

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26304017

研究課題名(和文) 東南アジア熱帯多雨林の起源 - 遺伝的多様性からたどる第四紀の森林動態

研究課題名(英文) The origin of tropical rain forest in Southeast Asia - Quaternary forest dynamics traced by genetic diversity

研究代表者

原田 光 (Harada, Ko)

愛媛大学・農学部・研究員

研究者番号：40150396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：スンダ地域は東南アジア熱帯雨林のコアとして、世界有数の生物多様性のホットスポットとなっている。スンダ地域の低地常緑樹林と高地常緑樹林のそれぞれを代表するフタバガキ科樹木とブナ科樹木について標本採集及び植生調査を行い、さらに遺伝的多様性に基づくデモグラフィック解析を行い、その結果を比較することによって過去の気候変動の現植生に与える影響について検証を試みた。低地常緑樹林に広域分布する*Dryobalanops aromatica*および*Shorea curtisii*についてボルネオ島とマレー半島 - スマトラ島のグループ間に明確な遺伝構造が認められ、その分岐は最終氷期以前に遡ることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Lowland evergreen forest and upland evergreen forest of Sundaic region are respectively characterized by abundant Dipterocarpaceae and Fagaceae species. Comparative demographic analysis based on genetic variation using molecular markers was applied on several representative species in these forests, which are broadly distributed in the area to testify the opposing hypothesis about the condition of the tropical rain forest in the last glacial maximum (LGM). Both *Dryobalanops aromatica* and *Shorea curtisii* showed clear genetic structure between groups of Malay-Sumatra and Borneo populations. Splitting time of the two groups was estimated far beyond the LGM, which occurred 20,000 years ago. This suggests that tropical rain forest at the LGM was divided into two main refugia in Borneo and in Malay-Sumatra probably by savanna corridor between them. Frequent gene flow revealed in *D. aromatica* suggests that the corridor was not completely continuous and interrupted by forests in some places.

研究分野：温帯および熱帯域の森林樹木の集団遺伝学

キーワード：フタバガキ ブナ科 スンダ地域 遺伝的多様性 最終氷期 デモグラフィック解析 遺伝構造 逃避地

1. 研究開始当初の背景

スンダ地域はマレー半島、スマトラ島、ジャワ島およびボルネオ島を含む広大な領域で、東南アジア熱帯多雨林のコアとして世界有数の生物多様性ホットスポットになっている。豊富な多様性の生成要因としてこの地域の気候変動に伴う陸域面積の大きな変化が議論されてきた。スンダ大陸棚は氷期には広大なスンダランドとして陸地化していたことが知られるが、これまでは陸地化したスンダランドは草原（サバンナ回廊）で覆われ、熱帯林は高緯度地域の温帯林と同様にボルネオ島東北部およびスマトラ島西部にあったとされる逃避地に縮小、隔離されて存在したと考えられてきた。ところが最近の全球気候モデルに基づく過去の気候復元から、氷期には陸地化したスンダ大陸棚に広大な低地常緑樹林が存在し、現在はその面積が最も減少したボトルネックにあることが示唆されるようになり (Cannon et al., 2009; Rase et al., 2014)、これまでの熱帯林の保全方法にも大きな見直しが必要になることになった。

我々はこれまでマレーシア・サラワク州を中心にフタバガキ科樹種の遺伝的多様性について調査を行い、温帯林の森林樹木集団と同等かそれ以上の多様性が維持されていることを明らかにしてきたが、最近の 10 年の間に非常に多様性の高い遺伝子マーカーであるマイクロサテライトが開発され、様々な生物種の遺伝的多様性や、生態学的研究の主役として用いられるようになってきた。これに伴い、ベイズ理論を取り込んだ MCMC (Markov chain-Monte Carlo) シミュレーションを用いたデモグラフィ解析の手法が発展し、森林の過去の動態に関する研究が可能になってきている。このような手法を適用し、スンダ地域における代表的な樹木種について、過去の森林の集団サイズ、集団の分岐年代などを推定することにより、現在の熱帯雨林がレフジアとしてボトルネックを通過しつつあるのか、過去のレフジアから拡大したものなのかについて明確な結論が得られると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

東南アジアの熱帯林における Cannon et al. (2009) の過去 15 万年の気候復元では、低地常緑林と高地常緑林で異なる森林面積の変動パターンが示されている。本研究では低地常緑林および高地常緑林に広域分布する代表的な樹種を選定し、マレー半島、スマトラ島、およびボルネオ島で葉のサンプル採集を行

う。これらについて葉緑体 DNA およびマイクロサテライトを用いた変異の解析を行うとともに、IM (isolation with migration) モデルを主体にしたデモグラフィ解析を行い、現在と過去の集団の有効サイズ、集団の分岐時間、および集団間の遺伝子流動量を推定する。低地常緑林および高地常緑林で得られたデモグラフィ解析の結果を比較検討することにより、二つの対立する仮説の是非を検証する。

3. 研究の方法

低地常緑樹林は標高 900m くらいまでの丘陵地に分布し、面積的に最も広く、島嶼東南アジアではフタバガキ科の樹種が優占するいわゆる熱帯多雨林が形成されている。一方、高地常緑樹林は標高 1000m 以上の山地に分布する森林でブナ科の樹木が優占する。本研究ではこの二つのタイプの森林を対象とし、マレー半島、スマトラ島およびボルネオ島の各地域に調査区を設けてサンプルの採集を行う。採集したサンプルは持ち帰って種を同定する。低地常緑樹林の樹木サンプルの採集は、課題 1 としてこれまでフタバガキ科を中心に集団遺伝学的研究を行ってきた原田と上谷が担当し、高地常緑樹林のサンプル採集は課題 2 として、東南アジアのブナ科樹木を中心に森林植生の調査を行ってきた大久保と原が担当する。採集したサンプルは現地、もしくは日本に持ち帰って DNA を抽出する。これらの材料について葉緑体 DNA の塩基配列決定およびマイクロサテライトを用いた変異の検出を行う。得られた変異に基づいて集団遺伝学的解析を行って遺伝的多様性の程度を明らかにすると共に、デモグラフィ解析を行う。

4. 研究成果

課題 1. 低地常緑樹林のフタバガキ科樹種
(1) *Dryobalanops aromatica* と *D. beccarii* の遺伝的多様性と系統地理 (原田光)
D. aromatica についてスマトラ島、マレー半島およびボルネオ島各 3 集団の計 9 集団から合計 219 個体のサンプルを採集した。*D. beccarii* についてはボルネオ島 15 集団、マレー半島 1 集団の計 16 集団から合計 235 個体のサンプルを採集した。これらから DNA を抽出し、マイクロサテライト 8 遺伝子座、Dra187, Dra428, Dra426, Dra519, Dra266, Dra471, Dra569 (Nanami et al., 2007) および Sle384 (Lee et al., 2004) について遺伝子型を決定した。その結果、2 種を合わせ

て合計 132 の対立遺伝子が検出された。これについて GenAIEx および FSTAT を用いて遺伝的多様性を示す統計量を算出した。ヘテロ接合度 (H_e) の 95%信頼限界は *D. aromatica* で 0.603-0.611、*D. beccarii* で 0.321-0.487 となり、*D. aromatica* で大きな値が示されたが、集団の遺伝的分化の指数である F_{ST} の 95%信頼限界は *D. aromatica* で 0.150-0.227、*D. beccarii* で 0.232-0.396 となり、*D. beccarii* で大きな値が示された。このことは *D. aromatica* が大集団で維持されているのに対し、*D. beccarii* では過去において集団の分断、縮小を経験し、小集団となって集団間の遺伝的分化が進んだものと考えられた。これらについて BOTTLENECK を用いた解析を行ったところ *D. aromatica* の Lambir および Limbang 集団、および *D. beccarii* の Bako および Bt. Tangii で最近の集団サイズの拡大が検出されたがボトルネックの証拠は得られなかった。

マイクロサテライトデータについて STRUCTURE を用いて遺伝構造の解析を行った。2 種を統合したデータセットについては、 K について $K=2$ の単一ピークが得られ、*D. aromatica* および *D. beccarii* を代表する二つのクラスターが明確に区別され、マイクロサテライトが種の識別においても有効な手段となり得ることが示された。また、両種の雑種集団と考えられる集団も同定され、雑種の程度が個体レベルで判別されることが明らかになった。さらに *D. aromatica* および *D. beccarii* のそれぞれについて個別に STRUCTURE 解析を行った。*D. aromatica* の集団では K について $K=2$ のとき最大のピークが得られ、マレー半島-スマトラ島のグループとボルネオ島のグループに二分された。*D. beccarii* については、 K について $K=3$ のとき最大のピークが得られ、これによりボルネオ島の集団は西サラワク、中央-東サラワク、および中央サラワク沿岸域とサバの 3 グループに分けられた。興味深いことにマレー半島の集団 (Gn. Panti) はすべての 3 つのクラスターの混合集団であった。

マレー半島-スマトラ島とボルネオ島の集団グループの分化が最終氷期以降に起こったのか、最終氷期以前に起こったのかを調べるため、集団をマレー半島、スマトラ島、ボルネオ島に分け、IMa2 (Hey, 2010) を用いたデモグラフィック解析を行った。スマトラ島集団とマレー半島間の分岐は 4000 年前 (Voris, 2000) とされているので、これを t_0 として、 t_1 (スマトラ島-マレー半島の集団グループと

ボルネオ島の集団グループの分岐年代) は 0.57×10^{-6} 年前 (95%信頼限界: $0.18 - 0.96 \times 10^{-6}$ 年前) と推定された。*S. leprosula* (Ohtani et al., 2012) および *S. parvifolia* (Iwanaga et al., 2012) で推定された t_1 の 95%信頼限界はそれぞれ $2.6 - 0.7 \times 10^{-6}$ 年前および $0.28 - 0.09 \times 10^{-6}$ 年前と推定されている。リュウノウジュにおける t_1 の推定値はマレー半島-スマトラ島とボルネオ島の集団グループの分化が最終氷期以前に起こったことを示している。このことは *S. leprosula* および *S. parvifolia* の結果とあわせて Cannon et al. (2009) が想定したような、最終氷期において現在より遙かに大きな熱帯雨林がスラングランドに存在した事を否定する。おそらくこれまでに議論されてきたように、スラングランドにおけるボルネオ島領域とマレー半島-スマトラ島領域の間には広大な草原地帯 (サバンナ回廊) が横たわっていて森林を分断していたのであろう。しかしながら、STRUCTURE 解析で示されるように、マレー半島の集団とボルネオ集団の間でクラスターの混合が見られる事から、サバンナ回廊は部分的に森林で覆われており、遺伝子流動が可能であったと考えられる。

(2) *Shorea curtisii* の遺伝的多様性と系統地理 (上谷浩一)

Shorea curtisii はマレー半島、リンガ諸島及びボルネオ島に広く分布する。*S. curtisii* についてマレー半島 13 集団、ボルネオ島 3 集団から合計 255 個体のサンプルを採集し、葉緑体の 2 領域、trnH-psbA-trnK および trnL-trnF について塩基配列を決定し、変異に基づくデモグラフィック解析を行った。またこれらのサンプルを含む合計 21 集団 (マレー半島 18 集団、ボルネオ島 3 集団) の合計 360 個体についてマイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝子型を決定し、検出された変異に基づいて集団の遺伝的多様性の程度と集団の遺伝的構造を明らかにした。

葉緑体 2 遺伝子領域の塩基配列情報から、マレー半島とボルネオ島から異なるコモンハプロタイプ (M1 および B1) が見つかった。マレー半島では 19 のレアハプロタイプ (M2-M20) が見つかったのに対し、ボルネオ島では 4 タイプ (B2-B5) のみが見つかった。マレー半島とボルネオ島の間で共有するハプロタイプはなかった。マレー半島で見つかったレアハプロタイプのほとんどは M1 から星形に派生したものであった。マレー半島とボルネオ島間の分岐は分子時計を用いて 464 万年前と推定された。塩基配列情報に基づいて

mismatch distribution 解析を行った結果、マレー半島では約 58,000 年前 (95%信頼限界: 7,346–67,505 年前) に集団の急速な拡大があった事が示された。一方でボルネオ島では集団の拡大縮小を示す有意な証拠はなかった。

マイクロサテライト 8 遺伝子座について各個体の遺伝子型を決定した。これについて遺伝的変異の代表的統計量である平均ヘテロ接合度を計算した。その結果、マレー半島 18 集団 292 個体では $H_e=0.7604 \pm 0.0055$ (SE)、 $H_e=0.6757 \pm 0.0063$ (SE) となり、ボルネオ島 3 集団 60 個体では $H_e=0.4847 \pm 0.0149$ (SE)、 $H_e=0.4083 \pm 0.0257$ (SE) となった。遺伝的変異の程度はマレー半島でボルネオ島より有意に大きかった。このデータについて STRUCTURE を用いたクラスター解析を行った結果、 $K=2$ でマレー半島とボルネオ島の集団が明確に区分されることが分かった。つぎに BOTTLENECK を用いて最近起こった集団サイズの変動を調べた。その結果、マレー半島の 4 集団およびボルネオ島の 1 集団で有意な集団サイズの拡大が検出された。

以上より、*Shorea curtisii* では葉緑体 DNA およびマイクロサテライトの両者ともマレー半島集団でボルネオ島集団より大きな変異の蓄積があることが示された。また mismatch distribution 解析からマレー半島の集団では過去 7 万年前から 7 千年前までの間に集団の分布の拡大があった事が示された。葉緑体 DNA のハプロタイプではマレー半島とボルネオ島で共有されるものはなく、またマイクロサテライトについての STRUCTURE 解析でもマレー半島とボルネオ島の間でクラスターは混合することなく両集団は明確に区分された。葉緑体の変異からは両集団の分岐が 465 万年前に遡ることが示され、両集団は過去の氷河期を通して遺伝子交流がなかったことが示唆された。これらの結果は過去の氷河期において現在よりも大きな熱帯林が存在したとする Cannon et al. (2009) の仮説を否定するものとなった。

課題 2 . 高地常緑樹林のブナ科樹種-ボルネオ島におけるブナ科植物の垂直・水平分布 (大久保達弘・原正利)

ボルネオ島におけるブナ科植物の垂直・水平分布について、2009 年以来、マレーシア・サラワク州内各所で、地域内を踏査してブナ科標本を採集し、標本化、同定の後、採集地点データを解析する方法で調べてきた。これまでに 6 地域、すなわち北からムル国立公園、

ブロンタウ国立公園、バリオ周辺、バリオ・ミリ間、ランジャク・エンティマウ生物保護区、クチン近郊 (ボルネオハイランドリゾート、サントゥボン国立公園、クバ国立公園) で調査した。2014 年までに採集した標本 (302 点) の同定を終え、76 種以上の分布を確認した。内訳は、マテバシイ属 50 種以上、シイ属 17 種、コナラ属 8 種、カクミガシ属 1 種で、マテバシイ属の多様性が特に高い。これらの採集データに加え、サラワク森林局植物標本庫 (SAR) に蓄積されている標本の採集データ、および Beaman et al. (2001) に記載されているキナバル山におけるブナ科植物の分布データを加え、ボルネオ島におけるブナ科植物の垂直・水平分布のマップを作成した。

ブナ科の植物は植生帯的には海拔 1,000m 前後より上の山地帯で優占することが多く、低地で優占するフタバガキ科の植物と対比されるが、種多様性の点からは、海拔 1,000m 以下の低地帯においても、ブナ科植物の多様性は山地帯に劣らず高いことがわかった。低地のほうが、河川による地表攪乱を受ける立地が広いことや、伐採等の人為攪乱の頻度が高いことがその一因ではないかと考えられる。また、種の垂直分布幅が広く、標高差 1,000m 以上に及ぶ例が多数見られることも特徴である。同じ熱帯でも、季節熱帯域に位置し、降水量も垂直的に大きく変化するタイ北部のインタノン山では、種の平均的な垂直分布幅はずっと狭い。湿潤熱帯域に位置するボルネオ島では、海拔高に比例して変化する環境要因は気温のみなので、垂直的な分布可能域が相対的に広いのかもかもしれない。さらに、同じ種でも山体ごとに分布標高が大きく異なることも確認された。山体ごとに山塊効果の大小や雲霧帯出現高度が大きく異なり、同一標高であっても、気温や土壌の水分条件、風当たりなどの変化が大きいことが一因ではないかと考えられる。水平分布については、まだ、よくわからない点が多いが、地史や地質の影響を強く受けていると考えられる。地理的に近接する地域であっても、地史や地質が異なれば、フロラや種の多様性はかなり異なり、逆に離れた地域であっても、地史や地質に共通性があれば、フロラや種の多様性も類似している。このため、離れた地域に隔離分布する稀産種が見られる。このような種の中には、大型の堅果を持つ、分散能力の小さいと考えられる種もあり、ボルネオ島における現在のブナ科フロラの背景には、長期の時間があることを示唆する。

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 5 件)

Harada K, Dwiyantri FG, Siregar IZ, Subiakto A, Chong L, Diway B, Lee YH, Ninomiya I, Kamiya K (2018) Genetic variation and genetic structure of two closely related dipterocarp species, *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. and *D. beccarii* Dyer. *Sibbaldia* 16: in press.

山路貴大・逢沢峰昭・駒井古実・大岡智亮・大久保達弘 (2016) 太平洋側ブナ林におけるブナ豊凶が堅果食性小蛾類の最優占種ブナヒメシクイにもたらす飽食効果. 日本森林学会誌 98: 26-30.

Dwiyantri FG, Chong L, Diway B, Lee YF, Siregar IZ, Subiakto A, Kamiya K, Ninomiya I, Harada K (2015) Population genetic diversity in the genus *Dryobalanops* Gaertn. f. (dipterocarpaceae) based on nuclear micro satellite markers. *J-Sustain* 3: 12-25.

Dwiyantri FG, Kamiya K, Harada K (2014) Phylogeographic structure of the commercially important tropical tree species, *Dryobalanops aromatica* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae) revealed by micro satellite markers. *Reinwardtia* 14: 43-51.

Dwiyantri FG, Harada K, Siregar IZ, Kamiya K (2014) Population Genetics of the critically endangered species *Dipterocarpus littorals* Blume (Dipterocarpaceae) endemic in Nusakambangan Island, Indonesia. *Biotropia* 21: 1-12.

[学会発表](計 17 件)

渡邊大地・大久保達弘・逢沢峰昭・原正利・Rnatai Jawa・Paul Chai (2017) ボルネオ島サラワク州のブナ科植物の垂直分布とDNAバーコーディング. 第129回日本森林学会大会, 3月26-29日, 高知大学.

原正利・大久保達弘・Rnatai Jawa・Paul Chai (2017) ボルネオ島におけるブナ科植物の水平・垂直分布について. 第27回日本熱帯生態学会大会, 6月17日, 奄美文化センター.

中谷崇人・上谷浩一・伊東明・名波哲・田中憲蔵・米田令仁・B. Diway・L. Chong・M.A. Alias・S. Lum・W.K. Meng・N.M. Majid・R.S.

Sukri・A. Cobb (2017) 東南アジアのフタバガキ科 *Shorea curtisii* 集団の遺伝的多様性と構造. 第129回日本森林学会大会, 3月26-29日, 高知大学.

Harada K (2017) Genetic diversity and its origin in *Dryobalanops* species. International Conference on Biodiversity, 4 November, Medan, Indonesia,

Harada K (2017) Sustainable plantation - from the view point of population genetics. IUFRO INAFOR Joint International Conference, 24 July, Yogyakarta, Indonesia.

原田光・Fifi Gus Dwiyantri・上谷浩一 (2016) フタバガキ科リュウノウジュ属 (*Dryobalanops*) の2種、*D. beccarii* と *D. aromatica* の間の雑種形成について. 第5回森林遺伝育種学会. 11月11日, 東京大学.

原正利・大久保達弘・Rnatai Jawa・Paul Chai (2016) マレーシア・サラワク州におけるブナ科植物の分布と植生. 植生学会第21回大会, 10月23日, 大阪産業大学.

原正利・大久保達弘・Rnatai Jawa・Paul Chai (2016) マレーシア・サラワク州クチン近郊のブナ科植物の分布について. 第26回日本熱帯生態学会年次大会, 6月17日-19日, 筑波大学.

Harada K, Dwiyantri FG, Kamiya K (2016) Genetic structure of *Dryobalanops beccarii* (Dipterocarpaceae) in northeastern Borneo and the relation with *D. aromatica*. 10th Flora Malesiana Symposium, July 11-15, Royal Botanical Garden, Edinburgh, England.

原田光・Fifi Gus Dwiyantri・上谷浩一・Iskandar Zulkarnaen Siregar・Bibian Diway・Lucy Chong (2016) スンダ地域におけるリュウノウジュ (*Dryobalanops aromatica*) の系統地理. 第26回日本熱帯生態学会年次大会, 6月17日-19日, 筑波大学.

Ohkubo T (2015) Fragmentation and the resilience of degraded forests adjacent to protected area in Bornean tropics-A case in Sarawak, Malaysia. JSPS中国同窓会広西支部会, 9月14日, 広西大学, 中国.

上谷浩一、原田光、田中憲蔵、米田令仁、Mohamad Azani Alias、Nik Muhamad Majid (2015) 東南アジア熱帯雨林の起源: 集団遺伝学的解析によるフタバガキ科樹木の集団サイズ変動履歴の検出. 日本熱帯生態学会第25回大会, 6月20日, 京都大学稲盛財団記念館.

原田光・Fifi Gus Dwiyanti・Bibian Diway・Ying-Fah Lee・Iskandar Zulkarnaen Siregar・Atok Sbiakto・上谷浩一 (2015) スンダ地域におけるリュウノウジュ (*Dryobalanops aromatica*) の遺伝構造と系統地理. 森林遺伝育種学会第4回大会, 11月6日, 東京大学.

Harada K, Dwiyanti FG, Chong L, Diway B, Lee YF, Siregar IZ, Sbiakto A, Ninomiya I, Kamiya K (2015) Phylogeography and genetic structure of two closely related species *Dryobalanops aromatica* and *D. beccarii* (Dipterocarpaceae) in Sundaland. 35th New Phytologist Symposium, Arnold Arboretum of Harvard University, June 16-17, Boston, USA.

田中憲蔵・米田令仁・上谷浩一・名波哲・Shawn Lum・則近由貴・市栄智明 (2014) シンガポールの断片化林におけるサラノキ属雑種稚樹の成長と枯死. 第24回日本熱帯生態学会年次大会, 6月13日-15日, 宇都宮大学峰キャンパス.

Dwiyanti FG, Chong L, Diway B, Siregar IZ, Subiakto A, Kamiya K, Ninomiya I, Harada K (2014) Population genetic diversity in the genus *Dryobalanops* Gaertn. f. (Dipterocarpaceae) based on microsatellite markers. The 5th International Conference on Sustainable Future for Human Security, Nov. 19-21, Sanur Paradise Plaza Hotel, Bali, Indonesia.

Dwiyanti FG, Kamiya K, Harada K (2014) Phylogeography of the two camphor species (*Dryobalanops*, Dipterocarpaceae) in western Malesia inferred from SSR variation. 第24回日本熱帯生態学会年次大会, 6月13日-14日, 宇都宮大学峰キャンパス.

〔図書〕(計 2 件)

大久保達弘 (2016) 「コナラの絵本」農文教.

大久保達弘 (2016) 「ブナの絵本」農文教.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田光 (HARADA KO)
愛媛大学農学部・研究員
研究者番号: 40150396

(2) 研究分担者

上谷浩一 (KAMIYA KOICHI)
愛媛大学大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 80638792

大久保達弘 (OHKUBO TATSUHIRO)
宇都宮大学農学部・教授
研究者番号: 10176844

原正利 (HARA MASATOSHI)
千葉県立中央博物館・生態・環境研究部・
主席研究員
研究者番号: 20250144
(平成 29 年度より研究協力者)