

富山県における地域性種苗の生産に向けた ヒメヤシャブシの遺伝的分化と繁殖特性の解明

斎藤 真己・長谷川 幹夫

Local genetic differentiation of *Alnus pendula* and annual fluctuation of its seed production
in Toyama Prefecture, Japan

Maki SAITO, Mikio HASEGAWA

富山県農林水産総合技術センター
森林研究所研究報告

No.9 平成29年3月31日 発行

Reprinted from

BULLETIN

OF

THE TOYAMA FORESTRY RESEARCH INSTITUTE

No.9 2017.3

富山県における地域性種苗の生産に向けた ヒメヤシャブシの遺伝的分化と繁殖特性の解明

斎藤 真己・長谷川 幹夫

Local genetic differentiation of *Alnus pendula* and annual fluctuation of its seed production
in Toyama Prefecture, Japan

Maki SAITO, Mikio HASEGAWA

富山県に自生しているヒメヤシャブシの集団間の遺伝的分化について把握するため、天然林10集団の葉緑体DNAのハプロタイプについて調査した結果、富山県東部の北アルプスの北端に位置する駒ヶ岳や僧ヶ岳（劔岳北方稜線）もしくは黒部川を境界にその東西で遺伝的に分化していた。このことから、富山県内であってもヒメヤシャブシの種苗配布区域は分ける必要があると考えられた。ヒメヤシャブシの地域性種苗の安定生産に向けて天然林の結実豊凶について調査した結果、その年変動は大きく同調性も認められた。しかしながら、種子の保存性は高かったため、地域性種苗の安定生産のためには葉緑体DNAなどの遺伝情報をもとに植栽地周辺の集団と同じハプロタイプを持つ集団を採種対象として特定した後、豊作年にできるだけ多くの種子を採取して、次回の豊作年まで貯蔵しつつ使用する方法が有効であると考えられた。

キーワード： 遺伝的分化, 結実豊凶, 種苗配布区域, ヒメヤシャブシ, 葉緑体ハプロタイプ

1. はじめに

ヒメヤシャブシ (*Alnus pendula* Matsum.) は、北海道・本州・四国に分布する落葉低木で、北陸地方では標高100mから1,600m程度まで自然分布している（高橋 1962）。この種は窒素固定細菌であるフランキアと共生し痩せ地でも旺盛な生育を示すことなどから、法面緑化や治山事業などで活用されている。しかしながら、これらの事業で使用される緑化植物の種苗は安価な外国産のものや産地不明のものが広く普及しているため（佐々木 2002）、最近になって既存集団への遺伝子攪乱や生態系への悪影響が危惧されるようになった（津村・岩田 2003）。例えば、斎藤ら（2009）は、同じように緑化木として活用されているケヤマハンノキについて、葉緑体DNAの分析結果から富山県の高標高域で植栽されたのり面や治山施工地の個体と天然個体は異なる系統（ハプロタイプ）であることを明らかにし、このまま放置すれば地域固有の遺伝子組成が失われる危険性があると報告した。

その種が持つ遺伝的な分化は生態学的特性及び集団の歴史的な変遷に密接に関係しており（津村・岩田 2003）、それぞれの地域の環境条件に適応した遺伝的固有性を意味する（金指

2007）。そのため、植栽や播種などを行う際にはできるだけその遺伝的構造を攪乱しないように配慮するのが望ましい（日本緑化工学会 2002）。種内の遺伝的分化を把握するには葉緑体DNAの塩基配列の差が指標としてよく用いられている（Demesure et al. 1996, Ferris et al. 1998, Okaura and Harada 2002）。一般的に、被子植物の葉緑体DNAは母系遺伝することから、それは種子親の系統を表しており、その差を比較調査することで遺伝的分化の程度などが明らかとなる（津村 2001）。

そこで、本研究では葉緑体DNAを指標に用いて富山県におけるヒメヤシャブシ天然林の集団間の遺伝的分化について調査を行った。また、ヒメヤシャブシの安定生産に向けて天然林の結実豊凶の周期や種子の発芽率・保存性についても調査を行った。

2. 材料および方法

2-1 材料

富山県内全域に分布するヒメヤシャブシの天然林10集団（標高130~1,180m）を対象とし、新葉や種子の採取、結実豊凶の調査を行った（図-1, 表-1）。ヒメヤシャブシは法面緑化事業

などで使用されていることから、緑化施工地やその周辺は調査から除外した。

新葉の採取は、1集団につき5~6個体から行い、個体間で2m程度の間隔を空けた。

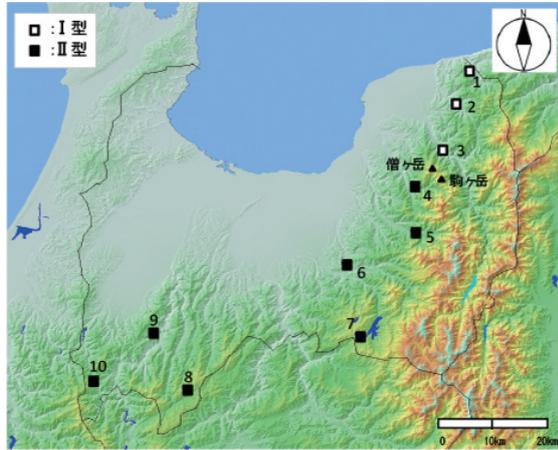


図-1 富山県におけるヒメヤシャブシ天然林の葉緑体DNAのハプロタイプによる分類 (図上の数字は表-1の集団番号に対応する。)

表-1 ヒメヤシャブシ10集団の標高と葉緑体DNAのハプロタイプ

集団番号	調査地	標高 (m)	分析個体数	ハプロタイプ毎の個体数	
				I型	II型
1	境川	130	5	5	0
2	朝日	220	6	6	0
3	宇奈月	480	6	6	0
4	片貝	550	5	0	5
5	馬場島	680	5	0	5
6	芦峠	670	6	0	6
7	有峰**	1,180	6	0	6
8	利賀**	990	6	0	6
9	平*	610	6	0	6
10	ブナオ峠*	790	5	0	5

(*は着果指数調査、**は発芽率調査を行った調査地を示す。)

2-2 葉緑体DNAのPCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析

地域性を識別するDNAマーカーを開発するため、富山県東部の「境川」、南東部の「有峰」、西部の「ブナオ峠」、南西部の「利賀」の4集団(各1個体)の新葉から全DNAを抽出(Isoplant II - ニッポンジーン社)した後、14セット(*trnK-trnK*, *trnT-trnF*, *rbcL*, *trnK*, *trnH-trnK*, *psbC-trnS*, *trnS-trnfM*, *trnS-trnT*, *rpoB*, *psbA*, *psbD*, *atpH-atpI*, 16S, *psaA*)の葉緑体DNAのユニバーサルプライマー(Demesure et al. 1995, Talbert et al. 1991, Tsumura et al. 1995, Tsumura et al. 1996)を用いてPCR増幅させた。増幅条件は、94℃3分の後、94℃30秒・60℃2分・72℃3分を35サイクル、72℃3分とした。得られたPCR産物を14種類(*Afa I*, *Alu I*,

Bam H I, *Dra I*, *Eco R I*, *Eco R V*, *Hae III*, *Hha I*, *Hinf I*, *Mbo I*, *Mbo II*, *Msp I*, *Taq I*, *Xsp I*)の制限酵素を用いて切断した後、エチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで電気泳動を行い、多型の検出を行った。その後、多型が得られたプライマーセットと制限酵素の組み合わせで全ての集団について同様の条件で調査した。

2-3 天然林の着果指数調査

ヒメヤシャブシの結実豊凶を把握するため、2011~2014年の10~11月に富山県東部の有峰及び県南西部の利賀・平・ブナオ峠の4集団(表-1)において、各20個体の果穂の量を目視によって4段階で指数化し(表-2)、集団毎に平均着果指数を算出した。また、着果指数(0~4)と実際の着果数は比例関係にあると仮定したうえで、集団における個体間の結実豊凶の同調性について把握するため、年間の種子生産量の変動係数を集団内の個体間の変動係数で除したMasting Index (MI) (八坂ら 2000)を算出した。

変動係数は統計ソフト「エクセル統計2010」を用いて算出した。

表-2 ヒメヤシャブシの着果状況の評価基準

着果指数	概要	評価
0	着生なし	凶作
1	わずかまたはごく一部に着生	不作
2	全体的に疎に着生	並作
3	全体的に密に着生	豊作

2-4 種子の保存性に関する調査

ヒメヤシャブシの種子の保存性について把握するため、2011年11月に有峰と利賀の天然集団それぞれ5個体から果穂を採取した後、自然乾燥させて種子を得た。それぞれの種子はシリカゲルの入った蓋付きのプラスチック容器に入れ、4℃の冷蔵庫で保存した。発芽試験は、橋詰(1987)に準じて行い、2012年3月に蒸留水を浸したろ紙に種子100粒を置床して、2,000 luxの連続照射、25℃に設定した人工気象器内で約50日間調査した。それぞれ3反復で試験を行った。その後、2013年3月と2014年3月に同じ種子を用いて同様の方法で発芽試験を行い、種子の保存性について調査した。

表-3 多型が検出された葉緑体DNAのプライマーとハプロタイプの断片長 (bp)

遺伝子座 / 制限酵素	プライマー	断片長(bp)	
		I 型	II 型
<i>trnK-trnK</i> / <i>Mbo</i> II	5'-GGGTTGCCCGGGACTCGAA-3' 5'-CAACGGTAGAGTACTCGGCTTTTA-3'	650, 500, 400, 250	1000, 550, 250
<i>trnS-trnfM</i> / <i>Dra</i> I	5'-GAGAGAGAGGGATTCTGAACC-3' 5'-CATAACCTTGAGGTCACGGG-3'	1000, 500	1500
<i>atpH-atpI</i> / <i>Afa</i> I	5'-TTGACCAACTCCAGGTCCAA-3' 5'-CCGCAGCTTATATAGCGAA-3'	800, 600, 100	800, 700
<i>psbC-trnS</i> / <i>Alu</i> I	5'-GGTCGTGACCAAGAAACCA-3' 5'-CGTTCGAATCCCTCTCTC-3'	700, 400, 300, 100	600, 400, 300, 150, 50

3. 結果

3-1 葉緑体DNAのハプロタイプによる分類

14セットのユニバーサルプライマーと14種類の制限酵素の組み合わせでDNAマーカーのスクリーニングを行った結果、4領域で多型が検出され(表-3)、2種類のハプロタイプが得られた(図-2)。次に、これら4領域のマーカーを用いて全ての天然集団について調査した結果、北アルプス稜線の北端に位置する駒ヶ岳(2002m)や僧ヶ岳(1855m)もしくは黒部川を境界に東側のI型と西側のII型の2つのハプロタイプに分かれていることが明らかになった(図-1)。また、2つのタイプが混在した集団は認められなかった(表-1)。

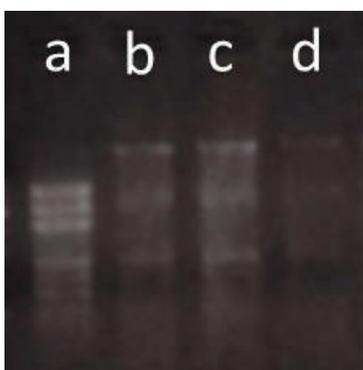


図-2 葉緑体DNAのバンドパターン (*trn K-trn K* / *Mbo* IIの組み合わせ)
a. 境川(I型), b. 有峰(II型),
c. 利賀(II型), d. ブナオ峠(II型)

3-2 天然林の着果状況

ヒメヤシャブシ天然林の2011~2014年の平均着果指数の推移を図-3に示した。各調査地共に年によって変動が認められ、利賀、平、ブナオ峠の平均着果指数は2011年と2013年が、1.1~1.8となり、2012年と2014年が0.1~0.8となった。有峰のそれは、4年間の調査で1.0を下回ることなく、他の調査地と比べて大きな変動は

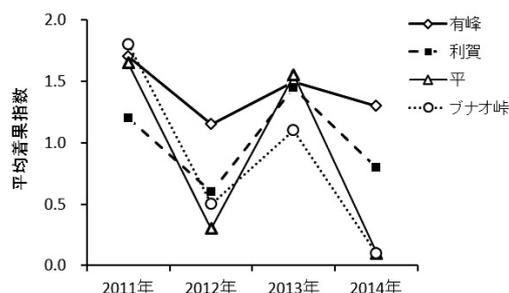


図-3 ヒメヤシャブシ天然林の着果指数の推移
認められなかったものの、他の調査地と同調して1年おきに増減を繰り返す傾向が認められた。

2011年の結果をもとに各調査地のMasting Index (MI)を算出した結果、平均すると2.03となり(表-4)、広葉樹20種の平均(MI=1.56)(八坂ら2000)を上回った。

表-4 種子生産の変動係数とMasting Index (MI)

調査地	個体間の 変動係数	年度間の 変動係数	Masting Index
有峰	0.27	0.17	0.63
利賀	0.51	0.38	0.75
平	0.29	0.90	3.10
ブナオ峠	0.23	0.84	3.65
平均			2.03

3-3 種子の保存性

冷蔵保存した種子の平均発芽率の年推移を表-5にまとめた。発芽率は3年目まで34%以上を維持していた。1年目(2012年)と3年目(2014年)で比較すると、有峰の発芽率の減少は4%で、利賀のそれは3.7%だった。このことから、保存期間が3年程度では発芽率の減少はわずかなことが明らかになった。

表-5 冷蔵保存した種子の発芽率の年推移

種子の 採取地	発芽率 (%)		
	2012年	2013年	2014年
有峰	44.3	41.0	40.3
利賀	38.3	36.0	34.6

4. 考察

最近の治山造林や緑化工などでは、生物多様性保全の観点からそれぞれの地域の環境に適した種苗の活用が求められるようになった（日本緑化工学会 2002, 吉丸 2004）。このことから、本研究では緑化事業でよく使用されているヒメヤシャブシを対象に、富山県内の天然林10カ所の葉緑体DNAのハプロタイプについて調査した結果、北アルプスの劔岳北方稜線もしくは黒部川を境界としてその東西で遺伝的に分化していた。種内における集団間の遺伝的分化は、山岳や大きな河川、海などの物理的な隔離などの影響で遺伝的交流が起きにくくなって引き起こされる（津村・岩田 2003）。ヒメヤシャブシも境界となっている劔岳北方稜線北端に位置する駒ヶ岳や僧ヶ岳は標高2,000m程度あることから、高標高の山脈、あるいは急流河川である黒部川による物理的な影響によって遺伝的分化が引き起こされたと推測された。

富山県のケヤマハンノキにおいては県内で広く植栽されたため、施工地への導入集団と天然性の集団では遺伝的に異なる系統（葉緑体ハプロタイプ）だった（斎藤ら 2009）。富山県ではヤシャブシ類の中ではオオバヤシャブシが主に導入されており、ヒメヤシャブシはほとんどないと考えられるため、本種の分化は上述のように自然の要因で引き起こされたと考えられた。

ヒメヤシャブシは風媒花であり種子も風散布型であるため遺伝子が拡散しやすい。そのため、法面緑化事業などで富山県外からの遺伝子の流入が続くと地域固有の遺伝子組成は失われ、種を維持するうえで重要な集団間の遺伝的多様性を歪める危険性が高い（佐々木 2002）。このことから、今後は地域の遺伝子組成を考慮した緑化事業を推進する必要がある。種苗の移動が容認される範囲はそれぞれの樹種の生態的特性によって異なり、厳密に定めるのは困難であるため、日本緑化工学会（2002）では暫定的に都道府県レベルの区分を提案した。しかしながら、本研究によってヒメヤシャブシの場合は富山県内でも北アルプスの北端あたりで東西に遺伝的な分化が認められたことから、種苗の配布区域を富山県内でも分ける必要があると考えられた。

ヒメヤシャブシの地域性種苗の安定生産に向

けて種子の結実豊凶について調査したところ、Masting index (MI) は2.03となった。MIはその値が大きい程、種子生産量の年間の変動が大きく個体間の同調性が高いことを示す。今回の結果は広葉樹20種で調査した中で2番目に高い数値だったアサダ (MI=2.10) とほぼ同程度の数値だったことから（八坂ら 2000）、ヒメヤシャブシの種子生産は年変動が大きく、かつ同調性も高いと考えられた。このことはヒメヤシャブシの種子を毎年、安定して採取するのは困難であることを意味する。しかしながら、その種子の保存性は高く、3年程度ではその発芽率が大きく低下することはなかった。従って、ヒメヤシャブシの地域性種苗の安定生産のためには、本研究によって明らかになった遺伝情報をもとに植栽地周辺の集団と同じハプロタイプを持つ集団を採種対象として特定した後、豊作年にできるだけ多くの種子を採取して、次の豊作年まで貯蔵しつつ使用する方法が有効であると考えられた。本種は県内の崩壊地や林道法面の随所に天然性の個体群が生育し、種子の採取も容易であることから、上述の方法で種子を採取・保存すれば地域性苗の育成は可能であろう。さらに根粒菌フランキアを活用することによって育成期間を短縮することも期待できる（斎藤 2015）。

遺伝的変異性を考慮した緑化への取り組みは世界的に見てもあまり例は多くないが、国内では三宅島で集団遺伝学的解析をもとに治山緑化が進められていることなどから（Iwata et al. 2005, 津村・岩田 2003）、今後、遺伝的多様性や集団間の遺伝的分化といった遺伝情報がより重視されるようになって考えられる。「生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言」（日本緑化工学会 2002）でも、遺伝情報は進化の長い歴史の過程で獲得されてきたかけがえのない自然界の遺産であり、遺伝子攪乱は遺伝子の学術的価値と資源的価値を消失させるものであることに配慮しなければならないとしている。

現状では、富山県も含めた多くの自治体で地域性種苗の生産・流通体制が整っていないため、まずは本研究のような遺伝情報をもとに生態系保全を考慮した緑化の指針づくりを進めていく必要があるだろう。

引用文献

- Demesure, B., Sodji, N. and Petitt, R. J. (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.*, 4: 129-131.
- Demesure, B., Comps, B. and Petitt, R. J. (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*, 50: 2515-2520.
- Ferris, C., King, R. A., Vainola, R. and Hewitt, M. (1998) Chloroplast DNA recognizes three refugial source of European oaks and suggests independent eastern and western immigrations to Finland. *Heredity*, 80: 584-593.
- 橋詰隼人 (1987) 法面緑化用木本・草本種子の発芽特性. *広葉樹研究*, 4: 75-83.
- Iwata, H., Kamijo, T., and Tsumura, Y. (2005) Genetic structure of *Miscanthus sinensis* ssp. *condensatus* (Poaceae) on Miyake Island: implications for revegetation of volcanically devastated sites. *Ecol. Res.*, 20: 233-238.
- 金指あや子 (2007) 遺伝的多様性の保全, 森林施業研究会編, 主張する森林施業論-22世紀を展望する森林管理-. 日本林業調査会, pp. 117-129.
- 日本緑化工学会 (2002) 生物多様性保全のための緑化植物の取り扱いに関する提言, 日本緑化工学会誌, 27(3): 481-491.
- Okaura, T. and Harada, K. (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity*, 88: 322-329.
- 斎藤真己 (2015) 根粒菌フランキアを活用したハンノキ属緑化木の短期育苗法. 富山県農林水産総合技術センター森林研究所研究レポート11: 1-6
- 斎藤真己・長谷川幹夫・中島春樹 (2009) 富山県におけるケヤマハンノキ天然林の遺伝的分化に基づく種苗配布区域の検討と地域性種苗の生産体制の安定化. *日本森林学会誌*, 91(3): 173-177.
- 佐々木寧 (2002) 法面緑化における外国産種子の侵入, 日本生態学会編, 外来種ハンドブック. 地人書館, pp. 212-213.
- 高橋啓二 (1962) 本州中部森林における垂直分布帯の研究-治山造林の立場から見た地域区分-. *林業試験場研究報告*, 142: 1-171.
- Talbert, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, 14: 1105-1109.
- Tsumura, Y., Yoshimura, K., Tomaru, N. and Ohba, K. (1995) Molecular phylogeny of conifers using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1222-1236.
- Tsumura, Y., Kawahara, T., Wickneswari, R. and Yoshimura, K. (1996) Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia using PCR-RFLP analysis of chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 22-29.
- 津村義彦 (2001) 集団遺伝学的知見から考えられる我が国の針葉樹の分布変遷. *植生史研究*, 10: 3-16.
- 津村義彦・岩田洋佳 (2003) 遺伝的変異性を考慮した緑化とは. *日本緑化工学会誌*, 28(4): 470-475.
- 八坂通泰・寺澤和彦・梅木 清・渡辺一郎・水井憲雄 (2000) 広葉樹20種の豊凶特性. 第110回日本林学会大会学術講演集: 191.
- 吉丸博志 (2004) 広葉樹の植林における遺伝子攪乱. *林業技術*, 748: 3-7.

Summary

To grasp local genetic differentiation of *Alnus pendula*, we investigated chloroplast DNA haplotypes at 10 natural forest sites in Toyama Prefecture, Japan. The haplotypes of *Alnus pendula* in the natural forest were classified into two types: those in east areas (Type I), and those in central and west areas (Type II). In afforestation industries, therefore, it will be necessary to take account of the haplotypes. With the aim of achieving stable production of *Alnus pendula* in local planting stocks, we examined the seed yield in the natural forest. Our results showed that year-to-year variations were large, making it difficult to harvest a stable level of seeds every year. However, because the seeds are highly preservable, it should be possible to cope with this problem by setting up seed-production stands based on genetic information, and then harvesting a large amount of seeds in high-yield years and storing them until the next high-yield year, in order to ensure stable production of *Alnus pendula* in local planting stocks.

Keywords: *Alnus pendula*, annual seed fluctuation, chloroplast DNA haplotype, genetic differentiation, seed transfer zones