

博士論文

景観スケールにおけるアカマツ林の遺伝的多様性維持機構

小澤 創

第1章 緒言	
1. 1 はじめに	- 1 -
1. 2 アカマツ及びアカマツ林分の特徴とその利用	- 3 -
1. 3 阿武隈山地におけるアカマツ林分の変遷	- 4 -
1. 4 アカマツ林分の拡大と縮小・分断化の影響	- 7 -
1. 5 本論文の目的と構成	- 9 -
第2章 風媒風散布型木本種の広域的な遺伝子流動研究	
2. 1 はじめに	- 15 -
2. 2 間接的なアプローチ	- 17 -
2. 3 直接的なアプローチ	- 19 -
2. 4 残された課題	- 22 -
第3章 アカマツ林分に分断化とその遺伝的多様性への影響	
3. 1 はじめに	- 31 -
3. 2 阿武隈山地におけるアカマツ林分に分断化の実態	- 32 -
3. 3 分断化が遺伝的多様性に与える影響	- 35 -
3. 4 まとめ	- 40 -
第4章 景観内を流動する花粉の評価	
4. 1 はじめに	- 49 -
4. 2 マツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園産種子への園外花粉の影響	- 51 -
4. 3 花粉の捕捉施設としての採種園の評価	- 57 -
4. 4 景観内を流動する花粉の遺伝的多様性	- 63 -
4. 5 まとめ	- 67 -
第5章 シードレインの遺伝的多様性に寄与する遺伝子流動	
5. 1 はじめに	- 81 -
5. 2 景観内を流動する花粉の寄与	- 83 -
5. 3 長距離散布種子の寄与	- 90 -
5. 4 まとめ	- 95 -
第6章 総合考察	
6. 1 アカマツの分断化の進行と遺伝的多様性	- 105 -
6. 2 アカマツの遺伝的多様性維持機構	- 107 -
6. 3 アカマツ林の管理への提案	- 114 -

6. 4 結論	- 116 -
謝辞	- 118 -
引用文献	- 119 -
付表及び付録	- 135 -

## 第1章 緒言

### 1. 1 はじめに

近年、木材価格の低迷や後継者不足などから（都築ら, 2007）伐採後に再生林を放棄する林地が多くなっている（Sakai *et al.*, 2006, Nagashima *et al.*, 2009, 梅田ら, 2009, 村上ら, 2011）。そうした林地の中には、10年以上経過しても高木層（8m以上）に達する木本種が出現しない場所や（竹谷, 2011）、木本種による植生回復が長期間なされない場所がある（竹谷, 2011, 長島ら, 2011）。そのため、水土保持等森林の持つ公益的機能の低下が危惧されている（吉田, 2011）。

遷移初期木本種は植生遷移において草本期から木本期への移行の橋渡しをする樹種である（沼田, 1966, Numata, 1969）。伐採跡地の二次遷移では、埋土種子や前世樹とともに遷移初期木本種が種子散布によって侵入することが重要であり（Yamagawa *et al.*, 2010）、一般に、攪乱後の初期に遷移初期種の頻度及び被度が増加し、その後、遷移後期種へと優占種が移行する（Ash and Barkham, 1976, 長池, 2002）。遷移が進行し、森林の階層構造が発達することで、森林の公益的機能は高まるとされる（藤森, 2004）。

長島ら（2011）は、再生林地放棄地のうち、種子供給源の森林との距離が離れていない林地では速やかに二次遷移が進行するが、種子供給源との距離が離れている林地では、放棄地に対して供給される種子量が少なく、植生回復に時間がかかることを明らかにした。したがって、再生林が行われない林地では、そこに侵入すべき遷移初期木本種の種子供給源が近くに存在していることが、二次遷移を確実に進行させるために重要だと考えられる。

ところで、長池（2002）は伐採や管理が行われている森林の生物多様性を保持するには、遷移を構成する各樹種の遺伝子流動の特性を理解することが必要であるとしている。すなわち、景観に分布する遷移初期種の集団の種子散布量及び種子散布距離、集団間の遺伝的なつながりなどを理解した上で、適切に管理することで、伐採跡地に侵入・定着する集団の遺伝的な質が維持される（長池, 2002）。遷移を構成する樹種の種多様性や遺伝的多様性を維持するように森林を管理することが、森林資源を利用しながら森林の生態系としての機能や構造も維持することにつながる（長池, 2002）。

しかしながら、数 km のスケール（以後、景観スケールとする）を対象として遷移初期種の遺伝的多様性維持機構、特に、遺伝子流動の特性について明らかにした例はこれまでにない。そのため、遷移初期種が景観内で重要な役割を担っているにも関わらず、景観内にどの程度の遷移初期種集団が存在し、それらをどのように管理すれば人為的な攪乱に対して適切に二次遷移が移行するのかという森林管理上の問題には答えられていない。

そこで、本研究では、遷移初期木本種の中で遺伝子流動の特性を解明するのに適した樹種として、アカマツ (*Pinus densiflora*) を取り上げ、景観スケールにおける遺伝子流動の特性について明らかにすることとした。

アカマツは明治以降日本の近代化に伴い、日本各地の放棄された草地を中心にその分布を拡大したが (Zhou *et al.*, 2002, 陳ら, 2005)、その後の都市化、維持管理の放棄やマツ枯れにより急激に集団の縮小、分断化が進行している (戸田, 2004, Ichikawa *et al.*, 2006)。また、アカマツ林は日本の里山景観の一部をなし (只木, 1996)、古くから人間による持続的な利用が行われてきた (小林, 1957, 星野, 1979a, b, 片切, 1981, 三村, 1918, 片山ら, 2005)。そして、現在では、アカマツ林内や林縁に見られる密生した低木林は哺乳類や鳥類などの隠れ家として重要とされ、生物多様性の観点から保全の価値のある生態系とも考えられるようになってきた (環境省, 2014)。このようにアカマツは持続的に集団として景観内に分布し、公益機能の一部を担ってきたものの、分布域の拡大と縮小を繰り返してきたと考えられる。

一方、マツ属の花粉や種子による遺伝子流動についてはこれまでに多くの研究がなされており (e.g. Schuster and Mitton, 2000)、一般に集団間の遺伝的分化の程度が小さく (Guries and Ledig, 1982)、集団の遺伝的多様性を維持させる花粉や種子による遺伝子流動能力が高いことが示唆されている (Nathan *et al.*, 2002, Iwaizumi *et al.*, 2010)。アカマツも他のマツ属と同様に、日本の分布域を網羅した研究において、集団の遺伝的多様性は非常に高く ( $H_E=0.805\sim 0.894$ )、集団間の遺伝的分化の程度も小さい ( $G_{ST}=0.122$ ) ことが明らかになっている (Iwaizumi *et al.*, 2013b)。したがって、アカマツは分布域の拡大と縮小を繰り返しながらも、高い遺伝的多様性を維持する機構を持っていると考えられる。

これらのことから、アカマツの遺伝子流動の特性や遺伝的多様性の維持機構を明らかにすることにより、遷移初期種としてのみならず、里山景観の構成種としての維持管理へも科学的なデータを提供できると考えた。

本研究では、近年アカマツ林分の縮小・分断化の顕著な、阿武隈山地の東斜面に立地する福島県相馬郡新地町に調査地を設定し (図-1.1[P12])、景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性及び長距離散布された種子が集団の遺伝的多様性に与える影響について明らかにした。そして、これらの知見に基づいて、アカマツの遺伝子流動の特性や遺伝的多様性の維持機構を明らかにした。最後にアカマツ林分の管理に関する提案を行った。

なお、本論文では、同一樹種の集まりについて、樹木の生育単位としての林地をさす場合には「林分」もしくは「林」を、集団遺伝学的議論において遺伝的に関係のある樹木種のまとまりをさす場合には「集団」を用いる。

## 1. 2 アカマツ及びアカマツ林分の特徴とその利用

アカマツはマツ科マツ属の常緑高木であり、本州、四国、九州、朝鮮半島、中国東北部に分布し（浅川ら, 1981）、日本においては暖温帯（関東、北陸から九州）及び冷温帯（東北地方、中部山岳地域や北海道の低地）に分布する（佐竹ら, 1989）。雌雄同株で単性花をつけ（浅川ら, 1981）、交配は風媒による（佐藤・堤, 1988）。種子は長さ 4~4.5mm、幅 2~2.5mm の倒卵状ひし形で、長さ 1.5cm、幅 5mm 程度の翼を持ち（矢頭, 1964）、風により散布される（Nathan *et al.*, 2001, 2002）。また、アカマツの種子を埋土するとその生存期間は 1 年以内であり、埋土種子として地中に存在しないと考えられている（大賀, 1977）。

本種は、1) 草原内の地表面の光条件下で発芽し成長できる、2) 草原に優占する多年生草本と共存できる、3) 初期成長が大きく、短期間に草原の群落高よりも高くなれる、4) 貧栄養の土壌条件下でも生育できるなど、遷移初期種としての特徴を備えており（大賀, 1977）、山地帯及び丘陵帯の人為的攪乱後の二次遷移において、草本期から木本期への移行の橋渡しとなる樹種とされる（沼田, 1966, Numata, 1969）。さらに、アカマツは次の遷移段階である陽樹期の主たる構成種にもなれる樹種とされ（大賀, 1977）、人間活動後の広大な裸地に二次林を作り（吉岡, 1958）、草地を放棄した後にも容易に成立できる（加藤, 1971）。

アカマツ林は我が国において、6~7 世紀の飛鳥時代に増加し始めたと考えられている（塚田, 1974, 只木, 1996）。森林から多くの資源が利用されるようになるにつれてアカマツ林は拡大し（只木, 1996）、鎌倉時代には急増したと考えられている（安田, 1995）。かつて中央政府が置かれていた近畿地方では、政府の建物、社寺、武士の屋敷や山城等を建設するために森林伐採が進み、また、農地開発によって必要とされる肥料を得るために落葉落枝や若葉が森林から収奪され、草地が維持されたと考えられている（太田, 2012）。そのため、アカマツ林の増加の要因は活発な人間活動の結果アカマツ以外は生育できないようなやせ地（はげ山・裸地）あるいは遷移初期種が侵入しやすい草地が、西日本を中心に拡大したためと考えられている（只木, 1996）。太田（2012）は乾燥気味の尾根筋に生育していたアカマツがやせ地や草地を中心に分布域を拡大させたので、アカマツは日本の森林の劣化・荒廃の指標植物とみなせると指摘している。

増加したアカマツは、日本人の生活に欠かせない重要な森林資源として様々な形で利用されてきた（小林, 1957, 星野, 1979a, b, 片切, 1981, 三村, 1981, 片山ら, 2005）。例えば、木材を燃焼させたときの発熱量は、一般に針葉樹では広葉樹にくらべて高いが、中でもアカマツは単位乾燥重量あたり 21.6MJ/kg と針葉樹の中でも比較的高い発熱量を示す（Abe, 1986）。そのため、化石燃料が用いられるようになるまでは、アカマツは農山村における

家庭用燃料として重要な位置を占めていた（佐藤, 1961）。また、同じ理由から製鉄の際の燃料としても、古くから用いられてきた（三村, 1918）。西日本においては 1600 年代から 1900 年代まで、山砂に含まれる砂鉄からの製鉄が行われており、大量の赤松炭が使用されてきた（片山ら, 2005）。また、農山村においては、アカマツは燃料としてだけでなく様々な形で生活に利用されていた。滋賀県西部の里山地域では、住民が行う森林資源に関する 272 種類の作業のうち、マツ（アカマツ・クロマツ）に関わる作業の種類は 45 種類と最も多く、用材や割木（薪）にする以外にも、「松枝」、「松かさ」、「松根」、「松葉」、「松木皮」などの用語が確認され、生活に密着した資源であったことが裏付けられている（堀内ら, 2006）。また、アカマツの樹皮や葉を米粉と混ぜて餅とし、葉を煮て茶としていたとの記述も存在する（上原, 1961）。

### 1. 3 阿武隈山地におけるアカマツ林分の変遷

アカマツが東北地方に分布域を拡大させたのは江戸時代後半以降であるとされていることから（安田, 1995）、本研究の対象地である阿武隈山地を含め、東北地方にかつて存在していた草地が分布域の拡大に関わっていると考えられる。東北地方は古くから有数な牛馬の産地であり、広大な放牧地が存在していた（安田, 1954, 1956, 1959, 1962）。東北地方において放牧が盛んであった理由は、冷涼な気候でしばしば夏の低温に見舞われるため、西日本よりも農業生産力が低いことが挙げられる（安田, 1956, 1962）。東北地方では水田の裏作ができず、畑作も 2 年 3 作あるいは 1 年 1 作であり、西日本のような農業への強い依存が不可能であった。そのため、農業収入だけでは家計が成り立たず、農作物ほど気候に影響されない家畜の山地放牧が農業と並行してなされていた（安田, 1956）。

阿武隈山地や岩手県北上山地の脊梁部には広い緩斜面が存在していることから、草地面積を確保し、放牧家畜を管理する上で有利であった（安田, 1962）。放牧の方法は柵垣で放牧地を限定しない自由放牧であり（安田, 1956）、阿武隈山地の平地から山地までの広い地域が草地であったと考えられている（安田, 1954）。実際、明治初年の阿武隈山地地域の土地台帳には草野と記載された場所が多く認められる（安田, 1962）。また、草地は近世の農業においても重要な役割を果たしていた。田畑の地力を維持するための刈敷、茅葺き屋根の材料、家畜の飼料などの供給地としての草地が集落の周囲に配置されていたとされている（深町, 2000, スプレイグ, 2003, 小椋, 2010）。

放牧や農業を営むためには相当な広さの草地が必要だったと考えられる（安田, 1962, 小椋, 2006）。例えば、冬期の放牧家畜の飼料の確保だけで田畑の 5~10 倍の草地が必要とされ（安田, 1962）、農業を営むための肥料や家畜の飼料として田畑の 10~12

倍の草地が必要だったとされている（小椋, 2006）。この他に燃料用としての木柴地も確保する必要があったため、地域によっては山地の5~7割以上が草地だったと推測されている（小椋, 2006）。最も古い統計値である1883年（明治16年）における全国の草地面積は1,360万ha（日本の国土面積3,780万haの約36%）であったのに対し、森林面積は1,670万ha（約44%）であった。これは、現在森林として覆われている地域（約2,500万ha）のうち、相当面積が過去に草地として維持されていたことを示している（小椋, 1993, 2006）。本研究の対象地である阿武隈山地において、草地がどの程度存在したかについては確かな資料はないが、放牧や農業経営に伴う草地は相当面積存在したと考えられる。

本研究の対象地において、草地がどの程度存在したかを推定するひとつの手掛かりとして、黒ボク土の存在がある。草地として長期間維持されると黒ボク土が生成される（渡辺, 1990, 須賀, 2010）。したがって、阿武隈山地の黒ボク土の分布範囲を把握することができれば、調査対象地域に草地がどれくらい分布していたかを推定することができる。黒ボク土の分布は既存の土壌図から推定することになるが、過去に行われた複数の土壌調査事業においては土壌分類が統一されておらず、褐色森林土大群とされる地域のうち黒ボク土大群に含まれる地域が多く存在するため、その分布範囲を正確に把握することができず、菅野ら（2008）は、褐色森林土大群から黒ボク土を抜き出すことをせずに、黒ボク土の分布を示している（図-1.1[P12]）。これによれば、黒ボク土は阿武隈山地の脊梁部を中心に分布し、その周囲に褐色森林土大群が分布している。すなわち、阿武隈高地における黒ボク土の分布は、先の安田（1954, 1962）の考え方と合致するといえよう。

阿武隈山地における当時のアカマツ林分の面積に関する資料は見当たらないが、アカマツが森林資源として持続的に利用され、山地に広大な草地が維持されている間はアカマツの分布域は拡大しなかったと考えられる。東北地方にマツ林分が拡大したのは江戸時代になってからのことであり、西日本に比べその歴史は長くはないとする記述（安田, 1998）もみられることから、今日ほど大面積のアカマツ林分は存在しなかった可能性が高い。

アカマツが東北地方に分布域を急速に拡大したきっかけの一つは、草地の維持管理の放棄だと考えられる。近世まで持続的に維持されてきた草地は、明治初期以降における火入れに対する厳しい規制とそれに伴った植林の推進、そして、金肥を田畑の肥料として用いるようになり、徐々に減少した（小椋, 2006）。また、東北地方で盛んに行われていた山地放牧は明治初期以降、林野の所有区分が明確になったため、自由放牧が規制されるようになり、柵等で放牧地を制限する限定放牧に移行した。また、その後、鉄道及び車などの交通機関の普及により軍用、通信、運搬用としての馬の使用が衰退し、山地に存在していた放牧地のほとんどが放棄された（安田, 1956）。さらに第二次大戦後、農業にトラクターが



導入されるようになると、農耕用の牛を養うことがなくなり、農山村周辺で使われていた草地も放棄されるようになった（鎌田・中越, 1990）。現在では草地の面積は約 43 万 ha、国土の 1%程度とされており、1883 年(明治 16 年)の 1,360 万 ha から激減した(小椋, 2006)。

放棄された草地には低木林や陽樹林が発達する(小泉ら, 2000)。陽樹とは陽光の下で発芽し、早い生育を示し、土地の乾湿・肥瘦に対する適応力の大きな樹種とされ、遷移初期木本種は全て陽樹とされている(沼田, 1999)。遷移初期木本種であるアカマツは本州西南山地(Zhou *et al.*, 2002) や関東北部(陳ら, 2005) の放棄された草地で陽樹林を発達させた。また、もともと樹高が低く疎なアカマツ林分(樹冠の疎密度が 50%未満)で放牧が行われていた場所では放棄後にアカマツ林分が発達しやすかった(鎌田・中越, 1990)。こうしたことから、阿武隈山地でも放棄された草地にアカマツ林分の分布域が拡大したと推定される。阿武隈山地北部における黒ボク土の分布(菅野ら, 2008)と現在のアカマツ林分の分布(環境省自然環境保全基礎調査植生調査 1/50,000 植生図「桑折」、「角田」、「保原」、「相馬中村」による[環境省, 1973~])を重ねて図-1.1[P12]に示した。阿武隈山地の脊梁部に黒ボク土の分布が認められ、黒ボク土の分布地域やその周囲に現在でも多くのアカマツ林分が分布している。このことから、阿武隈山地にかつて存在した草地の多くにアカマツが侵入・定着したことが推定される。

さらに、昭和 30 年代(1955 年~1964 年)には、アカマツはパルプ材として多く利用されており、福島県においても 1963 年(昭和 38 年)の 3,440ha を最大に造林が盛んに行われた(福島県農林水産部, 1955~2010)、1961 年(昭和 36 年)の 43,577ha から、1981 年(昭和 56 年)の 84,425ha へと、アカマツ林分はさらに拡大した。その後、アカマツ林分の面積は徐々に減少し、2010 年(平成 22 年)には 75,026ha となったが、今日でも民有林全体の 13.6% を占め、針葉樹ではスギについて 2 番目の面積を維持している。

このように分布域を急速に拡大させたアカマツ林分であるが、その後は急激に縮小・分断化が進行している。一般的に森林の面積の減少は樹木集団の分断化を引き起こす一つの原因であり、都市化の著しい地域では分布域の縮小や集団の分断化が深刻であるとされている(Ichikawa *et al.*, 2006, Kobayashi and Koike, 2010)。また、近代化にもとまって化石燃料を利用するようになると森林資源の利用が停止し、アカマツ林分を含む里山林は利用目的が見いだされないまま、積極的管理が行なわれない状態となっている(山場・中越, 1999, 田中ら, 2005)。アカマツ林分が多く分布する景観では、管理を放棄されたアカマツ林分は遷移が進行し(只木, 1996)、アカマツ—広葉樹混交林もしくは広葉樹林に変わることが知られている(山本, 2001)。アカマツ林分の場合、これらに加えてマツノザイセンチュウ(*Bursaphelenchus xylopholus*)を病原とするマツ枯れによる集団的な枯死も林分の減少や分断

化の要因になる。全国的にみると、マツ枯れは 1900 年代より継続して発生し、大規模に集団が消失するほどの被害が毎年発生しており（戸田，2004）、福島県においても 1957 年（昭和 32 年）に 9ha の被害が発生後、急速に拡大し、1996 年（平成 6 年）以降、面積で約 40,000ha、材積で約 70,000m<sup>3</sup> の被害が継続して発生している（福島県農林水産部，1955～2010）。被害調査から得た 1957～2010 年の累積被害は面積で 1,025,778ha、材積で 1,604,994m<sup>3</sup> に達している。被害面積は複数年の重複を含んでいるため、福島県のマツ林の面積の約 13 倍、被害材積は全マツ材積の 8.67% となる。

以上のように、アカマツ林分は過去百年余りの間に分布域の拡大と縮小を経験した。このような変化に対してアカマツの遺伝的多様性がどのように変化、あるいは維持されたかが明らかになれば、遷移初期種としての遺伝子流動の特性を明らかにすることができ、景観の構成種としてのアカマツ林分の維持管理に資する重要な知見が得られるものと考えられる。

#### 1. 4 アカマツ林分の拡大と縮小・分断化の影響

一般に、森林面積の拡大と縮小は構成樹種の遺伝的多様性に影響を与えるとされる。ある樹種が元の集団から隔離された別の場所に分布域を拡大させる場合、母集団から散布された種子が侵入・定着して新しい集団が作られる。その際、母集団の個体数よりも新規に定着した集団は個体数が少ないため、創始者効果によりその遺伝的多様性は母集団よりも低くなる（Hartl and Clark, 2007）。実際、ドイツトウヒ（*Picea abies*）において最終氷期以降の分布拡大に伴った創始者効果による遺伝的多様性の低下が示されている（Gugerli *et al.*, 2001）。新規定着集団では他集団からの移住がなければ、世代とともに近親交配の程度が高まることで遺伝的に劣化すること、また、定着集団間の遺伝的な差異が大きくなることが報告されている（Eckert *et al.*, 1996, Hedrick *et al.*, 2001, Ramachandran *et al.*, 2005）。他方、他集団からの移住が継続的に生じていれば遺伝的多様性の劣化は生じず、集団間分化も小さい（Hartl and Clark, 2007）。

一方、集団の分断化は集団間の物理的距離が離れるだけでなく、遺伝的なつながりも変化させる（Young *et al.*, 1996）。樹木の花粉や種子の散布距離や散布量には限りがある。そのため、分断化は集団間でやり取りされる遺伝子を質的、量的に変化させる。このことにより、集団の遺伝的多様性が変化し、集団の消失や遺伝的な分化を促進させ、長期的には種の進化に影響を及ぼすとされる（Young *et al.*, 1996, Sork *et al.*, 1999, Fernández and Sork, 2007）。しかし、Hamrick（2004）や Petit and Hampe（2006）は、樹木の寿命の長さ、花粉の散布能力の高さ、他殖性が分断化にともなう遺伝的多様性の劣化を防いでいると指摘し

ている。すなわち、分断化されたとしても親集団（分断化される前の集団）の遺伝的多様性が高く、自殖が少ないので、交配に関わる花粉の遺伝的多様性は高く、集団内交配による子集団の遺伝的多様性は高くなる。さらに、集団外からの遺伝子流動がこれに加わるので、結果的に子集団の遺伝的多様性は集団内交配のみの場合よりもさらに高くなる。このように分断化が木本種の遺伝的多様性に与える影響について全く反対の見解があるのは、分断化に対する木本種の反応が種や環境によって異なるからだと考えられている（Smouse and Sork, 2004）。

アカマツを含むマツ属では、数十から数百 km の範囲で集団間に遺伝的な差がなく（表-1.1[P13]）、広域的な花粉による遺伝子流動が存在すると推定されている。一般的に、マツ属では家系間や集団間で生理生態的な差があるとされている（Guries and Ledig, 1982）。例えば、*Pinus rigida* では半兄弟家系の光合成能力は家系間でわずかだが有意に異なること（Ledig and Clark, 1977）、また、高緯度の集団の光合成活性は温度変化の影響を受けにくく、低緯度の集団は低温の影響を受けやすいことが明らかになっている（Ledig *et al.*, 1977）。このような知見を踏まえ、Guries and Ledig（1982）は家系間や集団間の生理生態的な差から予想されるほどマツ属には集団間で遺伝的な差がないと指摘している。また、Al-Rabab'ah and Williams（2002）は、マツが分布していないような地域をはさんで集団が東と西に数百 km 以上離れていても集団間に遺伝的な差はなく、東西間の遺伝子流動は制限されない可能性があるとして指摘している。さらに、Ledig *et al.*（2001）は、メキシコのコアウイラ州からイダルゴ州までの 750km、標高 1,400m から 2,700m の範囲内に分布が限られ、しかも分断化されている固有種である *P. pinceana* でも、他の木本性の固有種や他殖性の固有種よりも遺伝的多様性が高く、固定指数が低いことから、広域的な遺伝子流動が示唆されるとしている。

一方、種子による広域的な遺伝子流動については、マツ属のような風散布種子であっても遺伝子流動の担い手としての評価はほとんどなされてこなかった（e.g. Heuertz *et al.*, 2003）。しかし、近年、風散布種子の長距離散布の事例が報告されるようになり（表-1.2[P14]）、当てはまりのよい散布関数が明らかにされてきた（e.g. Nathan *et al.*, 2001）。こうしたことから、アカマツにおいて花粉に加えて種子も広域的な遺伝子流動の担い手になり得ると考えられる。

しかしながら、数 km スケールの範囲内に分布するアカマツの集団において、どのような遺伝的多様性を持った花粉が流動し、集団の遺伝的多様性の維持に貢献しているのか、また、長距離散布される種子が集団の遺伝的多様性の維持にどの程度貢献しているのか等、

景観スケールでの集団間の遺伝子流動の実態を明らかにする研究はこれまでほとんどなされてい

#### 1. 5 本論文の目的と構成

以上を踏まえ、本研究は遷移初期種であるアカマツの景観スケールでの花粉や種子による遺伝子流動の特性及び遺伝的多様性の維持機構を、遺伝子流動の観点から明らかにすることを目的とする。

具体的には、(1) 景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性と遺伝的構成、(2) 長距離散布された種子が集団の遺伝的多様性に与える影響の2点について検討する。

(1) に関しては、これまでの広域的な遺伝子流動の研究は、遺伝子マーカーを用いて種子や実生の花粉親を識別することによって集団外もしくは調査区外からどれだけ花粉が飛来しているかを明らかにする定量的な研究が中心であった (e.g. Dow and Ashley, 1996, Streiff *et al.*, 1999, Robledo-Arnuncio and Gil, 2005)。しかし、実際の集団においては景観上に存在する遺伝子数は有限であり、遺伝子頻度も遺伝子によって大きな差がある。花粉によって長距離散布された遺伝子が集団の遺伝的多様性に与える影響を評価する場合、集団外からどれだけ飛来しているかという定量的な評価に加え、長距離散布された遺伝子プールの定性的な評価 (遺伝的多様性・遺伝的構成の評価) が重要である。

そこで、本研究では採種園を花粉捕捉施設として利用し、植栽されている個体の雌花の受粉時期の差を利用して花粉を捕捉し、花粉散布期間中の花粉の遺伝的多様性を評価することとした。具体的には、気候の異なった地域から選抜されたクローンにより構成され、周囲に多くのアカマツ集団が存在するアカマツ採種園において、植栽されているクローンの雌花の受粉期間の差を把握し、花粉散布期間中の異なる時期に景観内を流動する花粉をどれだけ捉えることができるかを評価する。その上で、異なる時期に捕捉された花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成の変化を評価し、さらに、採種園の周囲のアカマツ集団の遺伝的な特徴と比較する。

(2) に関しては、木本植物にとって種子の長距離散布は花粉による広域的な遺伝子流動と同様に重要な役割を担っていると考えられている (Bohrer *et al.*, 2005)。しかし、種子の長距離散布はまれにしか発生しない事象であり、二次散布等他の要因も関わる (Nathan and Muller-Landau, 2000) ため、集団外から飛来する種子を花粉と同様な手法 (種子親識別) で定量するのは難しい。

そこで、本研究では複数の集団において、集団内に散布された種子集団 (シードレインと呼ぶ) の遺伝的多様性に、集団外から飛来し、シードレインに混入する長距離散布種子

が与える影響を間接的に評価することとした。具体的には、集団の規模によってシードレインに対する、①集団内の親の寄与の程度、②寄与した親数がどのように変化するかについて、それぞれ推定し比較する。この場合、①の結果と②の結果が同じ傾向を示せば、シードレインに貢献する親は集団内のみで構成されていると判断される。一方、異なる傾向にあれば、集団外から飛来する長距離散布種子がシードレインの遺伝的多様性に何らかの影響を与えていると判断される。

本章に続く第2章では、過去に行われた樹木の遺伝子流動に関する研究についてマツ属を中心としてレビューする。これまで風媒風散布の木本種を対象とした遺伝子流動の研究は多く行われており、その研究目的、樹種、調査地、調査方法等は多岐に渡っている。本研究で解決すべき問題点としてとりあげた二つの課題、「景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性」、「長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響」について、既に明らかにされている点が少なくない。そのため、過去の研究で明確になった点、不明確な点を整理し、本研究で取り組む課題の新規性・重要性について明示する。

第3章では、調査対象地における分断化の経過を明らかにし、分断化が集団の遺伝的多様性に与える影響を明らかにする。日本において都市化、管理放棄、病害虫等によるアカマツ林分に分断化の程度は地域によって大きく異なると考えられる。しかしながら、アカマツ林分の減少の経過は統計資料には残っておらず、どれくらい分断化が進んでいるかは把握されていない。そこで、調査地の過去の植生と現在の植生を比較し、分断化の程度を明らかにする。また、分断化がアカマツ集団の遺伝的多様性に与える影響を明らかにする。具体的には、調査地において複数の集団を選定し、集団の成木と集団に散布された種子集団（以後、シードレインとする）の遺伝的多様性を明らかにし、成木（過去）の遺伝的多様性と近年に分断化を受けた後のシードレインの遺伝的多様性を比較する。

第4章では、景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性を明らかにする。まず、景観スケールで流動する花粉を捉える場としてのアカマツクローン採種園の花粉捕捉能力の評価を行う。本研究では、長距離散布される花粉の遺伝的多様性を直接評価するために、アカマツ集団が分布する調査地の中心に設置されているアカマツクローン採種園を利用して景観スケールで流動する花粉を捕捉することを考えた。

まず、この着想に至った研究として、対象採種園から生産される種子に対する園外花粉の貢献度を明らかにした研究を紹介する。次いで、この結果に基づき、調査地がアカマツの花粉散布期間中に採種園の植栽個体の雌花が園外から飛来する花粉（景観スケールで流動する花粉と呼ぶ）をどの程度捕捉しているかを明らかにする。さらに、景観スケール

ルで流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成が花粉散布期間中にどれだけ変化するのか、周囲の集団の遺伝的多様性や遺伝的構成とどの程度の差があるのかを明らかにする。

第5章では、シードレインの遺伝的多様性に寄与する遺伝子流動について明らかにする。まず、景観スケールで流動する花粉が集団の遺伝的多様性にどれだけ寄与しているかを評価する。同樹種集団が多く存在する調査地で集団外から飛来する花粉は分子マーカーを用いた直接的な親子鑑定法では正確に識別することが不可能である。そこで、間接的な評価として、「シードレインの集団内の親の貢献度と集団の規模との関係」と「シードレインの親数と集団の規模」の関係を明らかにする。そして、この2つの結果を比較することで、景観スケールで流動する花粉のシードレインに対する親としての影響を評価する。次に、同じ手法を用いて長距離散布種子がシードレインの親としてのどれくらい寄与しているかを評価する。

第6章では本研究で得られた知見をもとに景観スケールで流動する花粉や長距離散布種子の特性についてとりまとめ、アカマツが分布域の拡大や分断化によって環境が大きく変化する事象が発生しても遺伝的多様性が維持されてきた機構について考察する。さらに、アカマツ林分の管理に向けた提案を行う。

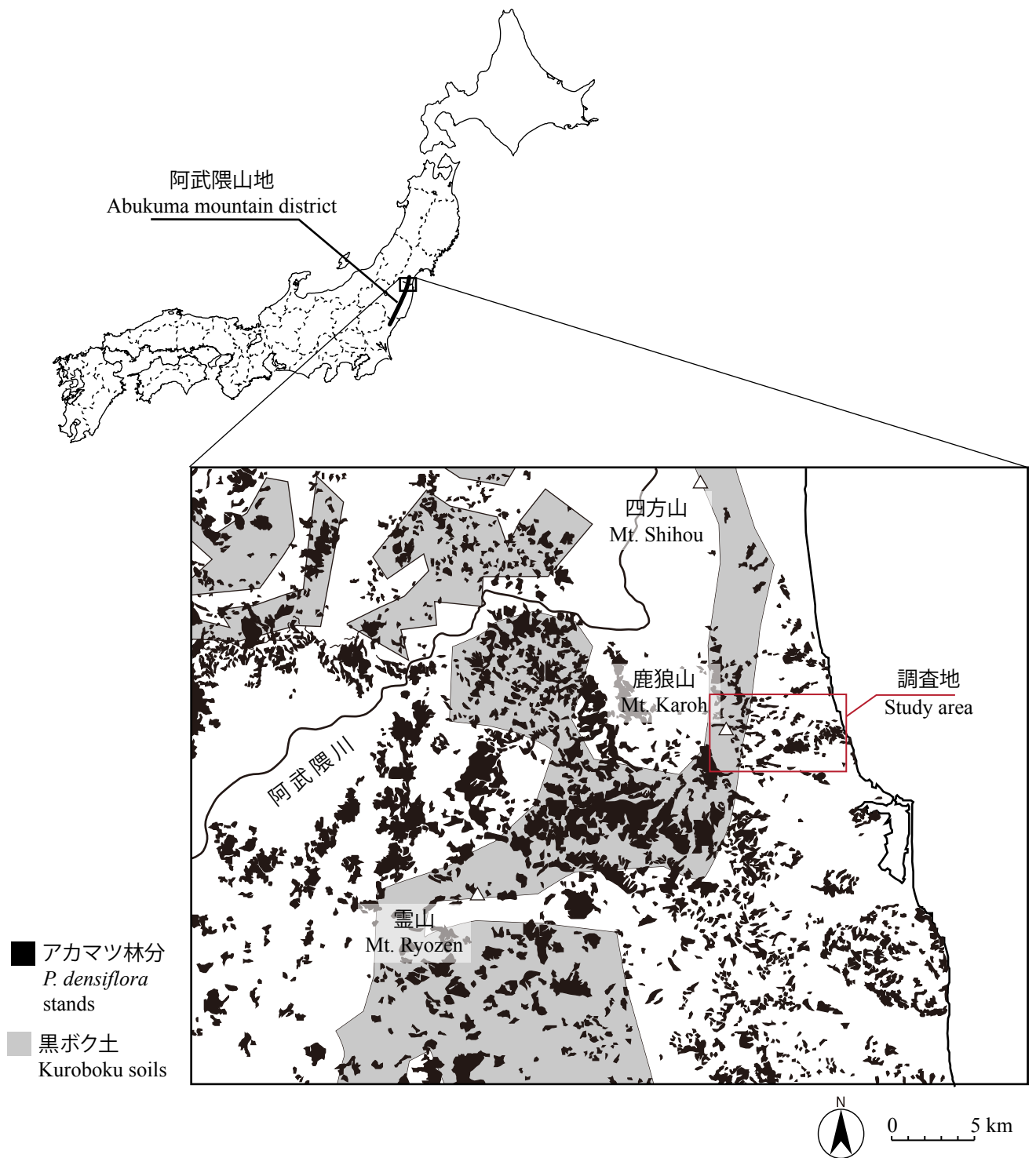


図 - 1.1 調査地とその周辺における黒ボク土\*およびアカマツ林の分布\*\*

\*、菅野ら(2008)による。黒ボク土は四方山、鹿狼山、霊山の稜線の周囲に分布している。

\*\*、1983年度、1984年度および1986年度調査に基づく、環境省自然環境保全基礎調査植生調査1/50,000植生図(「桑折」、「角田」、「保原」、「相馬中村」)による。

Fig. 1. 1 Study area and distribution of Kuroboku soils and *P. densiflora* stands

Kuroboku soils are distributed around the ridge line of Mt. Shihou, Mt. Karoh and Mt. Ryozen.

表- 1. 1 マツ属樹木の成木集団における遺伝的多様性と集団間分化

Table 1. 1 Genetic diversity of mature tree populations of *Pinus* species and genetic differentiation among them

樹種	対象集団数	Number of populations studied	遺伝的多様性 <sup>1)</sup>		集団間の遺伝的分化 <sup>2)</sup>		集団間の遺伝的距離		使用した遺伝子マーカーの種類と分析した遺伝子座数	Reference
			$H_s$	Genetic diversity <sup>1)</sup>	Genetic differentiation among populations <sup>2)</sup>	Genetic distance among populations	Types of genetic markers used and No. of loci analyzed			
Species			$H_s$	$H_o$	$F_{ST}$	$G_{ST}$	Nei's $D$	マーカー	遺伝子座数	
								Markers	No. of loci	
<i>P. densiflora</i>	62		0.873	—	0.013*	0.013	—	SSR	8	Iwaizumi <i>et al.</i> (2013)
<i>P. pinceana</i>	8		—	0.144	0.076-0.195	—	0.000-0.126	Allozyme	23	Ledig <i>et al.</i> (2001)
<i>P. rigida</i>	11		—	0.138	0.003-0.069	—	0.001-0.020	Allozyme	21	Guries & Ledig (1982)
<i>P. taeda</i>	5		—	0.520	0.012-0.058	—	—	SSR	18	Al-Rabab'ah & Williams (2002)
<i>P. thunbergii</i>	22		0.240	—	—	0.073	0.008-0.060	Allozyme	14	Miyata & Ubukata (1994)
<i>P. thunbergii</i>	13		—	0.214	—	0.044	—	Allozyme	7	Kim <i>et al.</i> (1997)

1)  $H_s$ , 平均遺伝子多様度;  $H_o$ , ヘテロ接合度の観察値の平均

1)  $H_s$ , mean Nei's gene diversity;  $H_o$ , mean observed heterozygosity

2)  $F_{ST}$ , 固定指数;  $G_{ST}$ , 遺伝子分化係数; \*,  $P < 0.01$  で有意

2)  $F_{ST}$ , fixation index;  $G_{ST}$ , coefficient of gene differentiation; \*, significant at  $P < 0.01$



表- 1. 2 SSR マーカーによる親子識別(母性分析)で推定された翼果の長距離散布

Table 1. 2 Long distance dispersal of winged seeds estimated by maternal parentage analysis based on SSR markers

樹種	設定された調査区の面積	調査区外から区内に散布された種子の割合	調査区と同種他集団との距離	分析した遺伝子座数	引用文献
Species	Area of study plot (ha)	Proportion of seeds dispersed to the plot from outside the plot (%)	Distance between the study plot and other conspecific populations (m)	Number of loci analyzed	Reference
<i>Pinus densiflora</i>	4	18-20	> 100	8	Iwaizumi <i>et al.</i> (2010)
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	20	7	continuous	5	Sato <i>et al.</i> (2006)
<i>Fraxinus excelsior</i>	900	46	≒ 600	5	Bacles <i>et al.</i> (2006)

## 第2章 風媒風散布型木本種の広域的な遺伝子流動研究

### 2.1 はじめに

風媒風散布型木本種において、遺伝子流動研究は主に二つに分類することができる。一つは集団間でどれくらいの遺伝子がやり取りされているかを明らかにする研究であり (e.g. Salvador *et al.*, 2000, Ledig *et al.*, 2001)、もう一つは集団外からどれくらいの遺伝子が集団内に飛来しているかを明らかにする研究である (e.g. Dow and Ashlegy, 1996, Schuster and Mitton, 2000, Pluess *et al.*, 2009)。

集団間の遺伝子のやり取りを明らかにすることは、その種が複雑な景観に適応して進化する能力を評価することにつながる (Whitlock and McCauley, 1999)。花粉や種子による樹木集団間の遺伝子流動については、実際に得られたデータを理論的に構築された集団遺伝学の原理やモデルに基づいて解釈することによって、定量化が試みられてきた。

そこで、まず、遺伝子流動研究の基礎をなす集団遺伝学について以下に若干紹介する。

N 個体からなる有限集団には、各遺伝子についてみると、それぞれ 2N 個が存在する。集団における世代間の遺伝子の伝達モデルの一つである「ライト・フィッシャーモデル」では、t-1 世代における 2N 個の遺伝子は配偶子として無限大に複製され、その中から 2N 個の遺伝子がランダムに取り出されて次世代 (t) を形成すると考える。この時、他集団からの遺伝子の移入がないとすると、集団には遺伝的浮動や近親交配が起こる (Hartl and Clark, 2007)。

遺伝的浮動とは、ある遺伝子の頻度が次世代において大きくなる確率と小さくなる確率は等しく、世代毎にランダムに変動することである。この変動は集団のサイズが小さいほど大きくなる。ある時点においてその遺伝子の遺伝子頻度が増加するか、減少するかを予測することはできないが、世代を経て遺伝子が固定する (遺伝子頻度が 1 になる) 確率は初期遺伝子頻度に依存し、頻度が高い遺伝子ほど固定しやすい。逆に初期遺伝子頻度が低い遺伝子ほど集団から消失しやすい (遺伝子頻度が 0 になる)。

ライト・フィッシャーモデルで、配偶子プールの中から 2 個の遺伝子を取り出したときに、複製された同一の遺伝子を取り出す確率は  $(1/2N)^2$  になる。このような遺伝子の組み合わせを近親交配と呼び、近親交配が生じると集団のヘテロ接合度は毎世代  $1/2N$  だけ減少し、最終的には 0 になる。ヘテロ接合度の減少の割合は集団のサイズが大きい場合にはごくわずかであるが、集団のサイズが小さいければヘテロ接合度の減少の割合は大きくなり、遺伝的多様性は減少する。

近親交配による遺伝的多様性の減少は、十分多くの個体からなる集団（大集団）がいくつかの集団（分集団）に分割され、集団サイズが小さくなった場合（小集団化）に顕著に表れる。分集団間で遺伝子流動がなく、分集団内で任意交配が行われている場合、分集団のヘテロ接合度は、近親交配によって分割される前よりも小さくなると考えられる（ワールンドの原理）。このとき、個々の遺伝子座における遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルグ平衡の状態を示したとしても、集団全体でのヘテロ接合度は減少する。ヘテロ接合度の減少の度合いは世代を経るにしたがって大きくなる。分割される前の集団のヘテロ接合度と分割された後の分集団の平均ヘテロ接合度の差は遺伝的分化と呼ばれ、指数  $F_{ST} : F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$  で表される。ここで、 $H_T$  は集団全体のヘテロ接合度、 $H_S$  は  $t$  世代における分集団のヘテロ接合度の平均値である。先に述べたように近親交配によって世代を経ることで  $H_T > H_S$  になるため、遺伝的分化は進み、 $F_{ST}$  は 0 よりも大きくなると考えられる。

他集団からの遺伝子の移住がある場合、遺伝的変異の増加と遺伝的浮動による固定化とがつりあって平衡に達すると考えられている。この関係は島モデル (island model、Wright, 1943) で定量化することができる。島モデルでは集団全体のサイズが  $N$  の  $n$  個の分集団を想定し、分集団間では分集団あたり  $m$  の割合で自由に遺伝子交換が起こるとされている。また、分集団に持ち込まれる対立遺伝子は必ず新規なものであるとされている。このモデルのもとで、遺伝的分化の指数  $F_{ST}$  は  $F_{ST} = 1 / (1 + 4N(\mu + m))$  で表される。ここで、 $\mu$  は突然変異率である。一般的に突然変異率は  $10^{-6}$  のオーダーであり、 $m$  に比べてはるかに小さいので、 $F_{ST} = 1 / (1 + 4Nm)$  で示される。この式で  $Nm$  が 1 世代における移動個体実数である。 $Nm$  の増加によって  $F_{ST}$  が急速に減少することが理解できる。分集団間でわずかな個体の移動があると遺伝的分化が抑えられると考えられる。

以上に基づいて、広域的な遺伝子流動を定量化する方法には間接的な方法と直接的な方法がある。

間接的な方法で広域的な遺伝子流動を定量化する場合、まず現実集団の遺伝的多様性及び遺伝的分化を評価し、それから推定される集団間の遺伝的多様性の差から遺伝的分化の程度を評価する。次に、遺伝的分化のパラメーターを用いて、島モデルを前提として  $Nm$  により集団間の遺伝子流動量を推定する。このような方法は、確立された集団遺伝学の理論に基づいて集団間遺伝子流動を現実集団で実証する研究といえる。

一方、直接的な方法で広域的な遺伝子流動を定量化する場合、多型性が高い DNA マーカーを用いて集団内における個体間の遺伝子流動を明らかにする研究から始まった (Chase *et al.*, 1996, Daw and Ashley, 1996)。こうした研究は、主に花粉の流動を中心として行われ、その散布距離や集団外からの流入量の推定などが行われてきた (e.g. Schuster and Mitton,

2000, Sork *et al.*, 2002)。加えて、散布距離と散布量の関係を関数で表す散布関数の推定も多くなされており (e.g. Streiff *et al.*, 1999, Austerlitz *et al.*, 2004)、集団内の比較的短い距離の遺伝子流動に関して散布距離と散布量が精度高く推定することができるようになってきた。しかしながら、直接的な方法で集団間の遺伝子流動が定量化された例はわずかである。

## 2. 2 間接的なアプローチ

これまで、天然マツの集団について、数百 km 以上の広い範囲での成木のサンプリングを行い、その核 DNA の情報に基づく遺伝的変異の推定や地理的、距離的隔離による遺伝的分化程度の推定が数多く試みられている (表-2.1[P30])。これらの研究において、集団の遺伝的多様性を示すパラメーターとしては、観察された平均ヘテロ接合度 ( $H_0$ ) や平均遺伝子多様度 ( $H_S$ , [Nei, 1987]) 等が、集団間の分化の程度については集団間の遺伝子頻度の差をもとにした固定指数 ( $F_{ST}$ , [Wright, 1943, 1969]) や遺伝子置換数を反映させた遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ , [Nei, 1987])、遺伝的距離 ( $D$ , [Nei, 1987]) 等が用いられている。

Hamrick *et al.* (1992) は一般的な木本種の遺伝的多様性はアロザイムによる評価の場合、 $H_S=0.253$  (裸子植物: 0.255、風散布種: 0.252)、遺伝子分化係数は  $G_{ST}=0.084$  (裸子植物: 0.073、風散布種: 0.076) であることとしている。これらの値とマーカーや遺伝子座数が異なるので直接には比較できないが、例えば、*P. thunbergii* のアロザイムによる  $H_S$  (0.240) および  $G_{ST}$  (0.073) は同程度であり (Miyata and Ubukata, 1994)、遺伝的多様性および集団間の遺伝的分化の程度は、一般的な裸子植物と変わりがない。

マツ属の広域的な遺伝子流動は、島モデルに基づくパラメーターである  $Nm$  (1 世代における移動個体数) を用いて定量されている。 $Nm$  値はイベリア半島全域に設定した *P. pinaster* の 12 集団では 3.02 (Salvador *et al.*, 2000)、アメリカの *P. flexilis* の孤立集団における 5 調査区では 6.9 (Schuster and Mitton, 2000)、メキシコ全域に設定した *P. pinceana* の 8 集団では 0.99~4.21 (Ledig *et al.*, 2001)、アメリカ西部に設定した *P. pinceana* の 6 地域 28 集団では 0.41~13.56 (Richardson *et al.*, 2002)、アメリカにおいて、ミシシッピ川渓谷をはさんで設定された *P. taeda* の東西の 5 集団間では 5.79 (Al-Rabab'ah and Williams, 2002) などと推定されている。これらから、マツ属の多くの種において、調査対象の集団の状態に関わらず  $Nm$  は 1 以上であり、理論的には十分に集団の遺伝的分化を抑制する遺伝子流動量だと判断される (Hartl and Clark, 2007)。

花粉による広域的な遺伝子流動を  $Nm$  とは異なる方法で推定した報告がある。これらの研究では、マツ属樹木では葉緑体遺伝子は父性遺伝することを利用し、集団の成木や若木

の葉緑体 DNA (cpDNA) の解析による父性遺伝子の情報から、花粉による遺伝子流動を推定し、集団間の遺伝子流動に制限があることを示している。例えば、スコットランドとヨーロッパの *P. sylvestris* の 15 集団では花粉プールの遺伝的多様性は高いものの ( $H_S=0.977$ )、集団間で花粉プールの遺伝的構成に有意差が検出された。しかし、その有意差の程度は全変動の 8.8% であるので、遺伝的な差があっても集団間の花粉流動は期待されるとして、制限のない広域的な遺伝子流動を行っているとは結論付けていない (Provan *et al.*, 1998)。また、北アメリカ大陸の数百 km 範囲を対象とした *P. albicaulis* の 6 集団でも遺伝的多様性は高いものの ( $H_S=0.907$ )、いくつかの集団で有意差な遺伝的差異が検出されている (pair-wise  $F_{ST}$ ,  $P<0.05$ ) (Richardson *et al.*, 2002)。これに関して、Richardson *et al.* (2002) は広域的な遺伝子流動に気象条件が影響している可能性を示唆し、集団間の遺伝子流動が起りやすい集団と起り難い集団があると結論付けている。Dyer and Sork (2001) は、*P. albicaulis* 集団の花粉プール間の遺伝的距離と集団間の距離に有意な相関関係があることを明らかにし (Mantel test,  $P<0.001$ )、数十 km の範囲で距離的隔離 (Isolation by distance=IBD) が成立することを示し、花粉散布の制限が景観を構成する森林の植生構造 (特に立木密度) が乱流を発生させることによって生じたと推測している。

$Nm$  を用いた集団間の遺伝子流動では、集団が置かれた環境に関係なく全ての集団が他集団と同程度の遺伝子流動を行うと推定されるが、cpDNA を用いて得られた知見は数百 km 以上の制限のない遺伝子流動の可能性を支持するものではない。複数の集団がお互いに数百 km 程度離れていても、遺伝子流動が起りやすい集団と起り難い集団があること、数十 km の範囲の中でも集団間の距離が離れると花粉による遺伝子流動が制限されることで、花粉プールの遺伝的構成に距離的隔離が成立する可能性があることを示している。

このように、広域的な遺伝子流動は集団的な差や  $Nm$  を用いた場合と cpDNA を用いた場合で異なる結果になった。遺伝子流動の評価に差が生じた主な要因は、 $Nm$  によって定量化された集団間遺伝子流動は長期間の遺伝子流動 (long-term gene flow) を反映しており、現在の遺伝子流動 (temporal gene flow) を反映したものではないからだと考えられる。Dyer and Sork (2001) は、実際の集団において長距離散布された花粉が他集団の花粉プールに与える影響は集団内の花粉流動と比較して無視できるほど少ないだろうと指摘している。また、Bossart and Prowell (1998) や Whitlock and McCauley (1999) は  $Nm$  によって集団間の遺伝子流動を定量化することは誤差が多く、問題があると指摘している。この 2 つの報告では、Wright (1943) が示した式 ( $F_{ST}=1/(1+4Nm)$ ) は、天然林では適用できない仮定をもとにしていると指摘している。

すなわち、仮定の一つはセレクションや突然変異を考慮していないことである。 $F$ -統計量は DNA のコード領域と非コード領域では有意に異なることが明らかにされている (Karl and Avise, 1992, Pogson *et al.*, 1995)。コード領域よりも非コード領域で突然変異が発生しやすいので、分析に用いるマーカーによって重要でない遺伝子の突然変異やセレクションが  $F$ -統計量に反映してしまう可能性がある。つまり、用いる分子マーカーによって遺伝子流動量が異なることになる。

また、Wright の式では集団サイズが同一で、集団間の遺伝子流動（遺伝子の交換）が発生する確率が同じである集団が無限に存在することを前提としている。実際には花粉や種子による集団間の遺伝子流動は大きな川や山脈によって妨げられることがある（地理的隔離）。また、集団と集団の距離が離れると遠くに離れた集団間の遺伝子流動は起こり難くなる（IBD）。現実の集団では地理的隔離や IBD に加えて、集団のサイズが異なっているので、集団間を流動する遺伝子数や遺伝子の構成や変異は大きく変わると考えられる。しかしながら、固定指数  $F_{ST}$  は地理的な構造を反映していないので、現実の集団間で有意な  $F_{ST}$  や有意な IBD が検出された場合、集団間遺伝子流動の程度と地理的な構造や集団サイズの差を間違えて関連づけてしまう危険性がある。

さらに、Wright の式では遺伝子浮動の作用と移住の作用の間が平衡に達していることを前提としている。近年の気候変動や人間による攪乱によって、以前よりも多くの種で分断化が進み、集団間の距離が長くなっている。そのため、集団外からの移住数は減少していると考えられるので、集団間の遺伝子流動と遺伝子浮動が平衡に達しているとは考えにくい。したがって、 $F_{ST}$  をもとにして間接的に推定された集団間遺伝子流動は有意ではない可能性がある。

これらのことから、近年の研究では  $Nm$  を広域的な遺伝子流動を推定する唯一のパラメーターとして用いることはなく、 $Nm$  の他に集団間の  $F_{ST}$  の差異の有意性の検出や有意な IBD の検出を行い、複数の解析結果から遺伝子流動を推定する試みや (Kudoh and Whigham, 1997)、次に示す直接的な手法によって遺伝子流動が推定されるようになってきた (Chase *et al.*, 1996, Dow and Ashley, 1996)。

### 2. 3 直接的なアプローチ

景観上に分布する集団の動態（更新と消失）はメタ個体群（meta-population）の要素を持っていると指摘されている (Sork *et al.*, 1999, Cain *et al.*, 2000)。メタ個体群モデル (Levin, 1970) は景観上に分布している集団はランダムに消失と更新を繰り返し、個々の集団が消失する確率と更新する確率は等しいというモデルである。つまり、現実の集団では島モデ

ルのように全集団に集団外から同じ程度の遺伝子流動があるのではなく、その程度は集団によって異なり、集団外からの遺伝子流動の程度がその集団の消失と更新に影響を与えているという考え方 (Sork *et al.*, 1999) を取り入れたモデルの一つである。このモデルで実際の広域的な遺伝子流動を説明するためには、景観上に分布している個々の集団の現在の遺伝子流動を定量的に評価する必要性や (Sork *et al.*, 1999)、遺伝子を運ぶ花粉や種子の長距離散布と散布量の関係 (散布曲線もしくは散布関数) を正確に推定する必要性があると指摘されている (Cain *et al.*, 2000)。集団間の遺伝子流動が定量化され、そこに働いているメカニズム (例えば、散布関数) が明らかになることで、メタ個体群モデルの考え方を取り入れた多くのモデル (Harrison, 1991) のうち、実際の集団間の遺伝子流動を説明できるモデルが明らかになる (Cain *et al.*, 2000)。

現在の遺伝子流動を評価することや、遺伝子を運ぶ花粉や種子の散布関数を推定するには、分布域全体を研究対象として  $F_{ST}$  や  $Nm$  を用いて間接的に遺伝子流動を評価するのは適切ではない。なぜならば、先にのべたように、 $Nm$  は現在の遺伝子流動を反映しておらず、比較的短期間に集団が消失・更新を繰り返すような現実の集団の遺伝子流動を評価できないからである。現実の集団の遺伝子流動を把握するには景観に分布している個々の集団に焦点を当て、集団内における花粉や種子の動態を直接的に明らかにする必要がある。

花粉や種子を対象とした直接的な遺伝子流動の評価手法には花粉親鑑定、種子親鑑定、散布距離推定等が挙げられる。本節では過去の多くの研究が行われた花粉による遺伝子流動の研究について取り上げる。また、マツ属を含め、マツ属と同じ風媒の木本種の研究も取り上げてレビューを行う。

直接的なアプローチによる遺伝子流動の評価では花粉の散布距離の推定と調査区外から飛来する花粉の定量が同時に行われる手法 (Sork *et al.*, 1999) と、花粉散布距離の推定のみを行う手法がある (Smouse and Sork, 2004)。親識別法は前者の方法であり、子と親候補として選定された個体の遺伝情報から、ある子に対して統計的に最も可能性が高い親を特定する手法である (Jones *et al.*, 2010)。可能性が高い親を見つける統計的なアルゴリズムの違いと識別しにくい遺伝子流動 (cryptic gene flow) の扱い方の違いから単純排除法 (exclusion method、FAP ソフトウェア)、最尤法 (most-likely method、CERVUS ソフトウェア)、比例配分法 (fractional allocation method、PATRI ソフトウェア)、full probability parentage analysis method (MASTERBAYES ソフトウェア) などが開発されている。花粉親識別法を用いることによって、親候補として選定された個体の子に対する貢献を位置情報と合わせて数値化できるため、遺伝子流動の定量とともに花粉が飛来する方向や散布距離を推定することができる。通常、花粉の散布距離は父親として特定された個体 (繁殖成功した個体) と母親

(種子親) 個体の距離の平均値で求められる。調査区内に存在する全ての個体を親候補個体として識別し、それ以外の遺伝子型が検出された場合、調査区外からの遺伝子流動として判断される。

また、子個体と親個体の同定を完全にはせずに、花粉散布距離を推定する手法がある (Burczyk *et al.*, 1996, Smouse and Sork, 2004)。主なものとして TwoGener 法 (Austerlitz and Smouse, 2001) と Neighbourhood 法 (Burczyk *et al.*, 1996, 2002) が挙げられ、伝統的な親識別法と遺伝的構造分析を混合させた方法であるとされる (Smouse and Sork, 2004)。TwoGener 法は複数の母親からサンプリングした子集団の父親由来の遺伝子プール (花粉プール) の遺伝的構成の差から平均散布距離を算出する方法である。まず、親からサンプリングされた子集団の父由来の遺伝子プールの遺伝的構成の差を  $F$ -統計量と類似した  $\phi$ -統計量で評価する。次に、花粉の散布関数に正規分布もしくは指数分布を仮定し、 $\phi$ -統計量が散布関数から推定される平均散布距離の二乗に反比例することを利用して、散布距離を推定する。Neighbourhood 法では複数の母親からサンプリングした子集団の花粉プール及び調査区内の父親候補木を分析の対象としている。母親から得た子集団は自殖 (s)、任意に決めた近隣の特定されていない父親 (m)、それ以外 (1-s-m) で構成されるとする neighborhood model と花粉プールのデータから他殖率を最尤推定する mixed mating model (Ritland and El-Kassaby, 1985) をもとに、ある子孫の父親の繁殖成功する確率が母親との距離の関数で表されることを利用して、花粉散布距離を推定する。このとき、距離の算出は母親と父親候補木の距離を用いる。また、これら 2 つの手法で算出された花粉散布距離は有効散布距離という用語が用いられる。

花粉親識別法、TwoGener 法、Neighbourhood 法などを用いた風媒の木本種の遺伝子流動の研究は数多くある。どの手法を用いても、調査区の大きさや集団の距離的隔離の程度等の影響は受けるものの、花粉散布距離はどの種でも最大 100m 程度だと判断される (表-2.1[P30])。花粉親識別法を用いた場合、調査区や調査林分外からの花粉の飛来が認められている。例えば、マツ属の平均散布距離は、*P. densiflora* では 68m (Lian *et al.*, 2001)、24~75m (Iwaizumi *et al.*, 2010)、*P. flexilis* では 140m (Schuster and Mitton, 2000)、*P. sylvestris* では 48m (Robledo-Arnuncio and Gil, 2005) と推定されている。いずれの調査地も同樹種林分から 100m (Iwaizumi *et al.*, 2010) ~30km 以上 (Robledo-Arnuncio and Gil, 2005) 隔離されているが、調査区外からの遺伝子流動がそれぞれ、35%、64%、7%、4%と推定されている。また、TwoGener 法や Neighbourhood 法を用いた場合、*P. sylvestris* では有効散布距離は 17~29m (Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004b) と推定されている。表-2.1[P30]に示した研究の中で、Bittencourt and Sebbenn (2008) と Pakkad *et al.* (2008) は花粉親識別法 (最尤法) と TwoGener



法の両方で花粉散布距離を算出している。*A. angustifolia* では 102m (花粉親識別法) に対し、98m (TwoGener 法)、*Q. semiserrata* では 54m (花粉親識別法) に対し、81m (TwoGener 法) であった。このように、推定された花粉散布距離は推定方法によって大きく変わらないと判断される。

一方、近年、多型性の高い DNA マーカーを用いた遺伝子流動の解析手法が開発され、分析の解像度が向上してきたものの、集団間でどれくらいの花粉がやり取りされているかを定量化する試みはほとんどなされていない (e.g. O'Connell *et al.*, 2007, Bacles and Ennos, 2008)。その理由として、調査区をどのように設定しても、調査区外からの飛来が認められ、正確な遺伝子流動が把握できないこと (Smouse and Sork, 2004) や正確に親を特定するには高い多型性を持った分子マーカーを用いる必要があること (Marshall *et al.*, 1998, Nielsen *et al.*, 2001) が挙げられる。したがって、規模の大きな集団が分布するような調査地では親識別法を用いて広域的な遺伝子流動を詳細に明らかにすることは、分析の解像度が減少し、労力や分析コストが増大する (Sork *et al.*, 1998)。また、多くの集団が存在するような景観において、限られた個体を親候補木として選定して得られた遺伝子流動の結果には、年変動や微環境の影響が含まれており、その変動を検証するだけの再現性がある研究ができないので、親識別法を用いるのは適切ではないと指摘されている (Sork *et al.*, 1998)。

## 2. 4 残された課題

これまで述べてきた事柄を踏まえ、風媒風散布型木本種の広域的な遺伝子流動研究において残された課題は、

- 1) 花粉による広域的な遺伝子流動の評価
- 2) 花粉の散布関数の特定
- 3) 広域的に流動する花粉の定性的な評価
- 4) 種子による広域的な遺伝子流動の評価

の 4 つに集約することができる。これらの内容については以下に概説するが、本研究で取り組む二つの課題、「景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性」及び「長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響」はそれぞれ、3)、4) に含まれる。

## 花粉による広域的な遺伝子流動の評価

直接的なアプローチによって遺伝子流動を評価することで明らかになったことは、花粉の動態は非常に局所的であり、交配に関わる主な花粉は近隣の親由来であるということである (Pakkad *et al.*, 2008)。この指摘は花粉親識別法など分析手法が確立され、多くの研究者に使いやすいソフトウェアが頒布される前に Provan *et al.* (1998) や Dyer and Sork (2001) が cpDNA を用いた研究において示唆していたことと変わっていない。大きく変わったことは、長距離散布される花粉が定量化されたことである。分析の解像度がよくなり、長距離散布花粉が定量化される以前、Dyer and Sork (2001) は集団外から飛来する長距離散布花粉が集団の花粉プールに与える影響は集団内の花粉流動と比較して無視できるほど少ないだろうと指摘していた。しかしながら、その後の分析解像度の高い研究で花粉親識別法によって詳細な交配実態が明らかになり、調査区外から無視できない量の長距離散布花粉が飛来しているということが明らかになった。特に、分断化された集団においては集団外からの花粉が集団の遺伝的多様性に貢献していることが示されてきた (e.g. Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007, Pakkad *et al.*, 2008)。

長距離散布される花粉が検出されるようになったことで、景観内を流動する花粉が集団の遺伝的多様性にどのように寄与しているかが解決すべき新たな課題の一つになる。一般的に、花粉散布は風向きや地形の影響を受け、散布距離や散布方向は継時的に変化することが知られている (Schueler and Schluenzen, 2006)。また、景観内に分布する集団はメタ個体群の要素を持っていると指摘されていることから (Sork *et al.*, 1999, Cain *et al.*, 2000)、集団の立地環境によって飛来する集団外の花粉量は異なり、集団外花粉が集団の遺伝的多様性に与える影響も異なると想定される。成木が数本以下の *Picea glauca* 集団が散在する調査地では親候補が全て特定できるため、複数の隔離された集団で集団外からの花粉の影響が評価されている (O'Connell *et al.*, 2007)。11 集団を対象に集団外から飛来する花粉の割合をマルチローカス交配システムプログラム (MLTR, [Ritland, 2002]) で推定したところ、最小で 66%、最大で 100%であった。この知見は集団によって集団外から飛来する花粉の量には差があり、少なくとも種子に対する集団外花粉の貢献度は集団が置かれた立地環境の影響を受けていることを示唆している。

しかしながら、花粉親識別法を用いて調査区外や集団外から飛来する花粉を定量化する研究の多くは 1 つの調査区もしくは集団に存在する全親候補個体が識別できる場所で行われており、数多くの個体が存在する場所を対象としてこなかった (e.g. Dow and Ashley, 1996, Streiff *et al.*, 1999, Robledo-Arnuncio and Gil, 2005)。その理由は 2. 3 で述べたようにどんなに広く調査区を設定しても、区域外からの親の貢献があること、膨大な親候補個体をサ

ンプリングする必要があることなどから正確な遺伝子流動が把握できないからである。そのため、景観内に多くの親候補となる個体もしくは集団が存在する場合に、景観内を流動する花粉がどの程度飛来し、集団の遺伝的多様性にどの程度影響を与えているかについては評価されてこなかった。親識別法以外の方法で親候補個体が多く存在する調査地で複数の集団を対象として景観スケールで流動する花粉が集団の遺伝的多様性に与える影響を評価する手法が望まれる。

### 花粉の散布関数の特定

長距離散布される花粉が検出されるようになったことで、広域的な遺伝子流動を明らかにするのに必要な散布関数を特定することが解決すべき新たな課題の一つになる。集団内外を含めた花粉の全散布距離と散布量の関係を表す散布関数を特定することができれば、集団の環境条件（密度など）を加味して花粉の散布距離・散布量を推定することができる（Smouse and Sork, 2004）。そして、景観に分布するある集団に飛来する花粉がどの集団から散布され、どれくらいの量飛来するのかを明らかにすることもできると考えられる。

比較的短い距離については散布関数の推定がなされており、整合性が高い複数の関数が指摘されていた（e.g. Austerlitz *et al.*, 2004）。Streiff *et al.* (1999) は *Q. robur* と *Q. petraea* において花粉親識別法で同定された親の頻度と交配個体間の距離のヒストグラムは、負の指数分布もでる（negative exponential model）との整合性が高いことを示している。花粉親識別法から算出された平均花粉散布距離はそれぞれ 22.1m、43.6m であるのに対し、モデルから推定された平均花粉散布距離は 32.1m、32.9m であった。また、Robledo-Arnuncio and Gil (2005) は *P. sylvestris* において指数べき分布（two-parameter bivariate exponential-power function）との整合性、Pluess *et al.* (2009) は *Q. lobata* において指数べき分布（exponential power）、inverse power、ワイブル分布（Weibull functions）の3つとの整合性が高いことを明らかにしている。

一方、数百メートル以上の長距離の場合、精度の高い散布曲線を一つの関数では表すことは困難だと指摘されている（Savolainen *et al.*, 2007）。Goto *et al.* (2006) は短距離散布に適合する散布関数と長距離散布に適合する散布関数の二つを合わせた二成分混合正規分布もでる（two-component model）を提唱し、長距離散布には樹冠で働く上昇気流等の短距離の散布では考慮しない因子が関わってくるため、複数の集団を含むような広い範囲の遺伝子流動の研究と集団内の個体レベルの遺伝子流動の研究をつなぐための中間的なスケールの研究が必要であることを指摘している。

## 広域的に流動する花粉の定性的な評価

広域的な遺伝子流動に関して解決すべき課題のもう一つは景観スケールで流動する花粉の遺伝的構成や遺伝的多様性等の定性的な情報を明らかにすることである。島モデルのもとでは集団間でどれだけの遺伝子がやり取りされているのかが重要であった。しかしながら、実際の集団はメタ個体群モデルの要素を多く持っているため、遺伝子流動量を把握するだけでは不十分である。

Aldrich *et al.* (1998) 及び Aldrich and Hamrick (1998) は、熱帯地方に分布する *Symphonia globulifera* において、人為的に周囲の森林から分断化されて孤立した集団と、森林の中に分布して孤立していない集団における種子と花粉による遺伝子流動をマイクロサテライトマーカーを用いて推定した。その結果、集団外からの遺伝子流動は孤立集団が 89% ( $n=638$ )、孤立集団していない集団が 68% ( $n=50$ ) であることを明らかにした。また、孤立集団の実生の自殖率 (26%) は孤立していない集団 (6%) よりも高く、孤立集団の遺伝的多様性 ( $H_E=0.775$ ) は孤立していない集団 ( $H_E=0.837$ ) よりも低かった。さらに、 $F$ -統計量を用いて、孤立集団と孤立していない集団の遺伝的な差異を検出したところ、親間では有意差はなかったが ( $F_{ST}=0.091$ , n.s.)、実生間では有意差 ( $F_{ST}=0.270$ ,  $P<0.05$ ) が検出された。分断化された孤立集団において、集団外からの遺伝子流動が孤立していない集団よりも多いにも関わらず、実生の自殖率が高く、遺伝的多様性が低くなった理由として、集団外からの遺伝子プールに貢献する親数が少ない (遺伝的多様性が低い) ことを挙げている。この知見は広域的な遺伝子流動を評価する場合、景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性を評価することが必要であることを示唆している。流動する遺伝子の量が多くても、遺伝的な変異が低ければ、集団の遺伝的多様性は低下し、世代が経過すると集団の遺伝的分化が進む可能性がある。したがって、景観スケールで流動する花粉の流動量の評価とともに遺伝的多様性の評価も必要である。

過去の研究においても、景観スケールで流動する花粉の定性的な評価は重要であると認識されており、遺伝的変異を明らかにする試みがなされている (e.g. Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007, Pakkad *et al.*, 2008, Nielsen and Kjær, 2010)。しかしながら、いくつかのパラメーターを組み合わせ、間接的に判断している場合がほとんどである。また、この評価方法は、親候補となる個体が多く存在するような場所ではパラメーターが適切に算出されないため適用することができない。そのため、適用可能な対象は親候補となる個体が限られている極端に分断化された集団に限られている。

花粉プールの遺伝的な変異を間接的に評価するパラメーターとして、花粉プールに寄与している異なる親数を推定する有効花粉親数 (effective number of fathers、 $N_{ep}$ ) や最大交配

父性数 (maximum likelihood estimate of breeding male、 $MLE(N)$ )、さらに mixed mating model (Ritland, 1988) のもとで近親交配を評価するパラメーターである multilocus outcrossing rates ( $t_m$ )、biparental inbreeding ( $t_m-t_s$ ;  $t_s$ , single locus outcrossing rates の平均) が用いられている。 $N_{ep}$  は Starr (1984) によって数学的に定義された式にもとづき、自殖及び同じ親同士の交配が無視できる場合に、 $r_p$  (Ritland, 1988)、 $\phi_{FT}$  (Austeliz and Smouse, 2001)、 $F_{ij}$  (Loiselle *et al.*, 1995) などの近交係数の逆数として算出される。 $MLE(N)$ はベイズ推定による親分析の算出過程で推定される子集団に対して推定される父性集団の最大数で、 $N_{ep}$ とは意味が異なるパラメーターである (Nielsen *et al.*, 2001)。

これらのパラメーターを用いて、過去の研究では集団外からの花粉の遺伝的変異が高く、集団の遺伝的多様性に貢献していることを以下の共通した分析過程によって間接的に推定している。

- 1) 調査区において実生の花粉親識別を行い、調査区外からの花粉の飛来が相当量あることの確認。
- 2) 実生の遺伝子プールの  $t_m$  や  $t_m-t_s$  が低いことの確認。
- 3) 実生の父性アレルの遺伝的多様性のパラメーターや  $N_{ep}$  が集団サイズに依存していないか、もしくは天然林と同じであることの確認。

しかしながら、先に述べたように花粉の遺伝的変異の間接的評価は調査対象に制限がある。 $N_{ep}$  や  $MLE(N)$ は、集団に移入する花粉の遺伝的変異を近隣の集団から種子や実生に貢献する親数で把握することができる分かりやすいパラメーターであるが、 $N_{ep}$ は近交係数から算出されるので、近交係数が小さい場合、すなわち、集団間を流動する花粉に貢献する親数が多いと想定される場合 (例えば、分断化が進んでおらず、花粉散布個体が多く存在する場合等)、近交係数は負の値を示し、 $N_{ep}$ は算出されない (Ozawa *et al.*, 2012)。Hardy (2003) は算出される近交係数が低く、マイナスを示す場合、基準として選んだ遺伝子プール内 (全サンプリング個体) よりも、評価する花粉プール内の (任意に選んだ二つのアレルの) 方が近親関係は薄いことを示すと指摘している。実際に  $N_{ep}$  を算出している研究の多くが極端に分断化され、親候補となる個体が限られるような集団を調査対象としている (Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007, Pakkad *et al.*, 2008)。一方、 $MLE(N)$ は花粉親識別法の分析過程で特定された親と子の数から事前確率として推定される親個体数である。したがって、親と子が特定されなかった場合、 $MLE(N)$ は算出されない (Ozawa *et al.*, 2013)。親と子が特定できる場合は有効であるものの、親候補となる個体が多く存在

し、そのほとんどがサンプリングできない場合、親と子が特定できないため、MLE(N)は有効な指標にならない。さらに、 $N_{ep}$  と MLE(N)は両方とも「親数」を推定する定量的なパラメーターであり、広域的な遺伝子流動を明らかにする上で十分とは言えない。実際の集団ではどのような遺伝子が交換されるのかは、 $N_{ep}$  や MLE(N)では評価できない。

これらのことから、周囲に親候補となる個体もしくは同樹種集団が多く存在している場所でも広域的に流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成を把握できる手法が求められる。広域的に流動する花粉だけを捉え、その遺伝子プールの情報を明らかにすることで、散布源の同樹種林分の遺伝的背景と比較することができる。

### 種子による広域的な遺伝子流動の評価

種子は花粉よりもはるかに重量が重いため、散布距離が短いとされている (Okubo and Levin, 1989)。したがって、風散布型種子であっても、花粉と同様に散布されることは期待されていないと指摘されている (Ribbens *et al.*, 1994, Heuertz *et al.*, 2003)。実際に、ほとんどの種子は種子親の近隣に散布されることが観測されている (Willson, 1993, Clark *et al.*, 1999, Willson and Traveset, 2000, McEuen and Curran, 2004)。また、これらの実測データは遺伝情報を用いた解析手法で、母性マーカーの方が父性マーカーよりも強い空間的な遺伝構造を形成することで確かめられている (Latta *et al.*, 1998, Liepelt *et al.*, 2002)。

しかしながら、最近では、広域的な遺伝子流動の主役は花粉であるという考え方は単なるドグマ (dogma) だと指摘されるようになってきた (Hamrick, 2004, Bittencourt and Sebbenn, 2007)。つまり、花粉による遺伝子流動に比べ、種子による遺伝子流動の研究はあまり行われておらず、種子の移動能力が過小評価されていると指摘されている (Cain *et al.*, 2000, Sork and Smouse, 2006, Bohrer *et al.*, 2005, Nathan, 2006, Dick *et al.*, 2008)。Cain *et al.* (2000) は分断化された集団が分布している景観内では、種子はある集団から集団外に長距離散布され、その長距離散布種子が離れた別の集団に飛来することで集団と集団を遺伝的につなぐ役割「個体の交換 (exchange individuals)」や、攪乱等が行われた場合に攪乱跡地に種子を散布させることで集団を更新や拡大させる役割「生息適地への侵入・定着 (colonize empty)」を行っている」と指摘し、種子の長距離散布の重要性を主張している。このように、種子は花粉と同様に集団外からの遺伝子流動に関わる可能性があり、分布域の拡大や集団の更新の担い手でもあることから、景観に分布する集団が示すメタ個体群モデルの要素である集団の消失と更新に深く関わっていると考えられる。

近年、多型性の高い DNA マーカーを用いることで、風散布種子の長距離散布の事例が報告されるようになってきた (表-1.2[P14])。例えば、*Fraxinus excelsior* 集団において、定

着した実生のうち、最大53%が900haの調査区外から飛来していると推定されている (Bacles *et al.*, 2006)。 *P. densiflora* 集団において、シードトラップで採取した種子のうち、18~20%が100m以上離れた集団から飛来していると推定されている (Iwaizumi *et al.*, 2010)。また、離れた生息地の個体の遺伝情報を直接比較することによって、種子の長距離散布が示唆されている。 Dick *et al.* (2007) はアフリカと新熱帯 (南米、中米) の熱帯雨林に分布する *Ceiba pentandra* 個体のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) の ITS 領域と cpDNA の psbB-psbF 間の突然変異の比較を行い、風もしくは海流によりアフリカから新熱帯区に長距離散布された可能性があることを指摘している。

分子遺伝学的なアプローチのほかに、数学的なアプローチでも風散布種子が長距離散布されることが推定されている (Nathan and Muller-Landau, 2000, Nathan *et al.*, 2003)。 Nathan *et al.* (2003) は種子の長距離散布は花粉と比較すると、散布量が少ないので、花粉よりも発生確率が低い現象であり、長距離散布のテイル (tail) 部分を正確に予測することが難しいと指摘している。しかしながら、軽量の翼果であるマツ属などでは正確な散布曲線が推定されている。例えば、Higgins and Richardson (1999) は A three-component mixture of Weibull distributions を開発し、他研究の散布データとの適合性を検証し、 *P. pinaster* や *P. contorta* の種子のうち、0.1%程度が1~10kmまで散布される可能性があることを明らかにした。また、Nathan *et al.* (2001) は風速が地上からの高さによって変わることを考慮して種子の散布距離を推定する SEDFAL model に散布後の種子の落下過程を考慮したラグランジュ的手法 (Lagrangian approach) を加えたモデル (WINDISPER) を用いて、 *P. halepensis* 種子の信頼性が高い散布曲線を開発した。さらに、Nathan *et al.* (2002) は樹冠内部と上部に発生する乱流を考慮した The coupled Eulerian-Lagrangian model (CELC) を開発した。そして、落葉樹林 (樹高33m) に設置された高さ45mのタワーに沿って102個のシードトラップに回収された5種類の風散布樹木の種子のデータを用いて3次元の散布曲線を推定した。その結果、上昇気流がないと散布距離は100m程度であるが、3樹種 (*P. taeda*, *Liriodendron tulipifera*, *Liquidambar styraciflua*) では、上昇気流によって数%の種子が舞い上がり、散布源から数km以上離れた場所に散布されることを明らかにした。種子散布に関わる上昇気流の発生は樹冠の葉量のパラメーターである葉面積指数 (leaf-area index, LAI) が低下する秋の落葉期に発生しやすいことも明らかにされている (Nathan and Katul, 2005)。

また、長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響について、数学的なシミュレーションによって評価する試みがなされており、与える条件 (例えば、集団の消失確率や集団の遺伝的多様性の初期値) によって集団の遺伝的多様性に及ぼす影響が大きく変わることが示されている (Austerlitz and Garnier-Gere, 2003, Bohrer *et al.*, 2005)。

これらから風散布種子が高い移動能力を持ち、広域的に流動することで集団の遺伝的多様性の維持に貢献している可能性は十分にあると考えられる。実際の集団が示すメタ個体群的な動態を明らかにするために、種子による集団間の遺伝子流動の定量的な評価、長距離散布される種子の遺伝的多様性の評価や集団の遺伝的多様性に与える影響等について研究を行う必要がある。



表- 2. 1 風媒の樹木において推定された花粉散布距離と調査区外から調査区内に散布された花粉の割合

Table 2. 1 Estimated distance of pollen dispersal and proportion of immigrant pollen from outside the study plot to the plot in the anemophilous tree species

樹種 Species	花粉散布距離 推定法* Method for estimation of pollen dispersal distance*	推定された 花粉散布距離 Pollen dispersal distance (m)	調査区の面積 調査区外から調査区 内に散布された 花粉の割合 Area of study plot (ha)	調査区と同種 他集団との距離 Distance between the study plot and other conspecific population	調査区外から調査区 内に散布された 花粉の割合 Proportion of pollen dispersed from outside the study plot to the plot (%)		調査区と同種 他集団との距離 Distance between the study plot and other conspecific population		マーカー Marker	Number of loci	引用文献 Reference
					調査区外から調査区 内に散布された 花粉の割合 Proportion of pollen dispersed from outside the study plot to the plot (%)	調査区と同種 他集団との距離 Distance between the study plot and other conspecific population	調査区と同種 他集団との距離 Distance between the study plot and other conspecific population	マーカー Marker			
<i>Pinus densiflora</i>	E	68	9	—	31	—	SSR	3	Lian <i>et al.</i> (2001)		
<i>P. densiflora</i>	M	24-75	4	> 100 m	64	> 100 m	SSR	5	Iwaizumi <i>et al.</i> (2010)		
<i>P. sylvestris</i>	E	48	20	> 30 km	4	> 30 km	SSR	7	Robledo-Arnuncio & Gil (2005)		
<i>P. sylvestris</i>	T	17-29	254	continuous	—	continuous	SSR	3	Robledo-Arnuncio <i>et al.</i> (2004)b		
<i>P. flexilis</i>	E, M, F	140	15	> 2 km	7	> 2 km	Allozyme	12	Schuster & Mitton (2000)		
<i>Araucaria angustifolia</i>	M	102	14	continuous	54	continuous	SSR	8	Bittencourt & Sebbenn (2008)		
<i>A. angustifolia</i>	T	98	14	continuous	—	continuous	SSR	8	Bittencourt & Sebbenn (2008)		
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	M	129	20	—	29	—	SSR	5	Sato <i>et al.</i> (2006)		
<i>Ulmus glabra</i>	T	104	—	continuous	—	continuous	SSR	4	Nielsen & Kjær (2010)		
<i>Fagus crenata</i>	N	79	3	continuous	40	continuous	SSR	11	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> (2010)		
<i>F. crenata</i>	M	37	3	> 700 m	8	> 700 m	SSR	5	Hanaoka <i>et al.</i> (2007)		
<i>F. sylvatica</i>	N	38	—	continuous	68	continuous	SSR	11	Oddou-Muratorio <i>et al.</i> (2010)		
<i>Quercus lobata</i>	M	114	20	—	19	—	SSR	7	Pluess <i>et al.</i> (2009)		
<i>Q. lobata</i>	T	65	—	—	—	—	Allozyme	9	Sork <i>et al.</i> (2002)		
<i>Q. petraea</i>	E	44	6	continuous	69	continuous	SSR	6	Streiff <i>et al.</i> (1999)		
<i>Q. robur</i>	E	22	6	continuous	65	continuous	SSR	6	Streiff <i>et al.</i> (1999)		
<i>Q. salicina</i>	M	69	1	continuous	52	continuous	SSR	10	Nakanishi <i>et al.</i> (2008)		
<i>Q. semiserrata</i>	M	54	11	—	26	—	SSR	8	Pakkad <i>et al.</i> (2008)		
<i>Q. semiserrata</i>	T	81	11	—	—	—	SSR	8	Pakkad <i>et al.</i> (2008)		
<i>Q. macrocarpa</i>	E	78	5	> 100 m	71	> 100 m	SSR	3	Dow & Ashley (1996)		

\* E, 単純排斥法; M, 最尤法; F, 比例配分法; T, TwoGener法; N, Neighbourhood法

\* E, Exclusion method; M, Most-likely method; F, Fractional allocation method; T, TwoGener method; N, Neighbourhood method

### 第3章 アカマツ林分の分断化とその遺伝的多様性への影響

#### 3.1 はじめに

第1章で述べたように、近年、アカマツ林分は管理放棄やマツノザイセンチュウの被害によって急激に減少している。しかしながら、その分布の変化について十分に把握されているとはいいがたい。

一般に、管理が放棄されたアカマツ林分では遷移が進行し（只木, 1996）、アカマツ林—広葉樹混交林もしくは広葉樹林に変わることが知られている（山本, 2001）。また、マツノザイセンチュウによって集団的に枯死したアカマツ林分も、遷移が進行して広葉樹林に変わる（Fujihara, 1996）。したがって、調査対象の阿武隈山地においても、管理放棄されたアカマツ林分で、アカマツの立木密度が減少し広葉樹が侵入している林分や完全に広葉樹に移行した林分が存在するはずである。一般に、林分の状況は民有林では都道府県が管理する森林簿によって確認することができる。しかし、実際には放棄されたアカマツ林分であっても、森林簿上では依然として管理されたアカマツ林分として面積、位置、材積等が記載されており、その実態は不明である。

一方、マツノザイセンチュウによるアカマツの集団的な枯死については、被害量が統計資料として把握されており、福島県における1957～2010年のマツ枯れの累積被害量は面積1,025,778ha、材積1,604,994m<sup>3</sup>であるとされる（福島県農林水産部, 1955～2010）。しかし、この被害量は踏査され、伐倒・薬剤処理された林分のみについてのものであり、踏査されなかった被害林分は含まれない。そのため、統計資料として把握されている累積被害量は過小評価であり、実際にどれだけの林分が被害を受けているのかは把握されていない。

このようにアカマツ林分は急速に分断化されているものの、それが、どこで、どの程度進んでいるかという実態ははっきりしない。まして、分断化によって集団の遺伝的多様性がどのように変化しているのかについては、まったく不明である。そこで、景観内の遺伝子流動の特性を明らかにする前に、分断化が集団の遺伝的多様性にどのような影響を与えたかを、まず明らかにする必要がある。

そのため、3.2節では調査地におけるアカマツ林分に分断化の程度とその経緯を、土地利用図を利用して把握する。次いで、3.3節では3.2節で選定された集団において、親世代と子世代の遺伝的多様性を比較することで、親世代の分断化が子世代の遺伝的多様性にどれくらい影響を与えているかを評価する。本研究では親世代として集団の成木を評価対象とし、子世代の遺伝的多様性として集団に散布された種子集団（シードレイン）を評価対象とした。

### 3. 2 阿武隈山地におけるアカマツ林分の分断化の実態

#### 3. 2. 1 材料と方法

##### 調査地

阿武隈山地（福島県）の東斜面に 337°51'N、140°53'E、標高 68m 中心とし、南北約 5km、東西約 8.5km、標高差約 400m の方形区を設定し、調査地とした（図-1.1[P12]、図-3.1[P42]）。2004 年現在、アカマツ林分は主に調査地の西側に分布しており、スギ (*Cryptomeria japonica*) の人工林やコナラ (*Quercus serrata*)、クリ (*Castanea crenata*)、イロハモミジ (*Acer palmatum* var. *matsumurae*) などの落葉広葉樹で構成される二次林で分断化されている。また、調査地の東側に位置する集団は水田や果樹園、住宅時などで分断されている。

##### アカマツ林分の分布

調査地における過去の森林分布情報として、1974 年に撮影された 5 枚の航空写真（地図番号, NJ-54-22-1；整理番号, MTO743X；コース番号, C12；写真番号, 8~12, [国土交通省, 1974]）から、アカマツ林分、その他針葉樹林、広葉樹林を判読し、デジタル化した。デジタル化には、画像処理ソフト (Photoshop Element ver. 7.0 及び Illustrator CS4, Adobe Systems Inc.) を用いた。

最近の森林分布情報として、2002 年に作成された環境省自然環境保全基礎調査（環境省, 1973~）の 1/25,000 植生図「新地」（以下、植生図と呼ぶ）及び 2005 年度に作成された福島県磐城地域森林計画書森林簿を用いた。まず、植生図からアカマツ林分、その他針葉樹林、広葉樹林の範囲を抽出し、森林簿の森林基本図からアカマツ林の範囲を抽出し、それぞれ画像処理ソフトによってデジタル化した。次に、植生図から得たアカマツ林分の分布と森林簿から得たアカマツ林分の分布を比較し、両分布図で一致するものは正しい分布情報として取り扱い、一致しない場合は現地踏査を 2004 年に行い、正しい分布情報を取得した。これらの画像データから、調査地内のアカマツ以外の森林面積及びアカマツ林分の数と面積を画像解析ソフト Image J 1.44p (National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>) によって求めた。また、1974 年と 2004 年の 2 時期間におけるアカマツ林分の面積減少量を、森林以外の利用への転換（市街化）と他樹種への転換とに分けて算出した。

期間内のアカマツの林分間距離の変化を把握するために、調査地の中心に 2km の方形区を設置し、その中に分布する 30 年生以上の林分を森林簿に基づいて抽出した。そのうち、1974 年に存在し、2004 年に残存していた 8 林分 (pf1~8) を調査対象とした（図-3.1[P42]、

表-3.1[P44])。選定された調査林分は本章を含め第4章以降で使用する8林分(集団)であり、マツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクロン採種園(図-3.1[P42]において、SOで示されている)から半径2kmの円内に位置している。それぞれの林分から調査地内に分布する全林分までの最短距離(以後、林分間距離とする。)をImage J 1.44pを用いて計測した。

### 3. 2. 2 結果

森林面積は1974年の2,171haから2004年には2,038haになり、133ha(6%)減少した(図-3.1[P42], 表-3.2[P45])。アカマツ林分についてみると、1974年には612ha、103林分であったが、2004年には234ha、114林分となり、面積は378ha(1974年の62%)減少し、林分数は11増加した。また、アカマツ林分の平均面積は1974年の5.9haから2004年の2.0ha(1974年の34%)に減少した。アカマツ林分の減少要因は市街化によるものが122ha(減少した面積378haの32%)、他樹種に転換したものが256ha(68%)であった(図-3.2[P43], 表-3.2[P45])。また、他樹種に転換した全林分が広葉樹林への転換であった。

林分間距離は1974年の平均2,414mから2004年には平均2,441mになり、27m増加した(表-3.2[P45])。このうち林分間距離が1974年に比べて長くなった林分は5林分(pf1、pf3、pf4、pf5、pf7)、短くなった林分は3林分(pf2、pf6、pf8)であった。林分間距離が最も長くなったのはpf4で、140m(2,096mから2,236m)の増加であった。一方、林分間距離が最も短くなったのはpf6で117m(3,062mから2,946m)の減少であった。各林分から最も近い同樹種の林分までの距離(以後、最短林分間距離とする。)は1974年の平均154mから平均328mに174m増加した。最短林分間距離が最も増加した林分はpf7で、その増加量は471m(181mから653m)であり、増加量が最も少なかった林分はpf8で40m(144mから184m)であった。

### 3. 2. 3 考察

調査地では30年間森林面積はほとんど減少していなかった。この結果は、森林以外の用途への転換がほとんどなかったことを示している。わずかに市街化された地域は調査地の東側に多く、空中写真の判読から住宅用地や工業用地に転換されていると判断された。一般に、都市部近郊では1950年以降の高度成長期に農村部では収入を上げるために森林が伐採され、果樹園や商工業用地に転換されたため、急激に森林面積が減少した(Ichikawa *et al.*, 2006)。本調査地でも同様な理由から森林の市街化がなされたと考えられる。

一方、アカマツ林分の減少は大きかった。30年間に減少したアカマツ林分378haのうち、市街化された面積が32%(122ha)、広葉樹林に転換したことによる林分の消失が68%(256ha)

であることが明らかになった。これにより、アカマツ林分数は増加し、林分の平均面積が減少したことから、林分が細分化され、個々の林分の規模が大幅に減少し、最短林分間距離が増加したことが明らかになった。

アカマツ林分が広葉樹林に転換する場合、以下の3つの過程が考えられる。アカマツ林分の管理が放棄され、遷移が移行する場合（山本, 2001）、アカマツ林分がマツノザイセンチュウによって集団的に枯死し、遷移が移行する場合（Fujihara, 1996）及び木材、薪炭、きのこのホダ木を得るためにアカマツ林分を伐採し、広葉樹を植栽する場合である。福島県相馬郡新地町において、1974年から2004年までの間に行われた広葉樹造林の面積は13.61haであった（福島県農林水産部, 1955～2010）。このことから、調査地においてアカマツ林分を伐採して広葉樹を植栽することはほとんどなされていないとみなすことができる。したがって、広葉樹林へ転換したアカマツ林分の面積256haのほとんどが管理放棄やマツノザイセンチュウの被害によるものと考えられた。

本調査において、今まで把握されてこなかったアカマツ林分の分断化の状況を把握することができた。集団が細分化され、集団間距離が大きくなることは集団間でやり取りされる遺伝子を質的、量的に変化させる可能性があると考えられ（Young *et al.*, 1996）、景観の森林を構成する樹種が減少することは生物多様性の全てのレベルに影響を与えるとされる（長池, 2002）。そのため、分断化がアカマツの遺伝的多様性に与える影響を評価するとともに、今後の分断化の推移を継続して把握する必要がある。

### 3. 3 分断化が遺伝的多様性に与える影響

#### 3. 3. 1 材料と方法

##### 調査集団の状況

調査地内に設定した 8 集団（林分）（図-3.1[P42]）に、2004 年に 225m<sup>2</sup>（15m×15m）の方形区を 1ha あたり 4 個の密度で、1 集団あたり 1~15 個設置し（表-3.1[P44]）、方形区内のアカマツ成木の樹高、胸高直径、本数を数えた。なお、各方形区はそれぞれ 20m 以上離して設置した。そして、以下に従って集団サイズ（立木本数、PS）を算出した。

$$PS \text{ (trees)} = (n/0.0225) \times PA \text{ (ha)}$$

ここで、 $n$  は当該集団におけるアカマツ成木数の方形区の平均、 $PA$  は 3. 2 で求めた集団（林分）の面積である。

調査集団において、管理放棄やマツノザイセンチュウによる集団的な枯死が発生している場合、健全林に比べて立木密度は減少すると考えられる。分断化が遺伝的多様性に与える影響を評価するためには、全調査集団が同じ立木密度のもとで生育していることを確かめる必要がある。そのため、立木本数と面積の関係についてスピアマンの順位相関係数を算出して有意性を検定した。検定には StatView ver. 5.0（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いた。

##### DNA 分析のためのサンプリング

集団内の成木の遺伝的な背景を把握するため、集団の全区域から相互に 15m 以上離れた成木をランダムに 30~60 個体選定し、針葉を採取した。また、典型的なシードレインを得るために、2004 年の 9 月から 12 月までの間、上記「調査集団の状況」において各集団に設置した方形区の中心にシードトラップを設置し、種子を採取した。各シートラップから得た種子を集団ごとに混合し、その中からランダムに約 70 種子を抽出し、シードレインの胚、父性アレル、母性アレルの遺伝的多様性を把握するための DNA 分析に供した。

##### DNA 抽出および PCR

採取したサンプルからの DNA 抽出法と PCR 法については付録-1[P137]に示した。また、PCR には 8 つのマイクロサテライト（simple sequence repeat, SSR）の遺伝子座、pdms009（Watanabe *et al.*, 2006）、pde14（Lian *et al.*, 2001）、bcpd502（Isoda and Watanabe, 未発表）、bcpd006（Goto *et al.*, 2005）、bcpd222（Isoda and Watanabe, 未発表）、pdms011（Watanabe *et*

al., 2006)、bcpt703 (Isoda and Watanabe, 未発表)、bcpt834 (Isoda and Watanabe, 未発表) を用いた。シードレインの父性アレルは胚のアレル ( $2n$ ) から母親から受け継がれた胚乳のアレル ( $n$ ) を差し引くことで特定した。例えば、胚が A と B のアレルを持ち、胚乳が B のアレルを持っていた場合、A が父親から受け継いだアレルと判断される。統計分析に供したサンプル数は、表-3.5[P48]に示すとおり、成木では各集団 29~53 個体で計 306 個体、シードレインでは各集団の胚、父性アレル、母性アレルとも 55~60 サンプルで合計 458 種子ある。

### 統計分析

8 つのマイクロサテライトの遺伝子座の多型性を、検出された対立遺伝子の数 ( $A$ )、対立遺伝子多様度 (アレリックリッチネス、 $R$ 、[El Mousadik and Petit, 1996])、ヘテロ接合度の観察値 ( $H_O$ )、Nei の遺伝子多様度 ( $H_E$ 、[Nei, 1987]) の 4 パラメーター及び排斥確率 (The exclusion probability of the first parent, EP1) により評価した。これらのパラメーターは統計分析に用いた集団の成木 306 個体およびシードレイン 458 種子の合計 764 サンプルの遺伝子型をもとに算出した。

8 つの調査集団間の遺伝的分化の程度を評価するために、固定指数 ( $F_{ST}$ ) を算出し、Hardy-Weinberg 平衡からの有意なずれの検出をボンフェローニ補正のもとで行った (1,000 ランダムイゼーション、 $P < 0.05$ )。次いで、各集団における、成木及びシードレインの遺伝的多様性は、 $R$ 、 $H_E$  及び集団固有の対立遺伝子の多様度 (プライベートアレリックリッチネス、 $PR$ 、[Kalinowski, 2004]) の 3 パラメーターにより評価した。なお、シードレインについては、胚、母性アレル、父性アレルのそれぞれについて、各パラメーターを求めた。成木とシードレインの遺伝的多様性の差を比較するために、 $R$  及び  $PR$  は集団の成木の最小の遺伝子数である 58 遺伝子に調整して算出した。

各パラメーターの成木、胚、母性アレル、父性アレル間 (サンプル間という) の有意差をマン・ホイットニ検定により、集団ごとに分析した。さらに、8 つの集団をまとめた時のサンプル間のパラメーターの有意差を分散分析 (analysis of variance, ANOVA) により検定した。これらの検定はボンフェローニ補正のもとで行った ( $P < 0.05$ )。

さらに、成木と胚の固定指数 ( $F_{IS}$ ) を算出し、ボンフェローニ補正のもとでハーディ・ワインベルグ平衡からの有意なずれの検出を行った。

最後に、分断化が集団の遺伝的多様性に与える影響を評価するために集団の規模 (すなわち、面積 [PA] 及び立木本数 [PS] の対数) と各サンプルの遺伝的多様性のパラメーターの相関関係についてスピアマン順位相関係数分析によって検定した ( $P < 0.05$ )。

これら遺伝的パラメーターの算出や統計分析に使用したソフトウェア及び引用文献は付表-1[P136]に示した。

### 3. 3. 2 結果

#### 調査集団の状況

得られた調査集団の概要を表-3.1[P44]に示す。対象とした 8 つのアカマツ集団の平均樹高は、最小が pf5 と pf8 の 13m、最大は pf1 の 22m、平均胸高直径 (DBH) は、最小が pf4 と pf7 の 19cm、最大は pf2 の 37cm、面積は、最小が pf2 の 0.3ha、最大は pf3 の 3.7ha であった。また、集団の立木本数は最小が pf2 の 179 本、最大は pf4 の 2,956 本であった。面積と立木本数の間には有意な相関関係が検出された (スピアマンの順位相関係数、 $\rho=0.802$ 、 $P<0.05$ )。

#### マイクロサテライトの多型性

用いた 8 つのマイクロサテライトマーカー遺伝子座の多型性の指標を、表-3.3[P46]に示す。A は、最小が bcpd222 の 17、最大は bcpd006 の 38、R は最小が bcpd222 の 10.4、最大は bcpd502 の 19.2 であった。また、 $H_o$  は、最小が bcpt703 の 0.765、最大は bcpd006 の 0.916、平均 0.837、 $H_E$  は、最小が bcpt703 の 0.805、最大は bcpt502 の 0.930、平均 0.866 であった。EP1 は 8 つの遺伝子座全体で 0.9996 であった。

#### 集団の遺伝的多様性

集団の集団間分化の程度の指標である  $F_{ST}$  は、pf2 と pf3 (0.0014)、pf2 と pf4 (0.0007) の間でのみ有意差 ( $P<0.05$ ) が認められたが、その程度は大きくなかった (表-3.4[P47])。8 つの集団の遺伝的多様性については、R は母性アレルの 10.03 (pf6) が最小であり、成木の 14.83 (pf6) が最大、PR の最小は 0 で、この値は成木、胚、母性アレル、父性アレルのそれぞれに存在した。また、PR の最大は成木の 0.26 (pf4) であった (表-3.5[P48])。  $H_E$  は母性アレルの 0.834 (pf8) が最小であり、父性アレルの 0.887 (pf1) が最大であった。集団毎にサンプル間 (成木、胚、母性アレル、父性アレル) の遺伝的多様性パラメーター R、 $H_E$ 、PR の比較を行ったところ、いずれも有意な差は検出されなかった。8 集団の平均値は、R は成木で 14.05、胚で 13.71、父性アレルで 12.98 であり、これらは母性アレルの値 (11.20) よりも有意に高かった (各々、 $P<0.05$ )。PR は、成木で 0.14、父性アレルで 0.06 であり、これらは胚 (0.03) と母性アレル (0.04) よりも有意に高かった (各々、 $P<0.05$ )。  $H_E$  は、成木で 0.863、胚で 0.867、母性アレルで 0.856、父性アレルで 0.871 であり、これらの値は



サンプル間で有意な差は認められなかった。また、成木と胚の  $F_{IS}$  値には 0 からの有意な隔たりは認められなかった。

### 分断化がアカマツ集団の遺伝的多様性に与える影響

集団の規模（面積と立木本数）と集団の遺伝的多様性のパラメーター（ $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ ）との間には有意な相関は認められなかった（表-3.5[P48]）。面積と遺伝的多様性のパラメーターとのスピアマンの順位相関係数の最小値と最大値は以下のようであった。 $R$  の最小は母性アレルで  $\rho = -0.138$ 、最大は成木の  $\rho = 0.024$ 、 $PR$  の最小は母性アレルで  $\rho = -0.212$ 、最大は成木の  $\rho = 0.067$ 、 $H_E$  の最小は父性アレルで  $\rho = -0.093$ 、最大は成木で  $\rho = 0.091$  であった。また、立木本数と遺伝的多様性のパラメーターとのスピアマンの順位相関係数の最小値と最大値は以下のようであった。 $R$  の最小は母性アレルで  $\rho = -0.026$ 、最大は胚の  $\rho = 0.027$ 、 $PR$  の最小は母性アレルで  $\rho = -0.072$ 、最大は父性アレルの  $\rho = 0.125$ 、 $H_E$  の最小は父性アレルで  $\rho = -0.043$ 、最大は成木で  $\rho = 0.041$  であった。

### 3. 3. 3 考察

集団の面積と立木本数の間に有意な相関が認められたことから、8 つの調査集団において極端な立木密度の減少はないと判断される。

調査集団の遺伝的多様性の評価に用いた 8 つの遺伝子座は、他の研究において広域的に分布する *P. densiflora*（アカマツ）の遺伝的多様性の評価に用いられていることから（Iwaizumi *et al.*, 2013b）、表-3.3[P46]で示された遺伝子座の多型性は本研究でアカマツ集団の遺伝的多様性を評価するのに十分な能力を持つと判断される。

これらの遺伝子座を用いて集団間の遺伝的分化の程度を評価したところ、集団間の遺伝的分化の程度は小さいことから、調査集団は遺伝的にほぼ均質な集団であると判断される。また、調査 8 集団の成木とシードレイン（胚、父性アレル、母性アレル）の遺伝的多様性は  $H_E = 0.834 \sim 0.887$  の範囲であった。人為的攪乱がほとんどなく保護されたアカマツ集団の遺伝的多様性を 5 つのマイクロサテライトマーカーで評価した研究では、成木では  $H_E = 0.898$ （Iwaizumi *et al.*, 2007）、0.915（Lian *et al.*, 2001）、また、日本全国に分布しているアカマツ天然林 62 集団の遺伝的多様性を本節で用いた遺伝子座と同じ 8 つのマイクロサテライトマーカーで評価した研究では、 $H_E = 0.805 \sim 0.894$  と推定されている（Iwaizumi *et al.*, 2013b）。シードレインの遺伝的多様性は人為的攪乱がほとんどなく保護されたアカマツ集団内では母性アレルで  $H_E = 0.861 \sim 0.873$ 、父性アレルで  $H_E = 0.855 \sim 0.876$ （Iwaizumi *et al.*, 2010）と推定されている。これらの知見から、本調査における 8 集団の遺伝的多様性（ $H_E = 0.834 \sim 0.887$ ）

は他の研究で明らかにされた保護されたアカマツ林や天然のアカマツ林の遺伝的多様性と差がないと判断される。

親世代（成木）と子世代（シードレイン）の遺伝的多様性は、集団毎では有意差は検出されず、集団をプールした全サンプルで比較した場合でも明確な有意差は検出されなかった。また、調査集団の面積と立木本数は集団の遺伝的多様性のパラメーター（ $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ ）のいずれとも有意な相関が検出されなかった。これらの結果はアカマツ林分の分断化が進行し、最短林分間距離が 154m から 328m に増加し、林分面積が合計で 612ha から 234ha、個々の集団で平均 5.9ha から 2.0ha に減少したにも関わらず（3. 2節）、調査したどの集団でも親世代の遺伝的多様性の高さが子世代で維持されていることを示している。また、子世代は任意交配集団とみなすことができるので（ $F_{IS}=0.007\sim 0.074$ ）、親の遺伝子は十分な遺伝子流動を経て集団内に散布されていると判断することができる。

親世代と子世代の胚、父性アレル、母性アレルとも遺伝的多様性が集団毎で有意差が検出されなかったことは親世代が持っている遺伝子の豊富さが極端に片親に偏らずに、父方と母方の両方から子世代に受け継がれていることを示唆している。一方、集団をプールした全サンプルで比較した場合に、母性アレルの  $R$  が有意に親世代や父性アレルよりも低かったことから、母性アレルが成木から受け継ぐ遺伝的多様性は父性アレルと比べると低いことを示している。したがって、親世代が持っている遺伝子の豊富さがわずかに父親に偏って受け継がれていると判断することができる。親の遺伝子が子世代に伝わる際に、父性アレルは花粉によって十分に流動し、母性アレルも種子によって花粉と同程度に流動していることが示唆される。

結論として、集団の規模に関わらず集団は高い遺伝的多様性を維持しており、1974年から2004年にかけてのアカマツ集団の分断化は集団の遺伝的多様性に影響を与えていないと判断される。

### 3. 4 まとめ

現在、森林管理者にとって、アカマツ林分の減少の経過が把握できる方法は伐採された林分面積とマツノザイセンチュウによる被害量のみである（福島県農林水産部，1955～2010）。管理放棄されたアカマツ林分やその後に遷移が推移した林分は把握されていない。そして、マツノザイセンチュウによる被害量も全量が把握されているのではなく、踏査され、伐倒、薬剤処理されていない枯死集団は含まれていない。このことから、行政資料からアカマツ林分の減少の経過を把握することはできず、変化しつつある林分の正確な管理がなされていない。また、過去の研究でも、アカマツ林分の減少の経過を明らかにしたものはなく、マツノザイセンチュウによる集団的な枯死と環境要因の関係（Kishi, 1999）や集団的な枯死後の二次遷移（達・大沢, 1992）に関するものが多い。したがって、本研究で初めてアカマツの分断化の経過について明らかにされたことになる。

1974年に存在し、2004年時点で消失せずに存在している8調査集団に遺伝的な差は検出されず、成木の遺伝的多様性（ $H_E=0.863$ ）は保護されたアカマツ林や天然のアカマツ林と同じ程度（ $H_E=0.873$ 、Iwaizumi *et al.*, 2013b）であり、任意交配集団とみなすことができた（ $F_{IS}=0$ とみなすことができる）。これらの結果から、1974年以前に存在していたアカマツ集団は高い遺伝的多様性を持っていたことが示唆される。調査地は阿武隈山地に位置し、主に明治時代以降に放棄された放牧地に分布域を拡大したと考えられることから（第1章）、この地に侵入・定着した集団が高い遺伝的多様性を持っていたことが示唆される。

調査地において、30年間の間に森林面積はほとんど減少していなかったものの、アカマツ林分の減少は大きかった。1974年に612haあった林分面積は2004年には234ha、1974年の38%に減少した。減少した面積378haのうち、市街化によるものが32%、広葉樹に転換したことによるものが68%であったので、アカマツ林分の分断化の多くが森林内で発生していることが明らかになった。分断化によって、アカマツの林分面積は平均5.9haから2.0haに減少し、最短林分間距離は154mから328mに174m増加した。これらの結果から、1974年よりも2004年の方が各林分の規模が減少し、近隣林分までの距離が離れたので、交配時に集団外に散布される花粉量や集団外から集団内に飛来する花粉量が減少していることが予想され、集団間の遺伝的なつながりに何らかの影響が及んでいることが予想された。

しかしながら、8調査集団のシードレインの遺伝的多様性（ $H_E=0.867$ ）は親世代である成木と同様に保護されたアカマツ林や天然のアカマツ林（e.g.  $H_E=0.873$ 、Iwaizumi *et al.*, 2013b）と同じ程度であり、任意交配集団であると判断された（ $F_{IS}=0$ とみなせる）。また、シードレインの遺伝的多様性は集団の規模と有意な相関関係は検出されなかったことから、規模が小さい集団でも成木と同程度の遺伝的多様性を持った種子集団が散布されているこ

とを示している。これらの結果から、1974年から2004年の分断化は集団の次世代の遺伝的多様性に影響を与えていないと判断された。また、分断化が進んだとしても、アカマツ集団は高い遺伝的多様性を持った子孫を作れる機構を持っていることが示唆された。

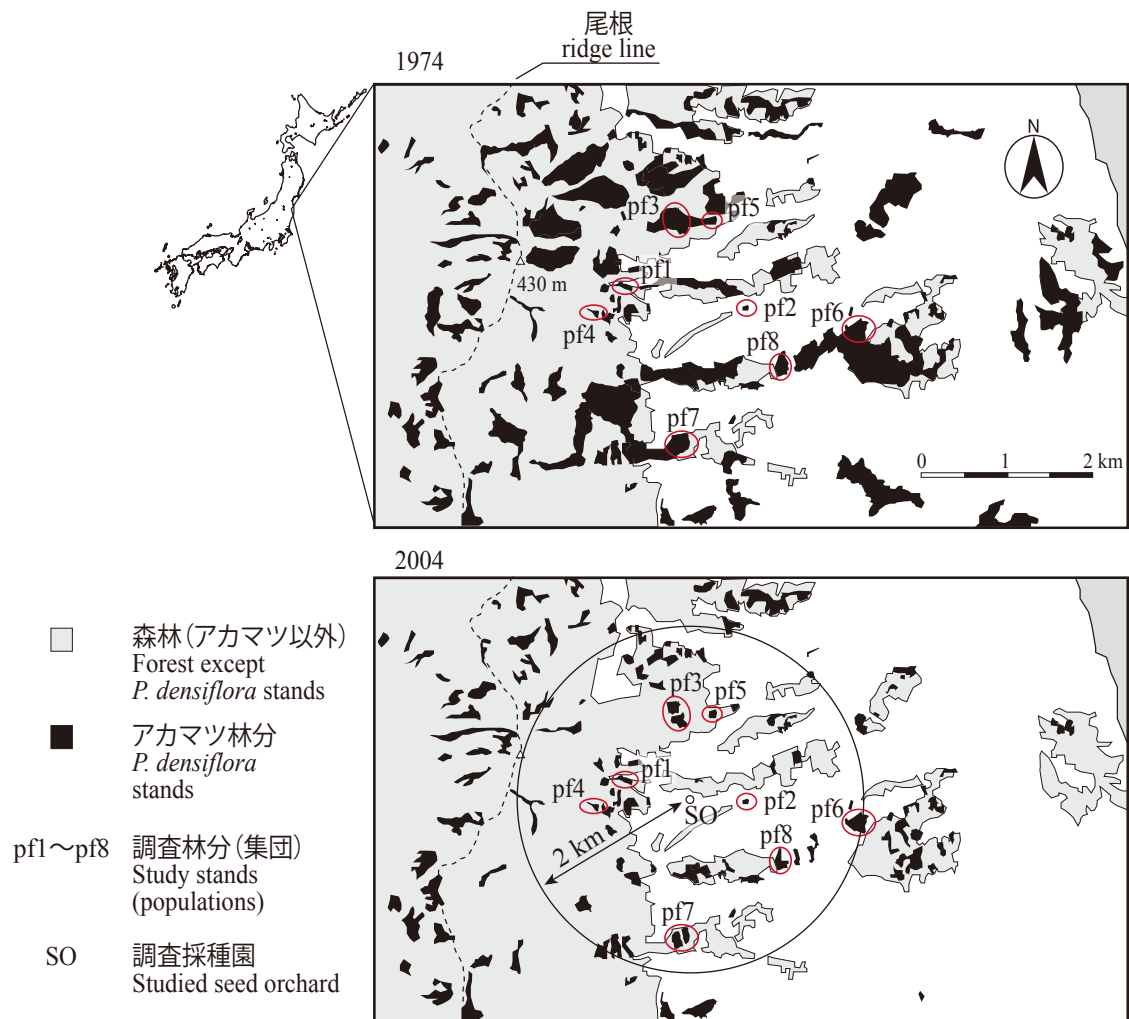
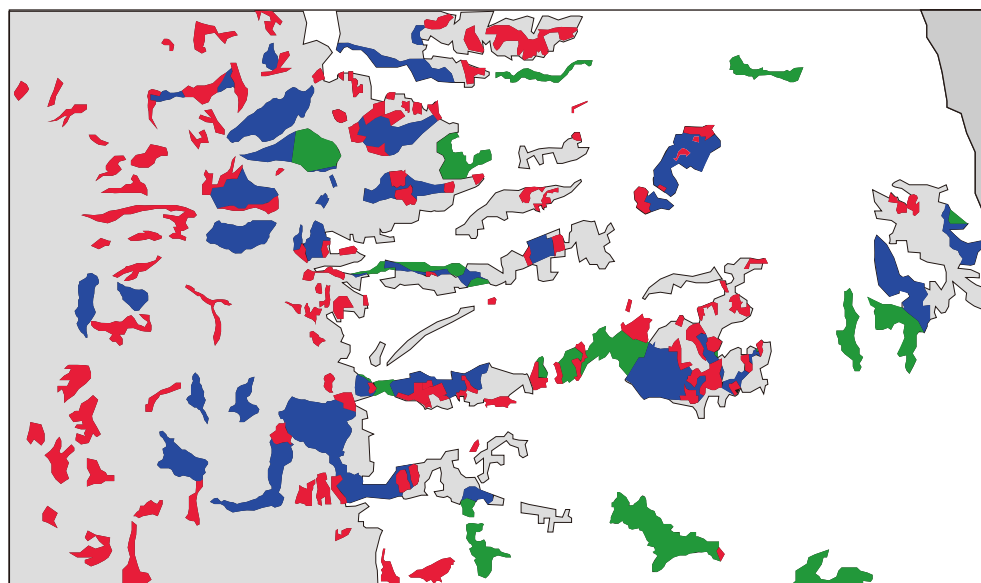


図 - 3.1 調査地における 1974 年、2004 年の森林分布および調査林分 (集団) \*

\* , マツノサイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園 (以下、採種園) を中心に半径 2 km の円内から、1974 年から継続して存在した 8 林分を選定した。

Fig. 3. 1 Distribution of forested land in 1974 and in 2004, and study stands (populations) in study area

\* , Eight stands persisted from 1974 were selected within the circle of 2 km radius from the nematode-resistant *P. densiflora* clonal seed orchard.



- 2004年に残存していた林分  
Stands persisted till 2004
- 市街化により消失した林分  
Lost stands caused from urbanization
- 他樹種集団に転換した林分  
Stands converted to other tree species

図 - 3.2 調査地における 1974 年から 2004 年のアカマツ林分の変化

Fig. 3.2 Conversion of *P. densiflora* stands from 1974 to 2004 in study area

表- 3. 1 調査した8つのアカマツ林分(集団)の概要

Table 3. 1 Profiles of 8 studied *P. densiflora* stands (populations)

林分(集団)	面積	立木本数	平均樹高 (m±SD)	平均胸高直径 (cm±SD)	海拔高	設置した 方形区数	調査採種園 までの距離
Stand (Population)	Area (ha)	The number of trees	Mean height of trees (m±SD)	Mean DBH of trees (cm±SD)	Altitude (m)	The number of plots set in each stand	Distance to the seed orchard studied (m)
pf 1	1.3	847	22 ± 6	28 ± 7	106	5	245
pf 2	0.3	179	15 ± 2	37 ± 9	56	1	504
pf 3	3.7	2,660	17 ± 3	33 ± 8	97	15	388
pf 4	2.7	2,956	15 ± 2	19 ± 6	146	11	154
pf 5	1.1	700	13 ± 3	25 ± 14	81	4	279
pf 6	3.3	2,761	16 ± 2	26 ± 6	57	13	212
pf 7	2.0	607	16 ± 2	19 ± 4	48	8	635
pf 8	2.0	1,993	13 ± 1	21 ± 6	54	8	169

表- 3. 2 調査地における1974年と2004年の森林の分布状態  
Table 3. 2 Status of forest distribution in the study area at 1974 and 2004

森林面積 Forested area (ha)	指標 Indexes	調査年 Year of survey		増減 Increase or decrease
		1974	2004	
全体 Total		2,171	2,038	-133
うちアカマツ林 <i>P. densiflora</i> stand of the total		612	234	-378
1974年から2004年にかけての アカマツ林から他の土地利用への 転換 Conversion of <i>P. densiflora</i> stand to other land use from 1974 to 2004	市街化 Urbanization 広葉樹へ転換 Conversion to broad-leaved tree species 針葉樹へ転換 Conversion to conifer species		122 256 0	
アカマツ林分の 分布状態 Status of <i>P. densiflora</i> stands distribution	林分数 The number of stands	103	114	-11
	林分面積の平均 (ha±SD) Mean area of the stands	5.9 ± 9.5	2.0 ± 1.7	-4
	調査林分 <sup>*</sup> から調査地内の 全アカマツ林分までの距離 Distance between a study stand and other <i>P. densiflora</i> stands within the study area <sup>*</sup>			
	平均林分間距離 (m±SD) Mean distance			
	pf1	2,024 ± 1,107	2,126 ± 993	101
	pf2	2,343 ± 992	2,311 ± 980	-32
	pf3	2,131 ± 1,108	2,200 ± 1,024	70
	pf4	2,096 ± 1,174	2,236 ± 1,056	140
	pf5	2,223 ± 1,100	2,266 ± 1,031	43
	pf6	3,062 ± 1,351	2,946 ± 1,474	-117
	pf7	2,745 ± 1,119	2,811 ± 1,049	67
	pf8	2,685 ± 1,099	2,630 ± 1,139	-56
	mean	2,414 ± 1,183	2,441 ± 1,137	27
	最短林分間距離 (m) The shortest distance			
	pf1	123	217	93
	pf2	168	511	343
	pf3	296	395	99
	pf4	77	170	93
	pf5	70	269	199
	pf6	169	224	56
	pf7	181	653	471
	pf8	144	184	40
	mean	154	328	174

\* 図- 3. 1に調査林分の調査地での位置を示した。  
\* Location of study stands in the study area were shown in Fig. 3. 1.



表- 3. 3. 8つのマイクロサテライトマーカーの多型性<sup>1)</sup>

Table 3.3 Polymorphism of 8 microsatellite markers

遺伝子座	遺伝子座あたりの アレル数	アレルリッ ク リッチネス <sup>2)</sup>	ヘテロ接合度の 観察値	遺伝子多様度	排斥確率
Locus	The number of detected alleles per locus	Allelic richness	Observed heterozygosity	Nei's unbiased gene diversity	Exclusion probability of the first parent
	A	R	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	EPI
pdms009	31	18.9	0.893	0.898	0.689
pde14	29	15.0	0.848	0.885	0.647
bcpd502	32	19.2	0.914	0.930	0.763
bcpd006	38	18.5	0.916	0.912	0.713
bcpd222	17	10.4	0.815	0.841	0.533
pdms011	21	10.6	0.774	0.841	0.537
bcpt703	25	13.1	0.765	0.805	0.495
bcpt834	25	10.9	0.768	0.813	0.478
平均	-	-	0.837	0.866	-
Mean	-	-	0.837	0.866	-
遺伝子座全体	-	-	-	-	0.9996
All loci	-	-	-	-	0.9996

1) 764サンプル(成木306本、シードレイン458種子)をもとに算出した。

2) 58遺伝子に補正した。

1) Polymorphism was calculated from 764 samples (Mature tree, 306 trees; Seed rain, 458 seeds).

2) Adjusted to the sample of 58 genes.

表- 3. 4 調査集団の集団間分化の程度 ( $F_{ST}$ )

Table 3. 4 Genetic differentiation between study populations estimated by  $F_{ST}$

調査集団 Population	pf1	pf2	pf3	pf4	pf5	pf6	pf7	pf8
pf 1	-							
pf 2	0.006	-						
pf 3	0.006	0.014*	-					
pf 4	-0.002	0.007*	0.001	-				
pf 5	0.002	0.007	0.005	0.003	-			
pf 6	-0.001	0.006	0.003	0.001	0.000	-		
pf 7	0.000	0.006	0.003	-0.001	-0.003	0.000	-	
pf 8	-0.002	0.003	0.005	0.001	-0.003	-0.003	0.002	-

\*、ボンフェローニ補正の下で1,000回のランダム推定を行ったときに  $P < 0.05$  で有意であることを示す。

\*, Significant at  $P < 0.05$  based on 1,000 permutations with Bonferroni correction.

表-3.5 調査集団の成木およびシードレインの遺伝的多様性及び遺伝的多様性と集団の規模の相関関係

Table 3.5 Genetic diversity of mature trees and seed rain collected in the studied populations and correlation between genetic diversity and scale of population

調査集団 Study population	成木 Mature tree						シードレイン Seed rain											
	胚 Embryo			母性アレル Maternal allele			胚 Embryo			父性アレル Paternal allele								
	N	R	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	R	PR	H <sub>E</sub>	R	PR	H <sub>E</sub>	R	PR	H <sub>E</sub>			
遺伝的多様性 Genetic diversity																		
pf 1	53	14.14	0.21	0.865	0.034	0.865	0.034	57	14.26	0.06	0.884	0.007	11.95	0.11	0.871	13.44	0.08	0.887
pf 2	33	13.75	0.25	0.849	0.037	0.849	0.037	55	14.13	0.06	0.869	0.054	11.69	0.09	0.862	13.45	0.10	0.867
pf 3	37	14.35	0.12	0.869	0.001	0.869	0.001	58	13.59	0.05	0.866	0.074	10.53	0.05	0.846	13.26	0.12	0.876
pf 4	38	13.72	0.26	0.859	0.008	0.859	0.008	55	14.74	0.03	0.876	0.009	12.35	0.05	0.864	13.85	0.06	0.882
pf 5	32	14.04	0	0.856	0.038	0.856	0.038	57	13.76	0.04	0.867	0.044	11.11	0.01	0.854	13.26	0.10	0.881
pf 6	45	14.83	0.10	0.879	0.021	0.879	0.021	60	12.58	0	0.862	0.034	10.03	0	0.866	11.75	0	0.842
pf 7	29	13.75	0.04	0.868	0.032	0.868	0.032	58	13.15	0	0.863	0.013	10.52	0.02	0.851	12.35	0	0.861
pf 8	39	13.80	0.11	0.859	0.053	0.859	0.053	58	13.46	0.02	0.854	0.018	11.42	0.01	0.834	12.46	0.05	0.869
total	306							458										
mean		14.05 <sup>a</sup>	0.14 <sup>a</sup>	0.863		0.863			13.71 <sup>a</sup>	0.03 <sup>b</sup>	0.867		11.20 <sup>b</sup>	0.04 <sup>b</sup>	0.856	12.98 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.871
遺伝的多様性と集団 の規模の相関関係 Correlation between genetic diversity and scale of population		0.024	0.067	0.091		0.091			-0.044	-0.105	-0.076		-0.138	-0.212	-0.045	-0.083	-0.013	-0.093
面積 Area (ha)																		
立木本数 Size (trees)		0.022	0.084	0.041		0.041			0.027	-0.013	-0.033		-0.026	-0.072	0.012	-0.004	0.125	-0.043

N, 供試サンプル数; R, 平均アレリックリッチネス; PR, 平均プライベートアレリックリッチネス; H<sub>E</sub>, 平均遺伝子多様度; F<sub>IS</sub>, 固定指数。RとPRはサンプル数を58に調整して算出した。各サンプルにおいて、全集団をプールしたパラメーター (PR, R and H<sub>E</sub>) 間差の有意性はボンフェローニ補正の上、分散分析 (ANOVA) によって検定した (P < 0.05)。また、各サンプルの集団ごとのパラメーター (PR, R and H<sub>E</sub>) 間差の有意性はボンフェローニ補正の上、マン・ホイットニ検定によって検定した (P < 0.05)。数字の肩に記したアルファベットが異なる場合、同一の指標において分析対象間に有意差がある。F<sub>IS</sub>値の有意性 (有意にゼロから離れているかどうか) は、1,000回のランダムマイゼーションによって検定した (P < 0.05)。集団の面積あるいは立木本数の自然対数と遺伝的多様性の相関関係の有意性はボンフェローニ補正の上、スピアマンの順位相関分析によって行なった (P < 0.05)。\*は有意な相関関係があることを示す。

N, Number of sample; R, mean allelic richness; PR, mean private allelic richness; H<sub>E</sub>, mean Nei's unbiased gene diversity; F<sub>IS</sub>, fixation index. R and PR values adjusted to a sample of 58 genes. Significant difference in parameters (PR, R and H<sub>E</sub>) of all populations between the samples was tested by ANOVA with Bonferroni correction (P < 0.05) and significant difference of each population between samples was tested by Mann-Whitney test with Bonferroni correction (P < 0.05). Different alphabets next to the figures in the column showed significant difference between analyzed materials in a index. F<sub>IS</sub> values were tested significant deviation from zero by 1,000 randomizations (P < 0.05). Significant correlation between natural logarithm of the area of the population (ha) or the size of the population (trees) and genetic diversity were tested by Spearman's rank correlation analysis under Bonferroni correction (P < 0.05). \* was shown the significant correlation between them.

## 第4章 景観スケールで流動する花粉の評価

### 4. 1 はじめに

前章ではこの調査地においてアカマツ集団は分断化が進行しているものの、遺伝的多様性は維持されていることが明らかになった。本章では、景観スケールで流動する花粉の定性的な評価について取り上げる。調査地の花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉を直接捕捉する手法として、マツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園（以下、採種園とする）を利用することを試みた。そして、採種園を利用して捕捉された花粉の遺伝的多様性の評価を行った。

過去の研究において、森林の遺伝子流動の観点から採種園が利用されたことはなく、まったく新しい着想といえる。そこで、まず、このような着想の端緒となった研究として、4. 2節において採種園における採種園外から飛来する花粉（以下、園外花粉とする）が種子の遺伝的形質に与える影響に関する研究を紹介する。具体的には、採種園がどのような遺伝的形質を持った種子を生産しているのかを確かめるために、採種園の交配実態を明らかにし、採種園産種子に求められる遺伝的形質（マツノザイセンチュウに対する抵抗性）を持たない園外花粉が採種園の交配にどれくらい影響を与えているのかを明らかにする。さらに、園外花粉を父親に持つ採種園産の実生苗がマツノザイセンチュウに対する抵抗性をどれくらい保持しているかを明らかにする。

次に、4. 3節において景観スケールで流動する花粉の捕捉施設としての採種園の評価を行う。調査地において花粉散布期間中に景観内を流動する花粉の遺伝的多様性がどのように変わるのかを評価するためには、花粉を継時的に直接捕捉する必要がある。時々刻々と流動する花粉を確実に捉えるには、採種園で作られる種子の父性アレルプールとして収集することが適切だと考えた。つまり、採種園を利用することで、景観スケールで流動する花粉を園外花粉として正確に識別することができ、しかも、異なる時期に採種園に飛来する園外花粉を容易に捉えることができる可能性がある。採種園は景観スケールで流動する花粉を捉える利点を4つ持っており、そのうち2つを検証することで、景観スケールで流動する花粉を継時的に捕捉するために利用できると考えた。

利点の第1は、採種園に植栽されている個体は種子採取を効率的に行うために樹高が5m程度で管理されるので、花粉を捕捉する役割を担う雌花の開花過程を容易に調査できることである。第2は、植栽されている個体は採種園から遠く離れた場所で選抜されており、選抜地の気候に適応した開花特性が維持されていることである（Burczyk and Chalupka, 1997）。採種園内の交配は雌花の受粉期間と花粉散布期間に時間的な差が生じることが多

く (Griffin, 1982, Erickson and Adams, 1989, Burczyk and Part, 1997, Paratainen and Pulkkinen, 2003, Owens *et al.*, 2005, Slavov *et al.*, 2005)、植栽木どうしの交配がなされない場合がある。採種園内の雄花と雌花の開花過程が植栽木で同調しないことは、理想的な採種園の条件 (Wheeler and Jech, 1992) から見ると不利であるが、景観スケールで流動する花粉を捉える場合は利点になる。つまり、雌花の受粉期間が植栽木によって数日間ずれるので、選抜地が異なる植栽木の雌花を利用して花粉散布期間の異なる時期に採種園に飛来する園外花粉を捉えることができる可能性がある。第 3 には、多くの採種園で園外花粉の流入が確認されることである (Stoehr and Newton, 2002)。園外花粉の流入割合は採種園の規模、造成してからの経過年数、周囲の同樹種林分の存在などにより 2.2~71.2%の幅がある (El-Kassaby *et al.*, 1989, Adams *et al.*, 1997, Pakkanen *et al.*, 2000, Goto *et al.*, 2002, Moriguchi *et al.*, 2004)。特に、造成からの経過年数が短い (言い換えれば「若い」) 採種園は採種園内で生産される花粉量が少ないため、採種園外からの花粉を受け入れやすいことが知られている (Harju and Muona, 1989)。したがって、若い採種園を利用して景観スケールで流動する花粉を量多く捕捉することができる可能性がある。第 4 には、クローン採種園の場合、採種園を構成するクローン数には限りがあり、採種園内の個体を遺伝子マーカーによって識別することが天然林に比べると容易であることである。さらに、異なる地域から選抜されたクローンが植栽されているため、個体が持っている遺伝子型が採種園の周囲の同樹種林分とは異なる可能性があり、遺伝子マーカーを用いて花粉親を識別する際の誤判定の確率を低く抑えることができる。これらの利点のうち、第 2、第 3 は採種園が置かれている環境によって異なるため、景観内を流動する花粉を捉える施設として適切かどうかを検証する必要がある。

これらのことから、調査地に設置されている造成後、数年しか経過していない若い採種園において、異なるクローンの雌花の受粉期間を把握する。さらに、調査地の近隣地で選抜された植栽クローンの雄花の花粉散布時期を把握することで調査地の花粉散布期間の推定を行う。そして、受粉期間と花粉散布期間を比較し、植栽クローンがこの調査地の花粉散布期間のうち、どの時期に流動する花粉を捉えているかを評価する。さらに、植栽クローンの種子に対する園外花粉の寄与の評価を行い、景観スケールで流動する花粉をどれくらい捕捉しているかを明らかにする。

最後に 4. 4 節では 4. 3 節を踏まえて、調査地が花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の 1) 遺伝的多様性の評価、2) 花粉散布期間中の遺伝的多様性・遺伝的構成の変化、3) 遺伝的多様性や遺伝的構成の周囲の同樹種林分との比較を行う。

## 4. 2 マツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園産種子への園外花粉の影響

### 4. 2. 1 材料と方法

#### 採種園

調査地において、採種園は第3章で設定された8つの調査集団の中心に位置し、太平洋から約5km内陸の平地に設置されている(337°51'N、140°53'E、海拔68m)(図-4.1[P68])。採種園から約2km西には南北に山脈が通っており、採種園の半径2kmの標高差は約400mである。採種園の規模は700m<sup>2</sup>であり、1998年にGiertych(1965)に基づいて設計され、2004年時点で、造成されてから6年が経過している。採種園は東北地方から選抜されたマツノザイセンチュウに対する抵抗性を持つ16クローンで構成されており、その16クローンを接ぎ木でクローン化した採種木(ラメート[ramet]、本研究では個体とする)が442本植栽されている(表-4.1[P73])。三本木5はクローン同定の結果、1クローンではなく3クローン(SaA, SaB, SaC)で構成されていた(後述)。そのため、採種園を構成するクローン数は実際には18になる。植栽間隔は3.5m、2004年時点での植栽個体の樹齢は9年もしくは6年である。

#### サンプリング、DNA抽出、PCR

採種園に植栽されている個体のクローン同定のため、2004年秋に全個体の針葉を採取した。また、種子の花粉親鑑定のためSaA、Km、Mi、Ka、I8、I26の6クローンから、クローン同定の結果に基づいてA~Uの21個体を選定し(図-4.2[P69])、2004年秋に種子を採取した。また、マツノザイセンチュウ接種試験に供する3年生実生苗の両親を特定するため、746本の供試苗から2004年秋に針葉を採取した。なお、これらの苗は、SaA、SaB、SaC、Oj、Ka、Ki、Miの7クローンから2002年に採種し育成したものである。

これらのサンプルについて、付録-1[P137]に示した方法により、DNAを抽出し、PCR増幅を行い、遺伝子型を分析した。PCRにはpdms009(Watanabe *et al.*, 2006)、pde14(Lian *et al.*, 2001)、bcpd502(Isoda and Watanabe, 未発表)、bcpd006(Goto *et al.*, 2005)、bcpd222(Isoda and Watanabe, 未発表)の5つのマイクロサテライトの遺伝子座を用いた。統計分析に供したサンプル数は採種園植栽個体442本、調査個体A~Uから採取された29~120種子合計1,552種子(表-4.3[P75])及びマツノザイセンチュウ接種試験に供した実生苗746本である。

#### マイクロサテライトの多型性

5 つのマイクロサテライトの遺伝子座の多型性を、ヘテロ接合度の観察値 ( $H_0$ )、 $Nei$  の遺伝子多様度 ( $H_E$ ) 及び排斥確率 (EP1) により評価した。これら遺伝的パラメーターの算出に使用したソフトウェアを付表-1[P136]に示す。

### クローン同定および花粉親鑑定

採種園に植栽されている全個体の遺伝子型を確定した後、植栽配置図に同一クローンと表示された植栽個体の全てが同一の遺伝子型を持つ場合、その遺伝子型を当該クローンの遺伝子型とした。例えば、植栽配置図で宮城 101 と表示されている個体が全て同一の遺伝子型を持っていた場合、その個体は宮城 101 とした。一方、同一クローンと表示された植栽個体が複数の遺伝子型を持つ場合、独立行政法人森林総合研究所林木育種センターが保存している抵抗性アカマツクローンの遺伝子型と一致する個体の遺伝子型を当該クローンの遺伝子型とし、他は系統管理ミスによるものであるとした。

調査個体 A~U から採取された種子の花粉親鑑定を、採種園植栽クローンを親候補として付録-2[P138]に示す最尤法による方法で行った。この結果、種子の花粉親が採種園に植栽されているクローンではないと判定された場合、園外から花粉による交配であるとした。

マツノザイセンチュウを接種するための実生苗は、育苗時の系統管理ミスを確認するために、育苗時に設置したラベルと同じクローンの遺伝子型を必ず持っていることを確認した。また、苗にマツノザイセンチュウを接種する直前に種子と同様の方法により採種園植栽クローンを親候補として花粉親鑑定を行った。花粉親鑑定に用いたソフトウェアは付表-1[P136]に示した。

### マツノザイセンチュウの接種試験

マツノザイセンチュウの接種検定に供した 7 クローン (SaA, SaB, SaC, Oj, Ka, Ki, Mi) 由来の実生苗 746 本から 160 個体を抽出し、苗高と基部径を測定した。このとき、SaA、SaB、SaC は三本木 5 として一つのグループとし、合計 5 グループから各 32 苗を任意に抽出した。抽出した 160 個体の平均苗高は  $49 \pm 5.2 \text{cm}$ 、平均基部径は  $1.0 \pm 0.2 \text{cm}$  であった。マツノザイセンチュウに対する抵抗性を評価するための対照とした実生苗 (対照実生苗とする) は森林総合研究所林木育種センターから提供された 3 年生実生苗 100 個体を用いた。対照実生苗の抵抗性は *P. taeda* が持つ抵抗性と同等であり、日本におけるマツノザイセンチュウに対する抵抗性の基準とされている (寺田ら, 1997)。この対照実生苗の大きさは平均苗高  $54 \pm 9.1 \text{cm}$ 、平均基部径は  $1.2 \pm 0.3 \text{cm}$  であった。マツノザイセンチュウの接種は長さ 18.2m、幅 4.6m、高さ 2.7m のビニールハウスで行った。接種試験に供する採種園産の実生苗は 5 つ

のグループに分けられ、乱塊法によってハウス内に設置された。対照実生苗は 1 つのグループとしてハウス内に設置された。2005 年 7 月 5 日に全苗の主軸の先端にマツノザイセンチュウ「島原」を 10,000 頭/0.1ml をマイクロピペットによって接種した。接種後、6～15 日間隔で 200～450ml/苗の散水を行った。そして、抵抗性の評価が十分できるとされる接種から 10 週間後の生存率を調査した（藤本ら, 1989）。生存苗のうち、接種箇所（主軸の先端）が枯れなかった苗や、そこから不定芽が形成された苗は適切にマツノザイセンチュウの接種がなされなかったと判断し、生存苗数から除外した。

#### 4. 2. 2 結果

##### マイクロサテライトの多型性

分析に用いた 5 つのマイクロサテライトマーカーの遺伝子座の  $H_O$  は最小が bcpd222 の 0.859 であり、最大は bcpd502 の 0.934、平均 0.891 であった。 $H_E$  は最小が bcpd222 の 0.853 であり、最大は bcpt502 の 0.909、平均 0.888 であった。EP1 は 5 つの遺伝子座全体で 0.994 であった（表-4.2[P74]）。

##### クローン同定

三本木 5 以外のクローンでは、各クローンの全個体が一つの遺伝子型になったことから、系統管理ミスはないと判断された。三本木 5 には 3 つの遺伝子型が確認され、35 個体のうち、それぞれ、18 個体（SaA とする）、3 個体（SaB とする）、14 個体（SaC とする）で構成されていた。このうち、SaA の遺伝子型が森林総合研究所林木育種センターに保存されている三本木 5 の遺伝子型と一致し、残りの SaB と SaC は保存されている抵抗性アカマツクローンのどの遺伝子型とも一致しなかった。SaB と SaC 以外の採種園植栽個体は正しいクローン由来だったので、系統管理ミスは全個体 442 個体のうち 17 個体、約 4% であった。

##### 採種園産種子の花粉親の構成

調査個体 A～U から採取した種子の花粉親うち、多くの花粉親が園外の個体（園外花粉による交配）であると判断された（表-4.3[P75]）。調査個体ごとにみた園外花粉の貢献は、C（Km）と F（Ka）で最も高く 94.2% であり、L（I8）で最も低く 40% であった。分析に供した全 1,552 種子のうち、園外花粉を父親として持つ種子は 1,273 種子、分析種子の 82% に達し、残りの 18%（279 種子）が、採種園内のクローンが花粉親であると判断された。

採種園内のクローンを親として持つ 279 種子のうち、三本木 5（SaA, SaB, SaC）の貢献度が最も高く 3 クローン合計で 81.4%（227 種子）であり、内訳は SaA が 8.6%（24 種子）、



SaB が 10.4% (29)、SaC が 62.4% (174 種子) であった。また、それ以外の 15 クロンの花粉親としての貢献度は全部合わせて 18.6% であった (52 種子)。

園外花粉も含めた各クロンの花粉親としての貢献度は SaA が 1.5%、SaB が 1.9%、SaC が 11.2% であり、SaA、SaB、SaC 以外の 15 クロンは合わせて 2.1% であった。

#### 接種試験に供した実生苗の花粉親の構成と抵抗性

供試実生苗 746 本のうち、98.7% にあたる 736 苗が園外花粉との交配による実生であると判断された (表-4.4[P76])。供試実生苗に対する園外花粉の貢献度は Oj で最も低く 97.4% (116 苗のうち 112 苗)、SaA、SaB 及び SaC の実生苗が最も高く 100% であった。

接種試験を行った結果、接種試験に供した 7 クロンの実生苗のうち、6 クロン (SaA、SaB、Oj、Ka、Ki、Mi) の実生苗の生存率は 41.8%~55.0% であった (表-4.5[P77])。この 6 クロンの実生苗は対照実生苗の生存率 40% よりも高い生存率を示したことから、マツノザイセンチュウに対して抵抗性を持つと判断された。残りの 1 クロン、SaC の実生苗は生存率が 34.8% であったので、抵抗性を持たないと判断された。

#### 4. 2. 3 考察

花粉親識別に用いた 5 つのマイクロサテライトの遺伝子座は他研究でも花粉親識別に用いられており (e.g. Iwaizumi *et al.*, 2007, Iwaizumi *et al.*, 2010)、十分に信頼に足る分析能力を持つと判断した。また、花粉散布距離推定を行う TwoGener 法 (Austerlitz and Smouse, 2001) では  $EP1 > 0.99$  で十分な遺伝的解像度を持つとされていることから (Austerlitz and Smouse, 2002)、この 5 つの遺伝子座が示した  $EP1 = 0.994$  は花粉親識別を含め、本章における他の解析にも耐えるものと判断した。

これまでの研究では、採種園における園外からの花粉による交配 (花粉汚染とする) の割合は 2.2~71.2% である (e.g. El-Kassaby *et al.*, 1989, Adams *et al.*, 1997, Goto *et al.*, 2002, Moriguchi *et al.*, 2004)。この採種園の花粉汚染は 82% であり、他の採種園の事例よりも高い割合だと考えられる。*Picea abies* 採種園において花粉汚染の影響は単年のものではなく、数年間に渡って一定のレベルを維持することが分かっている (Pakkanen *et al.*, 2000)。この知見から、採種園植栽個体の雌花の周囲に存在する花粉の構成を変化させない限り今後も花粉汚染は続くことが示唆される。つまり、採種園に植栽されている個体から散布される花粉量が多くなる場合や、周囲の同樹種林分が減少し、採種園外から採種園に飛来する花粉量が減少しない場合は、今後もこの採種園から生産される種子の 80% 程度が園外花粉由来のものになるであろうと考えられる。

採種園における花粉汚染は遺伝的に改良された種子を供給するためには避けるべきであることが古くから指摘されている (Wheeler and Jech, 1992)。そのため、花粉汚染の抑制対策についても種々提案がなされている (森口ら, 2005)。例えば、園外花粉を完全に遮断する施設内交配 (斎藤・平, 2006) は採種木をミニチュア化し、ガラス温室内で交配させる方法である。また、既存の採種園を利用したものでは、園内に植栽されているクローンの花粉をあらかじめ収集し、採種園に植栽されている個体の受粉期間に人為的に散布させる方法 (SMP; supplemental mass pollination, [El-Kassaby and Ritland K, 1986, Eriksson *et al.*, 1995, Stoehr *et al.*, 1998, 2006]) である。

提案されている対策のうち、どの対策を講じるかは花粉汚染を完全に遮断する必要があるかどうかを明らかにしたうえで考えるべきである。つまり、花粉汚染を抑制もしくは遮断するための対策を講じることは大変重要であるものの、優先されるべきことは、園外花粉が生産される種子の遺伝的形質にどれだけ影響を与えているかを明らかにすることである。その上で、どのような対策を取るかを検討することが必要になる。例えば、もし、採種園産の種子に求められる遺伝的形質に園外花粉の影響 (父方の遺伝的形質の影響) が小さいのであれば、花粉汚染を完全に遮断する対策を選択する必要はない。本研究で対象としたマツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園から生産される種子が持つべき遺伝的形質はマツノザイセンチュウに対する抵抗性であるので、園外花粉が種子のマツノザイセンチュウに対する抵抗性の形質に対してどれくらいの影響を与えているかが重要になる。抵抗性を持たない父親を持つ実生苗がマツノザイセンチュウに対して抵抗性を持っているのであれば、花粉汚染を遮断するような対策をとる必要はない。逆に、マツノザイセンチュウに対して抵抗性を持っていない場合、花粉汚染を遮断し、抵抗性を持つ親どうしの交配を促進させる対策を講じる必要がある。

マツノザイセンチュウに対する抵抗性を調査するために育成された実生苗の花粉親は全体で 98.7% が採種園外の個体であると判定されたことから、園外花粉は接種試験に供した実生苗にも大きな影響を与えていることが明らかになった。しかしながら、接種試験に供した 7 クローンのうち、6 クローン (SaA, SaB, Oj, Ka, Ki, Mi) の実生苗にマツノザイセンチュウを接種した結果、苗の生存率は対照実生苗の生存率よりも高かったことから、少なくとも基準とした抵抗性は持っていると判断された。この結果はこの採種園から生産される種子は園外花粉の影響を相当量受けているにも関わらず、種子の遺伝的形質に明確な負の影響は与えておらず、マツノザイセンチュウに対する抵抗性を持っていることを示している。

園外花粉が種子の遺伝的形質に影響を与えにくい理由の一つとしてマツノザイセンチュウに対する抵抗性が父方よりも母方から強く遺伝することが挙げられる。アカマツに対するマツノザイセンチュウの接種試験において、抵抗性クローン間の人工交配による苗の生存率は94.0%であり、抵抗性を持たない父親と抵抗性を持つ母親の人工交配による苗の生存率は69.5%であった（半田ら, 1995）。非抵抗性の父親によって低下した生存率69.5%は一般的な *P. taeda* の生存率（30~50%）よりも高い（岡田・津田, 1989, 竹内ら, 1989, 戸田ら, 1989）。また、他の抵抗性アカマツクローン採種園において、自然交配による採種園産実生苗のマツノザイセンチュウ接種後の生存率も *P. taeda* 実生苗の生存率よりも高い（岡田・津田, 1989, 竹内ら, 1989, 戸田ら, 1989, 遠藤・中川, 2005）。これらの知見はマツノザイセンチュウに対して抵抗性を持たない花粉がその種子の抵抗性に負の影響を与えにくいとする仮説を支持するものである。そして、種子が持つ抵抗性に母方の遺伝形質が強く影響することは、三本木5の実生苗の接種試験の結果からも示唆される。抵抗性クローンではないと判定された SaC の実生の生存率は34.8%であり、SaA、Oj、Ka、Ki、Mi のような抵抗性クローンの実生苗よりも低く、他の研究での非抵抗性の実生苗の生存率（岡田・津田, 1989, 戸田, 2004）とほぼ同じであった。この結果は種子親が抵抗性を持たない場合、種子の抵抗性も低くなるという仮説を支持するものである。

もう一つの理由として、園外から採種園に飛来する花粉が抵抗性の個体から散布された可能性が挙げられる。しかしながら、本調査地においてこの理由はあまり現実的ではない。なぜならば、一般的なアカマツ林からマツノザイセンチュウに抵抗性を持ったアカマツ個体が見つかる確率は0.8%程度だからである（藤本ら, 1989）。この採種園の周囲には多くのアカマツ集団が存在していることを考慮すると、この採種園に飛来する花粉の多くが抵抗性を持った個体から散布されたとは考えにくい。

結論として、この採種園において園外花粉の影響は大きいものの、生産される種子の抵抗性に与える影響は小さいことが明らかになった。したがって、早急に花粉汚染への対策をとる必要はないと考えられる。そして、対策を講じるとしても、花粉汚染を完全に遮断する対策を採用する必要はなく、通常の子実生産を行いながら、遺伝的に改良された種子の割合を多くすることができるような対策、例えば、先に述べた SMP (El-Kassaby and Ritland K, 1986, Eriksson *et al.*, 1995, Stoehr *et al.*, 1998, Stoehr *et al.*, 2006) が適切であると考えられる。

#### 4. 3 花粉の捕捉施設としての採種園の評価

##### 4. 3. 1 材料と方法

#### 採種園の受粉期間と調査地の花粉散布期間の推定

調査地においてアカマツ花粉が散布されている全期間にわたって採種園外から飛来する花粉を捉えるために、できるだけ調査対象の採種園から離れた地域で選抜されたクローンを調査材料として選定する必要がある。そこで、採種園が設置されている福島県から北と西に離れた地域から選抜された3クローン、三本木5 (SaA、青森県)、刈羽102 (Ka、新潟県)、上閉伊101 (Km、岩手県)を選定した(表-4.1[P73])。これらのクローンの選抜地は、それぞれ、採種園からSaAは北約310km、Kaは西約200km、Kmは北約170kmの地点で選抜された。この3クローンの雌花の開花フェノロジーの差を利用することで調査地の花粉散布期間中の異なる時期に採種園に飛来する園外花粉を捉えることができると期待される。また、調査地のアカマツ集団の花粉散布期間を把握するためにはできるだけ採種園に近い地域で選抜されたクローンを調査材料として選定する必要がある。そこで、採種園の南約60kmの福島県いわき市で選抜された4クローン(I8、I23、I25、I91)を選定した(表-4.1[P73])。この4クローンが花粉を散布した時を調査地における花粉飛散盛期とみなした。

採種園の受粉期間を明らかにするために、雌花の開花過程を把握した。SaA、Ka、Kmの3クローンからKmは3個体、SaAとKaはそれぞれ5個体を選定し(図-4.3[P70])、南向きの樹冠の高さ2.5mから3.0mの範囲に着生している雌花を1個体あたり最大5個選定した。調査雌花数はSaAとKaは5調査個体とも5花着生したので25花、Kmは3調査個体でそれぞれ、2花、5花、4花着生したので、11花であった。雌花の開花過程はChung(1981)に従い、開花初期(ステージ2、3)、開花中期(ステージ4)、開花後期(ステージ5)の3期に区分した。マツ属の開花過程においては、開花中期に胚珠が交配することから(Chung, 1981)、各クローンの受粉期間は、調査花のどれか一つでも開花中期に入った日を受粉期間の開始日とし、調査花が全て開花後期と確認された日の一つ前の調査日を受粉期間の終了日とした。例えば、受粉期の開始日は以下のように判断した。あるクローンにおいて5月13日の調査では調査25花全てが開花初期であり、5月15日の調査で3花が開花中期、22花が開花初期であった場合、5月15日を受粉期間の開始とした。一方、5月20日の調査で調査25花のうち5花が開花中期、20花が開花後期であり、5月22日の調査で25花全てが開花後期であった場合、5月20日を受粉期間の終了日とした。また、3クローンの開花中期を合わせた期間を採種園の受粉期間とした(クローンを考慮せず、調査個

体の最初の雌花が花粉中期に入った日から最後の雌花が開花後期に入った日の一つ前の調査日までの期間とした)。雌花の開花過程の調査は2003年5月に1~4日間隔で行った。

調査地の花粉散布期間を推定するためには雄花が花粉を散布させる日を把握する必要がある。そこで、4クローン (I18、I23、I25、I91) から19個体を選定し (図-4.3[P70])、南向きの樹冠の高さ1.0mから3.0mの範囲に着生した雄花を1個体あたり最大5花、全部で30花を選定し、花粉が散布された日を確認した。調査雄花が花粉を散布させた日から、調査地の花粉散布期間を以下のように推定した。一般的に、マツ林の花粉散布期間は約2週間とされ、マツ花粉が確認されてから、5~8日後に最も散布量が多くなる花粉散布盛期に達する (Eriksson *et al.*, 1995, Lindgren *et al.*, 1995, Stoehr *et al.*, 2006)。調査対象とした30花が花粉を散布させた日が調査地の花粉散布期間のどこに当たるのかは分からない。そこで、最も多くの調査花が花粉を散布させた日 (調査花の花粉散布盛期とする) を調査地における花粉散布盛期に当たると判断した。例えば、5月15日の調査で30花のうち、5花が花粉を散布させ、5月20日の調査で残りの20花が花粉を散布させた場合、5月20日が調査花の花粉散布盛期とした。そして、調査花の花粉散布盛期のおおよそ7日前に調査地のアカマツ花粉が飛散を開始し、調査花の花粉飛散盛期からおおよそ6日後に調査地のアカマツ花粉の飛散が終了すると判断した。例えば、5月20日が調査花の花粉散布盛期だった場合、その7日前の5月13日が調査地の花粉散布期間の開始日とし、6日後の5月26日を花粉散布期間の終了日とした。この場合、花粉散布期間は5月13日~5月26日となる。また、雌花の開花過程を調査した3クローン (SaA、Ka、Km) 13調査個体についても、各調査個体最大5花の雄花を選定し、花粉散布日を調査した。雄花の花粉散布日の調査は2003年5月に1~4日間隔で行った。

3クローンの雌花の受粉期間と、推定された調査地の花粉散布期間を比較することで、各クローンの受粉期間が調査地の花粉散布期間とどのように重なっているかを判断する。そして、各クローンの雌花が花粉散布期間中のどの時期に景観スケールで流動する花粉を捕捉することができるのかを明らかにする。

### サンプリング、DNA抽出、PCR

雌花の開花過程の調査時に選定された3クローン (SaA、Km、Ka) がどれだけ景観を流動する花粉を捕捉しているかを定量的に評価するためには、3クローンから得た種子の花粉親鑑定を行う必要がある。そこで、種子の花粉親鑑定をするために3クローンからB、C、F、G、H、K、N、R、Sの9個体を選定した (図-4.4[P71])。9個体のうち、2個体、GとNはSaA由来、3個体、C、H、RはKm由来、4個体、B、F、K、SはKa由来の個体であ

る。雌花の開花過程を行う調査個体と種子の花粉親鑑定を行う調査個体とは別の個体が選定された。一般的にクローン採種園において、個体間の雌花の開花過程の変動はクローン間の変動よりも十分に小さいことが知られていることから（高山, 1968）、雌花の開花過程の調査を行なった個体（図-4.3[P70]）と種子採取を行なった個体（B～S）の雌花の開花過程は十分に同調しているとみなした。

雌花の開花過程の調査を行った翌年の 2004 年秋に調査 9 個体から種子を採取した。種子からの DNA 抽出法及び PCR 法については付録-1[P137]に示した。統計分析に供したサンプル数は 9 調査個体で 77～120 種子（表-4.6[P78]）及び採種園植栽木 442 本である。PCR には 4. 2 で用いた 5 つのマイクロサテライトの遺伝子座、pdms009、pde14、bcpd502、bcpd006、bcpd222、pdms011 を用いた。

#### 統計分析

種園植栽クローンを親候補として、調査個体 B～S から採取された種子の花粉親鑑定を配分法による方法で行った（付録-2[P138]）。種子の花粉親が採種園に植栽されているクローンではないと判定された場合、園外から採種園内に飛来した花粉による交配であるとした。各調査個体から得た種子の花粉親鑑定を行い、分析した種子のうち園外花粉の寄与率が高い調査個体ほど景観を流動する花粉を捕捉するのに適していると判断した。

#### 4. 3. 2 結果

##### 採種園の受粉期間と調査地の花粉散布期間の推定

SaA と Ka では調査個体に十分量の雌花が着生し、各個体あたり 5 花を調査することができたが、Km では調査個体番号 1 では 2 花、調査個体番号 3 では 4 花しか着生しなかったため、着生した全ての花を調査対象とした（図-4.5b, [P72]）。雌花の開花過程の開始は SaA が最も早く、Ka が最も遅かった。また、各クローンで選定された調査個体の開花過程はほぼ同時に進行し、クローン内の差はほとんどなかった。開花過程が最も早い SaA と最も遅い Ka との差は大きく、SaA が開花後期の時に Ka は開花中期を示していた。また、Km の開花中期は SaA の開花中期の終了と Ka の開花中期の開始と重なっていた。各クローンの開花中期の開始日は SaA と Km が 5 月 15 日、Ka が 5 月 20 日であり、開花中期の終了日は SaA が 5 月 22 日、Km と Ka が 5 月 26 日であった。したがって、各クローンの受粉期間は SaA が 5 月 15 日～22 日、Km が 5 月 15 日～26 日、Ka が 5 月 20 日～26 日と判断された。また、この採種園の受粉期間は 5 月 15 日～26 日の 12 日間と判断された。

調査地の花粉散布期間を推定するために選定された 4 クローン (I8、I23、I25、I91) 30 調査花が花粉を散布させた日は 5 月 12 日が 1 花、5 月 15 日が 5 花、5 月 20 日が 24 花であった (図-4.5a, [P72])。したがって、最も多くの雄花が花粉を散布させた 5 月 20 日が調査花の花粉飛散盛期だと判断された。そして、調査地の花粉散布期間は 5 月 20 日を中心とした 2 週間 (5 月 13 日～26 日前後) と判断された。4 クローンの調査花が花粉を散布させた 5 月 15 日や 5 月 20 日は雌花の開花過程の調査を行った 3 クローン (SaA、Km、Ka) の開花中期とほぼ一致していた。一方、雌花の開花過程の調査を行った 3 クローン (SaA、Km、Ka) の花粉の飛散日は SaA と Km が先の 4 クローン (I8、I23、I25、I91) よりも早かった。SaA と Km の花粉は 5 月 13 日と 15 日に散布され、Ka は雄花を着生させなかった。

#### 景観を流動する花粉の捕捉量の評価

5 つの遺伝子座と採用した配分法を用いることで示される花粉親の識別能力は十分に高いと判断される (表-4.6[P78])。タイプ 1 エラー率 (採種園内の親を採種園外の親として判定する確率) は 0.1～2.8% であり、タイプ 2 エラー率 (採種園外の親を採種園内の親として判定する確率) は 5.7～14.6% であった。閾値に設定された LOD 値で、親候補個体を真の親として正しく鑑定する割合 (correct classification rate) は 88.1～92.4% であった。これらのパラメーターが示している鑑定能力のもとで、3 クローン (SaA、Ka、Km) から選定された調査個体 (B～S) から得た種子の花粉親鑑定を行った。調査個体から得られた種子のうち花粉親が園外から採種園内に飛来する花粉である割合は最小で N の 82.3% (分析した 96 種子のうち、79 種子)、最大が F の 94.2% (120 種子のうち、113 種子) であり、B～S の全体では 89.6% (879 種子のうち、788 種子) であった。SaA の調査個体では分析した種子の 82% 以上、Km の調査個体では 88% 以上、Ka の調査個体では 85% 以上が園外から飛来した花粉との交配によるものであった。

#### 4. 3. 3 考察

青森県、岩手県、新潟県から選抜された 3 クローン (SaA、Ka、Km) の雌花の受粉期間の結果から、この採種園を利用することで 5 月 15 日～26 日までの 12 日間に飛来する花粉を捕捉することができると判断された。一方、この地域の花粉散布期間は 5 月 20 日を中心とした 2 週間 (5 月 13 日～26 日前後) と推定される。したがって、採種園の受粉期間はこの地域の花粉散布期間と十分に重なっていたと判断される。そして、SaA の個体を利用することで花粉散布期間の比較的早い時期に景観内を流動する花粉を捕捉することができると判断される。また、Km と Ka の個体を利用することで花粉散布期間の中期から後期の花

粉を捕捉することができるかと判断される。Km と Ka の雌花のフェノロジーは明確に区別できないものの、Ka の方が比較的遅いこと判断されることから、Ka の方が Km よりも遅い時期の花粉を捕捉することができるかと推測される。

マツ属の花粉が散布される期間や散布される量は調査場所によって異なるものの、おおよそ2週間と判断した。例えば、スウェーデンの *P. sylvestris* 採種園での測定では花粉散布期間は6月1日～6月15日（15日間）とされ、散布量のピークは6月6日と6月11日に観察され、散布量の最大は約30,000粒/cm<sup>2</sup>/日であった（Eriksson *et al.*, 1995）。同じスウェーデンにおいて、採種園以外の場所（大学の構内）で観察された *P. sylvestris* の花粉散布期間は5月28日～6月28日（31日間）とされ、散布量のピークは6月13日と6月21日に観察され、散布量の最大は約35,000粒/cm<sup>2</sup>/日であった（Lindgren *et al.*, 1995）。カナダの *P. contoria* 採種園での測定では花粉散布期間は5月15日～5月26日（12日間）とされ、散布量のピークは5月19日、5月22日、5月24日に観察され、散布量の最大は約15,000粒/cm<sup>2</sup>/日であった（Stoehr *et al.*, 2006）。また、小澤（2007）は調査地において、2007年にアカマツ花粉の散布期間と散布量を測定し、研究対象の採種園の近隣で5月9日～6月2日（25日間）、採種園から3km東側で5月15日～6月2日（18日間）散布され、散布量の最大は5月21日の約30粒/cm<sup>2</sup>/日であったことを明らかにしている。いずれの研究でも花粉の観測開始日から2～10日間及び観察終了日前の数日間の散布量は少なく、1～3回の飛散量のピークが観測される。そのため、花粉が散布される主な期間はどの知見でもほぼ同じ2週間程度であると判断された。また、本調査地ではマツ花粉の散布量が最大になる日が2007年は5月21日であり（小澤, 2007）、本研究の調査花の花粉散布盛期と判断した5月20日と一致した。これらのことから、この調査地の花粉飛散期間を福島県クローンの花粉散布日ではほぼ正しく判断できたと考えられる。

雌花が受粉する期間は Chung（1981）を参考にし、開花中期であるとした。この時期が受粉期間であることは他の研究でも指摘されている。この「開花中期」は齋藤ら（1979）の研究では雌花の開花過程を5つのステージに分けたうちのステージⅢに相当する。ステージⅢは雌花の大部分の鱗片が露出し、種鱗の発達が進んであり、各鱗片の間隔が最大になる時期である。齋藤ら（1979）は各ステージ別に人工交配を行うと、ステージⅢが最も充実種子数が生産されることから、ステージⅢを受粉の適期であるとしている。雌花はこの時期だけ花粉を受粉するのではなく、その前後のステージ（ステージⅡ及びステージⅣ）でも受粉するものの、生産される充実種子数はステージⅢの1/3以下に減少する（齋藤ら, 1979）。本研究で調査対象とした採種園では3クローンの調査個体を利用することで5月



15日～26日の花粉を捕捉することができるとしたが、正確にはこの期間の前後に飛来した花粉も捕捉したと考えられる。

これらの知見から、調査地の花粉散布期間と採種園の3クローンの雌花の受粉期間は十分に重なっていたと判断され、この3クローンが十分に園外花粉を受け取っていれば、SaAの個体は花粉散布期間の前期、Kmの個体は中期、Kaは後期に景観内を流動する花粉を捕捉する能力があると判断される。

花粉親分析の結果、3クローン9調査個体とも採種園外から飛来する花粉を非常に多く受け取っており、景観内を流動する花粉を十分に捕捉したと判断される。全ての調査個体で解析に用いた種子の82%以上は採種園外の個体が父親だと判断され、採種園内の親を採種園外の親として判定する誤差（タイプ1エラー率）よりも採種園外の親を採種園内の親として判定する誤差（タイプ2エラー率）の方が小さかった。このことから、園外花粉の貢献度は過大評価ではなく、むしろ過小評価であると判断される。

結論として、調査対象とした採種園に植栽されているSaA、Km、Kaの個体を利用することで、調査地の花粉散布期間中の異なる時期に景観スケールで流動する花粉を捕捉することができることが明らかになった。

#### 4. 4 景観内を流動する花粉の遺伝的多様性

##### 4. 4. 1 材料と方法

##### サンプリング、DNA 抽出、PCR

採種園内に植栽されている3クローン(SaA、Km、Ka)9本の調査個体(B~S)(図-4.4[P71])から種子を採取し、DNA抽出法を行い、4. 2. 1に示した5つのマイクロサテライトの遺伝子座を用いてPCRを行い、花粉親分析を行って園外花粉の遺伝情報を得た。また、3. 3. 1に示した方法で採種園の周囲に設定されたアカマツ8集団(pf1~pf8)(図-4.1[P68])において、成木から針葉を採取し、DNA抽出及びPCRを行い、集団の成木の遺伝情報を得た。DNA抽出およびPCRは付録-1[P137]の方法によった。

##### 統計分析

3クローン9調査個体が捕捉した9つの園外花粉の遺伝情報(各々を園外花粉プールとする)とアカマツ集団の8つの成木の遺伝情報(各々を遺伝子プールとする)の遺伝的多様性を対立遺伝子多様度(アレリックリッチネス、 $R$ )、 $Nei$ の遺伝子多様度( $H_E$ )、集団固有の対立遺伝子の多様度(プライベートアレリックリッチネス、 $PR$ )により評価した。 $R$ と $PR$ は58遺伝子に調整して算出した。花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性の変化の有意性について検証するために、3クローンの園外花粉プールの遺伝的多様性( $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ )のクローン間差を分散分析(ANOVA)によって検定した。比較を行った園外花粉プールはSaAが調査個体G、Nに捕捉された2つの園外花粉プール、Kmが調査個体C、H、Rに捕捉された3つの園外花粉プール、Kaが調査個体B、F、K、Sに捕捉された4つの園外花粉プールである。そして、データをSaAでは $n=10$ (5遺伝子座 $\times$ 2園外花粉プール)、Kmでは $n=15$ (5遺伝子座 $\times$ 3園外花粉プール)、Kaでは $n=20$ (5遺伝子座 $\times$ 4園外花粉プール)とし、有意水準を $P<0.05$ (ボンフェローニ補正済)として分析を行った。景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性と周囲のアカマツ集団の遺伝的多様性を比較するために、9つの園外花粉プールを一つにした遺伝的多様性のパラメーター( $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ 、各 $n=45$ )と8つの遺伝子プールを一つにした遺伝的多様性のパラメーター( $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ 、各 $n=40$ :5遺伝子座 $\times$ 8集団)の差を分散分析によって検定した( $P<0.05$ )。

調査地の花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的構成の変化の有意性について検証するために、9つの園外花粉プールを用いて遺伝的構成のクローン間差をAMOVA(Excoffier *et al.*, 1992)によって検定した( $P<0.05$ )。このとき、同じクローンの園外花粉プールは反復として扱った。すなわち、SaAは調査個体G、Nが捕捉した2つの園外花粉プールで構成されているので、反復数を2、同様にKmは反復数3、Kaは反復数4

として分析した。また、景観スケールで流動する花粉の遺伝的構成とアカマツ集団の遺伝的構成の比較を行うために、9つの園外花粉プールを一つのグループにしたもの（全園外花粉プールとする）と8つの遺伝子プールを一つのグループにしたもの（全遺伝子プールとする）を作成し、この2グループ間の遺伝的構成の差の有意性を AMOVA で検定した（ $P<0.05$ ）。また、全遺伝子プールと3クローン（SaA、Km、Ka）の園外花粉プールの遺伝的構成の差を AMOVA で検定した（ $P<0.05$ ）。このとき、SaA が捉えた園外花粉は2つの園外花粉プールで構成されているので、反復数を2、同様に Km は反復数3、Ka は反復数4として分析した。

これらの遺伝的パラメーターの算出や統計分析に使用したソフトウェア及び引用文献は付表-1[P136]に示した。

#### 4. 4. 2 結果

##### 遺伝的多様性

9調査個体から採取された種子の花粉親分析の結果は4.3.2（表-4.6[P78]）に示した。9調査個体の花粉親のうち、園外花粉プールの遺伝的多様性の評価を行った（表-4.7[P79]）。園外花粉プールの  $R$  は最小値が N（SaA の個体）の 15.62、最大値が R（Km の個体）の 18.05 であった。各クローンの平均値は SaA が 16.51 であり、Km では 17.36、Ka では 17.56 であった。 $PR$  は最小値が G、N（両方とも SaA の個体）、B（Ka の個体）の 0 もしくは 0.00、最大値が H（Km の個体）の 0.39 であった。各クローンの平均値は SaA が 0.00 であり、Km では 0.32、Ka では 0.05 であった。 $H_E$  は最小値が N の 0.890、最大値が B の 0.906 であった。各クローンの平均値は SaA が 0.893 であり、Km と Ka では 0.900 であった。3つの遺伝的多様性のパラメーター（ $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ ）はクローン間で有意差が検出されなかった。

8つのアカマツ集団の遺伝子プールの遺伝的多様性の指標については、 $R$  は pf2 の 15.94 が最少であり、最大値が pf6 の 18.64、平均値は 17.34 であった（表-4.7[P79]）。 $PR$  は最小値が pf4 と pf5 の 0.01、最大値が pf8 の 0.77、平均値は 0.36 であった。 $H_E$  は最小値が pf2 の 0.890、最大値が pf6 の 0.906、平均値は 0.894 であった。

9つの園外花粉プールと8つの遺伝子プールの遺伝的多様性（ $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ ）は  $PR$  で有意差が検出され（分散分析、 $P<0.05$ ）、他の2つのパラメーター、 $R$  と  $H_E$  では有意差は検出されなかった。

##### 遺伝的構成

3クローンの園外花粉プールの遺伝的構成には有意なクローン間差は検出されなかった

(表-4.8[P80])。全園外花粉プールと全遺伝子プールの遺伝的構成は有意差が検出された ( $\phi_{it}=0.001$ 、 $P<0.05$ )。また、3 クローンの園外花粉プールと全遺伝子プールの遺伝的構成を比較した場合、全てのクローンで全遺伝子プールと有意差が検出された (SaA と全遺伝子プール間、 $\phi_{it}=0.427$ 、 $P<0.05$  ; Km と全遺伝子プール間、 $\phi_{it}=0.450$ 、 $P<0.05$  ; Ka と全遺伝子プール間、 $\phi_{it}=0.415$ 、 $P<0.05$ )。

#### 4. 4. 3 考察

第3章において、この調査地におけるアカマツ集団の遺伝的多様性 (成木、シードレイン [胚、父性アレル、母性アレル]) は保護林や天然林と同程度であることが明らかになった。本節で、採種園の調査個体が捕捉した園外花粉プールの遺伝的多様性 ( $R\geq 15.62$ 、 $H_E\geq 0.890$ ) はアカマツ集団の遺伝子プール ( $R\geq 15.94$ 、 $H_E\geq 0.890$ ) と有意差は検出されなかったことから、保護林や天然林と同程度であると判断される。したがって、景観スケールで流動する花粉を構成しているアレルは非常に変異に富んでいると判断することができる。

景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性のパラメーター ( $R$ 、 $PR$ 、 $H_E$ ) は雌花の開花過程が異なるクローン間で有意差が検出されなかった。また、遺伝的構成もクローン間で有意差が検出されなかった。選定した3クローン (SaA、Km、Ka) の雌花の受粉期間は調査地の花粉散布期間と重複しており、花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉を前期 (SaA によって捕捉)、中期 (Km によって捕捉)、後期 (Ka によって捕捉) に渡って捕捉することができる (4. 3 節)。クローン間で遺伝的多様性や遺伝的構成に有意差が検出されなかったことは、花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成は変化しないことを示している。

景観スケールで流動する花粉の遺伝的特徴は散布源となる同樹種集団の遺伝的背景が反映されると考えられる。8つの調査集団の中心に調査対象の採種園が配置されていることを考慮すると、採種園で捉えた園外花粉の散布源に8調査集団は含まれると考えられる。対象景観を代表する集団として選定された8集団の遺伝的多様性は保護林や天然林と同程度であり (3. 3 節)、園外花粉プールの遺伝的多様性のパラメーターのうち、 $R$  と  $H_E$  で集団の遺伝子プールと有意差が検出されなかった。また、8つの調査集団間には有意な遺伝的な差異がほとんど検出されなかったことから、景観内に分布しているアカマツ集団は遺伝的に同質であるとみなすことができる (3. 3 節)。散布源となるアカマツ集団が遺伝的に同質であるとみなすことができるので、集団から散布され、景観スケールで流動する花粉の遺伝的構成も花粉散布期間中に変化しなかったと考えられる。

全園外花粉プールと全遺伝子プール、各クローンの園外花粉プールと全遺伝子プールの

遺伝的構成には有意差が確認された。しかしながら、実際に遺伝的構成に差があるとは考えにくい。 $R$  や  $H_E$  のような遺伝的多様性を評価するパラメーターでは有意差が検出されなかったことから、 $R$  や  $H_E$  では検出できない違いであると判断される。以下に示すように分析に用いたサンプル量に起因すると考えられる。

景観スケールで流動する花粉とアカマツ集団の遺伝的構成の差異が検出された要因として、園外花粉プールと全遺伝子プールの低頻度アレルの構成に差があることが挙げられる。AMOVA に用いられている遺伝距離パラメーター  $\phi_{it}$  は分析対象の遺伝子プール間の距離を算出する際に、低頻度のアレルの差を考慮して評価することができるとされている (Smouse and Peakall, 1999)。一般的に、マイクロサテライトマーカーは他の遺伝子マーカーと異なり、遺伝子座あたりのアレル数が多い (Rongwen *et al.*, 1995)。そのため、ある遺伝子プールのアレルの頻度分布のうち、低頻度のアレルが占める割合が多くなる (Smouse and Peakall, 1999)。これらの知見から、マイクロサテライトマーカーを用いて長距離散布花粉と集団の遺伝子プールの差を AMOVA ( $\phi_{it}$ ) で検定すると、低頻度のアレルの差が解像度高く検出できると考えられる。低頻度のアレルの多様性を評価するレアアレリックリッチネス ( $PR$ ) からも園外花粉プールとアカマツ集団の遺伝子プールには低頻度アレルに差があることが示された。園外花粉プールの  $PR$  値 (平均  $PR=0.13$ ) は集団の遺伝子プール (平均  $PR=0.36$ ) よりも有意に小さかった ( $P<0.05$ )。この結果は景観スケールで流動する花粉の遺伝子プールは集団の遺伝子プールよりも低頻度のアレルが少ないことを示している。

景観スケールで流動する花粉に低頻度のアレルが少ない理由として、分析に供したサンプル数が少なかった影響が考えられる。本章において、統計分析に供した花粉量 (788 サンプル) は実際に景観内に散布された全花粉のうちのほんの僅かではない。集団で散布される花粉のうち、わずかな量が景観スケールで流動する花粉になると考えられるので、集団が持っている大きな遺伝子プール (母集団) からほんの少量の遺伝子が長距離散布されることになる。長距離散布される遺伝子が母集団の遺伝子プールからランダムに選ばれると仮定すると、母集団において高頻度で存在するアレルほど長距離散布される確率は高くなる。結果的に、相当量のサンプリングをしないと、低頻度のアレルを捉えることができないと考えられる。

結論として、景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性は保護林や天然林と同程度であり、花粉散布期間中変化しないことが明らかになった。また、景観スケールで流動する花粉の遺伝的構成も花粉散布期間中変化しないことが明らかになった。さらに、景観を流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成は景観を構成する集団の遺伝的特徴が反映されると考えられた。

#### 4. 5 まとめ

本章の研究は4. 2節で得た着想をもとにしている。調査対象とした採種園において、園外花粉の影響は大きく、調査種子に対する園外花粉の影響は貢献度で82%であることが明らかにされた。一般的に、採種園に植栽されるクローンは選抜された場所の気候の開花特性が維持されていることが知られていることから (Burczyk and Chalupka, 1997)、青森県から選抜された SaA、岩手県から選抜された Km や新潟県から選抜された Ka の雌花の開花時期は調査地が設定されている福島県のアカマツの雌花の開花時期と異なると推測された。従って、この採種園における園外花粉の貢献度の高さは開花時期がある程度ずれたとしても、採種園外から花粉が飛来し、父親として十分に貢献することを示している。つまり、この採種園に植栽されているクローンは調査地の花粉散布期間の異なる時期に採種園に飛来する花粉を捉えているのではないかと推測された。採種園外から飛来する花粉は採種園の周囲に分布するアカマツ集団から散布された長距離散布花粉、言い換えれば、景観スケールで流動する花粉だと判断することができるので、流動時期が異なる花粉の遺伝的多様性を比較することができると考えた。

4. 3節では、このような着想のもとに調査地のアカマツの花粉散布期間を推定し、SaA、Km、Ka の調査個体の雌花の受粉期間との関係を明らかにした。その結果、SaA の調査個体を利用することで花粉散布期間の前期、Km の調査個体を利用することで中期、Ka の調査個体を利用することで後期に景観内を流動する花粉を捕捉する可能性があることが明らかになった。この3クローンの調査個体の種子の花粉親鑑定を行ったところ、分析種子のうち、82%以上の花粉親が園外花粉であることが明らかになった。これらの結果から、この3クローンの受粉期間の差を利用して調査地の花粉散布期間中の異なる時期に採種園に飛来する花粉を捉えることができたことが明らかになった。

4. 4節において、3クローン9調査個体が捉えた園外花粉プールの遺伝的多様性の高さや遺伝的構成の差について検討し、景観スケールで流動する花粉の遺伝的特徴を明らかにした。その結果、景観スケールで流動する花粉を構成しているアレルは非常に変異に富んでいることが明らかになった。3クローンが捕捉した花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成はクローン間で有意差が確認されず、遺伝的多様性は天然林と同程度に高く、散布源と考えられる8つのアカマツ集団の遺伝子プールの遺伝的多様性と有意差が検出されなかった。これらの結果から、この調査地の花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成は変化しないこと、景観スケールで流動する花粉の遺伝的特徴は散布源となる同樹種集団の遺伝的背景が反映されることが明らかになった。

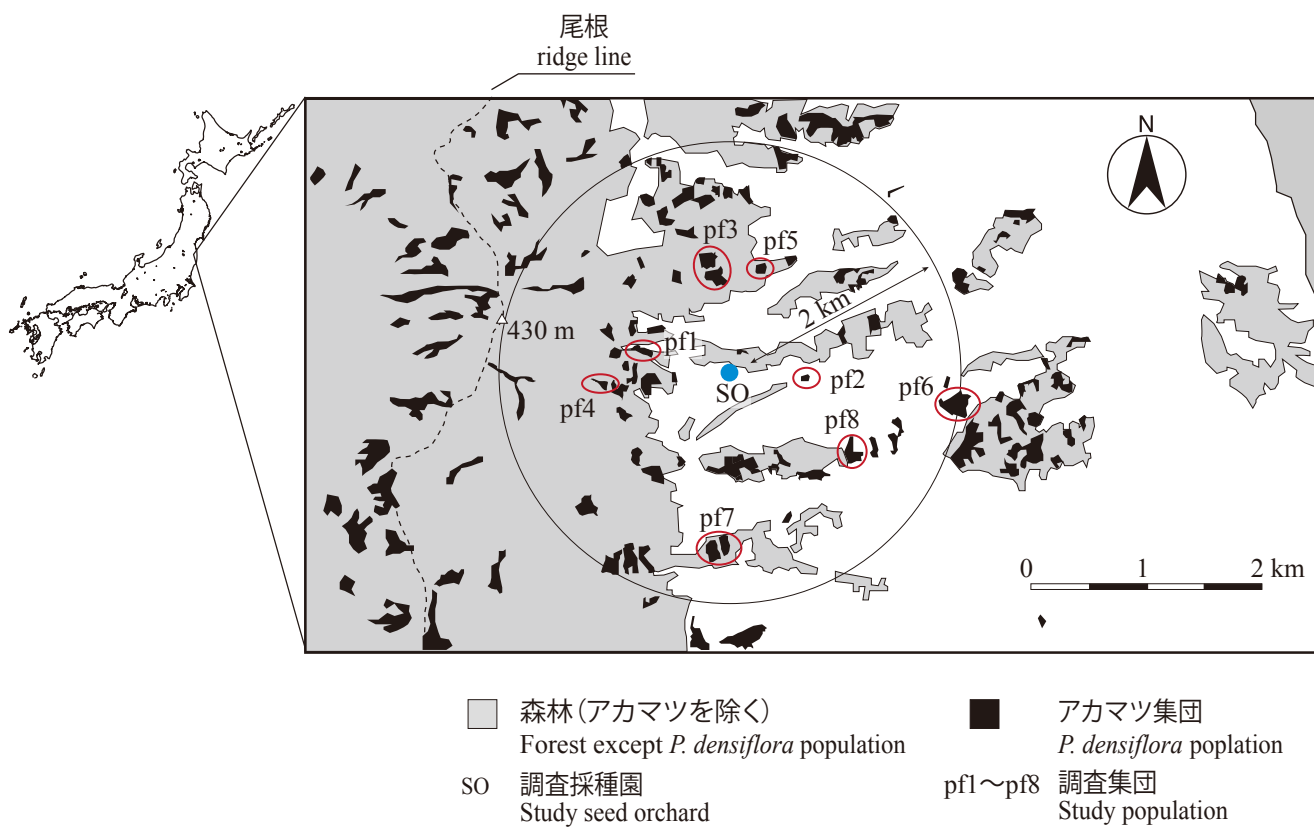


図 - 4. 1 調査対象とした採種園およびアカマツ集団\*

\*、図 - 3. 1から再掲。

Fig. 4. 1 Location of study seed-orchard and 8 study *P. densiflora*-populations\*

\*、Reinserted of Fig. 3. 1.

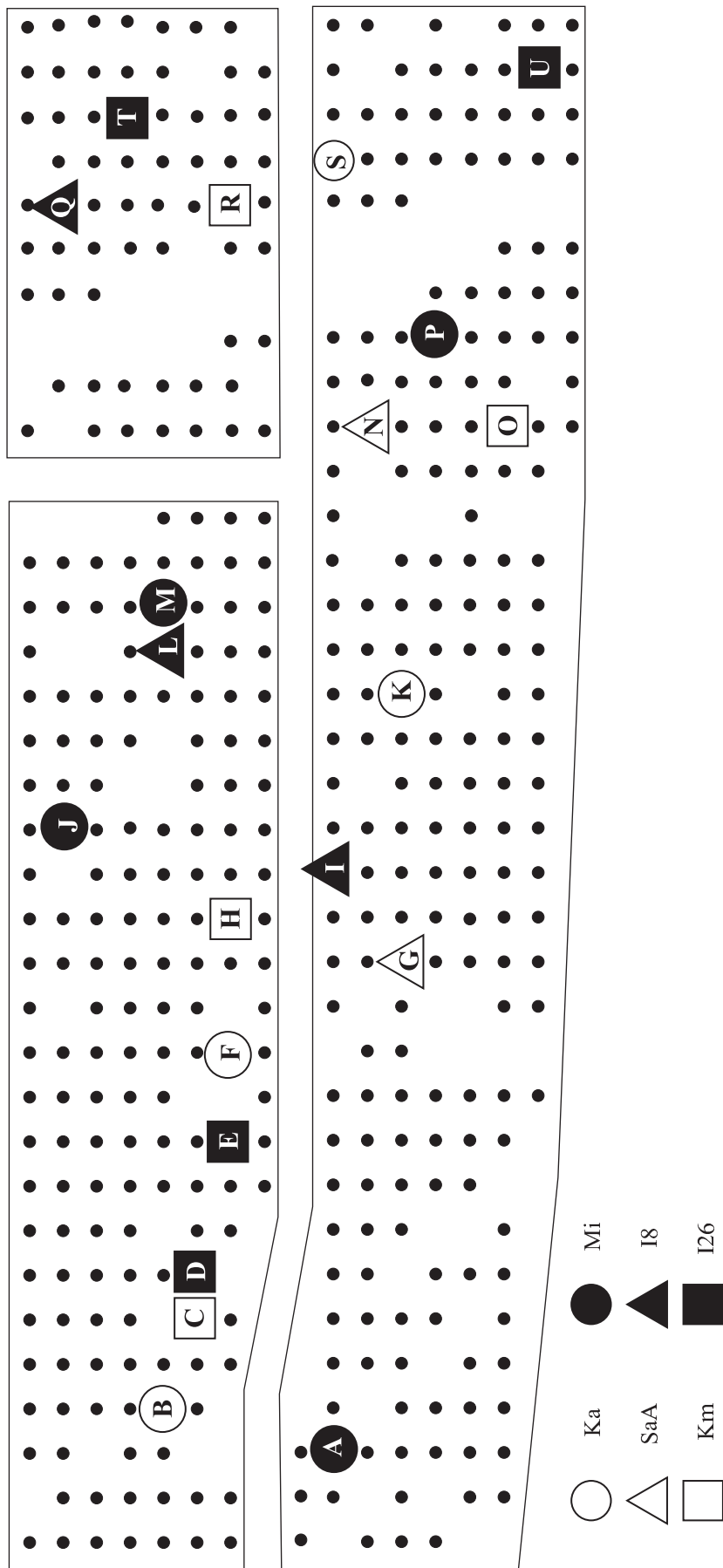


図-4.2 採種園における種子の花粉親分析に用いた調査個体の位置\*

\*、異なる図形は異なる調査クローンを、図形中のアルファベットは個体識別記号を示す。クローン名の略語は表-4.1に示す。

Fig. 4.2 Location of the study ramets used for the identification of pollen parents of their seeds in the seed orchard\*

\* , Different symbols indicate the study clone and each alphabet within the symbol indicate ID of study ramet. Abbreviated clone names are showed in Table. 4. 1.



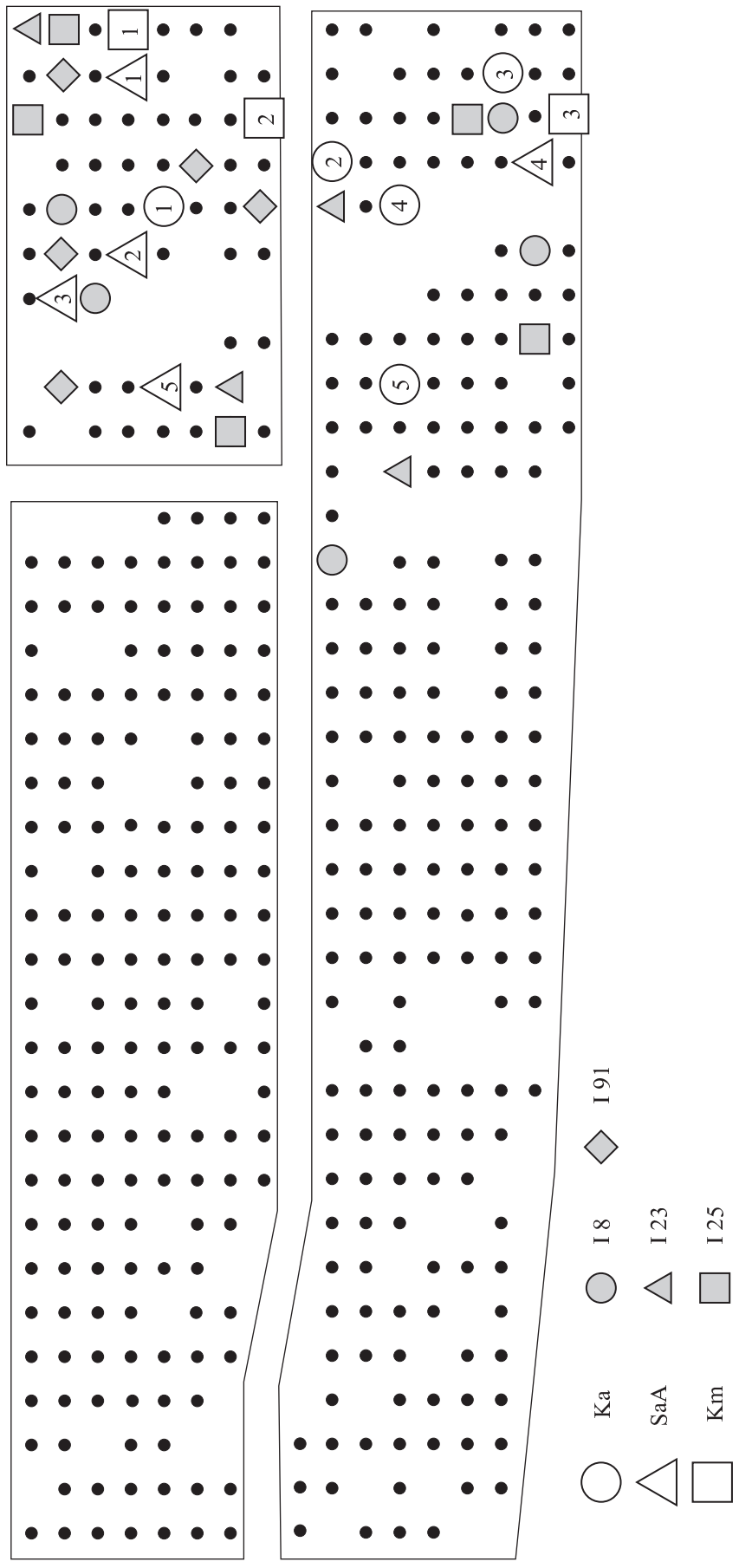


図-4.3 採種園における開花過程の調査に用いた個体の位置\*  
 \*、異なる図形は異なるクローンを、図形中の数字は調査個体番号を示す。略語は表-4.1に示す。  
 Ka、SaA、Km: 雄花と雌花の開花過程を調査したクローン。  
 I8、I23、I25、I91: 調査地における花粉飛散期間の推定に用いたクローン。

Fig. 4. 3 Location of the ramets used for monitoring the flowering phenology in the orchard\*  
 \*, Each symbol indicates the study clone and the number within a symbol indicate study ramet no.. Abbreviated clone names are showed in Table 4. 1.  
 Ka, SaA and Km were used for the monitoring the phenology of male and female flowers.  
 I8, I23, I25 and I91 were used for the estimation of pollen dispersal period in the study area.

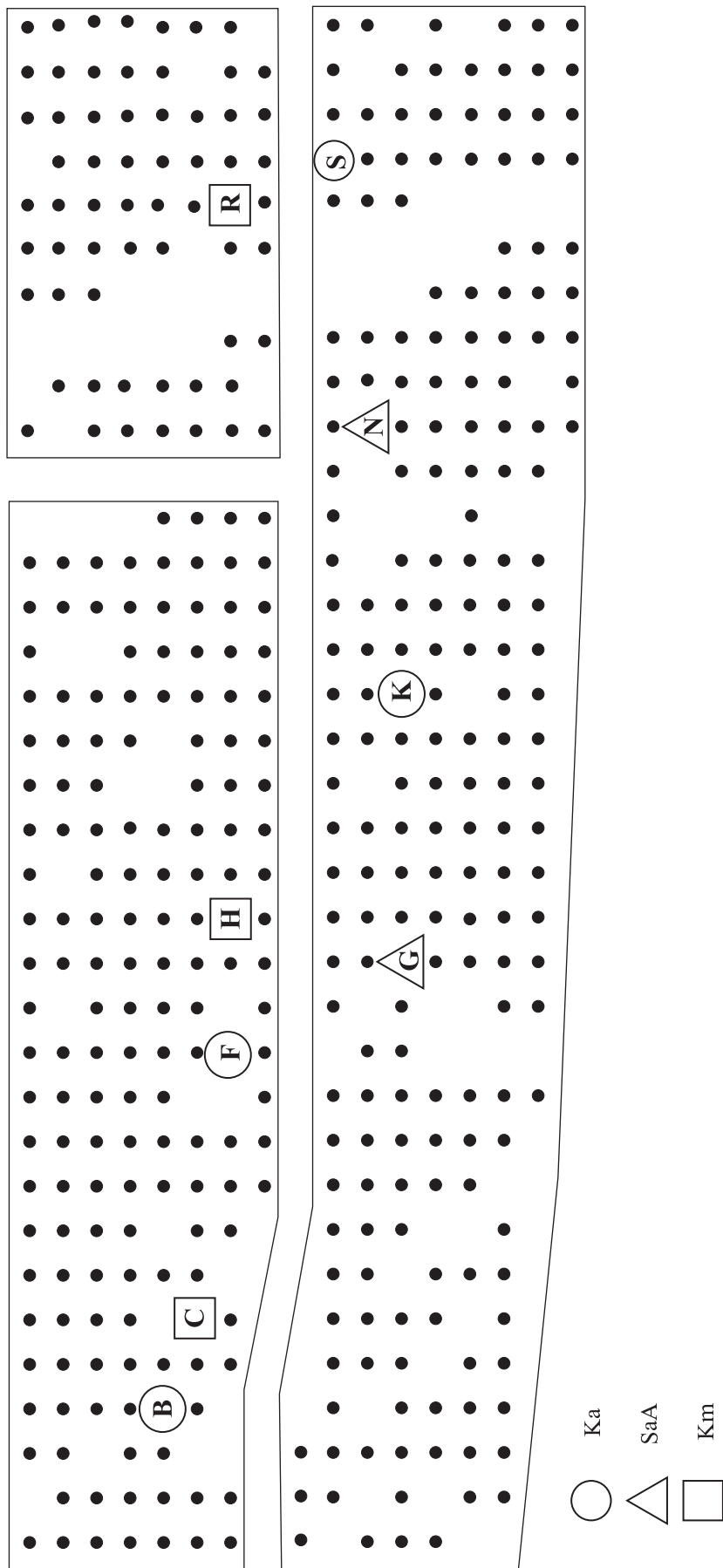


図-4.4 採種園における種子の花粉親分析を行った個体の位置  
B~Sのアルファベットは図-4.2で示された個体識別記号と同じものである。

Fig. 4.4 Locations of study ramets for paternal analysis of their seeds in the seed orchard  
“B” to “S” labels were study ramet ID showed in Fig. 4. 2.

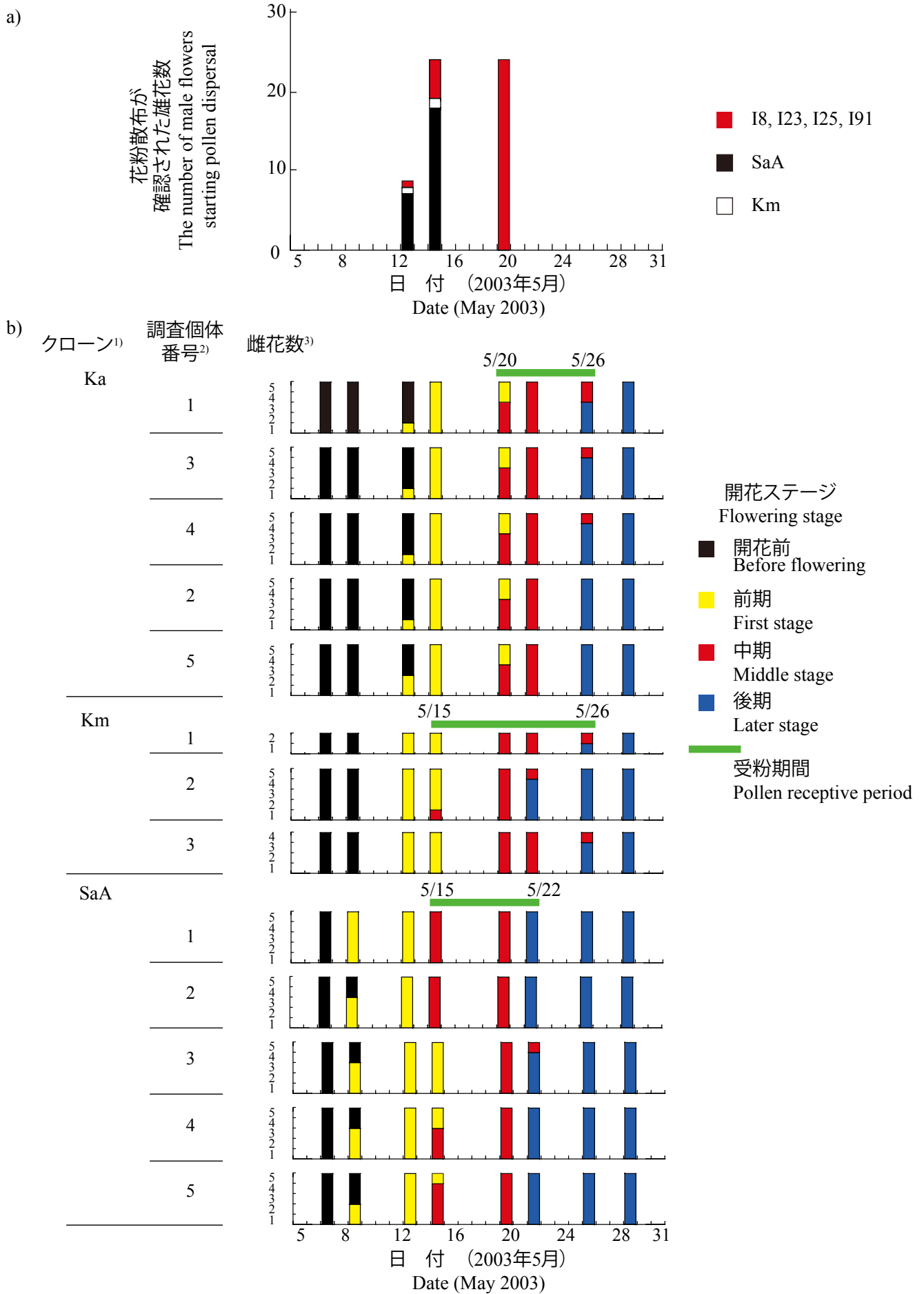


図 - 4.5 採種園における雄花a)および雌花開花の過程b)  
Kmの調査個体では雌花が着生しなかったため、着生した最大数(調査個体番号1では2花、調査個体番号3では4花)の調査を行った。  
Fig. 4.5 Flowering phenology of a) male and b) female flowers in the seed orchard  
Study ramets (no.1 and no.3) had not enough female flowers. Then, only 2 flowers (no.1) and 4 flowers (no.4) were monitored. 1) clone, 2) study ramet no., 3) the number of female flowers.

表- 4. 1 調査対象としたマツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園の植栽ラメートの概要  
 Table 4. 1 Profiles of the ramets planted in the nematode-resistant *P. densiflora* clonal seed orchard as the study site

クローン名 Clone	記号 Abbreviation	植栽年 Year of planting	植栽本数 No. of ramets	平均樹高 Mean height of ramets (cm±SD)	平均胸高直径 Mean DBH of ramets (cm±SD)	選抜県 Origin of ortet
三本木5 Sanbongi-5	SaA, SaB, SaC	1998	35	354 ± 20	5.5 ± 0.5	青森 Aomori
岩手104 Iwate-104	It	1998	7	301 ± 50	2.4 ± 1.2	岩手 Iwate
盛岡1 Morioka-1	Mo	1998	14	246 ± 45	2.0 ± 0.7	"
岩泉101 Iwaizumi-101	Ii	1998	30	309 ± 31	3.4 ± 1.1	"
一関101 Ichinoseki-101	Ic	1998	33	289 ± 28	3.8 ± 0.8	"
上閉伊101 Kamiheii-101	Km	1998	35	358 ± 59	4.8 ± 0.8	"
牡鹿102 Ojika-102	Oj	1998	35	254 ± 41	3.2 ± 0.9	宮城 Miyagi
宮城101 Miyagi-101	Mi	1998	39	315 ± 49	4.4 ± 1.2	"
北蒲原2 Kitakanbara-2	Ki	1998	43	283 ± 53	4.2 ± 1.2	新潟 Niigata
刈羽102 Kariha-102	Ka	1998	43	313 ± 22	4.9 ± 0.8	"
いわき23 Iwaki-23	I23	2001	27	97 ± 32	1.4 ± 0.4	福島 Fukushima
いわき26 Iwaki-26	I26	2001	31	114 ± 26	1.7 ± 0.4	"
いわき25 Iwaki-25	I25	2001	21	92 ± 11	1.7 ± 0.2	"
いわき8 Iwaki-8	I8	2001	19	107 ± 17	1.8 ± 0.2	"
いわき94 Iwaki-94	I94	2001	18	103 ± 20	2.0 ± 0.3	"
いわき91 Iwaki-91	I91	2001	12	89 ± 25	1.7 ± 0.2	"
合計 Total			442			

三本木5はクローン同定の結果、3つのクローンで構成されていた。そのため、3種類の略語、SaA、SaB、SaCを記した。

Ramets of Sanbongi-5 were composed of three clone. Therefore, Sanbongi-5 was abbreviated to three name, SaA, SaB and SaC.

表- 4. 2 5つのマイクロサテライトマーカーの多型性

Table 4. 2 Polymorphism of 5 microsatellite markers

遺伝子座	ヘテロ接合度の 観察値	遺伝子多様度	排斥確率
Locus	Observed heterozygosity	Nei's unbiased gene diversity	Exclusion probability of the first parent
	$H_O$	$H_E$	EP1
pdms009	0.883	0.874	0.614
pde14	0.912	0.899	0.662
bcpd502	0.934	0.909	0.694
bcpd006	0.868	0.905	0.684
bcpd222	0.859	0.853	0.542
平均 Mean	0.891	0.888	-
遺伝子座全体 All loci		0.892	0.994

花粉親識別に用いた種子の一部(879種子)と採種園植栽木(442本)をもとに算出された。

Polymorphism was calculated used the part of seeds analyzed (879 seeds) and the planted trees (442 trees) in the seed orchard for paternity analysis.

表-4.3 調査個体の種子の花粉親の由来

Table 4.3 The origin of paternal parents of the seeds collected from study ramets

調査個体 Study ramet	個体 識別記号 ID	クローン Clone	分析種子数 The number of seeds analyzed	園外 orchard	花粉親の由来 The origin of pollen parent of the analyzed seed (%)																		
					園内 (クローンごとの花粉親としての貢献度) In the orchard (Clonal contribution as pollen parent)																		
					全体	SaA	SaB	SaC	Ic	li	Km	Mo	Mi	Oj	Ka	Ki	I24	I26	I27	I91	I92		
A	Mi		29	89.7	10.3	-	3.4	6.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
B	Ka		96	92.7	7.3	-	1.0	3.1	-	2.1	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-			
C	Kim		86	94.2	5.8	2.3	-	1.2	-	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2			
D	I26		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
E	I26		14	85.7	14.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
F	Ka		120	94.2	5.8	1.7	-	0.8	-	1.7	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	0.8			
G	SaA		113	89.4	10.6	5.3	-	3.5	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-			
H	Kim		80	91.3	8.8	-	2.5	2.5	-	1.3	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	1.3			
I	I8		94	87.2	12.8	2.1	1.1	5.3	-	1.1	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	1.1			
J	Mi		73	83.6	16.4	-	4.1	11.0	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
K	Ka		77	92.2	7.8	1.3	1.3	3.9	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-			
L	I8		60	40.0	60.0	3.3	1.7	55.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
M	Mi		110	71.8	28.2	1.8	0.9	23.6	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	0.9			
N	SaA		96	82.3	17.7	2.1	7.3	7.3	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-			
O	Kim		45	80.0	20.0	-	2.2	17.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
P	Mi		57	87.7	12.3	1.8	-	10.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Q	I8		84	46.4	53.6	-	1.2	45.2	1.2	1.2	-	-	1.2	2.4	-	-	-	-	-	1.2			
R	Kim		95	88.4	11.6	-	2.1	6.3	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	1.1			
S	Ka		116	84.5	15.5	1.7	6.0	-	0.9	0.9	-	0.9	-	0.9	-	0.9	1.7	0.9	-	0.9			
T	I26		63	57.1	42.9	-	3.2	34.9	1.6	-	-	-	3.2	-	-	-	-	-	-	-			
U	I26		44	88.6	11.4	-	-	6.8	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.3			
合計 Total				82.0	18.0	1.5	1.9	11.2	0.7	0.1	0.1	0.5	0.2	0.6	0.1	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.5		
園内花粉におけるクローンごとの貢献度 Clonal contribution to the pollen parents in the orchard					100	8.6	10.4	62.4	3.9	0.4	0.7	2.9	1.1	3.2	0.4	1.1	0.7	1.1	0.4	0.4	2.9		

調査個体Dは球果が着生しなかったため、分析できなかった。A～Uの調査個体は図-4.2に示した。

Ramet "D" was unable to analyze because it did not have any cone. Study ramets with A - U were shown in Fig. 4. 2.

表- 4. 4 マツノザイセンチュウの接種試験に供した採種園産実生苗数と苗の花粉親の由来  
 Table 4. 4 The number of seedlings grown from orchard seed lot used for nematode inoculation test and the origin of the pollen parents of them

試験苗の種子親 Seed parents of the seedlings tested	接種試験に供した苗数 The number of the seedlings tested	花粉親の由来 The origin of the pollen parents of the seedling	
		園外 Outside the orchard (%)	園内 In the orchard (%)
		SaA	40
SaB	29	100	0
SaC	84	100	0
Oj	116	97.4	2.6
Ka	157	98.1	1.9
Ki	158	99.4	0.6
Mi	162	98.8	1.2
全体 Total	746	98.7	1.3

表- 4. 5 マツノザイセンチュウ接種後の採種園産実生苗と対照としたマツノザイセンチュウ抵抗性クローンの実生苗の生残

Table 4. 5 Survivals of the test seedlings grown from orchard seed lot and the control seedling originated from nematode-resistant clones after the pine-wilt nematode inoculation

材料 Materials	接種苗の種子親 Seed parent of the test seedlings	接種苗数 The number of inoculated seedlings	未接種苗数 <sup>1)</sup> The number of uninoculated seedlings <sup>1)</sup>	正確な接種苗数 <sup>2)</sup> The number of seedlings inoculated <sup>2)</sup>	生存・枯死割合(「c」に対する割合) <sup>3)</sup> Ratio to "c" <sup>3)</sup>			
					枯死 Dead	生存 Survival		
		a	b	c = a - b	%	SD	%	SD
採種園産実生苗 Seedling grown from orchard seed lot	SaA <sup>4)</sup>	40	14	26	50.0		50.0	
	SaB <sup>4)</sup>	29	5	24	45.8		54.2	
	SaC <sup>4)</sup>	84	18	66	65.2		34.8	
	Oj	117	22	95	45.0	17.6	55.0	17.6
	Ka	160	19	141	47.0	17.8	53.0	17.8
マツノザイセンチュウ 抵抗性クローン実生苗 <sup>5)</sup> Control seedling <sup>5)</sup>	Ki	161	39	122	51.9	27.1	48.1	27.1
	Mi	163	34	129	58.2	7.3	41.8	7.3
	Control seedling <sup>5)</sup>	100	0	100	60.0	14.6	40.0	13.6

1) マツノザイセンチュウが樹体に侵入していないと判断された実生苗。

2) マツノザイセンチュウが樹体に侵入したと判断された実生苗。

3) Sa以外の採種園産実生苗の生存・枯死率は乱塊法によって配置された5群の平均値で、「正確な接種苗数に対する割合(c)」で示した。

4) 接種実生苗数が少ないため、1群の生存・枯死率で示す。

5) 抵抗性クローンの実生苗で、1群の生存・枯死率で示す。

1) Nematode was not infested of the pland body.

2) Nematode was infested of the pland body surely.

3) Survival rate of the test seedlings except Sa-seedling was shown the mean of five groups with randomized block design. Survival rate of one group was calculated as the rate of the number of survival seedlings to "The number of inoculated seedling accrately (c)".

4) Survival rate of Sa-seedlings was shown the rate of one group, because the number of inoculated seedling was too low to apply randomized block design.

5) Survival rate of the control seedling was calculated as the rate of the number of survivals to 100 seedlings originated from 5 nematode-resistant clone.



表- 4. 6 調査個体から得られた種子の花粉親の由来と配分法を用いた花粉親の識別能力の評価

Table 4. 6 Origin of paternal parents of the seeds sampled from study ramets and the evaluation of the ability of paternal identification using the categorical allocation method

クローン Clone	ID Study ramets	分析種子数 The number of seeds analyzed	分析種子の花粉親の由来 Origin of the pollen parent of the analyzed seed		園内の由来 In the orchard		園外の由来 Outside the orchard		花粉親の識別能力 The ability of paternal identification			
			No.	%	No.	%	No.	%	閾値の LOD Threshold value of LOD	エラー率 (%) Error rate		分析の 正解率 (%) Correct classification
										Type I	Type II	
SaA	G	113	101 (89.4)	12 (10.6)	12 (10.6)	0.7	9.6	3.0	0.7	9.6	88.2	
	N	96	79 (82.3)	17 (17.7)	17 (17.7)	1.1	9.9	3.0	1.1	9.9	90.4	
Km	C	86	81 (94.2)	5 (5.8)	5 (5.8)	0.1	5.7	3.0	0.1	5.7	89.9	
	H	80	73 (91.3)	7 (8.8)	7 (8.8)	2.0	8.4	3.0	2.0	8.4	88.2	
	R	95	84 (88.4)	11 (11.6)	11 (11.6)	2.8	9.5	3.0	2.8	9.5	84.3	
	B	96	89 (92.7)	7 (7.3)	7 (7.3)	0.1	9.0	3.0	0.1	9.0	92.4	
Ka	F	120	113 (94.2)	7 (5.8)	7 (5.8)	0.1	10.6	2.9	0.1	10.6	91.6	
	K	77	70 (92.2)	7 (7.8)	7 (7.8)	0.1	14.6	3.0	0.1	14.6	89.9	
	S	116	98 (84.5)	18 (15.5)	18 (15.5)	0.8	10.5	3.0	0.8	10.5	88.1	
合計 Total		879	788 (89.6)	91 (11.5)	91 (11.5)							

表-4.7 採種園の調査個体が捕捉した園外花粉プールと調査集団の遺伝子プールの遺伝的多様性

Table 4.7 Genetic diversity of the immigrant pollen pools captured by study ramets in the seed orchard and the gene pools of the study populations

材料 Materials	集団 Population	クローン Clone	個体識別記号 ID	分析数 <i>n</i>	遺伝的多様性 Genetic diversity		
					<i>R</i>	<i>PR</i>	$H_E$
園外花粉プール Immigrant pollen pool		SaA	G	101	17.40	0	0.895
			N	79	15.62	0.00	0.890
		mean			16.51	0.00	0.893
		Km	C	81	17.22	0.21	0.898
			H	73	16.82	0.39	0.898
			R	84	18.05	0.36	0.903
		mean			17.36	0.32	0.900
		Ka	B	89	17.54	0.00	0.906
			F	113	17.81	0.15	0.896
			K	70	17.46	0.01	0.901
			S	98	17.44	0.03	0.896
		mean			17.56	0.05	0.900
	成木の遺伝子プール Gene pool of mature trees					17.26	0.13 <sup>a</sup>
pf1				53	18.58	0.50	0.897
pf2				33	15.94	0.20	0.890
pf3				37	17.91	0.23	0.902
pf4				38	16.88	0.01	0.893
pf5				32	16.35	0.01	0.874
pf6				45	18.64	0.74	0.906
pf7				29	16.40	0.40	0.898
pf8				39	18.04	0.77	0.893
		mean			17.34	0.36 <sup>b</sup>	0.894

*R*, 平均アレリックリッチネス; *PR*, 平均プライベートアレリックリッチネス;  $H_E$ , 平均遺伝子多様度。 *R* と *PR* は 58 遺伝子に調整して算出した。花粉プールの遺伝的多様性のクローン間差及び園外花粉プールと遺伝子プールの遺伝的多様性の差はボンフェローニ補正の下で、ANOVA によって検定した ( $P < 0.05$ )。数字の肩に記したアルファベットは有意差があることを示している。

*R*, mean allelic richness; *PR*, mean private allelic richness;  $H_E$ , mean Nei's unbiased gene diversity. *R* and *PR* values adjusted to a sample of 58 genes. Significant differences in immigrant pollen pools among clones and between total immigrant pollen pool and total gene pool were tested by ANOVA with Bonferroni correction ( $P < 0.05$ ). Different alphabets next to the figures in the column showed significant difference.

表- 4. 8 AMOVAによる園外花粉プールの遺伝的構成のクローン間差の検定と全遺伝子プール<sup>1)</sup>と各クローンの園外花粉プール<sup>1)</sup>の遺伝的構成の差の検定

Table 4. 8 Difference among clones in genetic composition of immigrant pollen pools, and difference between total gene pool<sup>1)</sup> and the immigrated pollen pool of each clone tested by AMOVA

Target for the difference test in genetic composition		変動の要因		平均平方	変動推定値	%	$\phi$	P-value
遺伝的構成の差の検定対象		Source of variation		MS	Est. var.			
自由度	df							
<b>園外花粉プールのクローン間</b>								
Among clones of immigrant pollen pools								
	2	クローン間	Among clones	2.418	0	0	-0.001	ns
	6	クローン内の調査個体間	Among ramets within clone	2.993	0.009	0%	0.004	< 0.05
	779	調査個体内の花粉間	Among pollen within ramet	2.185	2.185	100%		
<b>園外花粉プールと全遺伝子プール間</b>								
Between total immigrant pollen pool <sup>2)</sup> and total gene pool								
	1	全園外花粉プールと全遺伝子プール間	Between total pollen pool and total gene pool	4.647	0.003	0%	0.001	< 0.05
	1516	全園外花粉プールと全遺伝子プール内	Within total pollen pool and total gene pool	2.252	2.252	100%		
<b>Saの園外花粉プールと全遺伝子プール間</b>								
Between immigrant pollen pool of Sa and total gene pool								
	1	花粉プールと全遺伝子プール間	Between pollen pool and total gene pool	553.768	1.874	43%	0.427	< 0.05
	1	各花粉プールと全遺伝子プール間	Among pollen pools and gene pool	4.689	0.025	1%	0.010	< 0.05
	908	花粉プールと全遺伝子プール内	Within pollen pools and gene pool	2.488	2.488	57%		
<b>Kmの園外花粉プールと全遺伝子プール間</b>								
Between immigrant pollen pool of Km and total gene pool								
	1	花粉プールと全遺伝子プール間	Between pollen pool and total gene pool	747.392	2.052	45%	0.450	< 0.05
	2	各花粉プールと全遺伝子プール間	Among pollen pools and gene pool	2.998	0.006	0%	0.002	ns
	966	花粉プールと全遺伝子プール内	Within pollen pools and gene pool	2.507	2.507	55%		
<b>Kaの園外花粉プールと全遺伝子プール間</b>								
Between immigrant pollen pool of Ka and total gene pool								
	1	花粉プールと全遺伝子プール間	Between pollen pool and total gene pool	961.416	1.921	42%	0.415	< 0.05
	3	各花粉プールと全遺伝子プール間	Among pollen pools and gene pool	5.405	0.029	1%	0.011	< 0.05
	1098	花粉プールと全遺伝子プール内	Within pollen pools and gene pool	2.675	2.675	58%		

1) 全遺伝子プールは8つ集団の成木の遺伝子プールを一つのグループにしたもの。

2) 全園外花粉プールは9つの園外花粉プールを一つのグループにしたもの。ns, 有意差なし。 $\phi$ 値の有意性は1,000回のランダム推定によって得た。

1) Total gene pool was defined as 8 gene pools of mature trees in populations were grouped together to one group.

2) Total immigrant pollen pool was defined as 9 immigrant pollen pools were grouped together to one group. ns, no significant. P-value for  $\phi$  was obtained from 1,000 permutations.

## 第5章 シードレインの遺伝的多様性に寄与する遺伝子流動

### 5.1 はじめに

第3章において、調査対象集団では集団サイズに関わらず集団の子世代であるシードレインで高い遺伝的多様性が維持されており、分断化が集団の遺伝的多様性に与える影響はないと判断された。一般的に、分断化集団や隔離集団では集団の遺伝的多様性の維持に集団外から飛来する花粉が貢献している (e.g. Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007, Pakkad *et al.*, 2008)。特に、マツ属では花粉による広域的な遺伝子流動が示唆されており (第2章)、第3章で明らかにされたアカマツ集団におけるシードレインの遺伝的多様性の高さや固定指数の低さ ( $F_{IS}=0$  とみなせる) は集団内の親どうしの交配の結果だけで実現されたものではなく、景観スケールで流動する花粉 (= 集団外から飛来する花粉) の影響があると考えられる。そして、実際に景観スケールで流動する花粉が存在し、その遺伝的多様性は高いことが示された (第4章)。

これまで、景観スケールで流動する花粉の集団の遺伝的多様性への寄与が示唆されていたが、多くの集団が存在する景観において、そうした花粉が集団の子世代に親としてどれくらい貢献しているのかはこれまで評価されていない。なぜならば、対象とする景観内に同樹種の集団が多く存在する場合、親候補個体が膨大な数になり、集団外の花粉と集団内の花粉を正確に区別することが困難だからである (第2章)。花粉の動態は風向きや地形の影響を受け (Schueler and Schluünzen, 2006)、集団によって集団外から飛来する花粉量は差がある (O'Connell *et al.*, 2007) ことなどから、集団外から飛来する花粉の貢献はその集団が置かれた立地環境の影響を受けると考えられる。

そこで、5.2節では、規模が異なる集団において、景観スケールで流動する花粉がその子世代に与える影響を間接的に評価する。具体的には、まず、集団内の親がシードレインにどれくらい貢献しているかを明らかにする。集団からシードレインと成木をランダムにサンプリングし、花粉親識別法によって、サンプリングした成木のシードレインに対する貢献度を推定する。このことで、シードレインに対する集団内で選定された成木の花粉親としての貢献度の観察値を得る。この観察値を集団内の全ての成木がシードレインの花粉親として均等に貢献すると仮定して算出した期待値と比較することで、集団内の成木から散布された花粉による遺伝子流動を評価する。また、算出された観察値と集団の規模の相関関係の有意性を検証し、集団の規模によって集団内で選定された成木の貢献度がどのように変わるのかを明らかにする。

次に、シードレインに貢献した花粉親の数を推定する。分析には新しく開発された親子識別法の一つである近親関係復元法 (sibship reconstruction [Jones and Wang, 2010]) を用いてシードレインに貢献した花粉親の総数及びある 1 つの花粉親がシードレイン内のいくつかの種子の花粉親となったかを推定する。また、推定された花粉親の総数と集団の規模の相関関係の有意性を検証し、集団の規模によってシードレインに貢献した花粉親数がどのように変わるのかを明らかにする。

最後に、シードレインに対する景観スケールで流動する花粉の影響を 2 つの関係を比較することで間接的に評価する。すなわち、「シードレインに対する集団の成木の花粉親としての貢献度と集団の規模の関係」と「シードレインを構成する花粉親数と集団の規模の関係」の比較を行う。シードレインに貢献した花粉親が集団の成木のみであれば、この 2 つの関係は同じ傾向を示し、景観スケールで流動する花粉の影響があれば、同じ傾向を示さないと想定される。

さらに、5. 3 節では種子の遺伝子流動について取り上げる。マツ属のような風散布型の種子は広域的な遺伝子流動の担い手になり得る可能性があることを第 2 章で述べた。また、第 3 章において、シードレインの母性アレルの遺伝的多様性 ( $H_E=0.856$ ) が天然林 ( $H_E=0.805\sim 0.894$  [Iwaizumi *et al.*, 2013b]) と同程度に高かったことから、母性アレルの遺伝的多様性も父性アレルと同程度貢献することで、シードレインの遺伝的多様性の高さが実現されていることが示唆された。母性アレルの遺伝的多様性の高さに貢献しているのが集団内の親から散布された種子だけなのか、集団外から飛来する長距離散布種子も含まれているのかは明らかにされていない。そこで、本節では集団外から飛来する長距離散布種子がシードレインに対してどれくらい貢献しているかを明らかにする。

TwoGener 法 (Austerlitz and Smouse, 2001) や the mixed mating model をもとにした近親交配の推定 (Ritland, 2002) などの統計的な手法は花粉親に関する分析を行うために開発されており、種子による遺伝子流動に適用するのは困難である。一方、親子識別法は種子にも適用することができる。しかしながら、本調査地のように景観内に極めて多くの親候補が存在する場合、花粉親の識別と同様に、集団外からの飛来する長距離種子を正確に区別することは困難である (Sork *et al.*, 1998)。また、種子の重量は花粉よりも重く、散布量は花粉よりも少ないため、種子の長距離散布はまれにしか発生しない事象と考えられており、長距離散布種子を直接捕捉することは困難だと考えられている (Nathan and Muller-Landau, 2000)。

そこで、5. 2 節で採用した手法を用いて長距離散布種子がシードレインに親としてどれくらい寄与しているかを間接的に評価することを試みる。また、算出された各パラメー

ターを5. 2節の結果（花粉による遺伝子流動）とも比較することで、分断化された集団の遺伝的多様性に与える長距離散布種子の影響を明らかにする。

## 5. 2 景観内を流動する花粉の寄与

### 5. 2. 1 材料と方法

#### サンプリング、DNA 抽出、PCR

第3章で設定した8つのアカマツ集団（pf1～pf8、図-3.1[P42]の下段）と各集団で採取されたシードレインを利用して、集団間を流動する花粉が集団の遺伝的多様性に与える影響を評価する。調査集団から成木の針葉とシードレインのサンプリングを3. 3. 1に示した方法で行った。これらの成木の針葉、シードレインの胚と胚乳からのDNA抽出及びPCRを付録-1[P137]に示した方法で行った。PCRには3. 3. 1で用いた8つのマイクロサテライトの遺伝子座を利用した（表-3.3[P46]）。

#### 統計分析

##### シードレインに対する集団内の親の貢献度の推定

集団の成木のシードレインに対する貢献度が集団の規模によってどのように変わるかを推定した。まず、親子識別プログラム（FaMoz, [Gerber *et al.*, 2003]）にデータを入力させるためにシードレインの既知の父性アレルと一つの偽アレルを組み合わせ、1個体の偽親木から得た子集団を作成した（以下、架空の子集団とする）。このとき、偽アレルは本研究で検出されたアレル以外の値を与えた。例えば、実際に検出されたアレルが98～280の範囲であれば、400を偽アレルとした。そして、各集団からサンプリングされた成木（以下、調査木とする）が偽種子集団の花粉親としてどれだけ貢献しているかを配分法（付録-2[P138]）によって評価した。その後、シードレインの花粉親が調査木である観察確率（ $P_o$ ）を以下により求めた。

$$P_o = n_o/n$$

ここで、 $n_o$ は花粉親が調査木であると同定されたサンプル数、 $n$ は分析に供したサンプル数である。

$P_o$ を任意交配集団における成木のシードレインに対する貢献度と比較した。すなわち、各集団を構成している全個体が繁殖可能（成木）であるとみなし、集団内の全ての成木がシードレインの花粉親になる期待確率（ $P_e$ ）を以下の仮定により次式により算出した。

- 1) 集団内の全ての成木が均等にシードレインに貢献すること。
- 2) 自殖がないこと。

$$P_e = n_e / PS$$

ここで、 $n_e$  は調査木数、 $PS$  は集団の立木本数である。各集団の立木本数は表-3.1[P44]に示した。

$P_o$  と  $P_e$  の差の有意性をフィッシャーの正確確率検定 (Fisher's exact probability test) によって検定した (ボンフェローニ補正を適用し、 $P < 0.05$ )。また、 $P_o$  と集団の規模 (面積及び立木本数) の相関をスピアマンの順位相関分析によって検定した (ボンフェローニ補正を適用し、 $P < 0.05$ )。このとき、面積 (ha) と立木本数は自然対数に変換した。

#### シードレインに貢献する親数の推定

シードレインの花粉親数や花粉親あたりの種子数 (一人の父親が何人の子供を持っているか) を近親関係復元法 (sibship reconstruction、 [Wang, 2004, Ashley *et al.*, 2008]) を用いて推定した。この手法は子集団のマルチローカスの遺伝子型を用いてグループ最尤法 (the group likelihood approach) によって子集団を異なるクラス (両親が同じ、片親が同じ、全く関係ない) にグループ分けを行うアルゴリズムによって構成されている。グループ最尤法は、近年、マルハナバチ (Lepais *et al.*, 2010) や巻貝 (Read *et al.*, 2012) 等の自然に生息し、家系数や個体数が大きな集団に適用されるようになってきた手法である。今回採用したアルゴリズムは、子集団から任意にグループをシミュレーションし、グループの近親度の尤度が最大になるような組み合わせを検出することができる (Jones and Wang, 2010)。近親度の尤度が最大になるグループの構成員が近親関係にある兄弟と判定される。この手法は今まで考慮されてこなかったヌルアレル、アレルの欠失、突然変異、タイピングエラー等も含めて分析することができる。また、このアルゴリズムは 5 つ以上の SSR マーカーを用いることで大きな家系 (50~1,600 サンプル) に適用できること (Wang, 2004)、親や兄弟を特定するためにはグループ最尤法は従来の一対一の最尤法 (the pair-wise likelihood approach、 [Marshall *et al.*, 1998, Kalinowski *et al.*, 2007]) よりも効果的であることが指摘されてきている (Karaket and Poempuang, 2012)。

近親関係復元法を用いて集団の近親関係を分析する場合、分析に用いる分子マーカーに高い分解能力が問題になる。マーカーの分解能が低い場合、不正確なグループ分け (大きな家系が分割される場合や小さな家系が一つにまとめられる場合がある) が行われる可能

性がある (Wang and Santure, 2009)。Sefc and Koblmüller (2009) はこの方法で適切に分析がなされるには少なくとも、5~7 マーカーで  $H_E=0.84$ 、排除確率  $p=0.9969$  が必要であると指摘している。

本研究では、近親関係復元法で推定されるシードレインの花粉親数をシードレインの花粉親の総数 (NPP, Total number of pollen parents of the seed rain) とし、各集団の NPP と花粉親あたりの種子数を以下の遺伝情報をもとに推定した。すなわち、先に作成した架空の子集団と集団の調査木の遺伝情報を利用して NPP と花粉親あたりの種子数の推定を行った。例えば、集団 pf1 の NPP と花粉親あたりの種子数は 57 サンプルで構成される架空の子集団と 53 本の調査木と架空の親木 1 本 (前述した偽アレルをホモで与えた。) で構成される親集団の遺伝情報を用いて推定した。親の遺伝情報を用いなくても NPP や花粉親あたりの種子数の推定は可能であるが、片親の情報が存在することで、解析結果の信頼性が高まるため、架空の子集団の情報とあわせて入力した。この時、タイピングエラー率を 0.5%、アレルのドロップアウトなどによるエラー率を 1.5% とした。

また、シードレインの花粉親数は最尤推定親数 (MLE(N), the maximum likelihood estimate of breeding parent) でも推定した (Signorovitch and Nielsen, 2002)。MLE(N) は親子鑑定をベイズ推定によって行うソフトウェア PATRI (Signorovitch and Nielsen, 2002) で算出されるパラメーターである。親子鑑定のアルゴリズムの過程で MLE(N) が算出される。サンプリングされた調査木とシードレインの間に親子関係が見つからない場合、調査木からシードレインが得られる事後推定確率が 0 になるため、MLE(N) は計算上の最大値 10,000,000 が示される。この場合、MLE(N) は適切に親数を推定していないと判断した。本研究では近親関係復元法で用いた集団ごとの調査木と架空の子集団の情報をもとに、MLE(N) を算出した。

シードレインの親数と集団の規模がどのような関係にあるかを検定するために、2 つのパラメーター、NPP 及び MLE(N)、と集団の規模 (面積、立木本数) の相関関係をスピアマンの順位相関分析によって行った (ボンフェローニ補正を適用し、 $P<0.05$ )。このとき、面積 (ha) と立木本数は自然対数に変換した。

これら遺伝的パラメーターの算出や統計分析に使用したソフトウェアは付表-1[P136]に示した。

## 5. 2. 2 結果

### シードレインに対する集団内の親の貢献度

本章で用いた 8 つのマイクロサテライトの遺伝子座の多型性は表-3.3[P46]に示した。



調査木がシードレインの花粉親である観察確率 ( $P_o$ ) は、最小が pf4 の 0 で、どの調査木も花粉親として貢献していなかった。最大は pf1 の 0.19 (57 種子のうち 11 種子) であった (図-5.1[P97])。pf4 以外の 7 集団では、 $P_o$  は期待確率 ( $P_e$ ) と有意差がないか、 $P_e$  よりも有意に大きかった。具体的には 4 集団 (pf2、pf3、pf6、pf7) では  $P_o$  は  $P_e$  と有意差はなく、3 集団 (pf1、pf5、pf8) では、 $P_e$  よりも有意に大きかった。 $P_o$  は集団の面積と有意な負の相関関係が検出され ( $\rho=-0.732$ 、 $P<0.05$ )、集団の立木本数とは相関係数は負であったが、有意性は検出されなかった ( $\rho=-0.565$ 、ns) (表-5.2[P102]及び付表 2[P137]を参照)。

### シードレインに貢献した親数

シードレインの花粉親の総数 (NPP) は最小が pf6 の 33 個体、最大が pf8 の 46 個体であり、8 集団の平均は 41 個体であった (表-5.1[P101])。各集団の NPP は集団の規模 (面積、立木本数) と有意な相関関係は検出されなかった (面積、 $\rho=-0.119$ ; 立木本数、 $\rho=-0.036$ ) (表-5.2[P102]及び付表 2[P137]を参照)。シードレインを構成する親はその多くが 1 種子もしくは 2 種子のみに貢献していた (図-5.2[P98])。言い換えれば、シードレインのある花粉親の種子は 1 個もしくは 2 個である場合が多く、3 個以上種子の花粉親はほとんどいなかった。2 個以下の種子の花粉親の数はシードレインの親数の 9 割以上を占めており、最小が pf6 の 30 個体で親数の 90.9%、最大が pf4 の 41 個体で 100% であった。

最尤推定花粉親数 (MLE(N)) は最小が pf5 の 203、最大が pf7 の 1,684、平均 627 であった (表-5.1[P101])。サンプリングした調査木の遺伝子型から子孫の遺伝子型をベイズ推定した時に、採取した種子に合致する事後推定確率が pf3 と pf4 では 0 であった。したがって、これらの集団では正確に MLE(N) は算出されていないと判断した。また、MLE(N) と集団の規模 (面積、立木本数) は有意な相関関係は検出されなかった (面積、 $\rho=0.843$ ; 立木本数、 $\rho=0.314$ ) (表-5.2[P102]及び付表 2[P137]を参照)。

## 5. 2. 3 考察

### マイクロサテライトの多型性

分析に用いた 8 つの遺伝子座は他の親識別で用いられており (Lian *et al.*, 2001, Iwaizumi *et al.*, 2007, Iwaizumi *et al.*, 2010)、本節での花粉親識別や次節での種子親識別に十分に耐え得ると判断した。また、遺伝子座数=8、 $H_E=0.866$ 、 $EP1=0.9996$  は「5. 2. 1 材料と方法」で述べた近親関係復元法で適切に分析がなされる条件として Sefc and Koblmüller (2009) が示した値: 遺伝子座数>5~7; 遺伝子多様度  $H_E>0.84$ ; 排除確率  $p>0.9969$  を満たしており、本章で行う近親関係復元法による分析に十分に耐え得ると判断した。

### シードレインに対する集団内の親の貢献

シードレインの花粉親が調査木である観察確率  $P_o$  は pf4 以外、期待値  $P_e$  と同じか、 $P_e$  よりも有意に大きかった。この結果は多くの集団ではシードレインに対する集団内の成木の貢献は期待値よりも大きい、もしくは期待値と同じであることを示しており、集団内の遺伝子流動がランダム交配よりも制限されているものの、ランダム交配に近い遺伝子流動を行う集団もあることを示している。

$P_o$  は集団の面積と有意な負の相関関係が検出された。この結果はシードレインに対する集団内の成木の貢献が集団の規模に依存していることを示している。シードレインの採取は集団の規模に依存させて行っていることから、以下のような仮説を立てることができる。集団の面積と立木本数は有意な相関関係にあることから、各集団に設置されたシードトラップ (4 個/ha) の周囲に存在する親数は集団の規模に関わらず同じとみなすことができる (3.3 節)。シードトラップは規模が大きい集団ほど多く設置し (1~15 個、表-3.1[P44])、そこから集団の規模に関わらずランダムに同数の種子 (55~60 種子、表-3.5[P48]) を選んで花粉親鑑定に供した。したがって、シードレインに寄与する集団内の花粉親数は規模が大きい集団ほど多くなると想定される。

この仮説は集団から任意に選定された調査木がシードレインにどれくらい貢献しているかを推定することで評価することができる。花粉親鑑定に用いた調査木数は集団によって大きく変えなかった (集団面積 0.3~3.7ha に対し、29~53 個体、表-3.1[P44]、表-3.5[P48]) ので、先に述べた、「シードレインに寄与する集団内の花粉親数は規模が大きい集団ほど多くなる」という仮説は、規模が小さい集団ほど調査木のシードレインに対する花粉親としての貢献度は大きくなり、規模が大きい集団ほど調査木の貢献度は小さくなるという関係で評価することができる。

$P_o$  が集団の規模に依存するという結果はこの仮説が正しいことを示しており、大多数の遺伝子は親から近い距離しか散布されないという従来の考え方 (e.g. Willson, 1993, Dyer and Sork, 2001, Hanaoka *et al.*, 2007) を支持するものである。したがって、もし、シードレインの花粉親が集団内の親のみに限られるのであれば、シードレインの花粉親数を推定するパラメーターである NPP (シードレインの花粉親の総数) や MLE(M) (最尤推定親数) も集団の規模に依存し、集団の規模が大きいほど大きく、集団の規模が小さいほど小さくなると考えられる。

### シードレインに貢献した親数

一般的に、分断化集団や隔離集団では集団の遺伝的多様性の維持に集団外から飛来する花粉が貢献していることが示されていることから (e.g. Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007, Pakkad *et al.*, 2008)、シードレインには集団外の親も貢献していると考えられる。本調査地では各集団の NPP は分析に供した 55~57 種子に対して 33~46 個体であり、集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。同様に MLE(N) も集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。NPP や MLE(N) と集団の規模との関係はシードレインの親が集団内の親のみで構成されているのではないことを示している。つまり、遺伝子流動が集団内の親のみに限られるのであれば、「シードレインに寄与する集団内の花粉親数は規模が大きい集団ほど多くなる」ので、景観レベルで流動する花粉は、小さい規模の集団においてシードレインの花粉親数に大きく貢献していることが示唆される。

景観レベルで流動する花粉のシードレインに対する貢献は、花粉親あたりの種子数からも示唆される。どの集団においても、ある花粉親の種子は 1 種子もしくは 2 種子が 9 割以上であり、1 つの花粉親が多数の種子に貢献することはなかった。この結果は集団の規模に関わらず、シードレインの父方の近親度が低いことを示している。一般的に、花粉親と種子親の距離が近いのであれば、実生は親の周囲に集中的に分布し、片親が同じ種子や両親が同じ種子による空間的な遺伝構造が作られることが知られている (Hardy *et al.*, 2004, Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004a)。本節の結果は、花粉親と種子親の距離は離れており、遠くに存在する花粉親がシードレインに貢献していることを示している。シードレインの父性アレルの遺伝的多様性が天然林と同じ程度であること (3.3 節) を考慮すると、特に、規模の小さい集団では景観レベルで流動する花粉の影響が顕著に表れ、その集団が保持していない遺伝子を集団外から受け取ることで、シードレインの花粉親数を集団の規模が大きい集団と同程度に増加させていると考えられる。

$P_0$  が集団で差が見られた要因は集団の規模のほかに、調査木の着生量の差が反映したことが考えられる。一般的に、集団を構成する成木が子世代に均等に寄与することがないことは採種園の研究事例から推測することができる。例えば、Tang and Ide (2001) はヒノキ採種園を構成する 25 クロンの種子生産量がクローンによって大きな差があることを明らかにしている。この採種園において、上位 5 クロンの球果生産量は全球果生産量の 44.3% 占め、下位 5 クロンでは 7.6% しか占めない。スギ (Moriguchi *et al.*, 2005) やアカマツの採種園 (Ozawa *et al.*, 2009) でも、植栽されているクローンによって花の着生量には大きな差があることが明らかになっている。これらの知見は景観に分布している集団においても、集団を構成している成木が全て同じ量の花を着生させないことを示している。したがって、

ある集団で調査木をランダムに選定し、集団全体からシードレインをランダムに採取した場合、花を多く着生する調査木ほどシードレインの花粉親として貢献しやすくなると考えられる。

また、多くの集団で集団内の遺伝子流動がランダム交配に近いと判断された理由は、 $P_o$ に集団外の親の影響が加味されているため、集団内交配だけを前提として算出した  $P_e$ との差が検出され難くなったと考えられる。Iwaizumi *et al.* (2013) a は同樹種集団から 100m 程度隔離されたアカマツ集団でシードレインをサンプリングし、シードレインの 59~75%の花粉親が集団外の親であることを明らかにした。この知見は分断化された集団においては、シードレインの花粉親のうち少なくとも数十%程度が集団外の個体であり、景観レベルで流動する花粉によって集団にない遺伝子が持ち込まれることを示唆する。集団外から遺伝的に異なる親が貢献することは、 $P_o$ を低めることに寄与する。つまり、 $P_o$ は  $P_o=n_o/n$  で算出され、 $n_o$ は花粉親が集団内の調査木であると同定された種子数、 $n$ は分析に供した種子数であるため、集団外からの花粉は  $n_o$ を減らすことに寄与すると考えられる。

### 5. 3 長距離散布種子の寄与

#### 5. 3. 1 材料と方法

#### サンプリング、DNA 抽出、PCR

第3章で設定した8つのアカマツ集団 (pf1~pf8、図-3.1[P42]の下段) について、長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響を評価する。調査集団から成木、シードレインの採取を3. 3. 1に示した方法で行った。採取した成木の針葉、シードレインの胚と胚乳からのDNA抽出及びPCRを付録-1[P137]に示した方法で行った。PCRには3. 3. 1で用いた8つのマイクロサテライトの遺伝子座を利用した(表-3. 3[P46])。

#### 統計分析

#### シードレインに対する集団内の親の貢献度の推定

集団内の遺伝子流動の程度が集団の規模によってどのように変わるかを集団の調査木のシードレインに対する貢献度から推定した。まず、親子識別プログラムにデータを入力させるためにシードレインの胚乳から得た母性アレルと一つの偽アレルを父性アレルとして組み合わせ、1個体の偽親木から得た偽子集団(以下、5. 2と同様に架空の子集団とする)を作成した。そして、各集団の調査木と架空の子集団の遺伝情報を用いて付録-2[P138]に示した方法で種子親識別を行った。その後、各集団でシードレインの種子親が集団内の調査木である観察確率を以下により求めた。

$$P_o = n_o / n$$

ここで、 $n_o$ は種子親が集団内の調査木であると同定された偽子集団のサンプル数、 $n$ は分析に供した全サンプル数を表している。また、 $P_o$ を任意交配集団における成木のシードレインに対する貢献度と比較するために、期待確率( $P_e$ )を以下の仮定のもと次式により算出した。

- 1) 集団内の親がすべて均等にシードレインに貢献する。
- 2) 自殖がない。

$$P_e = n_e / PS$$

ここで、 $n_e$ は各集団からサンプリングされた調査木数、 $PS$ は集団の立木本数である。

$P_o$ と $P_e$ の有意差をフィッシャーの正確確率検定(Fisher's exact probability test)を行っ

た（ボンフェローニ補正を適用し、 $P<0.05$ ）。また、 $P_0$ と集団の規模（面積、立木本数）の相関をスピアマンの順位相関分析によって検定した（ボンフェローニ補正を適用し、 $P<0.05$ ）。

#### シードレインに貢献する親数の推定

シードレインの種子親数や種子親あたりの種子数（一人の母親が何人の子供を持っているか）を近親関係復元法（Wang, 2004, Ashley *et al.*, 2008）を用いて行った。この方法によって推定された親数をシードレインの種子親の総数（NSP, Total number of seed parent of the seed rain）とし、各集団の NSP や種子親あたりの種子数を先に作成した架空の子集団の遺伝情報を用いて推定した。例えば、pf1 では 57 個の架空の子集団と 54 本の親（53 本の調査木 + 偽親 1 本）の遺伝情報を用いて推定した。この時、タイピングエラー率を 0.5%、アレルのドロップアウトなどによるエラー率を 1.5%とした。また、シードレインの種子親数は最尤推定親数（MLE(N)）でも推定した（Signorovitch and Nielsen, 2002）。MLE(N)は集団ごとの調査木と架空の子集団の情報をもとに算出した。シードレインの種子親数（NSP や MLE(N)）と集団の規模（面積、立木本数）の相関関係をスピアマンの順位相関分析によって行った（ボンフェローニ補正を適用し、 $P<0.05$ ）。このとき、面積（ha）と立木本数は自然対数に変換した。

#### 花粉の遺伝子流動との比較

種子の遺伝子流動と花粉の遺伝子流動の比較を行うために、5.2の結果を利用して以下の有意差検定を行った。一つは、 $P_0$ 値について、各集団における花粉親と種子親の差をフィッシャーの正確確率検定（Fisher's exact probability test）をボンフェローニ補正のもとで行った（ $P<0.05$ ）。また、シードレインの親数について、NPP 値と NSP 値の差及び花粉親の MLE(N)値と種子親の MLE(N)値の差の有意性を 8 集団をプールし、マン・ホイットニ検定によって行った（ $P<0.05$ ）。

これらの遺伝的パラメーターの算出や統計分析に使用したソフトウェア及び引用文献は付表-1[P136]に示した。

#### 5.3.2 結果

##### シードレインに対する集団内の親の貢献度

集団内の調査木がシードレインの種子親である観察値（ $P_0$ ）は最小が pf4 の 0、最大が pf5 の 0.39 であった（57 種子のうち 13 種子）（図-5.3[P99]）。pf4 では集団内のどの調査

木も種子親として貢献していなかった。pf4 以外の 7 集団においては、 $P_o$  は  $P_e$  と有意差がないか、 $P_e$  よりも有意に大きかった。すなわち、3 集団 (pf2、pf3、pf7) では  $P_o$  は  $P_e$  と有意差はなかった。4 集団 (pf1、pf5、pf6、pf8) では  $P_o$  は  $P_e$  よりも有意に大きかった。種子親の  $P_o$  値は 5 集団 (pf1、pf2、pf3、pf4、pf7) で花粉親の  $P_o$  値と差がなかった。残りの 3 集団 (pf5、pf6、pf8) では種子親の  $P_o$  値は花粉親の  $P_o$  値よりも有意に大きかった。種子親の  $P_o$  値は集団の規模 (面積や立木本数) と負の相関係数が算出されたものの、有意ではなかった (面積、 $\rho=-0.577$ 、ns ; 立木本数、 $\rho=-0.381$ 、ns) (表-5.4[P104]及び付表 3[P138]を参照)。

### シードレインに貢献した親数

シードレインの種子親の総数 (NSP) は最小が pf7 の 28 個体、最大が pf8 の 38 個体であり、8 集団の平均は 34 個体であった (表-5.3[P103])。8 集団の NSP 値は NPP 値 (シードレインの花粉親の総数、平均 41 個体) よりも有意に少なかった (マン・ホイットニ検定、 $P<0.05$ )。NSP は集団のサイズ (面積、立木本数) とも有意な相関関係は検出されなかった (面積、 $\rho=-0.030$ 、ns ; 立木本数、 $\rho=0.220$ 、ns) (表-5.4[P104]及び付表 3[P138]を参照)。

シードレインを構成する種子親はそのほとんどが 1 種子もしくは 2 種子に寄与していた (図-5.4[P100])。言い換えれば、シードレインの中である種子親から散布された種子は 1 個もしくは 2 個である場合が多く、3 個以上種子の種子親はほとんどいなかった。2 種子以下に寄与した種子親数は最小が pf7 の 23 個体で親数の 82%、最大が pf3 と pf5 の 33 個体でそれぞれ、89%、87%あった。

種子親の最尤推定親数 ( $MLE(N)$ ) は最小が pf5 の 83、最大が pf7 の 1,682、平均 482 であった (表-5.3[P103])。8 集団の種子親の  $MLE(N)$  値は花粉親の  $MLE(N)$  値と有意差が検出されなかった。また、種子親の  $MLE(N)$  値は集団の規模 (面積や立木本数) と有意な相関関係は検出されなかった (面積、 $\rho=0.557$ 、ns ; 立木本数、 $\rho=0.029$ 、ns) (表-5.4[P104]及び付表 3[P138]を参照)。

### 5. 3. 3 考察

集団内の調査木がシードレインの種子親である観察値  $P_o$  は pf4 以外、集団内の親がすべて均等にシードレインに貢献すること及び自殖がないことを前提として算出した期待値  $P_e$  と同じか、 $P_e$  よりも有意に大きかった。この結果は多くの集団では集団内の遺伝子流動がランダム交配よりも制限されているものの、ランダム交配に近い遺伝子流動を行う集団もあることを示している。種子親の  $P_o$  が集団の規模 (面積、立木本数) と弱い負の相関関係

にあることから（面積、 $\rho=-0.577$ 、ns；立木本数、 $\rho=-0.381$ 、ns）、5. 2で明らかにされた花粉による遺伝子流動と同様に規模が小さい集団ほど集団内の調査木のシードレインに対する貢献度は大きくなり、規模が大きい集団ほど調査木のシードレインに対する貢献度は小さくなることを示唆している。したがって、シードレインの種子親が集団内の成木のみで構成されているのであれば、規模が小さい集団ではシードレインの母方の近親度は高まり、シードレインの種子数のパラメーターである NSP や MLE(N)は小さくなる。逆に、規模が大きい集団では近親度は低くなるので、NSP や MLE(N)は大きくなると想定される。

近親関係復元法で推定された NSP は各集団でサンプリングした種子 55~57 種子に対して 28~38 個体で構成され、集団の規模と有意な相関関係が検出されなかった。これらの結果は5. 2で明らかにされた花粉親の総数 (NPP) と集団の規模の関係と同じ傾向であり、シードレインの種子親が集団内の個体のみで構成されているのではないことを示唆している。つまり、規模が小さい集団ではシードレインに貢献した種子親は集団内の個体だけではなく、集団外から飛来する長距離散布種子も貢献したことを示唆している。その結果、規模の小さい集団のシードレインの種子数は規模の大きな集団と同程度に維持されたと考えられる。一般的に、種子は花粉よりもはるかに重量が重いので、風散布種子であっても風散布の花粉よりも散布距離が短い (Okubo and Levin, 1989)。また、ほとんどの種子は種子親の近隣に散布されることが実測されている (Willson, 1993, Clark *et al.*, 1999, Willson and Traveset, 2000, McEuen and Curran, 2004)。これらの知見に従えば、集団外から飛来する種子のような、極端に遠くから散布された種子はシードレイン (集団内で採取される種子) には貢献せず、集団内の親のみがシードレインに貢献すると考えられる。本節の結果から示唆されることはこの知見を支持しない。一方、Iwaizumi *et al.* (2013) a は、同樹種集団から 100m以上離れた *P. densiflora* 集団で5年間に渡ってシードレインを採取し、そのうち母性アレルの 8.2~25.2%が集団にないアレルであることを明らかにし、他集団から散布された種子が集団に飛来したと推測している。この知見は集団外から飛来する長距離散布種子がシードレインに貢献するという本節の仮説を支持しており、長距離散布種子が景観スケールで流動する花粉とともに集団の遺伝的多様性の維持に貢献している可能性が示唆される。

種子が花粉と同程度に十分に遺伝子流動を行っていることは、種子親と花粉親の  $P_0$  の差の検定結果やシードレインの親数に関するパラメーターの差の検定結果からも示唆される。規模の小さい集団では規模の大きい集団よりも集団内の調査木がシードレインに対する花粉親としての貢献度および種子親としての貢献度の両方とも大きくなることが明らかにされた。種子の散布距離が花粉よりも短い場合、規模の小さい集団では調査木がシードレイン



ンの種子親である観察値  $P_o$  はシードレインの花粉親である観察値  $P_o$  よりも有意に高くなる  
ことが期待される。しかしながら、種子親の  $P_o$  と花粉親の  $P_o$  は 5 集団では有意差がなかつ  
た。pf1、pf2、pf7 のような規模の小さい集団（それぞれ、面積：1.3ha、0.3ha、2.0ha；立木  
本数：847 本、179 本、607 本）でも種子親の  $P_o$  と花粉親の  $P_o$  は有意差が検出されなかつ  
た。これらの結果は、種子の散布距離と花粉の散布距離は大きく変わらないことを示唆し  
ている。また、シードレインの種子親の総数 (NSP) はシードレインの花粉親の総数 (NPP)  
よりわずかだが有意に少なく、種子親の MLE(N) と、花粉親の MLE(N) は有意差が検出され  
なかった。これらの結果は、シードレインは種子親、花粉親とも多くの個体で構成されい  
ることを示しており、シードレインを構成する種子親には近くの個体のみではなく、遠く  
の個体が多く含まれ、種子が花粉と同様に長距離散布されることを強く示唆している。

#### 5. 4 まとめ

本章では、景観スケールで流動する花粉が集団のシードレインに与える影響について、集団内の親の貢献度が集団の規模によってどのように変わるのか、という関係と、シードレインの親数が集団の規模によってどのように変わるのか、という関係を比較することで評価した。集団の規模が大きく異なる 8 集団において、集団の規模に関係なくほぼ同数の調査木を選定し、集団から任意に採取したシードレインに対して調査木が花粉親としてどれだけ貢献しているかを花粉親鑑定法によって推定した。その結果、集団の調査木のシードレインに対する貢献度は集団の規模と有意な負の相関関係が検出された。この結果から、シードレインに集団内の親だけが貢献しているのであれば、規模が小さい集団ほどシードレインの父方の近親度は高くなる、もしくは、花粉親数が少なくなると想定され、逆に規模が大きな集団ほど近親度は低くなる、もしくは花粉親数が多くなることが想定された。一方、シードレインの遺伝情報のみを用いてシードレインの花粉親数を近親関係復元分析によって推定したところ、花粉親数は分析に供した 55~57 種子に対して 33~46 個体であり、集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。また、花粉親あたりの種子数が 1 種子もしくは 2 種子である花粉親が全親数の 9 割以上を占めていた。これらの結果から、集団の規模に関係なく、シードレインは多くの花粉親で構成されていることが明らかになった。規模が小さい集団ではシードレインの花粉親数の多さは集団内の親のみの貢献だけでは説明することができないので、集団外の親が貢献していると考えられた。景観スケールで流動する花粉が集団にない遺伝子の供給源になり、シードレインの親数に貢献することで、結果的に遺伝的多様性を高めることに寄与すると考えられた。そして、景観スケールで流動する花粉のシードレインに対する貢献は規模が小さい集団の方が顕著に表れると考えられた。

次に、長距離散布種子が集団のシードレインに与える影響について、景観スケールで流動する花粉の影響の評価と同じ手法を用いて評価した。その結果、集団内から任意に選定された調査木のシードレインに対する貢献度と集団の規模とは弱い負の相関関係が見られた。景観スケールで流動する花粉と同様に、規模が小さい集団ほど調査木がシードレインに種子親として貢献する割合は高く、規模が大きな集団ほど調査木の種子親としての貢献度は低いことが示された。また、シードレインの種子親数を近親関係復元分析によって推定したところ、種子数は分析種子 55~57 種子に対して 28~38 個体であり、集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。この結果から景観スケールで流動する花粉と同様に、規模の小さい集団では長距離散布種子がシードレインに貢献していることが示唆された。

長距離散布種子が集団にない遺伝子の供給源になり、シードレインの親数に貢献することで、結果的に遺伝的多様性を高めることに寄与すると考えられた。

これらの結果から、本研究で採用した手法を用いることで景観に多くの同樹種集団が存在する場合でも、集団外から飛来する花粉の集団の子世代に対する影響を評価できることが明らかになった。また、この手法を用いることで長距離散布種子が集団のシードレインに対する影響を評価することができることが明らかになった。アカマツ種子が高い移動能力を持ち、景観スケールで流動する花粉と同様に集団間を遺伝的につなげる役割を担っている可能性があることが明らかになった。

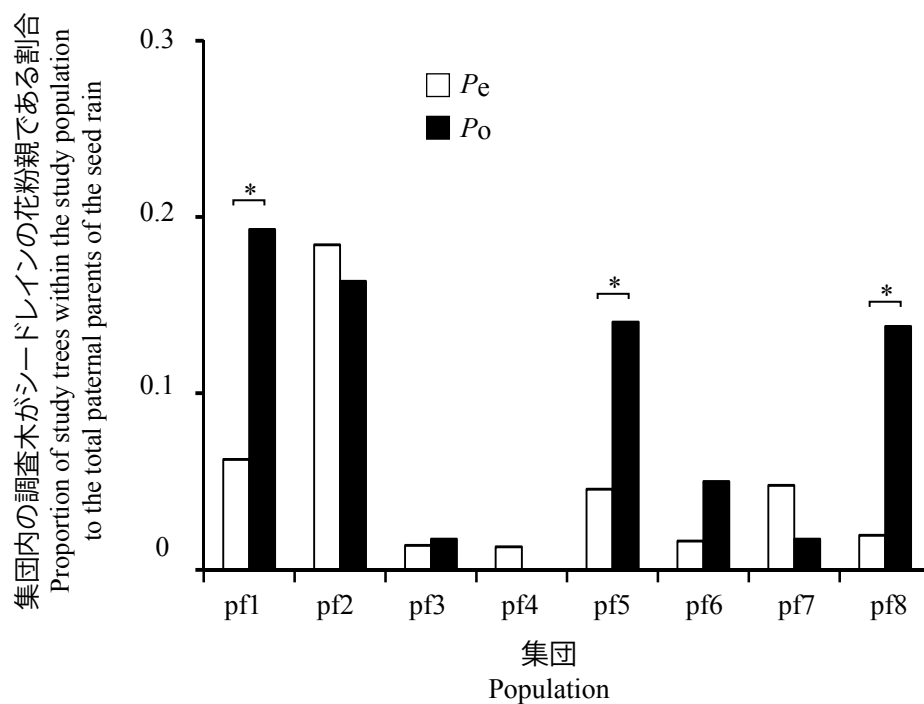


図 - 5.1 シードレインの花粉親のうち、集団内の調査木が親である割合  
 \*、期待値 ( $P_e$ ) と観察値 ( $P_o$ ) に有意差 ( $P < 0.05$ , フィッシャーの正確確率検定, ボンフェローニ補正済) があることを示す。

Fig. 5.1 Proportion of study trees within the study population to the total paternal parents of the seed rain  
 \*, significant differentiation between  $P_e$  and  $P_o$  ( $P < 0.05$ , Fisher's exact probability test under Bonferroni correction).

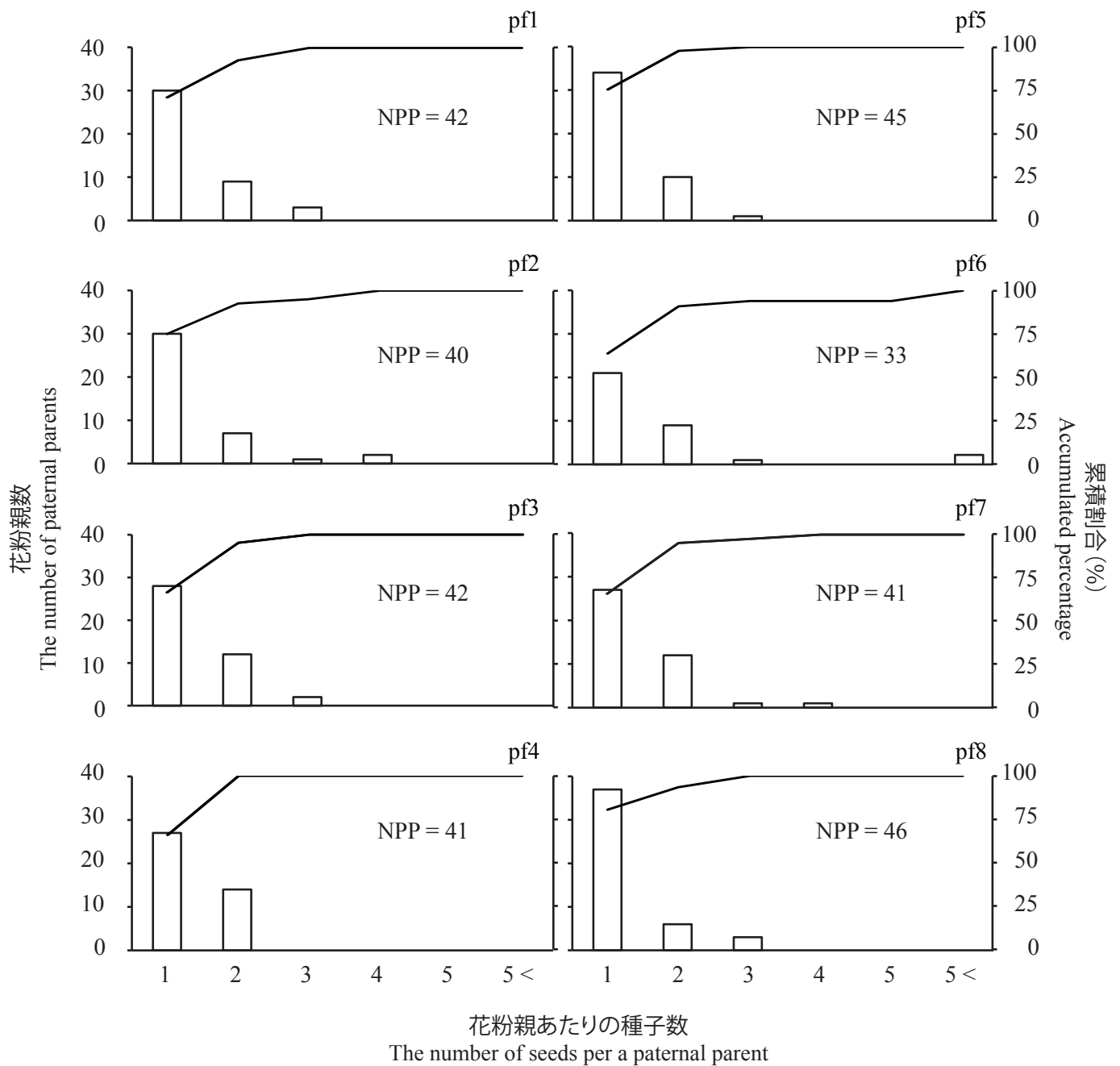


図 - 5.2 シードレインにおける花粉親あたりの種子数と花粉親の頻度  
NPP、シードレインの花粉親の総数。折れ線グラフは各花粉親数の NPP に対する累積割合を示す。

Fig. 5.2 The number of seeds per paternal parent and frequency of the paternal parents in seed rain  
NPP, Total number of paternal parents of the seed rain. Line plot was showed the accumulated percentage of each number of pollen parents to NPP.

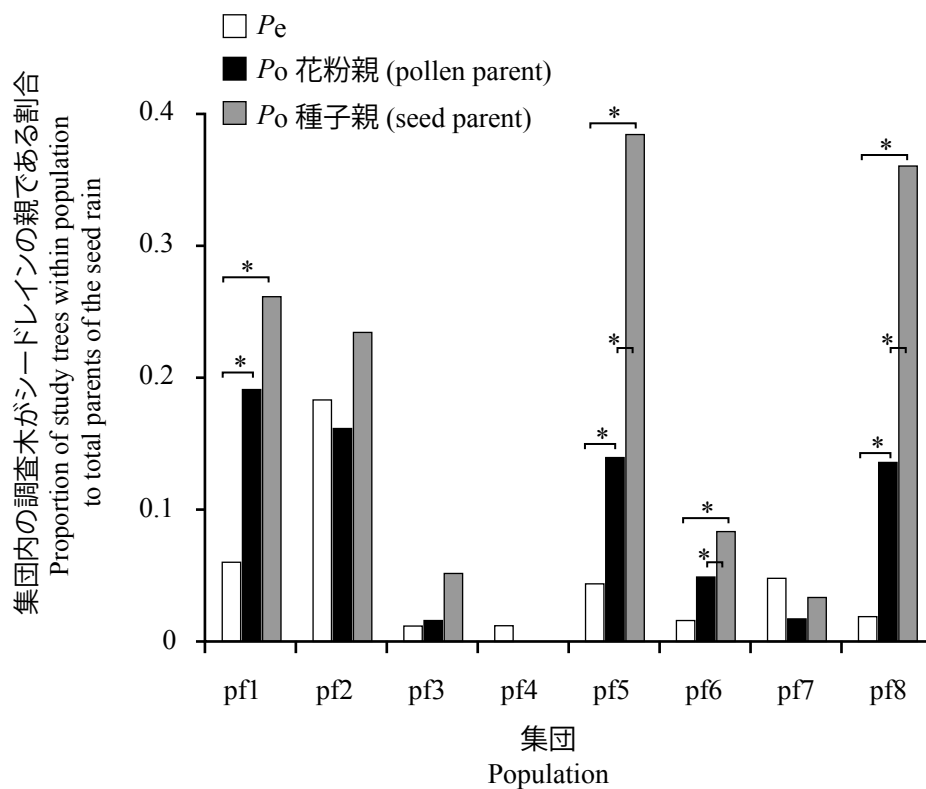


図 - 5.3 シードレインの親のうち、集団内の調査木が親である割合  
 \*は有意差 ( $P < 0.05$ , フィッシャーの正確確率検定, ボンフェローニ補正) があることを示す。花粉親のデータは図 - 5.1 を再掲した。

Fig. 5. 3 Proportion of study trees within population to total parents of the seed rain  
 \*, significant differentiation assigned by Fisher's exact probability test under Bonferroni correction ( $P < 0.05$ ). The data of pollen parent was reinserted of Fig. 5. 1.

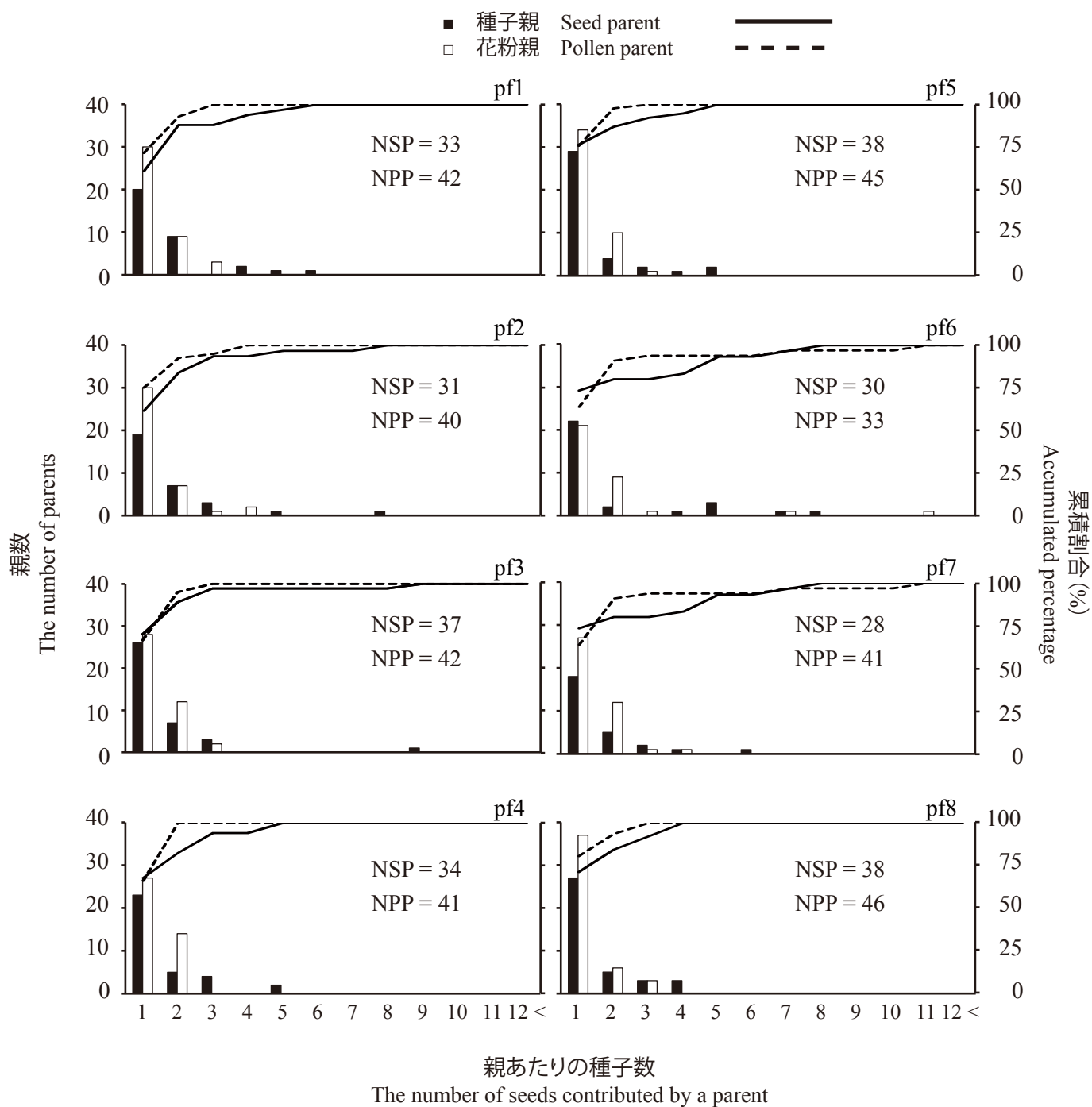


図 - 5.4 シードレインにおける親あたりの種子数と親の頻度  
 NSP、シードレインを構成する種子親の総数；NPP、シードレインの花粉親の総数。花粉親のデータは  
 図 - 5.2 から再掲した。

Fig. 5.4 The number of seeds per a parent and frequency of the parent in seed rain  
 NSP, Total number of seed parents of the seed rain; NPP, Total number of pollen parents of the seed rain. The data  
 of paternity was reinserted of Fig. 5.3.

表- 5. 1 近親関係復元法と最尤推定親数「MLE(N)」によるシードレインの花粉親数の推定

Table 5. 1 Estimation of the number of pollen parents of seed rain using sibship reconstruction and the maximum likelihood estimate of breeding parent [MLE(N)]

	pf1	pf2	pf3	pf4	pf5	pf6	pf7	pf8	平均 Mean
調査集団 Study population									
分析成木数 The number of mature trees analyzed	53	33	37	38	32	45	29	39	38
分析種子数 The number of seeds analyzed	57	55	58	55	57	60	58	58	57
花粉親の総数 (NPP) Total number of pollen parents of the seed rain	42	40	42	41	45	33	41	46	41
最尤推定親数「MLE(N)」 The maximum likelihood estimate of breeding parent	336	259	-	-	203	900	1,684	377	627

pf3とpf4のMLE(N)はサンプリングした親候補木からどれくらいの子が得られるかの事後推定確率がPATRI(Signorovitch and Nielsen, 2002)を用いた推定で0であったため、算出されなかった。

MLE(N) values in pf3 and pf4 were not able to be calculated in PATRI(Signorovitch and Nielsen, 2002) software because posterior expectations of the number of sampled seeds from sampled tree were zero.



表- 5. 2 集団の規模とシードレインの花粉親に関するパラメーターの相関関係

Table 5. 2 Correlation between the scale of the population and parameters in pollen parent of the seed rain

集団の規模 Scale of population	花粉親が集団内の 調査木である観察確率 Observed probability of seed parent within the population ( $P_o$ )	シードレインの親数 The number of pollen parents in the seed rain	
		花粉親の総数 NPP	最尤推定親数 MLE ( $N$ )
面積* Area	$P < 0.05$ ( $\rho = -0.732$ )	ns ( $\rho = -0.119$ )	ns ( $\rho = 0.843$ )
立木本数* Size	ns ( $\rho = -0.565$ )	ns ( $\rho = -0.036$ )	ns ( $\rho = 0.314$ )

\*、面積 (ha) と立木本数を自然対数に変換し、各パラメーターと相関分析を行った。相関分析にはスピアマンの順位相関係数を用い、括弧内に相関係数を示した。有意水準 ( $P < 0.05$ ) はボンフェローニ補正を行った。

\*, Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient was used between natural logarithm of the area of the population (ha) or the size of the population (trees) and each parameter. Correlation coefficient was shown in parentheses. Significance level ( $P < 0.05$ ) was converted with Bonferroni correction.

表- 5. 3 近親関係復元法と最尤推定親数[MLE(N)]によるシードレインの親数の推定

Table 5. 3 Estimation of the number of parents of seed rain using sibship reconstruction and the maximum likelihood estimate of breeding parent [MLE(N)]		pf1	pf2	pf3	pf4	pf5	pf6	pf7	pf8	平均 mean
調査集団 Study population										
分析成木数 The number of mature trees analyzed		53	33	37	38	32	45	29	39	38
分析種子数 The number of seeds analyzed		57	55	58	55	57	60	58	58	57
近親交配復元法 Sibship reconstruction		33	31	37	34	38	30	28	38	34 <sup>a</sup>
種子親の総数 (NSP) Total number of seed parents										
花粉親の総数 (NPP) Total number of pollen parents <sup>*</sup>		42	40	42	41	45	33	41	46	41 <sup>b</sup>
最尤度推定親数 The maximum likelihood estimate of breeding parent [MLE(N)]		216	130	-	-	83	675	1,682	108	482
種子親 Seed parent										
花粉親 <sup>*</sup> Pollen parent <sup>*</sup>		336	259	-	-	203	900	1,684	377	627

pf3とpf4のMLE(N)は集団内で選定された調査木からどれくらいの子が得られるかの事後推定確率がPATRI(Signorovitch and Nielsen, 2002)を用いた推定で0であったため、算出されなかった。NPP値とNSP値には有意差が検出されたため、異なるアルファベットで示した。また、MLE(N)値には種子親と花粉親で有意差が検出されなかった(いずれも、マン・ホイットニ二検定、 $P < 0.05$ )。\*、NPP及び花粉親のMLE(N)は表- 5. 1を再掲した。

MLE(N) values in pf3 and pf4 were not able to be calculated in PATRI software (Signorovitch and Nielsen, 2002) because posterior expectations of the number of sampled seeds from sampled mature trees were zero. Significant difference between NPP and NSP was detected tested by Man-Whitney test ( $P < 0.05$ ) and was shown different alphabets next to the figures. Significant difference of MLE(N) values in pooled sample of 8 populations between paternity and maternity was not detected tested by Man-Whitney test ( $P < 0.05$ ). \* NPP and MLE(N) of pollen parents was reinserted of Table 5. 1.

表- 5. 4 集団の規模とシードレインの種子親に関するパラメーターの相関関係

Table 5. 4 Correlation between the scale of the population and parameters in seed parent of the seed rain

集団の規模 Scale of population	花粉親が集団内の 調査木である観察確率 Observed probability of seed parent within the population ( $P_o$ )	シードレインの親数 The number of pollen parents in the seed rain	
		種子親の総数 NSP	最尤推定親数 MLE ( $N$ )
面積* Area	ns ( $\rho = -0.577$ )	ns ( $\rho = -0.030$ )	ns ( $\rho = 0.557$ )
立木本数* Size	ns ( $\rho = -0.381$ )	ns ( $\rho = 0.220$ )	ns ( $\rho = 0.029$ )

\*、面積 (ha) と立木本数を自然対数に変換し、各パラメーターと相関分析を行った。相関分析にはスピアマンの順位相関係数を用い、括弧内に相関係数を示した。有意水準 ( $P < 0.05$ ) はボンフェローニ補正を行った。

\*, Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient was used between natural logarithm of the area of the population (ha) or the size of the population (trees) and each parameter. Correlation coefficient was shown in parentheses. Significance level ( $P < 0.05$ ) was converted with Bonferroni correction.

## 第6章 総合考察

本研究で取り上げた二つの課題「景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性の評価」及び「長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響の評価」について、前章までで多くの知見を得た。これらの知見に基づいて、アカマツの遺伝子流動の特性や遺伝的多様性の維持機構について議論を行う。最後にアカマツ林の管理に関する提案を行う。

### 6. 1 アカマツの分断化の進行と遺伝的多様性

この調査地において、1974年から2004年までの間に多くのアカマツ林分が管理放棄やマツノザイセンチュウによる集団的な枯死によって遷移が移行し、広葉樹が優占する林分に変っていた。この分断化によってアカマツ林分の面積は調査地全体で612haから234haに減少し、林分間の平均距離は変わらないものの、同樹種林分までの最短距離が平均154mから328mに増加し、林分あたりの面積が5.9haから2.0haと1974年の34%に減少した。樹木の花粉や種子の散布距離や散布量には限りがあり、分断化は集団間でやり取りされる遺伝子を質的、量的に変化させる可能性がある(Young *et al.*, 1996)。遺伝的なつながりが変わった場合、集団の遺伝的多様性が変化し、集団の消失や遺伝的な分化を促進させ、長期的には種の進化への影響を及ぼすとされる(e.g. Sork *et al.*, 1999, Fernández and Sork, 2007)。本調査地においても、分断化によって花粉や種子による集団間の遺伝的なつながりに変化が生じた可能性が危惧される。例えば、アカマツ林分が減少することで、交配時に生産される花粉量が減少し、景観スケールで流動するような長距離散布される花粉が減少した可能性がある。また、近隣の同樹種林分までの距離が328mになったことは、一般的なマツ属の花粉の散布距離よりも長くなったことを示している。花粉親分析によって推定されたマツ属の花粉の平均散布距離は *Pinus flexilis* で140m (Schuster and Mitton, 2000)、*P. densiflora* で68m (Lian *et al.*, 2001)、*P. sylvestris* で48m (Robledo-Arnuncio and Gill, 2005)とされており、大部分のマツ花粉は散布源から100m程度の範囲内に散布されると考えられる。これらの知見は本調査地における分断化が花粉による集団間の遺伝的なつながりに変化を及ぼした可能性を支持するものである。花粉によって集団外から集団内に供給される遺伝子量が減少し、集団の遺伝的多様性に変化を及ぼしている可能性が十分に考えられる。

しかしながら、調査地で選定された8つのアカマツ集団から採取されたシードレインの遺伝的多様性 ( $H_E=0.867$ 、 $R=13.71$ ) は成木 ( $H_E=0.863$ 、 $R=14.05$ ) と有意差は検出されな

った。シードレインの遺伝的多様性の高さは保護されたアカマツ林や天然のアカマツ林と同じ程度 ( $H_E=0.898$ 、Iwaizumi *et al.*, 2007 ;  $H_E=0.915$ 、Lian *et al.*, 2001) であり、集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。また、シードレインの固定指数はゼロとみなすことができ ( $F_{IS}=0$ )、任意交配集団であると判断された。これらの結果から、1974年から2004年にかけて生じた分断化は残された集団の次世代の遺伝的多様性に影響を与えていないと判断された。

調査集団の面積が最小で 0.3ha、最大で 3.7ha と約 12 倍の差があるにも関わらず、どの集団でもシードレインの遺伝的多様性が高く、任意交配集団であったことは花粉による集団内及び集団間の遺伝子流動の両方が十分に行われていることを示している。過去の研究において、風媒の木本種では集団内の遺伝子流動を十分に行っていることが明らかにされている。多くの知見では連続的に分布している森林内に設定した試験区内の親のみが試験区内で採取した種子に貢献するのではなく、試験区外の親の貢献が少なからずあることを明らかにしている。例えば、*Quercus robur* を含んだいくつかの樹種で構成されている森林内に設置された 240m×240m の調査区において *Q. robur* 種子の花粉親のうち、65%が調査区外であることを明らかにしている (Streiff *et al.*, 1999)。また、*Fagus crenata* 林に設置された 170m×170m の調査区において種子の花粉親のうち、40%が調査区外であることを明らかにしている (Oddou-Muratorio *et al.*, 2010)。これらの知見は集団内で数百 m 以上離れた親がシードレインに十分に貢献することを示している。

風媒の木本種の隔離集団では集団外から集団に飛来する花粉も集団の子世代に貢献していると考えられる。例えば、近隣の同樹種集団から隔離されている *Pinus densiflora* 集団において、採取された種子の花粉親のうち、31%が集団外の個体であることが明らかにされている (Lian *et al.*, 2001)。また、*P. fexilis* の隔離集団では近隣の同樹種集団から 2km 隔離されているにも関わらず、採取された種子の花粉親のうち、6.5%が集団外の個体であることが明らかにされている (Schuster and Mitton, 2000)。これらの知見から、本研究で集団のシードレインの遺伝的多様性が高かったことは、花粉による集団内及び集団間の遺伝子流動の両方が貢献していることが示唆される。

シードレインの遺伝的多様性には種子による遺伝子流動も貢献していると考えられる。シードレインの母性アレル ( $H_E=0.856$ ) の遺伝的多様性の高さは天然林と同程度であった。また、2つの遺伝的多様性のパラメーター ( $H_E$ 、 $R$ ) を集団ごとで比較した場合、成木やシードレインの父性アレルと有意差はなかった。これらの結果は親世代が持っている遺伝子の豊富さが片親に偏らずに、花粉 (父方) と種子 (母方) の両方からほぼ均等に子世代に受け継がれていることを示唆している。花粉の場合と同様に、種子による集団内及び集団

間の遺伝子流動がシードレインの遺伝的多様性に貢献していることが示唆される。

## 6. 2 アカマツの遺伝的多様性維持機構

### 景観スケールで流動する花粉の役割

景観スケールで流動する花粉は規模の集団にない遺伝子の供給源になり、シードレインの遺伝的多様性の維持に貢献していた（第5章）。その影響は規模（面積や立木本数で表される）が小さい集団で顕著に表れることが明らかになった。規模が小さい集団で景観スケールで流動する花粉が集団の子世代の遺伝的多様性の維持に貢献していることは他の風媒の木本種の研究でも明らかにされている（O'Connell *et al.*, 2006, Fernández and Sork, 2005）。例えば、Fernández and Sork（2005）は *Quercus humboldtii* の5集団（平均20本の成木で構成され、近隣と同樹種集団から平均600m離れている）から得た種子の近親度を調べた。その結果、両親が集団内である割合（biparental inbreeding）は3%程度、有効花粉親数（ $N_{ep}$ ）が5.4~6.1であり、規模が大きな天然集団と同じレベルであることを明らかにし、集団外から飛来する花粉が近親交配を抑制していると結論付けている。また、O'Connell *et al.*（2006）は集団サイズが異なる *Picea glauca* の分断化された23集団において、種子の遺伝的多様性に差がないことを明らかにした。また、極端に集団のサイズが小さくならない限り、集団間で  $N_{ep}$  に有意差はないこと、他殖種子の父性アレルで遺伝的多様性に差がないことを明らかにした。その結果、長距離散布花粉が規模の小さい集団で種子の遺伝的多様性に寄与していると結論付けている。これらの知見は本研究の調査対象集団において、景観スケールで流動する花粉が規模の小さい集団に選択的に飛来していることを示すのではなく、規模が大きな集団にも集団外から花粉が飛来するが、統計分析の上で顕著に検出できたのが規模の小さい集団であることを示している。

本研究の調査対象集団では集団外からどれくらいの花粉が飛来しているかを明らかにするのは現在の分析手法では困難である。しかしながら、集団の規模に関わらず、集団外から花粉が飛来することは分断化された集団を対象とした多くの研究で明らかにされている（e.g. Dow and Ashley, 1996, Hanaoka *et al.*, 2007, O'Connell *et al.*, 2007）。例えば *Picea glauca* では近隣と同樹種集団から250~3000m離れた立木本数4~8本の7集団（本研究のpf2よりも規模が小さい）において、その集団で得られる種子の66%以上が集団外から飛来した花粉によるものであることが明らかにされている（O'Connell *et al.*, 2007）。また、アカマツ（*Pinus densiflora*）では同樹種集団から100m程度隔離された3.75ha、立木本数2,288本の集団（本研究のpf3集団の規模に相当）でシードレインの59~75%が集団外からの花粉親であることが明らかにされている（Iwaizumi *et al.*, 2013a）。これらの知見は本研究で設定し

た 8 集団全てにおいて景観スケールで流動する花粉が各集団に飛来し、シードレインの遺伝的多様性に貢献しているという仮説を支持するものである。集団が保持していない遺伝子を集団外から飛来する花粉が供給したことで、本研究で設定した 8 集団の規模の差（面積で約 12 倍、立木本数で約 17 倍）、立地環境の差（標高 54~146m）にも関わらず、シードレインの親数がほぼ同数（NPP=33~46）になり、遺伝的多様性（ $H_E \geq 0.854$ ）が天然林と同程度に維持されていると考えられる。

### 景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性

調査 8 集団は近隣と同樹種集団からの隔離の程度は最小で 170m（pf4）、最大で 511m（pf2）と差があり、各集団の周囲の同樹種林分の分布状況も同じではなかった（第 3 章）。そのため、景観スケールで流動する花粉が集団内に飛来する量は集団によって異なると考えられる。例えば、8 集団のうち、pf2 は近隣と同樹種集団から最も離れているため、近隣と同樹種集団とそれほど離れていない pf4 よりも集団外から飛来する花粉量は少ないと考えられる。pf2 のように規模が小さく（面積 0.3ha、立木本数 179 本）、同樹種集団から隔離されていたとしても、シードレインの遺伝的多様性が天然林と同様に高かった（ $H_E=0.869$ ）という結果は、花粉散布期間中に集団外から飛来する量が少なくても、集団にない遺伝子が供給されていたことを示唆している。つまり、景観スケールで流動する花粉が集団にない遺伝子を供給するには遺伝的多様性が高くなければならない。

本研究では、景観スケールで流動する花粉を採種園を利用して捕捉し、その遺伝的多様性を評価することを試みた。採種園に植栽されている 3 クローン（SaA、Km、Ka）の雌花の受粉期間は異なっており、これらを利用することで 5 月 15 日~26 日の間に景観スケールで流動する花粉を採種園外から飛来する花粉（園外花粉）として捕捉することができることが明らかになった。また、この調査地の花粉散布期間は 5 月 13 日~26 日前後と推定されることから、この 3 クローンは花粉散布期間の前期、中期、後期に景観スケールで流動する花粉を捕捉することができることが明らかになった。3 クローンの調査個体から採取された種子の花粉親は 8 割以上が園外花粉であったことから、景観スケールで流動する花粉が実際に存在すること、そして、この 3 クローンを利用することで景観スケールで流動する花粉を十分に捕捉できることが明らかになった。3 クローンが捕捉した園外花粉の遺伝的多様性（ $H_E \geq 0.890$ ）は保護林や天然林と同程度であり、クローン間で有意差が検出されなかったことから、調査地の花粉散布期間中変わらないことが明らかになった。また、園外花粉の遺伝的構成はクローン間で有意差が検出されなかったことから、遺伝的構成も花粉散布期間中変わらないことが明らかになった。

花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性や遺伝的構成が変化しないことは、景観内に分布している全ての集団が同じ質の花粉を受け取れることができることを示している。マツ属の雌花の開花過程は温度に依存していることから (Chung, 1981)、ある雌花が受粉期に達するまでの期間は集団が置かれている立地環境 (例えば、標高、方位、日照時間等) の影響を受けると考えられる。また、一つの個体の中でも雌花が着生した高さによって開花過程が異なり、着生した高さが高いほど開花過程が早くなることが知られている (齋藤ら, 1979)。これらの知見は、景観に分布する集団、集団を構成する個体、さらには一つの個体に着生する雌花が景観スケールで流動する花粉を受け入れる時期は全てが同一ではなく、変動が大きいことを示唆している。もし、景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性が花粉散布期間中に変化するのであれば、遺伝的多様性が低い花粉を受け入れる集団・個体・雌花と遺伝的多様性が高い花粉を受け入れる集団・個体・雌花が存在することになる。集団外からの遺伝子流動量が多くても、遺伝的多様性が低ければ、子集団の遺伝的多様性は低くなることから (Aldrich *et al.*, 1998, Aldrich and Hamrick, 1998)、同じ景観内で集団の受粉時期が異なることで、受け取る花粉プールの遺伝的多様性に差が生じ、結果的に子集団の遺伝的多様性に差が生じることが考えられる。景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性が高く、散布期間中に遺伝的多様性や遺伝的構成が変化しないことは、立地環境が異なる景観内でその景観内に分布するどの集団でも高い遺伝的多様性を持った子集団を作ることに寄与している。

#### 景観スケールで流動するアカマツ花粉の散布源

このように景観スケールで流動するアカマツ花粉が高い遺伝的ポテンシャルを持っていることが明らかになってくると、この花粉の散布源はどこで、どれくらいの量が流動するのかを議論することが、風媒の遷移初期種の花粉による遺伝子流動の特性を明らかにする上で必要になる。本研究では景観スケールで流動するアカマツ花粉の散布源や散布量を明らかにすることについて取り扱っていない。そのため、ここでは過去に行われた風媒の木本種の研究を取り上げ、議論する。

一般的に、花粉の散布距離や散布方向は地形や風の影響を受けることが知られている (Okubo and Levin, 1989, Schueler and Schluinzen, 2006)。花粉の散布距離は通常、水平方向の風の影響を大きく受ける (Okubo and Levin, 1989)。DNA マーカーを用いて推測された花粉の散布距離は森林内の調査で 22.1m (*Quercus robur*, Streiff *et al.*, 1999) ~102m (*Araucaria angustifolia*, Bittencourt and Sebbenn, 2008)、孤立集団の調査で 37.3m (*Fagus crenata*, Hanaoka *et al.*, 2007) ~140m (*Pinus felixilis*, Schuster and Mitton, 2000) であることから (詳細は表



-2.1[P30]に示した)、集団の分断化の状態に関わらずほとんどの花粉は散布源から 100m 程度の範囲内に散布されると考えられる。一方、上昇気流が発生するような微気象条件によって散布源から真上に 300m 高まで運ばれることが *Pinus banksiana* と *Picea mariana* 採種園での調査で明らかになり、上空まで運ばれた花粉が長距離散布されると指摘されている (Di-Giovanni *et al.*, 1996)。これらの知見から、花粉が長距離散布されるには水平方向の風の条件よりも上昇気流を生じさせるような気象条件が重要であると考えられる。そして、この上昇気流によって運ばれたわずかな花粉が景観を流動する花粉になると考えられる。

ある一つの集団から集団外に長距離散布された花粉は周囲に均一に広がらず、地形や気象条件に依存した散布距離や散布方向があることが知られている (Schueler and Schluünzen, 2006)。Schueler and Schluünzen (2006) は気象条件、地形、花粉の散布量等を加味し、コナラ属の花粉の散布様式を the mesoscale atmospheric meteorology model (METRAS) によってシミュレーションした。そして、ある一つの散布源の花粉雲 ( $10\text{pollen}/\text{m}^3$ ) が気象条件によって、30km に広がるものの、散布量は均一ではないことを明らかにしている。この知見から、ある一つの集団から散布された花粉が景観内の多くの集団に寄与するのではないと考えられる。

ある集団に飛来する花粉の散布源は近隣の同樹種林分までの距離や集団の規模が影響すると考えられる。Caron and Leblanc (1992) は近隣に同樹種集団が存在する *Picea mariana* 採種園において、採種園の周囲に花粉収集器を設置し、園外から飛来する花粉の計測を目視により行った。その結果、花粉散布期間中の風向の影響を受けるものの、どの方角からも一定量の花粉が飛来すること、そして、近隣に同樹種林分が存在する方角からより多くの花粉が飛来することを明らかにしている。また、Bacles and Ennos (2008) は極端に分断化され、立木本数と集団間距離が異なる 3 つの *Fraxinus excelsior* 集団において、集団間の遺伝子流動を集団から採取した種子の花粉親を 5 つのマイクロサテライトの遺伝子座を利用して推定した。その結果、集団の立木本数が大きい集団が小さい集団により多くの花粉を供給していることを明らかにしている。Bacles and Ennos (2008) は集団間の距離よりは集団の規模が集団間の遺伝的なつながりに寄与していると指摘している。これらの知見から、ある地点に飛来する花粉は近隣の散布源からのものが多いものの、他の集団から散布されたものも飛来すること、そして、距離が同じ集団であれば、規模が大きい集団から散布された花粉がより多く飛来することが示唆される。

景観スケールで流動する種子が集団の遺伝的多様性に与える影響

これまで遺伝子流動の担い手の一つとして、景観スケールで流動するアカマツ花粉の遺伝子流動の特性について明らかにしてきた。ここでは、もう一つの担い手である種子の遺伝子流動の特性について、集団の遺伝的多様性に与える影響の観点から議論する。

シードレインの母性アレルの遺伝的多様性は高く ( $H_E=0.856$ )、天然林や保護林 ( $H_E=0.898$ 、Iwaizumi *et al.*, 2007 ;  $H_E=0.915$ 、Lian *et al.*, 2001) と同程度であった (第3章)。また、母性アレルの  $H_E$  は父性アレル ( $H_E=0.871$ ) や親集団 ( $H_E=0.863$ ) と有意差が検出されなかった。一般的に、遺伝子流動が制限されている場合、子集団は親の周囲に集中的に分布し、片親が同じ子孫や両親が同じ子孫による空間的な遺伝構造が作られることが知られている (Hardy *et al.*, 2004, Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004a)。この知見は、種子の散布距離が限られている場合、シードレインに貢献する種子親は少ないため、同じ親の子が多くなり、母方の近親度が高まることで、シードレインの遺伝的多様性は低くなることを示唆する。しかしながら、シードレインの母性アレルの遺伝的多様性は高く、集団の規模 (面積、立木本数) と有意な相関関係になかったことから、集団の規模に関わらず多くの種子親がシードレインに貢献していることを示唆している。シードレインの種子親数の多さはシードレインの親数を近親関係復元法 (sibship reconstruction) によって推定した結果からも示唆された (第5章)。近親関係復元法によって推定された NSP (シードレインの種子親の総数) は平均 34 個体 (28~38 個体) と推定され、8 集団の規模の差 (面積で 12 倍、立木本数で 17 倍) ほどの差はなく、集団の規模と有意な相関関係は検出されなかった。また、種子親あたりの種子数 (ある種子親が散布した種子数) は 1 種子もしくは 2 種子がである種子親が多く、種子親の 8 割以上を占めていた。

シードレインの母性アレルの遺伝的多様性の高さやシードレインの種子親数の多さはシードレインに貢献する種子親が集団内の個体のみではないことを示唆している。特に、規模の小さい集団では長距離散布された種子がシードレインの遺伝的多様性に与える影響が顕著に現れ、集団外から飛来する長距離散布種子によってシードレインの種子親数が多くなり、遺伝的多様性を規模の大きい集団と同程度に維持している考えられる。マツ属の種子の長距離散布に関するいくつかの研究において、異なる集団からの種子親がシードレインの遺伝的多様性に貢献する可能性を示唆する散布データが示されている。Nathan *et al.* (2001) はランダムに選定された 100,000 種子の散布距離の頻度分布を数学的に予想し、3,482 種子 (3.5%) が 100m より遠くに散布され、そのうち、217 種子 (0.2%) が 1km より遠くに散布され、最大で 216km 散布されることを推定した。また、水平方向の風に加えて、数秒間の上方向への強い乱流によって、あたかもパラシュートが持ち上げられるように種子の長距離散布を促進させることが示されている (Nathan *et al.*, 2002, Nathan and Katul, 2005)。

Iwaizumi *et al.* (2013) a は、隔離された *P. densiflora* 集団でシードトラップによってシードレインを 5 年間採取した。そして、採取されたシードレインのうち 8.2~25.2%の母性アレルが 100m 以上離れた集団から飛来したものであることを明らかにし、父性アレル (59.0~75.2%) より少ないものの、集団間を流動する種子を定量化している。これらの知見から、この調査地において、種子の長距離散布がある程度発生するのであれば、その集団と血縁関係がある種子が集団外に散布され、代わりに血縁関係のない種子が集団外から飛来すると考えられる。したがって、種子による集団間遺伝子流動によって集団内の個体の貢献度が減少し、シードレインの遺伝的多様性が改善されると考えられる。この調査地のように分断化された集団が多く分布する景観では、種子の長距離散布は稀に発生するものではないのかもしれない。

#### アカマツが分布域を拡大する際に遺伝的多様性を維持する機構

第 1 章で述べたように、アカマツは近年の数十年間に分布域の急速な拡大と集団の分断化を経験している。それにも関わらず、遺伝的多様性が維持されるためには、広域的に流動する花粉が集団と集団を遺伝的につなぐ役割を果たすことが不可欠である。また、種子も長距離散布されることによって集団と集団を遺伝的につなぐ役割を果たすとともに、生息適地への侵入・定着することが不可欠である。

アカマツが放棄された草地等に分布域を拡大させる場合、散布源から長距離散布されて草地に侵入し、定着した集団の遺伝的多様性は高いと考えられる。本研究では過去に草地として維持されていた可能性が高い場所に調査地を設定し、そこに分布しているアカマツ 8 集団を選定し、集団間に遺伝的な差がなく、高い遺伝的多様性を持っていることを明らかにした (第 3 章)。この結果は攪乱跡地や放棄された草地に侵入し定着した集団が高い遺伝的多様性を持っていたという仮説を支持するものである。アカマツと同じ風散布型種子を持つ木本種において、攪乱跡地に侵入する集団や更新した集団が高い遺伝的多様性を持つことが示されている。Uchiyama *et al.* (2006) は山火事跡地で収集された *Betula maximowicziana* の埋土種子の遺伝的多様性は親集団と同程度であり、任意交配集団 ( $F_{IS}=0$ ) とみなすことができることを明らかにしている。また、Parker *et al.* (2001) は山火事跡地に更新した同年齢の *Pinus clausa* 実生集団が親集団と同様に任意交配集団とみなせること、実生集団には空間的な遺伝構造が検出されず、多くの種子親が寄与していることを明らかにしている。また、他のマツ属やウダイカンバの研究においても攪乱跡地などに侵入・定着する実生に顕著な空間的遺伝構造が検出されない事例がほとんどである (González-Martínez *et al.*, 2002, Jones *et al.*, 2006)。アカマツにおいて、攪乱跡地等に侵入する集団や定着した

集団の遺伝的多様性を明らかにした研究はないもの、長距離散布される種子の遺伝的多様性は高いことが示されている。Iwaizumi *et al.* (2010) は 100m 以上離れた集団から長距離散布され、他の集団のシードレインとして集団内に散布された種子の遺伝的多様性を明らかにしている ( $H_E \geq 0.866$ )。この遺伝的多様性の高さはアカマツ天然林 ( $H_E = 0.873$ 、Iwaizumi *et al.*, 2013b) と同程度である。これらの知見はアカマツが放棄された草地に遺伝的多様性が高い子集団を侵入させ、結果的に定着した集団の遺伝的多様性が高くなるという仮説を支持するものである。

マツ属が繁殖可能になるサイズが比較的小さい（もしくは若い）ことは分布域を急速に拡大させるのに寄与すると考えられる。一般的に植物には繁殖が可能になるサイズもしくは齢の閾値がある (Klinkhamer and de Jong, 1987, Weiner *et al.*, 2009)。マツ属では繁殖が可能な樹齢とサイズ（樹高）の知見がある。例えば、マツ属において、初めて雌花を着生させる樹齢は他の樹種よりも比較的若く、*P. sylvestris* で 2、3 年生 (Chalupka and Cecich, 1997)、*P. mugo* で 1 年生 (Chalupka and Cecich, 1997)、*P. taeda* で 4 年生 (Chalupka and Cecich, 1997)、*P. banksiana* で 2 年生 (Cecich *et al.*, 1994) とされている。また、雌花が着生する最小の樹高は、*P. pinaster* (Santos-del-Blanco L. *et al.*, 2012) や *P. halepensis* (Cecich *et al.*, 1994) で樹高 3m 未満とされている。また、樹齢やサイズが閾値を超えると全個体が雌花を着生させ、種子を作るわけではなく、同じ樹種でも地域や (Climent *et al.*, 2008)、家系 (Cecich *et al.*, 1994) によって繁殖可能な個体割合は異なることとされている。これらの知見から、アカマツにおいても発芽してから 2~4 年程度で繁殖可能なサイズに達する個体が現れると考えられる。アカマツは冷温処理をしないと発芽しないため (郷, 1965)、攪乱跡地や放棄された草地に秋に散布されると、翌年の春に発芽することになる。つまり、散布されてから 2 年半~4 年半程度で雌花を着生する個体が現れ、4~6 年程度で最初の種子散布が行われると考えられる。

アカマツ種子が長距離散布され、草地や攪乱跡地等に遺伝的多様性の高い実生集団を侵入・定着させる。その後、4~6 年程度の短期間で次世代の種子を散布させることが可能になる。このサイクルを繰り返すことでアカマツは遺伝的多様性を維持しながら分布域を急速に拡大させたと考えられる。

#### アカマツ集団が分断化されたときに遺伝的多様性を維持する機構

アカマツが放棄された草地に分布域を拡大させた後、種子の散布源となった親集団どうしや、親集団と分布域を拡大させた子集団は高い遺伝的多様性を持った花粉や種子によって遺伝的につながっていると考えられる。

景観スケールで流動する花粉が持つ遺伝的多様性の高さは（第4章）、花粉散布期間中に対象景観に分布する集団に対して集団にない遺伝子を供給する能力を持っていることを示している。特に、規模の小さい集団では、景観スケールで流動する花粉が集団内の成木から供給されなかった遺伝子の供給源になると考えられる（第5章）。景観スケールで流動する花粉は集団の規模に関わらず多くの集団に飛来すると考えられるので、どの集団でもシードレインの父性アレルの遺伝的多様性に貢献したと考えられる。その結果、シードレインの父性アレルの遺伝的多様性の高さが天然林と同じレベルに維持された（第3章）と考えられる。

また、長距離散布種子も集団間の遺伝的のつながりに貢献していると考えられる。本研究で明らかにしたシードレインの母性アレルの遺伝的多様性の高さは父性アレルや天然林と同じレベルであり（第3章）、長距離散布種子がシードレインに貢献していることが示唆されたことから（第5章）、アカマツ種子は集団と集団を遺伝的につなぐ役割を担っていると考えられる。他の研究でも長距離散布されるアカマツ種子の遺伝的多様性は天然林と同じレベルであることが示されており（Iwaizumi *et al.*, 2010, Iwaizumi *et al.*, 2013a）、集団と血縁関係がある種子が集団外に散布され、代わりに血縁関係のない種子が集団外から飛来することで、シードレインの遺伝的多様性が改善されると考えられる。

### 6. 3 アカマツ林の管理への提案

本研究や過去の研究によって得られた知見は現在のアカマツ林を遺伝的多様性の保全の面から管理をする必要性はないということを示している。また、人間が過去に長期間アカマツを利用してきた結果もアカマツの遺伝的多様性に影響を与えていないと考えられる。Iwaizumi *et al.* (2013) b は日本におけるアカマツ天然林 62 集団の集団間の遺伝的差異を SSR マーカーによって分析したところ、 $G'_{ST}=0.122$  であり、日本に広くに分布している他の風媒木本種や大陸のマツ属とほぼ同じであることを明らかにしている。只木（1996）は近代化によって森林資源が利用されなくなり、今まで遷移の進行が抑制されることで維持されてきたアカマツ林が衰退するのは、森林が極相に向かう自然の流れであると指摘している。太田（2012）は、アカマツ林は衰退しても完全に消失することはなく、尾根筋に生育し続けるであろうと予測している。これらの知見から、現在まで遺伝的多様性が維持されてきたのは、人間の利用の程度がアカマツ集団の遺伝的つながりの許容範囲内であり、アカマツが持つ遺伝的多様性を維持する機構が機能してきたためだと考えられる。言い換えれば、アカマツは遷移初期種として、全国に広がっている再造林放棄地に種子を供給する能力を保持していると考えられる。

一方、本研究や過去の研究で得られた知見は、短期的には管理する必要はないものの、長期的な観点からアカマツ林の管理をしなくてもよいということを示してはいない。Iwaizumi *et al.* (2013) b は東日本と北日本のアカマツ集団は過去に急激な分布拡大によるボトルネックの影響を受けていることを明らかにし、人間の活動と土地利用の変化が遺伝的多様性や遺伝的構造に影響を与える要因となりうることを指摘している。Iwaizumi *et al.* (2013) b は具体的な人間活動や土地利用の変化について言及はしていないものの、過去に東北地方で盛んだった牛馬放牧や農村の生活に必要な草地が放棄され、そこにアカマツが急速に分布域を広げたことと無関係ではないだろう。

花粉の散布距離よりも種子の散布距離の方が短いことを考慮すると、分断化がさらに進行して種子による集団間の遺伝的なつながりが保てなくなった場合、花粉による遺伝子流動だけではアカマツの遺伝的多様性が維持されない可能性がある。言い換えれば、集団間の距離が離れ、集団間の遺伝的なつながりに長距離散布種子が寄与できなくなると、集団と血縁関係がある種子が集団外に散布されるものの、代わりに血縁関係のない種子が集団外から飛来することがなくなると考えられる。その結果、シードレインの母性アレルの近親度が高まり、シードレインの遺伝的多様性が低下する可能性がある。

Uchiyama *et al.* (2009) は *B. maximowicziana* の立木密度が異なる 4 つの調査地（それぞれ 2、14、91、300 本/ha）において、10~11 個体から種子を採取し、さらに各調査区で 15 個のシードトラップを設置してシードレインを採取した。調査個体から採取した種子から有効花粉親数 ( $N_{ep}$ ) を推定し、4 調査区で比較したところ、立木密度が変わってもほとんど変化しなかった（それぞれ  $N_{ep}=6.0, 7.7, 9.1, 5.7$ ）。一方、調査区のシードレインは立木密度が極端に低い場合（2 及び 14 本/ha）に有意な空間的遺伝構造ができることを明らかにした。これらの結果は空中の花粉の遺伝的多様性は立木密度が変化しても変わらないが、シードレインに寄与した種子親の遺伝的多様性は立木密度の減少に伴って少なくなったことを示している。この要因について、Uchiyama *et al.* (2009) は立木密度が低い調査区では散布個体のシードシャドウが重複しなくなったため、ある種子親の近くに他の種子親の子孫が散布されにくくなったことを挙げている。その結果、ある地点で採取したシードレインの種子親の構成はその近隣で採取したシードレインの種子親の構成と類似し、離れた地点のシードレインとは異なることになり、空間的遺伝構造が生じたとしている。この知見は集団と集団の距離が離れた場合、種子による集団間の個体交換が十分に行われずに、景観に分布するシードレインに空間的な遺伝構造が形成される可能性があるという仮説を支持する。アカマツが遷移初期種であることを考慮すると、分断化が極端に進んだ場合、伐採跡地や再造林放棄地に遺伝的多様性が高い集団を定着させることができなくなる可能性

や、侵入・定着する個体数が減少する可能性があり、景観の森林が持つ機能が維持できなくなることに繋がる。さらには、アカマツを含めた里山景観の遺伝的多様性の低下にもつながる可能性がある。景観内において、アカマツの遷移初期種としての役割が果たせなくなるほど分断化されることは避けるべきである。

#### 6. 4 結論

以上、本論文では、福島県阿武隈山地のアカマツ林を対象に花粉や種子による遺伝子流動の特性について研究し、以下の2つの事柄について明らかにした。

一つ目は景観スケールで流動する花粉（数 km の範囲で流動する長距離散布花粉）の遺伝的多様性と遺伝的構成についてである。景観スケールの遺伝子流動の評価を行う場合、流動する遺伝子の量の評価だけでは不十分であり、遺伝的な変異を評価することが必要であることが過去の研究で示唆されている（Aldrich *et al.*, 1998, Aldrich and Hamrick, 1998）。しかしながら、多くの研究では有効花粉親数 ( $N_{ep}$ ) や最大交配父性数 (MLE( $N$ )) などを用いた間接的な評価にとどまっております（e.g. Fernández and Sork, 2005, O'Connell *et al.*, 2006, 2007）、遺伝子多様度 ( $H_E$ ) やアレリックリッチネス ( $R$ ) のような遺伝的多様性のパラメーターで直接的に評価されていなかった。そこで、森林の遺伝子流動の研究では全く新しい着想として、採種園を利用して景観スケールで流動する花粉を捕捉し、その遺伝的多様性を従来のパラメーターで評価することを試みた。まず、調査地に設置されているアカマツクローン採種園が花粉を捕捉する能力について評価した。採種園は景観スケールで流動する花粉を捕捉するための利点をいくつか持っており、そのうち、植栽されている個体が選抜された場所の気候に適した開花特性を維持していることと、採種園外からの飛来する花粉が必ず存在することを利用して調査地の花粉散布期間中に流動する異なる花粉プールを捕捉することができる考えた。採種園に植栽されている個体の雌花の開花過程を調査した結果、採種園に植栽されているクローンのうち、3クローンの受粉期間が調査地の花粉散布期間の前期、中期、後期にそれぞれ重なっていることが明らかになった。また、これら3クローンから採取した種子の花粉親分析を行った結果、82%以上の父親が園外から飛来した花粉、つまり、景観スケールで流動する花粉であることが明らかになった。これらの結果から、調査対象のアカマツクローン採種園は景観スケールで流動する花粉を捕捉する能力が十分にあると判断された。次に、3クローンを用いて捕捉された園外花粉の遺伝的多様性の評価を行った。その結果、遺伝的多様性 ( $H_E$ ) は保護林や天然林と同程度であり、遺伝的多様性のパラメーター ( $H_E$ ) 及び遺伝的構成は3クローン間で有意差が検出さ

れなかった。これらから、調査地の花粉散布期間中に景観スケールで流動する花粉の遺伝的多様性は高く、遺伝的特徴は変化しないことが明らかになった。

二つ目は長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に与える影響についてである。種子は花粉よりもはるかに重量が重いため、散布距離が短く (Okubo and Levin, 1989)、花粉と同様な長距離散布はなされないと考えられている (Ribbens *et al.*, 1994, Heuertz *et al.*, 2003)。しかしながら、近年、風散布種子において長距離散布の事例が報告されるようになってきたことから (e.g. Nathan *et al.*, 2002)、長距離散布種子が集団の遺伝的多様性に貢献している可能性が十分に考えられる。しかしながら、景観内に多くの親候補が存在する場合、親識別法を用いて遺伝子流動を評価することができない。そこで、複数の集団でシードレインを採取し、シードレインに対する集団内の種子親の貢献度が集団の規模によってどのように変わるのかという関係と、シードレインの種子親数が集団の規模によってどのように変わるのかという関係を比較することで間接的に評価した。その結果、集団内の調査木のシードレインに対する種子親としての貢献度と集団の規模は弱い負の相関関係が見られたことから、規模が小さい集団ほどシードレインに貢献する調査木の割合は高く、規模が大きい集団ほど貢献度は低いことが示された。シードレインに貢献する種子親が集団内の親のみであるならば、シードレインの種子親数は規模が小さい集団ほど少なく、規模が大きいほど大きくなると想定された。一方、シードレインに貢献する種子親数を推定したところ、推定された種子親数は集団の規模と有意な相関関係になかった。また、シードレインの母性アレルの遺伝的多様性は集団の規模に関わらず、保護林や天然林と同程度であることを考慮すると、シードレインは多くの種子親が貢献していることが示唆された。集団内の種子親のシードレインに対する貢献度は集団の規模に依存するものの、シードレインの種子親数は集団の規模に関わらず多かったことから、集団外から飛来する長距離散布種子がシードレインの親数に貢献していると考えられた。これらのことから、規模の小さい集団では長距離散布種子がシードレインの遺伝的多様性の維持に貢献している可能性が高いと考えられた。

すなわち、アカマツは遺伝的多様性が高い花粉と長距離散布種子が集団と集団を遺伝的につなぐ役割を果たし、種子を長距離散布させることで攪乱跡地や放棄された草地に遺伝的多様性が高い集団を侵入・定着させ、遺伝的多様性を維持してきたと考えられた。



## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科生圏システム学専攻森圏管理学研究室の井出雄二教授には、初稿から手を加えていただき、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました。

九州大学大学院農学研究院の渡辺敦史准教授には、本論文をとりまとめるきっかけを与えていただくとともに、本研究の当初から共同研究者として調査や実験にご協力いただき、多大なるご指導とご助言を賜りました。また、DNA 実験に関して様々な便宜を図っていただくとともに、終始激励をいただきました。東京大学農学生命科学研究科生圏システム学専攻森圏管理学研究室の齊藤陽子助教には、本論文をまとめるうえで、議論にお付き合いいただくとともに、貴重なご意見と終始懇切にご指導を賜りました。森林総合研究所森林遺伝研究領域樹木遺伝研究室の内山憲太郎博士には、本論文をまとめるうえで貴重なご意見を賜り、データ処理、データ分析に関して終始懇切にご指導を賜りました。

東京大学大学院農学生命科学研究科の宮下直教授、大黒俊哉教授、後藤晋准教授、東京大学アジア生物資源環境研究センターの練 春蘭准教授には、本論文を取りまとめる上で、貴重なご意見とご指導を賜りました。

森林総合研究所林木育種センターの近藤禎二博士、ならびに元森林総合研究所林木育種センターの藤澤義武博士には DNA 実験を行う上で格段のご配慮をいただきました。元福島県林業研究センターの渡邊次郎氏には共同研究者として調査や苗木の育成にご協力いただき、また、本研究を進めるにあたって様々な便宜を図っていただきました。森林総合研究所林木育種センターの高橋誠博士、平尾知士博士、花岡創博士には、議論に付き合ってくださいととともに、本研究に対する貴重なご意見をいただきました。穂積美和氏、佐久間美和氏には野外調査および DNA 実験に関して多大なるご協力をいただきました。

調査地を設置した福島県相馬郡新地町の町役場の方々には野外調査にあたって様々な便宜を図っていただきました。福島県林業研究センター森林環境部の皆様には、採種園や苗畑における調査研究に対して様々なご協力をいただきました。森圏管理学研究室の皆様には、本論文に対する貴重なご意見をいただきました。

妻の真弓、長女の桂葉子、次女の結希子には、本研究を進める上で終始激励とご協力をいただきました。

本研究は以上の多くの方々のもとに成し遂げられたのであり、心から厚く感謝し、お礼を申し上げます。

## 引用文献

- Abe F. (1986) Calorific value of Japanese coniferous wood. *Bull. For. & For. Prod. Res. Inst.* 338: 91-100.
- Adams W.T., Hipkins V.D., Burczyk J., Randall W.K. (1997) Pollen contamination trends in a maturing Douglas-fir seed orchard. *Can. J. For. Res.* 27: 131-134.
- Aldrich P.R., Hamrick J.L. (1998) Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* 281: 103-105.
- Aldrich P.R., Hamrick J.L., Chavarriaga P., Kochert G. (1998) Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Mol. Ecol.* 7: 933-944.
- Al-Rabab'ah M.A., Williams C.G. (2002) Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites. *For. Ecol. Manage.* 163: 263-271.
- 浅川 澄彦、勝田 柁、横山 敏孝 (1981) 日本の樹木種子 針葉樹編. 林木育種協会, 東京.
- Ash J.E., Barkham J.P. (1976) Changes and variability in the field layer of a coppiced woodland in Norfolk, England. *J. Ecol.* 64: 697-712.
- Ashley M.V., Berger-Wolf T.Y., Caballero I.C., Chaovalitwongse W., DasGupta B., Sheikh S.I. (2008) Full sibling reconstruction in wild populations from microsatellite genetic markers. In: *Computational Biology: New Research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York.
- Austerlitz F., Smouse P.E. (2001) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between  $\Phi_{ft}$ , pollen dispersal and interfemale distance. *Genetics* 157: 851-857.
- Austerlitz F., Smouse P.E. (2002) Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. IV. estimating the dispersal parameter. *Genetics* 161: 355-363.
- Austerlitz F., Garnier-Gere P.H. (2003) Modelling the impact of colonisation on genetic diversity and differentiation of forest trees: interaction of life cycle, pollen flow and seed long-distance dispersal. *Heredity* 90: 282-290.
- Austerlitz F., Dick C.W., Dutech C., Klein E.K., Oddou-Muratorio S., Smouse P.E., Sork V.L. (2004) Using genetic markers to estimate the pollen dispersal curve. *Mol. Ecol.* 13: 937-954.
- Bacles C.F.E., Lowe A.J., Ennos R.A. (2006) Effective seed dispersal across a fragmented landscape. *Science* 311: 628.
- Bacles C.F.E., Ennos R.A. (2008) Paternity analysis of pollen-mediated gene flow for *Fraxinus excelsior* L. in a chronically fragmented landscape. *Heredity* 101: 1-13.

- Bittencourt J.V.M., Sebbenn A.M. (2007) Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99: 580-591.
- Bittencourt J.V.M., Sebbenn A.M. (2008) Pollen movement within a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. *Conserv. Genet.* 9: 855-868.
- Bohrer G., Nathan R., Volis S. (2005) Effects of long-distance dispersal for metapopulation survival and genetic structure at ecological time and spatial scales. *J. Ecol.* 93: 1029-1040.
- Bossart J.L., Prowell D.P. (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons, and new directions. *Trends Ecol. Evol.* 13: 202-206.
- Burczyk J., Adams W.T., Shimizu J.Y. (1996) Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuate* Lemmon.) stand. *Heredity* 77: 251-260.
- Burczyk J., Chalupka W. (1997) Flowering and cone production variability and its effect on parental balance in a Scots pine clonal seed orchard. *Ann. For. Sci.* 54: 129-144.
- Burczyk J., Part D. (1997) Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* 79: 638-647.
- Burczyk J., Adams W.T., Moran G.F., Griffin A.R. (2002) Complex patterns of mating revealed in a *Eucalyptus regnans* seed orchard using allozyme markers and the neighbourhood model. *Mol. Ecol.* 11: 2379-2391.
- Cain M.L., Milligan B.G., Strand A.E. (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *Am. J. Bot.* 87: 1217-1227.
- Caron G.E., Leblanc R. (1992) Pollen contamination in a small black spruce seedling seed orchard for 3 consecutive years. *For. Ecol. Manage.* 53: 245-261.
- Cecich R.A., Kang H., Chalupka W. (1994) Regulation of early flowering in *Pinus banksiana*. *Tree Physiol.* 14: 275-284.
- Chalupka W., Cecich R.A. (1997) Control of the first flowering in forest trees. *Scand. J. For. Res.* 12: 102-111.
- Chase M.R., Moller C., Kesseli R., Bawa K.S. (1996) Distant gene flow in tropical trees. *Nature* 383: 398-399.
- 陳 俊、掘 良通、塩見 正衛、山村 靖夫、安田 泰輔、高橋 秀昌、伊木 瑞穂 (2005) 半自然草地および森林化した長期放任草地の群集構造. *日本草地学会誌* 51: 143-151.
- Chung M.-S. (1981) Flowering characteristics of *Pinus sylvestris* L. with special emphasis on the reproductive adaptation to local temperature factor. *Acta Forestalia Fennica* 169: 1-68.
- Clark J.S., Silman M., Kern R., Macklin E., HillerRisLambers J. (1999) Seed dispersal near and far: patterns across temperate and tropical forests. *Ecology* 80: 1475-1494.

- Climont J., Prada M.A., Calama R., Chambel M.R., Sanchez de Ron D., Alia R. (2008) To grow or to seed: ecotypic variation in reproductive allocation and cone production by young female Aleppo pine (*Pinus halepensis*, Pinaceae). *Am. J. Bot.* 95: 833-842.
- Devlin B., Ellstrand N.C. (1990) The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. *Evolution* 44: 248-259.
- Dick C.W., Bermingham E., Lemes M.R., Gribel R. (2007) Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Mol. Ecol.* 16: 3039-3049.
- Dick C.W., Hardy O.J., Jones F.A., Petit R.J. (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Trop. Plant Biol.* 1: 20-33.
- Di-Giovanni F., Kevan P.G., Arnold J. (1996) Lower planetary boundary layer profiles of atmospheric conifer pollen above a seed orchard in northern Ontario, Canada. *For. Ecol. Manage.* 83: 87-97.
- Dow B.D., Ashley M.V. (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Mol. Ecol.* 5: 615-627.
- Dyer R.J., Sork V.L. (2001) Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Mol. Ecol.* 10: 859-866.
- Eckert C.G., Manicacci D., Barrett S.C.H. (1996) Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution* 50: 1512-1519.
- El-Kassaby Y.A., Ritland K. (1986) The relation of outcrossing and contamination to reproductive phenology and supplemental mass pollination in a Douglas-fir orchard. *Silvae Genet.* 35: 240-244.
- El-Kassaby Y.A., Rudin D., Yazdani R. (1989) Levels of outcrossing and contamination in two *Pinus sylvestris* L. seed orchards in northern Sweden. *Scand. J. For. Res.* 4: 41-49.
- El Mousadik A., Petit R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92: 832-839.
- 遠藤 良太、中川 茂子 (2005) マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業で選抜された抵抗性マツ採種園産実生家系の千葉県における評価. *林木の育種* 215: 7-10.
- Erickson V.J., Adams W.T. (1989) Mating success in a coastal Douglas-fir seed orchard as affected by distance and floral phenology. *Can. J. For. Res.* 19: 1248-1255.
- Eriksson U., Jansson G., Yazdani R., Wilhelmsson L. (1995) Effects of supplemental mass pollination (SMP) in a young and a mature seed orchard of *Pinus sylvestris*. *Tree Physiol.* 15: 519-526.

- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fernández-M.J.F., Sork V.L. (2005) Mating patterns of a subdivided population of the Andean oak (*Quercus humboldtii* Bonpl., Fagaceae). *J. Hered.* 96: 635-643.
- Fernández-M.J.F., Sork V.L. (2007) Genetic variation in fragmented forest stands of the Andean oak *Quercus humboldtii* Bonpl. (Fagaceae). *Biotropica* 39: 72-78.
- Fujihara M. (1996) Development of secondary pine forests after pine wilt disease in western Japan. *J. Veg. Sci.* 7: 729-738.
- 藤森 隆郎 (2004) 森林と地球環境保全. 丸善, 東京.
- 藤本 吉幸、戸田 忠雄、西村 慶二、山手 廣太、冬野 劭一 (1989) マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業—技術開発と事業実施 10 か年の成果—. *林育研報* 7: 1-84.
- 深町 加津枝 (2000) 農山村における土地利用とランドスケープの変化. *ランドスケープ研究* 64: 147-150.
- 福島県農林水産部 (1955～2010) 福島県森林・林業統計書. 福島県農林水産部森林計画課.
- Gerber S., Chabrier P., Kremer A. (2003) FAMOZ: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Mol. Ecol. Notes* 3: 479-481.
- Gerber S., Mariette S., Streiff R., Bodenes C., Kremer A. (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1037-1048.
- Giertych M.M. (1965) Systematic lay-outs for seed orchards. *Silvae Genet.* 14: 91-94.
- Gonzalez-Martinez S.C., Gerber S., Cervera M.T., Martinez-Zapater J.M., Gil L., Alia R. (2002) Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1290-1297.
- 郷 正士 (1965) アカマツのタネの発芽と種皮、光、冷処理の関係. 東京大学農学部附属演習林報告 59: 1-18.
- Goudet J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Goto S., Miyahara F., Ide Y. (2002) Monitoring male reproductive success in a Japanese black pine clonal seed orchard with RAPD markers. *Can. J. For. Res.* 32: 983-988.
- Goto S., Shimatani K., Yoshimaru H., Takahashi Y. (2006) Fat-tailed gene flow in the dioecious canopy tree species *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* 15: 2985-2996.

- Goto S., Watanabe A., Miyahara F., Mori Y. (2005) Reproductive success of pollen derived from selected and non-selected sources and its impact on the performance of crops in a nematode-resistant Japanese black pine seed orchard. *Silvae Genet.* 54: 69-76.
- Griffin A.R. (1982) Clonal variations in radiata pine seed orchard. I. Some flowering, cone and seed production traits. *Aust. For. Res.* 12: 295-302.
- Gugerli F., Sperisen C., Buchler U., Magni F., Geburek T., Jeandroz S., Senn J. (2001) Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps. *Mol. Ecol.* 10: 1255-63.
- Guries R.P., Ledig F.T. (1982) Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* 36: 387-402.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W., Sherman-Broyles S.K. (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hamrick J.L. (2004) Response of forest trees to global environmental changes. *For. Ecol. Manage.* 197: 323-335.
- Hanaoka S., Yuzurihara J., Yamashita A., Tomaru N., Tsumura Y., Kakubari Y., Mukai Y. (2007) Pollen-mediated gene flow in a small, fragmented natural population of *Fagus crenata*. *Can. J. Bot.* 85: 404-413.
- 半田 孝俊、加藤 一隆、植木 忠二、河村 嘉一郎 (1995) 非抵抗性花粉の飛来によるアカマツマツノザイセンチュウ抵抗性クローンの子供苗の抵抗性の低下. 第 106 回日本林学会大会学術講演集: 295-296.
- Hardy O.J. (2003) Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Mol. Ecol.* 12: 1577-1588.
- Hardy O.J., Gonza'lez-Marti'nez S.C., Colas B., Fre'ville H., Mignot A., Olivieri I. (2004) Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics* 168: 1601-1614.
- Harju A., Muona O. (1989) Background pollination in *Pinus sylvestris* seed orchards. *Scand. J. For. Res.* 4: 513-520.
- Harrison S. (1991) Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 42: 73-88.
- Hartl D.L., Clark A.G. (2007) Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hedrick P.W., Gutierrez-Espeleta G.A., Lee R.N. (2001) Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Mol. Ecol.* 10: 851-857.
- Heuertz M., Vekemans X., Hausman J.F., Palada M., Hardy O.J. (2003) Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Mol. Ecol.* 12: 2483-2495.

- Higgins S.I., Richardson D.M. (1999) Predicting plant migration rates in a changing world: the role of long-distance dispersal. *Amer. Nat.* 153: 464-475.
- 堀内 美緒、深町 加津枝、奥 敬一、森本 幸裕 (2006) 明治後期の日記にみる滋賀県西部の里山ランドスケープにおける山林資源利用のパターン. *日本造園学会誌* 69: 705-710.
- 星野 定司 (1979) a 赤松パルプ化技術開発の経緯に就いて (第一報). *林業経済* 371: 20-31.
- 星野 定司 (1979) b 赤松パルプ化技術開発の経緯に就いて (第二報). *林業経済* 373: 8-21.
- Ichikawa K., Okubo N., Okubo S., Takeuchi K. (2006) Transition of the satoyama landscape in the urban fringe of the Tokyo metropolitan area from 1880 to 2001. *Landsc. Urban Plan.* 78: 398-410.
- Iwaizumi M.G., Watanabe A., Ubukata M. (2007) Use of different seed tissues for separate biparentage identification of dispersed seeds in conifers: confirmations and practices for gene flow in *Pinus densiflora*. *Can. J. For. Res.* 37: 2022-2030.
- Iwaizumi M.G., Takahashi M., Watanabe A., Ubukata M. (2010) Simultaneous evaluation of paternal and maternal immigrant gene flow and the implications for the overall genetic composition of *Pinus densiflora* dispersed seeds. *J. Hered.* 101: 144-153.
- Iwaizumi M.G., Takahashi M., Isoda K., Austerlitz F. (2013)a Consecutive five-year analysis of paternal and maternal gene flow and contributions of gametic heterogeneities to overall genetic composition of dispersed seeds of *Pinus densiflora* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 100: 1896-1904.
- Iwaizumi M.G., Tsuda Y., Ohtani M., Tsumura Y., Takahashi M. (2013)b Recent distribution changes affect geographic clines in genetic diversity and structure of *Pinus densiflora* natural populations in Japan. *For. Ecol. Manage.* 304: 407-416.
- Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A., Ratterman N.L. (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 6-30.
- Jones F.A., Hamrick J.L., Peterson C.J., Squiers E.R. (2006) Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Mol. Ecol.* 15: 851-861.
- Jones O.R., Wang J. (2010) COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10: 551-555.
- Kalinowski S.T. (2004) Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* 5: 539-543.
- Kalinowski S.T. (2007) HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Mol. Ecol. Notes* 5: 187-189.

- Kalinowski S.T., Taper M.L., Marshall T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- 鎌田 磨人、中越 信和 (1990) 農村周辺の 1960 年代以降における二次植生の分布構造と  
その変遷. *日本生態学会誌* 40: 137-150.
- 環境省 (1973～) 自然環境保全基礎調査. <http://www.vegetation.biodic.go.jp>.
- 環境省 (2014) 日本の里地里山の調査・分析について (中間報告) . <http://www.env.go.jp/nature/satoyama/chukan.html>.
- 菅野 均志、平井 英明、高橋 正、南條 正巳 (2008) 1/100 万日本土壌図 (1990) の読替えによる日本の統一的土壌分類体系—第二次案 (2002) —の土壌大群名を図示単位とした日本土壌図 ペドロジスト 52: 129-133.
- Karaket T., Poompuang S. (2012) CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 324-325: 307-311.
- Karl S.A., Avise J.C. (1992) Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256: 100-102.
- 片切 勝 (1981) 産業考古学と紙・パルプ産業. *紙パ技協誌* 35: 399-402.
- 片山 裕之、北村 寿宏、高橋 一郎 (2005) 江戸時代における奥出雲たたら製鉄の経営の展開. *鉄と鋼* 91: 122-126.
- 加藤 亮助 (1971) アカマツの新しい天然更新技術 「新しい天然更新技術」(柳沢ら編). 創文, 東京.
- Kim Z.S., Lee S.W., Hwang J.W. (1997) Genetic diversity and structure of natural populations of *Pinus thunbergii* in Korea. *Silvae Genet.* 46: 120-124.
- Kishi Y. (1999) Survival of *Pinus densiflora* and *P.thunbergii* forests in Ibaraki prefecture severely damaged by *Bursaphelenchus xylophilus*. *J. For. Res.* 4: 287-290.
- Klinkhamer P.G.L., de Jong T.J. (1987) Plant size and seed production in the monocarpic perennial *Cynoglossum Officinale* L. *New Phytol.* 106: 773-783.
- 小林 準一郎 (1957) アカマツとブナ. *紙パ技協誌* 11: 152-155.
- Kobayashi Y., Koike F. (2010) Separating the effects of land-use history and topography on the distribution of woody plant populations in a traditional rural landscape in Japan. *Landsc. Urban Plan.* 95: 34-45.
- 国土交通省 (1974) 地図・空中写真閲覧サービス. <http://mapps.gsi.go.jp/maplibSearch.do>.
- 小泉 博、大黒 俊哉、鞠子 茂 (2000) 草原、砂漠の生態. 協立出版, 東京.



- Kudoh H., Whigham D. (1997) Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. *Am. J. Bot.* 84: 1285-1293.
- Latta R.G., Linhart Y.B., Fleck D., Elliot M. (1998) Direct and indirect estimates of seed versus pollen movement within a population of ponderosa pine. *Evolution* 52: 61-67.
- Ledig F., Capo-Arteaga T.M., Hodgskiss P.D., Sbay H., Flores-Lopez C., Conkle M.T., and Bermejo-Velazquez B. (2001) Genetic diversity and the mating system of a rare Mexican pinon, *Pinus pinceana*, and a comparison with *Pinus maximartinezii* (Pinaceae). *Am. J. Bot.* 88: 1977-1987.
- Ledig F.T., Clark J.G. (1977) Photosynthesis in a half-sib family experiment in pitch pine. *Can. J. For. Res.* 7: 510-514.
- Ledig F.T., Clark J.G., Drew A.P. (1977) The effects of temperature treatment on photosynthesis of pitch pine from northern and southern latitudes. *Bot. Gaz.* 138: 7-12.
- Lepais O., Darvill B., O'connor S., Osborne J.L., Sanderson R.A., Cussans J., Goffe L., Goulson D. (2010) Estimation of bumblebee queen dispersal distances using sibship reconstruction method. *Mol. Ecol.* 19: 819-831.
- Levins R. (1970) Extinction. *Lectures on mathematics in the life sciences* 2: 75-107.
- Lian C., Miwa M., Hogetsu T. (2001) Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88-98.
- 達 良俊、大沢 雅彦 (1992) 都市景観域における放棄アカマツ植林の二次遷移とアカマツの一斉枯死による影響. *日本生態学会誌* 42: 81-93.
- Liepert S., Bialozyt R., Ziegenhagen B. (2002) Wind-dispersed pollen mediates postglacial gene flow among refugia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 22: 14590-14594.
- Lindgren D., Paule L., Xihuan S., Yazdani R., Segerstrom U., Wallin J.-E., Lejdebroy M.L. (1995) Can viable pollen carry Scots pine genes over long distances? *Grana* 34: 64-69.
- Loiselle B.A., Sork V. L., Nason J., Graham C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82: 1420-1425.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- McEuen A.B., Curran L.M. (2004) Seed dispersal and recruitment limitation across spatial scales in temperate forest fragments. *Ecology* 85: 507-518.
- 三村 鐘三郎 (1918) 純鉄製造用木炭ニ関スル研究 (第二回報告) . *林業試験場研究報告* 16: 131-146.
- Miyata M., Ubukata M. (1994) Genetic variation of allozymes in natural stands of Japanese black pine. *J. Jpn. For. Soc.* 76: 445-455.
- 森口 喜成、後藤 晋、高橋 誠 (2005) 分子マーカー情報に基づく採種園の遺伝的管理. *日林誌* 87: 161-169.

- Moriguchi Y., Taira H., Tani N., Tsumura Y. (2004) Variation of paternal contribution in a seed orchard of *Cryptomeria japonica* determined using microsatellite markers. *Can. J. For. Res.* 34: 1683-1690.
- Moriguchi Y., Tani N., Ito S., Kanehira F., Tanaka K., Yomogida H., Taira H., Tsumura Y. (2005) Gene flow and mating system in five *Cryptomeria japonica* D. Don seed orchards as revealed by analysis of microsatellite markers. *Tree Genet. Genomes* 1: 174-183.
- 村上 拓彦、吉田茂二郎、太田 徹志、溝上 展也、佐々木 重行、桑野 泰光、佐保 公隆、清水 正俊、宮崎 潤二、福里 和朗、小田 三保、下園 寿秋 (2011) 九州本島における再造林放棄地の発生率とその空間分布. *日林誌* 93: 280-287.
- 長池 卓男 (2002) 森林管理が植物種多様性に及ぼす影響. *日本生態学会誌* 52: 35-54.
- 長島 啓子、大本 健司、吉田 茂二郎 (2011) 九州地方における再造林放棄地の植生回復パターンとその要因：再造林放棄地の管理にむけて. *日林誌* 93: 294-302.
- Nagashima K., Yoshida S., Hosaka T. (2009) Patterns and factors in early-stage vegetation recovery at abandoned plantation clearcut sites in Oita, Japan: possible indicators for evaluating vegetation status. *J. For. Res.* 14:135-146.
- Nakanishi A., Tomaru N., Yoshimaru H., Manabe T., Yamamoto S. (2008) Effects of seed-and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. *Heredity* 102: 182-189.
- Nathan R., Katul G.G., Horn H.S., Thomas S.M., Oren R., Avissar R., Pacala S.W., Levin S.A. (2002) Mechanisms of long-distance dispersal of seeds by wind. *Nature* 418: 409-413.
- Nathan R., Katul G.G. (2005) Foliage shedding in deciduous forests lifts up long-distance seed dispersal by wind. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 8251-8256.
- Nathan R., Muller-Landau H.C. (2000) Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends Ecol. Evol.* 15: 278-285.
- Nathan R., Perry G., Cronin J.T., Strand A.E., Cain M.L. (2003) Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos* 103: 261-273.
- Nathan R., Safriel U.N., Noy-Meir I. (2001) Field validation and sensitivity analysis of a mechanistic model for tree seed dispersal by wind. *Ecology* 82: 374-388.
- Nathan R. (2006) Long-distance dispersal of plants. *Science* 311: 786-788.
- Nei M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nielsen L.R., Kjør E.D. (2010) Gene flow and mating patterns in individuals of wych elm (*Ulmus glabra*) in forest and open land after the influence of Dutch elm disease. *Conserv. Genet.* 11: 257-268.

- Nielsen R., Mattila D.K., Clapham P.J., Palsboll P.J. (2001) Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics* 157: 1673-1682.
- 沼田 真 (1966) 草地の状態診断に関する研究Ⅱ－種類組成による診断－. *日本草地学会誌* 12: 29-36.
- 沼田 真 (1999) 生態学辞典 増補改訂版. 築地書館, 東京.
- Numata M. (1969) Progressive and retrogressive gradient of grassland vegetation measured by degree of succession. *Vegetatio* 19: 96-127.
- O'Connell L.M., Mosseler A., Rajora O.P. (2006) Impacts of forest fragmentation on the mating system and genetic diversity of white spruce (*Picea glauca*) at the landscape level. *Heredity* 97: 418-426.
- O'Connell L.M., Mosseler A., Rajora O.P. (2007) Extensive long-distance pollen dispersal in a fragmented landscape maintains genetic diversity in white spruce. *J. Hered.* 98: 640-645.
- Oddou-Muratorio S., Bontemps A., Klein E.K., Chybicki I., Vendramind G.G., Suyama Y. (2010) Comparison of direct and indirect genetic methods for estimating seed and pollen dispersal in *Fagus sylvatica* and *Fagus crenata*. *For. Ecol. Manage.* 259: 2151-2159.
- 小椋 純一 (1993) 明治中期における房総丘陵の植生景観. *日本造園学会誌* 56: 25-30.
- 小椋 純一 (2006) 日本の草地面積の変遷. *京都精華大学紀要* 30: 160-172.
- 小椋 純一 (2010) 日本の草地の歴史を探る. *日本草地学会誌* 56: 216-219.
- 岡田 滋、津田 知明 (1989) 近畿・瀬戸内海地区におけるマツノザイセンチュウ抵抗性個体の選定. *林木育種場研究報告* 7: 85-118.
- Okubo A., Levin S.A. (1989) A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seeds and pollen. *Ecology* 70: 329-338.
- 大賀 宣彦 (1977) 群落の遷移とその機構 植物生態学講座 4. 沼田 真編, 朝倉書店, 東京.
- 太田 猛彦 (2012) 森林飽和 国土の変貌を考える. NHK 出版, 東京.
- Owens J.N., Bennett J., L'Hirondelle S. (2005) Pollination and cone morphology affect cone and seed production in lodgepole pine seed orchards. *Can. J. For. Res.* 35: 383-400.
- 小澤 創 (2007) 周囲の環境が異なる3地点でのマツ花粉のモニタリング. 第12回東北森林科学会講演要旨集.
- Ozawa H., Watanabe J., Chen H., Isoda K., Watanabe A. (2009) The impact of phenological and artificial factors on seed quality in a nematode-resistant *Pinus densiflora* seed orchard. *Silvae Genet.* 58: 145-152.
- Ozawa H., Watanabe A., Uchiyama K., Saito Y., Ide Y. (2012) Genetic diversity of *Pinus densiflora* pollen flowing over fragmented populations during a mating season. *J. For. Res.* 17: 448-498.

- Ozawa H., Watanabe A., Uchiyama K., Saito Y., Ide Y. (2013) Influence of long-distance seed dispersal on the genetic diversity of seed rain in fragmented *Pinus densiflora* populations relative to pollen-mediated gene flow. *J. Hered.* 104: 165-475.
- Pakkad G., Ueno S., Yoshimaru H. (2008) Gene flow pattern and mating system in a small population of *Quercus semiserrata* Roxb. (Fagaceae). *For. Ecol. Manage.* 255: 3819-3826.
- Pakkanen A., Nikkanen T., Pulkkinen P. (2000) Annual variation in pollen contamination and outcrossing in a *Picea abies* seed orchard. *Scand. J. For. Res.* 15: 399-404.
- Parantainen A., Pulkkinen P. (2003) Flowering and airborne pollen occurrence in a *Pinus sylvestris* seed orchard consisting of Northern clones. *Scand. J. For. Res.* 18: 111-117.
- Parker K.C., Hamrick J.L., Parker A.J., Nason J.D. (2001) Fine-scale genetic structure in *Pinus clausa* (Pinaceae) populations: effects of disturbance history. *Heredity* 87: 99-113.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Petit R.J., Hampe A. (2006) Some evolutionary consequences of being a tree. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 187-214.
- Pluess A.R., Sork V.L., Dolan B., Davis F.W., Grivet D., Merg K., Papp J., Smouse P.E. (2009) Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). *For. Ecol. Manage.* 258: 735-744.
- Pogson G.H., Mesa K.A., Boutilier R.G. (1995) Genetic population structure and gene flow in the Atlantic cod *Gadus Morhua*: a comparison of allozyme and nuclear RFLP loci. *Genetics* 139: 375-385.
- Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., McNicol J.W., Forrest G.I., Cottrell J., Powell W. (1998) Gene-pool variation in caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proc. Biol. Sci.* 265: 1697-1705.
- Ramachandran S., Deshpande O., Roseman C.C., Rosenberg N.A., Feldman M.W., Cavalli-Sforza L.L. (2005) Support from the relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 15942-15947.
- Read K.D., Lemay M.A., Acheson S., Bouldin E.G. (2012) Using molecular pedigree reconstruction to evaluate the long-term survival of outplanted hatchery-reared larval and juvenile northern abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Conserv. Genet.* 13: 801-810.
- Ribbens E., Silander J.A., Pacala S.W. (1994) Seedling recruitment in forests: calibrating models to predict patterns of tree seedling dispersion. *Ecology* 75: 1794-1806.

- Richardson B.A., Brunfeld S.J., Klopfenstein N.B. (2002) A from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus albicaulis*). *Mol. Ecol.* 11: 215-227.
- Ritland K., El-Kassaby Y.A. (1985) The nature of inbreeding in a seed orchard of Douglas fir as shown by an efficient multilocus model. *Theor. Appl. Genet.* 71: 375-384.
- Ritland K. (1988) The genetic-mating structure of subdivided populations. II. Correlated mating models. *Theor. popul. Biol.* 34: 320-346.
- Ritland K. (2002) Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Robledo-Arnuncio J.J., Alia R., Gil L. (2004)a Increased selfing and correlated paternity in a small population of a predominantly outcrossing conifer, *Pinus sylvestris*. *Mol. Ecol.* 13: 2567-2577.
- Robledo-Arnuncio J.J., Smouse P.E., Gil L., Alia R. (2004)b Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *For. Ecol. Manage.* 197: 245-255.
- Robledo-Arnuncio J.J., Gil L. (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13-22.
- Rongwen J., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lavi U., Cregan P.B. (1995) The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48.
- 齋藤 真己、平 英彰 (2006) ガラス室内スギミニチュア採種園の特徴とその有効性. *日林誌* 88: 187-191.
- 齋藤 幹夫、山本 千秋、荻原 訓、河野 耕蔵、下平 勝三 (1979) クロマツ雌球花の開花と受粉の適期. *林業試験場研究報告* 302: 79-96.
- Sakai A., Hirayama T., Oshioka S., Hirata Y. (2006) Effects of elevation and postharvest disturbance on the composition of vegetation established after the clear-cut harvest of conifer plantations in southern Shikoku, Japan. *J. For. Res.* 11: 253-265.
- Salvador L., Alia R., Agundez D., Gil L. (2000) Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) in the Iberian peninsula. *Theor. Appl. Genet.* 100: 89-95.
- Santos-del-Blanco L., Climent J., Gonzalez-Martinez S.C., Pannell J.R. (2012) Genetic differentiation for size at first reproduction through male versus female functions in the widespread Mediterranean tree *Pinus pinaster*. *Ann. Botany* 110: 1449-1460.
- 佐竹 義輔、原 寛、亘理 俊次、富成 忠夫 (1989) 日本の野生植物: 木本. 平凡社, 東京.
- 佐藤 大七郎、堤 利夫 (編) (1988) 樹木一形態と機能一. 文英堂, 東京.
- 佐藤 敬二 (1961) 日本のマツ 第1巻. 一般社団法人 全国林業改良普及協会, 東京.

- Sato T., Isagi Y., Sakio H., Osumi K., Goto S. (2006) Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. *Heredity* 96: 79-84.
- Savolainen O., Pyhajarvi T., Knurr T. (2007) Gene flow and local adaptation in trees. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 38: 595-619.
- Schueler S., Schluüenzen K.H. (2006) Modeling of oak pollen dispersal on the landscape level with a mesoscale atmospheric model. *Environ. Model. Assess.* 11: 179-194.
- Schuster W.S.F., Mitton J.B. (2000) Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Heredity* 84: 348-361.
- Sefton K.M., Kobl Müller S. (2009) Assessing parent numbers from offspring genotypes: the importance of marker polymorphism. *J. Hered.* 100: 197-205.
- Shiraishi S., Watanabe A. (1995) Identification of chloroplast genome between *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. and *P. thunbergii* Parl. based on the polymorphism in *rbcL* gene (in Japanese with English summary). *J. Jpn. For. Soc.* 77: 429-436.
- Signorovitch J., Nielsen R. (2002) PATRI-paternity inference using genetic data. *Bioinformatics* 18: 341-342.
- Slavov G.T., Howe G.T., Adams W.T. (2005) Pollen contamination and mating patterns in a Douglas-fir seed orchard as measured by simple sequence repeat markers. *Can. J. For. Res.* 35: 1592-1603.
- Smouse P.E., Peakall R. (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Smouse P.E., Sork V.L. (2004) Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. *For. Ecol. Manage.* 197: 21-38.
- Sork V.L., Campbell D., Dyer R., Fernandez-Manjarres J.F., Nason J., Petit R., Smouse P., Steinberg E. (1998) In: *Proceedings from a Workshop on Gene Flow in Fragmented, Managed, and Continuous Populations*. National Center for Ecological Analysis and Synthesis, Santa Barbara, CA. <https://www.nceas.ucsb.edu/nceas-web/projects/2057/nceas-paper3/geneflow.pdf>.
- Sork V.L., Nason J., Campbell D.R., Fernandez J.F. (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* 14: 219-224.
- Sork V.L., Davis F.W., Smouse P.E., Apsit V.J., Dyer R.J., Fernández-M.J.F., Kuhn B. (2002) Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone? *Mol. Ecol.* 11: 1657-1668.
- Sork V.L., Smouse P.E. (2006) Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landsc. Ecol.* 21: 821-836.

- スプレイグ D.S. (2003) 関東平野における草地の機能と空間構造 — 「平野草地」は存在したのか? —. 日本草地学会誌 48: 531-535.
- Starr C.K. (1984) Sperm competition, kinship, and sociality in the *Aculeate Hymenoptera*. Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems. (ed. Smith RL) pp. 427- 464. Academic Press, New York.
- Stoehr M., Mehl H., Nicholson G., Pieper G., Newton C. (2006) Evaluating supplemental mass pollination efficacy in a lodgepole pine orchard in British Columbia using chloroplast DNA markers. *New Forests* 31: 83-90.
- Stoehr M.U., Newton C.H. (2002) Evaluation of mating dynamics in a lodgepole pine seed orchard using chloroplast DNA markers. *Can. J. For. Res.* 32: 469-476.
- Stoehr M.U., Orvar B.L., Vo T.M., Gawley J.R., Webber J.E., Newton C.H. (1998) Application of a chloroplast DNA marker in seed orchard management evaluations of Douglas-fir. *Can. J. For. Res.* 28: 187-195.
- Streiff R., Ducousso A., Lexer C., Steinkellner H., Gloessl J., Kremer A. (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Mol. Ecol.* 8: 831-841.
- 須賀 丈 (2010) 半自然草地の変遷史と草原性生物の分布. 日本草地学会誌 56: 225-230.
- 只木 良也 (1996) 森林環境科学. 朝倉書店, 東京.
- 高山 芳之助 (1968) アカマツの採種園に関する研究 (Ⅲ) 開化日におけるクローン間差異. 日林誌 50: 103-108.
- 竹谷 忠義 (2011) 群馬県における再造林放棄地の更新状況. 群馬県林業試験場研究報告 16: 1-12.
- 竹内 寛興、半田 孝俊、大黒 正、岡村 政則 (1989) 四国地区におけるマツノザイセンチュウ抵抗性個体の選定. 林木育種場研究報告 7: 119-143.
- 田中 亘、野田 英志、細田 和男 (2005) 自治体における里山林の保全・管理・利用実態 (I) —近畿地方の市町村を対象としたアンケート調査から—. 森林総合研究所研究報告 397: 291-296.
- Tang D.Q., Ide Y. (2001) Genetic variation in fruitfulness in a Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Endl.) seed orchard and its impact on the maintenance of genetic diversity in seedlots. *J. For. Res.* 6: 67-72.
- 寺田 貴美雄、戸田 忠雄、野口 常介 (1997) 東北等, 寒冷地における被害林分からのマツノザイセンチュウ抵抗性候補木の選抜 —東北地方等マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業における接種検定の対照木について—. 林木育種センター東北育種場年報 27: 57-58.

- 戸田 忠雄、藤本 吉幸、西村 慶二、山手 廣太、冬野 劭一 (1989) 九州地区におけるマツノザイセンチュウ抵抗性個体の選定. 林木育種場研究報告 7: 145-178.
- 戸田 忠雄 (2004) アカマツおよびクロマツのマツ材線虫病抵抗性育種に関する研究. 林木育種センター研究報告 20: 83-218.
- 塚田 松雄 (1974) 日本における植生の編成 「花粉は語る」. 岩波書店, 東京.
- 都築 伸行、駒木 貴彰、山田 茂樹、田中 亘 (2007) 四国における森林所有権移動と再造林放棄. 森林計画学会誌 41: 213-219.
- Uchiyama K., Goto S., Tsuda Y., Takahashi Y., Ide Y. (2006) Genetic diversity and genetic structure of adult and buried seed populations of *Betula maximowicziana* in mixed and post-fire stands. For. Ecol. Manage. 237: 119-126.
- Uchiyama K., Goto S., Ide Y. (2009) Effects of population density on male and female reproductive success in the wind-pollinated, wind-dispersed tree species *Betula maximowicziana*. Conserv. Genet. 10: 1265-1275.
- 上原 敬二 (1961) 樹木大図説 第1巻. 有明書房, 東京.
- 梅田 久男、田中 一登、滝澤 伸 (2009) 再造林放棄地における天然更新の評価手法と更新技術の開発. 宮城県林業技術総合センター林業試験場成果報告 18: 31-40.
- Wang J. (2004) Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. Genetics 166: 1963-1979.
- Wang J., Santure A.W. (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. Genetics 181: 1579-1594.
- Watanabe A., Iwaizumi M. G., Ubukata M., Kondo T., Lian C., Hogetu T. (2006) Isolation of microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR techniques. Mol. Ecol. Notes 6: 80-82.
- 渡辺 真紀子 (1990) 黒ボク土の生成と農耕文化: とくに放牧との関わりについて. お茶の水地理 31: 16-23.
- Weiner J., Campbell L.G., Pino J., Echarte L. (2009) The allometry of reproduction within plant populations. J. Ecol. 97: 1220-1233.
- Wheeler N.C., Jech K.S. (1992) The use of electrophoretic markers in seed orchard research. New Forests 6: 311-328.
- Whitlock M.C., McCauley D.E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$ . Heredity 82: 117-125.
- Willson M.F. (1993) Dispersal mode, seed shadows, and colonization patterns. Plant Ecol. 107-108: 261-280.



- Willson M.F., Traveset A. (2000) The Ecology of Seed Dispersal. In *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2nd edition (ed. Michael Fenner) PP85-110, CABI publishing, New York.
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright S. (1969) *Evolution and the genetics of populations Vol. 2. The theory of gene frequencies.* Univ. Chicago Press, Chicago.
- 山場 淳史、中越 信和 (1999) 住居者属性から見た里山の利用・管理に関する意識調査. *日林誌* 81: 139-146.
- Yamagawa H., Ito S., Nakao T. (2010) Restoration of semi-natural forest after clearcutting of conifer plantations in Japan. *Landscape Ecol. Eng.* 6:109-117.
- 山本 勝利 (2001) 里地におけるランドスケープ構造と植物相の変容に関する研究. *農環研報* 20: 1-105.
- 安田 初雄 (1954) 日本に於ける山地放牧の地理的研究 (その1). *福島大学学芸学部論集* 5: 38-47.
- 安田 初雄 (1956) 日本の山地放牧. *地学雑誌* 65: 12-20.
- 安田 初雄 (1959) 中世以前の東北の牧馬. *人文地理学会誌* 11: 389-402.
- 安田 初雄 (1962) 本邦における放牧の地理学的研究. *福島大学学芸学部論集* 13: 41-85.
- 安田 喜憲 (1995) *森と文明の物語.* 筑摩書房, 東京
- 矢頭 献一 (1964) *図説 樹木学.* 朝倉書店, 東京.
- 吉田 茂二郎 (2011) 再造林放棄地に関する研究を特集とした背景 特集「再造林放棄地の実態と森林再生—九州地方における研究—」. *日林誌* 93: 277-279.
- 吉岡 邦二 (1958) *日本マツ林の生態学的研究.* 日本林業技術協会, 東京.
- Young A., Boyle T., Brown T. (1996) The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecol. Evol.* 11: 413-418.
- Zhou J., Naito K., Takahashi Y. (2002) Secondary vegetation and succession of abandoned grazed grasslands in upland Southwest Honshu, Japan. *Veg. Sci.* 19: 11-23.

付表及び付録

付表-1 各章において用いた各種パラメータおよび統計分析手法およびその算出に用いたソフトウェア\*

Appendix Table 1 Parameters and statistical methods used in each chapter and softwares employed

遺伝的多様性の指標 Parameters of genetic diversity	対象とするデータ Target data										使用したソフトウェア (Reference or published company)	
	集団 Population					採種園 Seed orchard						
	遺伝子座 Locus	成木 Mature tree	胚 Embryo	父性 アレル Paternal allele	母性 アレル Maternal allele	種子 Seed	植栽木 Clone	種子 Seed	父性 アレル Paternal allele	母性 アレル Maternal allele		採種園産 実生苗 Test seedling
検出アレル数(A) Number of detected alleles per locus	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet, 2001)
近交係数( $F_{IS}$ ) Inbreeding coefficient		3	3									"
固定指数( $F_{ST}$ ) Fixation index		3										"
ヘテロ接合度( $H_0$ ) Observed heterozygosity	3, 4											"
遺伝子多様度( $H_E$ ) <i>Net's</i> unbiased gene diversity	3, 4	3, 4	3	3	3			4				"
アレリックリッチネス( $R$ ) Allelic richness	3	3, 4	3	3	3			4				"
プライベートアレリックリッチネス( $PR$ ) Private allelic richness		3, 4	3	3	3			4				HP-RARE ver. 1.0 (Kalinowski, 2005)
排斥確率(EPI, first parent) Exclusion probability of the first parent	3, 4											CERVUS ver. 3.0 (Kalinowski <i>et al.</i> , 2007)
親子識別 Parentage analysis		5		5	5	4	4	4	4	4		FaMoz (Gerber <i>et al.</i> , 2003)
分子分散分析(AMOVA) Analysis of molecular variance		4										GenAlEx ver. 6.3 (Peakall & Smouse, 2006)
近親関係復元法によるシードレインの親数の推定 Sibship reconstruction estimate of breeding parents		5		5	5							COLONY ver. 2.0 (Jones & Wang, 2010)
最尤推定親数(MLE ( $N$ )) Maximum likelihood estimate of breeding parents				5	5							PATRI (Signorovitch & Nielsen, 2002)
分散分析(ANOVA) Analysis of variance		3, 4	3	3	3							StatView ver. 5.0 (SAS Institute Inc.)
マン-ホイットニ検定 Man-Whitney test		3	3	3, 5	3, 5							"
スピアマン順位相関分析 Spearman's rank correlation analysis		3	3	3, 5	3, 5							"
フィッシャーの正確確率検定 Fisher's exact probability test		5		5	5							"

\*、表中の数字はそれぞれが用いられた章を示す。

\*、Numbers in the table show the chapter where the parameters were used.

付表- 2 集団の規模とシードレインの花粉親に関するパラメーターの相関関係

Appendix Table 2 Correlation between the scale of the population and parameters in pollen parent of the seed rain

集団の規模 Scale of population	花粉親が集団内の 調査木である観察確率 Observed probability of seed parent within the population ( $P_o$ )	シードレインの親数 The number of pollen parents in the seed rain	
		花粉親の総数 NPP	最尤推定親数 MLE ( $N$ )
面積* Area	$P < 0.05$ ( $r = -0.732$ )	ns ( $r = -0.191$ )	ns ( $r = 0.060$ )
立木本数* Size	ns ( $r = -0.567$ )	ns ( $r = -0.141$ )	ns ( $r = 0.798$ )

第5章において、相関分析はスピアマンの順位相関係数を用いた(表- 5. 2を参照)。同じデータをピアソンの相関係数を用いて再分析を行った。

\*、面積(ha)と立木本数を自然対数に変換し、各パラメーターと相関分析を行った。括弧内に相関係数を示し、有意水準( $P < 0.05$ )はボンフェローニ補正を行った。

Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient was used in chapter 5 (see also Table 5.2). Same data was re-analyzed by Pearson's correlation coefficient.

\*, Correlation analysis with Pearson's correlation coefficient was used between natural logarithm of the area of the population (ha) or the size of the population (trees) and each parameter. Correlation coefficient was shown in parentheses. Significance level ( $P < 0.05$ ) was converted with Bonferroni correction.

付表- 3 集団の規模とシードレインの種子親に関するパラメーターの相関関係

Appendix Table 3 Correlation between the scale of the population and parameters in seed parent of the seed rain

集団の規模 Scale of population	花粉親が集団内の 調査木である観察確率 Observed probability of seed parent within the population ( $P_o$ )	シードレインの親数 The number of pollen parents in the seed rain	
		種子親の総数 NSP	最尤推定親数 MLE ( $N$ )
		面積* Area	ns ( $r = -0.535$ )
立木本数* Size	ns ( $r = -0.377$ )	ns ( $r = 0.327$ )	ns ( $r = 0.043$ )

第5章において、相関分析はスピアマンの順位相関係数を用いた(表- 5. 4を参照)。同じデータをピアソンの相関係数を用いて再分析を行った。

\*、面積(ha)と立木本数を自然対数に変換し、各パラメーターと相関分析を行った。括弧内に相関係数を示し、有意水準( $P < 0.05$ )はボンフェローニ補正を行った。

Correlation analysis with Spearman's rank correlation coefficient was used in chapter 5 (see also Table 5.4). Same data was re-analyzed by Pearson's correlation coefficient.

\*, Correlation analysis with Pearson's correlation coefficient was used between natural logarithm of the area of the population (ha) or the size of the population (trees) and each parameter. Correlation coefficient was shown in parentheses. Significance level ( $P < 0.05$ ) was converted with Bonferroni correction.

## 付録-1 DNA 抽出法および PCR 法

### Appendix 1 Methods of DNA extraction and PCR

DNA 抽出に用いた材料は、8 集団 (pf1~pf8、図-3.1[P42]) で選定された調査木から採取された針葉とシードレイン及びマツノザイセンチュウ抵抗性アカマツクローン採種園の全植栽個体から採取された針葉と調査個体 (A~U、図-4.2[P69]) から採取された種子である。

針葉は 1 試料あたり数 mg を粉砕し、シードレインは胚と胚乳に分けて粉砕し、種子は発芽後の芽生えを粉砕し、DNA 抽出に供した。DNA 抽出は臭化セチルトリメチルアンモニウム (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法によって行った (Shiraishi and Watanabe, 1995)。その後、5 もしくは 8 個のマイクロサテライト (simple sequence repeat, SSR) の遺伝子座を増幅した。ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) による遺伝子座の増幅はマルチプレックス PCR キット (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) を用い、DNA Engine™ Model PTC-200 サーマルサイクラー (MJ Research Inc., Hercules, CA, USA) によって行った。PCR 反応条件はキットで勧められている標準的な SSR サーマル反応を部分修正した (Iwaizumi *et al.*, 2007)。増幅産物のサイズを ABI PRISM 3100 ジェネティックアナライザー (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) を用い、サイズスタンダードに GENESCAN-500 LIZ (Applied Biosystems) を適用して決定した。遺伝子座のジェノタイプングは GeneMapper 3.5 ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて行った。DNA 抽出を行ったサンプルのうち、一つでも増幅されない遺伝子座があった場合、それらは統計分析に用いなかった。

## 付録-2 親子鑑定法

### Appendix 2 Parentage analysis

調査地にはアカマツ集団が多く存在しているため、採種園植栽クローンや集団で選定された成木、採種園から得た種子やそれから育成された苗及び集団から得たシードレインの親の全てではなく、多く存在する親の一部でしかない。そのため、設定された調査区（採種園もしくは集団）における遺伝子流動はサンプリングされた親以外の遺伝子流動（gene flow from outside the sampling individuals, GFO）とサンプリングされた親の遺伝子流動（gene flow from inside the sampling individuals, GFI）が存在する。本研究で明らかにしたい遺伝子流動（園外花粉の種子や採種園産苗に対する寄与及び集団内の調査木のシードレインに対する寄与）を把握するためには GFO と GFI を正確に推定する必要がある（Devlin and Ellstrand, 1990）。

本研究で採用したアルゴリズムは最尤法を元にした親子識別法であり、GFO と GFI をシミュレーションによって正確に分けることができる（Gerber *et al.*, 2003）。採取された子のサンプル（シードレイン、種子、苗）に対する最もあり得る唯一の親は尤度比のスコア（log-likelihood ratio, LOD）によって特定される。LOD はある一つの子のサンプルに対して親候補として選定された個体（集団の成木もしくは採種園植栽クローン）の親としての尤度をその子とは全く関係のない個体の親としての尤度で割った値である。最尤法はこの LOD 値を全ての親候補として選定された個体と比較し、LOD 値が最も高い個体を真の親とする手法である（Gerber *et al.*, 2000）。しかしながら、最も高い LOD 値の親候補と 2 番目に高い親候補の LOD 値の差がわずかだった場合、真の親を間違えて選定する可能性がある（GFO と GFI を識別できない）。採用したアルゴリズムでは有意な LOD 値を決定するための閾値をシミュレーションによって推定する。

シミュレーションは、二つの仮想の子集団の遺伝子プールをもとに行われる。一つは親候補として選定された集団の成木もしくは採種園植栽クローン（以下、選定された親候補集団とする）を両親として持つ 10,000 個の子のマルチローカスの遺伝子型をアレル頻度をもとにランダムに作成する（set 1）。もう一つは選定された親候補集団以外の親を両親として持つ 10,000 個の子のマルチローカスの遺伝子型を全サンプル（選定された親候補集団と分析に供する子サンプル）のアレル頻度をもとにランダムに作成する（set 2）。シミュレーションエラー率、突然変異とタイピングエラーやヌルアレルによる LOD 値の誤計算を加味したものを 0.01 に設定した。そして、それぞれの子集団（set 1、set 2）と選定された親候補集団をもとに LOD 値を計算し、LOD 値の頻度分布を作成する。二つの分布が交

差する点の LOD 値をタイプ 1 エラーとタイプ 2 エラーを最小にする閾値として採用する (Gerber *et al.*, 2000)。タイプ 1 エラーとは set 1 の真の親を選定された親候補集団以外の個体と間違えて判定する割合 (選定された親候補木が真の親であるにも関わらず、真の親ではないと誤判定する割合) である。タイプ 2 エラーとは set 2 の真の親を選定された親候補集団と間違えて判定する割合 (選定された親候補木以外の個体が真の親であるにも関わらず、真の親ではないと誤判定する割合) である。一般的にタイプ 2 エラーが cryptic gene flow (識別が困難な遺伝子流動) とされる。