

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292087

研究課題名(和文)ブナ林の断片化がブナ集団の遺伝的多様性と繁殖に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of habitat fragmentation on genetic diversity and reproduction in *Fagus crenata* populations

研究代表者

戸丸 信弘 (TOMARU, Nobuhiro)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50241774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：生育地の分断化は集団の孤立と集団サイズの減少をもたらす生物集団の存続を大きく脅かすと考えられている。ブナは日本の冷温帯落葉広葉樹林(ブナ林)の優占種であり、これまでの人間活動によってブナ林は分断化されてきた。本研究はブナ林の断片化がブナ集団の遺伝的多様性と繁殖に及ぼす影響を調べた。大集団と比べて小集団では集団内の遺伝的多様性が低く、遺伝的分化が高く、近縁度が高かった。また、大集団と比べて小集団では、開花しても堅果が稔らない割合(不稔率)が高く、健全堅果の割合(結実率)が低く、発芽率が低かった。これらの結果は集団の孤立と集団サイズの減少がブナ集団の存続に負の影響を及ぼしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Habitat fragmentation poses a serious threat to populations through the effects caused by reduced population size and increased isolation. *Fagus crenata* is the dominant species in cool temperate deciduous broadleaved forests (beech forests) in Japan, which have been fragmented by historical human activities. We studied the effects of habitat fragmentation on genetic diversity and reproduction in *F. crenata* populations. The sampled small populations showed low genetic diversity within populations, high genetic differentiation, and a high level of inbreeding compared to the sampled large populations. The sterile rate from flowering to fruiting, the proportion of sound seeds, and the germination rate were higher, lower, and lower, respectively, for the small populations than for the large populations. These findings indicate that small population size and population isolation have adverse effects on the persistence of *F. crenata* populations.

研究分野：森林遺伝学

キーワード：ブナ 生育地の断片化 小集団 孤立 遺伝的多様性 近親交配 結実 絶滅リスク

1. 研究開始当初の背景

地球上の多くの場所において、食糧生産やその他の土地利用の需要増大により、森林の断片化が急速に進んでいる。森林の断片化により生物の生息地が狭くなり、孤立することは、生物多様性への深刻な脅威である (Millennium Ecosystem Assessment 2005)。理論的な研究によると (たとえば Frankham et al. 2002)、植物の生育地が分断し、集団が小さくなると、遺伝的浮動の効果が強くなり、集団内の遺伝的多様性が減少し、集団間の遺伝的分化が高まる。周囲の集団からの遺伝子流動は遺伝的浮動とは逆の効果をもつが、孤立した集団では遺伝子流動が減少するため、その効果が低下する。また、小集団ほど、直接的な交配相手の減少に加えて、遺伝的多様性の減少を通して間接的に近親交配が増加する。近親交配の頻度が高まるとさらに遺伝的多様性が減少する。短期的には、この近親交配により、繁殖量や生存率の低下など個体の適応度が低下し (近交弱勢)、個体数が減少して、絶滅リスクが高まる。長期的には、遺伝的変異の低下は、環境変動に対する進化的なポテンシャルを低下させるため、絶滅リスクが高まる。

樹木集団の既往研究では、上記の理論的予測に反して、生育地の分断が生じても遺伝的多様性の低下が起こりにくく、絶滅リスクが高まりにくいことが指摘されてきた (総説として Hamrick 2004; Low et al. 2005)。その理由として以下の議論がある。まず第 1 に、樹木は長命であるために、遺存的に残る小さな集団でも長期間存続することができる。長命な樹木は短命な草本と比べて、断片化後の世代交代のときに受ける遺伝的浮動の回数が少ないため、結果として、遺伝的多様性の損失が少ない。第 2 に、樹木は高いレベルの表現型の可塑性をもつため、寿命よりも短いタイムスケールで起こる環境変動に適応することができるため、小さな孤立集団でも生き残る。第 3 に、体サイズが大きく、花粉や種子の生産量が多いため、遺伝子流動のポテンシャルが高いことである。特に風による花粉散布による遺伝子流動は広範であるため、断片化後の遺伝的浮動による遺伝的多様性の減少を相殺させることができる。

このように樹木、特に風媒の樹木で森林の断片化のリスクが低いという考えがあった。ところが、風による花粉散布は限られる証拠がブナ属やコナラ属樹種において示され (Knapp et al. 2001; Sork et al. 2002)、その証拠に対応するように、ヨーロッパブナ (風媒) の分断化した集団では、近親交配と遺伝的分化の増加、遺伝的多様性の減少がみられた (Jump & Penuelas 2006)。さらに、森林の断片化の影響を調べた 97 樹種のデータを用いて行われたメタ解析の結果では、草本と同様に樹木でも断片化により負の遺伝的影響があることが示唆された (Vranckx et al. 2012)。

2. 研究の目的

わが国において様々な生態系サービスを提供する極めて重要なブナ林は、これまでに人為的な影響、すなわち食糧生産やその他の土地利用によって分布が断片化してきた。また、現在進行中の地球温暖化は、積雪量の減少などを通して、特に分布下限のブナ林に影響を及ぼし、ブナ林の衰退をもたらす恐れがある。ブナ林の保全のためには、優占種であるブナを対象として断片化の影響を明らかにする必要があるだろう。

本研究では、ブナ林の断片化がブナ集団の遺伝的多様性と繁殖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、地域内の断片化した小集団と連続した大集団を対象として、遺伝的多様性と種子生産を明らかにして比較することにより、以下の作業仮説を検証する：断片小集団は連続大集団と比べて、次のような傾向をもつことにより、絶滅リスクが高まる。(1) 集団内の遺伝的多様性が低く、集団間の遺伝的分化程度が高い。また、個体間の近縁度が高い。(2) 不稔率が高く、種子生産量が少ない。

3. 研究の方法

(1) 調査地

3 地域、すなわち北陸 (石川・富山地域)、長野県とその周辺 (長野地域)、北関東 (茨城・栃木地域) のブナ林において、各地域内に分布する小集団と大集団を対象とした。その際、断片化しているブナ林において集団サイズが 100 個体未満の集団を小集団とした。一方、連続しているブナ林、あるいは断片化していても比較的広い範囲に広がるブナ林において集団サイズが 100 個体以上の集団を大集団と定義した。

(2) 遺伝的多様性調査

サンプリング

石川・富山地域では大集団が 12、小集団が 7、合計 19 集団、長野地域では大集団が 10、小集団が 13、合計 23 集団、さらに茨城・栃木地域では大集団が 5、小集団が 6、合計 11 集団を選定した。各集団において樹高 1.3m 以上の個体を対象にして、小集団では全個体、大集団ではランダムに 30 個体程度から葉を採取した。

DNA 抽出と遺伝子型決定

採取した葉から改変 CTAB 法で全 DNA を抽出した。マイクロサテライトマーカーとして、ブナで開発された 5 遺伝子座 (sfc0018、sfc0036、sfc0378、sfc1105、sfc1143) およびヨーロッパブナで開発された 2 遺伝子座 (FS1-03、FS4-46) の合計 7 遺伝子座を用いた。Multiplex PCR Kit (QIAGEN)) を用いて Gene Amp PCR System 9700 でマイクロサテライト部位を PCR 増幅し、3130-Avant Genetic Analyzer を用いてキャピラリー電気泳動を行った。得られた DNA 断片のサイズをプログラム GenMapper 4.0 (以上、Applied

Biosystems)で解析して、遺伝子型を決定した。

データ解析

集団内の遺伝的多様性の程度をアレリックリッチネス (AR) とヘテロ接合度の期待値 (H_E) で評価した。また、近親交配の程度を近交係数 (F_{IS}) で評価し、その値の0からの偏り (HWE からの偏り) の有意性を無作為化検定で調べた。これらの計算はプログラム FSTAT を用いた。

集団内における個体間の近縁関係の程度を近縁係数 (F_{ij}) で評価した。これはプログラム SPAGeDi で計算した。

集団間の遺伝的分化を評価するために、ある1つの集団が他の集団からどの適度遺伝的に分化しているかを表す遺伝距離 D_j を求めた。これはプログラム GSED で計算した。

各地域の大集団と小集団の間において、上記の5つのパラメータの平均値に有意な差異があるかどうかを検定した (AR , H_E , F_{IS} は FSTAT の無作為化検定、 F_{ij} と D_j はマン・ホイットニーの U 検定)。

有効集団サイズをプログラム NeEstimator で推定した。

過去の集団サイズの変動 (集団サイズの減少あるいは増加) についてはプログラム BOTTLENECK を用いて検定した (ウィルコクソンの符号順位検定)。

4つのパラメータ (AR , H_E , F_{IS} , F_{ij}) の関係をスピアマンの順位相関係数を計算して調べた。なお、すべての多重検定は sequential bonferroni 法で補正して検定した。

(3) 種子生産調査と発芽実験

種子生産調査

石川・富山地域では大集団が7、小集団が3、合計10集団、長野地域では大集団が4、小集団が3、合計7集団を選定した。各集団において、石川・富山地域では5個体、長野地域では5個体から27個体の林冠木を選定し、その樹冠下にシードトラップを1基ずつ4月に設置した。5月~12月まで半月から2ヶ月おきにトラップに捕捉された内容物を回収した。

トラップごとに回収物を雄花序と堅果 (雌花序を含む) に仕分けした後、堅果は健全、虫害、鳥獣害、シイナ、未成熟に区分して計数した。なお、雌花序には2個の雌花 (雌花には1個の胚珠) を含むため、雌花序やそれが発達して殻斗に包まれた状態で落下したものはその個数を2倍して足し合わせた。以下の式を用いて各集団の不稔率を推定した。
不稔率 = (シイナ数+未成熟数) / (健全数+シイナ数+未成熟数)

虫害と鳥獣害の個数を除いたのは、これらの堅果は虫や鳥獣の被害を受けたために、健全あるいはシイナ、未成熟のどれになったのか不明であるためであった。また、以下の式を用いて各集団の結実率を推定した。

結実率 = 健全数 / 総堅果数 (総雌花数)
なお、上記の計算式において、シイナ数、未成熟数、健全数は、各集団におけるトラップ間の平均値を用いた。

発芽実験

種子生産調査によって得られた健全堅果 (種子) を用いて発芽実験を行った (一部の集団では別途採取した堅果を用いた)。10月下旬から12月中旬にかけて、堅果 (種子) が得られ次第、直径9cmのシャーレに十分に水で湿らせた濾紙を敷き、シャーレあたり平均 25.5 ± 10.8 個の種子を播種した。播種したシャーレは5の冷蔵庫内に保管し、4月中旬まで発芽実験を行った。シャーレごとに発芽数を播種数で除すことにより発芽率を求め、集団ごとに平均発芽率を計算した。

4. 研究成果

(1) 遺伝的多様性

石川・富山、長野、茨城・栃木のどの地域においても、大集団と比べて小集団で集団内の遺伝的多様性が低下している傾向が認められた (表-1)。この傾向は H_E よりも AR で明瞭であり、特に石川・富山地域で明瞭であった。有効集団サイズの推定値は、特に石川・富山地域では小集団で小さくなる傾向が認められた。以上の結果から、ブナの小集団において遺伝的多様性が低下しており、これは集団サイズが小さいため遺伝的浮動が強くはたらいた結果であると考えられる。

表-1. 石川・富山、長野、茨城・栃木の3地域の小集団と大集団間における集団内の遺伝的多様性の比較

	AR	H_E	F_{IS}
石川・富山	**	**	
小集団	6.601	0.740	-0.059
大集団	8.726	0.800	0.014
長野	*	ns	ns
小集団	6.855	0.813	0.010
大集団	7.230	0.827	0.037
茨城・栃木	*	ns	ns
小集団	6.486	0.804	0.053
大集団	7.232	0.831	0.042

表中の値は平均値。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、^{ns} 有意差なし。

D_j の値から、大集団に比べて小集団において他の集団からの遺伝的分化が高まっている傾向が認められた (表-2)。一般には、集団が小さくなるにつれて集団は孤立していく。ブナの小集団でも孤立することによって他の集団からの遺伝子流動が減少し、遺伝的分化が進むと考えられる。また、小集団における集団内の遺伝的多様性の低下は遺伝子流動の減少も原因である。

ほとんどの集団で F_{IS} の0からの偏りは有意ではなく、HWEの状態であった (表-1)。し

かし、大集団に比べて小集団において個体間の近縁度が高まっていることが認められた(表-2)。また、 AR と F_{ij} (3地域とも)、 H_e と F_{ij} (石川・富山地域のみ)において有意な関係がみられた。したがって、小集団では遺伝的多様性の減少を通して近親交配(remote inbreeding)が増加することにより近縁な個体が増加していると考えられる。

表-2. 石川・富山、長野、茨城・栃木の3地域の小集団と大集団間における遺伝的分化と個体間の近縁度の比較

	D_i	F_{ij}
石川・富山	**	**
小集団	0.359	0.116
大集団	0.224	0.042
長野	.	**
小集団	0.287	0.043
大集団	0.233	0.007
茨城・栃木	.	.
小集団	0.342	0.055
大集団	0.287	0.008

表中の値は平均値。^{*} $P < 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$ 。

3地域のデータをプールすると F_{ij} と F_{IS} の間に負の関係が認められた。小集団では個体間の近縁度が高いためランダム交配が生じていても実質的には近親交配になり、ホモ接合体では近交弱勢が発現して死亡率が高いが、ヘテロ接合体は生き残るため、結果として F_{IS} が負に偏ることを示唆していると考えられる。

過去の集団サイズの変動については、唯一、石川・富山地域の一つの小集団において集団サイズの減少(ボトルネック)が推定されたが、大集団だけでなく小集団においても、むしろ集団サイズが増加している傾向であることが示唆された。

(2) 種子生産

2015年は、石川・富山地域および長野地域のどちらでも豊作であったため、データ解析に耐えうる堅果を得ることができた。種子生産調査の結果、大集団に比べて小集団に不稔率が高い傾向が認められた(表-3)。また、虫害や鳥獣害の影響も考慮した結実率は大集団に比べて小集団において著しく低かった。

また、健全堅果を用いて発芽実験を行った。発芽率は、大集団に比べて小集団で低くなる傾向が認められた。種子形成後の近交弱勢によって、特に小集団で発芽率が低下しているのであると考えられる。小集団において種子生産量が著しく少ないこと、また形成された種子が発芽して実生になる割合も低いことが示唆される。

表-3. 石川・富山、長野の2地域の小集団と大集団間における結実率、不稔率、発芽率の比較

	結実率	不稔率	発芽率
石川・富山			
小集団	0.059	0.923	0.224
大集団	0.236	0.657	0.566
長野			
小集団	0.045	0.941	0.370
大集団	0.434	0.421	0.643

表中の値は平均値。結実率と不稔率は石川・富山地域では10月~12月、長野地域では5月~12月の種子生産調査の結果にもとづき計算されたもの。

(3) まとめ

本研究の結果から、ブナの小集団は大集団と比べて、

(1) 集団内の遺伝的多様性が低く、集団間の遺伝的分化程度が高い。また、個体間の近縁度が高い

(2) 不稔率が高く、結実率が高いため、種子生産量が少ない。また、種子の発芽率も低い

という傾向をもつことにより、絶滅リスクが高まっていることが示唆される。

しかしながら、上記の傾向は、過去の集団サイズの変動に関する解析結果から、人為的な影響によって連続していたブナ林が断片化し、集団が孤立し、集団サイズが減少したからという単純な説明はできないかもしれない。現在の潜在的にブナが分布できる地域には、最終氷期以降にブナが分布を拡大したと考えられている。しかし、調査した小集団は、人為的な影響だけでなく、何らかの地史的影響により集団サイズを増加させることができなかったため、上記のような傾向があるのかもしれない。この仮説を検証するためには、過去の集団サイズの変動(デモグラフィ)を正確に推定する必要がある。

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4件)

Inanaga, M., Koyama, Y., Ida, H., Okada, M., Nakanishi, A., Takahashi, M., and Tomaru, N. Pollen dispersal patterns and population persistence in a small isolated population of *Fagus crenata*. *Tree Genomes and Genetics* (in press) 査読有

Inanaga, M., Nakanishi, A., Torimaru, T., Nishimura, N., and Tomaru, N. (2014) Distance-dependent but genetically random mating in a Japanese beech (*Fagus crenata*) population. *Botany* 92: 795-803. dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0024 査読

有

小谷二郎 (2014) 白山のブナの豊凶. はくさん 42: 2-6. 査読無

小山泰弘, 仙台鐵也, 井田秀行, 岡田充弘 (2014) 松本市牛伏寺に残る小面積ブナ林の林分構造. 信州大学教育学部附属志賀自然教育研究施設研究業績 51: 1-6. 査読無

[学会発表](計7件)

小山泰弘 保全すべき対象とその方法を考える-ブナを例として-. 第20回森林施業研究科シンポジウム, 2016年3月30日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

小谷二郎 低標高の小面積ブナ林の15年間の結実特性. 第63回日本生態学会大会, 2016年3月26日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)

小谷二郎 白山周辺地域での最近15年間のブナ堅果の豊凶推移. 第126回日本森林学会大会, 2015年3月27日, 北海道大学農学部(北海道札幌市)

渡邊真美, 井田秀行, 稲永路子, 戸丸信弘 本州中部のブナ孤立集団における交配様式の推定. 2014年度日本生態学会中部地区大会, 2014年12月6日, 信州大学教育学部(長野県長野市)

稲永路子, 小山泰弘, 井田秀行, 岡田充弘, 中西敦史, 高橋誠, 戸丸信弘 長野県のブナ孤立小集団において検出された長距離花粉散布. 2014年11月7日, 東京大学弥生講堂アネックス・セイホクギャラリー(東京都文京区)

小谷二郎 ブナの優占状況が堅果の豊凶パターンに与える影響. 第61回日本生態学会大会, 2014年3月15日, 広島国際会議場(広島県広島市)

井田秀行 長野県でのブナ種子生産量のモニタリングから見えてきたこと. 信州大学山岳科学総合研究所2013年度研究成果発表会, 2014年3月20日, 信州大学理学部(長野県松本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸丸 信弘 (TOMARU, Nobuhiro)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50241774

(2) 研究分担者

原 正利 (HARA Masatoshi)

千葉県中央博物館・生態・環境研究部・主席研究員
研究者番号: 20250144

小谷 二郎 (KODANI Jiro)

石川県農林総合研究センター(林業試験場)・森林環境部・主任研究員
研究者番号: 40450811

井田 秀行 (IDA Hideyuki)

信州大学・学術研究院教育学系・准教授
研究者番号: 70324217

岡田 充弘 (OKADA Mitsuhiro)

長野県林業総合センター・育林部・主任研究員

研究者番号: 90450816

(平成26年度まで)

清水香代 (SHIMIZU Kayo)

長野県林業総合センター・育林部・研究員

研究者番号: 00631714

(平成27年度より)

小山泰弘 (KOYAMA Yasuhiro)

長野県林業総合センター・指導部・担当係長

研究者番号: 00450817

(平成27年度より)

(3) 研究協力者

稲永 路子 (INANAGA Michiko)

秋田県立大学木材高度加工研究所・特任助教

研究者番号: 30757951