

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24405034

研究課題名(和文) 東南アジア熱帯林の遺伝的保全のためのガイドラインの作成

研究課題名(英文) Establishment of genetic guideline for conservation of tropical forests in Southeast Asia

研究代表者

津村 義彦 (TSUMURA, Yoshihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：20353774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアの熱帯林を保全するために生態学的にも林業的にも重要なフタバガキ科について複数年にわたって交配様式(他殖率)や遺伝子流動(花粉の散布範囲)の調査を行った。フタバガキ科のうち重要な *Shorea acuminata*, *S. macroptera*などを調査対象種とした。得られた他殖率や遺伝子流動結果からこれらの保全のための繁殖単位を算出した。*Shorea*属の多く種が100ha以上の繁殖単位が必要であることが明らかになった。十分な遺伝的多様性を保持して持続的な択伐林業を行なうためには森林ごとに少なくとも100ha以上の健全な森林を多数維持する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We have investigated mating system and gene flow of dipterocarp species for multiple flowering year, which are forestry and ecologically important tree species in Southeast Asia. Among various dipterocarp species, we have studied *Shorea acuminata*, *S. macroptera* and so on. We have estimated the breeding unit size using the obtained data such as gene flow and mating system. Mostly *Shorea* species required 100 ha for breeding unit. To maintain high genetic diversity of tropical forest and conduct sustainable selective logging in this region, at least 100 ha of multiple forests should be maintained for each species.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：フタバガキ科 遺伝子流動 遺伝的保全 熱帯林 遺伝的多様性 択伐 持続的林業 東南アジア

1. 研究開始当初の背景

東南アジア熱帯林は遺伝子資源の宝庫であり生態系全体で地球上の全生物種の約 90% が存在し、種多様性が極めて高いと言われている。また熱帯の陸地面積は約 11% であるが、バイオマスの地上現存量は 46% と高い蓄積量があり、炭素のシンク機能が高いと考えられている。一方、先進国の森林蓄積は 10 年間で 2% 増加しているに対して、熱帯林の 9% 減少している。東南アジア各国の熱帯林では持続的林業経営のために、それぞれの国の基準のもとに択伐を行っている。しかし択伐は森林の材積をもとに行われることが多く、森林の特定割合が伐採されている。そのため択伐後の森林には種によっては十分な個体が残っていない所も多い。特に林業上有用な樹種は過度に伐採されることもあり、将来の森林では樹種組成が変化し持続的林業ができないところも現れる可能性が指摘されている。

東南アジア熱帯林は数年の間隔で一斉開花することが知られている。また、ほとんどの樹種の個体密度は一般的に低く、ヘクタールあたり数本以下のもが多いと言われている。これら熱帯の樹種のほとんどは動物（昆虫、鳥など）が花粉を運び交配が行われている。そのため個体密度が極端に減少すると、花粉媒介者が同種の個体にたどり着かず、正常な外交配（他殖）が行われない（Obayashi et al. 2002）。外から花粉の供給がない場合はそれぞれの個体は完全自家不和合性（自分自身の花粉では交配ができないこと）でない限り自殖をして種子を生産することになる。樹木の場合、自殖した種子は生育不良で、発芽率も低く、実生の生育も悪いことが知られている。特にフタバガキ科樹木では、これまでの研究で自殖種子は他殖種子に比べ軽いことが知られており（Naito et al. 2005）、自殖の発芽率が極端に低く（Naito et al. 2008）、自殖由来の実生の生残率が低いことが知られている（Konuma et al. 2000）。そのため自殖を防ぐためには、ある程度の成木個体密度を維持する必要がある。

近年、分子遺伝学の急速な発展により、DNA マーカーによる花粉や種子の動きを追跡できるようになってきた。DNA マーカーのなかでもマイクロサテライトマーカーは個体識別に特に有効で、人間でも肉親探しや犯罪捜査に用いられている。これはゲノム中に散在する単純繰り返し配列のことで、例えば、CTCTCTCTCTCT のような配列が A 個体では CT が 6 回繰り返しているが、B 個体では 10 回繰り返しているように、繰り返し数の違いによって個体を識別する方法である。これら繰り返し配列はゲノム中に数多く存在し、これらの領域を複数組み合わせることによって、正確に個体識別が可能となる。フタバガキ科樹種でも複数の樹種でマイクロサテライトマーカーがすでに開発されており、花粉や種子の動きを調べる遺伝子流動

の研究が行われている。そのため、特定のフタバガキ科樹種の優占する調査地で、花粉の動きや交配様式をマイクロサテライトマーカーで調査することによって種ごとの適切な個体密度の推定が可能となる。

2. 研究の目的

本研究では個体の位置と樹種の同定が行われている特定の調査地で遺伝子流動及び交配様式の調査を行う。フタバガキ科は数年の間隔で一斉開花を行う樹種であり、マレー半島では 2005 年に一斉開花が起っているが、その後は大規模な開花は起っていない。そのためここ数年で一斉開花が起る可能性が非常に高い。一斉開花が起ったら、調査地での開花状況を調査し、どの個体がどれくらいの期間にどれくらいの規模の開花をしたかを調査する。また結実した種子を母樹別に収集する。これにより開花規模と交配様式の関係を明らかにする。

調査地の開花可能なフタバガキ科樹種の全個体から DNA 抽出用のサンプルを採取し、マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型の決定を行う。これにより花粉親及び種子親を決定する情報として用いる。収集した母樹別の種子をマイクロサテライトマーカーで解析し、母樹別に他殖率を明らかにし、個体密度との他殖率を明らかにする。またそれぞれの種子の花粉親の特定を行い、花粉飛散の距離を推定する。一斉開花の規模も程度も、開花年によって異なることが知られている。そのため複数年の調査結果があるとさらに信頼性の高いデータを得ることができる。本研究グループでは 2001 年、2002 年、2005 年に一斉開花した際に、フタバガキ科樹木について母樹別に種子を収集している。これらの種子をマイクロサテライトマーカーで解析することにより、他殖率及び花粉飛散距離を求める。複数年のデータを用いて種ごとに持続的林業が可能な個体密度の推定を行う。

3. 研究の方法

(1) 調査地及び開花調査の準備

調査地はマレー半島の低地フタバガキ科林であるパソ森林保護区内に設置した 40ha プロットを対象として調査を行った。パソ 40ha プロットは遺伝子流動解析用として設置した調査地でフタバガキ科樹種 23 種のフタバガキ科樹木が生育している。この調査地では遺伝子流動解析用として胸高直径 30cm 以上のフタバガキ科樹種の個体を全てマップし種同定を行っているプロットである。一斉開花がここ数年で起る可能性があるため、開花した花の量を個体ごとに調査するためのフラワートラップの準備を行う。開花の兆候があった場合は、対象個体にすぐに設置できる体制を整えておいた。開花が始まれば対象種について開花の観測及び調査を行い、結実した種子の収集を行う。開花期間が 1 ヶ月以上も続き、種子の散布も長いため現地

の調査体制を整備しておいた。

(2) 研究材料の収集

パソ森林保護区 40ha プロットでは調査地内に比較的母樹数がある 5 種を研究対象とした (*Shorea leprosula*, *S. parvifolia*, *S. acuminata*, *S. maxwelliana*, *S. macroptera*)。これらの母樹から DNA 抽出用の材料を採取した。生育しているほとんどの個体の樹高が高いため根元から内樹皮を採取した。これらの母樹の DNA は採取済みであるが、一部、未採取の個体について DNA の抽出を行った。

(3) 交配様式と遺伝子流動の解析 (母樹の解析)

パソで収集した母樹の材料から DNA の抽出を行う。*S. leprosula*, *S. curtisii*, *N. heimii* ではマイクロサテライトマーカーが開発済みである (Ujino et al. 1998, Lee et al. 2004, Iwata et al. 2000)。マイクロサテライトマーカーは近縁種には適応可能であるため、現在開発されているマーカーでかなりのフタバガキ科樹種が分析可能である。これらのマーカーを用いて、採取した母樹の内、パソの *S. leprosula*, *S. parvifolia*, *S. acuminata*, *S. maxwelliana* について開発されているマーカーを用いて遺伝子型の決定を行った。*S. leprosula* についてはこれらの種でマイクロサテライトマーカーが開発されているので、開発されているマーカーを直接利用する。それら以外の 3 種については *S. leprosula*, *S. curtisii* などの近縁種で開発されているマーカーを応用し利用できるマーカーをスクリーニング後に用いる。どの種についてもほぼ花粉親が決定できる高い確率を持ったマーカーのセットで分析を行った。

(種子の解析)

すでに開花が起こった 2001 年、2002 年、2005 年に収集した種子の遺伝子型の解析を行った。いずれの種も 10 母樹程度の母樹から 50 粒以上の種子を収集してある。そのため 1 種で 10 母樹 × 50 種子 = 500 種子以上の分析を目標として行った。解析データから、母樹ごとの他殖率を算出し、他殖種子についてはそれぞれの花粉親の特定を行う。プロットの外から花粉流動を除いて、全ての花粉親の特定ができたもので、花粉散布曲線を推定した。

4. 研究成果

一斉開花が起こったのは 2015 年であったため、基本的にはこれまでの一斉開花が起こった 2001 年、2002 年、2005 年の種子や実生のサンプルから DNA を抽出し、遺伝子型解析を行った。2015 年にはいくつかの樹種について材料の採取を行ったが、研究期間内での遺伝子解析はできなかった。

フタバガキ科の *S. maxwelliana* の一斉開花での平均他殖率は 91.8%(2002 年)、86.1%(2005 年)となり、他のフタバガキ科樹種と同じく他殖が優占していた。それに 2002 年と 2005 年の開花個体密度はそれぞれ 1.925 tree/ha、2.675 tree/ha と異なっていたが、他殖率はほとんど変わらなかった。また、本調査地の *S. maxwelliana* は 2 回の一斉開花を通して遺伝的に多様な花粉を開花個体間で交換していることが分かった (pollen richness=3.799~4.897(2002 年)、3.241~4.586(2005 年)。遺伝子多様度=0.596~0.712(2002 年)、0.595~0.723(2005 年))。また、2005 年では近距離交配が多く、母樹間が遠いほど、各母樹が受け取る花粉プールの遺伝的組成は異なっていたが、2002 年ではそのような関係はみられなかった。

これらのことから、他種に比べてプロット内の成木数が多い本種は、一斉開花時の開花個体密度が変わっても高い他殖率を維持していることが分かった。また、2 回の一斉開花を通して遺伝的に多様な花粉を交換しているが、同種の開花規模によって花粉流動パターンは異なっていることが分かった。

S. acuminata については 2001 年、2002 年、2005 年の 3 回の一斉開花時の花粉流動をマイクロサテライトマーカーを用いた父性解析によって明らかにした。更に他殖率、交配様式と開花個体密度の関係、一斉開花の規模による違いについて、種内および種間で比較・検証することを目的とした。その結果、3 回の一斉開花にわたる *S. acuminata* の平均他殖率は 2001 年で 59.0%、2002 年で 59.0%、2005 年で 85.0%となり、他のフタバガキ科樹種と同じく他殖が優占していた。開花個体密度が 2002 年、2005 年で一定して高かった一方で、他殖率は 2005 年の方が高くなったことより、2002 年の開花イベントでは個体レベルでの開花強度が低かったことが示唆された。先行研究や本研究を通して、胸高直径がより大きな個体、及び開花規模と開花個体密度が個体の繁殖成功に大きく関わっていることが明らかになっている。また、その傾向は開花イベントごと、種ごとに変化する。本研究より、択伐予定エリアの *S. acuminata* の集団の森林の持続性に関する指標として、2005 年時程度の開花強度および開花個体密度を維持することが、他殖率の安定と任意交配による遺伝的多様性の安定性につながるという。

S. macroptera は 2002 年と 2005 年の平均他殖率はそれぞれ 70%と 56%であった。他殖種子が受け取った花粉親の平均数は 2002 年と 2005 年でそれぞれ 8.75 と 4.89 と大きな違いが見られた。平均花粉散布距離はそれぞれ 142.9m と 304.9m であった。開花率は *S. acuminata* と同様に 2002 年よりも 2005 年が高いが、他殖率や遺伝的多様性などは 2005 年で低くなるという、*S. acuminata* とは異なる結果であった。本来、開花率が高い年は他殖率及び種子が受け取る遺伝的多様性も高

くなるのが一般的である。しかし、*S. macroptera* はフタバガキ科の中で最初に開花する樹種として知られており、2002年の前年の2001年にも開花しているために、200年にはある程度の花粉媒介者が維持されていたために相対的に高い他殖率などが維持されたのではないかと推測される。

この研究で得られた結果をもとに遺伝的多様性を十分に保持できる Breeding Unit (繁殖単位 (面積)) を求めた。また樹種の開花年ごとに Breeding Unit Size を求めた。その結果、*Shorea* 属の多く種が 100ha 以上の Breeding Unit Size が必要であることが明らかになった。*S. maxwellina* では 130-200ha、*S. acuminata* では 200-266ha、*S. macroptera* では 122-133ha であった。既報の *S. leprosula* では 277-375ha で、*S. parvifolia* では 202-256ha であった。一方、極端に個体密度が高い *S. curtisii* では 5-6ha と小さな値となった。この *S. curtisii* を除くと、十分な遺伝的多様性を保持して持続的な林業を行なうためには森林ごとに少なくとも 100ha 以上の健全な森林を多数維持する必要がある。また一斉開花の際に開花がほぼ起こる胸高直径 60-80cm の個体を残して択伐を行う新たな択伐基準の策定が望まれる。

<引用文献>

Iwata, H., A. Konuma, and Y. Tsumura (2000) Development of microsatellite markers in the tropical tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology* 9:1684-1685

Konuma, A., Y. Tsumura C.-T. Lee S. L. Lee and T. Okuda (2000) Estimation of gene flow inferred from paternity analysis in tropical rain forest tree: *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). *Molecular Ecology* 9: 1843-1852

Lee, S. L., N. Tani, K. K. S. Ng and Y. Tsumura (2004) Isolation and characterization of 20 microsatellite loci for an important tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) and their applicability to *S. parvifolia*. *Molecular Ecology Note* 4: 222-225

Naito, Y., A. Konuma, H. Iwata, Y. Suyama, K. Seiwa, T. Okuda, S. L. Lee, Norwati M. and Y. Tsumura (2005) Selfing and inbreeding depression in seeds and seedlings of *Neobalanocarpus heimii*. (Dipterocarpaceae). *Journal of Plant Research* 118: 423-430

Naito, Y., M. Kanzaki, S. Numata, K.

Obayashi, A. Konuma, S. Nishimura, S. Ohta, Y. Tsumura, T. Okuda, Lee S. L. and N. Muhammad (2008) Size-related flowering and fecundity in the tropical canopy tree species, *Shorea acuminata* (Dipterocarpaceae) during two consecutive general flowerings. *Journal of Plant Research* 121:33-42

Obayashi, K., Y. Tsumura, T. Ihara-Ujino, K. Niiyama, H. Tanouchi, Y. Suyama, I. Washitani, C.-T. Lee, S. L. Lee and N. Muhammad (2002) Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. *International Journal of Plant Science* 163: 151-158.

Ujino, T., T. Kawahara, Y. Tsumura, T. Nagamitsu, Wickneswari R. and H. Yoshimaru (1998) Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Tani N., Y. Tsumura, K. ta Fukasawa, T. Kado, Y. Taguchi, S. L. Lee, C. T. Lee, N. Muhammad, K. Niiyama, T. Otani, T. Yagihashi, H. Tanouchi, A. Ripin, A. R. Kassim (2015) Mixed mating system are regulated by fecundity in *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) as revealed by comparison under different pollen limited conditions. *PLoS ONE* 10: e0123445 (査読有り)

Ohtani M., T. Kondo, N. Tani, S. Ueno, L. S. Lee, K. K. S. Ng, N. Muhammad, R. Finkeldey, M. Na'iem, S. Indrioko, K. Kamiya, K. Harada, B. Diway, E. Khoo, K. Kawamura, Y. Tsumura (2013) Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveals Pleistocene divergence and subsequent secondary contact of two genetic lineages of the tropical rainforest tree species *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae) in Southeast Asia. *Molecular Ecology* 22: 2264-2279 (査読有り)

Masuda S., N. Tani, S. Ueno, S. L. Lee, N. Muhammad, T. Kondo, S. Numata, Y. Tsumura (2013) Non-density dependent

pollen dispersal of *Shorea maxwelliana* (Dipterocarpaceae) revealed by a Bayesian mating model based on paternity analysis in two synchronized flowering seasons. PLoS ONE 8: e82039 (査読有り)

〔学会発表〕(計 9件)

谷尚樹・近藤俊明・Lee, Soon Leong・Ng, Chin Hong・Lee, Chai Ting・Norwati Muhammad・津村義彦・新山馨・星野大介・Abd Rahman Kassim (2016) フタバガキ科樹種における異なる遺伝的クラスターに属する両親間の交配による実生の高い生存力. 日本森林学会、日本大学 神奈川県藤沢市 2016年3月

Numata, S., T. Hosaka, M. Hashim, T. Yamada, N. Tani, Y. Tsumura, S. K. Lee, and N. Muhammad. Dipterocarp flora of Peninsular Malaysia: their floristic region and environmental correlates. 日本生態学会 宮城県仙台市 2016年3月

Widiyatno, M. Naiem, Jatmoko, S. Purnomo, T. Hosaka, S. Numata. The performance of offspring from different mother trees of *Shorea parvifolia* in Central Kalimantan, Indonesia. 日本熱帯生態学会 京都府京都市 2015年6月

森本彩夏、沼田真也、保坂哲朗、M. Hashim、佐竹暁子、谷尚樹、市栄智明、N. Alias, N. Z. Noor Azman. フタバガキ科樹木の繁殖フェノロジーは種によって応答する気象条件が異なるか? 日本森林学会 北海道札幌市 2015年3月

Widiyatno, A. Matsumoto, S. Numata, T. Hosaka, Y. Tsumura. The impact of harvesting rotation on the genetic diversity of *Shorea parvifolia* (Dipterocarpaceae) in central Kalimantan, Indonesia 日本生態学会 鹿児島県鹿児島市 2015年3月

Morimoto, A., S. Numata, T. Hosaka, M. Hashim, N. Tani, A. Satake, T. Ichie, N. Alias, N. Z. Noor Azman. Interspecific comparison in reproductive phenology of dipterocarps using long-term flowering and fruiting data at FRIM. ATBC2014, Cairns Australia. July 2014.

Numata, S., T. Hosaka, N. Amemiya, M. Hashim, T. Yamada, N. Tani, Y. Tsumura, S. K. Lee, and N. Muhammad. Dipterocarp flora of Peninsular Malaysia: A preliminary analysis. ATBC2014, Cairns Australia. July 2014.

Widiyatno, S. Numata, T. Hosaka, Budiadi, E. Priyo Vegetation succession after sifting cultivation in central Kalimantan, Indonesia 日本生態学会 広島県広島市 2014年3月

Khairul A. A. R., N. Tani, G. Pakkad, S. Ueno, S. L. Lee, N. Muhammad, Y. Tsumura (2013) The Study of Gene Flow and Genetic Diversity in *Shorea macroptera* (Dipterocarpaceae) 日本森林学会、岩手大学 岩手県盛岡市 2013年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津村 義彦 (TSUMURA, Yoshihiko)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 20353774

(2) 研究分担者

沼田 真也 (NUMATA, Shinya)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号: 20391138

(3) 研究分担者

谷 尚樹 (TANI, Naoki)

独立行政法人国際農林水産業研究センター・林業領域・主任研究員

研究者番号: 90343798

(4) 研究分担者

内山 憲太郎 (UCHIYAMA, Kentaro)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・研究員

研究者番号: 40501937