

## 分子生態学的アプローチによる亜熱帯照葉樹林の森林更新プロセスの解明

中川昌人（総合地球環境学研究所・研究部）

### 【研究目的】

・本研究では亜熱帯性照葉樹林の保全に向けた基礎的データの収集を第一の目的として、この森林を構成する代表的な樹種の一つであるオキナワウラジロガシ (*Quercus miyagii* Koidz.) を対象とした集団構造の解析を分子生態学的アプローチにより行った。

### 【方法】

- ・調査・解析は西表島の2つの集団で行った。2集団はそれぞれ原生林、二次林として成立しており、約0.4haの調査プロットを設け、そこに分布する各個体のサイズ、位置を記録し、解析の対象とした。
- ・マイクロサテライトマーカー9遺伝子座を分子遺伝マーカーとして解析を行った。

### 【結果】

- ・集団内の個体サイズの分布からは、2集団いずれにおいても新たな個体の補充が継続的に生じていることが示された。
- ・2集団は同程度の遺伝的多様性を保持していたが、血縁構造は大きく異なることが明らかになった。原生林の集団では近縁個体のはっきりとした空間的な集合は認められなかったが、二次林の集団では10m程度の範囲での明瞭な構造を示した。
- ・実生個体を用いた親子推定の結果、繁殖において花粉は30~40mの範囲を移動し、種子は10~20m散布されることが示されたが、希な長距離の散布も認められた。

### 【結論】

- ・原生林における集団で血縁構造が観察されなかったことは、花粉や種子の散布が二次林よりも広範囲で生じている可能性を示唆し、そのことによって遺伝的均一な集団として安定的に維持されていると考えられた。
- ・二次林における明瞭な血縁構造は人為的攪乱（択伐）が新たな個体の定着をもたらした結果であると考えられる。このような血縁構造は近縁個体間の繁殖を生じさせ、今後、遺伝的多様性の減少をもたらす要因となる可能性がある。

公益信託エスベック地球環境研究・技術基金  
平成18年度研究助成成果報告書

# 分子生態学的アプローチによる 亜熱帯照葉樹林の森林更新プロセスの解明

中川昌人

(総合地球環境学研究所・研究部)

## 1. 研究の背景

森林の保全は地球環境問題において最も重要な問題の一つとなっている。森林はそこに生育する植物、動物なども含め、相互に深く関連をもつ生態系として成立しているが、その基盤は光合成を行い物質循環の基礎を形成する植物種、特に、高木となる樹木（樹種）によって支えられている。したがって、森林生態系の維持・保全を考える上では、これらの樹木が個別の種としてどのように繁殖を行い、個体数や遺伝的多様性を維持しているかを理解することは非常に重要な側面であると考えられる。

南西諸島に成立する亜熱帯照葉樹林は、この地域に固有な多くの希少生物に対して生育環境を提供し、非常に多様性の高い森林として成立している。しかしながら、沖縄本島などでは森林破壊が進んでいることが以前から報告されており（山中 1979）、保全の必要性が極めて高い状況にある。これまでの研究としては、Kubota et al. (2005) が人為的な攪乱要因として森林伐採の影響を評価し、主要な構成種の一つであるイタジイ（オキナワジイ）の萌芽再生による回復の重要性を指摘し、森林の種組成が変化することも報告している。しかしながら、個別の樹種の集団維持のメカニズムに関しては、ほとんど明らかになっておらず、この地域の亜熱帯照葉樹林の保全に対しては基礎的データの蓄積が必要である。

オキナワウラジロガシ (*Quercus miyagii* Koidz.) は亜熱帯照葉樹林を構成する代表的な樹種の一つで、ブナ科カシ属アカガシ亜属に属し、奄美以南の南西諸島に固有分布している。繁殖に関しては、花粉の送受粉は風によって媒介される一方で、大きな堅果（ドングリ）をもち、重力散布されると考えられる。しかし、堅果は他の動物種（リュウキュウイノシシ、クマネズミなど）の餌、栄養源となるという生態的役割も果たしており、その過程で二次的に動物によって散布される可能性もある。しかしながら、花粉や種子がどの程度の範囲に移動し、新たな個体の定着に伴って集団内の遺伝的多様性の維持や遺伝構造の形成に寄与しているかほとんど明らかにされていない。他方で、この樹種に関しては近縁なカシ属の種で DNA 分子遺伝マーカーの一つのマイクロサテライトマーカーが多く開発されており、これらを用いることで容易に精度の高い情報が得られるという利点があり、亜熱帯照葉樹林を構成する樹種の集団維持のメカニズムの解明に向けた研究蓄積の最初の段階として好適な研究材料であると考えられる。

本研究では、南西諸島の最西端に位置する西表島の原生林を対象として、分子生態学的アプローチによりオキナワウラジロガシ集団の遺伝構造の解析を行い、この樹種の集団の維持メカニズムを明らかにすることを目的とする。同時に、島内の人為的な攪乱を受けた二次林との比較を

行い、人間活動が集団の維持メカニズムに与える影響を明らかにする。

## 2. 材料と方法

### ○野外調査

西表島島内の2つ集団（集団 A、B）を対象とした調査を行った。集団 A は相良川沿いに位置し、天然林として成立している。これに対して、集団 B は仲間川沿いの大富林道周辺の二次林として成立しており、約 30 年前に択抜が行われている。集団の成立する地形などを考慮し、集団 A では 50m x 80m、集団 B では 70m x 60m の調査プロットを設け、その範囲内の胸高直径 (DBH) 0cm 以上（樹高約 1.3m 以上）の個体を対象として位置、胸高直径を記録した。また、大富集団に関しては、後述する実生の解析の精度を上げるために、プロット周辺から DBH>10cm の個体も追加で含め記録を行った。同時に、分子遺伝マーカーによる解析のための葉サンプル（1, 2 枚程度）を採集した。

また、集団 B では、実生個体を集中的に採集するプロット（5m x 5m）を設け、各実生から葉を 1 枚採集し、同様に DNA 解析用のサンプルとした。

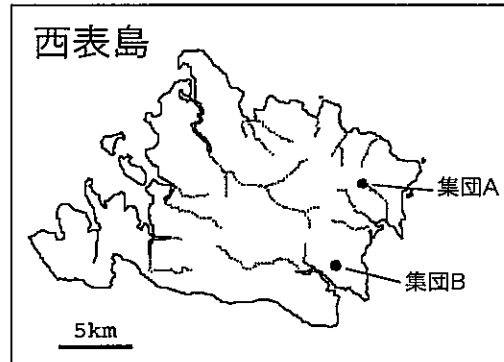


図 1：本研究での調査地



図 2：調査集団の様子。集団 A（左）、集団 B（右）

### ○分子遺伝マーカーを用いた実験

分子遺伝マーカーとしてマイクロサテライトマーカーを用いた解析を行った。葉サンプルから全 DNA を CTAB 法により抽出し、カシ属の他種でのプライマーを用いて PCR 反応により増幅を行った。安定した PCR 増幅が確認された場合には、蛍光標識したプライマーを用いてオートシーケンサーによる各個体の遺伝子型の決定を行った。

### ○データ解析

- ・ 遺伝的多様性の評価：集団の遺伝的多様性を平均対立遺伝子数、平均ヘテロ接合度によって定量化を行い比較を行った。
- ・ 血縁構造の解析：プロット内の個体の遺伝子型データ、位置情報から近縁な個体の集合がみられるかどうかを空間自己相関解析によって検定を行い、その範囲を特定した。
- ・ 実生の親推定：実生個体については、それぞれの遺伝的組成を基に、親個体を推定した。両者の位置関係から花粉・種子の散布が行われる範囲を明らかにし、空間自己相関解析によって得られた結果との整合性を評価した。

### 3, 結果

#### 1, 集団の構造

集団 A、B それぞれのプロットには 87 個体、128 個体の分布が確認された (集団 B の例; 図 3)。個体のサイズ (DBH) の分布をみると、いずれにおいてもより小さな個体が多く、大型の個体は少なくなる傾向が見られた (集団 B の例; 図 4)。

個体サイズは実生の発芽からの時間を反映していると考えられ、小型の個体が集団内で多くの割合を占めていることはいずれの集団においても新たな個体の補充が連続的に生じていることを示しており、少なくとも集団 B が二次林として成立する際の伐採の影響は個体の補充という面では明確に認められなかった。

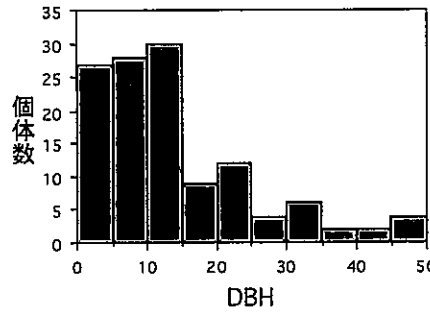


図 4: 集団 B の個体のサイズ分布。

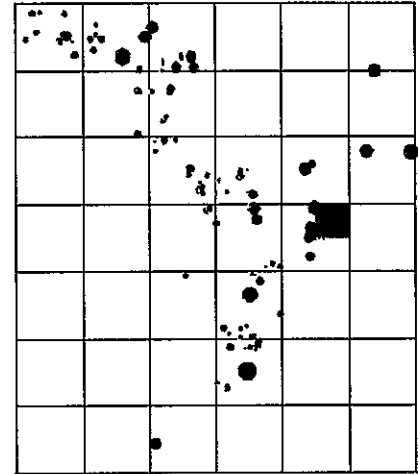


図 3: 集団 B のプロット内の個体分布。  
円の大きさは個体サイズを表し、林冠木 (DBH>10cm) を黒丸、稚樹 (DBH<10cm) を赤丸、実生プロットの位置を青枠で示す。

#### 2, 遺伝的多様性

これまでのカシ属での研究をもとに、オキナワウラジロガシを対象に 15 遺伝子座のプライマーでテストを行った結果、表 1 にある 9 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーで安定した PCR 増幅が確認され、利用可能であった。

全体での対立遺伝子数 (A) の平均は 6.89 で、集団間で比較を行うと、集団 A で 6.33、集団 B で 6.25 となり、ほぼ同程度の値を示した。同様に、平均ヘテロ接合度においても、集団 A が 0.472、集団 B で 0.462 となり、明瞭な差は見られず、天然林 (集団 A)、二次林 (集団 B) いずれも同程度の遺伝的多様性を保持していると考えられる。

表 1: 本研究で用いたマイクロサテライトマーカー。

遺伝子座	繰り返し配列	T <sub>A</sub>	A	Size range	Ref.
QM63-2M3	(TG) <sub>5</sub>	50	3	153-166	1
QM57-3M	(GCC) <sub>5</sub>	55	5	235-247	1
QM58TGT	(CAA) <sub>11</sub>	50	4	181-202	1
QM69-2M1	(TGG) <sub>4</sub> (CGG)(TGG) <sub>2</sub>	50	7	217-238	1
QM67-3M1	(GAA) <sub>2</sub> (GGC) <sub>4</sub> (GGT) <sub>4</sub> (GCC)(GGA)	55	3	157-166	1
ssrQpZAG9	(AG) <sub>12</sub>	52	12	238-276	2
ssrQpZAG15	(AG) <sub>23</sub>	52	5	108-122	2
ssrQpZAG110	(AG) <sub>15</sub>	52	9	206-232	2
ssrQrZAG7	(TC) <sub>17</sub>	50	14	111-143	3

1, Isagi and Suhandono (1997). 2, Steinkellner et al. (1997). 3, Kampfer et al. (1998)

#### 3, 血縁構造の解析

各個体の遺伝子型、位置情報をもとに空間自己相関解析を行った。ここでは、個体間の血縁度を Louislie (1995)の方法によって求め、個体間の距離に基づいて 6 つにクラス分けし (0~5m、~10 m、~20 m、~30 m、~50 m、~70 m、~100m)、それぞれ平均値を求めた (図 5)。平均値の有意性を検定するために、ランダムイゼーションテストによって 95%信頼区間を求め、観察値との比較を行った。

その結果、2 集団間で明瞭な血縁構造の違いが認められた。集団 A では、10m、20m の距離クラスで有意な血縁個体の集合が認められたが、最も短いクラスでの有意性は無く、はっきりとした血縁個体の集合は認められなかった。他方で、集団 B では、5m のクラスで個体間の血縁度は有意に高く (P<0.05)、10m のクラスでも同様であった。このことは集団 B が 10m 程度の範囲に血縁個体が集合する明瞭な空間遺伝構造をも

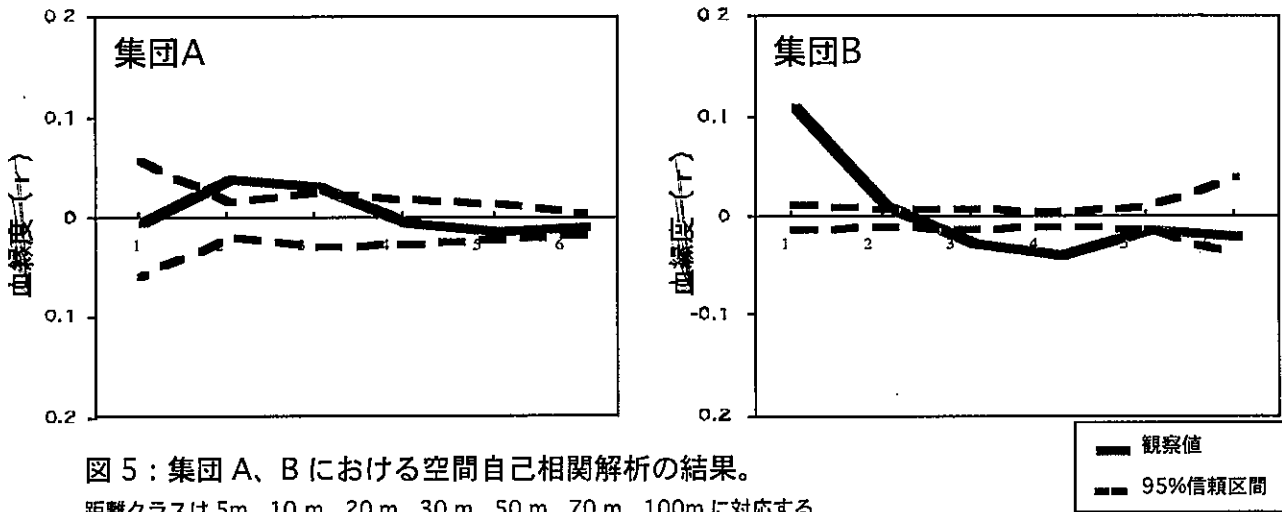


図 5 : 集団 A、B における空間自己相関解析の結果。

距離クラスは 5m、10 m、20 m、30 m、50 m、70 m、100m に対応する

つことを意味する。

さらに比較を行うと、集団 B においても DBH が 15cm 以上の個体のみを含めて同様の解析を行うと明瞭な遺伝構造は観察されなかった (図 6)。このことは、集団 B でみられた空間遺伝構造がより小さな個体の分布によって形成されていることを示している。

#### 4. 実生の親子推定

集団 B の実生プロットから 65 個体のサンプリングを行い、マイクロサテライトマーカー 9 遺伝子座での遺伝子型を決定した。集団 B のプロットに含まれる胸高直径 10cm 以上の成木を親候補として、尤度 (LOD 値) による親子関係の推定を行った。

その結果、35 個体の両親について信頼度の高い推定を行うことが出来た。親子間の距離は 0~70m の範囲にあるが、両親をより近いものと遠いもので区別した場合、前者は 0~10m、後者は 30~40m で最も多く見られた (図 7)。植物の繁殖においては花粉親、種子親の 2つが区別されるが、オキナワウラジロガシは大きな果実 (種子) をもつため、より近い親が種子親として想定される。このことから種子の散布は 10~20m の

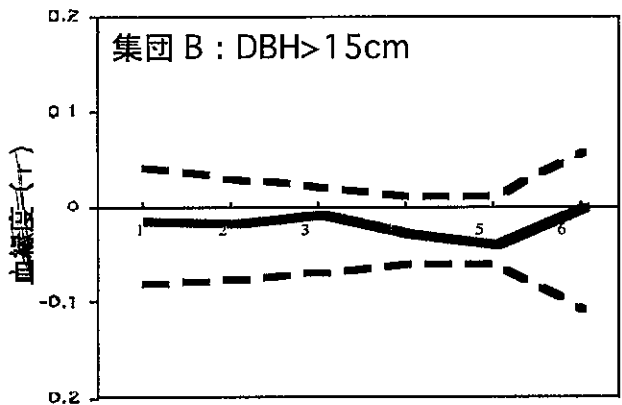


図 6 : 集団 B の DBH>15cm の個体に対する空間自己相関解析の結果。

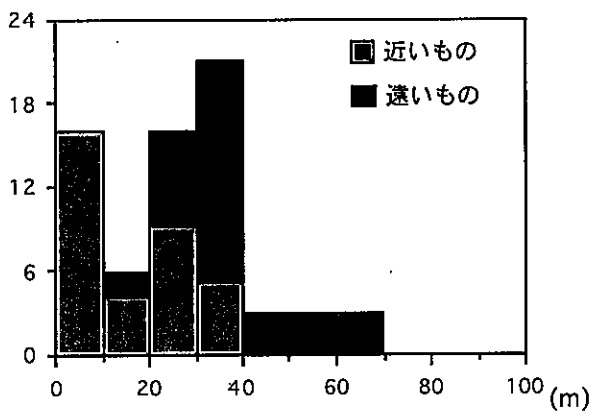


図 7 : 推定された親子間距離の頻度分布。

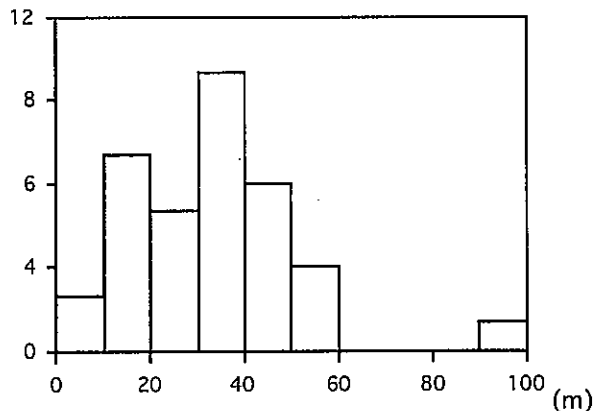


図 8 : 推定された両親間距離の頻度分布。

範囲で行われると推定できる。しかしながら、一定数の実生が 20m 以上の比較的長距離の種子散布によっても成立していた。また、両親間の距離は花粉の移動距離を示すと考えられるが、種子散布よりも長く、30~40m、時に 100m に到達していた。

#### 4. 考察

##### 1, オキナワウラジロガシ集団における花粉・種子の散布

マイクロサテライトマーカーによる実生の親子推定の結果、オキナワウラジロガシにおける花粉・種子の散布範囲を定量的に評価することが出来た。花粉は主に30~40mの範囲で散布され、種子（堅果）の場合は10~20m程度であった。集団Bでは比較的多数の個体が生育しており、近接した個体間で繁殖が行われていることを示していると考えられる。しかしながら、種子散布に関しては30m程度に及ぶこともあり、種子の散布が重力のみ（枝からの落下）によるとは考えにくい。このことは、種子散布が動物によって二次的に行われている、もしくは、台風など極端な物理的な力によってもなされている可能性を示唆している。

##### 2, 原生林におけるオキナワウラジロガシの集団維持・更新メカニズム

一般に、花粉・種子の散布の範囲が制限されている場合、集団内に血縁構造が生じる考えられている（Hamrick and Nason 1996）。しかしながら、オキナワウラジロガシの原生林の集団（集団A）では明瞭な遺伝構造は見られず、花粉・種子の散布距離から予測される結果と大きく異なる。このことは原生林では二次林よりも広い範囲で花粉や種子の移動が生じている可能性を示唆し、より小さな個体も含め全体として遺伝的に均一な集団として成立している。言い換えれば、原生林では限られた面積に対しても、周辺から多くの種子、花粉の移動が生じており、その中で個体数、遺伝的多様性を安定的に保持していると考えられる。

##### 3, 集団の空間・遺伝構造に対する人為的攪乱（森林伐採・択抜）の影響

上記に対して、二次林として成立している集団Bにおいては明瞭な血縁構造が見られた。特に、血縁構造はDBH>15cmの大きな個体間では見られず、明瞭な構造はより小さな個体によって形成されていることが明らかとなった（図7）。これらの小さな個体は伐採後の新たに定着したものと考えられ、伐採によって一時期に実生の定着が促進された結果であると考えられる。特に、近縁個体の集合の範囲は種子散布の範囲と一致しており、種子散布が制限されていることも空間構造をもたらす重要な要因であると考えられる。これらの結果は人為的攪乱の影響は集団内遺伝構造の形成に強く結びついていることを示すものである。同様の結果はこれまでに温帯性の樹種で示されているものの（例えば、Takahashi et al. 2000 ; Miyamoto et al. 2003）、本研究ではその様な状況を亜熱帯照葉樹林の樹種で明らかにすることが出来た。

一方で、このような集団内の血縁構造の形成はオキナワウラジロガシや他の亜熱帯性照葉樹林の保全を考える上で重要な結果でもある。特に、血縁構造の形成は近縁個体間での繁殖の可能性を高める効果をもち、近親交配を通じて遺伝的多様性の消失に結びつく可能性が指摘されている（矢原・鷲谷 1996）。もちろん、本研究では二次林における遺伝的多様度の減少を認めることが出来なかったが、今後、長期間の森林の維持を考えた場合には、遺伝的劣化など遺伝的要因が潜在的な脅威となる可能性を示唆している。特に、森林が分断化した場合などより極端な状況も想定され、他の亜熱帯性照葉樹林の樹種にも関しても比較研究を行い、森林保全する影響を解明す

る必要がある。

## 5, 参考文献

- Hamrick JL, Nason JD (1996) Consequence of dispersal in plants. In: Rhodes OEJ, Chesser RK, Smith MH (eds) Population dynamics in ecological space and time. Chicago University Press, Chicago. Pp203-236.
- Isagi Y, Suhandono S (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci from *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6: 897-899.
- Kampfer S, Lexer C, Glössl J, Steinkeller H (1998) Characterization of (GA)<sub>n</sub> microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas* 129: 183-186.
- Kubota Y, Katsuda K, Kikuzawa K (2005) Secondary succession and effects of clear logging on diversity in the subtropical forests on Okinawa Island, southern Japan. *Biodiversity and Conservation* 14: 879-901.
- Miyamoto N, Karamoto N, Takahashi M (2003) Ecological and genetic effects of cutting in an *Alnus trabeculosa* Hand.-Mazz. (Betulaceae) population. *Heredity* 91: 331-336.
- Steinkellner H, Lexer C, Turetschek E, Glössl J (1997) Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>-microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant molecular Biology* 33: 1093-1096.
- Takahashi M, Mukouda M, Koono K (2000) Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. *Heredity* 84: 103-116.
- 山中 二男 (1979) 『日本の森林植生【補訂版】』築地書館. 東京.

## 6, 成果公表

中川昌人・大川智史・内貴章世・木本行俊「西表島におけるオキナワウラジロガシ集団の遺伝子流動と遺伝構造」日本植物学会第71回大会、東京理科大学、野田市、2007年9月7日