

サクラバハノキ (*Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz.) の 保全に関する遺伝・生態学的研究*

宮本 尚子⁽¹⁾

Naoko Miyamoto⁽¹⁾

Genetic and Ecological Studies
for the Conservation of *Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz.

目 次

第1章 序 論

第1節 はじめに

- 1) 研究の背景 23
- 2) サクラバハノキの現状 25

第2節 ハノキ属の概要

- 1) ハノキ属の分類 25
- 2) サクラバハノキの種特性 27

第3節 本研究の目的と論文の構成

- 1) 本研究の意義 29
- 2) 萌芽および集団の動態に関する研究の目的 29
- 3) 遺伝的多様性に関する研究の目的 30
- 4) 集団内遺伝構造に関する研究の目的 31
- 5) 本論文の構成 32

第2章 サクラバハノキの生態的特徴

第1節 はじめに 32

第2節 材料および方法

- 1) 調査地 32

(1) 林木育種センター北海道育種場

〒069-0836 北海道江別市文京台緑町561

Hokkaido Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center

561 Bunkyo-dai, Midori-machi, Ebetsu, Hokkaido 069-0836 Japan

* 本論文は京都大学博士号（農学）請求論文である。

2) 調査および解析方法	
(1) サクラバハノキとハノキの萌芽性の比較	33
(2) サクラバハノキ個体内の幹構造	34
(3) サクラバハノキ局所集団の動態	34
第3節 結 果	
1) サクラバハノキとハノキの萌芽性の比較	34
2) サクラバハノキ個体内の幹構造	37
3) サクラバハノキ局所集団の動態	37
第4節 まとめ	39
第3章 サクラバハノキにおけるアロザイムマーカーの開発	
第1節 はじめに	39
第2節 材料および方法	
1) 材 料	39
2) アロザイムの分析方法	40
(1) 酵素の抽出	40
(2) 電気泳動	40
(3) 染色および固定	40
(4) ザイモグラムの観察	41
第3節 結 果	
1) アロザイム遺伝子座と対立遺伝子の推定	41
2) シキミ酸脱水素酵素 (ShDH)	41
3) グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)	41
4) ジアホラーゼ (DIA)	43
5) アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT)	43
6) アミラーゼ (AMY)	43
7) アラニンアミノペプチターゼ (AAP)	43
8) ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)	43
9) アコニターゼ (ACO)	43
10) ホスホグルコースイソメラーゼ (PGI)	46
第4節 まとめ	46
第4章 サクラバハノキのアロザイムによる集団遺伝学的解析	
第1節 はじめに	46
第2節 材料および方法	
1) 材 料	46

2) 方 法

(1) 集団レベルの解析

a. 多型的遺伝子座の割合	50
b. 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数	50
c. 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数	50
d. 平均ヘテロ接合度	50
e. 近交係数	51
f. 遺伝的分化を表す統計量	51

(2) 種レベルの解析

a. 多型的遺伝子座の割合	52
b. 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数	52
c. 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数	52
d. 平均ヘテロ接合度	52

第3節 結 果

1) 集団レベルの解析

(1) 検出された対立遺伝子とその頻度	54
(2) 集団レベルの遺伝的変異	54
(3) 近交係数	54
(4) 遺伝的分化を表す指標	54

2) 種レベルの解析

第4節 まとめ

第5章 サクラバハノキの集団内遺伝構造

第1節 はじめに

第2節 材料および方法

1) 解析の対象とした集団

(1) 岩手県湯田町の集団	56
(2) 茨城県十王町の集団	56
(3) 栃木県今市市の集団	57

2) 林齢の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

3) 同一局所集団の遺伝構造に関する時系列の比較

4) 伐採歴の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

5) 解析方法

(1) Moran's I	60
(2) SND	60
(3) NAC	60

第3節 結 果	
1) 林齢の異なる局所集団間の遺伝構造の比較	64
2) 同一局所集団の遺伝構造に関する時系列の比較	65
3) 伐採歴の異なる局所集団間の遺伝構造の比較	71
第4節 ま と め	72
第6章 総合考察	
第1節 生態学的にみたサクラバハノキの保全の方法	72
第2節 遺伝学的にみたサクラバハノキの保全の方法	74
第3節 本研究に基づいたサクラバハノキおよび生物多様性保全への提言	75
摘 要	76
謝 辞	77
引用文献	77

第1章 序 論

第1節 はじめに

1) 研究の背景

人類は日常生活の中で、生物体やその生産物を利用しつづけてきた。急増する世界人口をささえつつ、より豊かな生活を目指すためには、生物体の改良、すなわち育種がますます重要になると思われる。近年の目覚ましいバイオテクノロジーの発展、とくに遺伝子組み換え技術の発展は、生物の改良に新たな道を切り拓いた。しかし、いかにバイオテクノロジーが進歩しても、新しい有用遺伝子を人工的に創出することは、現在のところ不可能と考えられている。一方、農林水産業の分野で行われている育種では、生物種がもつ膨大な遺伝変異の中から、有益な個体を選抜し、それを育種素材として利用するという方法が用いられている。しかし、育種技術が高度に発展して優秀な品種が育成されると、その品種の遺伝的侵食により、その種全体の遺伝変異が失われていく傾向がある。このことは、将来の育種に利用可能な遺伝変異が急速に減少しつつあることを意味しており、したがって、遺伝変異の保存は育種のみならず人類の生存にとってもきわめて重要な課題である。

地球は、現在、かつてなかった大絶滅時代を迎えている。少し前までふつうに見ていた数多くの生物が絶滅の危機にさらされている（鷲谷・矢原，1996）。生態系はそれを構成する種が様々な種とつながりを保ちつつ形成されているが、そのつながりは微妙なバランスの上に成立しており、実際、たった一種の絶滅により、その種を含んでいた生態系全体が崩壊してしまった例が多く見られる。多くの種が地球上から失われることは、人類が生きていく上で欠かせない食料・エネルギー資源等の基盤を危うくするだけでなく、地球上の全生物に影響を与える可能性が高い（環境省自然環境局生物多様性センター，2002）。したがって生態系を構成するそれぞれの種が失われないようにすること、すなわち種の保存もまたきわめて重要な課題である。

このような危機感に立つて、近年、生物の遺伝変異を資源とみなし、これを保存していこうとする考えが広く浸透してきた。植物の場合、その保存法には、①自然の生育状態のまま保存する生息域内保全と、②本来の生息地から収集してきて、圃場、植物園、温室、施設などで保存する生息域外保全とがある。生息域外保全には、種子保存、栄養体保存、試験管内保存および凍結保存などがあるが、林木の保存は、農作物、果樹などに比べると、①対象植物の種数・系統が著しく多いこと、②長命の植物であるため、種子繁殖に長年月を要すること、③施設による保存では樹体が大きいため膨大なコストを要すること、④組織培養の実験系が確立されていない種が多いため、試験管内保存が困難であること、⑤長期間にわたる種子の保存方法が確立されていないことなど、不利な点が多く、生息域内保全が望ましい。現在、独立行政法人林木育種センターと森林管理局、都道府県が連携して、林木育種センター等の構内に成体で約2万点、貯蔵施設に種子・花粉を約6千点保存するとともに、人工林242ヶ所990haを造成して生息域外保全を図っているが、上記理由により、国有林内の399ヶ所、計45,600haの天然林を生息域内保全地として登録している。とくに絶滅に瀕している樹種については、生息域外保全地において種苗を生産し、これを再び生息地に戻すという努力もなされている（林木育種センター，2002）。

また林木の場合、保存種内の遺伝変異の大きさや繁殖様式など、遺伝・生殖・生態的特徴についての情報が一部を除いてほとんどない。さらに、林木の多くは風媒もしくは虫媒の他殖性植物であることから、自殖もしくは近親交配を行うと、近交弱勢が起きやすいとされている（大庭・勝田，1991）。実際、現在までにスギやヒノキの造林樹種を中心に遺伝マーカーの開発や連鎖地図の作成などが行われているが、自殖を行うとある特定の遺伝子

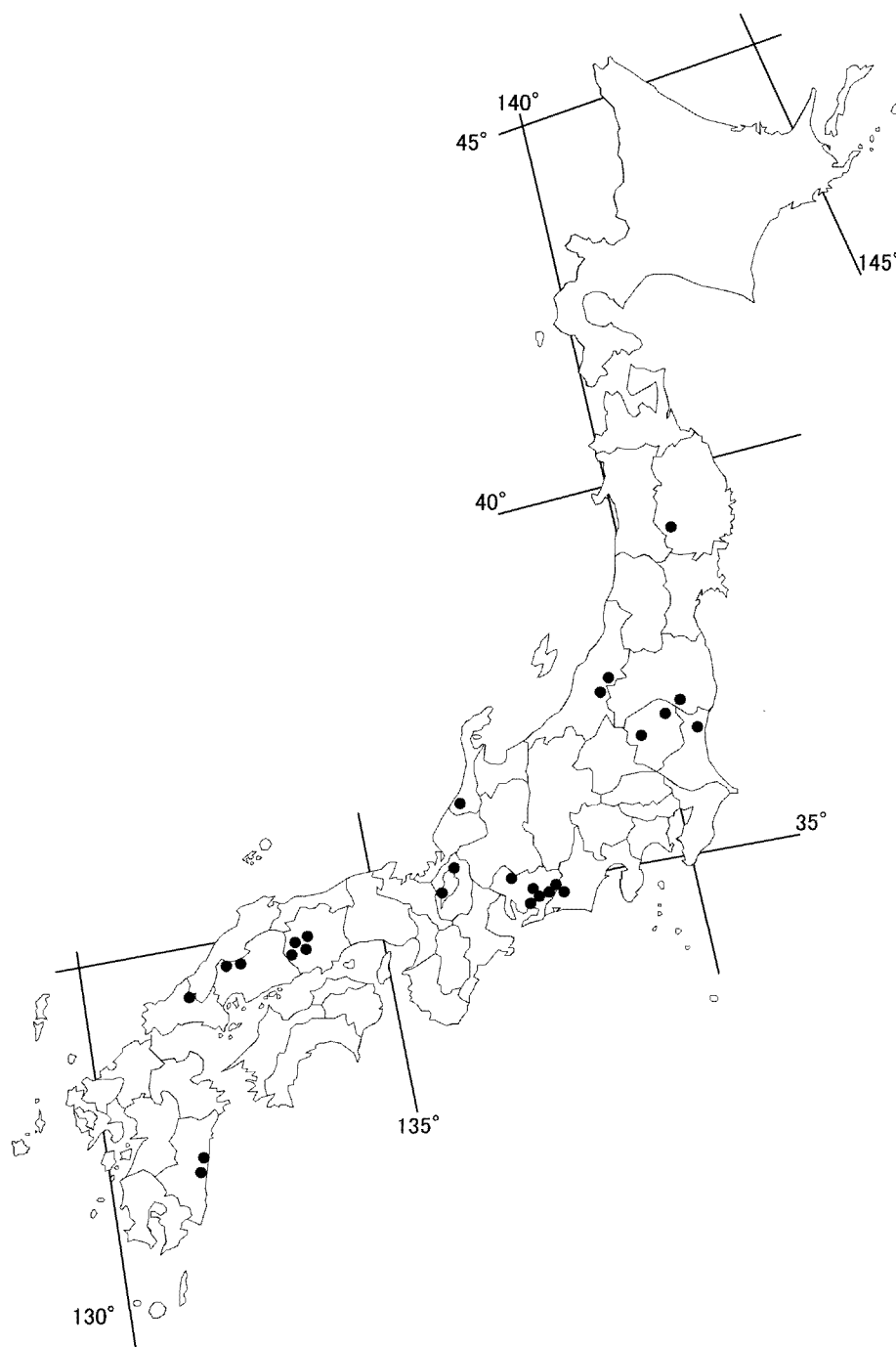


Fig. 1-1 Distribution of natural populations of *A. trabeculosa* in Japan. Author added the latest data to the Kurata's data (1968)

型の発芽率および活力の低下にともなって、遺伝マーカーの分離が歪むことが知られている（河崎, 1990; Mukai *et al.*, 1995; Kuramoto *et al.*, 2000 など）。したがって、特定の地域・家系・系統のみを保全することは、近親交配を招来するため、種のもつ全遺伝変異を保全することにはならないことになる。

本研究で取り扱うサクラバハンノキ (*Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz.) は、準絶滅危惧種に指定されている。この種を絶滅させないためには、サクラバハンノキの生態的状況や遺伝的多様度等の現況を十分把握した上で、保全を行っていくことが望まれる。

2) サクラバハンノキの現状

サクラバハンノキは、カバノキ科ハンノキ属に属する落葉性小高木である。その分布域は中国大陸東南部と日本であり、中国では河南、安徽、江蘇、浙江、江西、福建、広東、湖北、湖南、貴州の各省の標高200~1,000mの山谷、河岸、低湿地に分布している（中国科学院植物研究所・深圳仙湖植物園, 1987）。サクラバハンノキの日本における現在の分布域は、倉田（1971）の原色日本林業樹木図鑑に準じて、本州（茨城県、栃木県、新潟県以西）および九州（宮崎県）としている文献が多いが、最北限は1996年に確認された岩手県湯田町の群落である（Fig. 1-1）。なお、サクラバハンノキの日本での生育地は、日当たりの良い湧水湿地であることが多く、また、Fig. 1-1に示したように、各地に隔離された小集団を形成している。

現在日本において、サクラバハンノキは13県で確認されているものの、生息に適した土地の開発や水田化などによって集団数が減少してきている。このため環境省によって準絶滅危惧種に指定されており、また、群落レッドデータブックでは緊急に保護対策を要する群落として5ヶ所をあげている（日本自然保護協会, 1996）。このように、現在サクラバハンノキは絶滅する恐れがあり、今後何らかの保全の方策をとらねばならないという状況にある。

なお、日本では存在する集団が少なく資源量が少ないことから、現在のところ木材、その他の林業上の利用はない。中国では、建築用材、家具や水桶に、また低湿地の重要造林樹種となっており、さらに樹体の形状が風趣であることから、庭園木として利用されている（倉田, 1971; 中国科学院植物研究所・深圳仙湖植物園, 1987; 中国樹木誌編纂委員会, 1985）。

第2節 ハンノキ属の概要

1) ハンノキ属の分類

サクラバハンノキが属するカバノキ科ハンノキ属は、北半球の温帯から暖帯および南米に約30種が生息し、そのうち日本は2亜属5節約10種が生息している（北村・岡本, 1959; 初島, 1976）。しかし、村井（1962, 1963, 1964）は、形態学的観点から、世界のハンノキ属全種の再分類を行って、1属2亜属7節29種に整理統合し、このうち、日本には2亜属5節11種が生息するとした（Table 1-1）。

村井の分類（1962, 1963, 1964）によると、サクラバハンノキはハンノキ (*Alnus japonica* Steud.) とともにハンノキ亜属ハンノキ節に属している。カバノキ科の進化順序について、村井（1963）は雌・雄花の出現時期、種子成熟期、形態などに基づき、シラカンバ属→ミヤマハンノキ亜属→ハンノキ亜属の順に進化したと考えた。さらに、ハンノキ属ハンノキ節に属する2種1変種（ハンノキ、サクラバハンノキ、エゾハンノキ）の進化順序について、サクラバハンノキが最も古く、ついでハンノキ、エゾハンノキという順で発生したのではないかと推

Table 1-1 Classification of genus *Alnus* habiting in Japan.

genus	subgenus	section	species
<i>Alnus</i>	<i>Alnuster</i>	<i>Bifurcatus</i>	<i>A. pendula</i> Matsum. "Himeashabushi" in Japanese
			<i>A. firma</i> Sieb. et Zucc. "Yashabushi" in Japanese
			<i>A. sieboldiana</i> Matsum. "Oobayashabushi" in Japanese
		<i>Alnobetula</i>	<i>A. maximowiczii</i> Call. "Miyamahannoki" in Japanese
	<i>Gymonothyrus</i>	<i>Fauriae</i>	<i>A. serrulatooides</i> Call. "Kawahannoki" in Japanese
			<i>A. fauriei</i> Lev. "Miyamakawahannoki" in Japanese
		<i>Japonicae</i>	<i>A. japonica</i> Steud. "Hannoki" in Japanese
			<i>A. trabeculosa</i> Hand.-Mazz. "Sakurabahannoki" in Japanese
		<i>Glutinosae</i>	<i>A. matsumurae</i> Call. "Yahazuhannoki" in Japanese
			<i>A. inokumae</i> M. et K. "Kobanoyamahannoki" in Japanese
			<i>A. hirsta</i> Turcz. "Keyamahannoki" in Japanese

Reference; Somegou (1985)

Table 1-2 Successful interspecific crossing in genus *Alnus*.

Cross combination			No. of chromosomes	Reference
<i>A. glutinosa</i>	×	<i>A. inokumae</i> M. et K.	—	Murata (1964)
	×	<i>A. hirsta</i> var. <i>tinctoria</i>	—	//
<i>A. inokumae</i> M. et K.	×	<i>A. hirsta</i> Turcz.	2n=21 (3x)	Chiba (1966)
	×	<i>A. glutinosa</i>	2n=21 (3x)	//
<i>A. hirsta</i> Turcz.	×	<i>A. inokumae</i> M. et K.	2n=21 (3x)	//
	×	<i>A. hirsta</i> Turcz.	2n=28 (4x)	//
<i>A. glutinosa</i>	×	<i>A. inokumae</i> M. et K.	2n=21 (3x)	//
	×	<i>A. hirsta</i> Turcz.	2n=28 (4x)	//
<i>A. japonica</i> var. <i>arguta</i>	×	<i>A. inokumae</i> M. et K.	2n=21 (3x)	//
	×	<i>A. hirsta</i> Turcz.	2n=28 (4x)	//
	×	<i>A. glutinosa</i>	2n=28 (4x)	//

Reference; Somegou (1985)

定している。これに対して、菊沢 (1978, 1980) および Kikuzawa (1978) は、側芽の芽鱗がミヤマハンノキ亜属では発達しているが、ハンノキ亜属では未発達であること、およびそれによって夏季の落葉数がハンノキ亜属では多く、ミヤマハンノキ亜属では少ないことを認め、村井とは逆にハンノキ亜属→ミヤマハンノキ亜属→シラカンバ属という順に進化したと報告している。

ハンノキ属に関する細胞遺伝学的研究は1920年代より行われており (Wetzel, 1927; Woodworth, 1929など), $2n=28$ の染色体数を示す種が多いことが確認されている (Darlington and Wylie, 1955; Dobzhansky, 1970)。また、これまでの報告によると、様々な種間で雑種の作出が可能である (染郷, 1985; Table 1-2)。それら雑種の中には、成長の旺盛なものも含まれている。したがって、ハンノキ属樹種の種間交雑育種が成功する可能性は高い。

2) サクラバハンノキの種特性

サクラバハンノキは、形態的・生態的近縁種であるハンノキによく似ており、ハンノキと混在して生息することが多い。しかし、サクラバハンノキは、①葉身の基部がハンノキのように尖っていないこと、②側脈が数多く、下面によく隆起していること、また、③種子に翼がないことなどから、ハンノキと容易に区別できる。さらに、サクラバハンノキはハンノキに比して樹幹が特徴的である。すなわち、ハンノキは胸高直径が10cmを超えるようになると樹幹の表面に亀裂が生じ、色も茶褐色になるのに対し、サクラバハンノキは樹皮に亀裂がなく、灰白色である (倉田, 1968, 1971; 半田, 投稿準備中)。また、サクラバハンノキはハンノキに比べて萌芽力が強く、中心の幹が枯れても周囲の萌芽枝が幹に成長すること、さらに隣接する樹体と根でつながっていること (Fig. 1-2; 半田氏提供) から明らかなように、栄養繁殖をすることが知られている (半田ら, 1996)。さらに、幹の太い個体では、気根が発生する場合もある (Fig. 1-3) (半田, 2002; 飯塚, 私信)。

サクラバハンノキの開花・結実特性は、他のハンノキ属樹種と同様、雌雄同株で、開花は開葉前である。雄花序には柄があり、枝先から4～5個垂れ下がり、雌花序は雄花序の下に上向きにつく。茨城県十王町の加幸沢上流にあるハンノキとサクラバハンノキの混在自生群落を観察した半田によると、ハンノキの花粉は2月初旬 (1997年) から飛散し始めたのに対して、サクラバハンノキの花粉は2月中旬 (1997年) から飛散し始めた。この



Fig. 1-2 Two trunks connecting with a root.
(Photo offered by Handa T.)



Fig. 1-3 Aerial root.



Fig. 1-4 Young fruit.

ようにサクラバハンノキの花粉の飛散最盛期とハンノキの花粉のそれとは若干のずれがあるが、両種の花粉飛散時期には重なる時期がある。しかし両種が混生している群落においても雑種と推定される中間的個体が存在しないことから、両種間には何らかの生殖的隔離があると考えられる（半田，投稿準備中）。

サクラバハンノキの果実（Fig. 1-4）は9～10月に成熟して緑から黒に変色する。成熟期の長径は15～20mmで形は楕円形～卵状楕円形，短柄があり，上向きにつく（倉田，1971）。村井（1964）によると，ハンノキの果実は縦18.3mm，横13.5mm，縦横比が1.4であるのに対して，サクラバハンノキの果実は縦20.9mm，横12.4mm，縦横比1.7であり，サクラバハンノキの方が若干細長い形の果実をもつ。乾燥にともなって種子（堅果）は飛散するが，他のハンノキ属樹種と同様に翌年までつづく（半田，投稿準備中）。

第3節 本研究の目的と論文の構成

1) 本研究の意義

一般にハノキ属の樹種は、地力の乏しい場所においても生息できることから、落葉広葉樹の先駆樹種としていち早く荒廃地に侵入することが知られている。そのためハノキ属には、緑化や地力回復に使用されている樹種が多く、その一部は、砂防工事、のり面緑化、荒廃地緑化に使用されている。このため、その遺伝資源収集と保存が行われてきている。また、ハノキ属樹種では種間雑種を作出しうること、サクラバハノキが現生のハノキの祖先種ではないかという報告もあることから、サクラバハノキの遺伝的多様性の解明および保全法の確立は、今後のハノキ属樹種の育種ならびに遺伝資源の保全に非常に有用な情報を提供すると考えられる。

サクラバハノキは日本においてはもともと集団数が少なく、湿地の乾性化や埋め立てにより集団の数が減少してきており、環境省によって「準絶滅危惧」にランクされている。今後のハノキ属樹種の育種的な観点ばかりでなく、生物多様性保全のための研究にも、サクラバハノキの生態学的特徴や集団の動態に関する研究、遺伝的多様度の評価および集団内家系構造の評価は重要である。

2) 萌芽および集団の動態に関する研究の目的

保全しようとする種の生活史や自生地の生育環境など生態的特性に関するデータを蓄積することは、対象とする種の最適環境を明らかにする上で有効であり、その解明によって当該種の保全計画の立案や、実際の保全活動がスムーズに行われるものと期待される。このことは、生息域内保全の場合にも、生息域外保全の場合にも共通である。とくに希少種に関しては、個体数や集団数が少ないことから、保全の失敗が許されない。このため生息域調査をより精密に行う必要がある（森本・亀山，2001）。

樹木の更新様式には、種子散布による有性繁殖の実生更新と無性繁殖の萌芽更新がある。渡邊（1994）、大庭（1996）は高木の萌芽更新として、根頸萌芽、伏条萌芽、根萌芽や倒木幹萌芽によるものなどがあるとしている。サクラバハノキについては、実生更新の他に、根頸部から萌芽することが知られている（半田ら，1996）。また、サクラバハノキにおいて、隣接個体どうしが根でつながっている事例（半田ら，1996）や、複数の遺伝子座において全く同じ遺伝子型をもつ個体が近接して存在していたという報告（宮本ら，2000）がある。これらのことからサクラバハノキは、実生更新とともに萌芽更新を行っており、その方法としては根頸萌芽に加え、根萌芽や倒木幹萌芽のような方法もとっている可能性が考えられる。しかし実生および萌芽更新をどの程度行っているのかについては明らかになっていない。また、茨城県十王町におけるサクラバハノキの自生地域では、同種が、同属であり絶滅に関する情報についてとくに指定のない「普通種」であるハノキ（倉田，1968）と混在している箇所と、両樹種が棲み分けをして生育している箇所の存在が報告されている（半田ら，1996）。近縁な2種で、一方は広く分布する普通種であるが、他方は分布の限られた希少種で絶滅が危惧されているという例がしばしばある（矢原，1994）。同様の関係にあるサクラバハノキとハノキの生態的な特徴を比較することにより、サクラバハノキの保全に向けた情報が得られる可能性があると考えられる。

さらにサクラバハノキの集団の動態に関してはほとんどデータがないが、このような情報を集積することは集団の維持にとって重要な要因を明らかにすることになり、保全方針を立てる際に必要であると考えられる。

そこで第2章ではサクラバハノキの萌芽特性および集団の動態など保全のための基礎情報となる生態的特性を生息地調査によって解析した。

3) 遺伝的多様性に関する研究の目的

遺伝的多様性に関する解析は、その種がもつ遺伝変異を減少させることなく保全を行う上で重要な判断基準となる。生物の自然集団の遺伝的多様性に関する研究は、これまで形態マーカー、アイソザイムマーカーおよびDNAマーカーなどを用いて行われてきた。近年、DNA解析技術の進歩により、林木でも共優性マーカーであるSSR (Simple Sequence Repeat; あるいはMicrosatellite DNA)やCAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)等の利用が可能になりつつある。SSRは非常に変異性が高く、また、CAPSは遺伝子発現領域を対象としたマーカーであることから保存性が高く、遺伝解析にきわめて有効なDNAマーカーとして評価されている。しかしながら、これらのDNAマーカーは、費用がかさむこと、あるいはデザインしたプライマーと相補性を示さない場合があることから誤って遺伝的多様度を推定してしまう場合があることなど、現段階では使用しにくい状況にある。一方、「アイソザイム」は、同じ基質特異性を示しながら、異なった分子構造を持つ同一種内の酵素タンパク質に与えられた名称である (Markert and Moller, 1959)。このうち、同一遺伝子座の複対立遺伝子によって支配されているものをアロザイム (allozyme) と呼び、集団遺伝学的な研究の解析の対象となるのは、このアロザイム変異である。アイソザイムマーカーは、形態等の遺伝的指標に比べ、①遺伝子 (DNA) の一次産物であるため環境の影響を受けにくい、②自然選択に対して中立である、③高頻度で分布しているものから低頻度で分布しているものまで様々である、④対立遺伝子間に優劣性がなく共優性であるため、多くの場合、バンドパターンから遺伝子型を直接判定することができる、などの特長をもつことから、集団遺伝学的研究に汎用されている。

林木においても、スギ (Tsumura and Ohba, 1992, 1993; Tomaru *et al.*, 1994)、ヒノキ (Shiraishi *et al.*, 1987; Uchida *et al.*, 1991)、オオシラビソ (Suyama *et al.*, 1992, 1997)、クロマツ (Miyata and Ubukata, 1993; 宮田・生方, 1994)、アカマツ (Na'iem *et al.*, 1989; Na'iem *et al.*, 1991)、ボンデローザマツ (Mitton *et al.*, 1980; Woods *et al.*, 1983)、ヨーロッパアカマツ (Gullberg *et al.*, 1985)、ダグラスモミ (Moran and Adams, 1989)、ハイマツ (Goncharenko *et al.*, 1993; Tani *et al.*, 1996) など多くの樹種の天然林集団に関してアイソザイム変異が調べられている。ハンノキ属樹種については、種内の遺伝的多様性を評価するため、アイソザイムマーカーが用いられており、Dusan and Ladislav (2002) はスロバキアの *Alnus glutinosa* Gaertn. 3 集団、Bousquet (1987) はカナダの *Alnus crispa* 22 集団、同じく Bousquet *et al.* (1988) はカナダの *Alnus rugosa* 14 集団、Huh (1999) は韓国のハンノキ (*Alnus japonica*) 17 集団、Huh and Huh (1999) は韓国のケヤマハンノキ (*Alnus hirsta*) 15 集団についてそれぞれ解析しているが、サクラバハンノキに関しては解析がなされていない。針葉樹におけるアロザイムの遺伝子解析の多くは、種子の半数体組織 (胚乳) を用いて行われている。これは交配を経ずに遺伝子型の決定が可能であるからである。一方、広葉樹では、交配によって種子を獲得し、その後代における表現型の分離から、関与する遺伝子座および遺伝子型を決定すべきであるが、樹木は一般に交配可能になるまでに長年月を要するため、交配を経ずにこれらを推定することが多い。分子生物学の発展にともない、近年、酵素の細胞内分布とアロザイム数の関連 (Gottlieb, 1981, 1982) や酵素の高次元構造が明らかにされ、いくつかの酵素種については遺伝子の重複が起きていない場合に期待される最小遺伝子座数と遺伝様式を推定することが可能になった。したがって、アロザイムについては交配実験を行わなくても、関与する遺伝子座数を推定することができるようになった (矢原, 1988)。ただし、この場合、①抽出と泳動の条件が適当でなかったことに起因する酵素の失活、②組織特異性、③調査個体の生理的状态などの要因により、遺伝子座の一部が検出されないこと、さらに④アイソザイムコンフォーマー (化学的修飾を受けたアイソザイム) がいないという前提条件を考慮す

る必要がある。

第3章では、サクラバハノキの遺伝マーカーとして使用しうるアロザイム遺伝子座の検出を目的とした。第4章ではそれらのマーカーを用いて保全の判断基準を得ることを目的として、日本のサクラバハノキの種・集団がもつ遺伝的多様性について集団遺伝学的解析を行った。

4) 集団内遺伝構造に関する研究の目的

集団内遺伝構造 (within-population genetic structure) とは、集団内の遺伝変異の空間分布構造のことを指し、空間遺伝構造 (spatial genetic structure) , 微細空間遺伝構造 (fine-scale spatial genetic structure) などと呼ばれている。天然林集団内における遺伝構造についての解析は、元来地理学や保健衛生学的な研究分野で用いられていた空間的自己相関解析 (spatial autocorrelation analysis) を Sokal and Oden (1987a, b) が生物集団への応用したことを契機として、1980年代前半から盛んに行われるようになった。空間的自己相関解析とは Moran's I や SND といった一連の統計量を用いた解析法の総称であり、集団内の任意の個体間距離とその個体どうしのもつ遺伝変異の情報を解析するものである。遺伝的類似度が高い個体どうしが統計的に有意に近距離に位置している状態のことを、空間的自己相関がある (強い)、または遺伝構造がある (強い)、と表現する。

遺伝構造の解析には、何らかの遺伝マーカーに基づく遺伝変異の分析情報と測量による個体の位置情報が必要である。遺伝変異のデータには、対立遺伝子 (allele) レベル、遺伝子型 (genotype) レベルおよび複数の遺伝子型 (multilocus) レベルがあり、これらの解析は質的に異なった情報を提供する。

集団の遺伝変異の空間構造は、花粉流動や種子散布による遺伝子流動の影響を強く受ける。遺伝子流動の解析には、対立遺伝子レベルの解析が必要である。また、ある時点における集団内各個体の遺伝情報は遺伝子型に基づく。このため、その集団内の遺伝変異の空間構造を把握するためには遺伝子型レベルでの解析も重要である。Turner *et al.* (1982) は、コンピュータシミュレーションにより、距離による隔離 (isolation by distance) 下では世代数を経るとともにホモ接合体の遺伝的なパッチ (patch) が形成されていくとしている。このため、遺伝子型レベルでの解析によっても遺伝子流動の制約にともなう遺伝構造の形成を検出できると考えられる。multilocus レベルでの解析では、haplotype レベルでの遺伝子流動を検討することになる。また、無性繁殖によるクローンの存在が考えられる集団での解析にきわめて有効なアプローチ法である。これ以外にも集団の有効サイズの減少を経たのち遺伝的浮動の影響を受けた集団では、染色体上では実際には連鎖していない遺伝子座間で連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) が生じる。これは、異なる遺伝子座で保有されている変異に、座間で連鎖が生じることを意味している (高橋, 2002)。

以上3つのレベルに対応する代表的な統計量として、対立遺伝子レベルでは Moran's I 、遺伝子型レベルでは SND、multilocus レベルでは NAC がある。

集団内遺伝構造は主に花粉流動や種子散布によって形成されるが (Epperson, 1990; Socal and Wartenberg, 1983), 他にもさまざまな要因が関与しており、中でも生育場所の分断・孤立、制限された種子や花粉の散布、選択、人為的な攪乱などの影響が大きいと考えられている (Sokal and Menozzi, 1982)。空間的自己相関解析を用いて進化の過程で起こった微妙な差異を検出しようとするのは現実的ではないと考えられるが、集団に与える進化上の大まかな要因を考える際にはこの手法は有効であると考えられる (Sokal and Menozzi, 1982)。さらに、これらの統計量の利用によって、生息域内保全集団や育種集団を自然集団から選抜する際に有効な基本情報が得

られるものと考えられる。また、集団内遺伝構造は集団の遺伝変異を保持し、また集団の遺伝変異を正確に評価するためにも考慮に入れなければならない (Epperson, 1989)。

現在までに、多くの樹種において、spatial autocorrelationを用いた遺伝構造の解析が行われるようになり、データが蓄積されつつある。たとえば、この手法を用いて林齢の異なる集団間の遺伝構造の違いを解析した報告が多数ある (Hamrick *et al.*, 1993; Epperson and Alvarez-Buylla, 1997; Parker *et al.*, 2001)。それらは、若齢の集団で顕著にみられた集団内遺伝構造が、集団の齢が大きくなり、間引きが起こるにつれて減少していくと報告している。また人為的な攪乱履歴のある集団では著しい空間的自己相関が認められたという報告もある (Knowles *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 2000)。さらに、栄養繁殖や制限された種子や花粉の散布のあった集団でも顕著な空間的自己相関をもつ遺伝構造が検出されている (Shapcott, 1995)。

サクラバハノキに関しても、集団の遺伝構造を考慮することは、生息域内保全する集団の選定および生息域外保全のためのサンプリングを適切かつ効率的に行う際の基礎的な情報を与えるものと考えられる。そこで第 5 章では遺伝的多様度および集団内遺伝構造の解析を行った。

5) 本論文の構成

本研究では、まず第 2 章で、サクラバハノキの萌芽特性や集団の動態など、生態的側面からの特徴について議論する。第 3 章では、遺伝的分析に使用するアロザイムマーカーの開発について、第 4 章ではアロザイムマーカーを用いてサクラバハノキ 7 集団の集団遺伝学的解析の結果をそれぞれ議論する。第 5 章では集団内遺伝構造を樹齢や伐採歴の異なる集団間で比較し、最後に第 6 章で総合考察として、サクラバハノキの遺伝資源保全の方法について言及する。

第 2 章 サクラバハノキの生態的特徴

第 1 節 はじめに

サクラバハノキの種および集団の適切かつ効率的な保全に関する知見を得るため、本章では、茨城県十王町におけるサクラバハノキとハノキ自生地域において、両種の萌芽特性およびそれに関連するサクラバハノキ複幹個体内の幹構造を調査した。次にサクラバハノキ局所集団の動態を検討するため、最近 6 年間の枯死個体と新規加入個体を調査し、加えて果穂の着果量、実生更新の状況についても調査した。

第 2 節 材料および方法

1) 調査地

今回の調査では外観を基準に、単幹で生育しているものについてはそれを、株立ち状に生育しているものについては株をまとめて 1 個体とした。また萌芽シュートと幹を樹高 2 m で区分した。萌芽シュートは伸長高 0.2 m 以上の開葉しているものとした。

茨城県十王町加幸沢の沢筋と周辺域の湿地（北緯 36 度 42 分，東経 140 度 42 分，標高 50 m）に成立しているサクラバハノキおよびハノキ集団（以下，十王集団とする）（半田ら，1996）は，道路や水路などによって分断されて，局所的に生育し，小集団を構成している（Fig. 2-1；半田氏提供）。ここではそれらの小集団を局所集団と呼

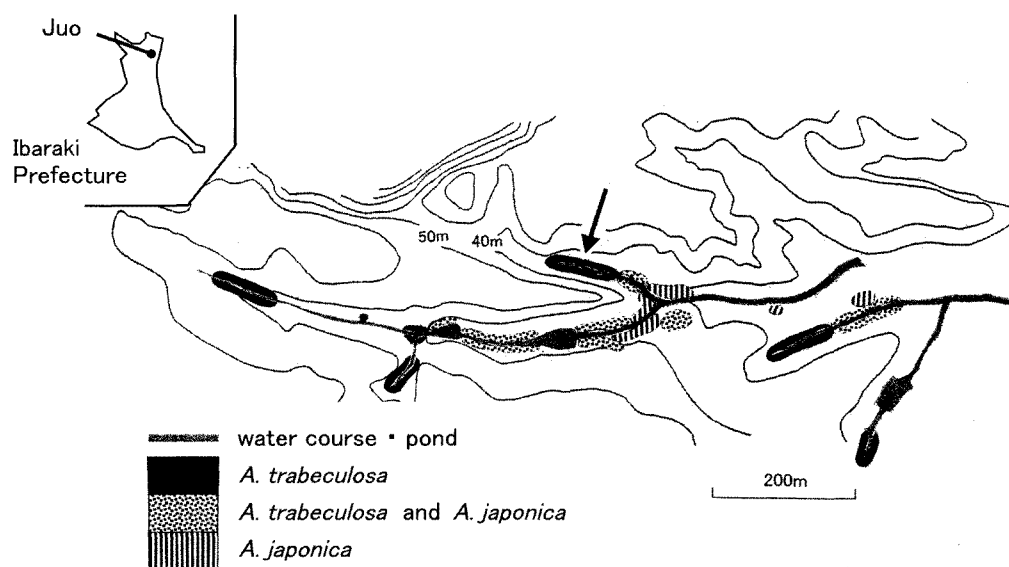


Fig. 2-1 Distribution of *A. trabeculosa* and *A. japonica* in Juo population. The arrow indicates the sub-population of *A. trabeculosa* specially analysed for several ecological traits in addition to tree height and diameter at breast height. Data offered by Handa T.

ぶことにする。今回は十王集団に属する樹高（垂直高）2 m以上のサクラバハノキ全個体とハンノキ全個体、およびそれらのうち146個体が属するサクラバハノキの1局所集団を調査の対象とした（Fig. 2-1の矢印）。本局所集団は、十王集団中で最も大きなものの一つで、その上流にはサクラバハノキは生育しておらず、また、他の局所集団とは異なる沢沿いに成立している。

2) 調査および解析方法

(1) サクラバハノキとハンノキの萌芽性の比較

十王集団の調査対象個体（サクラバハノキ：446個体、ハンノキ：338個体）について、1995年10～12月に個体ごとに測定した全ての幹の樹高および胸高直径のデータ（半田氏提供）をもとに、幹数を基準として樹形を単幹タイプ、複幹タイプの2タイプに区分した。さらに萌芽特性を検討するため、1個体内の最大径をもつ幹を主幹とし、主幹以外の幹はすべて萌芽幹とした。また両種とも、複幹個体率および1複幹個体当たりの幹数は、つぎの式により算出した。

$$\text{複幹個体率 (\%)} = (\text{複幹タイプの個体数} / \text{全個体数}) \times 100$$

$$1 \text{ 複幹個体当たりの幹数 (本)} = \text{複幹タイプの幹数} / \text{複幹の個体数}$$

さらにハンノキについて2001年5月に、十王集団内の任意の60個体について萌芽シュートの有無と本数を調査した。

つぎに、局所集団に属するサクラバハノキ全個体の全ての幹の胸高部（地上1.2m）（胸高直径が最小の幹は6.5cmであった）について、内径5mmの成長錘を用いて樹皮から髄に至るコアを採取した。そのコアの木口面を鋭利な刃物で平滑に調整し、年輪数（胸高部の年輪数を以下、「樹齢」とする）および5年輪単位の年輪幅を測定した。さらに、複幹個体を構成している幹について、髄から6～15年輪間の10年輪の部位について材密度を測定した。なお、偏心および芯腐れが観察された幹については、直径および採取した数本のコアの年輪数と幅から髄の位置までの樹齢を推定した。材密度（Bd）はつぎの式により算出した。なお、生材体積は水中浮力法で測定した。

W_0 (g) : 全乾重量, V_g (cm³) : 生材体積

春から秋を1成長期と考え、Fig. 2-1に矢印で示した局所集団について個体数ならびに幹数の5成長期間の変化を調査した。本局所集団には前述した1995年の調査時点で146個体、241本の幹が存在していた。5成長期後の2001年の4～5月に枯死個体を確認し、局所集団の全ての生存個体を対象に個体ごとの幹数、全ての幹の胸高直径、萌芽シュートの有無および根元付近にある枯死した幹・萌芽シュートの有無を調べた。また前年（2000年）に着果した果穂の量（以下、着果量とする）についても調査した。着果性によって集団内の個体を次の4群；着果が樹冠の全体にみられ、その量が20をこすもの、着果が樹冠の一部に偏っているが、着果量が20をこすもの、果穂の量が20個以下、および観察されないもの、に区分した。さらに局所集団内および隣接地において、実生更新による稚樹の発生があるかどうかを観察した。なお、この局所集団内では、前回調査から最近6年間に人為的な伐採行為は行われていない。

1) サクラバハノキとハノキの萌芽性の比較

Table 2-1 Number of individuals and stems of each tree type, percentage of multiple-stemmed individuals, number of stems per multiple-stemmed individual, average and standard deviations of diameter of breast height (1.2m) and tree height in *A. trabeculosa* and *A. japonica* (1995).

	Total		Tree type			Percentage of individuals with multiple- stems (%)	Mean number of stems per multiple- stemmed individual	Diameter at breast height (main stem) (cm)	Tree height (main stem) (m)
	No. of individuals	No. of stems	Single- stemmed No. of individuals	Multiple-stemmed No. of individuals No. of stems					
<i>A. trabeculosa</i>	446	819	275	171	544	38	3.2	12.8±7.1	8.7±3.6
<i>A. japonica</i>	338	379	303	35	76	10	2.2	13.0±6.1	9.6±3.2

($p < 0.05$)

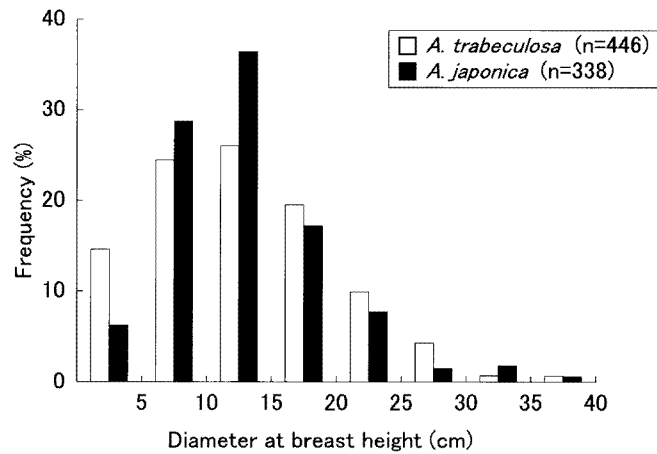


Fig.2-2 Frequency distribution of stem diameter at breast height (1.2m) in *A. trabeculosa* and *A. japonica* (1995).

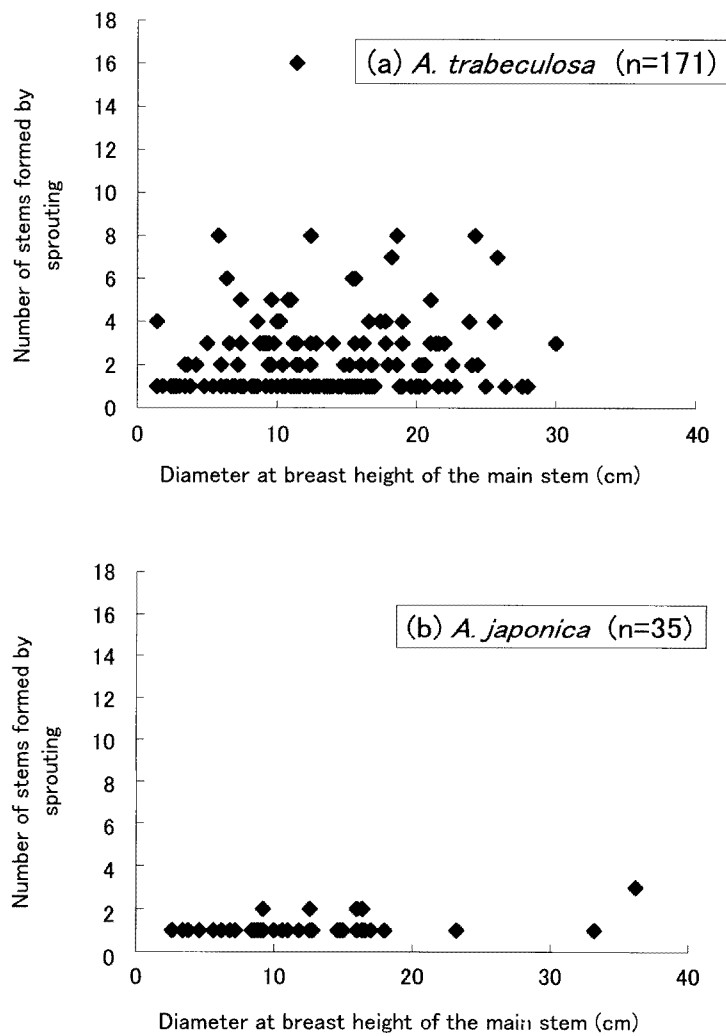


Fig.2-3 Relation between the diameter at breast height (1.2m) of the main stems and the number of stems formed by sprouting in (a) *A. trabeculosa* and (b) *A. japonica*

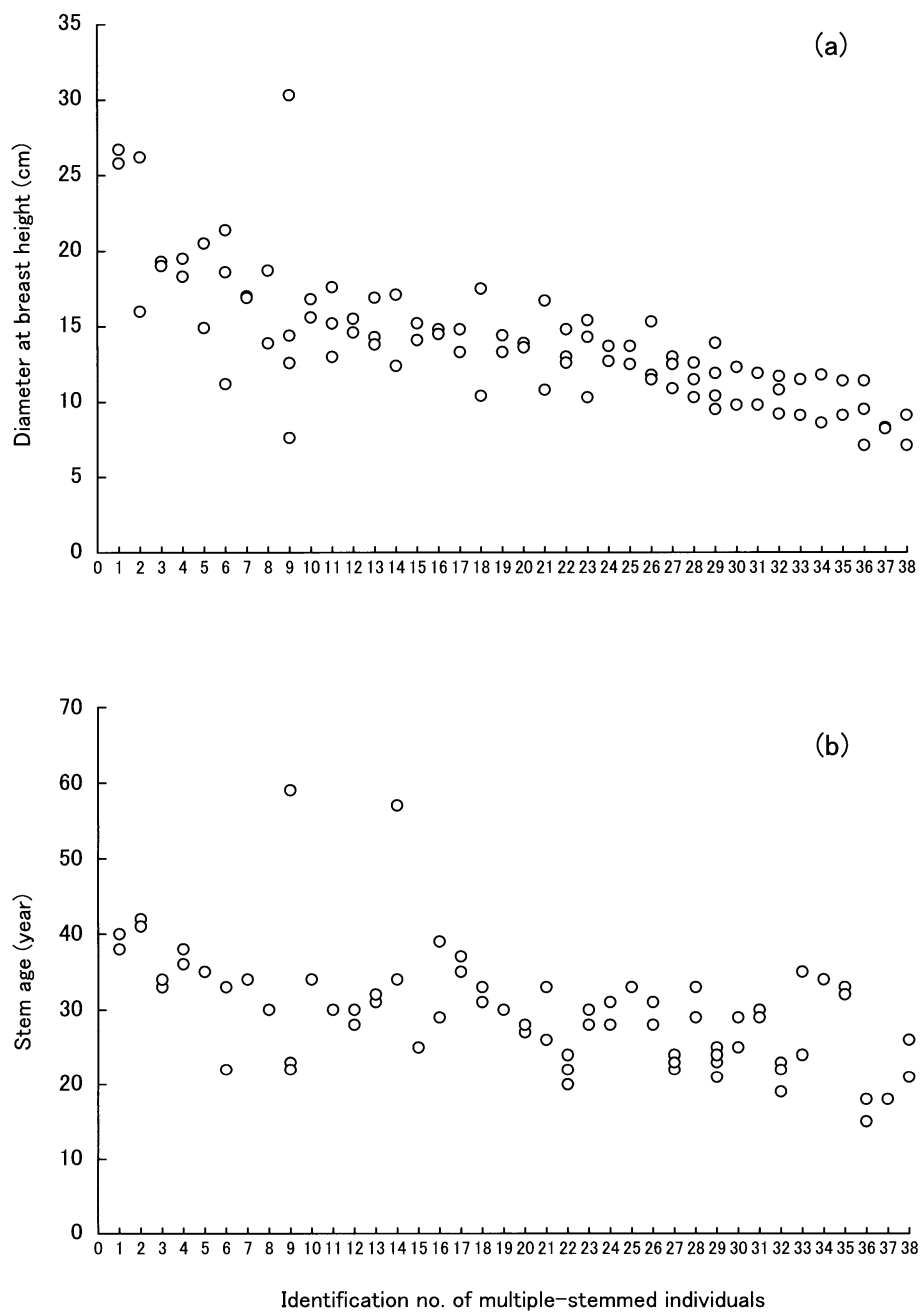


Fig.2-4 (a) Diameter at breast height (1.2m) and (b) stem age of multiple-stemmed individuals of *A. trabeculosa* in the sub-population (2001).

の胸高直径の頻度分布をFig. 2-2に示した。両樹種ともに胸高直径階は、最頻値が10.0~14.9cm、最大値が35.0~39.9cmであった。四分位偏差はサクラバハノキで9.7cm、ハノキで6.9cmであった。またとくにサクラバハノキは、胸高直径階5cm未満の個体の比率がハノキに比べて大きかった。

サクラバハノキとハノキの複幹個体率および1複幹個体当たりの幹数をTable 2-1に示した。両指標ともサクラバハノキの方がハノキよりも大きい値を示した。1複幹個体当たりの幹数について、サクラバハノキとハノキの平均値には、 t -検定の結果、5%水準で有意差があった。

萌芽シュートに関しては、サクラバハノキでは調査個体（局所集団中の生存個体）の61%に相当する76個体で観察され、その数は個体当たり1から12本（平均4.0本）であった。一方、十王集団内の任意のハノキ60個体については15%に相当する9個体で萌芽シュートが観察され、その数は個体当たり1から5本（平均3.2本）であった。以上のように、サクラバハノキはハノキに比べて、萌芽シュートを保有している個体の比率が4倍高く、個体当たりの萌芽シュート数も多かった。

つぎに、複幹タイプにおける主幹の胸高直径と萌芽幹数の関係をFig. 2-3に示した。サクラバハノキは171個体で萌芽幹が544本、ハノキは35個体で萌芽幹が76本であった。サクラバハノキについて1個体の幹数は最大17本で、5本以上の個体が26個体と、全体の15%を占めたが、ハノキの1個体の幹数は全て4本以下であり、サクラバハノキの方が多数の幹を保持していた。また、 t -検定の結果、ハノキでは主幹の胸高直径と萌芽幹の本数との間に有意な正の相関（ $p < 0.01$ ）が見られたが、サクラバハノキではみられなかった。

2) サクラバハノキ個体内の幹構造

調査したサクラバハノキ局所集団に属する38複幹個体に関して、個体間および個体内で胸高直径、樹齢、髄から6~15年輪部位の材密度および年輪幅の比較を行った。個体単位で求めた胸高直径、樹齢、材密度および年輪幅の平均値±標準偏差はそれぞれ 14.0 ± 3.7 cm, 30 ± 6 年, 434 ± 20 kg/m³および 2.6 ± 0.5 mmであった。Fig. 2-4に38個体に属する全幹93本の胸高直径および樹齢の分布を示した。胸高直径および樹齢の値が個体内の幹の間で大きく異なる個体はほとんどなかった。さらにそれぞれの形質について、分散分析を行ったところ、胸高直径、樹齢および材密度には個体間に有意差（ $p < 0.01$ ）が認められたが、年輪幅には個体間に有意差が認められなかった。このことから、個体を形成する幹の胸高直径、樹齢および材密度に関するばらつきは、個体内より個体間の方が大きいことが明らかになった。

Fig. 2-4中の特徴的な2個体（個体番号9および29）について、すべての幹の胸高直径と樹齢の値をTable 2-2に示した。個体9では主幹が他の幹と35年以上年輪数が異なるため、主幹がある程度成長してから萌芽幹がほぼ一斉に発生したのと考えられた。個体29は、個体9と同様に主幹がある程度成長してから萌芽幹がほぼ一斉に発生したと考えられるが、その後主幹が枯損して、萌芽幹が主幹の形で残存したものと考えられた。個体9における萌芽幹と、個体29のすべての幹の樹齢は、ほぼ同様で21~25年であった。

3) サクラバハノキ局所集団の動態

本局所集団における枯死個体と新規加入個体に関する5成長期間の動態をTable 2-3に示した。実生および萌芽からの新規加入は観察されなかった。個体数は幹の枯損により21個体が枯死し、146個体から125個体に減少した。125個体のうち4個体については幹が枯損していたが、萌芽シュートが発生しており個体が維持されていた。

Table 2-2 Diameter at breast height (1.2m) and stem age for two individuals of *A. trabeculosa*.

Individual No.		Stem				
		1	2	3	4	5
9	Diameter (cm)	30.3	14.4	12.6	7.6	-
	Stem age (years)	59	22	23	22	-
29	Diameter (cm)	13.5	11.9	10.4	10.4	9.5
	Stem age (years)	25	23	24	21	21

Table 2-3 Changes in the number of individuals and stems of each tree type, percentage of multiple-stemmed individuals, number of stems per multiple-stemmed individual, average and standard deviations of diameter of breast height (1.2m) and tree height over six years (October 1995 - April 2001).

	Total		Tree type			Percentage of individuals with multiple-stems (%)	Mean number of stems per multiple-stemmed individual	Tree height (main stem) (m)	Diameter at breast height (main stem) (cm)
			Single-stemmed	Multiple-stemmed					
	No. of individuals	No. of stems	No. of individuals	No. of individuals	No. of stems				
October 1995	146	241	87	59	154	40	2.6	8.9±2.6	11.0±4.7
April 2001	125*	176	83	38	93	30	2.4	9.8±2.0	13.5±4.2

* including four maintained by new sprouts

Table 2-4 Changes in width of annual rings (at breast height: 1.2m) with distance from pith.

	Number of annual rings from the pith												
	Total	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-
Mean (cm)	2.2	2.7	2.7	2.3	1.9	1.7	1.6	1.5	1.9	1.7	1.4	1.2	1.2
Standard deviation	0.5	0.8	0.9	0.8	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.9	0.8	0.4	0.2
Number of stems	176	176	176	176	174	159	119	59	15	6	4	3	2

1995年10月の調査時では、複幹個体率が40%、1複幹個体当たりの幹数が2.6本であったが、5成長期後には、それぞれ30%、および2.4本に減少していた。

5成長期の間に単幹個体は20個体（14%）が枯死したが、一部の幹が枯損した16複幹個体（11%）が単幹個体になったことにともなう、全体では4個体が減少し、単幹個体の数は83になった。複幹個体は、5個体（3%）が枯死し、また一部の幹の枯損により単幹個体になった個体が16（11%）あったため、全体では21個体が減少し38個体となった。複幹個体は、幹の枯損によって単幹個体になるものの、既存の単幹個体と比べて低い減少率を示した。

1995年および2001年調査時の主幹の胸高直径および樹高の平均値±標準偏差をTable 2-3に示した。2001年調査時に生存していた個体の、1995年における主幹の胸高直径および樹高の平均値±標準偏差は、それぞれ13.5±

4.2cmおよび 9.8 ± 2.0 mであり、同調査時における枯死個体のそれらはそれぞれ 8.6 ± 2.8 cm、 7.6 ± 2.4 mであった。形状比（樹高／胸高直径）に関しては、生存個体の平均値が77であるのに対して枯死個体の平均値は92であった。このように、枯死個体は胸高直径、樹高ともに生存個体よりも小さく、しかも細長い樹形を示していた。

2001年の調査時に幹が生存していた121個体の全ての幹（176本）の胸高直径、年輪幅および樹齢の平均値±標準偏差はそれぞれ 13.8 ± 4.1 cm、 2.2 ± 0.5 mmおよび 30 ± 7 年であった。また、樹齢の最大値は59年、最小値は15年であった。中心部から樹皮に至る半径方向の年輪幅の推移はTable 2-4に示したとおり、中心部で直径成長が良好であった。樹齢に関しては20年以下の幹が17本、21年から35年の幹が144本、36年以上の幹が15本であり、21～35年の幹が全体の82%を占めた。また最小樹齢が15年であったことから、この局所集団では少なくとも最近15年間、新規加入による現存個体はないと考えられた。また、前述のように萌芽シュートによる新規加入個体もみられなかった。

また、前年（2000年）の着果状況の調査の結果、果穂が観察されたサクラバハノキの個体数は63で、幹が維持されていた121個体のうち52%であった。しかし、樹冠全体に着果していた個体が6（5%）と少なく、部分的に着果していた個体が23（19%）、果穂が20個以下であった個体が34（28%）であった。

第4節 まとめ

サクラバハノキとハノキの複幹個体率および1複幹個体当たりの幹数は、ともにハノキよりもサクラバハノキで大きかった。さらに、萌芽シュートを保有している個体の比率、および個体当たりの萌芽シュート数に関しても、サクラバハノキはハノキより大きな値を示した。

サクラバハノキの個体を形成する幹の胸高直径、樹齢および材密度に関する個体間変異は、個体内変異より大きかった。

個体の消長を調査した十王町のサクラバハノキ局所集団には5成長期間を通して、実生および萌芽からの新規加入は観察されなかった。個体数は幹の枯損により21個体が枯死し、146個体から125個体に減少した。125個体のうち4個体については幹が枯損していたが、萌芽シュートが発生しており個体が維持されていた。

第3章 サクラバハノキにおけるアロザイムマーカーの開発

第1節 はじめに

遺伝的多様性や集団内遺伝構造に関する解析は、その種がもつ遺伝変異を減少させることなく保全する上で重要な判断基準となる。本章では、サクラバハノキについてこれらの解析を行うための遺伝マーカーとして使用するアロザイム遺伝子座の検出を目的とする。なお、本研究では厳密な意味でのアロザイム分析は行っていないが、アロザイム遺伝子座という用語は推定アロザイム遺伝子座を指すものとした。

第2節 材料および方法

1) 材 料

サクラバハノキでアロザイム分析が可能かどうかを、茨城県十王町集団から100個体、静岡県浜北市集団から50個体、山口県阿東町集団から100個体、宮崎県木城町集団から100個体サンプリングを行い、これらの個体を対

象に調査した。分析材料には冬芽を用いた。冬芽の採取は1997年から2000年の冬季に行った。採取した試料は-80℃で保存し、適宜実験に用いた。

2) アロザイムの分析方法

アロザイムの分析方法は津村ら (1990) の方法に基づき、以下の方法で行った。

(1) 酵素の抽出

採取後冷凍保存しておいた冬芽を30mg秤量し、予め-4℃に冷やしておいた乳鉢に入れ液体窒素を注ぎパウダー状になるまですりつぶした。これに抽出用緩衝液1ml (Table 3-1) とポリビニールポリピロリドン (PVPP) 30mgを加えホモジネートした。この粗抽出液を遠沈チューブにとり、4℃, 12,000rpmで50分間遠心分離した。得られた上澄み液を電気泳動用試料として用いた。一連の作業は酵素が失活しないよう低温下で行った。

(2) 電気泳動

電気泳動は、ポリアクリルアミドゲルを支持体とする垂直平板法を用い、Davis (1964), Ornstein (1964) の方法にほぼ従った。分離ゲルおよび濃縮ゲルの濃度とpHをそれぞれ7.5%・pH8.9, 3.75%・pH6.7とした。さらに濃縮ゲルについては10% (w/v) のポリビニールピロリドン (PVP) を添加した。試料添加数は1枚のゲル板に25サンプルとし、試料添加量は1サンプル孔あたり12μlとした。電気泳動は4℃, 9.5mA/cm²の定温、定電流条件とし、約180分間行なった。

(3) 染色および固定

ゲルの染色を行なったところ、明瞭なザイモグラムが得られたのは、シキミ酸脱水素酵素 (ShDH), グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD), ジアホラーゼ (DIA), アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT), アミラーゼ (AMY), アラニンアミノペプチターゼ (AAP), ロイシンアミノペプチターゼ (LAP), アコニターゼ (ACO) およびホスホグルコースイソメラーゼ (PGI) の9酵素種であった (Table 3-2)。染色液の組成、染色温度をTable

Table 3-1 Composition of extraction buffer.

(Buffer)	
93mM Tris-HCl pH7.5	
(Additive)	
Glycerol	23.4% (W/V)
Tween80	0.6% (W/V)
Dithiothreitol	11mM
EDTA-2Na*	2.8mM
NAD*	2.3mM
NADP*	1.6mM
2-Mercaptoethanol	0.5% (W/V)
Bovine serum albumin	0.05% (W/V)

*Ethylenediaminetetraacetic acid

*β-Nicotinamide adenine dinucleotide

*β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

3-3とTable 3-4に示した。染色後、Table 3-4に示す固定液に一晩浸し、その後ゲル板をセロハン紙に挟み、ガラス板に張り付け乾燥させた。

(4) ザイモグラムの観察

ゲル板の乾燥後、各酵素種についてザイモグラムを読み取り、各推定遺伝子座の遺伝子型を調査した。同一遺伝子座に属する対立遺伝子に関してはザイモグラムの泳動度の遅いものから順にアルファベット (*a, b, c* ……) を付した。

第3節 結 果

1) アロザイム遺伝子座と対立遺伝子の推定

合計350個体のサクラバハノキの冬芽に対して、アロザイム22酵素種の検出を試みた。そのうち安定したバンドパターンが得られた酵素は、9酵素種13推定遺伝子座であった。以下に、その酵素種の各バンドパターンについて述べる。なお、観察されたバンドパターンとそれに対応する遺伝子型をFig. 3-1に示した。

2) シキミ酸脱水素酵素 (ShDH)

ShDHを染色したゲル板では1つのゾーンが検出され、10種類の表現型を観察した。バンドパターンから対立遺伝子は5種類と推定された。またヘテロ接合体のバンドパターンからこの遺伝子座はモノマー型の遺伝様式をもつことが推定された。この推定遺伝子座を*Shd*とした。

3) グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)

G6PDを染色したゲル板では1つのゾーンが検出され、3種類の表現型を観察した。バンドパターンから対立

Table 3-2 Investigated enzymes and their abbreviation and enzyme commission reference number (E. C. No.).

Enzyme	Abbreviation	E. C. No.	Locus
Shikimate dehydrogenase	ShDH	1. 1. 1. 25	<i>Shd</i>
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	1. 1. 1. 49	<i>G6p</i>
Diaphorase	DIA	1. 6. 4. 3	<i>Dia-1</i> <i>Dia-2</i> <i>Dia-3</i>
Glutamate oxaloacetate transaminase	GOT	2. 6. 1. 1	<i>Got-1</i> <i>Got-2</i>
Amylase	AMY	3. 2. 1. 1	<i>Amy-2</i>
Alanine aminopeptidase	AAP	3. 4. 11. 1	<i>Aap</i>
Leucine aminopeptidase	LAP	3. 4. 11. 1	<i>Lap</i>
Aconitase	ACO	4. 2. 1. 3	<i>Aco</i>
Phosphoglucosomerase	PGI	5. 3. 1. 9	<i>Pgi-1</i> <i>Pgi-2</i>
Total	9 enzymes		13 loci

Table 3-3 Composition of staining solution.

Enzyme	Buffer	Substrate	Others
ShDH	44mM Tris-HCl, pH8. 0	Shikimic acid 6. 0mM	NADP* 0. 14mM MTT* 0. 21mM PMS* 0. 057mM
G6PD	44mM Tris-HCl, pH8. 0	D-Glucose-6-phosphate 5. 1mM	NADP* 0. 14mM MTT* 0. 21mM PMS* 0. 057mM MgCl ₂ 8. 8mM
DIA	47mM Tris-HCl, pH8. 0	2, 6-Dichlorophenol-indophenol 0. 065mM	NADH* 0. 62mM MTT* 0. 23mM
GOT	93mM Phosphate, pH7. 0	L-Aspartic acid 8. 7mM α -Ketoglutaric acid 8. 0mM	Pridoxal-5'-phosphate 0. 79mM Fast Blue BB salt 0. 12% (W/V)
AMY	A: 100mM Phosphate, pH6. 0 B:	Starch 0. 30% (W/V)	Iodine 19mM Potassium Iodide 14mM
AAP	182mM Tris-maleate, pH6. 0	L-Alanine β -naphtylamide 8. 5mM	Fast Black K salt 0. 06% Dimetilesulfoxide 0. 47mM
LAP	182mM Maleate, pH6. 0	L-Leucine β -naphthylamide 1. 2mM	Fast Black K salt 0. 056%
ACO	46mM Tris-HCl, pH8. 0	Aconitic acid 11mM	NADP* 0. 15mM PMS* 0. 22mM NBT* 0. 059mM MgCl ₂ 9. 1mM iCDH* 20units
PGI	45mM Tris-HCl, pH8. 0	D- Fructose-6-phosphate 0. 70mM	NADP* 0. 14mM MTT* 0. 22mM PMS* 0. 059mM MgCl ₂ 9. 1mM G6PD* 20units

*NADP : β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

*MTT : 3- (4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

*PMS : Phenazine methosulfate

*NBT : Nitro blue tetrazolium

*NADH : β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

*G6PD : Glucose-6-phosphate dehydrogenase

*iCDH : Isocitrate dehydrogenase

Table 3-4 Incubation temperature for staining and fixation solution in each enzyme system.

Enzyme	Temperature	Fixation solution*
ShDH	37°C	A
G6PD	37°C	A
DIA	37°C	A
GOT	room temp.	B
AMY	37°C	A
AAP	37°C	A
LAP	37°C	A
ACO	37°C	A
PGI	37°C	A

*A : 50% Ethanol

B : 50% Ethanol -5% Acetic acid solution

遺伝子は2種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンからこの遺伝子座はダイマー型の遺伝様式をもつことが推定された。この推定遺伝子座を*G6p*とした。

4) ジアホラーゼ (DIA)

DIAを染色したゲル板では3つのゾーンが検出された。移動度の最も小さなゾーンでは単一の表現型が観察されたが、残りの2つのゾーンでは多型がみられた。このうち移動度の小さい方では4種類の表現型が、大きい方では6種類の表現型が観察され、両者とも対立遺伝子は3種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンから移動度の小さい方の遺伝子座はテトラマー型の遺伝様式を、移動度の大きいほうの遺伝子座はモノマー型の遺伝様式をもつと推定された。これらの推定遺伝子座を移動度の小さいものから順に*Dia-1*、*Dia-2*および*Dia-3*とした。

5) アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT)

GOTを染色したゲル板では2つのゾーンが検出された。このうち移動度の小さい方では2種類の表現型が、大きいほうでは11種類の表現型が観察され、前者の対立遺伝子は2種類、後者では5種類と推定できた。またヘテロ接合体のバンドパターンから両者ともダイマー型の遺伝様式をもつことが推定された。これらの推定遺伝子座を移動度の小さいものから順に*Got-1*および*Got-2*とした。

6) アミラーゼ (AMY)

AMYを染色したゲル板では2つのゾーンが検出された。しかし、このうち移動度の小さい方ではバンドパターンが鮮明でなかったため、移動度の大きいゾーンのみを解析に用いた。このゾーンでは3種類の表現型が観察され、対立遺伝子は2種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンからモノマー型の遺伝様式をもつことが推定された。この推定遺伝子座を*Amy-2*とした。

7) アラニンアミノペプチターゼ (AAP)

AAPを染色したゲル板では1つのゾーンが検出され、12種類の表現型を観察した。バンドパターンから対立遺伝子は6種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンからこの遺伝子座はモノマー型の遺伝様式をもつことが推定された。この推定遺伝子座を*Aap*とした。

8) ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)

LAPを染色したゲル板では1つのゾーンが検出され、7種類の表現型が観察された。バンドパターンから対立遺伝子は4種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンからこの遺伝子座はダイマー型の遺伝様式をもつことが推定された。この推定遺伝子座を*Lap*とした。

9) アコニターゼ (ACO)

ACOを染色したゲル板では1つのゾーンが検出され、表現型が単一であった。バンドパターンから対立遺伝子は1種類と推定できた。この推定遺伝子座を*Aco*とした。

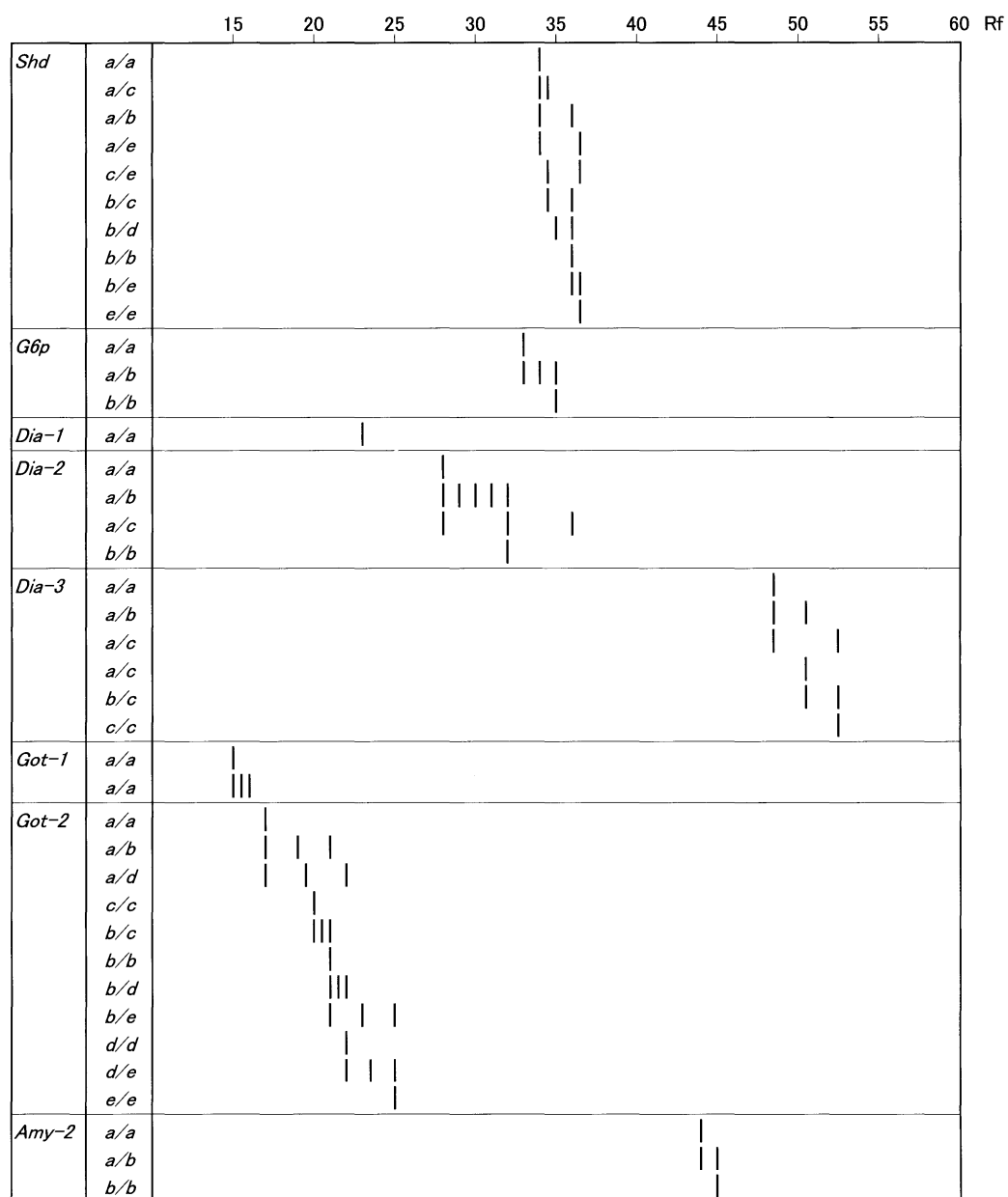


Fig.3-1 Zymograms of nine enzyme systems.

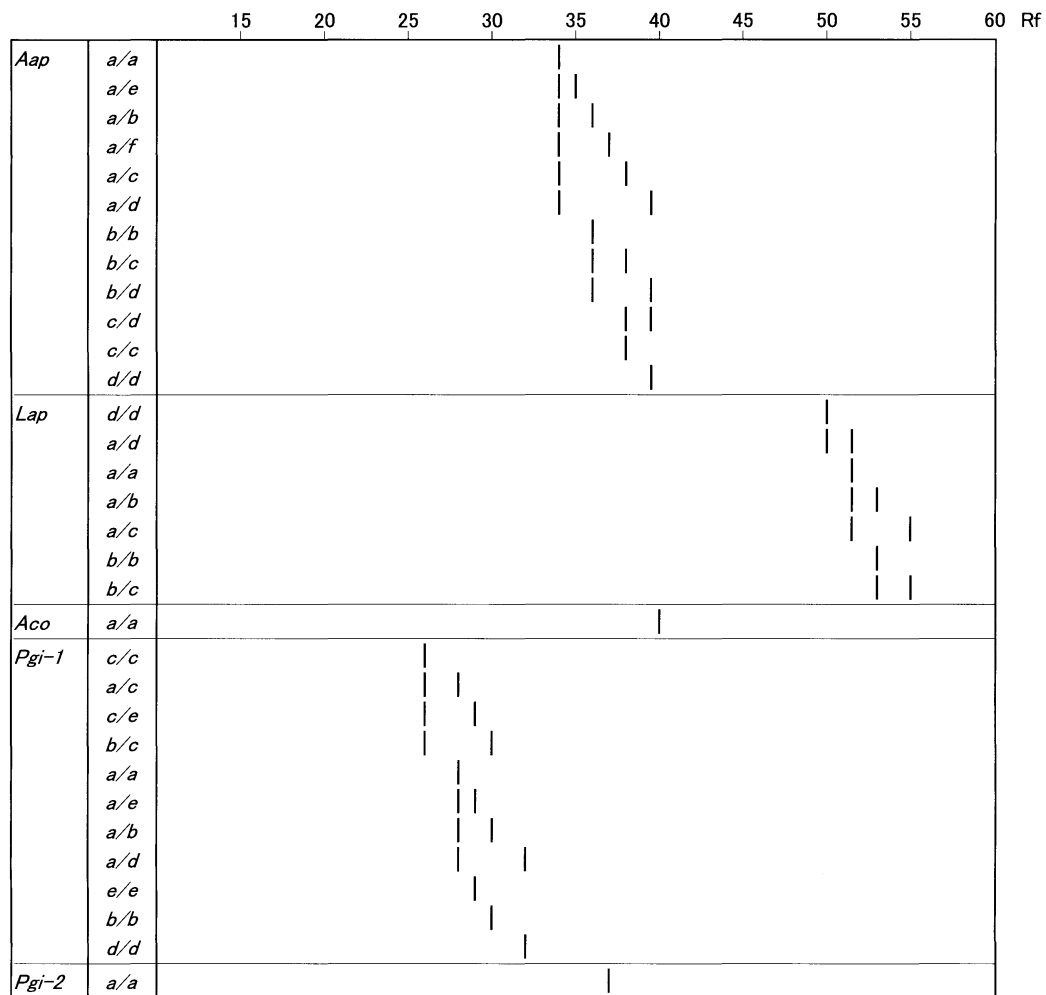


Fig.3-1 Zymograms of nine enzyme systems (Continued).

10) ホスホグルコースイソメラーゼ (PGI)

PGIを染色したゲル板では2つのゾーンが検出された。このうち移動度の小さい方では11種類の表現型が観察されたが、大きい方では単型であった。前者の対立遺伝子は5種類、後者では1種類と推定された。また、ヘテロ接合体のバンドパターンから前者の遺伝様式はモノマー型と推定された。これらの推定遺伝子座を移動度の小さいものから順に*Pgi-1*および*Pgi-2*とした。

第4節 まとめ

本研究では、最終的にFig. 3-1に示すように9酵素種について13の推定遺伝子座と計42の対立遺伝子を推定した。これにより、集団遺伝学的解析および集団内遺伝構造の解析が可能となった。しかしこれらのうち、G6PDの*G6p*遺伝子座については一部の集団で明瞭なザイモグラムが得られなかったため、本遺伝子座は第5章のサクラバハンノキの集団内遺伝構造の一部の解析でのみ使用し、その他の解析については12推定遺伝子座を用いて解析することにした。

第4章 サクラバハンノキのアロザイムによる集団遺伝学的解析

第1節 はじめに

サクラバハンノキは北は岩手県湯田町から南は九州の宮崎県木城町に至るまで隔離分布しているが、もともと集団数が少なく、湿地の乾性化や埋め立てにより集団の数が減少してきており、環境省によって「準絶滅危惧」にランクされている。今後の遺伝資源の保全を考えた場合、サクラバハンノキの遺伝的多様度を明らかにしておく必要がある。しかしながら、サクラバハンノキの遺伝的な多様性を評価した研究例はない。本章では、第3章で推定した12推定遺伝子座を遺伝マーカーとしてサクラバハンノキの遺伝変異の解析を行う。

第2節 材料および方法

1) 材 料

サクラバハンノキの遺伝的な多様性の評価を試みるため、日本各地に成立しているサクラバハンノキ集団のうち、岩手県湯田町 (Fig. 4-1)、福島県西郷村 (Fig. 4-2)、茨城県十王町 (Fig. 4-3)、栃木県今市市 (Fig. 4-4)、静岡県浜北市 (Fig. 4-5)、山口県阿東町 (Fig. 4-6) および宮崎県木城町 (Fig. 4-7) の7集団を対象とした。それぞれの集団の所在地をFig. 4-8, Table 4-1に示す。アロザイムを検出するためにそれらの集団から冬芽を採取した。サンプリングは1997年から2000年の冬に行った。西郷・今市・浜北・阿東の4集団では個体数が少なかったため、全数サンプリングしたが、湯田・十王・木城の3集団ではランダムサンプリングを行った。萌芽により株状に生育しているものについては、そのうちの1本から材料を採取した。採取した試料は-80℃で保存し、適宜実験に用いた。そして、それらを第3章で述べたアロザイム分析法で分析した。そこから得られた各個体の遺伝子型をもとに、データ解析を行った。



Fig. 4-1 Yuda population of *A. trabeculosa*.



Fig. 4-2 Nishigo population of *A. trabeculosa*.



Fig. 4-3 Juo population of *A. trabeculosa*.



Fig.4-4 Imaichi population of *A. trabeculosa*.



Fig.4-5 Hamakita population of *A. trabeculosa*.



Fig.4-6 Ato population of *A. trabeculosa*.



Fig.4-7 Kijo population of *A. trabeculosa*.

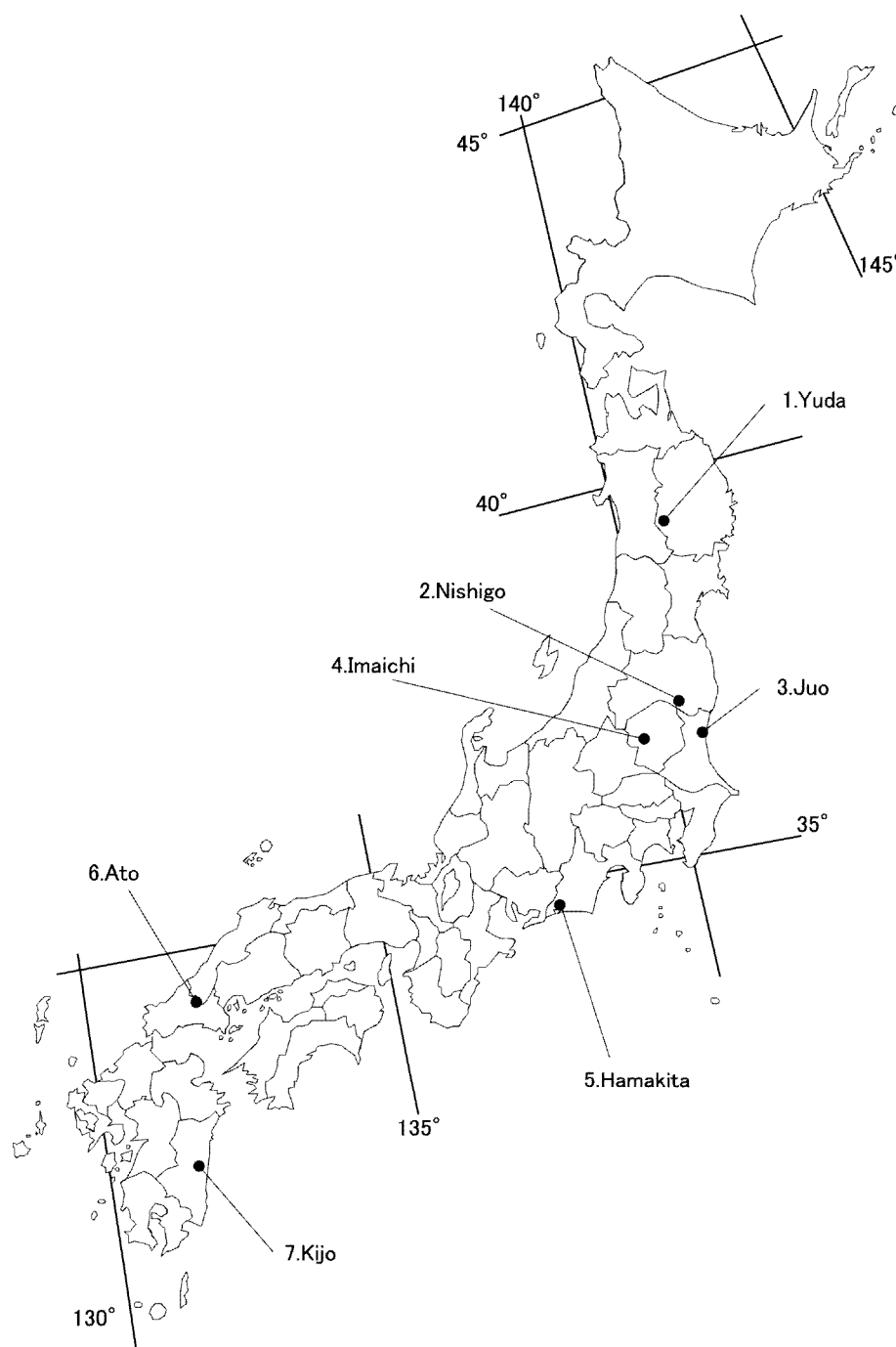


Fig. 4-8 Location of analysed *A. trabeculosa* populations.

2) 方 法

(1) 集団レベルの解析

a. 多型的遺伝子座の割合

r 個の遺伝子座のうち、ある集団において最も頻度の高い対立遺伝子の頻度が 0.95 より低いものを多型的遺伝子座とした。多型的遺伝子座の数が p 個のとき、その集団の多型的遺伝子座の割合 P は次式で求められる。

$$P = p / r$$

b. 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数

ある集団において j 番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座の対立遺伝子の数が m_j 個のとき、1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数 A は、次式で求められる。

$$A = \sum m_j / r$$

c. 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数

ある集団において j 番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座の i 番目の対立遺伝子の頻度を p_{ij} とすると、1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数 A_e は、次式で求められる (Kimura and Crow, 1964)。

$$A_e = 1 / \sum \sum p_{ij}^2$$

式から明らかなように、 A は集団の大きさに依存し、集団が大きいほど値が大きくなる傾向があるが、 A_e は集団の大きさとは無関係である。

d. 平均ヘテロ接合度

s 個のある部分集団のうち k 番目 ($k=1, 2, 3, \dots, s$) の部分集団で、 j 番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座における i 番目 ($i=1, 2, 3, \dots, m$) の対立遺伝子の遺伝子頻度、ホモ接合体の遺伝子型頻度をそれぞれ x_{ijk} と X_{ijk} とすると、ヘテロ接合度の期待値 (he_{jk}) と観察値 (ho_{jk}) は以下の式で求められる (Nei, 1987)。

$$he_{jk} = 1 - \sum x_{ijk}^2$$

$$ho_{jk} = 1 - \sum X_{ijk}$$

Table 4-1 Location and sample size of analysed seven populations of *A. trabeculosa*.

Population	Latitude (North)	Longitude (East)	sample size*
1. Yuda	39° 17' 33"	140° 43' 50"	182
2. Nishigo	37° 08' 08"	140° 10' 32"	15
3. Juo	36° 41' 23"	140° 41' 36"	174
4. Imaichi	36° 37' 17"	139° 44' 74"	124
5. Hamakita	34° 49' 38"	137° 45' 51"	63
6. Ato	34° 20' 52"	131° 40' 16"	101
7. Kijo	32° 14' 45"	131° 23' 18"	149

*Mean sample size: 115.4

he_{jk} とは、ある集団の1つの遺伝子座に関してハーディ・ワインベルグの平衡から期待されるヘテロ接合体の割合であり、 ho_{jk} とはある集団の1つの遺伝子座で実際に観察されたヘテロ接合体の割合である。各遺伝子座の he_{jk} 、 ho_{jk} を集団ごとに平均した平均ヘテロ接合体の期待値 (H_e) と観察値 (H_o) は以下の式で求められる。

$$H_e = (\sum he_{jk}) / r$$

$$H_o = (\sum ho_{jk}) / r$$

H_e 、 H_o はそれぞれの集団の遺伝的変異のレベルを表す。

多型的遺伝子座の割合 (P)、1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数 (A)、1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数 (A_e)、ヘテロ接合体の観察値 (H_o) および期待値 (H_e) はいずれも遺伝的変異の重要な尺度である。これらの統計量は集団が保有する遺伝的変異の大きさを表す統計量で、値が大きいほど遺伝的変異が大きいことを意味する。

さらに P 、 A 、 A_e 、 H_o および H_e の集団ごとの値を合計し、集団数で割った平均値をそれぞれ、 P_p 、 A_p 、 A_{ep} 、 H_{op} および H_{ep} とし、集団レベルでの遺伝的変異のレベルを表す指数として算出した。

e. 近交係数

近交係数 (F_{IS}) はWright (1951, 1965) によって提唱された統計量で、集団内に起こっている近親交配の程度を推定するのに有効である。 F_{IS} は集団内における近親交配によるヘテロ接合体の減少の程度を表し、以下の式で求められる。

$$F_{IS} = (1 - ho_{jk}) / he_{jk}$$

F_{IS} は-1から+1の間の値をとり、 F_{IS} が0もしくは0に近い値をとるときには、遺伝子型の分布がハーディ・ワインベルグの平衡に従った分布をしていることを表す。また、 F_{IS} が+に偏ったときには、ホモ接合体の個体がハーディ・ワインベルグの平衡から期待される割合より多いことを示し、-に偏ったときには、逆にヘテロ接合体の個体が多いことを示す。 F_{IS} の0からの偏差に関する有意差検定は、 χ^2 テストによって行った (Li and Horvitz, 1953)。

f. 遺伝的分化を表す統計量

ある集団が s 個の部分集団に分かれ、各部分集団内で任意交配が行われている場合の、任意の遺伝子座における平均ヘテロ接合体の期待値 (H_{Sj}) および全集団内で任意交配が行われている場合の同期待値 (H_{Tj}) は次式で表される (Nei, 1987)。

$$H_{Sj} = 1 - \sum \sum (x_{ijk})^2$$

$$H_{Tj} = 1 - \sum (\sum x_{ijk})^2$$

ただし、 x_{ijk} は k 番目 ($k=1, 2, 3, \dots, s$) の部分集団における j 番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座の i 番目 ($i=1, 2, 3, \dots, m$) の対立遺伝子の頻度を表す。 H_{Sj} 、 H_{Tj} から D_{STj} および G_{STj} は以下のように導かれる (Nei, 1987)。

$$D_{STj} = H_{Tj} - H_{Sj}$$

$$G_{STj} = D_{STj} / H_{Tj}$$

G_{ST} は G_{STj} から以下のように導かれる (Nei, 1987)。

$$G_{ST} = \Sigma G_{STj} / r$$

G_{ST} は 0 から 1 の値をとり、各部分集団の遺伝的分化の程度を表す。 G_{ST} の値が大きいほど、各集団が遺伝的に分化していることを表す。集団間における遺伝変異の違いを評価するため、遺伝子分化係数 G_{ST} (Nei, 1973) を求め、0 からの偏差を χ^2 テストで検定した (Workman and Niswander, 1970)。また、 P , A , A_e および H_e と緯度との回帰を t -testおよびノンパラメトリックテスト (Ordering test; Quenouille, 1952) で検定した。

(2) 種レベルの解析

サクラバハノキ 7 集団から採取した全個体のデータをすべてプールし、遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度を算出した。

a. 多型的遺伝子座の割合

本研究では、いずれかの集団で多型を示した遺伝子座はすべて多型的遺伝子座として扱った。 r 個の遺伝子座のうち、多型的遺伝子座が p 個あるとき、その種の多型的遺伝子座の割合 P_s は次式で求められる。

$$P_s = p / r$$

b. 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数

プールしたデータに関して、検出されたすべての対立遺伝子の数を m 、分析した遺伝子座の数を r とすると、1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数 A_s は、次式で求められる。

$$A_s = m / r$$

c. 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数

1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数 A_{es} は集団レベルでの解析と同様に、次の式で求められる (Kimura and Crow, 1964)。

$$A_{es} = 1 / \Sigma \Sigma p_{ij}^2$$

d. 平均ヘテロ接合度

j 番目 ($j=1, 2, 3, \dots, r$) の遺伝子座における i 番目 ($i=1, 2, 3, \dots, m$) の対立遺伝子の遺伝子頻度、ホモ接合体の遺伝子型頻度をそれぞれ x_{ij} および X_{ij} とすると、ヘテロ接合度の期待値 (he_j) と観察値 (ho_j)、平均ヘテロ接合度の期待値 (H_{es}) と観察値 (H_{os}) は集団レベルでの解析と同様に以下の式で求められる (Nei, 1987)。

$$he_j = 1 - \Sigma x_{ij}^2$$

$$ho_j = 1 - \Sigma X_{ij}$$

$$H_{es} = \Sigma he_j / r$$

$$H_{os} = \Sigma ho_j / r$$

H_{es} , H_{os} はそれぞれ、種の遺伝的変異のレベルを表す。

多型的遺伝子座の割合, 1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数, 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数, およびヘテロ接合度はいずれも遺伝的変異の重要な尺度である。これらの統計量は種が保有する遺伝的変異の大きさを表す統計量で, 値が大きいくほど遺伝的変異が大きいことを意味する。

Table 4-2 Allele frequencies at 12 allozyme loci in *A. trabeculosa*.

Enzyme	Locus	Allele	Population*						
			1	2	3	4	5	6	7
ShDH	<i>Shd</i>	<i>a</i>		0.133	0.092	0.049	0.129	0.225	0.134
		<i>b</i>	1.000	0.867	0.908	0.935	0.815	0.660	0.859
		<i>c</i>				0.004		0.030	
		<i>d</i>					0.056		0.007
		<i>e</i>				0.012		0.085	
DIA	<i>Dia-1</i>	<i>a</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
		<i>b</i>							
		<i>c</i>							
	<i>Dia-2</i>	<i>a</i>		0.100	0.118		0.278	0.090	0.661
		<i>b</i>	1.000	0.900	0.882	1.000	0.722	0.910	0.336
		<i>c</i>							0.003
	<i>Dia-3</i>	<i>a</i>	0.005	0.133	0.076	0.219	0.097	0.015	0.282
		<i>b</i>	0.893	0.867	0.750	0.657	0.798	0.790	0.718
		<i>c</i>	0.102		0.174	0.124	0.105	0.195	
GOT	<i>Got-1</i>	<i>a</i>	1.000	1.000	0.993	0.984	1.000	1.000	1.000
		<i>b</i>			0.007	0.016			
	<i>Got-2</i>	<i>a</i>	0.099	0.233	0.155	0.066	0.045	0.012	0.008
		<i>b</i>	0.901	0.700	0.845	0.934	0.464	0.744	0.545
		<i>c</i>					0.491	0.244	0.295
		<i>d</i>							0.098
		<i>e</i>							0.053
		<i>o</i>		0.067					
AMY	<i>Amy-2</i>	<i>a</i>	0.088	0.267	0.172	0.191	0.135	0.114	0.010
		<i>b</i>	0.912	0.733	0.828	0.809	0.833	0.886	0.990
		<i>o</i>					0.032		
AAP	<i>Aap</i>	<i>a</i>	0.676	0.667	0.838	0.303	0.603	0.863	0.774
		<i>b</i>			0.052	0.034	0.048	0.026	0.058
		<i>c</i>	0.324	0.167	0.110	0.521	0.278	0.084	0.133
		<i>d</i>		0.167		0.141	0.071	0.011	0.027
		<i>e</i>							0.009
		<i>f</i>						0.016	
LAP	<i>Lap</i>	<i>a</i>	0.385	0.867	0.942	0.837	0.960	0.875	0.980
		<i>b</i>	0.519	0.133	0.040	0.163	0.024		0.020
		<i>c</i>	0.096		0.012				
		<i>d</i>			0.006		0.016	0.125	
ACO	<i>Aco</i>	<i>a</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
PGI	<i>Pgi-1</i>	<i>a</i>	1.000	0.933	0.885	0.642	0.667	0.440	0.584
		<i>b</i>			0.112	0.049	0.325	0.011	0.181
		<i>c</i>		0.067	0.003	0.309	0.008	0.038	
		<i>d</i>						0.027	0.235
		<i>e</i>						0.484	
	<i>Pgi-2</i>	<i>a</i>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

*Populations: 1, Yuda; 2, Nishigo; 3, Juo; 4, Imaichi; 5, Hamakita; 6, Ato; and 7, Kijo

第3節 結果

1) 集団レベルの解析

(1) 検出された対立遺伝子とその頻度

サクラバハノキ 7 集団 808 個体を用いて、8 酵素種 12 アロザイム遺伝子座について分析を行ったところ、合計 42 個の対立遺伝子が検出された。Table 4-2 に各集団の対立遺伝子頻度を示す。各遺伝子座において、集団内で検出された対立遺伝子数は 1 ~ 6 であり、最も多くの対立遺伝子が検出された遺伝子座は *Aap* であった。また *Dia-1*, *Aco*, *Pgi-2* の各遺伝子座はすべての集団で単型であった。すべての集団で検出された対立遺伝子は *Shd*^b, *Dia-2*^b, *Dia-3*^a, *Dia-3*^b, *Got-1*^a, *Got-2*^a, *Got-2*^b, *Amy-2*^a, *Amy-2*^b, *Aap*^a, *Aap*^c, *Lap*^a, *Pgi*^a の 13 であった。また、特定の集団にのみ検出された対立遺伝子も存在した（阿東集団における *Aap*^f および *Pgi-1*^e, 木城集団における *Dia-2*^c, *Got-2*^d, *Got-2*^e および *Aap*^e）。これら 2 集団はいずれも南西日本に位置する集団であった。

(2) 集団レベルの遺伝的変異

各集団の遺伝的多様度を示す統計量を Table 4-3 に示す。集団レベル平均値は $P_p=58.3$, $A_p=2.14$, $A_{ep}=1.35$, $H_{ep}=0.199$ であった。木本植物の平均値は $P_p=49.3$, $A_p=1.76$, $A_{ep}=1.20$, $H_{ep}=0.148$ (Hamrick *et al.*, 1992) であるので、サクラバハノキは比較的高い集団レベルでの遺伝的変異をもつことが明らかになった。

(3) 近交係数

F_{IS} は、木城集団においてのみ 0 と異なったが、他の 6 集団では有意に異ならなかった。また 7 集団の平均値も 0 に異ならなかった (Table 4-3)。したがって、ほとんどのサクラバハノキ集団は、各遺伝子座の遺伝子型頻度に関してハーディ・ワインベルグ平衡にあると考えられた。

(4) 遺伝的分化を表す指標

多型を示した 9 遺伝子座について遺伝的分化の程度を表す G_{ST} 値を求め、その値の 0 からの偏差を検定したところ、8 遺伝子座で有意であった (Table 4-4)。このことは、ほとんどのアロザイム遺伝子座に関して、遺伝子頻度に集団間差異があることを示している。サクラバハノキ全体の種としての G_{ST} 値は 0.146 であった。各集団の持つ遺伝変異を表す統計量と緯度との回帰検定を行ったところ、 t -test では A , A_e および H_e において、ノンパラメトリックテストでは A_e および H_e において有意であった。したがって、サクラバハノキの種内遺伝変異に占める集団間差異の割合は木本植物では比較的大きいと考えられ、また、日本の南部の集団は北の集団に比べて集団内遺伝変異が高いことが明らかになった。

2) 種レベルの解析

種レベルにおける遺伝的多様度を示す統計量を求めたところ、 $P_s=75.0$, $A_s=3.42$, $A_{es}=1.35$ および $H_{es}=0.222$ であった。木本植物における平均値は $P_s=65.0$, $A_s=2.22$, $A_{es}=1.24$, $H_{es}=0.177$ (Hamrick *et al.*, 1992) であるので、サクラバハノキは比較的高い種内遺伝変異をもつことが明らかになった。

Table 4-3 Percentage of polymorphic loci (P ; 95% criterion), no. of alleles per locus (A), effective no. of alleles per locus (A_e), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and the fixation index (F_{IS}) in seven populations of *A. trabeculosa*.

Population	P	A	A_e	H_o	H_e	F_{IS}
1. Yuda	41.7	1.58	1.23	0.128	0.129	0.005
2. Nishigo	66.7	1.83	1.31	0.194	0.202	0.037
3. Juo	66.7	2.17	1.22	0.157	0.162	0.030
4. Imaichi	58.3	2.17	1.39	0.214	0.207	-0.034
5. Hamakita	58.3	2.33	1.45	0.241	0.249	0.036
6. Ato	66.7	2.50	1.38	0.182	0.220	0.176
7. Kijo	50.0	2.42	1.45	0.191	0.227	0.162*
Mean	58.3	2.14	1.35	0.187	0.199	0.064

*Significant at 5% level

F_{IS} values of each population were estimated from average F_{IS} values at polymorphic loci.

Mean F_{IS} value was estimated from average F_{IS} values at polymorphic loci apart from *Amy-2* and *Got-2*.

Table 4-4 Gene diversity statistics for 12 allozyme loci among the seven populations of *A. trabeculosa*.

Locus	H_T	H_S	G_{ST}
<i>Shd</i>	0.243	0.229	0.058**
<i>Dia-1</i>	0.000	0.000	0.000
<i>Dia-2</i>	0.294	0.202	0.312**
<i>Dia-3</i>	0.365	0.348	0.047**
<i>Got-1</i>	0.007	0.007	0.003
<i>Got-2</i>	0.433	0.367	0.152**
<i>Amy-2</i>	0.248	0.238	0.040**
<i>Aap</i>	0.487	0.434	0.109**
<i>Lap</i>	0.286	0.219	0.232**
<i>Aco</i>	0.000	0.000	0.000
<i>Pgi-1</i>	0.440	0.347	0.210**
<i>Pgi-2</i>	0.000	0.000	0.000
Mean	0.233	0.199	0.146
(se)	0.054	0.047	0.030

Gene diversity statistics: H_T (the gene diversity in the total populations) ,

H_S (the average gene diversity within populations)

and G_{ST} (the coefficient of gene differentiation) .

The mean G_{ST} estimate was calculated from the mean values of H_T and H_S .

*Significant at 5% level **Significant at 1% level

第4節 まとめ

サクラバハノキの集団レベルの遺伝的多様度を示す統計量は $P_p=58.3$, $A_p=2.14$, $A_{ep}=1.35$, $H_{ep}=0.199$ となり、いずれも木本植物の平均値 ($P_p=49.3$, $A_p=1.76$, $A_{ep}=1.20$, $H_{ep}=0.148$) (Hamrick *et al.*, 1992) よりも高かった。また、種レベルにおける遺伝的多様度を示す統計量は $P_s=75.0$, $A_s=3.42$, $A_{es}=1.35$ および $H_{es}=0.222$ であり、これらも木本植物の平均値 ($P_s=65.0$, $A_s=2.22$, $A_{es}=1.24$, $H_{es}=0.177$) (Hamrick *et al.*, 1992) より高かった。

F_{IS} を算出した結果、ほとんどのサクラバハノキ集団において、ほとんどのアロザイム遺伝子座に関して遺伝子頻度がハーディ・ワインベルグ平衡にあることが認められた。また、サクラバハノキ全体の G_{ST} 値は0.146であった。木本植物について、分布範囲の広さ別に算出した G_{ST} の平均値が、固有分布、狭分布、地域分布、広範囲分布種でそれぞれ、0.141, 0.124, 0.065, 0.033である (Hamrick *et al.*, 1992)。したがって、サクラバハノキの種内遺伝変異に占める集団間差異の割合は木本植物では比較的大きいと考えられた。また、各集団が持つ遺伝変異を表す統計量と緯度との回帰解析を行ったところ、日本の南部の集団は北の集団に比べて集団内遺伝変異が高いことが明らかになった。

第 5 章 サクラバハノキの集団内遺伝構造

第 1 節 はじめに

サクラバハノキ集団の、林齢やその成立過程が集団内家系構造にどのような影響を与えるのかを検討することは、生息域内保全を行う集団の選定および生息域外保全のためのサンプリングを適切かつ効率的に行う際に重要であると考えられる。そこで本章では、①若い 2 局所集団と比較的成熟した 2 局所集団の比較と②同一の集団を用いた時系列分析により林齢の効果、および③伐採歴のある局所集団と伐採歴を持たない局所集団の比較により伐採による効果を検討した。

第 2 節 材料および方法

1) 解析の対象とした集団

集団内遺伝構造の解析の対象とした集団は岩手県湯田町、茨城県十王町および栃木県今市市に存在する集団である。これらの集団の現況は以下のとおりである。

(1) 岩手県湯田町の集団

岩手県湯田町越中畑（北緯39度17分，東経140度43分，標高285m）の湿地に成立している集団は日本におけるサクラバハノキの北限集団である。この集団は、西側から東側に向かって流れる沢沿いに成立しており、北側を水田、南側の斜面をスギ人工林、西側を秋田自動車道建設時の土捨て場に囲まれている。本集団は位置的にみて上流側と下流側の 2 つの局所集団に大きく分けることができ、この 2 局所集団は50mほど離れている。上流側集団は、大部分が比較的樹体の小さい個体によって構成されており、その一部は水田にすぐ隣接している。一方下流側集団は、上流側に比べて集団の大部分が樹体の大きい個体により構成されている。しかし、上流側集団の林相は下流側集団と比較して、樹高・胸高直径ともに小さく、未成熟の林分であると推測された。土地の所有者（私信）によれば、この上流域では30年ほど前にスギ人工林の造成のためにそれまでの植生が伐採されたということである。そこで、本研究では、伐採歴があり、林齢が若いと考えられる上流部をYUDA-A局所集団とし、ある程度成熟していると考えられる下流部をYUDA-B局所集団と呼ぶこととする (Fig. 5-1)。なお、本集団では株立ち状に萌芽している個体が多くみられた。

(2) 茨城県十王町の集団

茨城県十王町加幸沢（北緯36度42分，東経140度42分，標高50m）の湿地に成立しているサクラバハノキ集団

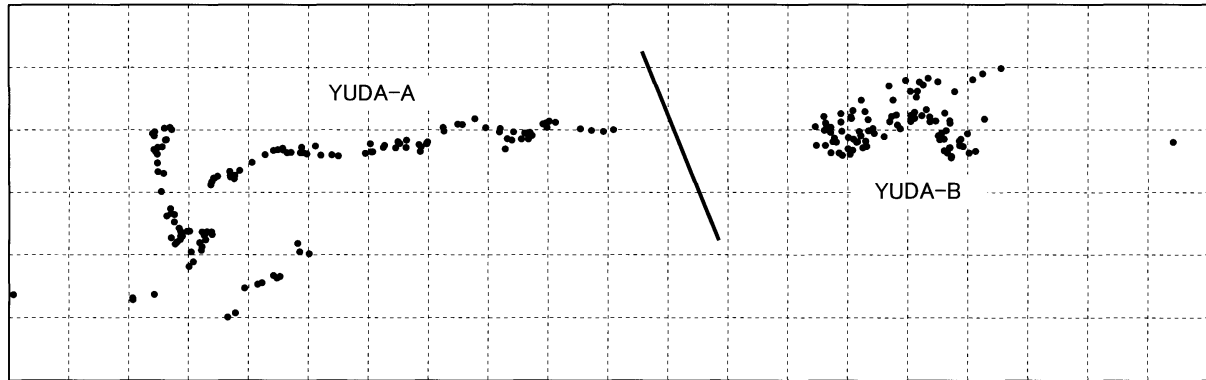


Fig.5-1 Map of all individuals analysed in the Yuda population and the spatial relationship between the YUDA-A and YUDA-B sub-populations.
For each individual containing more than two ramets we plotted one ramet that was at its center of gravity.
Square with dashed lines indicates 20m intervals.

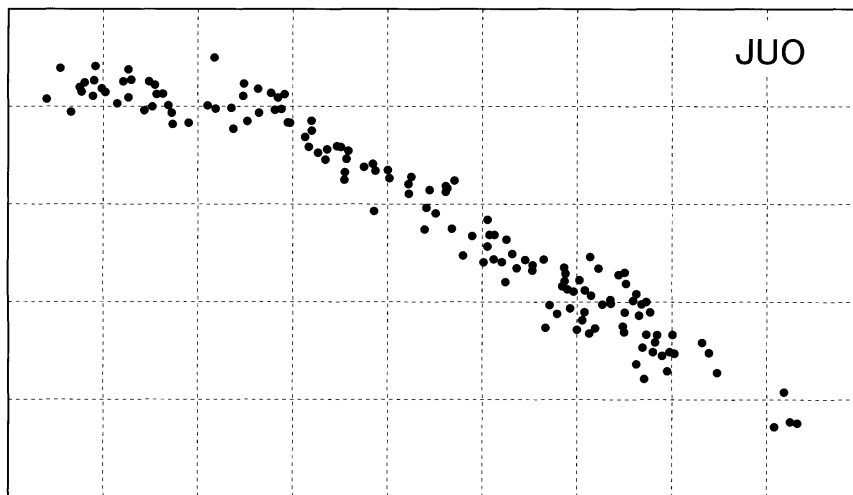


Fig.5-2 Map of all individuals analysed in the JUO sub-population (1996).
Square with dashed lines indicates 20 m intervals.

は、数百個体からなる集団であるが、道路や水路などによって分断されて、局所的に小集団を構成している。このうち1局所集団（146個体）を解析の対象とし、この局所集団をJUOと呼ぶものとする（Fig. 5-2）。本局所集団は、集団内で最も大きなものの一つで、その上流にはサクラバハノキは生育しておらず、また、他の局所集団とは異なる沢沿いに成立している。

(3) 栃木県今市市の集団

栃木県今市市岩崎（北緯36度37分，東経139度44分，標高175m）の湿地に成立しているサクラバハノキ集団は百数十個体からなる集団であり、水路，道路，田などによって南および北の2局所集団に分断されている。これ

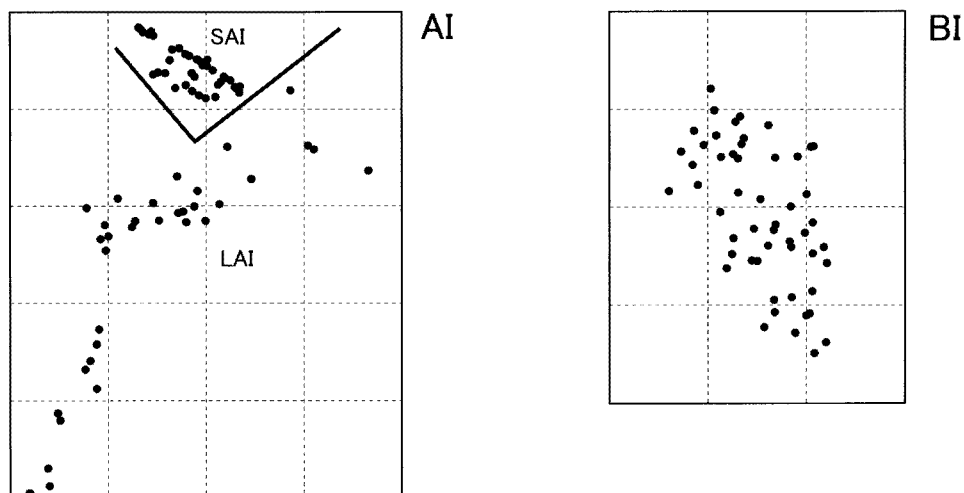


Fig.5-3 Map of all individuals analysed in the Imaichi population (LAI, SAI and BI) and the spatial relationship between the LAI and SAI sub-populations.
Square with dashed lines indicates 20m intervals.

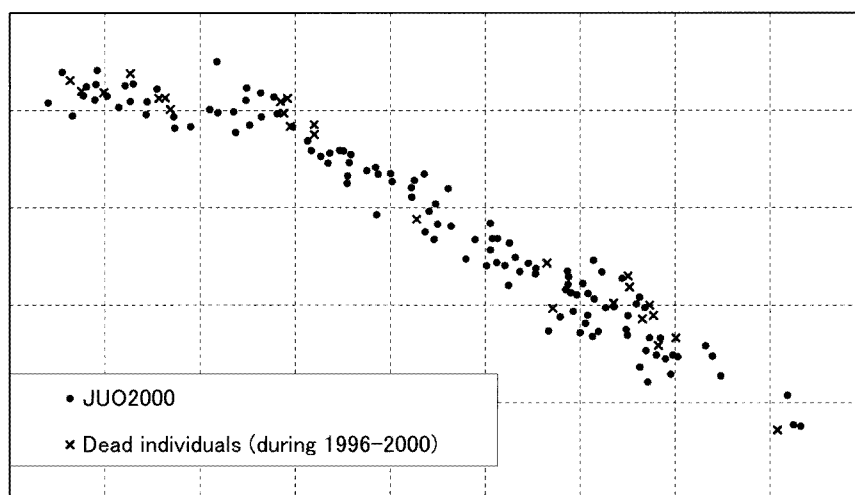


Fig.5-4 Map of all individuals analysed in the Juo sub-population (●: JUO2000). × denotes dead individuals during 1996-2000. JUO1996 consists of ● and ×. Square with dashed lines indicates 20 m intervals.

らは約200m離れており、北の局所集団をAI局所集団、南の局所集団をBI局所集団と呼ぶものとする。さらにAI局所集団の北西部のエリアと南東部のエリアは明らかに樹齢が異なる個体で構成されている。AIの南東部、比較的樹齢の小さい個体で構成されているエリアは1972年に開墾された（名塚，1996）という報告があり、現在このエリアに生育しているサクラバハノキは開墾後定着した実生集団ではないかと推定される。このようにAI局所集団は明らかに樹齢や経歴が異なる2つのエリアからなるため、これらを区別し、北西部に存在する樹齢の大きい局所集団をLAI局所集団、南東部に存在する樹齢の小さい局所集団をSAI局所集団と呼ぶものとした（Fig. 5-3）。

2) 林齢の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

林齢の異なる局所集団間での集団内遺伝構造を比較する目的から、樹体の大きさが異なるJUO, LAI, SAIおよびBIの4局所集団を調査対象集団とした。

3) 同一局所集団の遺伝構造に関する時系列の比較

同一局所集団の遺伝構造に関する時系列の比較を行う目的で、十王局所集団の1996年および2000年における遺伝構造の比較を行った。1996年の十王局所集団をJUO1996, 2000年の十王局所集団をJUO2000とする。Fig. 5-4にJUO2000の個体の位置, および1996年調査時には生育していたが2000年調査時に枯死していた, つまり1996年から2000年の間に枯損した個体(25個体)の位置を示す。ここで枯損個体とした25個体のうちには, 幹が枯損したもののシュートが発生したことにより個体が維持されていた4個体も含まれている。このJUO1996は, 2)で用いたJUOと同一のものである。

4) 伐採歴の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

伐採歴の異なる局所集団間の遺伝構造の比較を行う目的で, 伐採歴のあるYUDA-Aおよび伐採歴をもたないYUDA-Bを解析の対象とした。なお, 本集団では樹高が1 m以上の全個体を解析に用いたが, 株立ち状に生育している個体(Fig. 5-5)が多くみられたので, それらについては, その個体に属する幹の1本からアイソザイム分析に用いる冬芽を採取し, その個体に属する幹の重心の位置に1本の幹が生育していると仮定して解析に用いた。

5) 解析方法

解析対象としたそれぞれの局所集団内の個体について, 測量によりその位置を確定するとともに, 樹高・胸高直径を測定した。個体の位置情報とアロザイム分析型から局所集団内のアロザイム遺伝子の分布パターンについて, Moran's I (Sokal and Oden, 1978a,b), SND (Sokal and Oden, 1978a,b), NAC (Number of Alleles in Common; Surles *et al.*, 1990; Berg and Hamrick, 1995) を用いて解析した。各指標の算出方法を以下に示す。



Fig.5-5 Individuals that has more than two trunks (Yuda population).

(1) Moran's I

Moran's I の解析は次のように行った。5 mごとに10の距離階級を設定し、対立遺伝子頻度が0.05以上、0.95未満の対立遺伝子のみを解析の対象とした。 i 番目の個体がある対立遺伝子に関してホモ接合の場合には $x_i=1$ 、ヘテロ接合体の場合には $x_i=0.5$ 、それ以外の場合は $x_i=0$ として、 $z_i=p-x_i$ を算出した。 p はある集団における対立遺伝子の頻度である。各個体どうしの組み合わせを個体間距離に応じて、10の距離階級に分けた。Moran's I は各対立遺伝子、距離階級ごとに

$$I = n \sum \sum w_{ij} z_i z_j / (W \sum z_i^2)$$

から求めた。ここで n は個体数、 w_{ij} は個体 i と j の重み付けの値で、個体 i と j が任意の距離階級に含まれる場合は $w_{ij}=1$ 、そうでない場合は $w_{ij}=0$ とし、 W は w_{ij} の総和とした。さらに I が期待値 $-1/(n-1)$ から5%水準で有意差があった対立遺伝子の割合を求めた。

(2) SND

SNDの解析についても、5 mごとに10の距離階級を設定し、遺伝子型頻度が0.05以上、0.95未満の遺伝子型のみを対象とした。さらに期待される遺伝子型の組み合わせが1以下であるものについては解析から除外した。同じ遺伝子型をもつ個体どうしの組み合わせ (like join) および、異なる遺伝子型をもつ個体どうしの組み合わせ (unlike join) のそれぞれについてSNDを求めた。同じ遺伝子型の組み合わせ (like join) の、期待される組み合わせ数からのSNDは次式で表される。

$$\text{SND} = (\text{観察された組み合わせ数} - \text{期待される組み合わせ数}) / \text{分散}^{1/2}$$

それぞれの距離階級においてSNDを算出し、その絶対値が標準正規分布の5%点1.96より大きければその遺伝子型は集中分布していることを示す。さらに、SNDの値が正方向に有意であった同じ遺伝子型の組み合わせ (like join) の割合 (PLJ) および負方向に有意であった異なる遺伝子型の組み合わせ (unlike join) の割合 (NUJ) を両局所集団について計算した。有意な負のunlike joinは1つまたは複数の正のlike joinが累積した効果と考えられている。

(3) NAC

NAC (Number of Alleles in Common) の解析についても、5 mごとに10の距離階級を設定した。NACは任意の距離階級において、任意の2個体が多型を示す遺伝子座において共有する対立遺伝子の数の平均値である。すなわち、 $g(i, k)$ を i 番目の個体の k 番目の遺伝子座とし、 $\text{NAC}(g(i, k), g(j, k))$ を、 i 番目の個体と j 番目の個体が共にもつ k 座の対立遺伝子の数とすると、

個体 i と個体 j が両方の対立遺伝子を共有するとき； $\text{NAC}(g(i, k), g(j, k)) = 2$,

個体 i と個体 j が1つの対立遺伝子を共有するとき； $\text{NAC}(g(i, k), g(j, k)) = 1$,

個体 i と個体 j が対立遺伝子を共有しないとき； $\text{NAC}(g(i, k), g(j, k)) = 0$

となる。これを調査したすべての遺伝子座について平均したものがNACである。NACは0～2の値をとり、通常は1.25から1.75の値をとる (Hamrick *et al.*, 1993)。遺伝的に近ければ、NACは大きく、遺伝的に遠ければ小さい。任意の距離階級に含まれる個体についてNACを計算し、この数値をプロットして折れ線で結べば、NACのコアログラムが得られ、遺伝子のランダム分布性はrandomization testで検定できる。

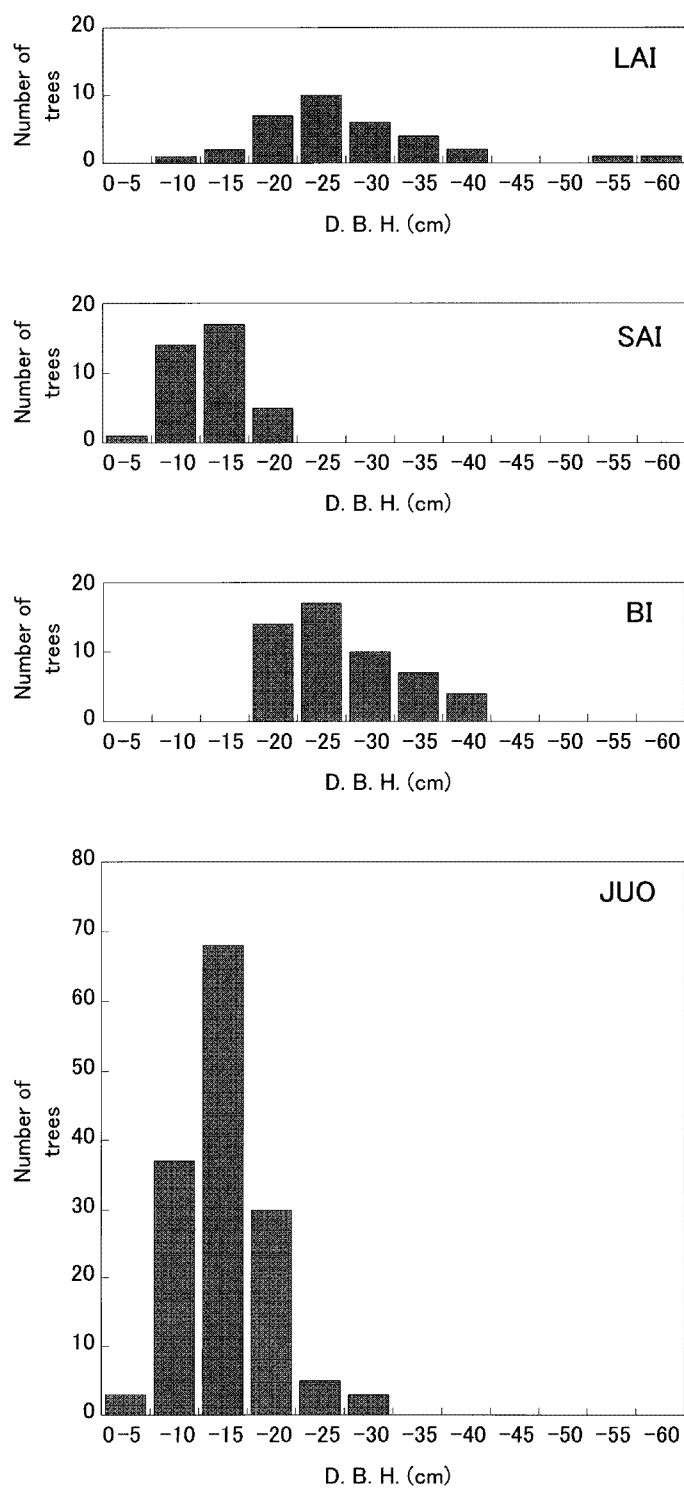


Fig.5-6 Distributions of diameter at breast height (D. B. H.) in the LAI, SAI, BI and JUO sub-populations.

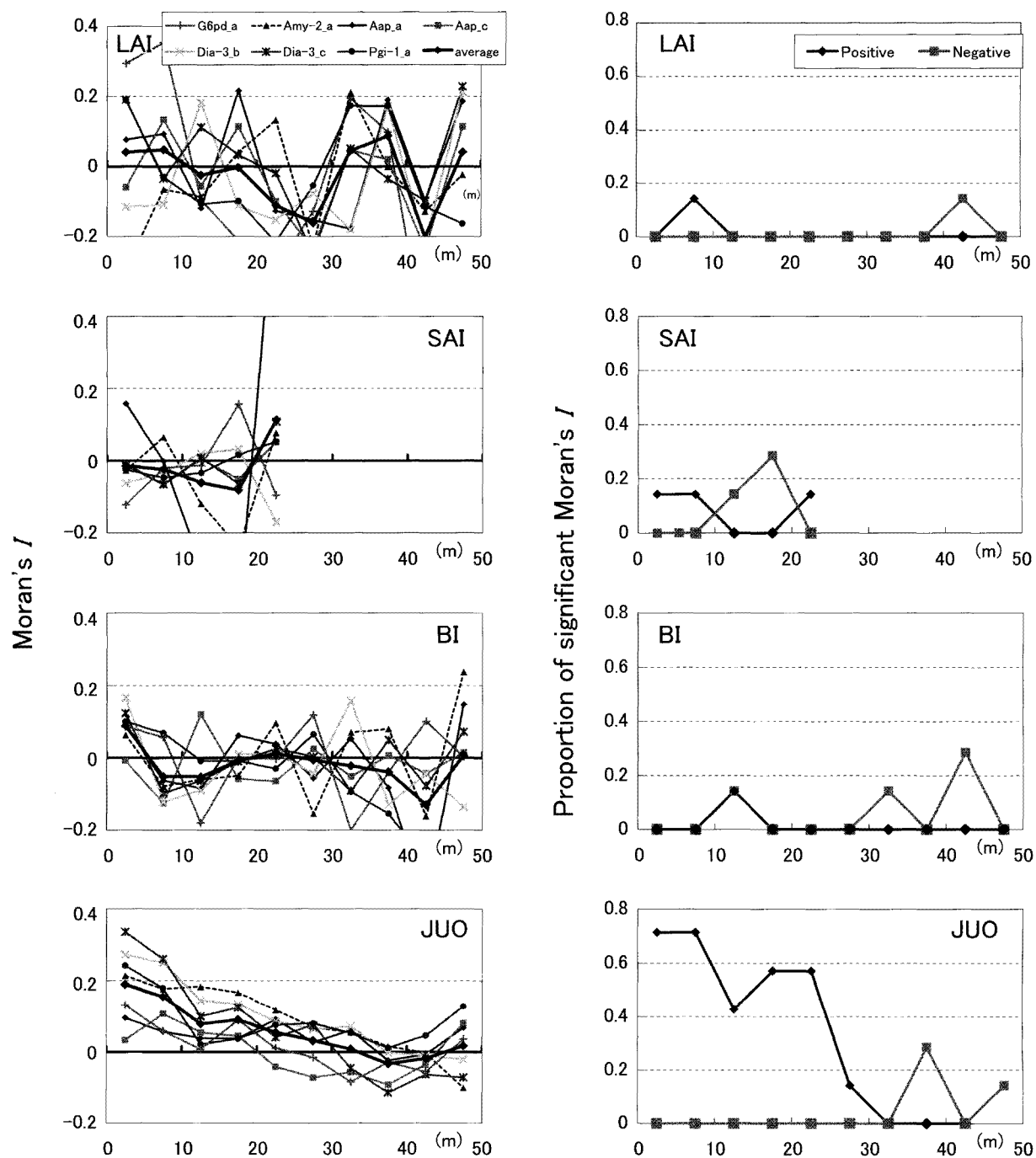


Fig.5-7 Individual and average correlograms of Moran's I -value in the LAI, SAI, BI, JUO sub-populations (in the left) and proportion of significant Moran's I (in the right) in each sub-population.

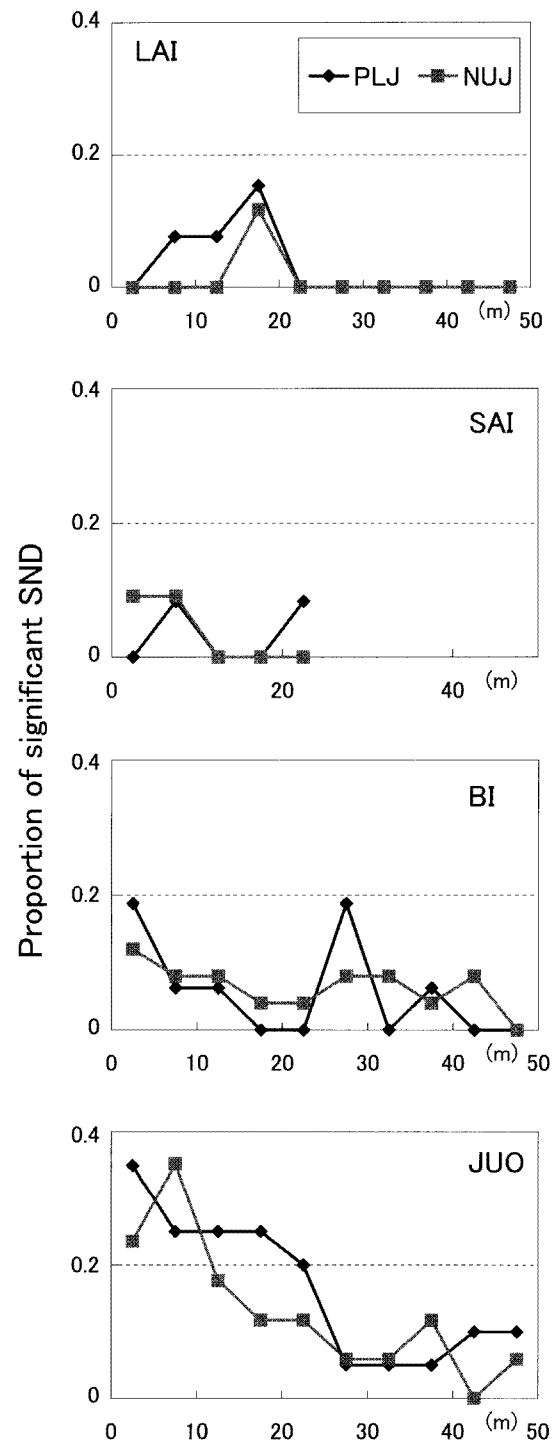


Fig.5-8 Proportion of significant SNPs of like joins (PLJ) and negatively significant SNPs of unlike joins (NUJ) in the LAI, SAI, BI and JUO sub-populations.

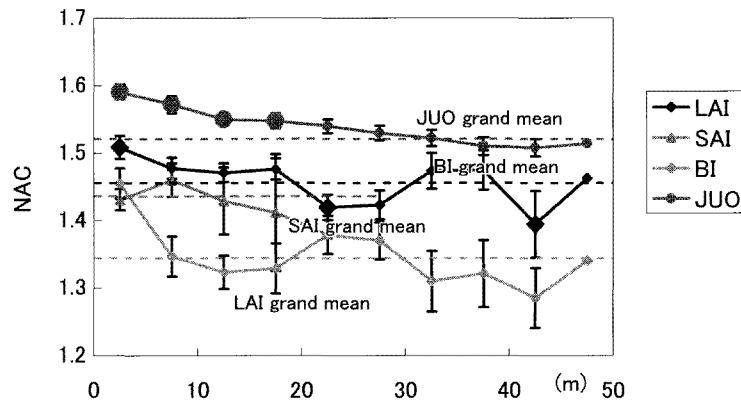


Fig.5-9 NAC values over 10 distance classes in the LAI, SAI, BI and JUO sub-populations.
Grand means of NAC values in each sub-population are shown by dashed lines.
Large markers denote NAC values which significantly differed from the grand mean NAC value at the 5% probability level
Error bars show standard deviations of the NAC values.

以上の3つの指標を用いて、上述の各局所集団について家系構造の解析を行った。これら3つの指標の算出にはTakahashi (2000) のProgram of spatial autocorrelationソフトを使用した。

さらにそれぞれの局所集団について第4章の方法にしたがって遺伝的多様度 (P , A , A_e , H_0 および H_e) を算出し、局所集団間の違いを検定した。

第3節 結果

1) 林齢の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

Fig. 5-6にLAI, SAI, BIおよびJUOの各局所集団に属する個体の胸高直径の頻度分布を示す。胸高直径から判断するとJUOとSAIの2局所集団、およびLAIとBIの2局所集団はそれぞれ同程度の樹齢であると推定され、JUOとSAIは若齢であるが、LAIとBIはそれより齢が進んでいる。Fig. 5-7にLAI, SAI, BIおよびJUOの各局所集団におけるMoran's I のコアリログラム、および有意な正の値を示したMoran's I の割合および有意な負の値を示したMoran's I の割合を示した。Fig. 5-8に有意な正の値を示したlike join (PLJ) と有意な負の値を示したunlike join (NUJ) の割合を示した。さらにFig. 5-9にNACのコアリログラムおよび各局所集団の全平均を示した。LAI, SAIおよびBIの3局所集団集団ではMoran's I の平均コアリログラムが比較的近距离の階級でx軸と交差するのに対し、JUOでは、8番目の距離階級で初めてx軸と交差している。また有意な値をとったMoran's I の割合も今市の3局所集団ではほとんどすべての距離階級で0から0.3程度の低い値をとったのに対し、JUOでは第1, 第2距離階級で7割強の対立遺伝子が有意な値となった。有意な値をとったSNDの割合も同様に、今市の3局所集団ではほぼすべての距離階級について低い値をとったが、JUOでは他の局所集団よりもかなり高い値を示した。NACの平均値もJUOで最も高い値となった他、近距离の階級では有意に期待値よりも大きい値をとった。このようにいずれの指標においてもJUO局所集団で最も空間的自己相関が顕著であったが、その他の今市の3局所集団では明確な遺伝構造は見られないというほぼ同様の傾向が認められた。

Table 5-1 Number of trees, D. B. H. (cm), percentage of polymorphic loci (P ; 95% criterion), no. of alleles per locus (A), effective no. of alleles per locus (A_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) (standard errors in parentheses) in the LAI, SAI, BI and JUO sub-populations.

	Number of trees	D. B. H. (cm)	P (%)	A	A_e	H_o	H_e
LAI	34	25.1 $\pm$ 10.0	53.8	1.9(0.3)	1.37(0.13)	0.225(0.070)	0.203(0.063)
SAI	37	11.1 $\pm$ 3.6	46.2	1.9(0.3)	1.27(0.10)	0.165(0.054)	0.165(0.055)
BI	52	24.5 $\pm$ 6.1	61.5	1.9(0.3)	1.55(0.18)	0.287(0.075)	0.265(0.071)
JUO	146	12.6 $\pm$ 4.4	61.5	2.0(0.2)	1.25(0.07)	0.181(0.044)	0.177(0.042)

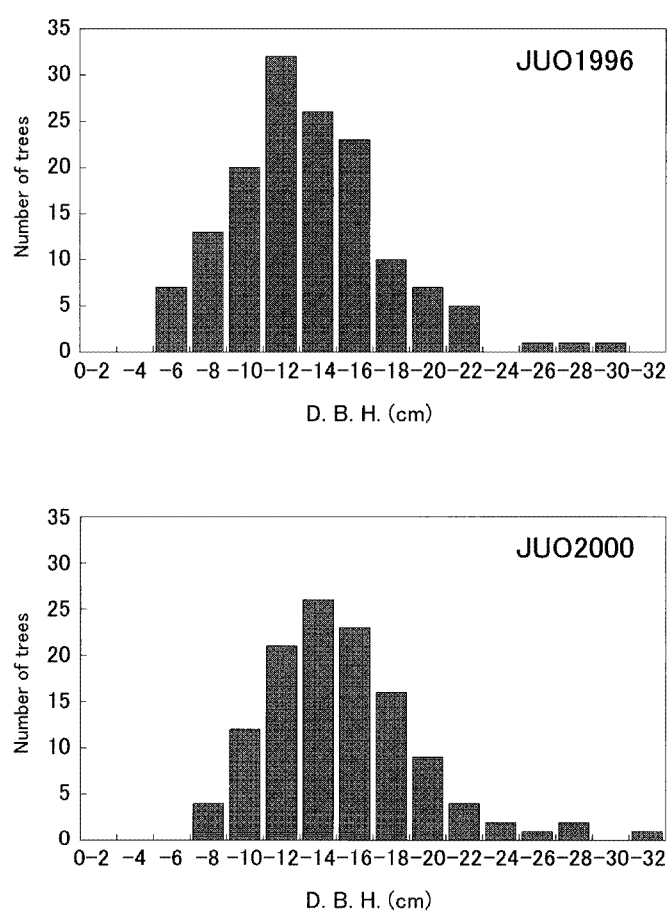


Fig.5-10 Distributions of diameter at breast height (D. B. H.) in the JUO1996 and JUO2000 sub-populations.

Table 5-1にLAI, SAI, BIおよびJUOの各局所集団の遺伝的多様度を示した。分散分析の結果, これらの局所集団間に有意な差はみられなかった。

2) 同一局所集団の遺伝構造に関する時系列の比較

Fig. 5-10にJUO1996およびJUO2000の両局所集団に属する個体の胸高直径の頻度分布を示す。Fig. 5-11に

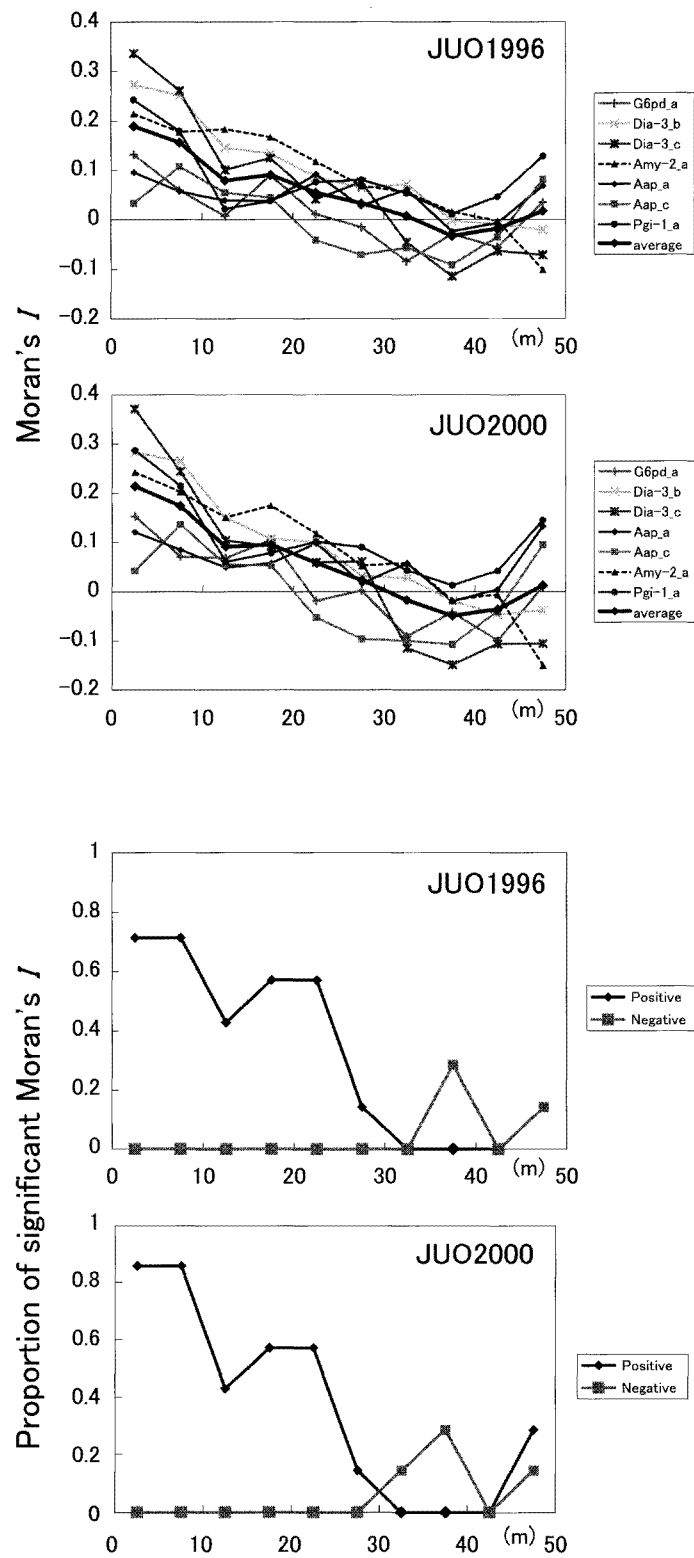


Fig.5-11 Individual and average correlograms of Moran's I -value (in the above) and proportion of significant Moran's I (in the below) in the JUO1996 and JUO2000 sub-populations.

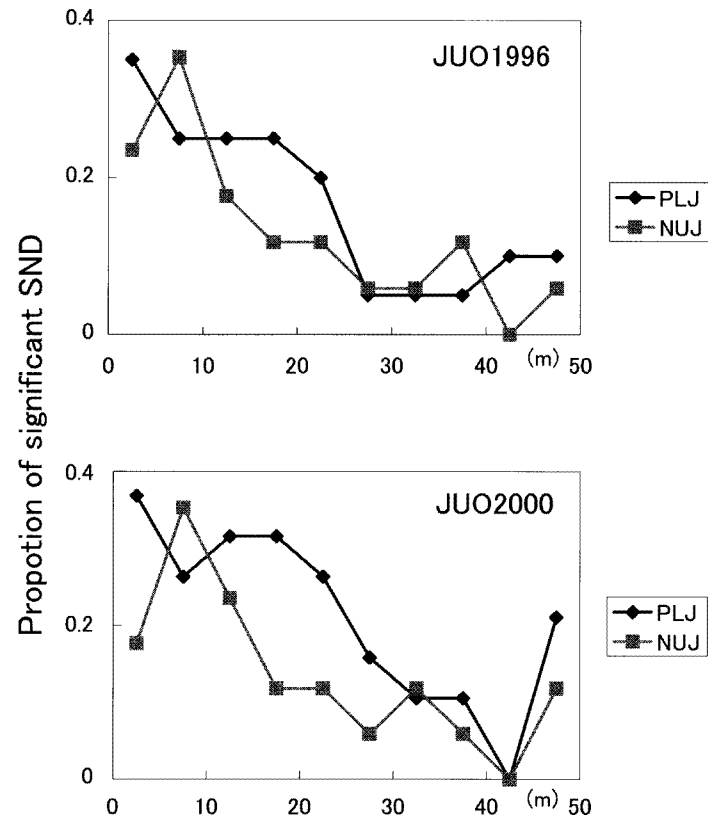


Fig.5-12 Proportion of significant SNPs of like joins (PLJ) and negatively significant SNPs of unlike joins (NUJ) in the JUO1996 and JUO2000 sub-populations.

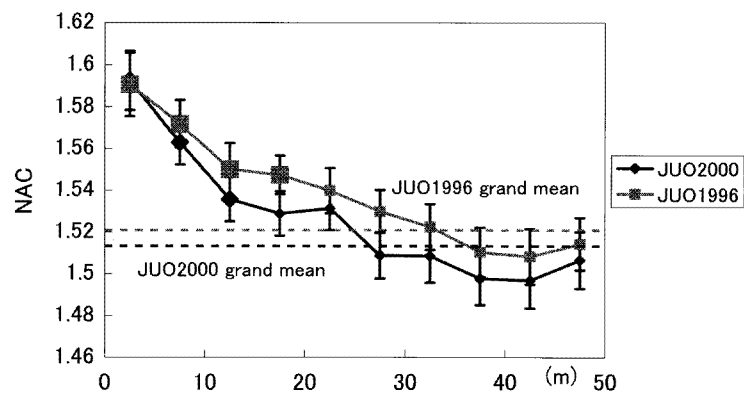


Fig.5-13 NAC values over 10 distance classes in the JUO1996 and JUO2000 sub-populations. Grand means of NAC values in each sub-population are shown by dashed lines. Large markers denote NAC values which significantly differed from the grand mean NAC value at the 5% probability level. Error bars show standard deviations of the NAC values.

Table 5-2 Number of trees, D. B. H. (cm), percentage of polymorphic loci (P ; 95% criterion), no. of alleles per locus (A), effective no. of alleles per locus (A_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) (standard errors in parentheses) in the JUO1996 and JUO2000 sub-populations.

	Number of trees	D. B. H. (cm)	P (%)	A	A_e	H_o	H_e
JUO1996	146	12.6 ± 4.4	69.2	2.0 (0.2)	1.25 (0.07)	0.181 (0.044)	0.177 (0.041)
JUO2000	121	14.4 ± 4.2	69.2	2.0 (0.2)	1.25 (0.07)	0.179 (0.044)	0.177 (0.042)

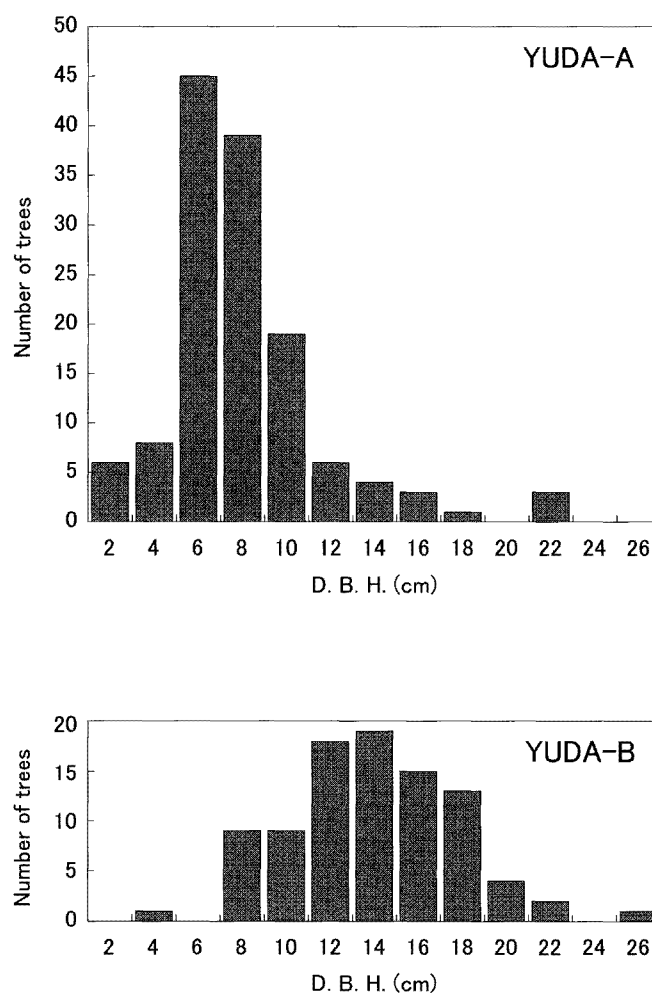


Fig.5-14 Distributions of diameter at breast height (D.B.H) in the YUDA-A and YUDA-B sub-populations.

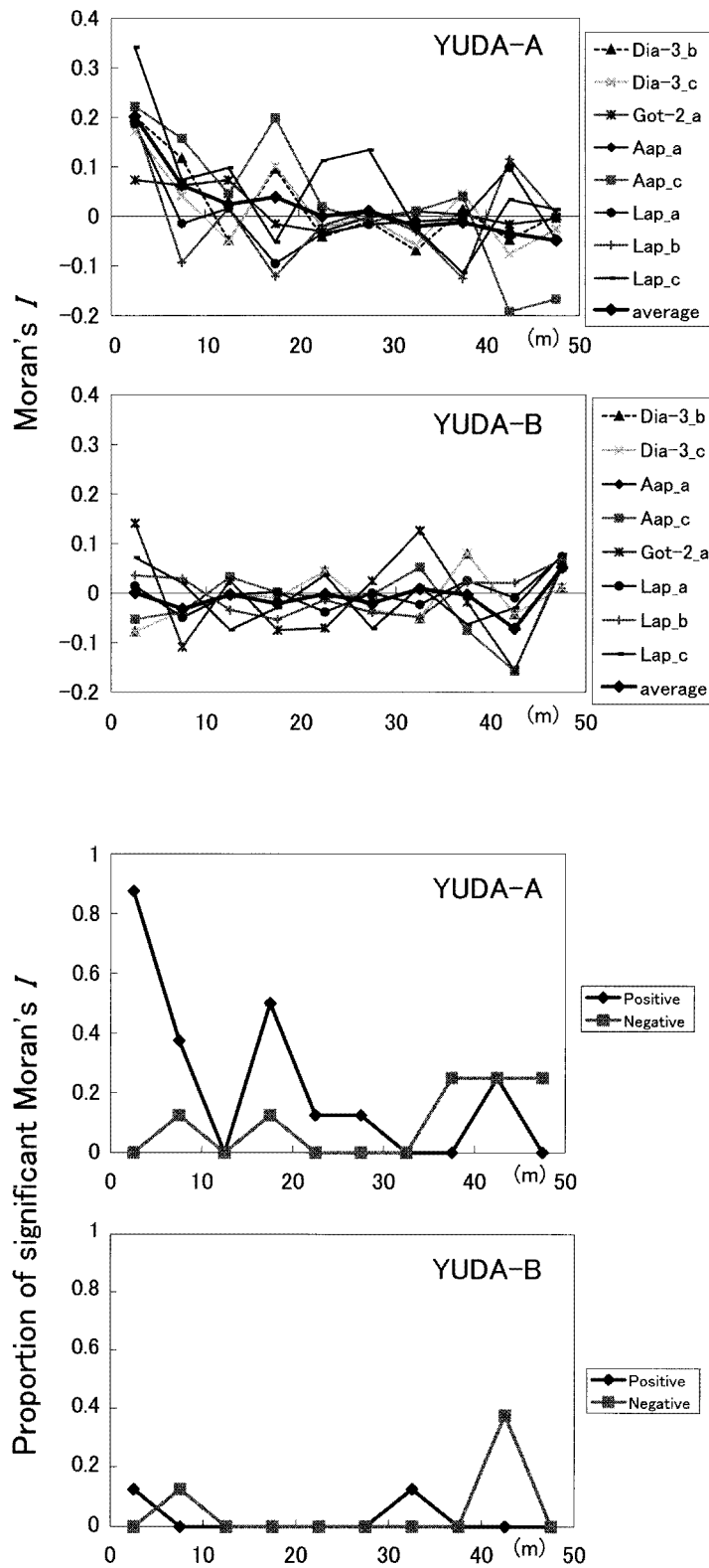


Fig. 5-15 Individual and average correlograms of Moran's I -value (in the above) and proportion of significant Moran's I (in the below) in the YUDA-A and YUDA-B sub-populations.

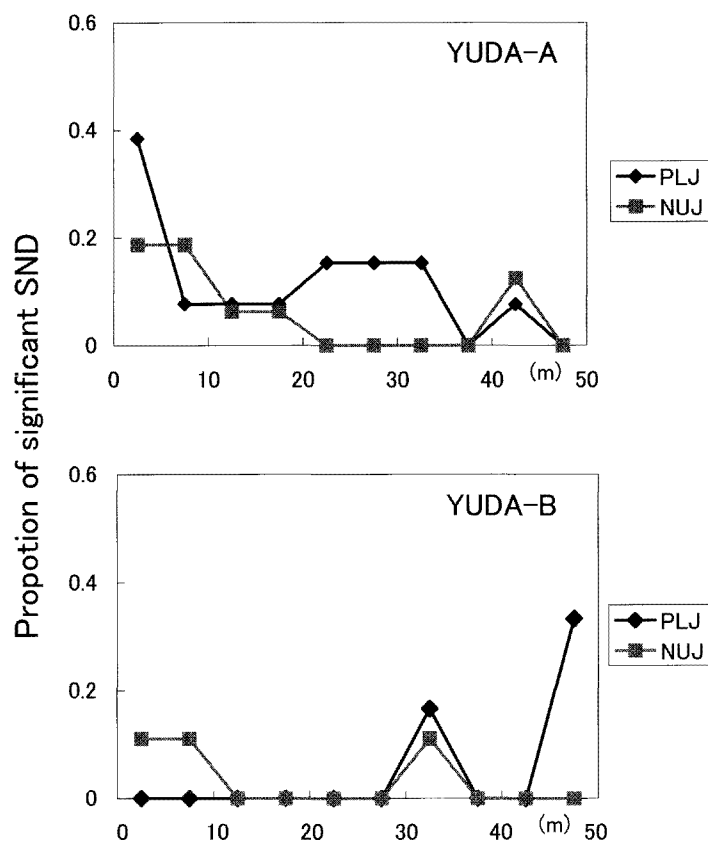


Fig.5-16 Proportion of significant SNDs of like joins (PLJ) and negatively significant SNDs of unlike joins (NUJ) in the YUDA-A and YUDA-B sub-populations.

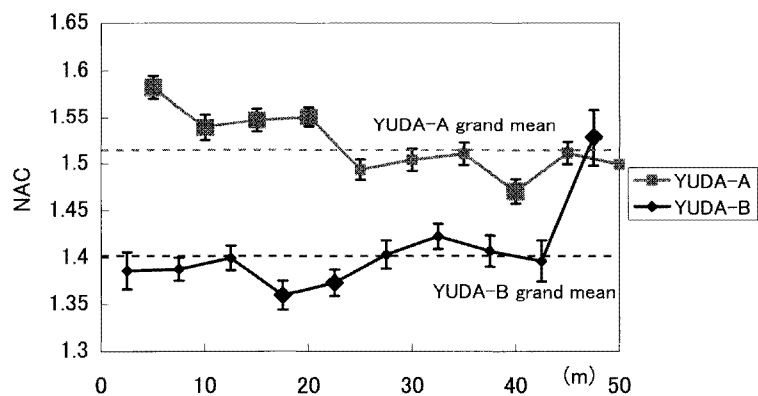


Fig.5-17 NAC values over 10 distance classes in the YUDA-A and YUDA-B sub-populations. Grand means of NAC values in each sub-population are shown by dashed lines. Large markers denote NAC values which significantly differed from the grand mean NAC value at the 5% probability level. Error bars show standard deviations of the NAC values.

Table 5-3 Number of trees, D. B. H. (cm), percentage of polymorphic loci (P ; 95% criterion), no. of alleles per locus (A), effective no. of alleles per locus (A_e), observed heterozygosity (H_o) and expected heterozygosity (H_e) (standard errors in parentheses) in the YUDA-A and YUDA-B sub-populations.

	Number of trees	D. B. H. (cm)	P (%)	A	A_e	H_o	H_e
YUDA-A	349	6.2 ± 2.9	41.7	1.6(0.2)	1.22(0.12)	0.127(0.059)	0.125(0.056)
YUDA-B	183	11.6 ± 4.1	41.7	1.6(0.2)	1.24(0.12)	0.144(0.067)	0.133(0.060)

JUO1996とJUO2000の各局所集団におけるMoran's I のコアリログラム、有意な正の値を示したMoran's I の割合および有意な負の値を示したMoran's I の割合、Fig. 5-12に有意な正の値を示したlike join (PLJ) と有意な負の値を示したunlike join (NUJ)の割合を示した。さらにFig. 5-13にNACのコアリログラムおよび全平均を示した。JUO1996, JUO2000ともにほぼ同様に顕著な空間的自己相関がみられ、有意なMoran's I の値をとった割合、有意なSNDをとった遺伝子座の割合にはほとんど差異はみられなかった。しかし、Moran's I の平均コアリログラムをみると、JUO1996では8番目の距離階級で初めてx軸を下回っているのに対し、JUO2000では7番目の距離階級でx軸を下回った他、NACの全平均の値はJUO1996よりJUO2000で小さくなったことなどから、JUO2000において遺伝構造が弱くなっていることが示唆された。

Table 5-2にJUO1996およびJUO2000の各局所集団の遺伝的多様度を示した。 t -検定の結果、2つの局所集団間の数値に有意な差はみられなかった。

3) 伐採歴の異なる局所集団間の遺伝構造の比較

Fig. 5-14にYUDA-AおよびYUDA-Bの両局所集団に属する個体の胸高直径の頻度分布を示す。伐採歴をもたないYUDA-Bの方は、伐採を受けたYUDA-Aよりも平均胸高直径が大きく、YUDA-Aのほぼ2倍の値をとった。Fig. 5-15にYUDA-AおよびYUDA-Bの各局所集団におけるMoran's I のコアリログラム、有意な正の値を示したMoran's I の割合および有意な負の値を示したMoran's I の割合、Fig. 5-16に有意な正の値を示したlike join (PLJ) と有意な負の値を示したunlike join (NUJ)の割合を示した。さらにFig. 5-17にNACのコアリログラムおよび全平均を示した。YUDA-BではMoran's I の平均コアリログラムがほぼすべての距離階級で0付近の値であったのに対し、YUDA-Aでは、近距離の階級でとくに高い値をとり、5番目の距離階級で初めてx軸と交差していた。また有意な値をとったMoran's I の割合もYUDA-Bではほとんどすべての距離階級で低い値をとっているのに対し、YUDA-Aでは第1距離階級で9割近くの対立遺伝子が有意な値をとっていた。有意な値をとったSNDの割合も同様にYUDA-Bではほぼすべての距離階級について低い値をとったが、YUDA-Aのこれらの値は全般的に高く、距離階級が大きくなるにつれて徐々に低下した。NACの平均値もYUDA-BよりもYUDA-Aの方が大きかった他、最初の4距離階級でYUDA-Aは有意に期待値よりも大きい値をとった。したがってこれらのいずれの指標においても伐採のあったYUDA-A局所集団では顕著な空間的自己相関がみられたが、伐採のなかったYUDA-B局所集団ではYUDA-Aに比べ遺伝構造が弱かったという結果になった。

Table 5-3にYUDA-AおよびYUDA-Bの各局所集団の遺伝的多様度を示した。 t -検定の結果、2つの局所集団間に有意な差はみられなかった。

第 4 節 まとめ

胸高直径から判断すると、JUOとSAIの2局所集団、およびLAIとBIの2局所集団はそれぞれ同程度の樹齢をもつ局所集団であると推定され、JUOとSAIは若齢であるがLAIとBIは前者2集団に比べて齢が進行している。今市の3局所集団LAI, SAIおよびBIでは明確な遺伝構造がみられなかったのに対し、比較的若齢であると推定されたJUOのみが顕著な空間的自己相関を示した。またJUO2000はJUO1996に比べ、わずかであるが遺伝構造が弱まっていた。また伐採のあったYUDA-Aでは空間的自己相関が顕著であったが、伐採のなかったYUDA-Bでは明らかな遺伝構造は観察されなかった。比較したそれぞれの局所集団間に遺伝的多様度に有意差はなかった。

第 6 章 総合考察

第 1 節 生態学的にみたサクラバハノキの保全方法

サクラバハノキとハノキとの間で根頸部からの萌芽性を比較したところ、前者の方が高い複幹個体率および1複幹個体当たり幹数を示した。その理由のひとつとしては、サクラバハノキではある程度成長した幹が枯死し、代わって若齢の萌芽幹が複数本形成されやすいことがあげられる。このように、サクラバハノキは萌芽更新を盛んに行う種であると考えられるが、調査した局所集団内において実生個体の新規参入が認められなかったものの、樹形の2タイプ中、単幹タイプが最も多かったこと、および2001年に過半数の個体で着果が確認されたこと、さらに局所集団に隣接する開放地の林道の縁や法面の裸地で稚幼樹が観察されたことから、実生更新も同時に行っていることが明らかになった。一方、同じハノキ属に属するハノキは萌芽性が低い(谷本, 1990)とされていたが、本研究において萌芽シュートの発生および複幹を形成する個体が少なかったことから、この種では萌芽更新によるよりも、実生更新が主として行われていると推察された。

酒井(1997)は、萌芽を生態学的にみて以下のパターンに分類している。①伐採などの攪乱を受けた際の修復・再生のための萌芽、②地上部の更新のための萌芽、③栄養繁殖としての萌芽である。①の萌芽はその能力には著しい差があるものの、大部分の樹木でみられる現象である(酒井, 1997)。一方、②の萌芽はイヌブナ(Ohkubo *et al.*, 1988; 大久保ら, 1989)、カツラ(久保ら2001)など、③の萌芽はアメリカブナ(Jones and Raynal, 1986)、モミジバフウ(Kormanik and Brown, 1967)、シウリザクラ(小川・福嶋, 1996)などの特定の樹種において、通常的生活史の一部としてみられる萌芽である。サクラバハノキでは、幹が枯損しているにも関わらず根頸部から萌芽シュートが発生して個体が維持されている例がみられたこと、根頸からの萌芽能力がハノキより高かったこと、隣接個体どうしが根でつながっている例があったこと、さらに複数の遺伝子座において同一の遺伝子型をもつ個体が近接して存在する場合の多かったことから、サクラバハノキには①、②および③すべての萌芽パターンをもつ樹種であると考えられた。

ハノキ類は、樹齢10年前後の若齢期から結実を開始し、毎年かなり多量に結実する(林野庁研究普及課, 1981)。本研究の調査集団においても2001年には過半数の個体で着果が確認され、集団に隣接する林道の縁や法面の裸地では種子由来の稚幼樹が観察された。しかし、集団内では種子由来の稚幼樹がみられず、また少なくとも最近15年間は種子由来する個体の新規加入は認められなかった。一般に、林内に散布された種子は、陽光の不足や発芽を阻害する菌類の影響を受ける(北海道営林局, 1985)ために、実生の定着は困難であると考えられている。したがって、実生が定着するためには、攪乱によって林冠ギャップが発生し、陽光の不足が解消される必要

があると考えられる。

生存個体の根頸部に枯死した萌芽シュートが多数観察されたことから、サクラバハノキは攪乱を受けない状況下においても、根頸部から出る萌芽シュートが絶えず新しいシュートに置き換えられながら樹幹の枯死および林冠ギャップの修復に備えていると考えられる。サクラバハノキの個体を形成している幹の樹齢は15~59年の範囲であったが、樹齢21~35年の幹が82%と際立って多かった。カツラでは個体を形成する複数の萌芽幹の樹齢が100年以上にわたっている(渡邊, 1970)ことを考えると、サクラバハノキの萌芽幹の成長は、比較的短い周期で一斉に行われていることが明らかである。このため、サクラバハノキの個体の維持には、このような特性を考慮する必要がある。

台風などにより倒木や枯死木が大量に発生し、大型の林冠ギャップが形成された場合、根頸部からの萌芽シュートの成長に加え、倒木した幹からの萌芽や根萌芽による栄養繁殖がおこる可能性がある。本研究で調査した集団において栄養繁殖による空間的な家系構造の存在が示唆されていたことから、栄養繁殖のための萌芽が集団の遺伝的構造の形成に与える影響は大きいと考えられた。

以上のことから、サクラバハノキは、根頸部に萌芽シュートを備えることによって個体を長寿命化し、また偶発的な攪乱が発生した際には親個体から複数のクローンを分離、分散させることによって集団の維持を図っているものと推察される。

Grime (1977) は淘汰圧に対する生活史戦略によって種の分類を試み、競争種 (competitor)、ストレス耐性種 (stress tolerator) および攪乱依存種 (ruderal) に分けられることを提唱した。サクラバハノキは湿地という特殊な土壌条件に耐性をもつストレス耐性種に分類されるので、湿地内では他の湿地土壌耐性種との競争になる。しかし本研究で調査した局所集団が成立している水路沿いにはほぼサクラバハノキのみが生育していたことから、ここでの競争はさほど激しくないと考えられた。

萌芽更新と実生更新はトレードオフの関係にあり、どちらを生活史戦略としてとるかは、種の進化および維持に関わる重要な点である。一般には条件によって使い分けている (Bellingham and Sparrow, 2000) が、その採択比率には種内に連続変異があるようである。サクラバハノキに関しては、本実験結果が示すように、実生更新に加えて萌芽更新も主要な更新方法であり、この方向にサクラバハノキは進化してきたと考えられる。Bellingham and Sparrow (2000) は、どちらの更新方法が攪乱によって失ったバイオマスを取り戻すために有効であるかについて、攪乱の強度および頻度との関係から考察している。今回調査した局所集団は、1996年から2001年までの観察によるかぎり、攪乱の強度・頻度ともに低く、安定した環境に分布していると推定される。これは彼らのモデルによると萌芽更新に適した条件である。すなわち、サクラバハノキは、湿地を生育環境として選ぶことによって、他種との競争を避け、さらに生育場所に大きな攪乱がなければ、萌芽更新によるメリットを生かして場所の確保・個体の長寿命化を図っていると推察される。攪乱が起こった場合にも、それが大きくなければ、これを実生による更新や萌芽による栄養繁殖の機会としていえると考えられる。このようにサクラバハノキは、湿地において大きな攪乱がなければダメージを受ける可能性は小さい。しかし、近年湿地の乾性化や埋め立てが進み、サクラバハノキの生育環境の劣悪化しており、このことがサクラバハノキが絶滅に瀕している大きな要因と考えられる。したがって、本種の保護には本種の生育地である湿地の保護が最も意義があると考えられる。人為を排除して湿地が保護できる状態であれば、例えば天然記念物として指定することなどにより集団の保護が図れるであろうし、また積極的な人為的介入がなくても湿地が乾性化に向かっている場合は、集団内

外の水の通路を調査し、人為的に確保することが有効と思われる。また、保護という観点からは離れるが、局所集団内では実生個体の生育が困難であることが推察されたことから、集団から採種して養苗した苗木を集団内に植栽する方法も考えられる。

第 2 節 遺伝学的にみたサクラバハノキの保全の方法

種および集団レベルにおける遺伝的多様性を示す統計量とともに、木本植物の平均値よりも大きかった。なお、遺伝変異は繁殖様式や種子散布様式に強く影響され、サクラバハノキのような風媒植物では、高い遺伝変異をもつとされている。

また、 F_{IS} を算出したところ、木城集団においてのみ 0 からの有意差が観察されたが、他の 6 集団および木城集団を含む 7 集団の平均値には有意差が検出されなかった。このことから、ほとんどのサクラバハノキ集団では、各遺伝子座の遺伝子型頻度がハーディ・ワインベルグ平衡にあることが示唆され、集団内に近親交配はほとんど生じていないことが示された。しかし、集団間における遺伝的分化の程度を表す G_{ST} 値を求め、その値の 0 からの偏差を検定したところ、9 多型遺伝子座中 8 遺伝子座で有意であった。すなわち、ほとんどのアロザイム遺伝子座で遺伝子頻度に関して有意な集団間差異のあることが認められた。また、サクラバハノキ集団全体の G_{ST} 値を求めたところ 0.146 となり、サクラバハノキが種としてもつ遺伝変異のうち、14.6% が、集団間の差に由来することが明らかになった。この割合は他の木本植物より大きく、したがって本実験に供したサクラバハノキに関しては集団間の分化がかなり進んでいると考えられた。

サクラバハノキの地理的変異を明らかにするため、各集団が持つ遺伝変異を表す統計量と緯度との関係について回帰分析を行った。その結果、 t -test では A 、 A_e および H_e において、ノンパラメトリックテストでは A_e および H_e において緯度との有意な回帰が検出された。このことから、南の集団の方が北の集団より高い集団内遺伝変異を保持していることが明らかになった。また、特定の集団にのみ存在する対立遺伝子がいくつかあり、それらは南西日本の 2 集団において検出された (阿東集団における Aap^f および $Pgi-1^e$ 、木城集団における $Dia-2^c$ 、 $Got-2^d$ 、 $Got-2^e$ および Aap^e)。花粉分析の研究からハノキ属は氷河期以降、北へ分布域を拡大したという報告がある (辻・鈴木, 1977; 塚田, 1981; 松岡ら, 1983; 大西, 1990)。これらの報告では、ハノキ属内の種を区別していないが、ハノキ属の多くの種が湿地に生育する性質をもつため、サクラバハノキについても同様の考察が適用しうると考えられる。

以上のことから、サクラバハノキは氷河期以降、創始者効果、遺伝的浮動に影響されながらその分布域を北へと拡大していたと考えられる。

浜北、木城の 2 集団でとくに高い遺伝的多様性が認められたが、両集団の存在する地域は、特異的な土壌をもつことが知られている。浜北集団が存在する付近地域は、丘陵・台地・段丘地形に特徴づけられ、貧栄養の低湿地を多く抱え、ハナノキ、シデコブシ、ヒトツバタゴ等の東海丘陵要素と呼ばれる多くの固有種、絶滅危惧種、隔離分布種等の自生地となっている。また、木城集団の存在する地域は九州において火山の影響を受けていない実質上唯一の土地であり、この地域もヒュウガホシクサ (既に絶滅した) (環境庁自然保護局野生生物課, 2000)、絶滅危惧種のナガバノイシモチソウ (環境庁自然保護局野生生物課, 2000) を保持している。これらの地域には、貧栄養状態でも生育可能なこれらの種しか生育できなかったために、これら植物が遺存種として現在も生育しているのか、あるいは貧栄養の土地がこれらの種にとってレヒュージア (他地域では競争に負けた、または気候が

変化して生きていけなくなった生物が逃げ込む場所)として働いたために、これらの種が現在なお生息しているのかは明らかでないが、これら2集団で比較的高い遺伝変異が観察されたことは、特殊な土壌条件と関係があるかもしれない。

生態特性が十分に知られていない種を保全する時、その現在の生育地の以外の場所で保全できるかどうかは疑わしい。したがって保全に際し、まずとるべき方策は生息域内保全であり、生息域外保全はそれを補完するものである。サクラバハノキのように集団間の遺伝的分化の程度を表す G_{ST} が高い値である種においては、その種がもつ遺伝変異は多数の集団に分散されて保持されていることが示唆される。すなわち、個体数の小さい集団にも重要な遺伝変異が含まれている可能性がある。日本のサクラバハノキの保全の際には、個体数の大きな湯田、十王、木城集団はもちろんのこと、個体数の少ない西郷集団や浜北集団も含め、まずは保全対象とする集団数を多くする必要があると思われる。

本調査の結果、集団内の空間的自己相関は①若齢の集団で顕著であり、老齢の集団では弱いこと、②同一集団においても5年間で若干弱まること、さらに②伐採があった集団では強くなること、が明らかになった。今市のLAI, SAI, BI, およびJUO各集団の遺伝的多様性を分散分析によって調べたところ、4つの集団間に有意な差はみられなかった。しかし、集団内遺伝構造には大きな差が存在した。すなわち、JUOとSAIはほぼ同じサイズの個体から構成されており、かつ遺伝的多様度はほぼ同様のレベルであったが、JUO集団は、SAI集団と異なり、強い空間的自己相関が存在した。このような差が生じた理由として母樹集団の遺伝的組成の違い、微地形および微気象等の空間の構造があげられる。とくに母集団の遺伝的組成がJUOとLAI, SAI, BIの3集団では大きく異なっていた。今市の3局所集団の周囲にはかなり広範囲にわたって、小さな集団が複数存在していることが報告されている(名塚, 1996)。すなわち、JUO局所集団と異なり、今市の各集団は風による花粉の分散、あるいは風または流水による種子の移住が他の集団からあることにより、遺伝的に均質化しているとも考えられる。またJUO局所集団の集団内遺伝構造を5年経て再度検証したところ、他の種で報告されているのと同様に(Hamrick *et al.*, 1993; Epperson and Alvarez-Buylla, 1997; Parker *et al.*, 2001), 間引きが起こったことによる遺伝構造の縮小がみられた。

さらに、湯田の2局所集団の遺伝的多様度を算出した結果、2つの局所集団間の数値に有意な差はみられなかったものの、集団内遺伝構造には大きな違いがあり、伐採のあったYUDA-Aでは、YUDA-Bにはみられない集団内遺伝構造が検出された。その理由としてYUDA-Aでは過去の伐採によって一部の個体に残り、その個体からの種子が更新に関わっていた可能性のあることがあげられる。以上のサクラバハノキ生息域内保全集団の選定の際には、若い集団よりも成熟した集団を、さらに人為的影響があった集団よりも影響を受けていない集団を選ぶべきと考えられる。

第3節 本研究に基づいたサクラバハノキおよび生物多様性保全への提言

本研究に基づき、サクラバハノキにとっては①湿地の保全が有効であること、②個体数が大きい集団を含めることはもちろんのこと、保全の対象とすべき集団数は多いほどよいこと、③優先順位をつけるとすれば、集団内遺伝構造があまり発達していない林分が適しており、そのような林分とは、成熟した林分、また人為的影響を受けていない林分であること、④集団内遺伝構造を考慮した保全・サンプリングが必要であることがわかった。

今回調査したサクラバハノキ調査地の概要についてTable 6-1にまとめた。個体数の少ない集団が2つ、ま

Table 6-1 Outline of seven populations.

	Size of trees	No. of individuals	Seedlings	Owner	
1. Yuda	middle/small	large	Yes	private	natural monument
2. Nishigo	large	very small	No	village	
3. Juo	middle	large	Yes	national	
4. Imaichi	large	middle	No	private	
5. Hamakita	middle	small	Yes	prefectural	
6. Ato	middle	middle	Yes	private	
7. Kijo	small	large	Yes	national	

た一見したところ実生の存在が確認できなかった集団が2つあった。土地の所有形態に関しては、国・県・市町村有地以外の、民有地のものが3ヶ所あった。その他、湯田の集団は町指定の天然記念物になっており、そのためこの集団内のサクラバハノキに関しては、町教育委員会等の許可なく現状に変更を加えるような行為は禁止されている。しかし、他の集団に関しては、保護に関する指定はなされていない。とくにこれら民有地のサクラバハノキ生育地に関しては、湯田の集団を除き、現在の状況では伐採・埋め立て等、土地やその土地に生育している植物に変更を加えることに関して所有者の裁量に任されている状態である。したがって、希少な種や絶滅危惧種等を含む土地が政策や経済状況によって変化しないとも限らない。このようなことを踏まえて現在民有地である集団に関しても早急に何らかの保全上の指定をし、なおかつ、この指定を受けたことによって所有者が不利益を被らないような対策を講じる必要がある。

さらに、サクラバハノキが湿地に適応する特異な種であることから、湿地を天然記念物に指定することによって人為の介入を排除しても、放置しておくだけでは湿地の乾性化や遷移などにより現状が維持できなくなると予想される。そのような場合には、人為的に水路を確保することや、場合によっては集団から採取して得た種子を養苗したものを植え戻すという作業も必要となる。

摘 要

サクラバハノキの保全について考察することは、ハノキ属樹種の育種のみならず、各種生物種多様性保全のためにも重要な意義がある。本研究は、このような観点から、サクラバハノキの遺伝および生態的特性を解析し、保全に関する基礎的知見を得ようとしたものである。

1. サクラバハノキは、同属で同様のニッチをもつハノキと比較して、萌芽能力が高いこと、また湿地が保全されていればその高い萌芽能力により個体の維持が可能であること、つまり湿地の保全がサクラバハノキの保全にきわめて重要であることが明らかになった。
2. 集団遺伝学的手法を用いて、サクラバハノキのもつ遺伝的多様性を評価したところ、種レベルにおける遺伝的多様度を示す統計量は $P_s=75.0$, $A_s=3.42$, $A_{es}=1.35$ および $H_{es}=0.222$ となり、集団レベルでは $P_p=58.3$, $A_p=2.14$, $A_{ep}=1.35$, $H_{ep}=0.199$ となって、いずれの値も木本植物の平均値より高いことが認められた。また、

G_{ST} 値は0.146と高く、サクラバハノキが種としてもつ遺伝変異のうち、14.6%が集団間の差に由来することが明らかになった。この値は木本植物の中では比較的大きく、したがって保全の際には個体数が大きい集団を選ぶのはもちろんのこと、保全の対象とすべき集団数も多くすることが望ましいことが明らかになった。

3. 集団内の空間的自己相関は若齢の集団で強く、老齢の集団では弱く、同一集団でも5年後に若干弱まった。また伐採があった集団では遺伝構造が強まることが認められた。集団内遺伝構造が弱い集団は、遺伝的な組成がよく似た個体どうしが集中分布していないことになる。したがってそのような集団を生息域内保全の対象として優先的に選抜することにより、効率的に遺伝的多様性が保全できると考えられた。また、集団内遺伝構造が強い集団では保全やサンプリングの際にその存在に留意する必要があることが示された。

謝 辞

本論文に懇篤なるご助言をいただき、校閲の労をお取りいただいた京都大学農学部教授谷坂隆俊博士に心から感謝します。本論文をとりまとめるにあたり、終始ご指導とご助言をいただいた宇都宮大学農学部助教授飯塚和也博士に厚くお礼申し上げます。北海道育種場の半田孝俊育種課長、星比呂志育種研究室長、森林総合研究所の津村義彦博士、名古屋大学農学部助教授戸丸信弘博士、龍谷大学理工学部宮浦富保博士、九州育種場の倉本哲嗣博士には本研究に懇切なご教示をいただきました。林木育種センターの高橋誠博士には集団遺伝学的解析および空間的自己相関分析用のプログラムの使用を快諾していただき、懇切な助言をいただきました。また林木育種センター育種部長田島正啓博士ならびに同育種課長宮田増男博士には研究の遂行にあたってご指導と励ましをいただきました。材料採取・地図の作成には静岡県北遠農林事務所の山本徳子技師、宮崎大学農学部教授中尾登志雄農学博士、林木育種センターの山田浩雄室長、長野増殖保存園の菊池正和係長、大塚次郎係員、関西育種場の竹田宣明係員に多大なるご協力をいただきました。実験・資料の整理には、林木育種センターの宮田由美子氏・田中きみ子氏・桑原政美氏および北海道育種場の千野裕美子氏・細川千津美氏・村木幸智子氏にお世話いただきました。また北海道育種場の職員のみなさまには本研究にご理解とご協力をいただきました。これらの方々に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Bellingham PJ, Sparrow AD (2000) Resprouting as a life history strategy in woody plant communities. *Oikos* 89: 409-416.
- Berg EE, Hamrick JL (1995) Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. *Evolution* 49: 110-120.
- Bousquet J (1987) Genetic differentiation among 22 mature populations of green alder (*Alnus crispa*) in central Quebec. *Can. J. For. Res.* 17: 219-227.
- Bousquet J, Cheliak WM, Lolande M (1988) Allozyme variation within and among mature populations of speckled alder (*Alnus rugosa*) and relationships with green alder (*A. crispa*). *Amer. J. Bot.* 75: 1678-1686.

- 千葉 茂 (1966) ハンノキ, ポプラ属の交雑ならびに倍数性による育種に関する研究. 王子製紙株式会社林木育種研究所研究報告 1 : 1-165.
- 中国樹木誌編纂委員会 (1985) 中国樹木誌 2. 中国林業出版社, 北京.
- 中国科学院植物研究所・深圳仙湖植物園 (1987) 中国高等植物. 青島出版, 青島.
- Darlington CD, Wylie AP (1955) Chromosome atlas of flowering plants. George allen and Unwin LTD, London.
- Davis BJ (1964) Disc electrophoretic data and plant speciation. Syst. Bot. 10: 405-416.
- Dobzhansky T (1970) Genetics in the evolutionary process. Columbia Univ, Press, New York and London.
- Dusan G, Ladislav P (2002) Spatial and microgeographical genetic differentiation of black alder (*Alnus glutinosa* Gaertn.) populations. For. Ecol. and Management 160: 3-9.
- Epperson BK (1989) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sinauer Associates: Sunderland, MA. pp229-253.
- Epperson BK (1990) Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. Genetics 124: 757-771.
- Epperson BK, Alvarez-Buylla ER (1997) Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. Evolution 51: 275-282.
- Goncharenko GG, Padutov VE, Silin AE (1993) Allozyme variation in natural populations of Eurasian Pine. Silvae Genet. 42: 237-253.
- Gottlieb LD (1981) Electrophoretic evidence and plant populations. Prog. Phytochem. 7: 1-46.
- Gottlieb LD (1982) Conservation and duplication of isozymes in plants. Science 216: 373-380.
- Grime JP (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. American Naturalist 111: 1169-1194.
- Gullberg U, Yazdani R, Rudin D, Ryman N (1985) Allozyme variation in scots pine (*Pinus sylvestris* L) in Sweden. Silvae Genet. 34: 193-201.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.
- Hamrick JL, Murawski DA, Nason JD (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. Vegetatio 107/108: 281-297.
- 半田孝俊・千田雅一・星比呂志・西村慶二 (1996) 茨城県十王町のサクラバハンノキ群落 (I) —その現状—, 第107回日本林学会大会講演要旨集: 145.
- 半田孝俊 (2002) 十王町の貴重な植物群落, 十王町の歴史と民俗11 (十王町史編纂委員会発行)
- 半田孝俊 (投稿準備中) 日本樹木誌 サクラバハンノキ 日本林業調査会.
- 初島住彦 (1976) 日本の樹木. 講談社, 東京.
- 北海道営林局 (1985) 天然林を考える. 北海道営林局技術開発室, 札幌.
- Huh MK (1999) Genetic diversity and population structure of Korean alder (*Alnus japonica*; Betulaceae) Can. J. For. Res. 29: 1311-1316.

- Huh MK, Huh HW (1999) Genetic diversity and population structure of *Alnus hirsta* (Betulaceae) in Korea. J.Plant Res. 112: 437-442.
- Jones RH, Raynal DJ (1986) Spatial distribution and developement of root sprouts in *Fagus grandifolia* (Fagaceae) .Amer. J. Bot. 73: 1723-1731.
- 環境省自然環境局生物多様性センター (2002) <http://www.biodic.go.jp/>
- 環境庁自然保護局野生生物課 (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—8 植物 I (維管束植物). 自然環境研究センター, 東京.
- 河崎久男 (1990) スギにおける胚致死遺伝子検出法に関する研究. 林育研報 8 : 1-67.
- Kikuzawa K (1978) Emergence, defoliation and longevity of Alder (*Alnus hirsute* Turcz.) leaves in a deciduous hardwood forest stand. Jpn. J. Ecol. 28: 299-306.
- 菊沢喜八郎 (1978) 広葉樹の葉の生存曲線. 遺伝 32 (8) : 57-62.
- 菊沢喜八郎 (1980) ハノキ属の葉はなぜ夏に落ちるか. 日本生態学会誌 30: 359-368.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49: 725-738.
- 北村四郎・岡本省吾 (1959) 原色日本樹木図鑑. 保育社, 大阪.
- Knowles P, Perry DJ, Forster HA (1992) Spatial genetic structure in two tamarack (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) populations with differing establishment histories. Evolution 46: 572-576.
- Kormanik PP, Brown CL (1967) Root buds and the development of root suckers in sweetgum. Forest Science 13: 338-345.
- 久保満佐子・島野光司・崎尾均・大野啓一 (2001) 地形と萌芽の発生様式からみたカツラの萌芽特性. 日本林学会誌 83: 271-278.
- Kuramoto N, Kondo T, Fujisawa Y, Nakata R, Hayashi E, Goto Y (2000) Detection of quantitative trait loci for wood strength in *Cryptomeria japonica*. Can. J. For. Res. 30: 1525-1533.
- 倉田 悟 (1968) ハノキ, 原色日本林業樹木図鑑第二巻. 地球出版, 東京.
- 倉田 悟 (1971) サクラバハノキ, 原色日本林業樹木図鑑第三巻. 地球出版, 東京.
- Li P, Horvitz DG (1953) Some methods of estimating the inbreeding coefficient. Am. J. Genet. 5: 107-117.
- Markert TL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes; tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. 45: 753-763.
- 松岡数充・西田史郎・金原正明・竹村恵二 (1983) 紀伊半島室生山地の完新統の花粉分析. 第四紀研究 22: 1-10.
- Mitton JR, Sturgeon KB, Davis ML (1980) Genetic differentiation in ponderosa pine along a steep elevation transect. Silvae Genet. 29: 356-360.
- 宮本尚子・山本徳子・星比呂志・半田孝俊 (2000) アイソザイムによる茨城県十王町サクラバハノキ集団の家系構造. 日本林学会誌 82: 72-79.
- Miyata M, Ubukata M (1993) Genetic variation of allozymes in natural stands of Japanese black pine in Tohoku and East Kanto Regions. J. Jpn. For. Sci. 75: 361-366.
- 宮田増男・生方正俊 (1994) クロマツ天然林におけるアロザイム変異. 日本林学会誌 76: 445-455.

- Moran GF, Adams WT (1989) Microgeographical patterns of allozyme differentiation in Douglas-fir from southwest Oregon. *Forest Science* 35: 3-15.
- 森本幸裕・亀山 章 (2001) ミティゲーション—自然環境の保全・復元技術—. ソフトサイエンス社, 東京.
- Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, Kawahara T, Yoshimaru H, Kondo T, Tomaru N, Kuramoto N, Murai M (1995) A linkage map for Sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. *Theor. Appl. Genet.* 90: 835-840.
- 村井三郎 (1962) 邦産ハンノキ属の植物分類・地理学的研究 (第 I 報) 高木性樹種の比較研究. 林業試験場研究報告141: 141-166.
- 村井三郎 (1963) 邦産ハンノキ属の植物分類・地理学的研究 (第 II 報) 低木性樹種を含めた全樹種の比較研究. 林業試験場研究報告154: 21-72.
- 村井三郎 (1964) 邦産ハンノキ属の植物分類・地理学的研究 (第 III 報) 世界全種の分類および各節の分布. 林業試験場研究報告171: 1-107.
- Na'iem M, Tsumura Y, Uchida K, Nakamura T, Shimizu S, Ohba K (1989) Inheritance of isozyme variants of megagametophyte in Japanese red pine. *J. Jpn. For. Soc.* 71: 425-434.
- Na'iem M, Tsumura Y, Uchida K, Nakamura T, Ohba K (1991) Allozyme variation in Japanese red pine trees selected from natural forests. *J. Jpn. For. Soc.* 73: 448-452.
- 名塚史雄 (1996) 栃木県今市市・鹿沼市における絶滅危惧植物サクラバハンノキの分布. 栃木県立博物館研究紀要13: 109-114.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- 日本自然保護協会 (1996) 群落レッドデータブック. pp280-281.
- 小川みふゆ・福嶋 司 (1996) 奥日光のオオシラビソ林におけるシウリザクラの根萌芽および実生の動態. 日本林学会誌78: 195-200.
- 大庭喜八郎・勝田 柁 (1991) 林木育種学. 文永堂出版, 東京.
- 大庭喜八郎 (1996) 繁殖様式, 森林の百科事典 (太田猛彦ほか著), 丸善株式会社, 東京.
- Ohkubo T, Kaji M, Hamaya T (1988) Structure of primary Japanese beech (*Fagus japonica* Maxim.) forests in the Chichibu Mountains central Japan, with special reference to regeneration processes. *Ecological Research* 3: 101-116.
- 大久保達弘・丹羽 玲・梶 幹男・濱谷稔夫 (1989) 秩父山地イヌブナ (*Fagus japonica* Maxim.) 天然林における堅果落下量と実生の消長. 日本生態学会誌39: 17-26.
- 大西郁夫 (1990) 日本海西部沿岸地域の更新世中期以降の植生変化. 第四紀研究29: 223-234.
- Ornstein L (1964) Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121: 321-456.
- Parker KC, Hamrick JL, Parker AJ, Nason JD (2001) Fine-scale genetic structure in *Pinus clausa* (Pinaceae) populations: effects of disturbance history. *Heredity* 87: 99-113.
- Quenouille MH (1952) *Associated Measurements*. Academic Press, New York.
- 林木育種センター (2002) <http://www.nftbc.affrc.go.jp/html/genebank/seikal.htm>

- 林野庁研究普及課 (1981) 広葉樹林とその施業. 地球社, 東京.
- 酒井暁子 (1997) 高木性樹木における萌芽の生態学的意味—生活史戦略としての萌芽性—. 種生物学研究21: 1-12.
- Shapcott A (1995). The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum*. Heredity 74: 28-38.
- Shiraishi S, Kaminaka H, Ohya N. (1987) Genetic variation and differentiation recognized at two allozyme loci in Hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). Jpn. For. Soc. 69: 88-93.
- Sokal RR, Oden NL (1978a) Spatial autocorrelation in biology. 1. Methodology. Biol. J. Linn. Soc. 10: 199-228.
- Sokal RR, Oden NL (1978b) Spatial autocorrelation in biology. 2. Some biological implication and four applications of evolutionary and ecological interest. Biol. J. Linn. Soc. 10: 229-249.
- Sokal RR, Menozzi P (1982) Spatial autocorrelation of HLA frequencies in Europe support demic diffusion of early farmers. Am. Nat. 119: 1-17.
- Sokal RR, Wartenberg DE (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. Genetics 105: 219-237.
- 染郷正孝 (1985) ハンノキ植物の細胞遺伝 (樹木進化の一断面). 林木育種協会, 東京.
- Surles SE, Srnold J, Schnabel A, Hamrick JL, Bongarten BC (1990) Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. Theor. Appl. Genet. 80: 49-56.
- Suyama Y, Tsumura Y, Ohba K (1992) Inheritance of isozyme variants and allozyme diversity of *Abies mariesii* in the three isolated natural forests. J. Jpn. For. Soc. 74: 65-73.
- Suyama Y, Tsumura Y, Ohba K (1997) A cline of allozyme variation in *Abies mariesii*. J. Plant Res. 110: 219-226.
- Takahashi M (2000) Program of spatial autocorrelation for windows 95/98. Delphi type version 1.0.0.
- Takahashi M, Mukouda M, Koono K (2000) Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. Heredity 84: 103-115.
- 高橋 誠 (2002) 遺伝マーカーを用いた森林樹木の集団内遺伝構造—ブナ林の遺伝構造とその解析のための空間統計学. 統計数理研究所共同研究レポート154: 1-14.
- Tani N, Tomaru N, Araki M, Ohba K (1996) Genetic diversity and differentiation in populations of Japanese stone pine (*Pinus pumila*) in Japan. Can. J. For. Res. 26: 1454-1462.
- 谷本丈夫 (1990) 広葉樹施業の生態学. 創文, 東京.
- Tomaru N, Tsumura Y, Ohba K (1994) Genetic variation and population differentiation in natural population of *Cryptomeria japonica*. Plant Species Biol. 9: 191-199.
- 辻誠一郎・鈴木 茂 (1977) 九十九里平野北部の沖積世干潟層の花粉分析的研究. 第四紀研究16: 1-12.
- 塚田松雄 (1981) 過去一万二千年間—日本の植生変遷史—II 新しい花粉帯. 日生態会誌31: 201-215.
- Tsumura Y, Ohba K (1992) Allozyme variation of five natural populations of *Cryptomeria japonica* in western Japan. Jpn. J. Genet. 67: 299-308.

- Tsumura Y, Ohba K (1993) Genetic structure of geographical marginal populations of *Cryptomeria japonica*. Can. J. For. Res. 23: 859-863.
- 津村義彦・戸丸信弘・陶山佳久・モハマド＝ナイム・大庭喜八郎 (1990) アイソザイム実験法. 筑波大学農林技術センター演習林報告 6 : 63-95.
- Turner ME, Stephens JC, Anderson W (1982) Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 203-207.
- Uchida K, Tsumura Y, Ohba K (1991) Inheritance of isozyme variants in leaf tissues of Hinoki, *Chamaecyparis obtusa*, and allozyme diversity of two natural forests. Japan. J. Breed. 41: 11-24.
- 鷺谷いづみ・矢原徹一 (1996) 保全生態学入門 遺伝子から景観まで. 文一総合出版, 東京.
- 渡邊定元 (1970) 北海道天然生林のサクセッションのパターンについて I. 北方林業261: 349-356.
- 渡邊定元 (1994) 樹木社会学. 東京大学出版, 東京.
- Wetzel G (1927) Chromosomenzahlen bei den Fagales. Ber. Deutsch. Bot. Ges. 45: 251-252.
- Woods JH, Blake GM, Allendorf FW (1983) Amount and distribution of isozyme variation in ponderosa pine from eastern Montana. Silvae Genet. 32: 151-157.
- Woodworth RH (1929) Cytological studies in the Betulaceae. I. Betula. Bot. Gaz. 87: 331-363.
- Workman PL, Niswander JD (1970) Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. Am. J. Hum. Genet. 22: 24-49.
- Wright S (1951) The genetical structure of population. Ann. Eugen. 15: 323-354.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. Evolution 19: 395-420.
- 矢原徹一 (1988) 酵素多型を用いた高等植物の進化学的研究. 種生物学研究12: 26-55.
- 矢原徹一 (1994) “絶滅” についての生物学的理解を深めるために. 科学64: 611-616.