構造ができたと考察されている(Zhang et al. 2015)。以上のように、中国においては、クヌギは遺伝構造を持ち、日本における一般の天然林構成樹種と同じような傾向があったといえる。しかし日本において、クヌギの遺伝構造に関する研究はこれまでにない。そこで本章では、葉緑体 SSR マーカーと核 SSR マーカーを用い、日本におけるクヌギの遺伝構造を明らかにすることとした。

3-2 葉緑体 DNA

本節の目的は、葉緑体マイクロサテライトマーカーを用いて日本産ク

ヌギの遺伝的多様性と遺伝構造の特徴を明らかにすることである。

3-2-1 材料と方法

サンプル採取

日本においては、天然更新集団として、河岸および河岸段丘崖に生育する天然更新と考えられるクヌギ 16 集団と林木遺伝資源保存林 1 集団、緑地保全地域 1 集団の計 18 集団、人工林集団として 28 集団を対象とした (表 3-1, 図 3-1)。人工林集団は、各県の森林簿より、1960 年代以前に植栽された 50 年生以上の林齢の集団を対象とした。ユーラシア大陸北東部の 13 集団 (以下 大陸集団) も、比較対照としてサンプリングを行った。全 59 集団、2152 個体の成木の葉を採取し、DNA 抽出までシリカゲルの入ったビニール袋に保存した。

葉緑体 SSR 解析

改変 CTAB 法 (Lian et al. 2003) を用いて葉から全 DNA を抽出した。また葉緑体 SSR マーカーとしては、 $\mu dt1$ 、 $\mu dt3$ 、 $\mu dt4$ 、 $\mu cd4$ 、 $\mu cd5$ 、 $\mu kk4$ (Deguilloux et al. 2003) の 6 つのマーカーを用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit (Qiagen co.) を用い、各プライマーの終濃度が $0.2\mu M$ となるよう反応液を調整した。PCR 条件は、初期活性化 $95^{\circ}C$ 15 分の後、熱変性 $94^{\circ}C$ 30 秒、アニーリング $48^{\circ}C$ で 90 秒、伸長反応 $72^{\circ}C$ 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 $60^{\circ}C$ 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。

遺伝データ解析

各個体のハプロタイプは 6 つの葉緑体 SSR マーカーの断片長を基に決定した。集団の遺伝的多様性はハプロタイプリッチネス (A_s) および Pons and Petit (1996) に基づき unordered のハプロタイプ多様度 (h_s) と SSR のリピート数を考慮する ordered のハプロタイプ多様度 (v_s) を

求めた。全体の遺伝的多様性は Pons and Petit (1996)による SSR の突然変異がランダムに生じると考える h_t と Stepwise Mutation Model を仮定する v_t とを求めた (Estoup et al. 2002)。これらは、ソフトウェア RAREFAC (Petit et al. 1998)を使用して求めた。

集団間分化は、unordered alleles (G_{ST}) (Nei 1973) と、Stepwise Mutation Model (SMM) を仮定した ordered alleles (R_{ST} ; Statkin 1995) を求めた。さらに、 N_{ST} (Pons and Petit 1996) も求めた。ホモプラシーやマルチステップな突然変異があるとき N_{ST} を採用するのが良いとされ、共通の対立遺伝子を持つ葉緑体 SSR の遺伝子座の数をハプロタイプ間の距離としている。Pons and Petit (1996) に従って、1000 回のランダムイゼーションで R_{ST} と N_{ST} が有意に G_{ST} より大きいかが検証した。これらの計算と有意差検定は PERMUT/CpSSR ver 2.0 (Pons and Petit 1996) を用いて行った。遺伝分化の指数である G_{ST} は、遺伝的多様性に関連するため、標準化した G'_{ST} (Hedrick 2005) を求めた。 G'_{ST} はマーカーの多型性にかかわらず 0 (no differentiation) から 1 (complete differentiation) まで変化する。葉緑体ハプロタイプ間の系統関係を決定するために、Neighbor-net (Bryant and Moulton 2002) をソフトウェア SplitsTree4 (Huson and Bryant 2006) を用いて作成した。また、集団間の遺伝的関係を明らかにするため、 $(\delta\mu)^2$ (Goldstein et al. 1995) に基づく近隣結合法による系統樹を Populations ver.1.2.30 (Langella 2007) を用いて作成し、Mapmaker and GenGIS2 software (Parks et al. 2013) で可視化した。

表 3-1 解析に用いたクヌギ 59 集団の地域、林分タイプ、所在県または都市、緯度、経度、サンプル個体数、検出されたハプロタイプ

地域	林分タイプ	集団	県(都市)	緯度(N)	経度(E)	個体数	検出されたハプロタイプ
日本	天然更新	KK	岩手	39°16'	141°07'	53	20
		GO*	宮城	38°45'	141°23'	16	20
		ARD	埼玉	36°07'	139°19'	41	6, 20
		KO	茨城	36°02'	140°01'	32	20
		KM	山梨	35°39'	138°30'	13	20
		KA	静岡	35°10'	138°90'	4	20
		TR	静岡	34°48'	137°49'	14	20
		KN	和歌山	34°14'	135°09'	15	20
		YR	京都	35°17'	135°19'	13	20
		KZ	福井	35°54'	136°38'	15	20
		YS	徳島	34°06'	134°30'	13	20
		TH	岡山	34°52'	133°33'	6	20
		SM*	岡山	34°53'	133°25'	12	20
		OG	福岡	33°35'	130°39'	19	7, 9, 20
		TG	大分	33°20'	130°50'	8	20
	SK	熊本	32°46'	130°36'	14	20	
	MK	熊本	32°42'	130°36'	13	20	
	GK	宮崎	32°39'	131°25'	21	7, 20	
	IW	岩手	39°46'	141°08'	37	20	
	MF	宮城	38°20'	140°59'	33	6, 7, 19, 20, 38	
	MA	宮城	38°38'	140°59'	49	20	
	MS	宮城	38°21'	141°00'	22	20	
	TT	栃木	36°31'	140°13'	46	20	
	TM	栃木	36°30'	140°12'	46	20	
	TI	栃木	36°29'	139°59'	48	20	
	TU	栃木	36°29'	139°55'	48	7, 20	
	GT	群馬	36°17'	139°04'	40	20	
	GM	群馬	36°16'	138°45'	48	20	
	TO	東京	35°38'	139°18'	50	20	
	IZ	静岡	34°53'	139°06'	40	20	
IO	静岡	35°01'	138°59'	50	4, 20		
YY	山梨	35°30'	138°28'	50	20		
YK	山梨	35°28'	138°30'	50	20		
ME	三重	34°21'	136°29'	50	20		
KY	京都	34°57'	135°32'	50	20		
HY	兵庫	34°55'	135°27'	46	20		
WK	和歌山	34°11'	135°17'	50	20		
WM	和歌山	34°02'	135°13'	31	20		
YA	山口	34°16'	131°18'	50	20		
EH	愛媛	33°37'	132°49'	50	20		
FU	福岡	33°47'	130°53'	42	20		
OH	大分	33°19'	130°57'	48	3, 7, 16, 19, 20		
OK1	大分	33°11'	131°16'	50	3, 5, 6, 7, 10, 15, 19, 20		
OK2	大分	33°08'	131°16'	50	20		
KS	熊本	33°02'	130°50'	48	20		
KH	熊本	33°04'	130°53'	47	20		
大陸	天然更新	SA	Saemal	37°36'	128°01'	41	3
		SU	Sweon	37°19'	127°01'	47	3, 5, 7, 12, 16, 19, 20
		F	Hwaseong	37°12'	126°59'	50	3, 6, 7, 12, 15, 16, 19, 20
		CD	Ch'u-dog	36°50'	127°57'	49	7, 15, 19, 20, 21, 26
		CH	Chugok	36°24'	127°15'	49	7, 12, 15, 19, 20, 21
		SG	Sangju	36°22'	128°08'	46	3, 7, 12, 15, 19, 20, 21
		GE	Geochang	35°44'	127°47'	46	3, 5, 7, 12, 15, 19, 20, 21
		HA	Hach'on	35°38'	127°17'	39	5, 7, 9, 19, 20, 32
		KW	Kwangju	35°09'	126°56'	28	7, 19, 20
		Che	Cheju	33°31'	126°32'	14	1, 26, 39, 41
		XI	Xiuyuan	40°23'	123°18'	54	3, 7, 20, 26
		MI	Miyun	39°55'	116°24'	47	6, 20
		DA	Dalian	38°55'	121°21'	51	7, 9, 15, 19, 20, 26, 34, 36, 37, 40

*山地林

3-2-2 結果

検出されたハプロタイプ

6つの葉緑体 SSR マーカーで 59 集団 2152 個体を解析した結果、22 の異なる対立遺伝子が検出された (表 3-2)。その結果 23 のハプロタイプ (以下 *Hp*) が決定され (表 3-2)、Neighbor-net (図 3-2) で 3 つのグループに分けられた。Group I に 7 つ、II に 8 つ、III に 8 つのハプロタイプが属した。全体では、group III の *Hp20* (72.2%) と group I の *Hp7* (11.9%) が多く検出された。*Hp20* は日本で、*Hp7* は大陸で優占していた (表 3-2、図 3-1)。日本の天然林で 4 つのハプロタイプ、人工林で 12 個、大陸の集団で 20 のハプロタイプが検出された (表 3-1)。それぞれの集団タイプにユニークなハプロタイプは、日本の人工林で 3 つ (*Hp4*, *Hp10*, *Hp38*)、大陸集団で 10 個 (*Hp1*, *Hp12*, *Hp21*, *Hp32*, *Hp34*, *Hp36*, *Hp37*, *Hp39*, *Hp40*, *Hp41*) であった。日本の天然集団のみで見られるハプロタイプはなかった。

ハプロタイプの地理的分布

ハプロタイプの地理的分布と多様性について、図 3-1、表 3-2 に示した。*Hp 20* は日本の天然林と人工林で高頻度で見られた。大陸では 13 集団中 11 集団に低頻度で見られ、頻度が高いのは韓国南部の集団 KW で 10.7%、集団 SG で 8.7% であった。一方、*Hp7* は大陸の 13 集団中 10 集団で見られ、大陸の個体全体で 87.5% の優占度であったが、日本では天然更新 2 集団、人工林 4 集団のみで検出された。23 個のハプロタイプのうち 10 個のハプロタイプが 1 つの集団のみから検出された。それらは以下の通りで、大陸では、*Hp1*、*Hp39*、*Hp41* が集団 Che で、*Hp34*、*Hp36*、*Hp40* が集団 DA で、*Hp32* は集団 HA のみで検出された。日本では、*Hp 38* が集団 MF で、*Hp 4* が集団 IO で、*Hp 10* が集団 OK1 の人工林集団で検出された。日本では、*Hp20* 以外の 11 のハプロタイプが低頻度で検出されているが、複数のハプロタイプを持っているのは 46 集団中 8 集団のみであった。*Hp20* に固定されている集団が多いため、日本では系統地理学的構造は見られなかった。集団ごとに優占しているハ

プロタイプのグループを見ると、大まかに中国と韓国北部の集団は Group II、韓国は Group I、韓国の集団 HA と日本は Group III で、全体として構造が見られた (図 3-3)。

表 3-2 葉緑体 SSR 解析により検出されたクヌギのハプロタイプと 6 遺伝子座のフラグメントサイズおよび地域ごとのハプロタイプ頻度

ハプロタイプ	マーカーごとのフラグメントサイズ						ハプロタイプ頻度			合計
	μ cd4 (VIC)	μ cd5 (FAM)	μ dt1 (PET)	μ dt3 (FAM)	μ dt4 (PET)	μ kk4 (NED)	日本		大陸	
	天然更新		人工林							
20	101	81	90	129	139	115	0.957	0.965	0.037	0.7217
7	101	81	90	128	136	115	0.028	0.018	0.399	0.1190
19	101	81	90	129	138	115	-	0.006	0.121	0.0353
3	101	81	90	126	137	115	-	0.002	0.112	0.0307
6	101	81	90	127	137	115	0.006	0.002	0.084	0.0237
9	101	81	90	127	138	115	0.009	0.001	0.061	0.0177
21	102	82	91	128	137	115	-	-	0.052	0.0135
26	101	81	89	128	136	115	-	-	0.027	0.0070
5	100	81	90	127	138	115	-	0.001	0.020	0.0056
16	102	81	90	129	136	115	-	0.001	0.018	0.0051
12	102	81	90	128	136	115	-	-	0.018	0.0046
15	102	81	90	127	138	115	-	0.002	0.012	0.0042
32	102	81	90	129	138	115	-	-	0.014	0.0037
36	101	81	89	127	138	115	-	-	0.012	0.0033
10	101	81	90	128	137	115	-	0.002	-	0.0009
39	101	81	89	129	138	115	-	-	0.004	0.0009
4	101	81	90	127	136	115	-	0.001	-	0.0005
38	101	81	89	129	135	115	-	0.001	-	0.0005
1	101	81	89	128	136	113	-	-	0.002	0.0005
34	101	82	88	129	138	115	-	-	0.002	0.0005
37	101	81	89	128	139	115	-	-	0.002	0.0005
40	101	82	88	130	139	116	-	-	0.002	0.0005
41	101	81	90	130	139	116	-	-	0.002	0.0005

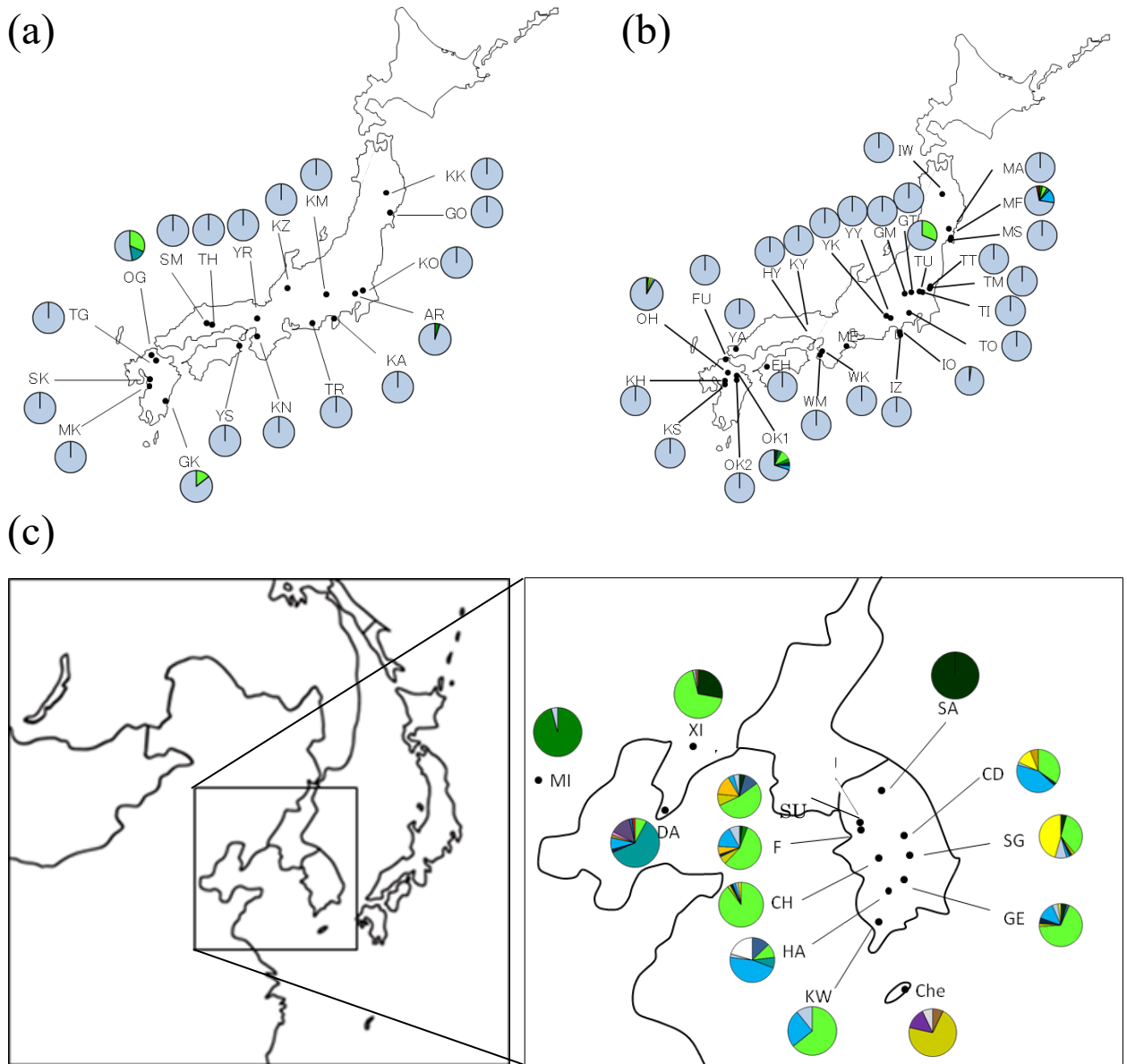


図 3-1 クヌギの葉緑体ハプロタイプの地理的分布
 (a)日本の天然更新 18 集団 (b)日本の人工林集団 28 集団 (c)大陸 13 集団
 ハプロタイプの凡例は図 3-2-2 と同じである

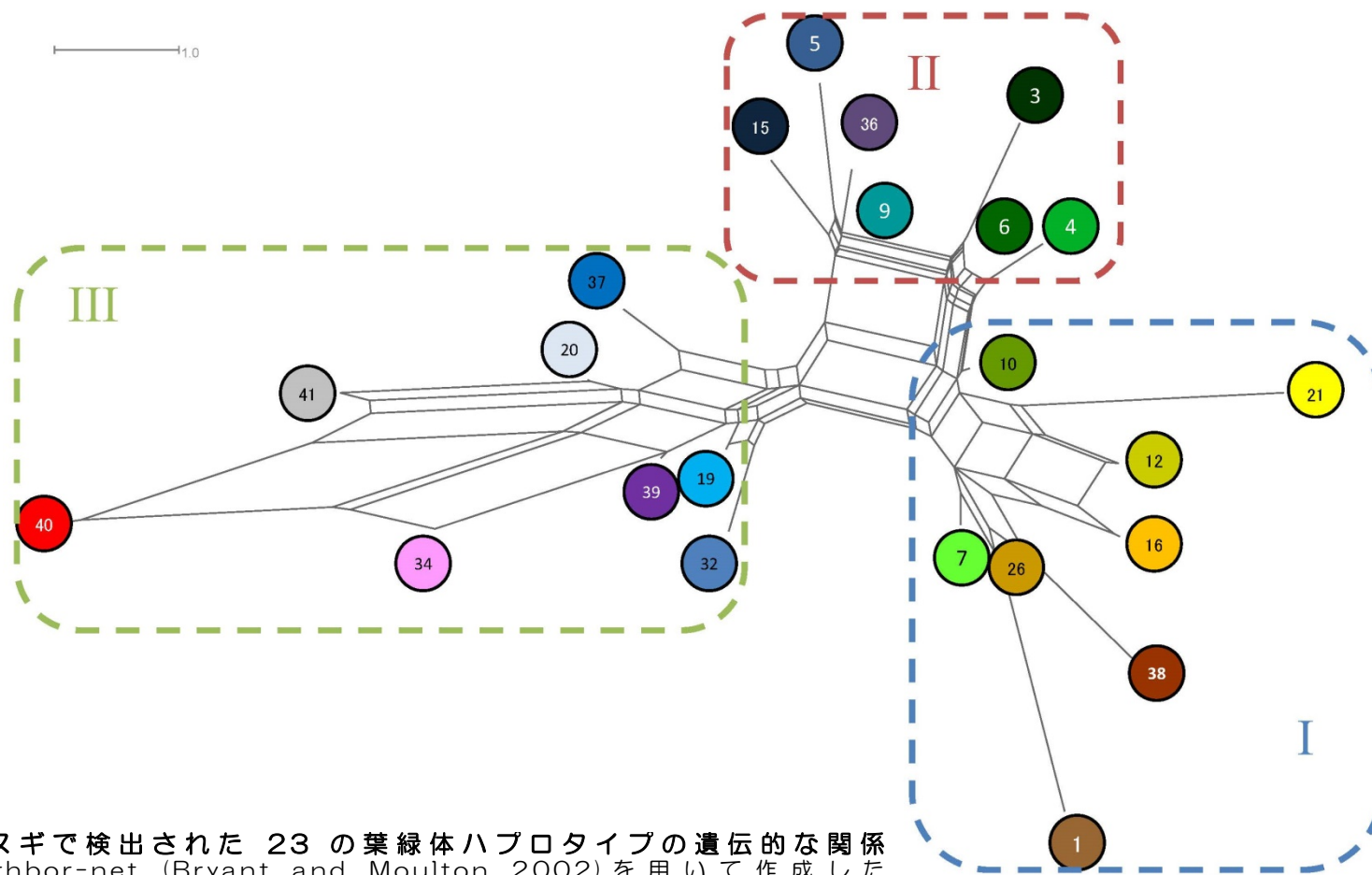


図 3-2 クヌギで検出された 23 の葉緑体ハプロタイプの遺伝的な関係
Neighbor-net (Bryant and Moulton 2002) を用いて作成した
I,II,III はハプロタイプグループ

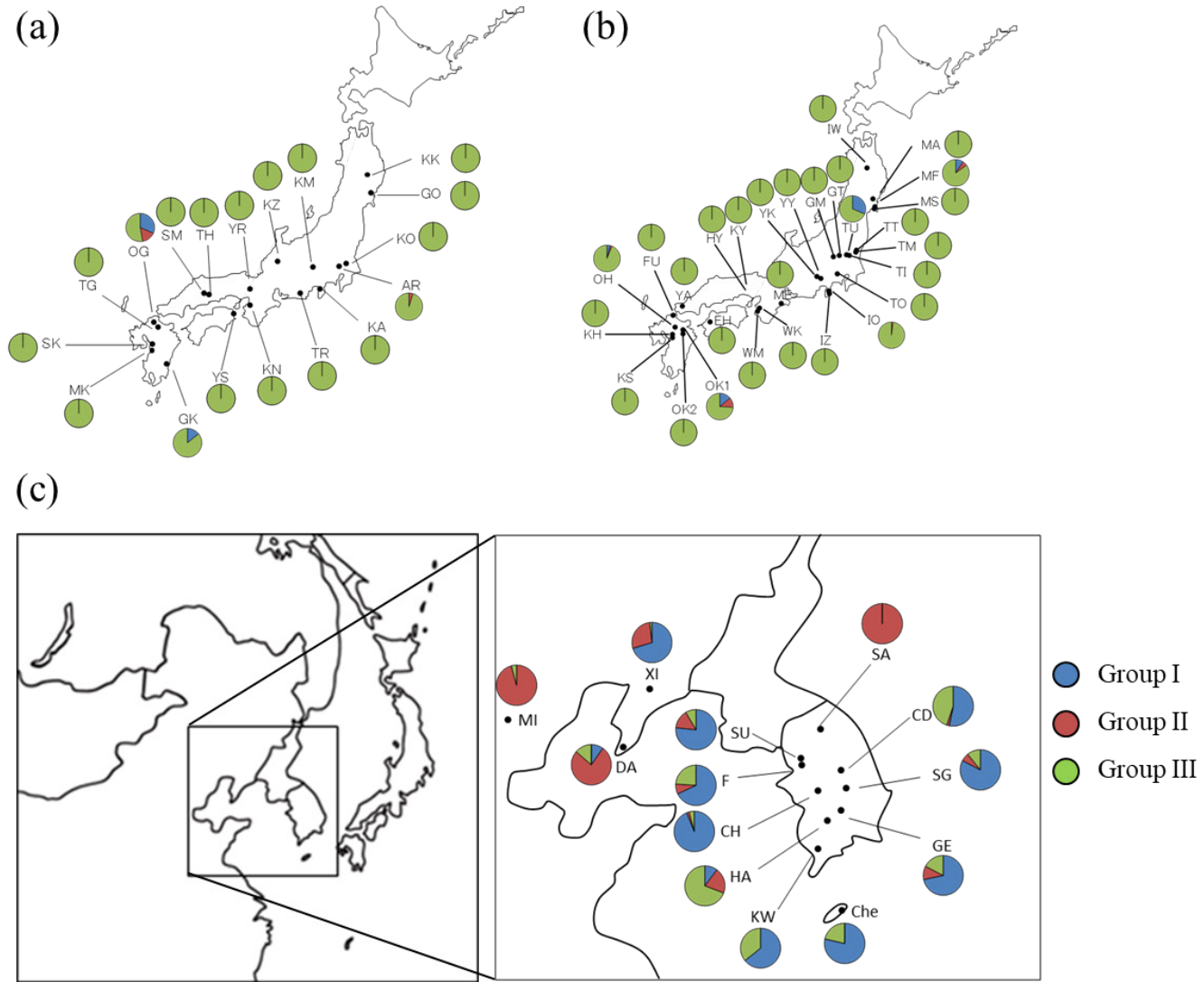


図 3-3 Neighbor-net (Bryant and Moulton 2002) でグルーピングしたクヌギの葉緑体ハプロタイプグループの地理的分布
 (a)日本の天然更新 18 集団 (b)日本の人工林集団 28 集団 (c)大陸 13 集団

集団の遺伝的多様性と集団間分化

日本では、ほとんどの集団が、天然集団でも植栽集団でも *Hp20* のみに固定されていた。反対に大陸では、集団 SA 以外のすべての集団で複数のハプロタイプが検出された。集団内の遺伝的多様性と集団間分化の指標を表 3-3 に示した。すべての遺伝的多様性の指標が日本の天然更新集団および人工林集団 (*hs*: 0.055, 0.059; *vs*: 0.053, 0.057) より大陸 (*hs*: 0.488; *vs*: 0.482) で高かった。日本では、天然更新集団と人工林集団で同じ程度の値であった。天然更新集団より人工林集団で検出されたハプロタイプ数が多かったが、どちらも *Hp20* に固定されている集団がほとんどであり、複数のハプロタイプを持っているのは 2 つの天然更新集団、5 つの人工林集団のみであった(表 3-1、図 3-1)。日本の集団間分化の程度はいずれの指標でも大陸集団と比べると低かった。 R_{ST} は G_{ST} と比べ有意に大きくはなかった。大陸の集団は N_{ST} が G_{ST} より有意に高く、系統地理学的傾向を示唆した。

表 3-3 クヌギの地域および林分タイプごとの葉緑体ハプロタイプの多様性および集団間分化

地域	林分タイプ	集団数	個体数	A_s	h_s	v_s	h_t	v_t	G_{ST}	G'_{ST}	R_{ST}	N_{ST}
日本	天然更新	18	322	1.111 (0.076)	0.055 (0.037)	0.053 (0.037)	0.073 (0.051)	0.073 (0.050)	0.246	0.261	0.238	0.238
日本	人工林	28	1269	1.122 (0.061)	0.059 (0.029)	0.057 (0.028)	0.072 (0.035)	0.072 (0.035)	0.180	0.191	0.201	0.179
大陸	天然更新	13	561	2.088 (0.159)	0.488 (0.067)	0.482 (0.063)	0.843 (0.054)	0.844 (0.099)	0.421	0.856	0.429	0.480*

A_s , haplotypic richness; h_s , unordered haplotypic diversity; v_s , ordered haplotypic diversity; h_t , unordered total haplotypic diversity; v_t , ordered total haplotypic diversity; G_{ST} , unordered population differentiation index; G'_{ST} , standardized value of G_{ST} ; R_{ST} , ordered alleles based population differentiation index; N_{ST} , ordered loci based population differentiation index; standard errors in parentheses; * N_{ST} is significantly larger than G_{ST} ($p < 0.05$).

集団間の遺伝的な関係

$(\delta\mu)^2$ (Goldstein et al. 1995) に基づき近隣結合法により作成した 59 集団の系統樹を図 3-4 に示した。2 つのクレードが形成され、1 つは日本の天然集団と人工林集団であり、もう一つは大陸の集団であった。このことは日本の集団と大陸の集団とが遺伝的に異なることを示唆している。日本の天然集団である集団 OG のみが大陸集団のクレードに属した。日本のクレードには系統地理学的構造は見られなかった。図 3-5 から、

もう 1 つの大陸のクレードには 2 つのサブクレードがあり、一方は中国と韓国北部の集団で構成され、もう一方は韓国南部の集団であった。このことから、ユーラシア大陸では、遺伝構造が存在すると言えた。

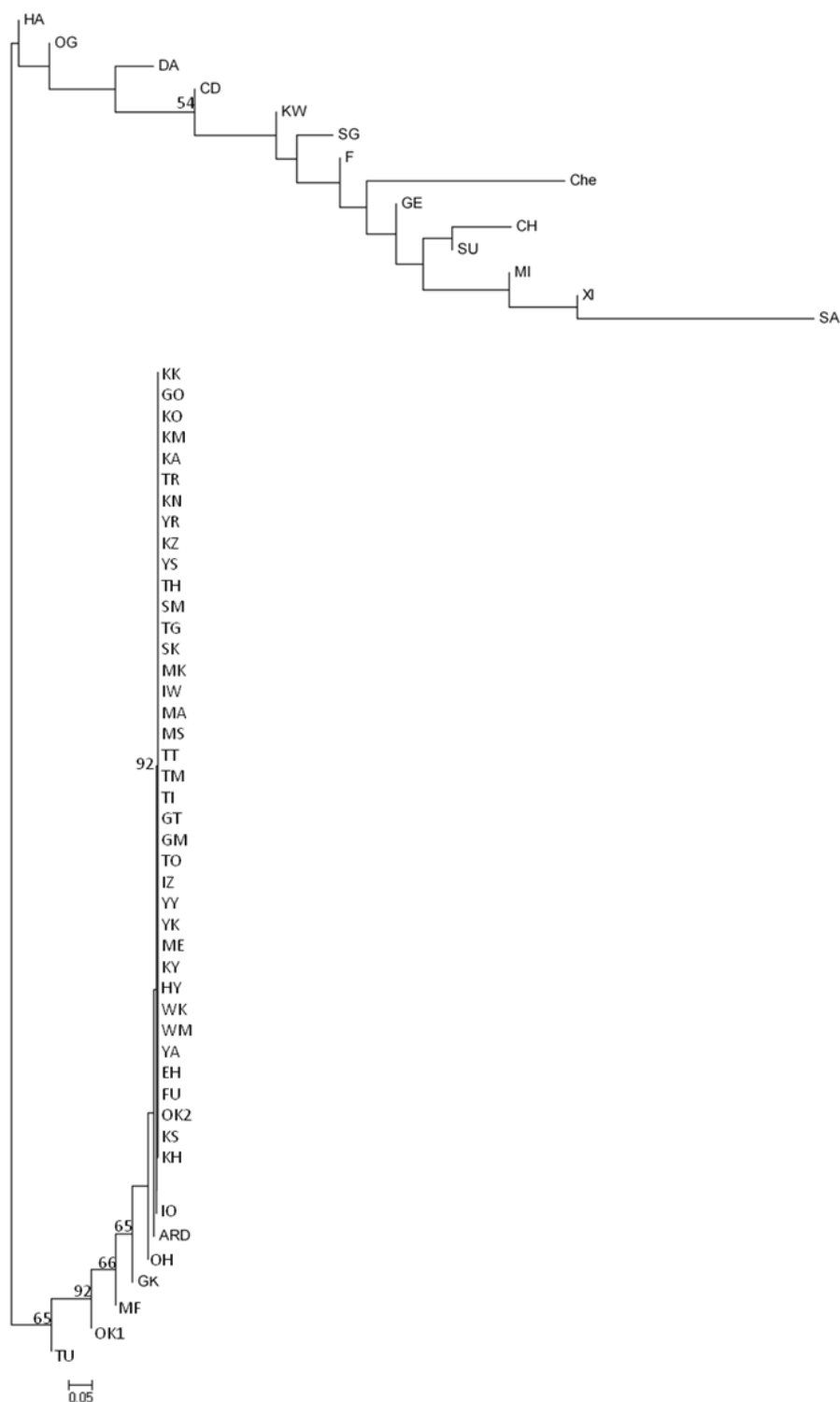


図 3-4 クヌギ 59 集団の $(\delta \mu)^2$ (Goldstein et al, 1995) に基づく近隣結合法で作成した系統樹
 ノードの数字は 1000 回繰り返しのブートストラップ率(ブートストラップ率 50 以上のみを記載)
 バーは遺伝距離を示す
 日本集団と大陸集団のクレードに分かれた

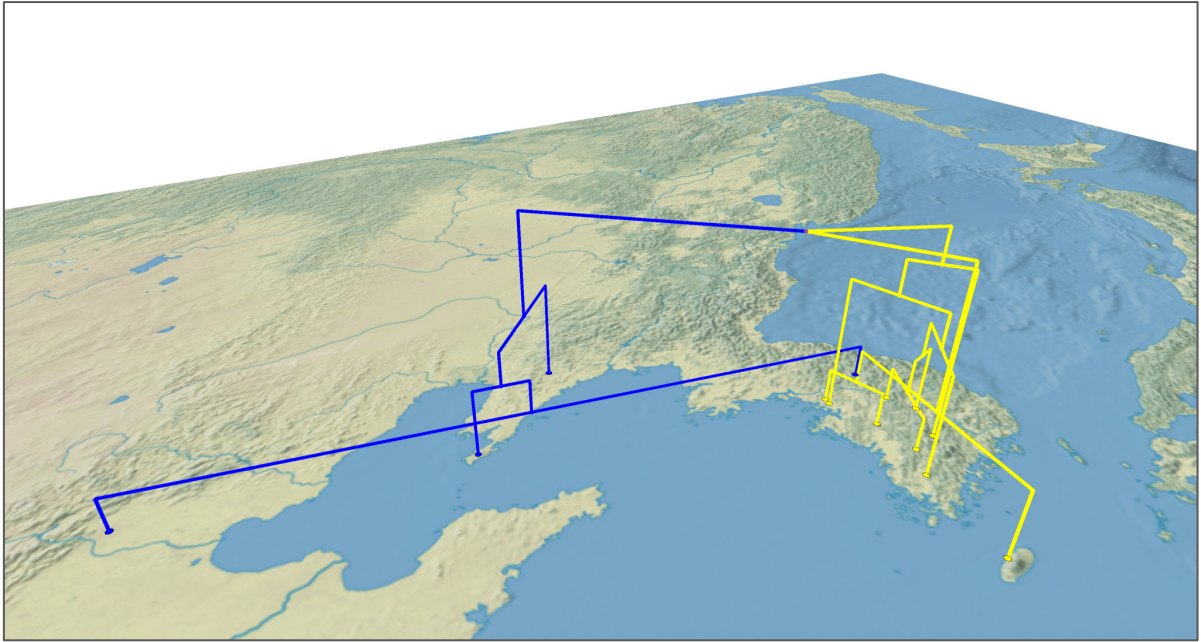


図 3-5 クヌギの大陸 13 集団の $(\delta \mu)^2$ (Goldstein et al. 1995) に基づく近隣結合法で作成した系統樹
中国および韓国北部と韓国南部の 2 つのクレードに分かれた

3-2-3 考察

日本及びユーラシア大陸(韓国および北東中国)の全 59 集団のクヌギについて、葉緑体 SSR マーカーで解析した結果、マーカーは多型的であり 23 のハプロタイプを検出した。

クヌギの葉緑体 DNA の遺伝多様性と遺伝構造

日本の集団は大陸集団と比べて、遺伝的多様性が非常に低かった。用いたマーカーは多型的であったにも関わらず、日本の集団はほとんどが *Hp20* に固定されており、多様性がなかった。このことから、日本列島に分布拡大する際、あるいは最終氷期に厳しいボトルネックを経験していたと考えられる。

一般的に、樹木では遺伝的に同一か近縁のハプロタイプが地理的に近いところに分布し(例えば *Betula maximowicziana* Tsuda and Ide 2010; *Fraxinus angustifolia* Heuertz et al. 2006)、系統地理学的構造と呼ばれている。日本列島のコナラ属でもミズナラ、コナラ、カシワ、ナラガシワは最終氷期のレフュージアとその後の分布変遷を反映する葉

緑体 DNA の明確な遺伝構造を持っている (Kanno et al. 2004; Okaura et al. 2007)。本研究では、日本のクヌギは系統地理学的構造を持っておらず、上述の 4 つのコナラ属樹木と全く異なっていた。この遺伝構造のなさは、一つのハプロタイプのみがあり、それが広範囲に分布拡大したことによる。照葉樹林を構成するスタジイ(上野・青木 2015)、シラカシ(金谷・松本 2015a)、アカガシ(金谷・松本 2015b)の常緑樹は、九州地方から関東地方までの分布域全体でほぼひとつのハプロタイプに固定されており本研究のクヌギのハプロタイプの分布パターンと類似している。この西日本一帯で同じひとつのハプロタイプが分布するパターンは、他の落葉広葉樹(クマシデ Iwasaki et al. 2010; ウワミズザクラ Iwasaki et al. 2012)でも見られる。しかし、これら落葉広葉樹は、東～北日本では、西日本とは異なるハプロタイプを持っている。一方クヌギは分布が東北地方にまでおよんでいるにもかかわらず一つのハプロタイプが分布している点で独特であると言える。

トチノキは、日本列島において長く人間により利用されてきた樹種であり、複数のハプロタイプを持っているが、他方、一つのハプロタイプがおおよそ 900km という広さで分布している(Sugahara et al. 2011)。Sugahara et al. (2011)は、この現象を分散能力から予測される分布域と実際の分布域との不一致 Reid's Paradox (Clark et al. 1998)と論じており、まれな長距離の種子移動により急速な分布拡大を説明できるとしている(Sugahara et al. 2011)。同様に、クヌギも *Hp20* の分布はおおむね 1400km にわたっている。クヌギの堅果は、ネズミによって運搬され、報告されている最大の散布距離は 38.5m である(Iida 1996)。橋詰(1983)は 5 年生の個体で種子を産したことを報告している。最終氷期に暖温帯照葉樹林とともに古屋久半島 まで南下していた(Tsukada 1985)場合、現在の北端にまで達するのに最短でもおおよそ 18 万年かかってしまう。

また、Zhang et al.(2015)のエコロジカルニッチモデリングによっても最終氷期にクヌギは日本列島に分布していない。しかし、確率が 0.45-0.55 とあまり高くないが、現在の御前崎の南、紀伊水道付近、paleo-Yaku Peninsula および対馬と周辺の海域に生育地があった可能

性は残される。上述のスタジイは高知県(上野・青木 2015)に、アラカシは静岡県(金谷・松本 2015b)に分布域全体で優占するのとは異なるハプロタイプが存在する。このことは、それらの地域に照葉樹のレフュージアが存在した可能性を示唆する。クヌギも、太平洋岸の半島にレフュージアがあったとすると、最も東の御前崎の南から現在の北限までは、おおよそ 650km であり、おおむね 85,000 年かかる。いずれにせよ、この場合にも稀な長距離散布が分布拡大を促した可能性がある。さらに、*Hp6* は大陸では韓国 1 集団、中国 1 集団で検出されているが、日本では関東地方の 1 集団で検出されている。このことも、長距離散布があったことを示唆する。これらのことは、自然の分布拡大プロセスとは異なる事象の存在を示唆する。

一方で、人工林集団を含めて、日本でもいくつかの集団で複数のハプロタイプがあり、複数回、大陸から種子の導入があったことが示唆される。しかし、これらの種子は *Hp20* のように全国的に一様に広がることになかった。このことから、これらのハプロタイプは *Hp20* が日本列島に広がってからより後に、日本に来たと考えられる。あるいは、日本の人工林のみに存在する非常に頻度の低いハプロタイプも 3 つ検出されているが、図 3-2 のハプロタイプの遺伝的なグループでは互いにバラバラの位置にあり *Hp20* とともに遺伝的に近くなかったことから、日本で分化したハプロタイプであるとは考えづらく、大陸から移入したものと考えられる。さらに、*Hp20* が日本列島に広がってから、変異が蓄積するのに十分な時間が経っておらず、その分布拡大は非常に急激であったと考えられる。

また、人工林集団についても、天然更新集団と同様に、多型性がなく遺伝構造もない、という同じ特徴であった。また、天然林と同様に、九州地方および関東地方で *Hp20* とは異なるハプロタイプが検出されていることから、地元の天然更新集団から人工林集団を育成しているか、逆に人工林集団の逸出個体により天然更新集団が形成されたと考えられる。

遺伝的分化

集団間分化については、日本において分化の程度が非常に低かった。Aguinagalde et al. (2005) はヨーロッパの樹木と灌木の母性遺伝するマーカーの遺伝構造についてレビューした。動物散布である3つの種は (*Corylus avellana*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*) $G_{ST}=0.83\pm 0.05$ SD であり、15の風散布樹種は $G_{ST}=0.56\pm 0.07$ SD であった。日本における樹種の母性遺伝するDNAの分化指数は表3-2-4のとおりである。種子散布様式に関わらず、多くの種で G_{ST} が 0.9、 G'_{ST} が 0.97 を越え、種子散布の制限により高い分化となっている。日本の天然更新のクヌギは ($G_{ST}=0.251$, $G'_{ST}=0.261$) であり、比較して非常に低い。このことは、上述したように自然の分布拡大プロセスとは異なる事象の存在を示唆する。

一方、クヌギの大陸集団は、やはり G_{ST} が 0.421 と比較的遺伝的分化の程度が低いが G'_{ST} は高くなった。これは、用いた葉緑体 SSR マーカーが多型的であったためである。さらに $G_{ST}>N_{ST}$ により、大陸集団には系統地理学的構造があることが示唆され、近隣結合法により作成された系統樹では、2つのグループが示された(図3-5)。また、ハプロタイプをグループに分けた場合には、日本を含めて大まかな遺伝構造が見られることから、大陸集団および日本への分布拡大においては、自然の分布拡大プロセスが生じていたと考えられる。

以上のように、日本産クヌギの葉緑体ハプロタイプの遺伝構造は、広域にわたり多型性が非常に少なく、集団間分化が低く、遺伝構造もない、というこれまでに報告されている他樹種とは異なる独特の特徴が明らかとなった。

表 3-4 日本産樹木 9 種のオルガネラ DNA の遺伝的分化

樹種	種子散布様式	集団数	個体数	DNA	G _{ST}	G' _{ST}	引用
<i>Quercus acutissima</i>	重・動	18	322	C	0.246	0.261	本研究
<i>Quercus gilva</i>	重・動	25	135	C	0.668	0.754	Sugiura et al. 2015
<i>Quercus mongoloca</i>	重・動	33	501	C	0.857	-	Okaura et al. 2007
<i>Quercus aliena</i>	重・動	12	89	C	0.791	-	San et al. 2017
<i>Quercus serrata</i>	重・動	44	350	C	0.750	-	San et al. 2017
<i>Fagus crenata</i>	重・動	17	409	M	0.963	-	Tomaru et al. 1998
<i>Fagus crenata</i>	重・動	21	351	C	0.95	-	Okaura and Harada 2002
<i>Betula maximowicziana</i>	風	25	400	C	0.950	0.977	Tusda and Ide 2010
<i>Picea jezoensis</i>	風	33	264	M	0.901	-	Aizawa et al. 2007

重 重力散布; 動 動物散布; 風 風散布; C 葉緑体; M ミトコンドリア

3-3 核 DNA

本節の目的は、核 SSR マーカーを用いて日本産クヌギの遺伝的多様性と遺伝構造の特徴を明らかにすることである。

3-3-1 材料と方法

サンプル採取

用いた集団および個体は、葉緑体 DNA 解析で用いたものと同じであるが、個体数の少ない日本の天然更新 1 集団を除いたため全 58 集団を対象とした(表 3-5)。

核 SSR 解析

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 (Isagi and Suhandono 1997)、ssrQpZAG15、ssrQpZAG36、ssrQpZAG110 (Steinkellner et al. 1997)、bcqm42 (Mishima et al. 2006)、CsCAT15 (Marinoni et al. 2003)の 7 マーカーを用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit(Qiagen co.)を用い、各プライマーの終濃度が 0.2 μ M となるよう反応液を調整した。PCR 条件は、初期活性化 95 $^{\circ}$ C 15 分の後、熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 54 $^{\circ}$ C で 90 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

遺伝データ解析

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 (R_s ; El Mousadik and Petit 1996)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E ; Nei 1987) および近交係数 F_{IS} を求めた。集団分化の程度は F_{ST} (Weir and Cockerham 1984) を用いて評価した。 F_{IS} および F_{ST} が 0 から有意に偏っているかについては 1000 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 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} の補正值 F'_{ST} (Meirmans and Hedrick 2011) を GenAlex6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012) により算出した。天然更新集団、植栽集団、大陸集団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_s 、 H_E 、 F_{IS} および F_{ST} を両種間で比較し、1000 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。地理的距離と集団分化の関係 (Isolation by distance, IBD, Wright 1943) については Rousset (1997) に従い、集団分化の指標に $(F_{ST}/1-F_{ST})$ を用いて日本の天然更新集団および日本の天然更新集団と大陸集団をあわせ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、Pritchard ら (2000) のアルゴリズムに基づいて開発された STRUCTURE 2.3.4 (Hubis et al. 2009) を用いてベイジアンクラスタリングを行い (以下、STRUCTURE 解析)、クラスター数 K は 1 から 10、100,000 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 ΔK (Evanno et al. 2005) を計算し、最適なクラスター数を推定した。

表 3-5 解析に用いたクヌギ 58 集団の地域、林分タイプ、集団名、サンプル個体数、核 SSR マーカー 7 座の解析による遺伝的多様性及びボトルネック検定の結果
 集団名は葉緑体と同じである

地域	林分タイプ	集団	個体数	遺伝的多様性			ボトルネック検定	
				R_s	H_E	F_{IS}	IAM	TPM
天然更新		KK	51	4.44	0.657	0.164*	0.281	0.922
		GO	13	4.98	0.682	0.011	0.008**	0.023**
		ARD	35	4.20	0.640	0.047	0.219	0.922
		KO	28	4.53	0.651	0.013	0.023	0.500
		KM	13	4.41	0.661	0.063	0.289	0.711
		TR	13	4.30	0.643	-0.077	0.055	0.344
		KN	15	5.36	0.716	0.122	0.594	0.766
		YR	11	4.44	0.659	0.034	0.281	0.500
		KZ	15	4.71	0.668	0.074	0.469	0.852
		YS	12	4.63	0.666	0.089	0.219	0.422
		TH	6	5.71	0.755	-0.009	0.656	0.711
		SM	10	5.46	0.741	-0.021	0.531	0.711
		OG	19	4.74	0.664	0.028	0.078	0.719
		TG	8	4.71	0.666	0.088	0.422	0.781
		SK	14	4.50	0.652	0.061	0.219	0.578
		MK	14	4.66	0.677	0.066	0.406	0.813
		GK	20	4.71	0.637	0.014	0.656	0.977
		計	297	4.736	0.664	0.060		
	日本	人工林	IW	39	3.75	0.592	-0.037	0.016**
MF			32	4.86	0.682	0.175*	0.594	0.852
MA			47	4.40	0.651	0.080	0.016**	0.500
MS			22	4.66	0.644	0.060	0.422	0.719
TT			48	4.62	0.678	-0.010	0.008**	0.344
TM			47	4.75	0.668	-0.015	0.078	0.945
TI			47	4.51	0.647	0.042	0.219	0.781
TU			48	4.83	0.677	0.062	0.219	0.781
GT			29	4.97	0.693	0.113	0.813	0.988
GM			47	4.93	0.685	0.133*	0.289	0.766
TO			48	4.81	0.678	0.069	0.281	0.945
IZ			40	4.33	0.640	0.033	0.500	0.961
IO			10	4.96	0.700	0.256*	0.219	0.656
YY		48	4.43	0.660	0.034	0.016**	0.719	
YK		46	4.70	0.674	-0.048	0.055	0.422	
ME		48	4.46	0.663	0.099	0.055	0.469	
KY		48	5.31	0.731	0.150*	0.344	0.945	
HY		47	5.19	0.725	0.060	0.055	0.766	
WK		44	4.99	0.695	0.130	0.234	0.980	
WM		31	4.52	0.654	0.061	0.188	0.711	
YA		48	4.82	0.676	-0.004	0.289	0.852	
EH		48	4.67	0.663	0.101	0.344	0.781	
FU		43	4.82	0.652	0.084	0.422	0.961	
OH		48	4.89	0.665	0.128*	0.344	0.961	
OK1		48	4.51	0.661	0.072	0.008*	0.922	
OK2		48	4.65	0.661	0.041	0.344	0.719	
KS	48	4.97	0.678	0.049	0.656	0.992		
KH	47	5.29	0.692	0.038	0.344	0.961		
	計	1194	4.735	0.669	0.063			

表 3-5 つづき

地域	林分 タイプ	集団	個 体 数	遺伝的多様性			ボトルネック検定	
				R_s	H_E	F_{IS}	IAM	TPM
大陸	天然更新	SA	41	4.80	0.684	0.101	0.289	0.973
		SU	47	5.23	0.720	0.083	0.656	0.992
		F	50	5.11	0.692	0.092	0.852	1.000
		CD	49	4.74	0.668	0.054	0.469	0.813
		CH	49	4.78	0.681	0.077	0.594	0.766
		SG	46	4.93	0.679	0.031*	0.281	0.781
		GE	46	4.86	0.676	0.116	0.711	0.996
		HA	39	4.37	0.657	0.018	0.039*	0.766
		KW	28	5.22	0.738	0.057	0.039*	0.973
		Che	14	4.97	0.677	0.041	0.219	0.500
		XI	54	4.63	0.652	0.100	0.422	0.977
		MI	47	3.90	0.587	0.059	0.344	0.961
		DA	51	4.33	0.638	0.043	0.234	0.852
		計	541	4.759	0.668	0.071		

R_s アレリックリッチネス(6 個体); H_E ヘテロ接合度の期待値; F_{IS} 近交係数; * F_{IS} が有意に 0 より大きい $p < 0.05$; ** 有意なボトルネックが検出された $p < 0.05$

3-3-2 結果

集団の遺伝的多様性

核 SSR マーカー 7 座を用いてクヌギ天然更新集団 297 個体、人工林集団 1194 個体、大陸集団 541 個体の解析を行った結果、全 2032 個体(表 3-5)のデータを得ることができた。各集団の遺伝的多様性の指標の平均は天然更新集団で $R_s=4.736$ 、 $H_E=0.664$ 、人工林集団で $R_s=4.735$ 、 $H_E=0.669$ 、大陸集団で $R_s=4.759$ 、 $H_E=0.668$ であり(表 3-5)、3 つのグループに有意な差は見られなかった。また、近交係数 F_{IS} は、天然更新集団が 0.060、人工林集団が 0.063、大陸集団が 0.071 であり、各集団ごとに見ると天然更新集団のうち 1 集団、人工林集団のうち 5 集団、大陸集団で 1 集団が 0 から有意に大きかった。

最近のボトルネックについては IAM モデル下では、天然更新集団が 1 集団、人工林集団が 5 集団、大陸集団で 1 集団でボトルネックを検出し、TPM モデルではボトルネックが検出された集団は天然更新集団の GO のみであった(表 3-5)。

日本の天然更新集団は、緯度、経度と遺伝的多様性の指標 R_s 、 H_E との間に相関関係はなく、クラインは見られなかった。一方、大陸集団は、

R_S 、 H_E とも緯度と有意な負の相関(図 3-6、図 3-7)、経度と有意な正の相関があった(図 3-8、図 3-9)。すなわち北西にある集団ほど遺伝的な多様性が低かった。

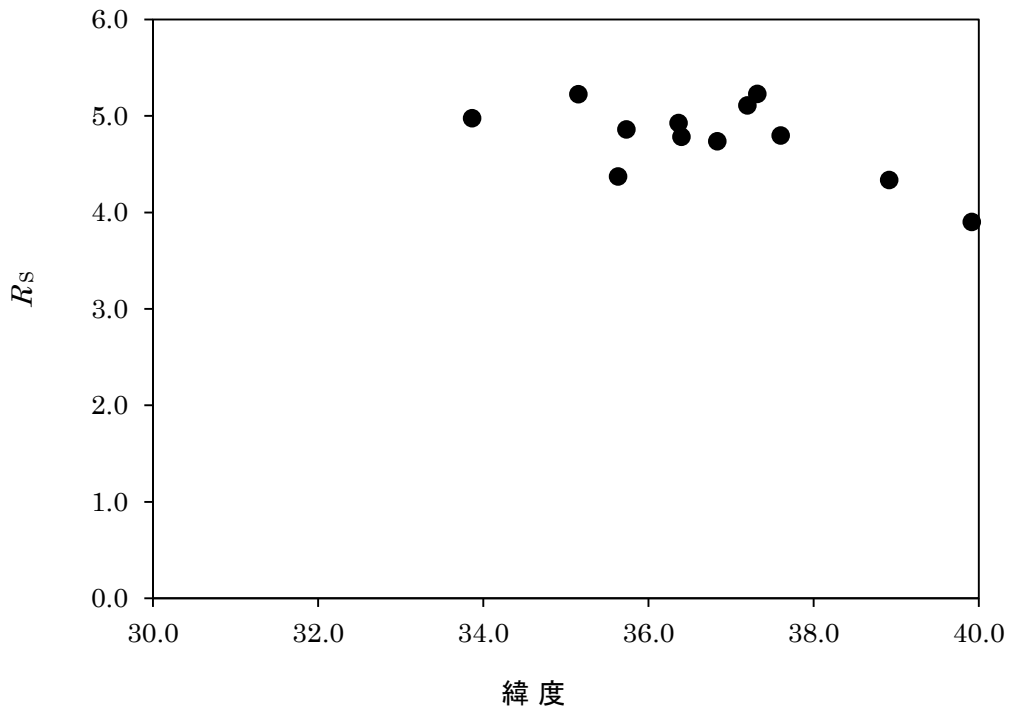


図 3-6 クヌギの大陸 13 集団の緯度とアレリックリッチネス(R_S)の関係
緯度と R_S に負の相関があった ($p < 0.05$)

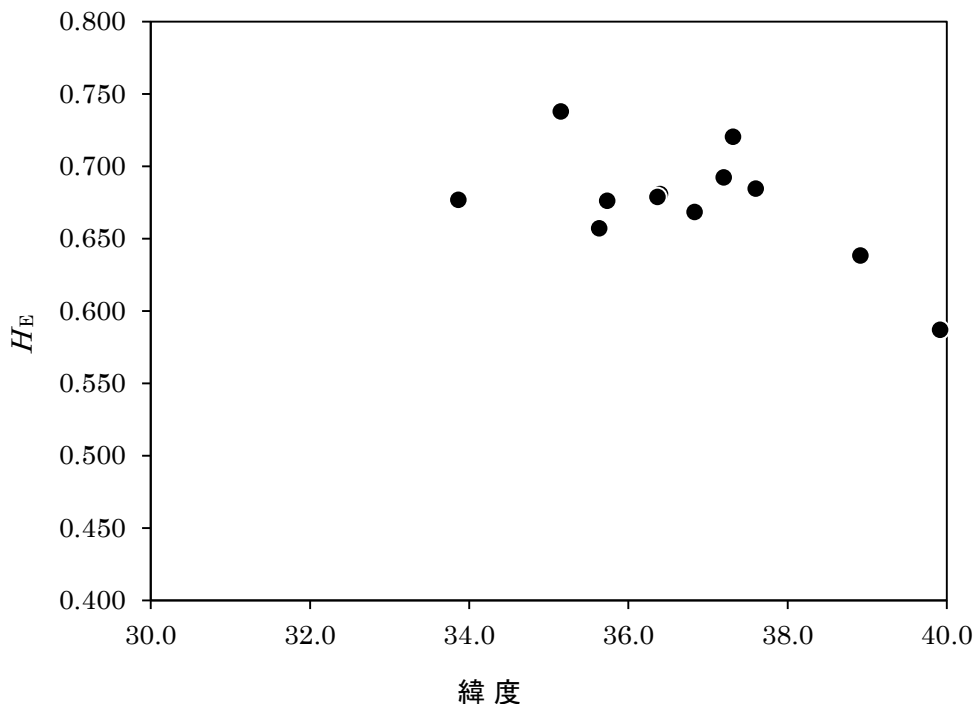


図 3-7 クヌギの大陸 13 集団の緯度と H_E の関係
緯度と R_S に負の相関があった ($p < 0.05$)

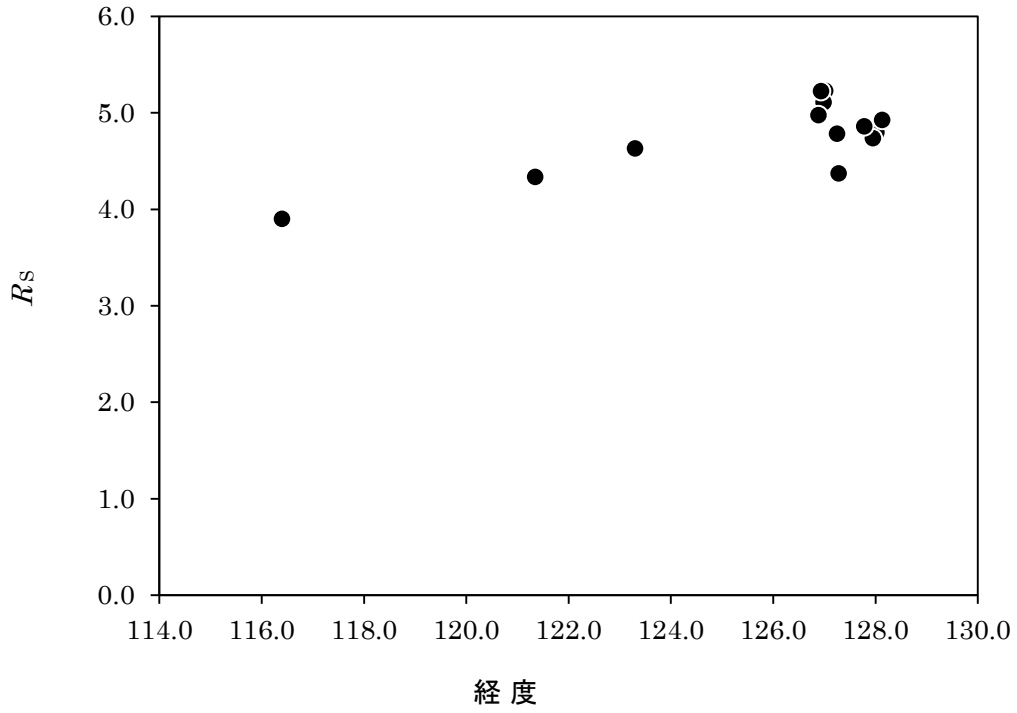


図 3-8 クヌギの大陸 13 集団の経度とアレリックリッチネス (R_S) の関係
 経度と R_S に正の相関があった ($p < 0.01$)

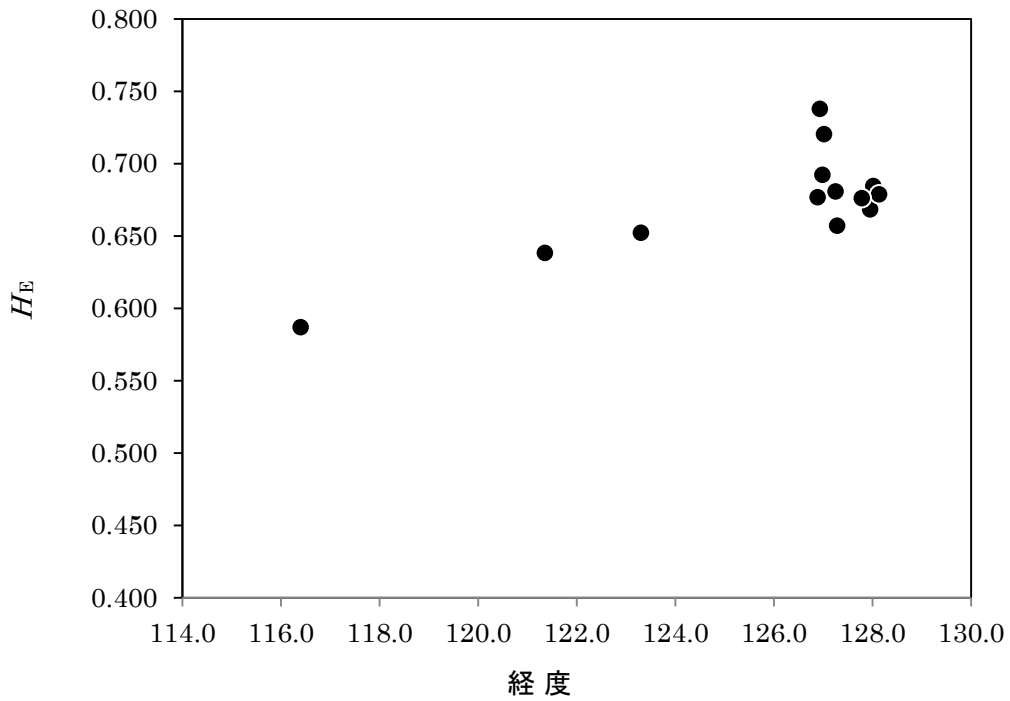


図 3-9 クヌギの大陸 13 集団の経度と H_E の関係
 緯度と H_E に正の相関があった ($p < 0.01$)

集団間分化と集団間の遺伝的な関係

集団間分化の指標である分化指数 F_{ST} (または F'_{ST})は、天然更新集団が 0.027(0.081)、人工林集団が 0.026(0.080)、大陸集団では 0.024(0.075)でありいずれの F_{ST} も小さいが有意であった ($p < 0.001$)。また F_{ST} の値に3つのグループ間で有意な違いはなかった。

IBD については、日本の天然更新集団のみ、または日本の天然更新集団と大陸集団を合わせて解析した場合にも集団間の地理的距離と遺伝的距離に有意に正の相関がみられ、地理的に近い集団ほど遺伝的に近いことが示された(図 3-10)。

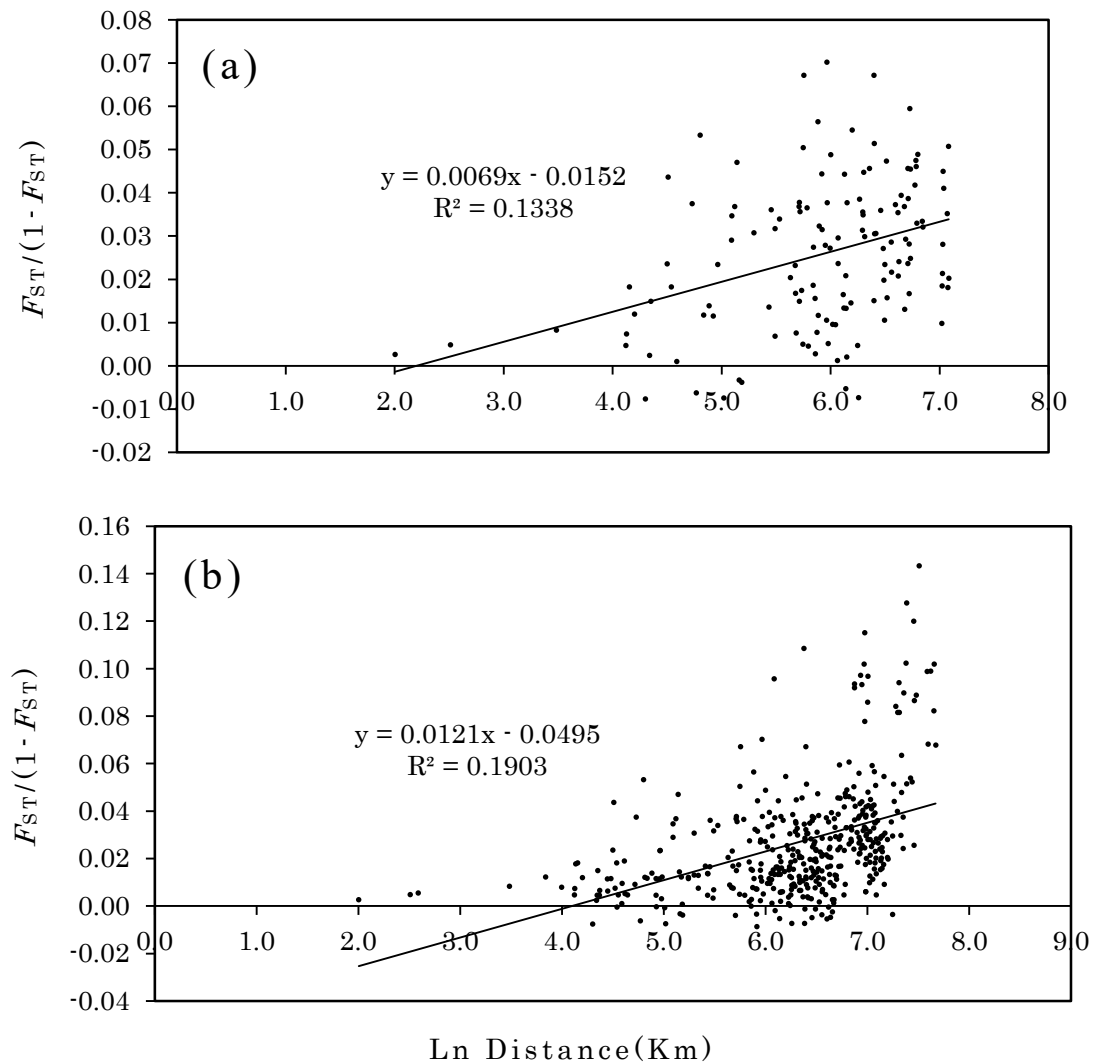


図 3-10 集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係 (IBD)
(a)日本の天然更新 17 集団および (b)日本の天然更新 17 集団と大陸 13 集団の計 30 集団
いずれも地理的距離と遺伝的距離に有意な相関があった ($p < 0.01$)

集団間の関係は、日本の天然更新集団と大陸集団を合わせて STRUCTURE 解析を行った場合、事後確率は $K=4$ まで高くなり、 ΔK は $K=2$ で最も大きくなった(図 3-11)。 $K=2\sim 4$ はいずれも、中国の 1 集団が他の集団とは明確に異なるクラスターに属した。 $K=3$ で東日本に多い紫のクラスター 2 が西日本の集団になると割合が下がり、大陸集団ではさらに低い割合になった。このとき、それぞれのクラスターの F_{ST} はクラスター 1(水色)で 0.0003、クラスター 2(紫)で 0.1106、クラスター 3(オレンジ)で 0.3593 であり、東日本で多いクラスター 1 よりクラスター 2 の方が小さかった。

また、人工林集団を加えたクヌギ全集団を解析した場合、事後確率は $K=6$ まで高くなり、 ΔK は $K=2$ で最も大きくなった(図 3-12)。 $K=2$ を見ると、西日本に行くほど橙色のクラスター割合が増えていく。例外があっても、人工林集団も同じ傾向がある。 $K=2$ の時クラスター 1(水色)、2(オレンジ)の F_{ST} はそれぞれ 0.0057、0.0032 であり、東日本で多いクラスター 1 よりクラスター 2 の方が小さかった。

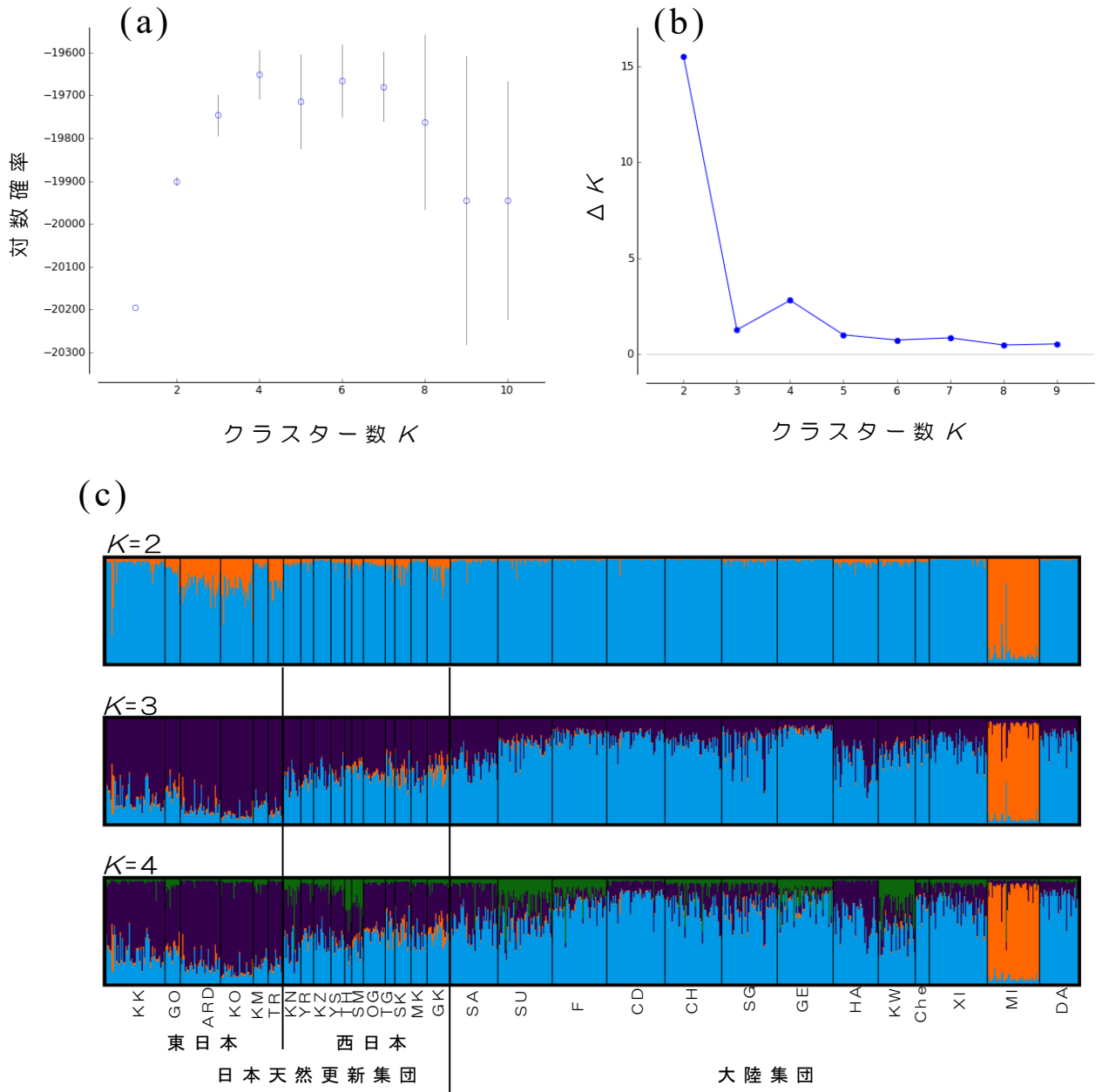


図 3-11 クヌギの日本の天然更新集団および大陸集団のベイズクラスタリング結果
 (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) $K=2$ および $K=3, K=4$ における各個体ごとのクラスタの混合割合
 $K=3$ の時クラスタ-1 (■), 2 (■), 3 (■) の F_{ST} はそれぞれ 0.0003、0.1106、0.3593

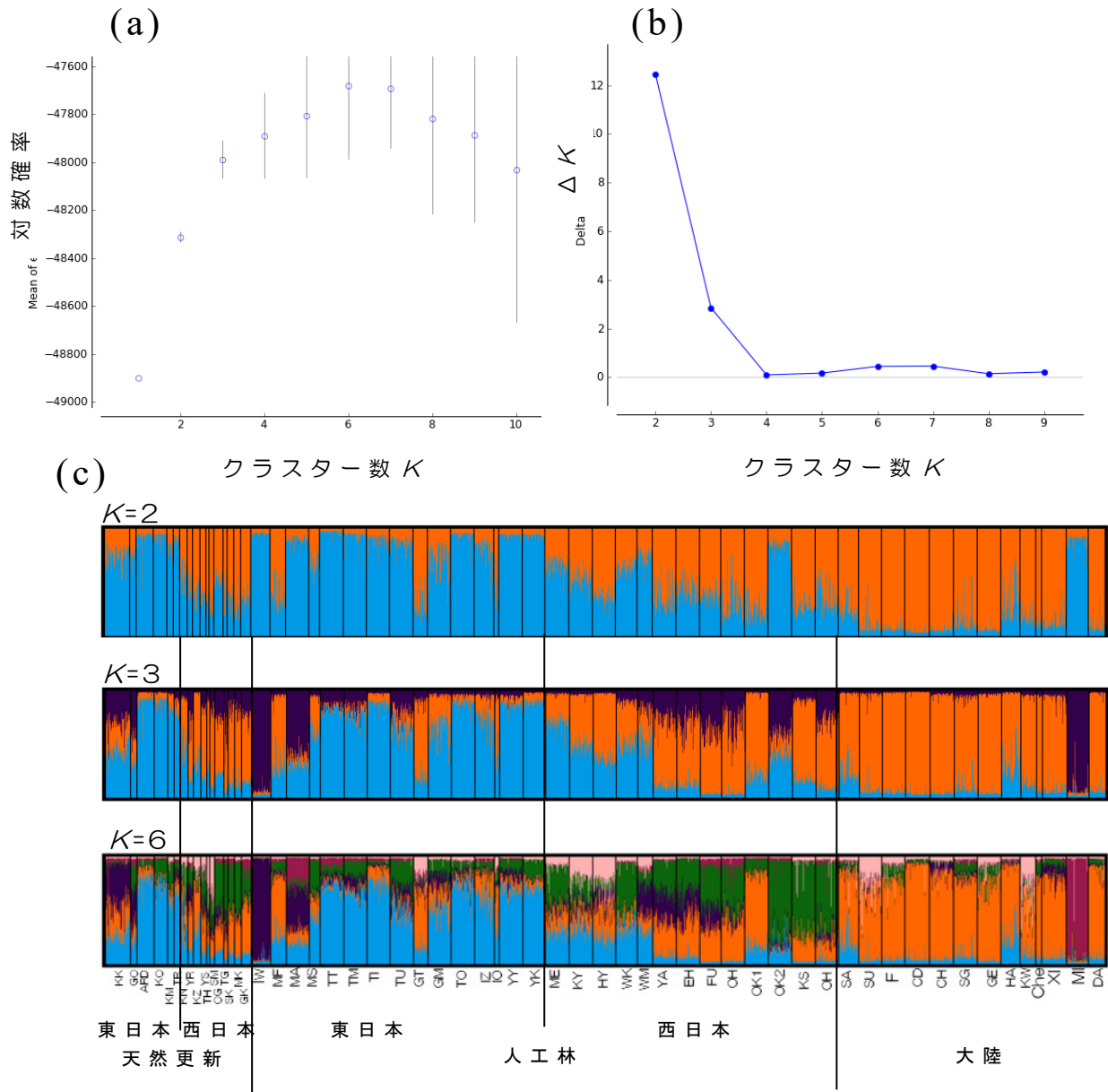


図 3-12 日本のクヌギ天然更新集団、人工林集団および大陸集団のベイズクラスタリング結果
 (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) $K=3$ および $K=4$ 、 $K=6$ における各個体ごとのクラスターの混合割合。 $K=2$ の時クラスター 1 (■)、2 (■) の F_{ST} はそれぞれ 0.0057、0.0032

主座標分析の結果を図 3-13 に示す。日本の天然更新集団と人工林集団のうち西日本に位置するものと大陸集団(中国の 1 集団を除く)は、おおむねまとまっていた。一方、東日本の天然更新集団と植栽集団は、互いに分散してはいるものの、主成分 1 が正の値をとる集団がほとんどであり、負の値を取る西日本の集団とは異なった。

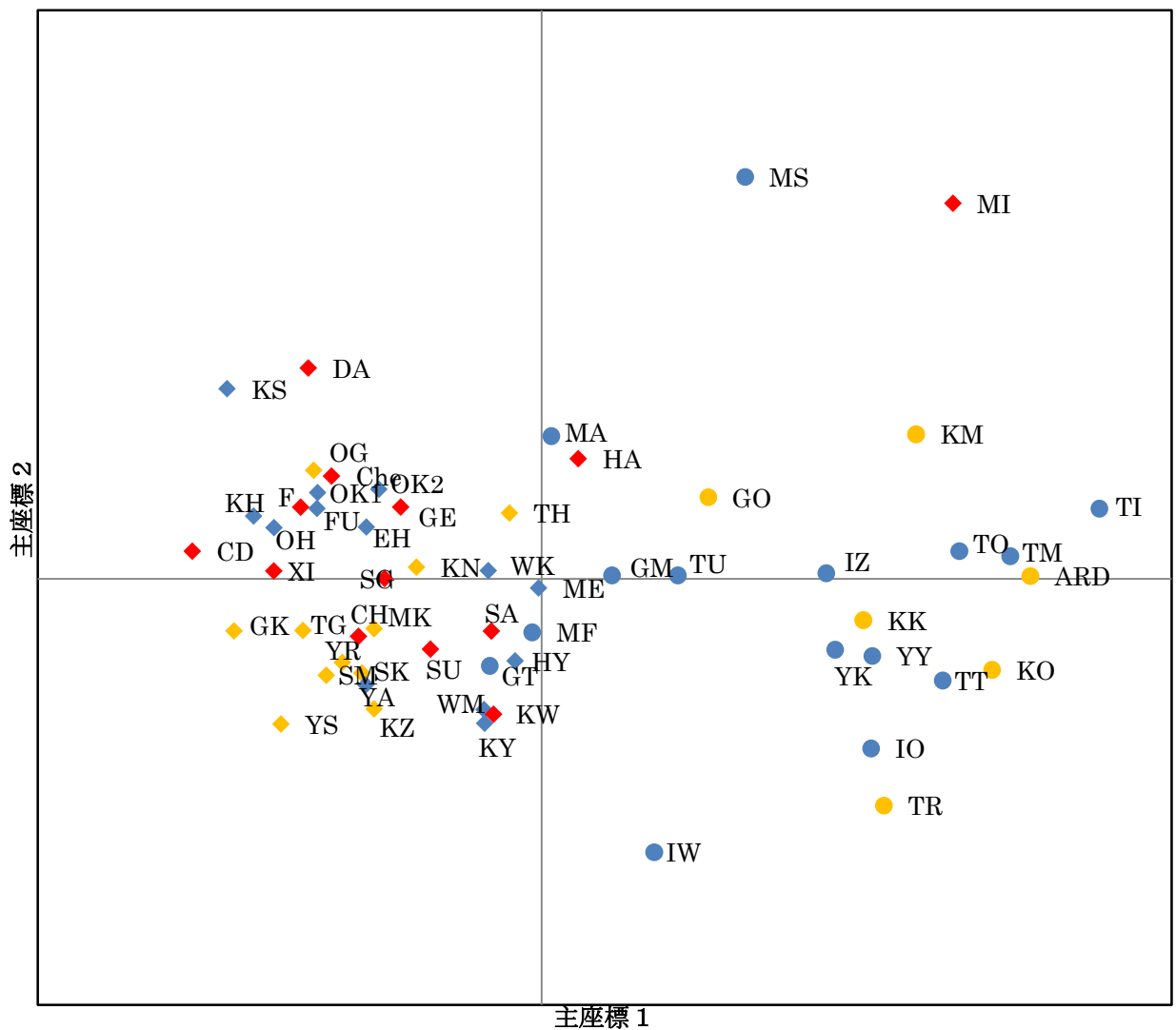


図 3-13 クヌギ 59 集団間のペアワイス F_{ST} に基づく主座標分析結果
 日本の天然更新 18 集団 (黄)、人工林 28 集団 (青)、大陸 13 集団 (赤)、
 東日本 21 集団 (○)、西日本及び大陸集団 37 集団 (◇)
 主座標 1 が正の範囲に主に東日本集団が、負の範囲に西日本および大
 陸集団が位置した

3-3-3 考察

クヌギの核 DNA の遺伝的多様性

日本集団は天然更新集団または人工林集団に限らず同程度の遺伝的多様性を保持しており、また大陸集団と多様性は同程度であった。また、最近の明らかなボトルネックを受けた集団は東北の 1 集団のみであった。ボトルネックテストにより創始者効果など分布変遷の過程で急激な個体数の減少を経験した集団が検出される(コナラ Ohsawa et al. 2011、ヤチダモ Hu et al. 2010)。したがって、日本集団は強いボトルネックを受け極端に個体数を減らした履歴はないと考えられた。また、大陸集団には地理的クラインがあったにもかかわらず、日本の天然更新集団にはクラインがなかった。日本産天然樹種には北東ほど変異が減少するクラインが見られるものがあり(eg. ウダイカンバ Tsuda and Ide 2005; ブナ Hiraoka and Tomaru 2009)、北東へ分布拡大した時に生じた創始者効果か、最終氷期のボトルネック、あるいは両方と考えられている(戸丸 2013)。地理的クラインもボトルネックもないクヌギは十分な個体数を保持したまま最終氷期以降分布を拡大したと考えられる。大陸集団で検出されたクラインは、多様性が低い 3 集団、すなわち緯度の高い中国の 3 集団の影響が大きく、韓国国内では、クラインは検出されなかった。したがって、大陸では北方集団で遺伝的多様性が低く、他の中国産落葉広葉樹で考察されているように(Hu et al. 2010; Liu et al. 2014)、分布拡大の際の創始者効果の可能性がある。

日本の天然更新集団は 1 集団を除き任意交配集団とみなせたが、人工林集団は有意に F_{IS} が 0 より大きいものが 4 集団あった。人工林集団は、個体数が少ない林などで近親交配した種子が用いられた可能性がある。

遺伝構造

日本の天然更新集団間の分化係数 F'_{ST} は 0.081 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 $G'_{ST}=0.090$ (Ohsawa et al. 2011)、分布域全体を網羅したブナ $G'_{ST}=0.168$ (Hiraoka and Tomaru 2009)より低かつ

た。

STRUCTURE 解析で中部地域を境目として東日本と西日本+大陸と二つのグループに分かれる構造があった。さらにペアワイズ F_{ST} に基づく主座標分析でも同様の傾向が見られた。東日本集団と西日本集団の遺伝的多様性の指標および遺伝的分化係数 F_{ST} に違いがないか検証したところ、 R_s が有意に東日本集団で低く ($p < 0.05$)、有意ではないが F_{ST} が東日本で高かった。西日本で遺伝的多様性が高い落葉広葉樹はこれまでに報告されており(ナラガシワ、コナラ San et al. 2017、ブナ Hiraoka and Tomaru 2009)、これは第四紀の氷期・間氷期の気候変動化においても、西日本では落葉広葉樹の集団が比較的安定的に維持されてきたことによると考えられている(戸丸 2013)。クヌギもこれらの種と同様に、氷期に西日本に生育していたと考えられる。これは Zhang et al. 2014 のエコロジカルニッチモデリングで最終氷期には日本列島にクヌギの生育適地がなかったか、あっても西日本のごく一部であったことと一致する。しかし、上記の樹種や西日本のみ分布するスダジイ(Aoki et al. 2014)ではより南の集団で遺伝的多様性が高いクラインが存在しているが、クヌギはクラインが存在しなかった。このことは、クヌギの分布拡大様式がこれらの種とは異なっている可能性を示唆する。一方で、東日本集団のみでは IBD は存在していなかったが、西日本集団のみでは存在しており(図 3-14)、STRUCTURE 解析でも東日本クラスターは西日本クラスターより F_{ST} が高く、東日本クラスターの方が遺伝的浮動の影響をより強く受けていると考えられた。これらのことから、西日本集団の方が安定的に集団を維持してきたが、東日本では、地理的に徐々に分布拡大が進んだのではなく、ランダムに飛び石的に集団が形成され、それが集団間の分化の程度が高いことにも反映していると推察される。

この東西に分かれる傾向は人工林集団でも同様である。したがって、人工林集団は、天然更新集団と同じような歴史的経歴を持っており、地域の天然更新集団の種子を基に人工林が造成された、あるいは逆に人工林集団の逸出個体が天然更新集団のもとになっていると考えられる。

大陸集団はおおむね一つのグループになったが、STRUCTURE 解析、

主座標分析、いずれも集団 MI が異なる遺伝的グループに属した。この集団 MI は、最も内陸にあり、遺伝的多様性も著しく低い。ほかの大陸集団とは、分布の拡大ルートが異なり、遺伝子流動も起こっていない可能性が示唆される。

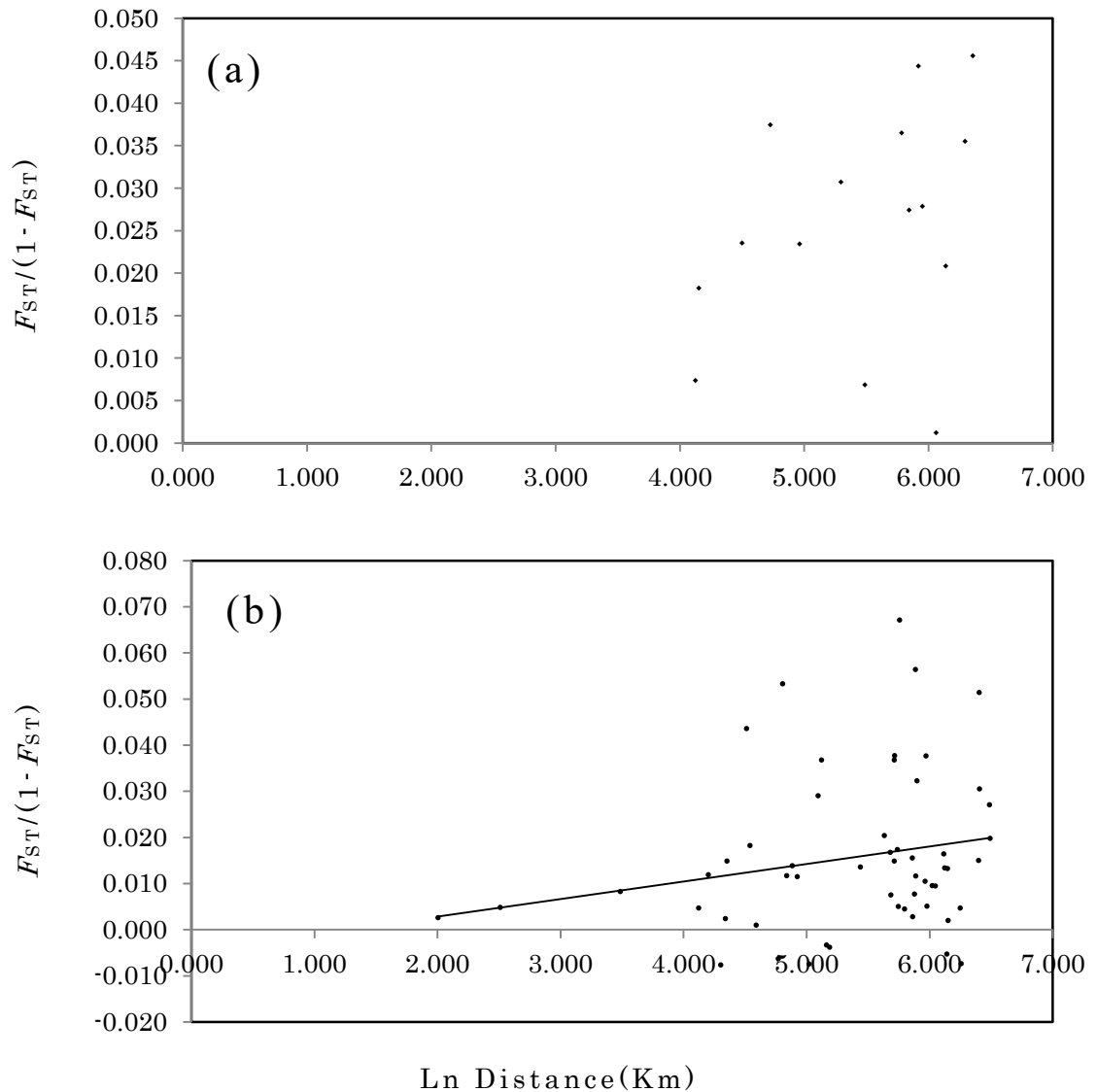


図 3-14 クヌギの日本の天然更新集団間の地理的距離と遺伝的距離の関係 (IBD)
 (a)東日本の天然更新 6 集団および (b)西日本の天然更新 11 集団
 西日本の天然更新集団で地理的距離と遺伝的距離に有意な相関があった ($p < 0.05$)

3-4 考察

3-4-1 日本産クヌギの遺伝構造

葉緑体 DNA 解析で、日本の天然更新集団と人工林集団とも、九州地方から東北地方まで広範囲に同じハプロタイプが分布しており、ほとんどの集団がそのひとつのハプロタイプに固定されているという、特異な遺伝的な特徴を検出した。クヌギは急速に分布を拡大し、その後十分な時間を経っていないと考えられる。一方、核 SSR 解析の結果では、クヌギは過去の分布変遷において個体数が極端に減少することはなかったと考えられた。さらに、核 DNA で西日本では遺伝的多様性が高い樹種はしばしば見られ、クヌギもそれらの種と同様に氷期のレフュージアが西日本に存在していたと考えられた。さらに、日本の天然更新集団および人工林集団を含めて一定の地域性があり、西日本と大陸集団(中国の MI を除く)は遺伝的にまとまりが見られる一方、東日本の集団は祖先集団は共通すると考えられるものの、現在個々の集団が遺伝的に非常にばらつきが高かった。西日本にレフュージアが存在したと考えるのは、ENM (Zhang et al. 2015)の結果からも妥当であり、ENM や花粉分析結果 (Tsukada 1985)から特に九州地方周辺に存在すると考えられる。

したがって、葉緑体 DNA と核 DNA の結果を総合すると、クヌギは西日本のごく一部、おそらく九州地方周辺、のレフュージアに生育していたが、その後、東北地方まで急速に分布を拡大した。その過程で、個体数を極端に減らすことはなかった。特に東日本から東北地方まで拡大した際には、系統的ではなく、ばらばらに集団が形成されていったと考えられる。

第四章 日本産アベマキの遺伝構造

4-1 はじめに

アベマキの遺伝構造に関する研究としては、本州中部以西の日本集団を含めた東アジアの集団遺伝構造に関する葉緑体 DNA シーケンスによる研究(Chen et al. 2012)がある。この研究では、東アジア全体で弱い系統地理学的構造があるが、中国の中東部は他の地域よりハプロタイプ数が多く有意な構造があることが示された。その中で、日本集団は 6 集団解析されているが、研究全体で 26 個と多数のハプロタイプが検出されたにも関わらず、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おり、ボトルネックか創始者効果が働いたことが示された。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することを目的とした。

4-2 材料と方法

4-2-1 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。山形県の集団 SY は、里山林であるが植栽木に起因する可能性もあるため由来不詳とした。アベマキの集団 OI と集団 SMV 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 4-1 および表 4-1 に示す。乾燥した葉は DNA 抽出まで、室温で保管した。

表 4-1 解析に用いたアベマキ 7 集団および対照に用いたクヌギ 3 集団の所在地、林分タイプ、緯度、経度、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の指標および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 タイプ	北緯	東経	個体数	R_S	H_E	F_{IS}	ボトルネック検定	
										IAM	TPM
アベマキ	SY	山形	由来不詳	38°15'	140°21'	32	4.66	0.721	0.051	0.005 ⁵	0.492
	OI ¹	静岡	河畔林	34°53'	138°05'	7	4.22	0.639	-0.073	0.570	0.910
	ST	愛知	人工林	35°14'	137°04'	45	4.79	0.698	0.073	0.557	0.084
	YRV	京都	河畔林	35°30'	135°17'	20	4.46	0.659	0.061	0.492	0.275
	SMV ¹	岡山	山地林 ²	34°53'	133°25'	6	4.80	0.747	0.018	0.160	0.432
	KM	広島	山地林 ²	34°55'	132°56'	24	4.32	0.681	-0.021	0.032 ⁵	0.846
	AD	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 ³	0.047		
クヌギ	GO	宮城	河畔林	38°45'	141°23'	12	4.55	0.601	-0.012		
	ARD	埼玉	河畔林	36°07'	139°19'	35	4.06	0.627	0.123 ⁴		
	SM	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 ³	0.078		

R_S アレリックリッチネス(6 個体); H_E ヘテロ接合度の期待値; F_{IS} 近交係数; 1 アベマキとクヌギが同所的に生育; 2 遺伝子資源保存林; 3 有意に差がある($p < 0.05$); 4 有意に 0 より大きい($p < 0.05$); 5 有意なボトルネックが検出された($p < 0.05$)

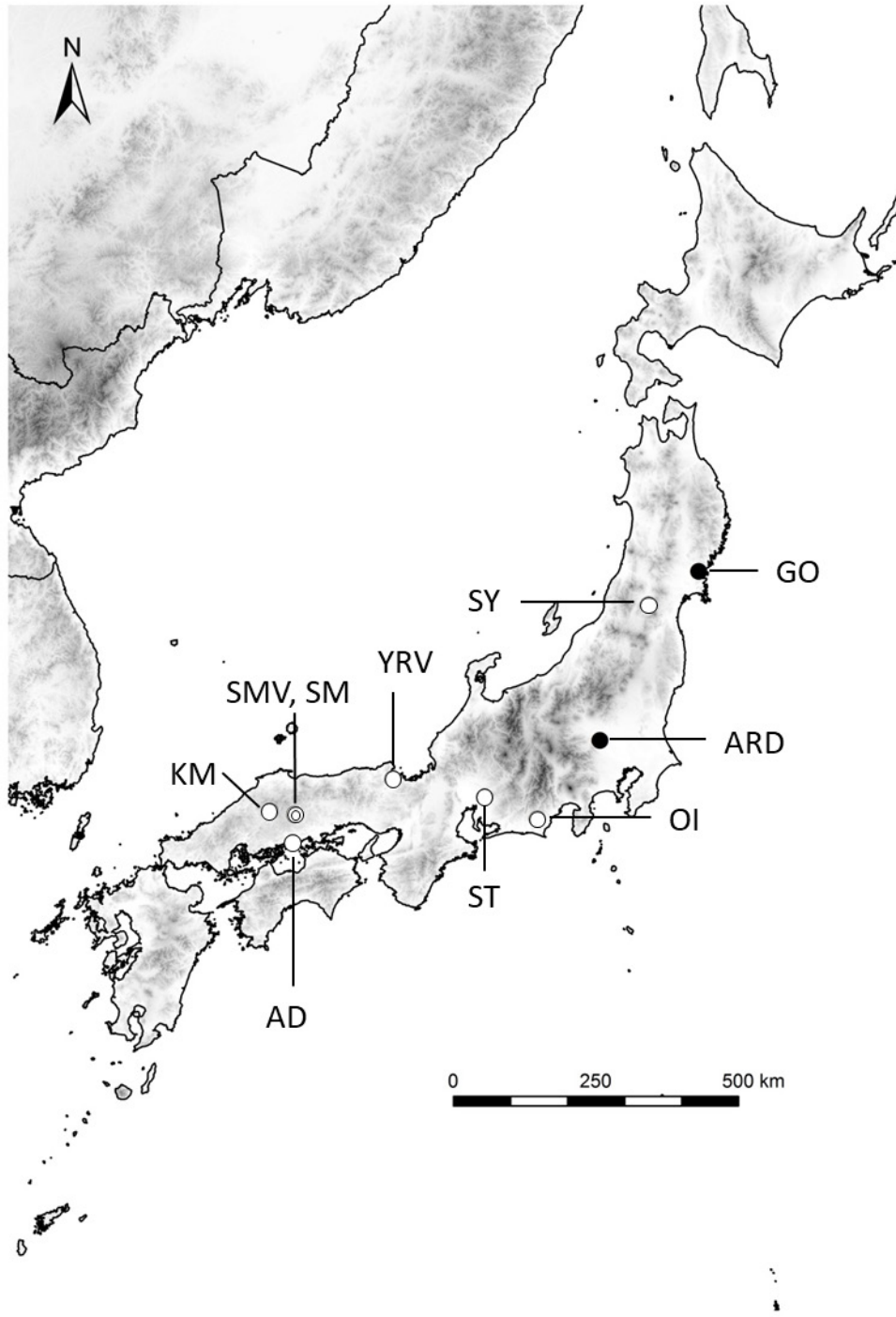


図 4-1 サンプルングを行ったアベマキ7集団およびクヌギ3集団の位置
 白丸はアベマキ集団、黒丸はクヌギ集団、二重丸は両種の集団を示す

4-2-2 DNA 解析

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 (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 マーカーを用いた。また葉緑体 SSR マーカーとしては、*μdt1*、*μdt3*、*μdt4*、*μcd4*、*μcd5*、*μkk4*(Deguilloux et al. 2003)の 6 つのマーカーを用いた。PCR 反応には Multiplex PCR kit(Qiagen co.)を用い、核プライマーの終濃度が $0.2\mu\text{M}$ 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。

4-2-3 遺伝データ解析

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 (R_s ; El Mousadik and Petit 1996)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E ; Nei 1987)および固定指数 F_{IS} を求めた。集団分化の程度は F_{ST} (Weir and Cockerham 1984)を用いて評価した。 F_{IS} および F_{ST} が 0 から有意に偏っているかについては 1000 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 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} の補正值 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_s 、 H_E 、 F_{IS} および F_{ST} を両種間で比較し、1000 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($F_{ST} / 1 - F_{ST}$)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 (Peakall and Smouse 2012)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、Pritchard ら(2000)のアルゴリズムに基づいて開発されたSTRUCTURE2.3.4 (Hubis et al. 2009)を用いてベイジアンクラスタリングを行い(以下、STRUCTURE 解析)、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 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 DNA

葉緑体 SSR マーカー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。

4-3 結果

4-3-1 核 DNA

アベマキ 7 集団 143 個体、クヌギ 3 集団 57 個体について 10 座の SSR 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 $R_S=4.58$ 、 $H_E=0.694$ 、クヌギで $R_S =4.47$ 、 $H_E=0.630$ であった(表 4-1)。また、近交係数 F_{IS} は、アベマキが 0.047、クヌギが 0.078 であった。アベマキは、由来不詳の集団 SY と人工林の集団 ST も R_S および H_E はいずれも天然集団の値の幅の範囲内であった。 R_S および H_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_E は有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、集団 SY と集団 KM 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 4-1)。集団間分化は、アベマキ全集団の分化指数(F_{ST})は 0.025 であり有意であった($p < 0.001$)。また Meirmans and Hedrick(2011)の F'_{ST} は 0.087(不詳および人工林を除いた 5 集団で 0.100)であった。クヌギ集団を含めた近隣結合法で作成した系統樹(図 4-1)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、アベマキの集団 OI は 2 つのクラスターの間位置していた。アベマキ集団は、集団 YRV と集団 AD 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、人工林の集団 ST および由来不詳の SY 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。同様に、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、 ΔK は $K=2$ で最も大きくなった(図 4-2)。 $K=2$ のとき、クラスター 1、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、アベマキの集団 OI および集団 YRV にはクヌギ集団で多いクラスター 2 が、クヌギの集団 SM ではアベマキ集団で多いクラスター 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 1、3 から構成され、集団 SY のみクラスター 3 の割合が高く、集団 OI と集団 YRV はクラスター 2 も含まれていたが、集団 YRV でのクラスター 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 2 で構成されていたが、集団 SM にはクラスター 1、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 1 が 0.0630、クラスター 2 が 0.1082、クラスター 3 が 0.0958 であった。

4-3-2 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、 $\mu dt1:90bp$ 、 $\mu dt3:129bp$ 、 $\mu dt4:139bp$ 、 $\mu cd4:101bp$ 、 $\mu cd5:81bp$ 、 $\mu kk4:115bp$ であった。

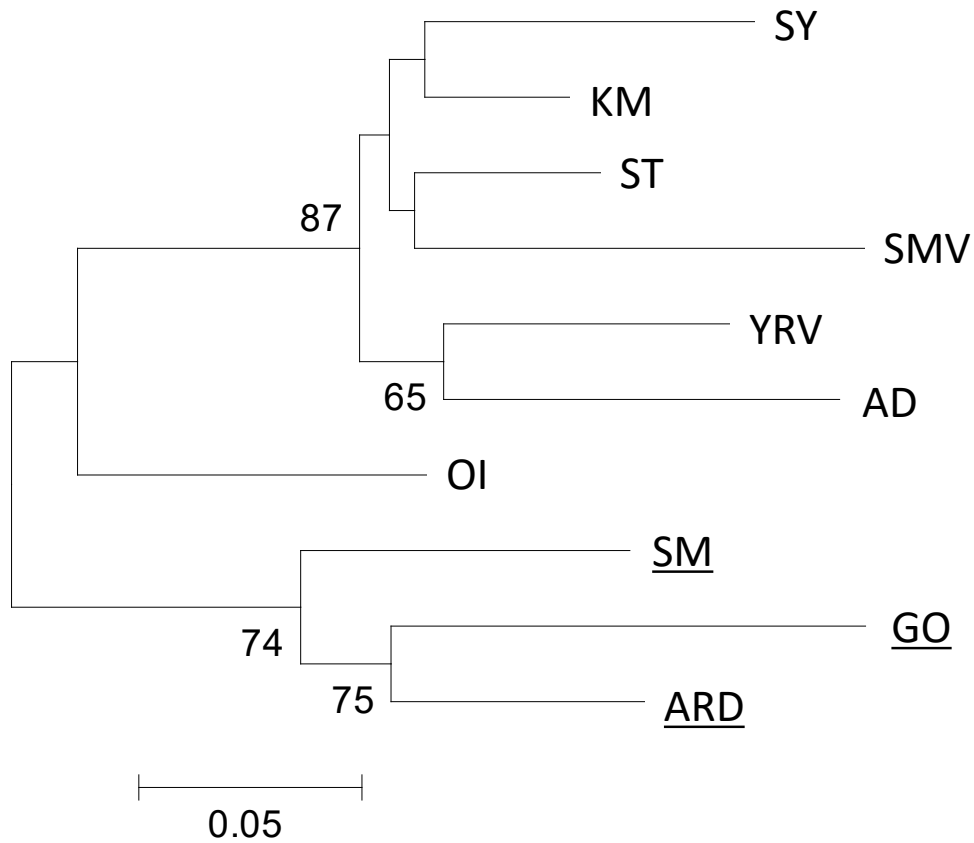


図 4-2 アベマキ 7 集団およびクヌギ 3 集団の遺伝距離 D_A (Nei 1973) に基づいて近隣結合法で作成した系統樹
 下線はクヌギ集団
 数字は 1000 回の繰返しを行ったブートストラップ率 (50 以上を記載)
 バーは遺伝距離を示す

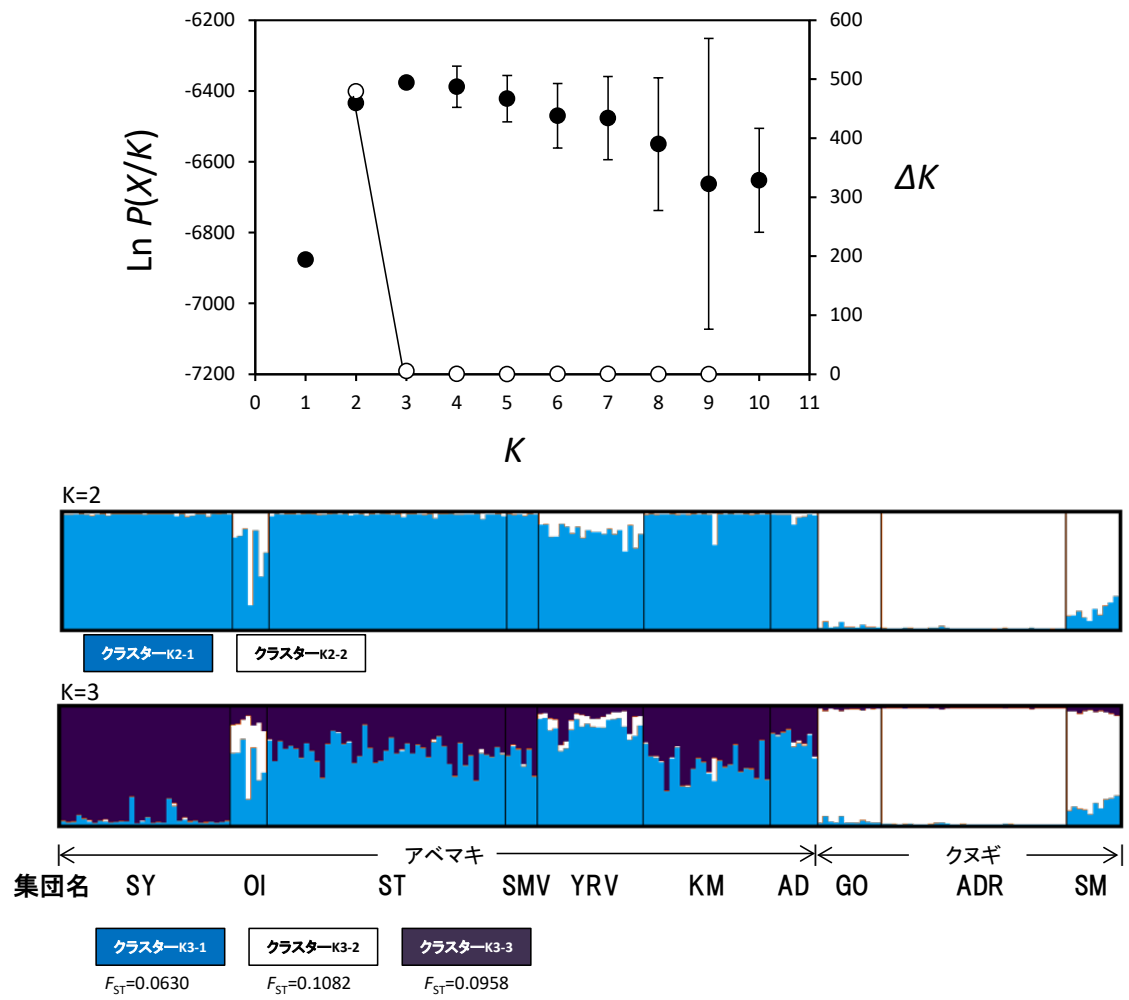


図 4-3 アベマキ 7 集団およびクヌギ 3 集団のベイズクラスタリングを用いて分類したクラスター数 (K, ●) と尤度 (Ln P(X/K), ○) と変化率 (ΔK) の関係 (上) およびクラスター数が 2 および 3 の場合の、アベマキ 7 集団およびクヌギ 3 集団の各個体の推定された各クラスターの割合 (下)

4-4 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、しかも第三章で日本のクヌギ集団で優占しているのと同じ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(e.g. Fujii et al. 2002; Tsuda and Ide 2010; Kanno et al. 2004)の葉緑体DNAが多型と地域性を持っていたのとは異なる。一方、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(Chen et al. 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。一方、調査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。

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っ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人工林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_{ST} は0.087(人工林を除く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 $G'_{ST}=0.090$ (Ohsawa et al. 2011)、分布域全体を網羅したブナ $G'_{ST}=0.168$ (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 STRUTURE 解析では $K=3$ のとき主にクラスター1、3の混合となっているが、最北の集団 SY はクラスター3で優占されていた。また、クラスター3は F_{ST} の値がクラスター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1と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、集団 SY 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。ただし、Chen et al. (2012)の ENM では最終氷期のアベマキの分布域は西日本であったことを示唆している。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集団 SY

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、そのことが集団 SY の STRUCTURE 解析やボトルネックの結果に反映された可能性もある。

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集団 OI は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アベマキ集団 SMV およびクヌギ集団 SM では、 $K=2$ および 3 のときアベマキ集団ではクヌギに多いクラスター 2 がなく、クヌギ集団ではアベマキに多いクラスター 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 解析で見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)。今後、アベマキ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。

第五章 クヌギとアベマキの浸透交雑

5-1 はじめに

アベマキとクヌギはコナラ属クヌギ節の種であり、この2種間で交雑を行うとされる(北村・村田 1979)。両種の中間的な形質を備えた個体の存在が古くから知られており、ミヅアベ(倉田 1949)やアベクヌギ(橋詰・金川 1988)などと呼ばれる。中間的な形質を示す個体は、中国地方など(橋詰・金川 1988)で見られるが、天竜川流域で現在でも両種が交雑していると考えられる交雑帯が存在することが、Hiroki and Kamiya (2005)によって報告されている。両種の葉形態の変異については、一般にクヌギよりアベマキの方が整生で幅が広く、クヌギの葉には腰細のものがあ、また成葉の裏面ではクヌギは葉毛がほとんどないのに対し、アベマキは星状毛が密生するとされている(橋詰・金川 1988)。しかし、葉の大きさや形状のみから両種を区別することは難しく(橋詰・金川 1988)、両種のクヌギ、アベマキの分類は葉裏面の葉毛が決め手(岡田ら 1996)とされている。

これまでクヌギとアベマキの交雑について遺伝マーカーを用いた研究は行われておらず、また人工交配による雑種形成に関わる検証も行われていない。そのため両種が実際に浸透性交雑を行っているか、また、中間的な形質の個体が本当に交雑個体なのかは明らかとなっていない。そこで、本研究では、現在、交雑帯とされている場所に生育している個体を対象に、実際に交雑が生じているのか、また、従来形態から判別する交雑個体の識別が妥当であるのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、各個体について、クヌギとアベマキの識別点となっている葉裏の星状毛密度を測定すると同時に、葉緑体 SSR マーカーと核 SSR マーカーを用いて遺伝的特性を明らかにし、浸透性交雑の証拠として、i)葉緑体の共有がなされているか、ii)核 DNA の混合(以下、遺伝的混合)は起こっているか、iii)個体ごとの形態から予想される交雑の程度と遺伝的混合の程度とは関連があるか、について検討を行った。

5-2 材料と方法

5-2-1 サンプル採取

長野県駒ケ根市から飯島町に至る南北約 6km、東西約 3km の範囲(図 5-1)に生育する、クヌギ節樹木のうちランダムに選んだ 108 個体を材料とした。星状毛を観察するための葉を 1 個体あたり 3 枚、遺伝分析用の葉を 1 枚採取した。遺伝分析用の葉は、冷蔵で実験室まで運搬し、その後、分析まで -30 度で保存した。飯島町は Hiroki and Kamiya (2005) の研究で推定された交雑個体率は 60% を超え、周辺地域と比較して突出して高かった場所である。また、遺伝解析の対照データを得るため、東京都八王子市(TO)および静岡県浜松市(TR)のクヌギ集団それぞれ 47 個体および 13 個体、愛知県瀬戸市(ST)に生育するアベマキ集団 42 個体(図 5-1)を用いた。



図 5-1 サンプルングを行った交雑帯および比較のための対照として用いたアベマキ 1 集団およびクヌギ 2 集団の位置

5-2-2 葉裏の星状毛数のカウント

クヌギとアベマキの交雑個体は、両者の中間的な形態をとるとされているが、葉の形態や樹皮の厚さは林分間、個体間の変異が大きく(橋詰・金川 1988)、識別は困難である。一方、クヌギは葉の裏面に星状毛を持たず、アベマキは多数の星状毛を持つ。そこで、交雑個体を識別する指標として Hiroki and Kamiya (2005) に倣って、葉の裏面の右側の基部から 9 番目と 10 番目の葉脈間の星状毛数をカウントした。カウントは 1 個体あたり 3 枚の葉について行い、実体顕微鏡(オリンパス SZX16)を用いて写真撮影し、写真をコンピュータのモニターに拡大して映し、0.5mm 四方の星状毛の数を数え、3 枚の平均値をその個体の値とした。また、参考値とするためアベマキ集団 ST の 5 個体について、各 1 枚の葉の星状毛密度を上記の方法で数えた。

5-2-3 DNA 解析

対象個体から採取した葉から改変 CTAB 法を用いて DNA を抽出した。遺伝マーカーとして、核 SSR マーカー 6 座、bcqm42 (Mishima et al. 2006)、ssrQpZAG15、ssrQpZAG36、ssrQpZAG110 (Steinkellner et al. 1997)、CsCAT15 (Marinoni et al. 2003)、QM69-2M1 (Isagi and Suhandono 1997)、および葉緑体 SSR マーカー 6 座、 μ dt1、 μ dt3、 μ dt4、 μ cd4、 μ cd5、 μ kk4 (Degulloux 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 0.2μ M となるよう反応液を構成した。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。完全な遺伝データを得られた個体は 90 個体であり、以下のデータ解析に供試した。

5-2-4 遺伝データ解析

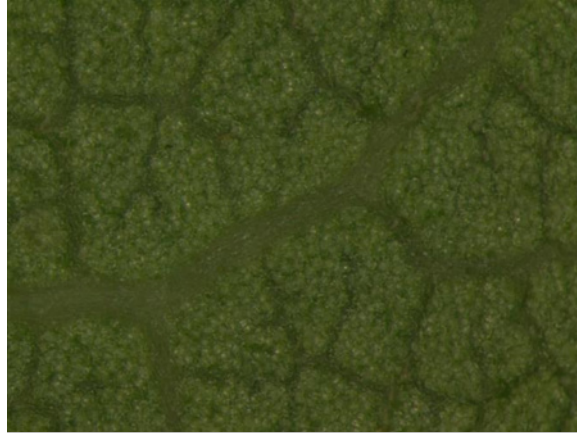
葉緑体 SSR6 座のフラグメントサイズに基づいて、ハプロタイプを分類し、各個体の葉緑体ハプロタイプを決定した。また、核 SSR のデータを基に、各対立遺伝子の頻度と遺伝的多様性の指数 (R_s 、 H_E 、 F_{IS}) を FSTAT (Goudet 1995) で求めた。Pritchard ら (2000) のアルゴリズムに基づいて開発された STRUCTURE2.3.4 (Hubis et al. 2009) を用いてベジアンクラスタリングを行い (以下、STRUCTURE 解析)、各個体のクラスターへの帰属を判断した。クラスター数 K は 1 から 8、200,000 回の burn-in period の後、Markov chain Monte Carlo シミュレーション 200,000 回とした。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。

形態から判断される交雑の程度と遺伝子型から見た交雑との程度に関連があるかを明らかにするため、各個体の星状毛密度と STRUCTURE 解析の結果から得られたクラスターへの帰属割合との相関について、Spearman の順位相関係数を用いて検定を行った。

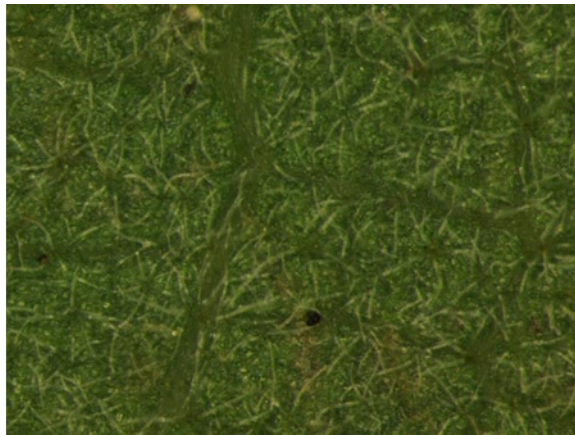
5-3 結果

5-3-1 葉裏の星状毛密度

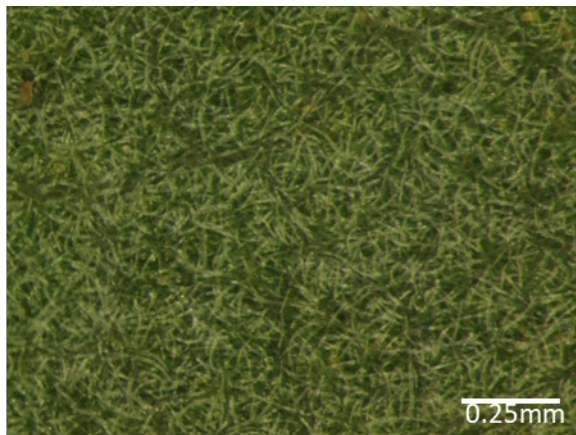
葉裏の星状毛の状態を図 5-2 に示し、星状毛密度によるヒストグラムを図 5-3 に示す。1mm² あたり 0~928 本で平均 236.7(±294.9)本であり、0~100 本未満の個体が多かった。無毛(0 本/mm²)の個体数は、30 個体で全体の 27.8%であり、1 本/mm²以上 100 本/mm²未満の個体は 34 個体で 31.5%であった。これらは、葉の裏面が緑色に見えた。肉眼で葉裏が明らかに白く見えるものは、星状毛密度がおおむね 400 本/mm²以上で、顕微鏡下でも葉の全体が星状毛に覆われるように見えた。星状毛密度が 400 本/mm²以上の個体は、36 個体(33.3%)であった。アベマキ集団 ST の 5 個体の平均は 1036.0 本/mm² (920 本/mm²~1120 本/mm²)であった。



0本/mm²



216本/mm²



928本/mm²

図 5-2 交雑帯に生育する個体のうち、葉裏の星状毛密度が異なる 3 個体の星状毛の様子(例)

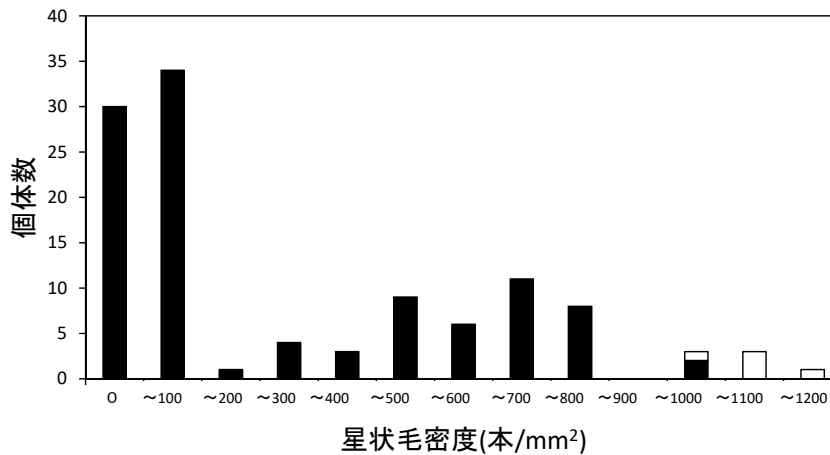


図 5-3 交雑帯集団およびアベマキ集団 ST における葉裏の星状毛密度ごとの個体数分布

アベマキ集団 ST は 5 個体のみカウントした
 ■ 交雑帯集団； □ アベマキ集団 ST

5-3-2 葉緑体 DNA のハプロタイプ

それぞれの葉緑体 SSR マーカーのフラグメントサイズは、 $\mu dt1:90bp$ 、 $\mu dt3:129bp$ 、 $\mu dt4:139bp$ 、 $\mu cd4:101bp$ 、 $\mu cd5:81bp$ 、 $\mu kk4:115bp$ の 1 通りであり、検出されたハプロタイプは 1 つであった。すなわち、調査地全ての個体が同一のハプロタイプを持っていた。このハプロタイプは、クヌギ集団とアベマキ集団の全個体のハプロタイプと同じであり、第三章および第四章の日本のクヌギおよびアベマキに優占するハプロタイプであった。

5-3-3 核 DNA からみた遺伝的多様性

核 SSR マーカーを使用して求めた集団ごと、遺伝子座ごとの遺伝的多様性の指標を表 5-1 に示した。集団の遺伝的多様性は、交雑帯集団、アベマキの集団 ST の順で、 R_s と H_E ともに高く、すべての集団で F_{Is} は有意に 0 からずれていなかった。対立遺伝子ごとに見ると、 R_s は 3 つの遺伝子座 ($bcqm42$ 、 $CsCAT15$ 、 $ssrQpZAG 15$) で交雑帯集団の値が最も高く、残りの 3 つの遺伝子座でアベマキ集団 ST が最も高かった。 H_E は

高く、残りの 3 つの遺伝子座でアベマキ集団 ST が最も高かった。 H_E は交雑帯集団が 4 つの遺伝子座 (bcqm42、CsCAT15、QM69-2M1) で最も高く、残りの遺伝子座は、それぞれ 1 座ずつアベマキ集団 ST とクヌギの集団 TO で最も高かった。 F_{IS} は、交雑帯集団の QM69-2M1 で有意に 0 からずれていたが、その他の対立遺伝子はすべてハーディワインベルグ平衡にあり、すべての集団は任意交配集団であった。

表 5-1 交雑帯およびクヌギ 2 集団、アベマキ 1 集団における核 SSR6 遺伝子座の遺伝的多様性

遺伝子座	R_s				H_E				F_{IS}			
	交雑帯	クヌギ		アベマキ	交雑帯	クヌギ		アベマキ	交雑帯	クヌギ		アベマキ
		TO	TR	ST		TO	TR	ST		TO	TR	ST
bcqm42	12.0	8.2	9	9.1	0.887	0.809	0.853	0.873	0.099	0.106	-0.173	0.155
CsCAT15	8.2	8.2	7	7.2	0.830	0.829	0.801	0.763	0.009	-0.026	0.040	0.158
QM69-2M1	5.4	3.0	3	5.9	0.753	0.651	0.676	0.742	0.173*	0.183	-0.137	-0.059
ssrQpZAG15	9.3	8.9	9	6.8	0.822	0.839	0.798	0.729	0.027	-0.040	-0.157	0.021
ssrQpZAG36	4.0	1.0	1	4.1	0.682	0	0	0.648	0.071	NA	NA	-0.103
ssrQpZAG110	9.5	9.3	8	10.1	0.833	0.842	0.788	0.847	-0.027	0.014	-0.073	0.073
平均	8.1	6.4	6.2	7.2	0.801	0.662	0.653	0.767	0.057	0.041	-0.100	0.048

R_S アレリックリッチネス (13 個体); H_E ヘテロ接合度の期待値; F_{IS} 近交係数; * 0 から有意にずれている ($p < 0.05$)

5-3-4 遺伝的混合

STRUCTURE 解析の結果、データの対数確率は K が 2 から 3 で頭打ちになった (図 5-4)。また、 ΔK はクラスター数が 2 の時、最大となった。クラスター数が 2 の時、クヌギとアベマキの個体は、それぞれ別のクラスターに属した (以下、クヌギクラスターおよびアベマキクラスター)。解析した交雑帯集団の全ての個体が、対照に用いたクヌギとアベマキの双方のクラスターの混合となった (図 5-4)。各集団のクヌギクラスター割合を表 5-2 に示す。クヌギ集団は、それぞれ 0.995 (TO) および 0.984 (TR) であり、すべての個体のクヌギクラスター割合が 100% に近かった。アベマキ集団 ST はクヌギクラスター割合が 0.010 で 1% にも満たなかった。交雑帯集団におけるクヌギクラスターの割合は 0.391 (± 0.208) と中間の値をとったがばらつきが大きく、個体ごとに見ると 0.104 ~ 0.778 で、遺伝的混合の程度には幅があった。

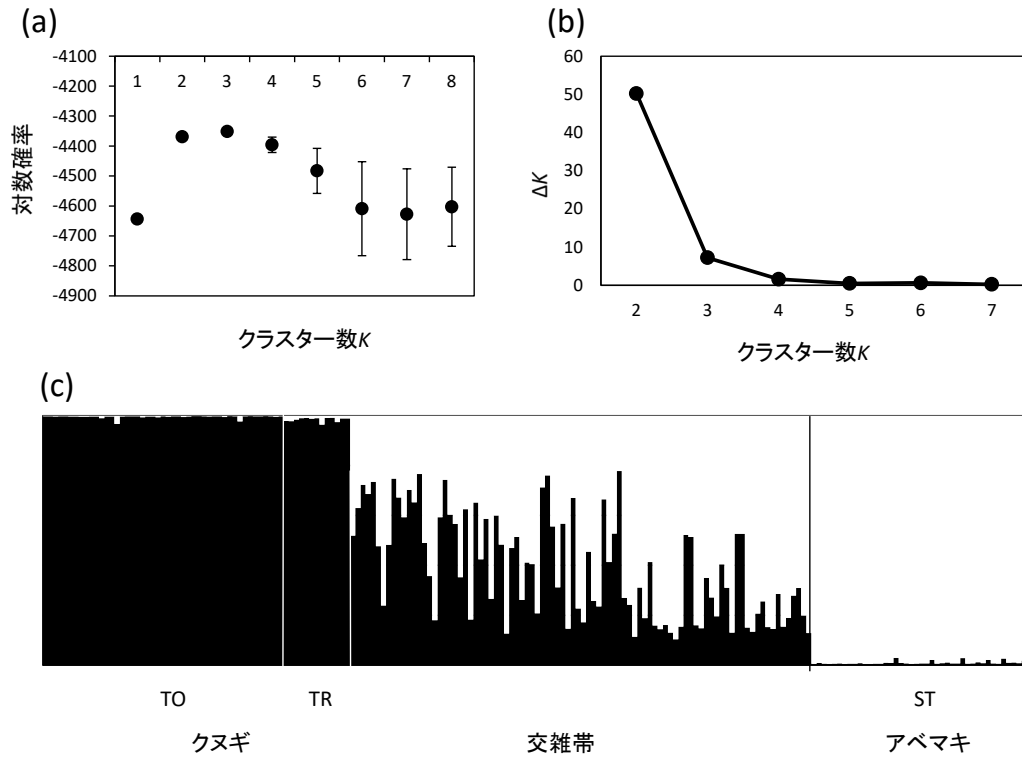


図 5-4 STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリング (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) $K=2$ の場合のクヌギ集団 (TO、TR)、交雑帯集団およびアベマキ集団 (ST) における各個体ごとの 2 つのクラスターの混合割合

表 5-2 核 SSR6 座を用いた交雑帯およびクヌギ 2 集団、アベマキ 1 集団のベイズクラスタリング (図 5-4) において $K=2$ とした場合の各集団のクヌギクラスター割合

集団	平均	±	標準偏差
交雑帯	0.391	±	0.208
クヌギ	TO	0.995	± 0.005
	TR	0.984	± 0.008
アベマキ	ST	0.010	± 0.006

5-3-5 星状毛密度とクヌギまたはアベマキクラスターへの帰属割合

各個体の星状毛密度とクヌギクラスターの関係については、星状毛密度が高いほど、クヌギクラスター割合が低く(図 5-5)、Spearman の順位相関係数を求めたところ、有意に負の相関があった($r=-0.5940$, $p<0.01$)。一方、無毛の個体でもクヌギクラスターの占める割合には幅があった($n=21$, 平均 0.579 ± 0.163)。

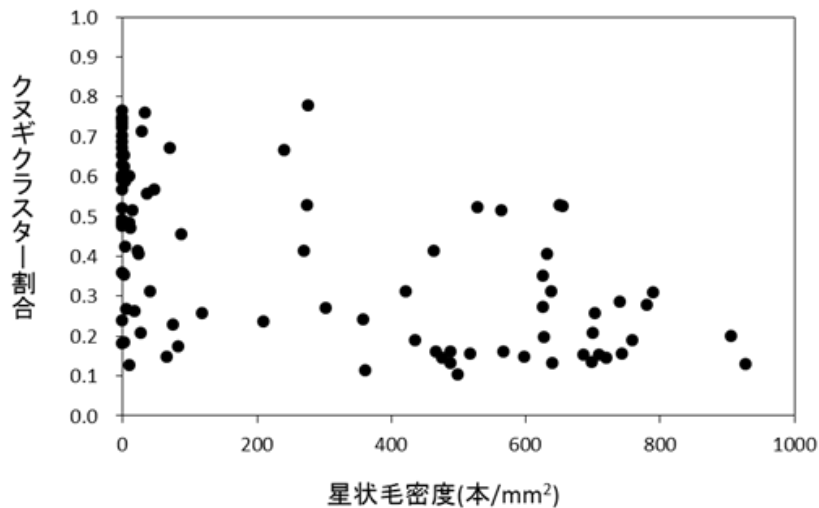


図 5-5 交雑帯個体の葉裏の星状毛密度と核 SSR6 座を用いたベイズクラスタリング(図 5-4)において $K=2$ とした場合のクヌギクラスター割合の関係。Spearman の順位相関係数 $r=-0.5940$ で有意な負の相関があった($p<0.01$)。

5-4 考察

5-4-1 葉裏の星状毛密度からみた交雑帯の存在

本研究の調査地は、Hiroki and Kamiya (2005)において、葉裏の星状毛密度から交雑個体と判定された個体の割合が約 60%で最も高かった長野県飯島町の周辺とした。一般にアベマキとクヌギは葉の裏面の星状毛の有無で識別され、交雑個体はその中間とされるが、星状毛密度の閾値の定義はなく、Hiroki and Kamiya (2005)では肉眼で見て葉の裏が白いものをアベマキ、葉の裏の色が緑色または緑色に近いもののうち顕微鏡下で星状毛を持つものを交雑個体としている。一方、岡田ら(1996)は走査式電子顕微鏡を用いてわずかに星状毛がみられても一列細胞毛の方がはるかに多い場合にはクヌギとし、全般に星状毛が見られるが毛量が少

ない場合を交雑個体、星状毛がかなり多く葉全体がおおわれる場合をアベマキとしている。どちらの基準も完全には数値化されていないため、全く同じ基準で議論することは困難である。本研究では、400本/mm²以上の個体は肉眼で葉裏が完全に白く見え、かつ顕微鏡下でも葉の全体が星状毛に覆われるように見えるため、400本/mm²未満の密度で星状毛がある個体が上記の既存研究の定義の交雑個体とほぼ同等と考えた。この基準では本研究での交雑個体割合は38.9%となり、形態から見た交雑個体が高頻度で存在し、飯島町周辺が交雑帯であることを支持する。一方、この交雑個体の割合は、Hiroki and Kamiya (2005)の約60%よりも低い値であるが、これは基準が完全には一致しないことや、本研究では全108個体をサンプルとしたが、Hiroki and Kamiya (2005)は13個体であり、サンプル数が大きく違うことが交雑個体割合の違いに反映された可能性がある。さらに、本研究で参考値としたアベマキ集団STの星状毛密度は1000本/mm²程度となり、5個体のうち4個体は交雑帯で最も密度が高い個体よりも高い値となった(図5-3)。このことは、本研究では星状毛密度が400本/mm²以上の個体を葉の裏面が白く見えるためアベマキとしたが、これらも交雑個体である可能性を示唆している。

5-4-2 交雑帯における浸透交雑

葉緑体DNAは、交雑帯集団および対照としたクヌギとアベマキの集団全てが同じハプロタイプに固定されていた。これは使用した葉緑体SSRマーカー6座が、クヌギとアベマキで単型である可能性が考えられる。しかし、第三章では、同じマーカーセットを用いて日本及び朝鮮半島、中国大陸のクヌギを解析し、23ハプロタイプを検出している。したがって、ハプロタイプが1つに固定されていたのは解析した集団の遺伝的特性であると考えられる。このことから、このハプロタイプは、2種が分化する前の祖先集団から保持されているか、両種で浸透性交雑が起こっているため共有されたと考えられる。近縁種間で交雑を行うコナラ属樹木は、このように種間でハプロタイプを共有することが数多く報告され(例えば Cavender-Bares et al. 2015; Petit et al. 2002)、日本国内

においては Kanno et al. (2004)と Okaura et al. (2007)が、コナラ、ミズナラ、カシワ、ナラガシワが葉緑体ハプロタイプを共有していることを示した。祖先的なハプロタイプはより広域に分布することが多いが、本研究ではハプロタイプが一つしか検出されず、また、対照集団も関東、東海地方と比較的狭い範囲であったため、この結果のみからは祖先多型か交雑による共有かは判別できなかった。

核 DNA からみた遺伝的多様性は、 R_s 、 H_E ともに、交雑帯集団で最も高くなった。メキシコにおける *Quercus castanea* 集団の遺伝的多様性が、同所的に生育する近縁種の種数が多いほど高くなることが報告されており (Valencia-Cuevas et al. 2014)、種間の交雑により直接的に遺伝的多様性が影響を受けていると考察されている。本研究の交雑帯でも、これと同様の現象が生じて、遺伝的多様性が高くなっていると考えられる。また、交雑帯集団が任意交配集団であったことは、本調査地でクヌギとアベマキがただ同所的に生育しているのではなく、浸透性交雑を行っている可能性を示す。

さらに STRUCTUR 解析の結果でも、交雑帯の個体はクヌギクラスターとアベマキクラスターの混合となったことから、飯島町周辺で両種の浸透性交雑が生じていることが支持された。核 DNA のベイズクラスタリングは種内の遺伝構造の検出に用いられることが多いが (例えば Tsuda et al. 2009)、本研究と同様に異なる種間での遺伝的混合が検出される例も多い。例えば、メキシコにおける *Quercus affinis* と *Quercus laurina* (Ramos-Ortiz et al. 2016)や中国大陸の *Quercus mongolica* と *Quercus liaotungensis* (Zeng et al. 2011)の交雑帯におけるベジアンクラスタリングによる核 DNA の遺伝的混合が示されている。

また、2つのクラスターの混合の程度に幅があったことから、交雑帯においては、両種の交雑のみならず戻し交雑や交雑個体同士の交配が生じていることと推察される。さらに第四章でクヌギとアベマキの交雑には方向性があることが示唆された。もし、本交雑帯で交雑に方向性があれば、どちらか一方の種に遺伝的混合を示さない個体が存在すべきであるが、本交雑帯ではすべての個体が2つのクラスターの遺伝的混合であ

った。このことから本交雑帯では、方向性がある交雑が起こっているとは言えない。

5・4・3 星状毛密度から予想される交雑の程度と遺伝的混合との関連

星状毛密度とクヌギクラスターへの帰属割合に有意な負の相関があったことから、形態から判断される交雑の程度と、遺伝子型から見た交雑の程度には関連があることが明らかとなった。このことは、クヌギとアベマキの遺伝的混合の程度が星状毛密度という形質に反映することを示している。形態から交雑と判別された個体を遺伝マーカーでも交雑個体と識別する試みはこれまでもなされてきており、*Quercus crassifolia* と *Quercus crassipes* の交雑個体は、RAPD マーカーを用い Hardig hybrid index (Harding et al. 2000) によって検出された (Tovar-Sanchez and Oyama 2004)。また、*Quercus crispula* と *Quercus dentata* の交雑個体は、AFLP マーカーのデータを主座標分析し図示した結果、親種個体の中間に位置した (Ishida et al. 2003)。本研究では、交雑帯の個体が親種の遺伝的混合であることを示しただけではなく、その遺伝的混合の程度が星状毛密度と関連があることを示すことができた。これは、星状毛密度が環境的な影響をほとんど受けず、遺伝的に支配されている可能性を示唆する。また、これまでのクヌギとアベマキの雑種の識別点として、星状毛の密度が提唱されてきた (岡田ら 1996) ことは遺伝的な観点から見ても妥当であったといえる。

しかし一方で、クヌギ集団 TO および TR においてはクヌギクラスター割合が 100% に近いのに対し、交雑帯集団では無毛の個体でもクヌギクラスターが平均 0.579、最大で 0.766 でしかなかったことから、本交雑帯に生育する個体は無毛、すなわち形態からクヌギと判断される個体であったとしても必ずしも遺伝的には純粋なクヌギとは言えない可能性がある。同様に交雑帯集団では、形態から星状毛密度が高く既存研究 (Hiroki and Kamiya 2005) の基準ではアベマキと識別される個体のうち、クヌギクラスター割合が最小でも 0.129 あったことから、純粋なアベマキと言えない可能性が残される。このことは、葉裏が白くても交雑帯の

個体は、参考としたアベマキ集団の個体の星状毛密度より低いものがほとんどであることから支持される。交雑帯における種の識別と形態および遺伝的混合の程度との関連については、さらなる検討が必要である。

以上、既報によりクヌギとアベマキの交雑帯であるとされていた長野県飯島町周辺は、本研究でも、形態的に交雑個体であると考えられる個体が高頻度で生育していた。また、遺伝解析により、そこに生育している全個体が、実際に両種の遺伝的混合の個体であり、両種が浸透交雑を行っていることを示した。また、遺伝的混合の程度と、葉裏の星状毛密度という形質との間に関連があり、遺伝的にクヌギに近い個体ほど星状毛密度が小さく、逆にアベマキに近い個体ほど星状毛密度が高い傾向があることが明らかになった。

第六章 植栽年代の異なるクヌギ人工林の遺伝的組成

6-1 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、その林を構成する樹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、遺伝的に同一の個体を育成するクローン林業、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育種が、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、人工林で生育する個体の表現型のみならず、林分の遺伝的な組成にも影響を与えると考えられる。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)。さらに、ブナでは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)、人工林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)。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、大陸の天然林集団を比較対照として用いた。

6-2 材料と方法

6-2-1 サンプル採取

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6-1に示す。植栽時期は各県の森林簿によった。

6-2-2 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、 μ dt1、 μ dt3、 μ dt4、 μ cd4、 μ cd5、 μ 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 μ Mとなるよう反応液を調整した。PCR条件は、初期活性化95 $^{\circ}$ C・15分の後、熱変性94 $^{\circ}$ C・30秒、アニーリング54 $^{\circ}$ C(核マーカー)または48 $^{\circ}$ C(葉緑体マーカー)で90秒、伸長反応72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

6-2-3 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(R_s 、 H_E 、 F_{IS})をFSTAT (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FSTAT (Goudet 1995)を用いて検証した。また、Pritchardら(2000)のアルゴリズムに基づいて開発されたSTRUCTURE2.3.4(Hubisz et al.

2009)を用いてベイジアンクラスタリングを行った(以下、STRUCTURE解析)。各個体のクラスターへの帰属を判断した。クラスター数 K は 1 から 8、100,000 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 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。葉緑体ハプロタイプの多様度 (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を行って作成した。

表 6-1 サンプルングを行った日本のクヌギ人工林 19 林分および大陸 3 集団の位置、林齢区分、サンプル数および遺伝的多様性

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	R_S	F_{IS}	n	h_s	h_t	G_{ST}	
日本	静岡1	高齡林	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		平均	0.662	8.82		2	0.020	0.022	0.092	
	静岡3	壮齡林	48	35° 57'49	138° 52'15	0.650	8.34	0.040	2	0.153			
	静岡4		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		平均	0.671	9.12		8	0.285	0.425	0.330		
	山口	山口1	高齡林	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		平均	0.665	8.79		5	0.079	0.082	0.037		
	大分	大分1	高齡林	47	33° 11'11	131° 16'38	0.683	9.16	-0.007	8	0.489		
		大分2		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		平均	0.679	9.03		9	0.217	0.234	0.076	
大分4		壮齡林	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			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		平均	0.675	9.19		12	0.459	0.571	0.196			
大陸	韓国	韓国	天然林	48	37° 12'34	126° 59'25	0.689	9.35	0.059	8	0.623		
	中国	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		平均	0.798	11.46		11	0.639	0.834	0.234			

H_E ヘテロ接合度の期待値; R_S アレリックリッチネス; F_{IS} 近交係数; n 検出されたハプロタイプ数 h_s 林分の遺伝子多様度; h_t グループの遺伝子多様度; G_{ST} 遺伝的分化係数; * 0より有意に大きい ($p < 0.05$)

6-3 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 6-1 のとおりである。日本の人工林の R_S は 8.15(YAY2)から 10.10(OHY3)、 H_E は 0.650(SHY1、YAY2)から 0.695(OHY3)の間であった。これら R_S と H_E の多様性指数については、地域別では R_S 、 H_E 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 6-2)。また、高齡林、壮齡林の林齢区分でも差がなかった。また、韓国集団 R_S 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 (R_S 11.96, 13.08; H_E 0.836, 0.868)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、高齡林より壮齡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 6-1)。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 (IO、IZ、SHY1、SHY2、OHY5、OHY8)、クラスター 1 が優占する林分 (YA、OK1、OK2) と、クラスター 1 と 2 との混合の林分とがあった (図 6-1)。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 6-2 日本のクヌギ人工林 19 林分の地域別、林齢区分別の核 SSR マーカー 7 座および葉緑体 SSR マーカー 6 座で解析した遺伝的多様性および遺伝的分化係数

	集団数	サンプル数	核DNA					葉緑体DNA			
			H_o	H_s	R_s	F_{IS}	F_{ST}	h_s	h_t	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； R_s アレリックリッチネス； F_{IS} 近交係数； F_{ST} 遺伝的分化係数； h_s 林分の遺伝子多様度； h_t グループの遺伝子多様度； G_{ST} 遺伝的分化係数

葉緑体 DNA を解析した結果、日本 19 林分、大陸 3 集団、全 990 個体からハプロタイプが 16 個のハプロタイプが検出された (表 6-2)。そのうち、日本国内では 15 個のハプロタイプが検出され、*Hp17* のみ日本になかった。大陸集団からは 11 のハプロタイプが検出された。*Hp20* が日本において高齢林 0.930、壮齢林 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、壮齢林 2 林分が *Hp20* に固定されていた (表 6-4)。林分ごとの遺伝子多様度 (h) は、*Hp20* に固定されていた林分があるため、日本では 0 から 0.821 (OHY3) と幅があった (表 6-1)。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 (h_t) は山口 < 静岡 < 大分、林齢区分ごとでは、高齢林 < 壮齢林であった (表 6-2)。また、それぞれの地域ごとでも、高齢林 < 壮齢林であった (表 6-1)。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 < 壮齢林となった (表 6-2)。($\delta \mu$)² に基づく近隣結合法で作成した系統樹では、日本の林分のクレードと大陸集団のクレードの間に壮齢の

大分の5林分と静岡4が位置したが(図6-2)、これらが別のクレードを形成することはなかった。

表6-3 クヌギ人工林の葉緑体SSR6座による解析で検出された16ハプロタイプと各地域におけるハプロタイプ頻度

マーカー	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			
ハプロタイプ											
2	100	81	90	127	137	115	-	0.005	-	0.003	
3	101	81	90	126	137	115	0.007	0.009	0.036	0.012	
4	101	81	90	127	136	115	0.004	-	-	0.001	
5	100	81	90	127	138	115	0.004	0.031	0.036	0.024	
6	101	81	90	127	137	115	0.004	0.002	0.029	0.006	
7	101	81	90	128	136	115	0.022	0.164	0.200	0.130	
8	101	81	90	129	135	115	-	0.002	-	0.001	
9	101	81	90	127	138	115	-	0.009	-	0.005	
10	101	81	90	128	137	115	0.007	0.002	0.214	0.033	
12	102	81	90	128	136	115	-	0.010	0.243	0.040	
15	102	81	90	127	138	115	0.007	0.009	0.007	0.008	
16	102	81	90	129	136	115	0.004	0.007	0.014	0.007	
17	103	81	90	127	137	115	-	-	0.100	0.014	
19	101	81	90	129	138	115	0.011	0.036	0.057	0.032	
20	101	81	90	129	139	115	0.930	0.700	0.064	0.673	
21	102	82	91	128	137	115	-	0.016	-	0.009	

表6-4 日本のクヌギ人工林19林分および大陸3集団の葉緑体SSR6座で解析したハプロタイプの頻度

地域	林分名	林齢区分	サンプル数	ハプロタイプ頻度																	
				2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	17	19	20	21	Total	
静岡	IO	高齢林	48	-	-	0.02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.98	-	1.00	
	IZ		40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00	
	SHY1	壮齢林	48	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-	-	-	-	0.92	-	1.00	
	SHY2		48	-	-	-	0.10	0.02	0.35	-	-	-	-	0.02	0.02	-	0.06	0.40	0.02	1.00	
	SHY3		30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00	
山口	YA	高齢林	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00	
	YAY1		47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00	
	YAY2	壮齢林	48	0.02	-	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-	-	-	-	-	0.92	0.02	1.00	
	OK1		高齢林	47	-	0.02	-	0.02	0.02	0.11	-	-	0.04	-	0.04	-	-	0.04	0.70	-	1.00
	OK2			48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
OH	47	-		0.02	-	-	-	0.02	-	-	-	-	-	0.02	-	0.02	0.91	-	1.00		
OHY1	47	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.98	-	1.00		
OHY2	43	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	0.95	-	1.00		
大分	OHY3	壮齢林	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	
	OHY4		48	-	0.02	-	0.04	-	0.25	-	-	0.02	-	0.02	-	-	0.02	0.63	-	1.00	
	OHY5		48	-	-	-	-	-	0.33	-	0.02	-	0.02	0.04	0.04	-	0.04	0.46	0.04	1.00	
	OHY6		48	0.02	0.02	-	0.06	-	0.35	-	-	-	0.06	-	-	-	0.10	0.35	0.02	1.00	
	OHY7		32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	0.88	-	1.00	
	OHY8		46	-	0.02	-	0.04	-	0.30	-	0.02	-	0.02	-	-	-	-	0.59	-	1.00	
韓国	F		48	-	0.02	-	-	0.04	0.58	-	-	-	0.06	0.02	0.04	-	0.15	0.08	-	1.00	
大陸	中国	天然林	CN1	45	-	-	-	0.04	0.04	-	-	-	0.09	0.53	-	-	0.24	-	0.04	-	1.00
			CN2	47	-	0.09	-	0.06	-	-	-	-	-	0.55	0.15	-	-	0.06	0.02	0.06	-

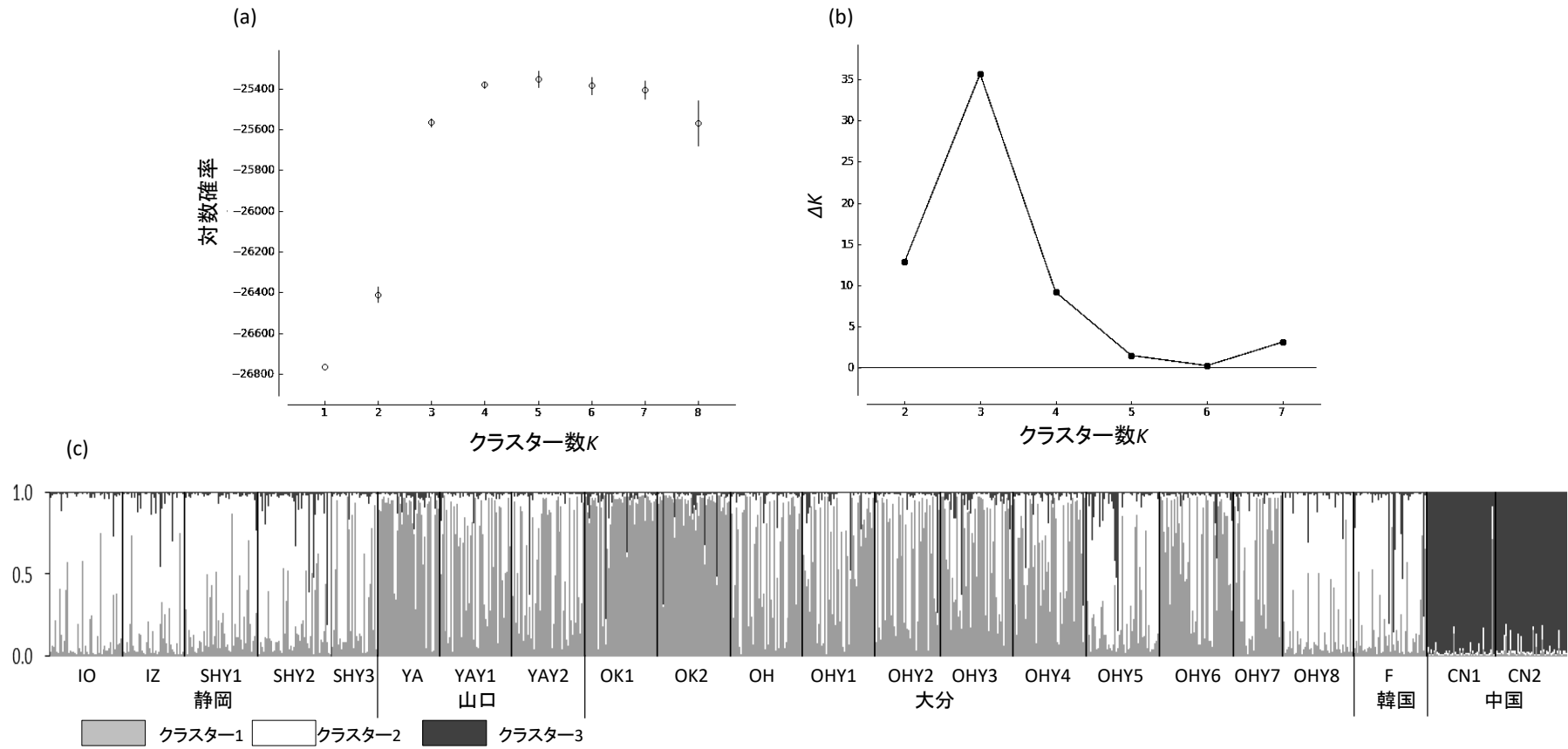


図 6-1 クヌギ人工林の STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリング
 (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) 日本のクヌギ人工林 19 林分および大陸 3 集団における各個体ごとの 3 つのクラスターの混合割合

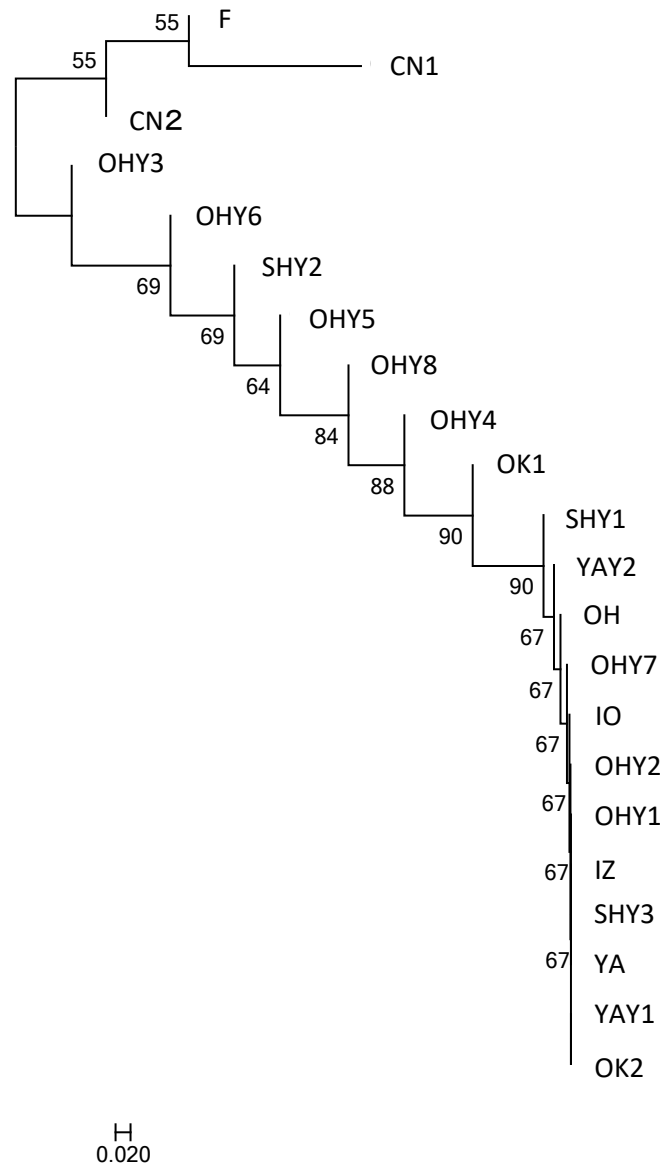


図 6-2 クヌギの日本の人工林 19 林分および大陸 3 集団の葉緑体 DNA の (μ)² に基づく近隣結合法で作成した系統樹。ノードの数字は 1000 回の繰り返しのブートストラップ率 (50 以上を記載)。バーは遺伝距離を示す。

6-4 考察

6-4-1 クヌギ人工林の遺伝的な地域性

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 では、*Hp20* 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。第三章で示した通り、この *Hp20* は本州のクヌギ林に広域的に分布しているハプロタイプである。静岡では 1 林分を除く 4 林分および山口の 3 林分のクヌギ林はこれら本州の一般的なクヌ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 *Hp20* 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、ハプロタイプの近隣結合法で作成した系統樹では、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 6-4 から、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 7 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ヌ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 *Hp20* 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 1979 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、日本のクヌ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。

6-4-2 クヌギ人工林の遺伝的な世代間差

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度(ht)では高齢林より壮齡林で遺伝子多様度が高かった(表 6-2)。特に地域ごとに見ると静岡および大分で壮齡林の ht が高齢林の ht より明らかに高かった(表 6-1)。これも上記のように壮齡林では、ハプロタイプ 20 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。これらの壮齡林は、クヌギの急激な造林に伴って、広範な種苗の流通が行われ、上記のように遺伝的に大陸産種苗に近い種苗も使用されたと考えられる。

核 DNA の STRUCTURE 解析では、山口の高齡林および大分の高齡林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は静岡の高齡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齡林であっても $Hp20$ 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。

第七章 総合考察

7-1 クヌギおよびアベマキの遺伝構造に対する両種の浸透交雑の影響

クヌギとアベマキが浸透交雑することが、両種の遺伝構造に影響を与えたか否かについて、これまでの結果を表 7-1 にまとめた。葉緑体 DNA についてみると、クヌギとアベマキは同じ 1 つのハプロタイプを共有していた。これは第五章で示した両種の浸透交雑が原因と考えられ、葉緑体 DNA の遺伝構造に浸透交雑が大きな影響を与えていることが明らかとなった。また、このハプロタイプは両種の分布域全域に広がっていることから、両種が分布拡大後に個々の地域で浸透交雑をしてハプロタイプを共有したとは考えづらい。両種がハプロタイプを共有した地域は、氷期のレフュージアであると考えられる。クヌギの最終氷期のレフュージアは、ENM (Zhang et al. 2015) から九州地方周辺、アベマキについては Chung et al. (2012) の ENM からクヌギよりも広域に西日本にレフュージアがあったと考えられる。したがって、クヌギが最終氷期以降、アベマキに花粉親として浸透交雑を行い、分布を拡大させることにより、クヌギがアベマキの葉緑体 DNA を獲得した可能性がある。他方、広木・松原(1977)はアベマキの分布域の多くが照葉樹と重なっているとしている。そのため、クヌギと同様、最終氷期のレフュージアが九州周辺のごく限られた場所にしか存在しなかった可能性もある。その場合には、この九州周辺のレフュージアで同所的に生育することにより浸透交雑を行い、いずれかが葉緑体を捕捉したかは不明であるが、葉緑体共有後に分布拡大したと、考えられる。

核 DNA からみると、アベマキの遺伝構造に対するクヌギの交雑の影響を第四章で述べたが、さらにクヌギおよびアベマキの全集団の STRUCTURE 解析を核マーカー 7 座のデータを用いて行った。その結果、それぞれの種に対応する 2 つの遺伝的なグループに明確に分けられた (図 7-1)。これは、一般に浸透交雑する種が、種内集団間で十分な遺伝子流動がある場合、核では種間の分化が保たれる (Petit and Excoffier 2009) ことと一致する。しかし、クヌギとアベマキが同所的に存在する

集団では、遺伝的な混合が見られる場合があり、両種の交雑が部分的な構造に影響を与えていることを示した。

さらに、第三章で、クヌギの遺伝的多様性は西日本で高いという結果が得られ、西日本にレフュージアが存在した、と考察した。一方、第五章で、交雑帯は他の集団よりも遺伝的多様性が高いことが示された。クヌギの西日本の集団で特に遺伝的多様性が高い集団は、TH および SM であり、大陸集団の SU、KW も遺伝的多様性が高い(表 3-1)。これらの集団は図 7-1 でアベマキと遺伝的混合構造を持つものである。このことから、これらの集団の遺伝的多様性の高さは、アベマキとの交雑によるものと考えらる。したがってクヌギの核 DNA は必ずしも西日本で遺伝的多様性が高いとは言えない。以上のように、アベマキとクヌギの浸透交雑は遺伝構造に影響を与えるのみならず、遺伝的多様性にも影響を与えていることが明らかとなった。

表 7-1 クヌギとアベマキの遺伝構造に対する両種の浸透交雑の影響の有無とそれを示す現象

	クヌギ	アベマキ
葉緑体 DNA		
影響	有	有
現象	ハプロタイプの共有	ハプロタイプの共有
核 DNA		
影響	有	有
現象	遺伝的混合が見られる集団がある	遺伝的混合が見られる集団がある
	遺伝的混合が見られる集団のアレリックリッチネスが高い	

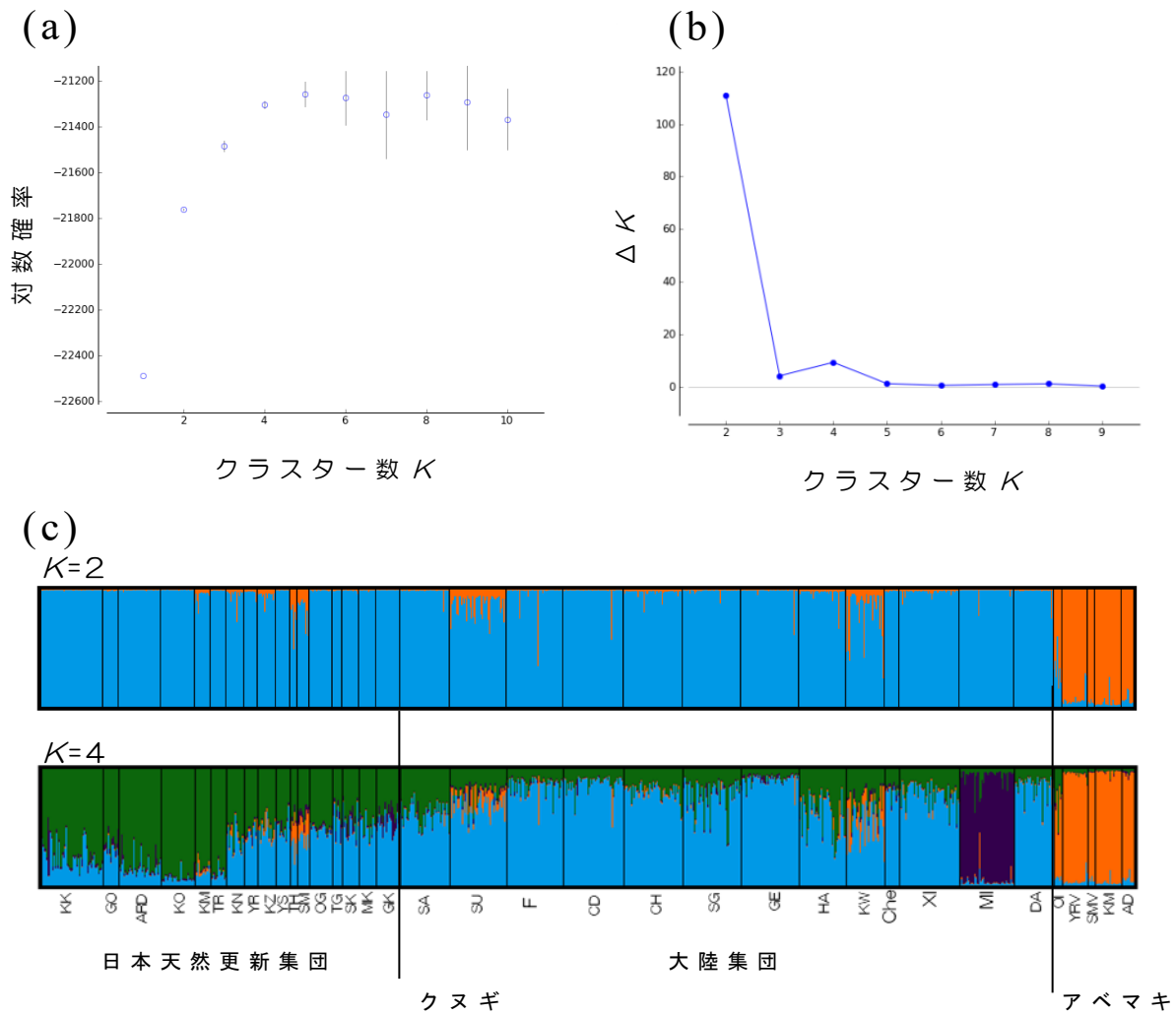


図 7-1 クヌギ天然更新集団、大陸集団、およびアベマキの STRUCTURE 解析によるベイズクラスタリング結果 (a) 対数確率および (b) ΔK の変化 (c) $K=2$ および $K=4$ における各個体ごとのクラスタの混合割合

7-2 クヌギおよびアベマキの遺伝構造に対する人間活動の影響

遺伝構造に影響を与える人間活動は主に種苗の移動である。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 i) 集団内の遺伝的多様性を高める (König et al. 2002, Gong et al. 2008)、ii) 集団間の遺伝的分化を低下させる (Mohanty et al. 2001, König et al. 2002, Gong et al. 2008)、iii) 系統地理学的構造を損なう (Mohanty et al. 2001) などがある。本研究で得られた結果を表 7-2 にまとめた。

表 7-2 人間による種苗移動で生じると考えられる現象と、クヌギおよびアベマキでのその現象の有無

種苗移動で生じる現象	クヌギ	アベマキ
葉緑体 DNA		
i) 集団内多様性が高まる	無	無
ii) 集団間分化が低くなる	有 一つのハプロタイプが優占していたため、人為の影響か不明	有 ハプロタイプが1つだけだったため、人為の影響か不明
iii) 系統地理学的構造が失われる	有 一つのハプロタイプが優占していたため、人為の影響か不明 非常に広域に一つのハプロタイプが分布	有 ハプロタイプが1つだけだったため、人為の影響か不明
核 DNA		
i) 集団内多様性が高まる	無	無
ii) 集団間分化が低くなる	無	無
iii) 系統地理学的構造が失われる	一部 東日本と西日本に分かれる 西日本にのみ IBD クラインなし	有 クライン、IBD なし (集団数が少ない影響の可能性)

まず、クヌギの遺伝構造についてこのような傾向があるかを検証する。葉緑体 DNA については、i)の集団内遺伝的多様性は著しく低く、当たらなかった。ii)の集団間の分化については、表 7-3 に人間活動の影響を長期間受けたと考えられる樹種についてまとめた。日本においてイチイガシは堅果が食用になり材も有用であるため、人間活動の影響を高く受けたとされているが、クヌギよりもかなり高い分化が報告されている ($G'st=0.754$) (Sugiura et al. 2015)。ヨーロッパの *Castanea sativa* ($G'st$

=0.43) (Fineschi et al. 2000)と *Prunus avium* ($G_{ST} = 0.29$) (Mohanty et al. 2001)は、両種とも人間により利用されており、それに応じて分布が影響を受けているが、非常に低い遺伝的分化を示している。クヌギはこれらよりも分化の指数が低く、集団間分化が低下するという点で当たっていたが、これは1つのハプロタイプが広域に優占しているためであり、人間活動の影響とは言い切れない。iii)の系統地理学的構造を損なう、については、ヨーロッパにおいて人間活動の影響を受けていると考えられる *Castanea sativa* (Fineschi et al. 2000) や *Prunus avium* (Dumolin et al. 1995)の葉緑体ハプロタイプの分布は、クヌギと同じようにひとつの主要なハプロタイプがほぼ分布域全体を覆うような形である。ただし、これら2種は他にもハプロタイプを持っている。クヌギのこの遺伝構造のなさは、一つのハプロタイプのみがあり、それが広範囲に分布拡大したことによると考えられ、人間活動の影響とは言い切れない。照葉樹を構成するスタジイ(上野・青木 2015)、シラカシ(金谷・松本 2015a)、アカガシ(金谷・松本 2015b)の常緑樹は、九州地方から関東地方までの分布域全体でほぼひとつのハプロタイプに固定されており本研究のクヌギのハプロタイプの分布パターンと類似している。その他の落葉広葉樹でも、西日本では一つのハプロタイプが優占し、関東以東に他のハプロタイプが分布する構造が見られる。しかし、クヌギは分布が九州地方から東北地方にまで広域におよんでいるにもかかわらず一つのハプロタイプが分布している点で、他の種よりも急激な分布拡大が考えられ、少なくとも東日本では人為による種苗移動の影響があることが示唆される。

次にクヌギの核 SSR についてみる。i)の集団内の遺伝的多様性は、大陸集団と比較しても取り立てて高い傾向はなかった。ii)の集団間分化の程度が下がる、とあるが、 F'_{ST} は天然更新集団で0.081と必ずしも低いとは言えなかった。さらに iii)系統地理学的構造については、東西二つのグループに分かれており、IBDが見られ、一定の構造が見られた。しかし、スタジイでは分布域全体の西日本で核 SSR では東に行くにつれて多様性が低下するクラインが見られている。クヌギは、東日本では集団間の分化係数が西日本より高く、IBD、クラインも存在しなかった。

このことから東日本では規則的に分布を拡大したとは、考えづらく、この点に人間による種苗移動の影響が表れていると考えられる。

アベマキについてもクヌギとほぼ同様であり、葉緑体 DNA についてはこれまでに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かった。核 DNA でも遺伝構造が見られない一方で、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 F_{ST} 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。表 7-2 より、本研究の結果はアベマキの遺伝構造に人間による種苗移動の痕跡が明確に存在した、とはいえないものの、系統地理学的構造が検出されないなど、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。

表 7-3 長期にわたり人間に利用されていた樹種のオルガネラ DNA の遺伝的分化

樹種	散布様式	集団数	個体数	DNA	G_{ST}	G'_{ST}	引用
<i>Quercus acutissima</i>	重・動	18	322	C	0.246	0.261	本研究
<i>Quercus gilva</i>	重・動	25	135	C	0.668	0.754	Sugiura et al. 2015
<i>Prunus avium</i>	重・動	23	211	C	0.29	-	Mohanty et al. 2001
<i>Castanea sativa</i>	重・動	38	181	C	0.43	-	Fineschi et al. 2000
<i>Olea europaea</i>	重・動	37	334	C	0.720	-	Besnard et al. 2002

重 重力; 動 動物; C 葉緑体;

7-3 クヌギ種苗の今後の取り扱い

外国産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、第六章およびその他の記録（戸田ら 1989; 大久保・片野田 2007）からすでに導入されて各地に植栽されたということが明らかである。また、第三章のクヌギの遺伝構造を明らかにするための葉緑体 DNA 解析で、人為によりクヌギの種苗が分布を拡大した可能性が指摘された。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、外国産種苗を利用することにあまり問題は無いと考えることも可能である。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、全国的にクヌギと同じ葉緑体ハプロタイプ(*Hp20*)を共有しており、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第四章および第五章で示された。そこに、葉緑体ハプロタイプが異なるクヌギの外国産種苗が導入されると、日本産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。しかし、第六章で 1960 年代以降のクヌギの人工林に、在来集団とは遺伝的に異なる韓国産種苗が導入されている可能性が指摘された。したがって、今後のクヌギ種苗は、アベマキと同一ハプロタイプを持つ種苗と同じものを使用するのが望ましいと言える。

謝辞

本論文は、東京大学大学院農学生命科学研究科の井出雄二教授のご指導の下で取りまとめたものである。井出教授には本研究に取り組む機会を与えていただき、また研究の計画から本論文のとりまとめまで、長期間にわたり終始丁寧なご指導とご助言をいただきました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科の吉田薫教授、丹下健教授、大黒俊哉教授、森林総合研究所林木育種センターの高橋誠博士には、示唆に富むご指摘を数多くいただきました。ここに記して感謝申し上げますとともに、ご指摘いただいた点については今後の研究においてさらに取り組んでいきたいと思っております。

また、筑波大学津田吉晃准教授には、主にデータの統計解析をご指導いただきました。中華人民共和国東北林業大学沈海龍教授、大韓民国慶北大学金坂基教授には共同研究者として、クヌギサンプルのご提供をいただきました。本研究の開始時に修士課程に所属していた瀬戸康弘氏並びに福田知秀氏とは、共同研究者として共にサンプリングと遺伝解析を行い議論を深めました。森林総合研究所主任研究員の内山憲太郎博士と中華人民共和国胡立江博士には、遺伝分析にご協力いただきました。また、試料のサンプリングの際には各県職員、NPOの皆様にご情報提供とサンプリング許可を快くいただきました。ここに記して厚く御礼申し上げます。

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」で行われました。ここに感謝申し上げます。

追記

本論文の内容の一部は、以下の通り公表済みまたは公表予定である。

第三章：Saito Y, Tsuda Y, Uchiyama K, Fukuda T, Seto Y, Kim P, Shen HL, Ide Y (2017) Genetic variation in *Quercus acutissima*, an important tree species in traditional Japanese rural forests and agricultural landscapes, revealed by chloroplast microsatellite markers. *Forests* 8: 451.

第四章：齊藤陽子・津田吉晃・内山憲太郎・福田知秀・井出雄二(2018) 日本産アベマキ(*Quercus variabilis*)の遺伝構造. 森林遺伝育種学会誌 7: 1-10

第五章：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コナラの葉裏の星状毛密度と浸透性交雑. 東大演報 136:1-13

第六章：齊藤陽子・瀬戸康弘・井出雄二 (2018) 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－東大演報 印刷中

引用文献

- Aas G (1993) Taxonomical impact of morphological variation in *Quercus robur* and *Q. petraea*: a contribution to the hybrid controversy. *Annals of Forest Science*. 50 (suppl 1):107s-113s
- Abrams MD, Copenheaver CA, Terazawa K, Umeki K, Takiya M, Akashi N (1999) A 370-year dendroecological history of an old-growth *Abies-Acer-Quercus* forest in Hokkaido, northern Japan. *Canadian Journal of Forest Research* 29: 1891–1899.
- Aguinagalde I, Hampe A, Mohanty A, Martin JP, Duminil J, Petit RJ (2005) Effects of life-history traits and species distribution on genetic structure at maternally inherited markers in European trees and shrubs. *J. Biogeogr.* 32: 329–339.
- 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.
- Aldrich PR and Cavender-Bares J (2011) Genomics and breeding of oaks and their slightly less-domesticated wild oak relatives. 89-130 *In*: C. Kole, editor. *Wealth of Wild Species: Genetic, Genomic and Breeding Resources*. Springer-Verlag, New York.
- Anderson E (1949) *Introgressive Hybridization*. pp109. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Aoki K, Ueno S, Kamijo T, Setoguchi H, Murakami N, Kato M, Tsumura Y (2014) Genetic differentiation and genetic diversity of *Castanopsis* (Fagaceae), the dominant tree species in Japanese broadleaved evergreen forests, revealed by analysis of EST-associated microsatellites. *PlosOne* 9: e87429.
- Arnold ML (1992) Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 23: 237-261.

- 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.
- Banez G, Gyokusen K, Saito A (1999) Plasticity in branching characteristics of four year old *Quercus actissima* and *Q. serrata* seedlings in response to low light intensity and additional fertilizer. *Bulletin of Kyushu University Forests* 80: 27-39.
- Besnard G, Khadari B, Baradat P, Bervill A (2002) *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1353–1361.
- Breen AL, Murray DF, Olson MS (2012) Genetic consequences of glacial survival: the late Quaternary history of balsam poplar (*Populus balsamifera* L.) in North America. *Journal of Biogeography* 39: 918-928.
- Bryant D, Moulton V (2002) NeighborNet: An agglomerative method for the construction of planar phylogenetic networks. In *Algorithms in Bioinformatics*; Guigó, R., Gusfield, D., Eds.; WABI: Springer, Berlin, Germany, Volume 2452, pp. 375–391.
- 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.
- Cavender-Bares J, González-Rodríguez A, Eaton D, Hipp A, Beulke A, Manos P (2015) Phylogeny and biogeography of the American live

- oaks (*Quercus* subsection *Virentes*): a genomic and population genetics approach. *Molecular Ecology*. 24: 3668-3687.
- 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* 7:1-14.
- Cinget B, Gérardi S, Beaulieu J, Bousquet J. (2015) Less pollen-mediated gene flow for more signatures of glacial lineages: congruent evidence from balsam fir cpDNA and mtDNA for multiple refugia in eastern and central North America. *PLoS ONE* 10: e0122815.
- Clark JS, Fastie C, Hurtt G, Jackson ST, Johnson C, King GA, Lewis M, Lynch J, Pacala S, Prentice C (1998) Reid's Paradox of Rapid Plant Migration: Dispersal theory and interpretation of paleoecological records. *BioScience* 48: 13-24.
- 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
- Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG, Petit RJ (2007) Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *The American Naturalist* 169: 662-672.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Fineschi S, Come VL, Petit RJ (1997) Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Earl DA, Bridgett M (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

- Ebert D, Peakall R (2009) Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): Technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. *Mol. Ecol. Res.* 9: 673–690.
- Eckert AJ, Heerwaarden J, Wegrzyn JL, Nelson CD, Ross-Ibarra J, González-Martínez SC, Neale DB (2010) Patterns of population structure and environmental associations to aridity across the range of loblolly pine (*Pinus taeda* L., Pinaceae). *Genetics* 185: 969–982.
- El Mousadik, 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.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.
- 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*, 066431
- Fineschi S, Turchini D, Villani F, Vendramin GG (2000) Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (Fagaceae) throughout southern European countries. *Molecular Ecology* 9: 1495–1503.
- 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.
- 藤原正人(1972) 明治前期産業發達史資料 補卷 33. 290pp., 明治文献

資料刊行会，東京

- Fukamachi K, Oku H, Rackham O (2003) A comparative study on trees and hedgerows in Japan and England. In Landscape Interfaces. Palang, H. and Fry, G. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 53-69.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavallo-Sforza LL, Feldman MW (1995) An evaluation of genetic distances for use with microsatellites loci. Genetics 139:463-471.
- 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 Intergrative Plant Biology 50: 368-374.
- Goudet J (1995, 2002) FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F statistics. Journal of Heredity 86: 485-486.
- Grivet D, Deguilloux MF, Petit RJ, Sork VL (2006) Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) in California and Europe. Molecular Ecology 15: 4085-4093.
- Gunn B, Baudouin L, Olsen K (2011) Independent origins of cultivated coconut (*Cocos nucifera* L.) in the old world tropics. PlosOne 6: 1-8.
- Hamilton J, Lexer C, Aitken S (2013) Genomic and phenotypic architecture of a spruce hybrid zone (*Picea sitchensis* × *P. glauca*). Molecular Ecology. 22: 827-841.
- Hardig T, Brunsfeld S, Fritz R, Morgan M, Orrians C (2000) Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. Molecular Ecology. 9: 9-24.
- 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.
- 橋詰隼人(1983)クヌギ、コナラの幼齢木の着花習性. 広葉樹研究 2:

49-54.

橋詰隼人・金川悟 (1988) クヌギ・アベマキ混交林における葉及び樹皮形態の変異. 第 99 回日本林学会大会発表論文集. 241-242.

橋詰隼人・韓海栄 (1993) 多雪地におけるクヌギ大苗の人工造林に関する研究. 日本林学会関西支部論文集 2:163-166.

Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59: 1633-1638.

Heuertz M, Fineschi S, Anzidei M, Pastorelli R, Salvini D, Paule L, Frascaria-Lacoste N, Hardy OJ, Vekemans X, Vendramin GG (2004) Chloroplast DNA variation and postglacial recolonization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) in Europe. *Molecular Ecology* 13: 3437-3452.

Heuertz M, Carnevale S, Fineschi S, Sebastiani F, Hausman JF, Paule L, Vendramin GG (2006) Chloroplast DNA phylogeography of European ashes, *Fraxinus* sp. (Oleaceae): roles of hybridization and life history traits. *Molecular Ecology* 15: 2131-2140.

Hiraoka K, Tomaru N (2009) Genetic divergence in nuclear genomes between populations of *Fagus crenata* along the Japan Sea and Pacific sides of Japan. *The Journal of Plant Research* 122: 269-282.

Hiroki S (2000) Fluctuation in size and weight of acorns and in the amount of acorn production with *Quercus variabilis* Blume. *Nagoya University Forest Science* 19:37-42.

Hiroki S, Kamiya T (2005) Discrimination of hybrids between *Quercus variabilis* and *Q. acutissima* by using stellate hairs, and analysis of the hybridization zone in the Chubu District of central Japan. *The Journal of Phytogeography and Taxonomy*. 53: 145-152.

広木詔三・松原輝男 (1977) ブナ科植物の生態学的研究 I. アベマキの種子期における整理生態学的研究. *日本生態学会誌* 27: 13-21

- 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.
- Hu L, Uchiyama K, Shen HL, Saito Y, Tsuda Y, Ide Y(2008) Nuclear DNA microsatellites reveal genetic variation but a lack of phylogeographical structure in and endangered species, *Fraxinus mandshurica*, across North-east China. *Annals of Botany* 102: 195-205
- 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.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- 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
- Iida S (1996) Quantitative analysis of acorn transportation by rodents using magnetic locator. *Vegetatio* 124: 39-43.
- 伊東宏樹・日野輝明・佐久間大輔 (2010) 兵庫県猪名川町の二次林の林分構造および林床植生. 森林総合研究所研究報告 9: 47-62.
- 伊東隆夫 (1990) 日本の遺跡から出土した木材の樹種とその用途 II. 木材研究・資料 26: 91-189.
- 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.
- Ishida T, Hattori K, Sato H, Kimura M (2003) Differentiation and hybridization between *Quercus crispula* and *Q. dentata* (Fagaceae): Insights from morphological traits, amplified fragment length polymorphism markers, and leaf miner composition. *American Journal of Botany*. 90: 769-776.
- Iwaizumi M, Tsuda Y, Ohtani M, Tsumura Y, Takahashi M (2013) Recent distribution changes affect geographic clines in genetic diversity and structure of *Pinus densiflora* natural populations in Japan. *Forest Ecology and Management* 304: 407-416.
- Iwasaki T, Aoki K, Seo A, Murakami N (2012) Comparative phylogeography of four component species of deciduous broad-leaved forests in Japan based on chloroplast DNA variation. *The Journal of Plant Research* 125: 207-221.
- 梶幹男(2012)コナラ属 82-90. 図説日本の樹木 鈴木和夫・福田健二編著. 朝倉書店, 東京.
- 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.
- 金谷整一・松本麻子(2015a)シラカシ. 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, 135-136. 文一総合出版, 東京
- 金谷整一・松本麻子(2015b)アラカシ. 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, 137-138. 文一総合出版, 東京
- 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・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.
- Keller SR, Olson MS, Silim S, Schroeder W, Tiffin P (2010) Genomic diversity, population structure, and migration following rapid range expansion in the Balsam Poplar, *Populus balsamifera*. *Molecular Ecology* 19: 1212-1226.
- 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. 日本緑化工学会誌 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.
- 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.
- 北村四郎・村田源 (1979) 原色日本植物図鑑・木本編 II. pp545., 保育社, 大阪.
- 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.
- 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.
- 倉田益二郎 (1949) アベマキ. 特用樹種. 朝倉書店, 東京. 112-120.
- 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 pp229
- Kremer A, Dupouey J, Deans J, Cottrell J, Cskikl U, Finkeldey R,

- Espinel S, Jensen J, Kleinschmit J, Dam B, Ducousso A, Forrest I, Lopez De Heredia U, Lowe A, Tutkova M, Munro R, Steinhoff S, Badeau, V (2002) Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Annals of Forest Sciences*. 59: 777-787.
- Langella O (2007) Populations 1.2.31: Population genetic software (individuals or populations distances, phylogenetic trees). <http://bioinformatics.org/populations/>
- Lee J, Jin D, Choi B, Choi D (2014) Genetic differentiation and introgression among Korean evergreen *Quercus* (Fagaceae) are revealed by microsatellite markers. *Annales Botanici Fennici* 51: 39-48.
- 李廷鎬・橋詰隼人・山本福壽 (1996) カシワ、コナラ、ミズナラおよびそれらの中間型個体の開花期、花粉の形態・稔性について. *日本林學會誌*. 78: 452-456.
- 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.
- Lian CL, Oishi R, Miyashita N, Nara K, Nakaya H, Wu BY, Zhou ZH, 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.
- Liu C, Tsuda Y, Shen H, Saito Y, Ide Y (2014) Genetic structure and hierarchical population divergence history of *Acer mono* var. *mono* in South and Northeast China. *PLOS ONE* DOI: 10.1371/journal.pone.0087187
- Liu HZ, Takeichi Y, Kamiya K, Harada K (2013) Phylogeography of *Quercus phillyraeoides* (Fagaceae) in Japan as revealed by

- chloroplast DNA variation. *Journal of Forest Research* 18: 361-370
- Lumaret R, Mir C, Michaud H, Raynal V (2002) Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). *Molecular Ecology* 11: 2327-2336.
- Magni CR, Ducouso A, Caron H, Petit RJ, Kremer A (2005) Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. *Molecular ecology* 14: 513-524.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, Dupanloup I, Geburek T, Gömöry D, Latałowa M, Litt T, Paule L, Roure JM, Tantau I, Knaap WO, Petit RJ, Beaulieu JL (2006) A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199-221.
- Magri D, Fineschi S, Bellarosa R, Buonamici A, Sebastiani F, Schirone B, Simeone MC, Vendramin, GG (2007) The distribution of *Quercus* subchloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16: 5259-5266.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*. 20: 229-37.
- Manos PS, Zhou ZK, Cannon CH(2001) Systematics of Fagaceae: Phylogenetic tests of reproductive trait evolution. *International Journal of Plant Sciences* 162: 1362-1379.
- Marinoni D, Akkac A, Boundous 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
- 松原輝男・広木詔三 (1985) ブナ科植物の生態学的研究 IV.アベマキの5

- 年生までの生長と根における貯蔵物質. 日本生態学会誌 35: 329-336.
- Matsumoto A, Kawahara T, Kanazashi A, Yoshimaru H, Takahashi M, Tsumura Y (2009) Differentiation of three closely related Japanese oak species and detection of interspecific hybrids using AFLP markers. *Botany* 87: 145-153.
- Meirmans PG, Hedrick PW (2011) Assessing population structure: FST 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.
- 光永俊郎(2006)ドングリの食文化 II—縄文人とドングリ— *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* 211:546-554.
- 光永俊郎 (2007) ドングリの食文化 V—縄文以後の日本のドングリの食文化— *Foods and Food Ingredients Journal of Japan* 212:148-161.
- 宮崎安貞 (1988) 北海道におけるなら類の遺伝子滲透と自然雑種. 北海道の林木育種. 31: 5-8.
- 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.
- 中村克哉(1983)シイタケ栽培の史的研究. 502 pp., 東京出版, 東京.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Nei M (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University press. New York 512 p.
- 農林省(1933a)日本林政史資料 熊本藩 内閣印刷局 東京 204-205
- 農林省(1933b)日本林政史資料 鹿児島藩 内閣印刷局 東京 180-181
- 農林省(1933c)日本林政史資料 小倉藩 内閣印刷局 東京 352-353
- 農林省(1933d)日本林政史資料 鳥取藩 内閣印刷局 東京 274-275

農林省農林経済局(1971)農林水産統計表

野崎伸三(1936)「コルク」原料としてのアベマキ樹皮に就いて 日本林学会誌 18:26-34

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

岡田滋・中川幸尚・橋詰隼人 (1995) 中国地方(岡山県三平山)のナラ類の雑種性について(I)－走査性電子顕微鏡(SEM)による葉毛型の分類－. 日本林学会関西支部論文集 3:133-136.

岡田滋・山本史恵・橋詰隼人・山本福壽 (1996) クヌギ、アベマキの葉の形態の変異について. 日本林学会関西支部論文集 5: 73-76.

岡田滋・山本武・山本福壽・橋詰隼人(1995)山陰海岸(長尾鼻、陸上岬)に自生するナラ類の変異(II)-ミズナラ、コナラ、カシワの雑種性について-. 日本林学会関西支部論文集 4: 89-92.

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.

大場秀章 (1989) ブナ科. 日本の野生植物 木本 I, 66-78. 平凡社, 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.

Ortego J, Riordan EC, Gugger PF, Sork VL. (2012) Influence of environmental heterogeneity on genetic diversity and structure in an endemic southern Californian oak. *Molecular Ecology* 21:

- 3210-3223.
- Palme AE, Su Q, Palsson S, Lascoux M (2004) Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. *Molecular Ecology* 13:167-178.
- Parks DH, Mankowski T, Zangoeei S, Porter MS, Armanini DG, Baird DJ, Langille MGI, Beiko RG (2013) GenGIS 2: Geospatial analysis of traditional and genetic biodiversity, with new gradient algorithms and an extensible plugin framework. *PLoS ONE* 8, e69885, doi:10.1371/journal.pone.0069885.
- 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 RJ, BODÉNÈS C, Ducouso A., Roussel G, Kremer A (2003) Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*. 161: 151–164.
- Petit RJ, Csaikl U, BORDÁCS S, Burg K, Coart E, Cottrell J, Van Dam B, Deans J, Dumolin-LAPÈGUE S, Fineschi S, Finkeldey R, Gillies A, Glaz I, Goicoechea P, Jensen J, KÖNIG A, Lowe A, Madsen S, MÁTYÁS G, Munro R, Olalde M, Pemonge M, Popescu F, Slade D, Tabbener H, Turchini D, DE Vries S, Ziegenhagen B, Kremer A (2002) Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management*. 156: 5-26.
- Petit RJ, Excoffier L (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 386-393.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.

- Petit RJ, Kremer A, Wagner D (1993) Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 122-128.
- Pons O, Petit RJ (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 14: 1237-1245.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: New tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 142-147.
- Quang ND, Ikeda S, Harada K (2008) Nucleotide variation in *Quercus crispula* Blume. *Heredity* 101: 166-174.
- Rajora OP, Dancik BP (1992) Chloroplast DNA inheritance in *Populus*. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 280-285.
- Ramos-Ortiz S, Oyama K, Rodriguez-Correa H, Gonzalez-Rodriguez A (2016) Geographic structure of genetic and phenotypic variation in the hybrid zone between *Quercus affinis* and *Q. laurina* in Mexico. *Plant Species Biology*. 31: 219-232.
- 林野庁(2016)森林・林業統計要覧. 260pp.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Rushton B (1978) *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: a multivariate approach to the hybrid problem: 1. Data acquisition, analysis and interpretation. *Watsonia*. 12: 81-101.
- 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—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
- Sakai T, Tanaka H, Shibata M, Suzuki W, Nomiya H, Kanazashi T,

- Iida S, Nakashizuka T (1999) Riparian disturbance and community structure of a *Quercus-Ulmus* forest in central Japan. *Plant Ecol.* 140: 99–109.
- San Jose-Maldia L, Matsumoto A, Ueno S, Kanazashi A, Kanno M, Namikawa K, Yoshimaru H, Tsumura Y (2017) Geographic patterns of genetic variation in nuclear and chloroplast genomes of two related oaks (*Quercus aliena* and *Q. serrata*) in Japan: implications for seed and seedling transfer. *Tree Genetics and Genomes* 13: 121.
- 佐多一至・豊東積(1939)アベマキのコルク剥皮試験成績 日本林學會誌 21:10-18
- Sexton JP, Hangartner SB, Hoffmann AA (2014) Genetic isolation by environment or distance: which pattern of gene flow is most common? *Evolution* 68: 1-15.
- 島田和則・勝木俊雄・岩本宏二郎・齊藤修(2008)東京都多摩地方南西部におけるコナラ・クヌギ二次林の群落構造および種数の管理形態による差異. 植生学会誌 25:1-12.
- 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 ONE* 11: 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. pp90, 大成印刷. 茨城
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- 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)n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*. 6: 1189-1194.
- Sugahara K, Kaneko Y, Ito S, Yamanaka K, Sakio H, Hoshizaki K, Suzuki W, Yamanaka N, Setoguchi H (2011) Phylogeography of Japanese horse chestnut (*Aesculus turbinata*) in the Japanese Archipelago based on chloroplast DNA haplotypes. *The Journal of Plant Research* 124: 75-83.
- Sugiura N, Tang D, Kurokochi H, Saito Y, Ide Y (2015) Genetic structure of *Quercus gilva* Blume in Japan as revealed by chloroplast DNA sequences. *Botany* 93: 873-880.
- 鈴木三男 (2002)日本人と木の文化. 八坂書房, 東京 pp255
- 鈴木三男・能代修一(1997)縄文時代の森林植生の復元と木材資源の利用. 第四紀研究 36: 329-342
- 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.
- 只木良也(1993)二次林 沼田真編 生態の事典.264 東京堂出版, 東京
- Tamaki I, Okada M (2014) Genetic admixing of two evergreen oaks, *Quercus acuta* and *Q. sessilifolia* (subgenus *Cyclobalanopsis*), is the result of interspecific introgressive hybridization. *Tree Genetics and Genomes* 10: 989-999.
- Tamaki I, Setsuko S, Tomaru N (2008) Genetic variation and differentiation in populations of a threatened tree, *Magnolia stellata*: factors influencing the level of within - population genetic variation. *Heredity* 100: 415-423
- Tani N, Tomaru N, Araki M, Ohba K (1996) Genetic diversity and

- differentiation in populations of Japanese stone pine (*Pinus pumila*) in Japan. Canadian Journal of Forest Research 26: 1456-1462.
- 戸田忠雄・藤本吉幸・西村慶二・前田武彦(1986) 輸入種子による18年生クヌギ林分の調査結果. 九州育種場年報 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. 九州育種場年報 17:69-73.
- 徳川宗敬(1941) 江戸時代に於ける造林技術の史的研究 西ヶ原刊行会 373pp
- 戸丸信弘(2013) 日本に広域分布する落葉広葉樹における遺伝的多様性と集団遺伝構造. 地球環境 18:119-126.
- Tomaru N, Takahashi M, Tsumura Y, Takahashi M, Ohba K (1998) Intraspecific variation and phylogeographic patterns of *Fagus crenata* (Fagaceae). American Journal of Botany 85: 629-636.
- Tovar-Sanchez E, OYAMA K (2004) Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. American Journal of Botany. 91: 1352-1363.
- 津田吉晃 (2012) 遺伝構造データ解析. 森の分子生態学 2, 345-387. 文一総合出版, 東京
- Tsuda Y, Chen J, Stocks M, Källman T, Sønstebo J, Parducci L, Semerikov V, Sperisen C, Politov D, Ronkainen T, Väliiranta M, Vendramin G, Tollefsrud M, Lascoux M (2016) The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? Molecular Ecology 25: 2773-2789.
- 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, 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.
- 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.
- Tsukada M (1985) Map of vegetation during the Last Glacial Maximum in Japan. *Quaternary Research* 23: 369-381.
- 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.
- 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.
文一総合出版, 東京 pp170
- 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.
- Twyford AD, Ennos RA (2012) Next-generation hybridization and introgression. *Heredity*. 108: 179-189.

- 生方正俊・板鼻直栄・河野耕蔵 (1999) ミズナラとカシワの交雑和合性
および種間雑種における繁殖能力と開花時期. 日本林學會誌. 81:
286-290.
- 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 and Genomes* 10:
1257-1270.
- 上原敬二 (1961) あべまき. 樹木大図説 I, 780. 有明書房, 東京
- 上野真義・青木京子(2015)スダジイ. 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, 114-116. 文一総合出版, 東京
- Valencia-Cuevas L, Pinero D, Mussali-Galante P, Valencia-Avalos S,
Tovar-Sanchez E (2014) Effect of a red oak species gradient on
genetic structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae)
in Mexico. *Tree Genetics & Genomes* 10:641-652.
- Watano Y, Kanai A, Tani N (2004) Genetic structure of hybrid zones
between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla*
(Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis. *American
Journal of Botany* 91: 65-72.
- 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.
- Whittemore A, Schaal B. (1991) Interspecific gene flow in sympatric
oaks (hybridization/ introgression/ chloroplast DNA/ *Quercus*).
Evolution. 88: 2540-2544.
- 養父志乃夫・駒走裕之・中島敦司・山田宏之(1998)緑化用ブナ科植物 9
種の種子発芽に与える温度等諸条件の影響. ランドスケープ研究
61: 497-500.
- 山田浩雄・久保田正裕・磯田圭哉(2011)クヌギ精英樹 F1 実生採取園の
家系内選抜により実現された初期成長の改良効果. 日本林学会誌

93:139-142

- 山中二男(1979)日本の森林植生 補訂版. 築地書館, 東京 pp223
- 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
- 山中典和・笹木智華子・玉井重信(2007)落葉性コナラ属実生の水分生理
特性. 日本緑化工学会誌 33:100-104.
- 山瀬敬太郎(2012)暖温帯域での高齢化した里山構成種 7 種の萌芽能力.
日本緑化工学会誌 38:109-114.
- 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.
- 安田喜憲・三好教夫(1998)図説日本列島植生史. 朝倉書店 東京 pp302
- 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
- 吉野政治(2009)橡衣考続貂. 同志社女子大学大学院文学研究科紀要
9:129-143
- Zeng Y, LIAO W, Petit R, Zhang D (2011) Geographic variation in the
structure of oak hybrid zones provides insights into the
dynamics of speciation. *Molecular Ecology*. 20: 4995-5011.
- Zhang YY, Fang YM, Mukui KY, Li XX, Xia T (2013) Molecular
characterization and genetic structure of *Quercus acutissima*
germplasm in China using microsatellites. *Molecular Biology
Reports* 40: 4083-4090.
- Zhang X, Li Y, Liu C, Xia T, Zhang Q, Fang Y (2015) Phylogeography
of the temperate tree species *Quercus acutissima* in China:
Inferences from chloroplast DNA variations. *Biochemical
Systematics and Ecology* 63: 190-197.