

天然林施業における伐採対象樹種の 遺伝的多様性保全法の確立

1 2 3 8 0 1 0 0

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 井 出 雄 二
東京大学大学院農学生命科学研究科教授

はしがき

本報告書は文部科学省科学研究費補助金（基盤研究（B）12380100、平成15年度～平成17年度）による「天然林施業における伐採対象樹種の遺伝的多様性保全法の確立」の研究成果を取りまとめたものである。

研究組織

- 研究代表者 : 井出 雄二（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）
- 研究分担者 : 宝月 岱造（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）
- 研究分担者 : 吉丸 博志（独立行政法人森林総合研究所生態遺伝研究室長）
- 研究分担者 : 清藤 城宏（山梨県森林総合研究所副所長）
- 研究分担者 : 西川 浩己（山梨県森林総合研究所研究員）
- 研究分担者 : 後藤 晋（東京大学大学院農学生命科学研究科講師）
- 研究分担者 : 齊藤 陽子（東京大学大学院農学生命科学研究科助手）

研究協力者

- 津田吉晃、内山憲太郎、綿野好則（東京大学大学院農学生命科学研究科）
- 永藤京子（東京大学農学部）
- 阿達康真、藤平晃司、福岡 哲、池田裕行、小池征寛、里見重成、鈴木祐紀、高橋康夫、丹下 健、塚越剛史、米道 学、
- （東京大学大学院農学生命科学研究科附属科学の森教育研究センター）
- 練 春蘭（東京大学アジア生物資源環境研究センター）

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	8,100,000	0	8,100,000
平成16年度	4,500,000	0	4,500,000
平成17年度	3,200,000	0	3,200,000
総計	15,800,000	0	15,800,000

研究発表

(1) 学会誌等

- Goto, S., Tsuda, Y., Nagafuji, K., Uchiyama, K., Takahashi, Y., Tange, T., Ide, Y. Genetic make-up and diversity of regenerated *Betula maximowicziana* Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management* 203:273-282 2004
- Saito, Y., Fujihira, K., Suzuki, M., Satomi, S., Yonemichi, M., Ide, Y. Allozyme variation in natural populations of *Abies firma* in University Forest in Chiba, University Forests, The University of Tokyo and in around Kanto area. *Bull. Tokyo Univ. Forests* 113:1-10 2005
- Saito, Y., Lian, C.L., Hogetsu, T., Ide, Y. Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* interspecific amplification in other Japanese *Abies* species. *Molecular Ecology Notes* 5:234-235 2005
- Tsuda, Y., Goto, S., Ide, Y. RAPD analysis of genetic variation within and among four natural populations of *Betula maximowicziana*. *Silvae Genetica* 53:5-6 2004
- Tsuda, Y., Ide, Y. Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. *Molecular Ecology*, 14:3929-3941 2005

(2) 口頭発表

- 内山憲太郎, 津田吉晃, 高橋康夫, 後藤晋, 井出雄二 東京大学北海道演習林におけるウダイカンバ高齢木集団の遺伝構造. 第115回日本林学会大会 2004.4
- 津田吉晃, 井出雄二 ウダイカンバの分布と遺伝的多様性の関係. 第115回日本林学会大会 2004.4
- 西川浩己, 津田吉晃, 清藤城宏, 井出雄二 山梨県および埼玉県秩父地方のオノオレカンバ集団のSSRマーカーによる遺伝的多様性解析. 第115回日本林学会大会 2004.4
- 津田吉晃, 井出雄二 ウダイカンバの分布と遺伝的多様性の関係. 韓日遺伝資源活用方案セミナー 2004.9
- 西川浩己 オノオレカンバの利用と遺伝的多様性. 韓日山林遺伝資源活用セミナー 2004.9
- 津田吉晃, 大給敬子, 内山憲太郎, 後藤晋, 井出雄二 ウダイカンバの繁殖システムの解明. 第116回日本森林学会大会 2005.3
- 西川浩己, 津田吉晃, 清藤城宏, 井出雄二 マイクロサテライトマーカーを用いたオノオレカンバの遺伝的多様性と集団間分化. 第116回日本森林学会大会 2005.3
- 綿野好則, 後藤晋, 齊藤陽子, 井出雄二 SSRマーカーを用いた東京大学北海道演習林におけるトドマツ天然林の遺伝的多様性の評価. 116回日本森林学会大会 2005.3

目次

I.	はじめに	1
II.	カバノキ属樹種の遺伝的多様性	
1	RAPD analysis of genetic variation within and among four natural populations of <i>Betula maximowicziana</i> .	3
2	Wide-range analysis of genetic structure of <i>Betula maximowicziana</i> , a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan.	9
3	Genetic make-up and diversity of regenerated <i>Betula maximowicziana</i> Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis.	23
4	オノオレカンバの分布域における遺伝的多様性	33
III.	マツ科樹種の遺伝的多様性	
1	Allozyme variation in natural populations of <i>Abies firma</i> in University Forest in Chiba, University Forests, The University of Tokyo and in around Kanto area.	41
2	Development and characterization of microsatellite markers in <i>Abies firma</i> interspecific amplification in other Japanese <i>Abies</i> species.	51
3	成熟程度の異なるモミ林の遺伝的特性	53
4	東京大学北海道演習林の天然林択伐がトドマツの遺伝的多様性に与える影響	63
5	景観スケールにおけるアカエゾマツ集団の遺伝的多様性と遺伝構造	71

I. はじめに

わが国において林業といえば人工林における集約的木材生産を想起することがほとんどであろう。しかし、北海道を中心に針葉樹天然林の伐採は引き続き行なわれており、森林の持続性に配慮した伐採を行なっているとしても、その影響は何らかの形で伐採対象樹種に及んでいると考えられる。また、有用な広葉樹は高価に取引されているが、それらのほぼ全てが天然林から伐出されるものである。こうした広葉樹種は、資源量も不明でまたその繁殖や更新についても不明なものが多く、伐採の具体的な影響がどのようなものであるかは全く未知である。伐採の影響は単に個体数の減少をもたらすだけでなく、その繁殖を通じて将来世代の遺伝的多様性に大きな影響を及ぼすと考えられる。遺伝的多様性は、それぞれの生物種の存在および進化の源泉であり、これを十全に維持してゆくことが健全な森林生態系と生物多様性の維持のために重要である。

そこで、本研究では、これまで十分に明らかにされていなかった、天然林樹種、特に、有用、高価で常に伐採の対象とされる樹種および景観管理上重要な樹種を取り上げ、その保有する遺伝的多様性の有様を明らかにするとともに、伐採等施業がそれに及ぼす影響を議論しようとした。

広葉樹については、ウダイカンバ、オノオレカンバの2種のカバノキ属樹木を取り上げ、まず、分布域を網羅した遺伝的多様性の賦存状況を明らかにした。このことによって、近年、活発化の様相を見せている有用広葉樹種の人工林造成などの動きに対して、種苗配布区の設定など、遺伝的管理が必要であることを裏付けた。また、ウダイカンバについては、積極的な多様性保全策としての地はぎ施業の有効性を、遺伝的多様性の観点から検証した。また、針葉樹については、モミ属のモミ、エゾマツおよびトウヒ属のアカエゾマツを取り上げ、それぞれ特定地域における遺伝的多様性の賦存状況を明らかにし、さらに、更新、造林、伐採などの各種施業が、それぞれの遺伝的多様性に及ぼす影響を評価した。

これらの研究により、遺伝的多様性の実態がこれまで明らかになっていなかった樹種について、集団分化や遺伝構造が明らかになったばかりでなく、伐採や造林といった施業が将来世代の遺伝的多様性に及ぼす影響の一端を明らかにした。これらは、今後の森林管理計画に大きく寄与するものと考えている。

Ⅱ．カバノキ属樹種の遺伝的多様性

RAPD analysis of genetic variation within and among four natural populations of *Betula maximowicziana*. Tsuda,

Y., Goto, S., Ide, Y

Silvae Genetica 53:5-6 2004

Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan.

Tsuda, Y., Ide, Y.

Molecular Ecology, 14:3929-3941 2005

Genetic make-up and diversity of regenerated *Betula maximowicziana* Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis.

Goto, S., Tsuda, Y., Nagafuji, K., Uchiyama, K., Takahashi, Y., Tange, T., Ide, Y.

Forest Ecology and Management 203:273-282 2004

オノオレカンバの分布域における遺伝的多様性

西川浩己・津田吉晃・清藤城宏・井出雄二

1. はじめに

オノオレカンバ (*Betula schmidtii*) は、本州中部以北の太平洋側、朝鮮半島、中国東北部およびウスリーに分布するカバノキ科の樹種である (倉田,1968)。材は緻密で非常に堅く比重が 0.9-0.95 と大きく (坂口,1985)、その材質が印章や櫛などの工芸品として適当であるため、天然生木の需要が生じている。オノオレカンバは先駆性でありながら、長寿で成長も非常に遅いため (大住,1996)、資源の安定供給および遺伝資源保全の観点から、利用と並行して永続的確保の方策を構築する必要がある。オノオレカンバのような樹種を資源として適正に利用していくためには、樹種特性だけでなく、分布範囲全体にわたる遺伝的多様性の賦存状態を把握し、地域集団の遺伝的特徴について明確にし、それを踏まえた管理や保全を検討することが重要である (井出,2002)。そこで、本研究ではマイクロサテライトマーカーを用いて、国内外のオノオレカンバ分布域における地域集団内の遺伝的多様性および集団間分化について把握することを検討した。

2. 材料および方法

山梨県 5 集団、東京都 1 集団、埼玉県 1 集団、栃木県 2 集団、福島県 2 集団、岩手県 2 集団、韓国 3 集団および中国 1 集団の計 17 集団から各 20~53 個体の計 581 個体から冬芽、葉、枝および幹の形成層のいずれかの組織を採取し、分析まで -80℃ で保存した (図-1、表-1)。

DNA は、採取したサンプルから Dneay Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出し、PCR の鋳型 DNA とした。マイクロサテライト遺伝子座としては、ウダイカンバで開発された Bmax097、Bmax529、Bmax624 (Ogyu *et al.*, 2003)、シラカンバで開発された Bp01 (Wu *et al.*, 2002) および *B. pendula* で開発された L2.7、L5.4、L5.5 (Kulju *et al.*, 2004) の計 7 遺伝子座を用いた。PCR 反応液は、Multiplex PCR Kit (QIAGEN 社製) のプロトコールに従い作成した。PCR 条件は、サーマルサイクラー (Takara 製) を用いて、95℃で 15 分間の変性後、94℃で 30 秒 (変性)、57℃で 90 秒 (アニーリング)、72℃で 60 秒 (伸長) のサイクルを 30 回、最後に 60℃で 30 分 (伸長) とした。PCR 産物は ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) でシグナルを検出し、DNA フラグメント解析ソフトウェアである Genemapper (Applied Biosystems 社製) を用いて増幅フラグメントのサイズを決定した。

集団内での遺伝的多様性の指標として、対立遺伝子多様度 Allelic richness (El Mousadik and Petit,1996)、ヘテロ接合度の期待値 (H_e ; Nei,1987)、近親交配の程度を示す近交係数 (F_{IS}) の算出および F_{IS} の 0 からの偏りの有意性の検定について、遺伝解析ソフト FSTAT

(Goudet,2001)を用いて行った。

集団間の遺伝的分化の指標には集団分化程度を示す F_{ST} (Weir and Cockerham,1984)を算出した。

空間的遺伝構造を評価するために、日本国内集団で距離による隔離：IBD (Wright,1943)について評価した。

また遺伝距離 D_A (Nei *et al.*, 1983)を用いて近隣結合法による系統樹を作成し、集団間の遺伝的關係について評価した。

さらに遺伝構造を鋭敏に評価するため、Pritchard *et al.*, (2000)にしたがい、連鎖不平衡およびハーディー・ワインベルグ不平衡が最小となるように供試全個体を K 個のクラスターに割り振る解析をソフト Structure 2.0 (Pritchard and Wen,2002)を用いておこなった。

3. 結果および考察

集団内の遺伝的多様性を示す統計量として Allelic richness ($A_{[40]}$)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、近交係数 (F_{IS}) を表-2に示した。

$A_{[40]}$ は、韓国の春川集団で 2.80 と最小となり、山梨県の早川集団

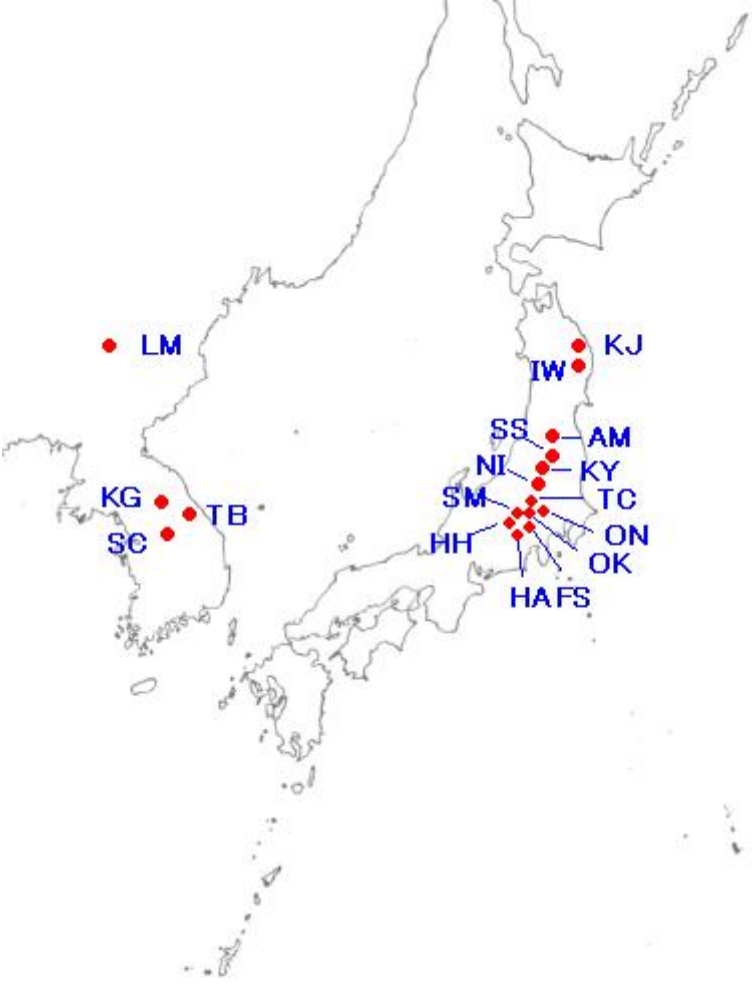


図-1 調査対象集団

表-1 オノオレカンバ 17 集団の位置と分析個体数

	位 置	コード	北緯	東経	分析個体数
1	山梨県南巨摩郡早川町	HA	35° 22′	138° 18′	53
2	山梨県南都留郡富士河口湖町	FS	35° 29′	138° 40′	32
3	山梨県大月市七保町	OK	35° 42′	138° 56′	34
4	山梨県北杜市白州町	HH	35° 48′	138° 12′	38
5	山梨県北杜市須玉町	SM	35° 52′	138° 33′	41
6	東京都西多摩郡奥多摩町	ON	35° 53′	139° 02′	27
7	埼玉県秩父郡大滝村	TC	35° 56′	138° 49′	32
8	栃木県日光市中宮祠	NI	36° 45′	139° 30′	20
9	栃木県日光市湯西川	KY	37° 00′	139° 36′	30
10	福島県大沼郡昭和村	SS	37° 18′	139° 42′	24
11	福島県喜多方市熱塩加納町	AM	37° 44′	139° 48′	32
12	岩手県下閉伊郡岩泉町	IW	39° 46′	141° 37′	40
13	岩手県久慈市山形町	KJ	40° 12′	141° 37′	35
14	忠清北道 忠州市	SC	37° 06′	128° 03′	30
15	江原道 太白市	TB	37° 08′	128° 56′	51
16	江原道 春川市	KG	37° 46′	127° 49′	34
17	吉林省 臨江市 猫耳山	LM	41° 44′	126° 35′	28
	合計				581

で 4.59 と最大になり、日本集団の方が、韓国・中国集団のより高かったが、日本国内では特に明確な傾向はみられなかった。 H_E は、韓国の忠州集団で 0.341 と最小となり、栃木県の日光集団で 0.581 と最大になった。 H_E も $A_{[40]}$ と同様に日本集団の方が韓国・中国集団のより高かった。日本国内では南の集団の方が北の集団より高くなる傾向はみられた。 F_{IS} は全体として比較的高かった。これは、オノオレカンバが急な尾根筋に単木的に生育しているため、隔離分布の影響を受けやすく、近親交配が多くなるためと考えられた。特に山梨県の白州・西湖・大月の 3 集団と韓国の春川・忠州集団で 0 からの有意な偏りが検出され、近親交配の進行が示唆された。残りの集団についてはハーディー・ワインベルグ不平衡が成り立っており、任意交配集団とみなされた。

集団間の遺伝的変異の統計量として F_{ST} を表-3 に示した。17 集団間では 0.121 と比較的高い値を示し、集団分化程度はやや高いことが示唆された。しかし、日本国内 13 集団間では 0.057 と比較的低い値を示した。これは国内外の集団間の遺伝的分化の影響によるもので、日本国内の集団間の遺伝的分化程度は比較的低くかった。同じカバノキ属のウダイカンバの全国 23 集団間では 0.062 であり (Tsuda and Ide, 2005)、同程度であった。しかし、集団総当たりの F_{ST} はほとんどが有意であったため、分化程度は低い各集団はそれぞれ分化していると考えられた。

集団間の遺伝的関係について、日本国内 13 集団において距離による隔離を評価したところ、 F_{ST} と地理的距離には有意な正の相関があり、有意な距離による隔離が検出され (図-2)、距離が離れると遺伝的に分化する傾向があり、遺伝的構造が形成されていると考えられた。

遺伝距離 D_A を用いて近隣結合法による系統樹を図-3 に示した。韓国・中国集団から成るグループは、日本集団と遺伝的に大きく異なっており、日本集団とは分化していることが示唆された。日本国内から成るグループは、2 つのグループに細分され、東北・北関東地方集団の北方グループと山梨県周辺の本州中部地方集団の南方グループに分けられ、各集団の地理的な位置関係をほぼ反映していた。

表 - 2 各集団の遺伝的多様性の統計量

集団		$A_{[20]}$	H_E	F_{IS}
1 HA 早川	山梨県	4.59	0.578	-0.017
2 FS 西湖		4.18	0.546	0.273 *
3 OK 大月		4.33	0.574	0.201 *
4 HH 白州		4.47	0.565	0.160 *
5 SM 須玉	東京都	4.31	0.580	0.051
6 OH 日原		4.20	0.573	-0.021
7 TC 秩父	埼玉県	4.47	0.550	0.147
8 NI 日光	栃木県	4.71	0.581	0.152
9 KY 栗山		4.46	0.534	0.089
10 SS 昭和	福島県	4.26	0.474	0.062
11 AM 熱塩		4.22	0.517	0.049
12 IW 岩泉	岩手県	4.19	0.503	0.083
13 KJ 久慈		4.21	0.531	0.126
14 SC 忠州	韓国	3.01	0.344	0.281 *
15 KG 春川		2.80	0.362	0.234 *
16 TB 太白	中国	3.04	0.390	0.110
17 LM 臨江		3.18	0.424	0.060
平均		4.09	0.513	0.124

* 5%水準で有意

表 - 3 国内外の遺伝的多様性と遺伝的分

国	$A_{[40]}$	H_E	F_{ST}
日本	4.35	0.549	0.057
韓国・中国	3.01	0.380	0.095
17集団全体	4.09	0.513	0.121

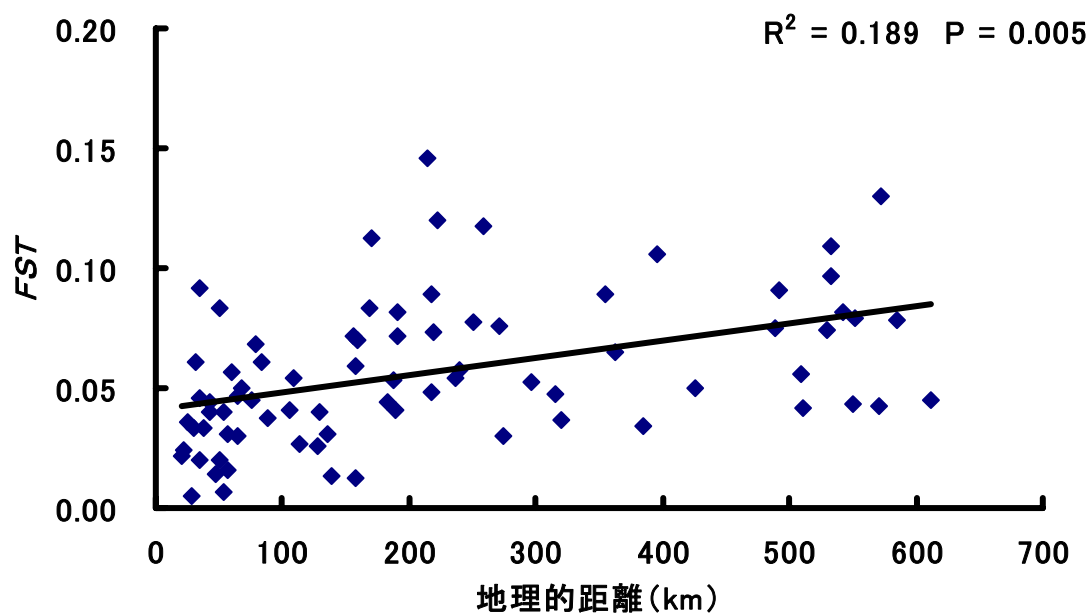


図-2 地理的距離と F_{ST} の関係

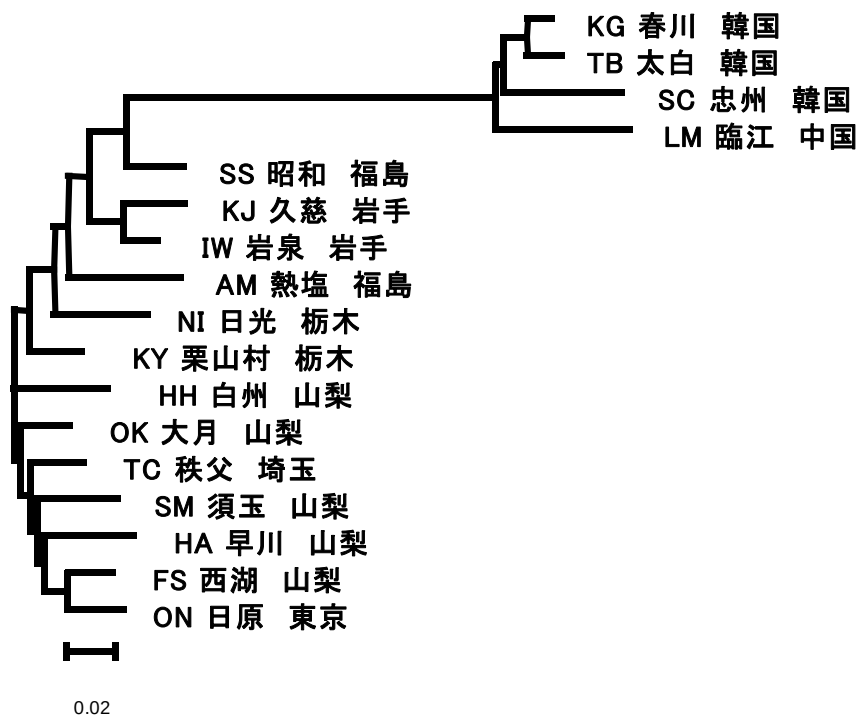


図-3 遺伝距離 D_A を用いた近隣結合法による系統樹

Pritchard ら方法に従い、供試した全 581 個体の遺伝子型からの連鎖不平衡およびハー

ディー・ワインベルグ不平衡が最小となるようにクラスターを推定したところ、図-4に示すように、遺伝的に異なる系統を意味する4つのクラスターが検出された。クラスター には東北地方と北関東地方の集団の個体が多く割り振られ、クラスター には本州中部地方の集団の個体が多く割り振られた。またクラスター およびクラスター には韓国・中国集団のほとんどの個体が割り振られた。これらのことから日本集団と韓国・中国集団は遺伝的に大きく異なり、日本集団とは分化していることが示唆されました。このようにクラスター分析の結果は遺伝距離を用いた系統樹の結果と合致した。日本国内では、各集団のクラスター および に割り振られる個体の割合に地理的傾向がみられましたが、どの集団からもクラスター および に割り振られる個体が一定割合検出されたことは、日本国内の集団は、クラスター および に起因すると思われる2つの系統の分布拡大およびそれら系統間の遺伝的交流が大きく影響していることが示唆された。

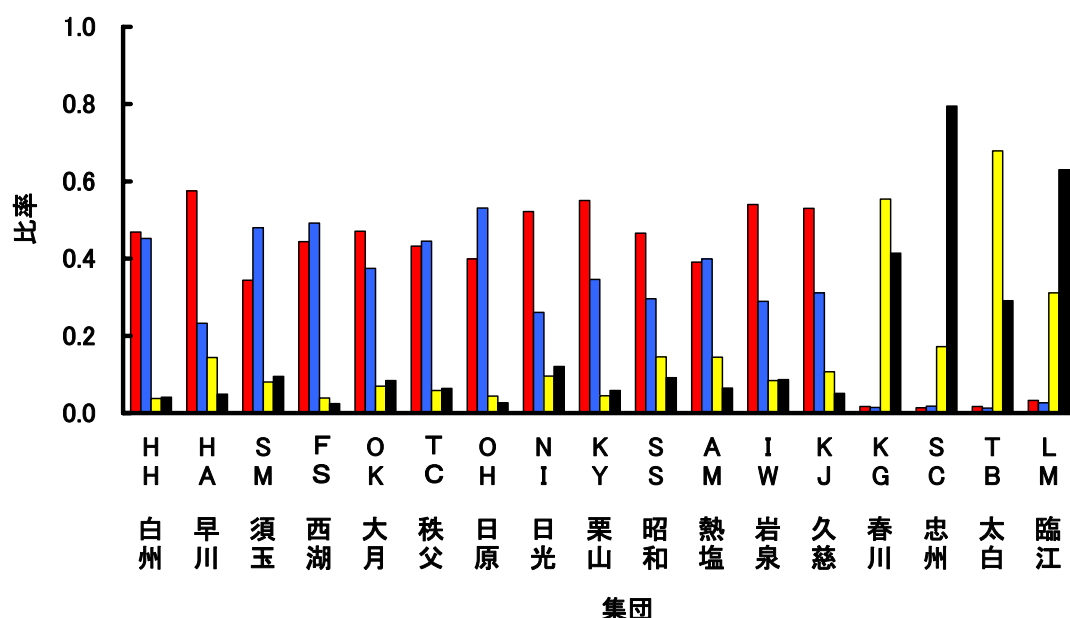


図-4 Pritchard *et al*, (2000) に基づいて推定したクラスターの構造

本研究の結果から、各集団内での遺伝的多様性は、日本集団は、韓国・中国集団よりも高く、このことは韓国・中国集団では、何らかの原因による個体数の減少によって引き起こされたボトルネック効果によるものと考えられた。しかし、マーカーのスクリーニングを日本集団で行ったため、マーカーの適用性の問題も捨て切れない。今後この点については検討していきたい。オノオレカンバは限られた場所に点在して分布しているが、広域に一斉林を形成するウダイカンバと同様に集団間分化程度は低く、Hamrick *et al* (1992) より示された樹木集団は一般的に集団内の遺伝的変異は高く、集団間の遺伝的分化程度は低いという傾向は本種でもみられた。繁殖様式は花粉は風媒、種子は風散布

であるため、遺伝子流動の能力が高いが、距離が離れると遺伝的な違いが大きくなる傾向があり、距離により遺伝子流動が制限されていた。系統樹とクラスター分析から東北・北関東地方、本州中部地方、韓国・中国の3集団グループに分けられた。国内集団の遺伝構造形成には、ウダイカンバ（津田・井出,2004）と同様に2つの系統の分布変遷と相互の遺伝的交流の影響が示唆された。

今後の本研究の発展のため、未採集のウスリー等の国外集団、国内集団についても調査を行い、さらに詳細なオノオレカンバの集団内および集団間分化について検討する必要がある。また、葉緑体DNAは一般的に核DNAよりも明確な遺伝構造の検出が期待でき、ウダイカンバ（津田・井出,2004）、*B. pendula*（Palme *et al*,2003）では明確な遺伝構造が検出されており、オノオレカンバにおいても葉緑体DNAの解析から明確な遺伝構造の解明が期待できると考えられる。さらに、繁殖や更新に関して、地域内での集団間の花粉や種子による遺伝子流動の制限の要因についても検討する必要がある。

引用文献

- El Mousadik A., Petit RJ :High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. Theoretical and Applied Genetics. 92, 832-839, 1996
- Goudet J.:FSTAT (version 2.9.3.): A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. www.unil.ch/izea/software/fstat.html., 2001
- Hamrick JL, Godt MJW. Sherman-Broyles SL :Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forests. 6, 95-124, 1992
- 井出雄二：森林環境保全のための遺伝子管理，第22回基礎育種学シンポジウム報告，21-29, 2002
- Kulju, K.K.M., Pekkinen, M., Varvio, S.:Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae), Molecular Ecology Notes 4, 471-473, 2004
- 倉田悟：原色日本林業樹木図鑑第2巻, 265pp, 地球社, 東京, 1968
- Nei M.:Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York., 1987
- Nei M., Tajima F., Tateno Y. :Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. Journal of Molecular Evolution, 19, 153-170, 1983
- Ogyu K., Tsuda Y., Sugaya T., Yoshimaru H., Ide Y.: Identification and characterization of microsatellite loci in *Betula maximowicziana* Regel, Molecular Ecology Notes, 3, 268-269, 2003
- 大住克博：北上山地のカンバ林，林業技術 No.655, 12-14, 1996
- Palme AE., Su Q., Rautenberg A., Manni F., Lascoux M.: Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. Molecular Ecology, 12, 201-212, 2003
- Pritchard JK., Stephens M., Donnelly P.:Inference of population structure using multilocus

- genotype data, *Genetics*, 155, 945-959, 2000
- Pritchard JK., Wen W.:STRUCTURE (version 2). University of Chicago, Chicago, Illinois, <http://pritch.bsd.uchicago.edu/> , 2002
- 坂口勝美他編：有用広葉樹の知識, 514pp, 林業科学技術振興所, 東京, 1985
- Tsuda Y., Ide Y. :Wide-range Analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of japan. *Molecular Ecology* 14, 413-415, 2002
- 津田吉晃・井出雄二：ウダイカンバの分布と遺伝的多様性の関係, 第 115 回日本林学会大会学術講演集, 268, 2004
- Weir BS, Cockerham CC :Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370, 1984
- Wright S.: Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114-138, 1943
- Wu B., Lian C., Hogetsu T. : Development of microsatellite markers in white birch(*Betula platyphilla* var.*japonica*). *Molecular Ecology Notes*, 2 , 413-415, 2002

Ⅲ. マツ科樹木の遺伝的多様性

Allozyme variation in natural populations of *Abies firma* in University
Forest in Chiba, University Forests, The University of Tokyo and in around
Kanto area

Saito, Y., Fujihira, K., Suzuki, M., Satomi, S., Yonemichi, M., Ide, Y.

Bull. Tokyo Univ. Forests 113:1-10 2005

Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma*
interspecific amplification in other Japanese *Abies* species.

Saito, Y. Lian, C.L., Hogetsu, T., Ide, Y.

Molecular Ecology Notes 5:234-235 2005

成熟程度の異なるモミ林の遺伝的特性

齊藤陽子・藤平晃司・鈴木祐紀・井出雄二

はじめに

モミは本州、四国、九州の暖帯から温帯に広く分布する風媒風散布の日本固有種であり、モミ林は日本固有の森林景観としての保全価値が高い。モミは、暖温帯においては常緑広葉樹との組み合わせが主体のモミ林を形成するが、その遷移上の位置づけは必ずしも明確ではない(梶, 1975)。暖温帯に位置する東京大学千葉演習林のモミ林について、高杉(1974)、蒲谷(1974、1975)は安定な極相である、としているが、梶(1975)は同じく千葉演習林における調査から、また吉井・吉岡(1951)は筑波山における研究より、暖温帯のモミ林は気候的極相群落として安定的な群落ではない、としている。これらの議論に対して、尾崎・大沢(1988)は、尾根型立地ではモミ・ツガが極相を形成し、斜面型立地ではシイ・カシなど常緑広葉樹が極相林を形成することを明らかにした。これより、暖温帯のモミ林は地形的極相の可能性がある(大沢, 1988)とされている。

岡野・荒上(1999)は、九州地方の調査により、最上層をモミが高い割合で優占しており相観的にモミ林といえる林分においては、下層にはモミの個体数は少なく、将来的にはモミ林ではなくなる可能性が高いとしている。したがって、モミ林の更新には林冠の破壊などの攪乱が必要であり、四国では台風による一斉風倒などが攪乱要因(鈴木, 1984)として考えられている。上述の千葉演習林においても、台風の風倒被害を受けたモミ林の写真が残されている(蒲谷, 1975)。このように、モミ実生はモミ上木存在下では生育が難しいため、モミ天然林の保続のためには、人為的干渉を導入した取り扱いも必要である(荒上, 1987; 鈴木, 2002)。

モミは上記のような特性のため、モミ林内に実生から成木までの各生育段階の個体が存在しているわけではなく、ひとつの林分は一定の年齢幅をもつ樹齢の近い個体の集団となっている。この年齢幅は林分成立の諸条件により異なるであろうが、鈴木(1984)の調査では約 50 年であった。地域内にはこのような林分が様々な成熟段階で分布している。成熟が進むにつれて、個体の自然選択による枯死が生じ、個体密度が減少していく。このような成熟段階によって、個々の林分の遺伝的多様性や繁殖実態は異なっている可能性があり、その取扱いは異なってくるのではないだろうか。

一方、森林を健全に維持・管理していくためには、その構成種の遺伝的多様性についての理解が不可欠である。林分の遺伝的多様性は、その人間の取り扱い履歴によって異なってくる(Buchert *et al.*, 1997; El-Kassaby *et al.*, 2003; Gomory, 1992; Rajora *et al.*, 2000)ことが明らかとなっている。また、樹木個体群には空間的遺伝構造というものが存在している例も多く知られている。空間的遺伝構造は、個体間での遺伝子の

分布がランダムでないことの証拠である (Epperson, 1989)。空間的遺伝構造に影響を与える要因としては、種子散布・花粉飛散の制限、成木の密度、林分の履歴、ミクロな環境要因による自然選抜などが考えられる (Sokal and Jacquez, 1991; Hamrick *et al.*, 1993; Smouse and Peakall, 1999)。また、林齢やコホートのステージによっても構造の有無や強さは異なっている (Kalisz *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003)。

そこで、本研究では、暖温帯のモミ林について、その取り扱い方法を検討するためのデータを得るため、異なる成熟段階における遺伝的多様性および空間的遺伝構造を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

調査地とサンプル

東京大学大学院農学生命科学研究科附属千葉演習林におけるモミ林を対象とした。生活史段階の異なる集団の空間的遺伝構造の研究では、同一林分内でサンプリングを行い、それらを段階ごとに分けて解析する方法が一般に用いられる (e. g. Chung *et al.* 2004)。しかし、本研究では対象種であるモミはある程度の幅を持った近い生活史段階に属する個体どうしで林分を構成しているため、成熟程度が異なる 4 つのモミが優占する林分 (ナラノキ、カジザカ、マネザワ、ドウザワ) を調査地とした。調査地は、2000 年にモミ個体が約 90 本含まれるように設定したものである。調査地内の全個体の位置及び胸高直径を測定した。2005 年現在では、枯死のため 90 本に満たなくなった林分もある。調査地の面積及び 2000 年の時点での個体数を表 1 に示す。また、各林分の胸高直径階別ヒストグラムを図 1 に

示す。梶 (1975) の個体群の発達のパターンに倣うと、ナラノキおよびカジザカは成熟前林分、マネザワは成熟林分、ドウザワは崩壊林

分と考えることが出来る。設定した 4 つのモミ林分において全個体から 2000 年から 2005 年まで針葉または幹より形成層をサンプリングした。針葉はシリカゲルを入れたビニル

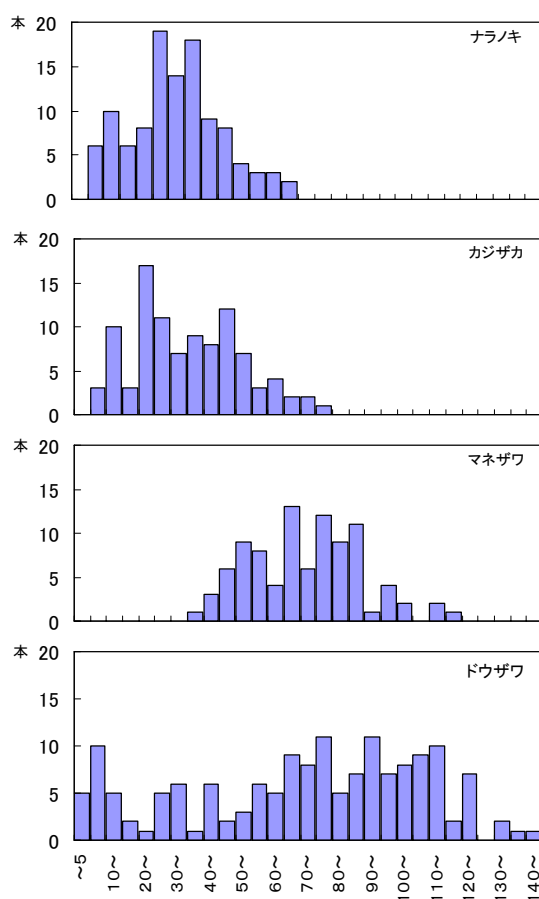


図 1 調査対象としたモミ 4 林分の胸高直径階別ヒストグラム

袋に入れ、乾燥させ常温で保存した。形成層は-80 度で保存した。

DNA 分析

DNA の抽出は針葉または形成層より改変 CTAB 法(Lian *et al.*, 2003)を用いて行った。使用した DNA マーカーは、モミ、トドマツおよび *Abies nordmanniana* で開発された 9 つのマイクロサテライトマーカー(Af11、Af13、Af18(Saito *et al.*, 2005)、As07、As08、As09、As13、As20(練ら、未発表)、NFH15(Hansen *et al.* 2005))である。PCR は以下の方法で行った。反応液の組成は、 $5\mu\text{l}$ テンプレート DNA、 $0.2\mu\text{M}$ プライマー、 $1\times$ Multiplex PCR Master Mix(Qiagen)である。PCR 条件は初期活性化ステップとして 95°C 15 分の後、熱変性 94°C (30 秒)、アニーリング 57°C (90 秒)、伸長反応 72°C (60 秒)を 1 サイクルとし合計 30 サイクルを行い、最終伸長反応を 60°C 30 分間行った。PCR 産物の電気泳動と断片長の決定には、ABI 社の Genetic Analyzer 3100 およびその多型解析ソフト GeneMapper を用いた。

データ解析

林分の遺伝的多様性

遺伝的多様性を表す指数として、遺伝子多様度(H_e)、対立遺伝子多様度($A_{[r]}$)、固有の対立遺伝子数(P)を求めた。また、サンプル全体での対立遺伝子頻度が 1%未満のものを稀な対立遺伝子と定義し、林分ごとに検出された稀な対立遺伝子数を求めた。さらに林分ごとに、固定指数(F_{is})を求め、遺伝子座間の連鎖の有無を確認した。これらは、解析ソフト FSTAT 2.9.3(Goudet, 2001)を用いて算出した。

林分の遺伝的空間構造

各林分内に遺伝構造が存在するかを明らかにするため、複数の遺伝子座における複数の対立遺伝子のデータを用いることが出来る Smouse and Peakall(1999)の r により空間自己相関を評価した。ランダムな個体の配置を 999 回繰り返し、95%の確率よりも実際の r の値が高い場合、有意な正の自己相関があるとした。計算は GenAlex ver. 6 (Smouse and Peakall, 2005)を用いて行った。

結果および考察

林分の遺伝的多様性

各林分で得られた遺伝的多様性を示す指数を表 1 に示す。

表 1 成熟段階の異なる 4 つのモミ林分における調査地概要(2000 年)およびモミの遺伝的多様性

	本数	面積(m ²)	分析個体数	$A_{[58]}$	P	R	H_E	H_O	F_{IS}
ナラノキ	100	570	67	9.43	3	13	0.673	0.636	0.054
カジザカ	95	2600	90	9.16	3	12	0.666	0.630	0.053
マネザワ	93	8300	80	9.38	1	12	0.689	0.658	0.045
ドウザワ	100	49000	70	9.74	4	14	0.695	0.667	0.040
Total	388		307	9.81	—	—	0.685	—	0.048

$A_{[58]}$: 対立遺伝子多様度 P : 林分固有の対立遺伝子数 R : 稀な対立遺伝子数 H_E : 遺伝子多様度 H_O : ヘテロ接合度の観察値 F_{IS} : 固定指数

対立遺伝子多様度 $A_{[58]}$ は 9.16~9.74 となりカジザカで最も低く、ドウザワで最も高かった。林分固有の対立遺伝子数 P は 1~4 となり、マネザワで少なくドウザワで最も多かった。稀な対立遺伝子数は 12~14 となりドウザワで多かった。遺伝子多様度 H_E は 0.666~0.695、ヘテロ接合度の観察値(H_O)は 0.630~0.667 で、いずれも対立遺伝子多様度と同様にカジザカで最も低くドウザワで最も高かった。

いずれの指数もナラノキ、カジザカ、マネザワでは一定の傾向がなかった。この 3 林分の面積および成熟段階の違いは多様性に違いをもたらすほどのものではないと考えられる。あるいはナラノキを除くと、残る 3 林分は成熟に伴って、即ち林分面積が大きくなるに伴って遺伝子多様度と対立遺伝子多様度が高くなることから、この成熟段階と遺伝的多様性の関係にナラノキが合致していないともみなすことが出来る。この場合、ナラノキは面積、成熟段階に対して多様性が高いと考えられ、その要因として、ナラノキが林分形成の段階で他の林分と何らかの違い、例えば世代交代が起こった際の前世代の個体数が多かった、ことが考えられる。

ドウザワは他の 3 つの林分よりも全ての指数で遺伝的多様性が高かった。この理由については、面積の影響あるいは同時に前世代の母樹数の影響、前世代での空間的遺伝構造の存在が考えられる。面積の影響とは、面積が十分広くないとそこに成立できる個体の家系数が制限されてしまうため、遺伝的多様性が低くなってしまうことを意味する。

ヘテロ接合度の観察値がドウザワで最も高くなったのは、林分の成熟に伴ってホモ接合体がヘテロ接合体よりもより多く枯死したためと考えられる。

固定指数 F_{IS} はカジザカのみで有意に 0 から正に偏っており、その他の林分では 0 からの有意な偏りは見られず、任意交配集団とみなすことができた。

林分の遺伝的空間構造

各林分の距離階級別に算出した空間的自己相関係数 r のコレログラムを図 2 に示した。

ナラノキおよびドウザワでは短い距離階級で有意に r が高い距離階級はなかった。一方、カジザカおよびマネザワでは最も短い距離階級(それぞれ 10m および 15m)で r が有意に高く、弱いながらも遺伝的空間構造が存在することが明らかとなった。

ナラノキに空間的遺伝構造が見られなかった原因として、seed shadow の重なり合いのほか、サンプル数が少ないあるいはサンプリング範囲が狭すぎて遺伝構造が検出できなかったことなどサンプリングの問題も考えられる。Jones ら(2006)は、同一林分において *Quercus rubra* は強い遺伝構造を持っているが、*Pinus strobus* では弱い遺伝構造しか検出されなかった要因として、*P. strobus* は種子散布距離がより長いこと Seed shadow の重なり合いがあり構造が弱められているとしている。本研究では、同種内ではあるが、ナラノキのほうが他の林分よりも seed shadow の重なりが大きかったことが考えられる。すなわち前世代の母樹密度が高かったといえる。この場合、上述の遺伝的多様性の中で考察した、ナラノキの現在の林分成立する由来となった母樹数が多かった可能性を支持することとなる。すなわち成熟段階が近いナラノキとカジザカの遺伝的多様性および遺伝構造の違いは、前世代の母樹数の違いではないかと考えられる。また、同種内でも更新形態が異なる場合、空間構造の有無も異なっている例も報告されている(Premoli and Kitzberger, 2005)。一方、Cavers ら(2005)は空間的遺伝構造を推定するには、SSR マーカー10 遺伝子座の場合、サンプル数が 100 以上であることが望ましいとしている。今回解析に用いた遺伝子座は 9、サンプル数が 67 と遺伝構造の検出には不十分であった可能性がある。また、ナラノキではサンプリング範囲が狭く、構造が存在したとしても、それを概観できないようにサンプリング領域が入り込んでしまっている可能性も考えられる。このことを検証するためには、より広範囲のサンプリングが必要であると考えられる。

空間的遺伝構造は前世代の母樹の密度と種子散布距離の影響を受ける(Hamrick *et al.*, 1993; Kalisz *et al.*, 2001)。種子散布距離は種特性であり、林分間で顕著な差はないと考えられる。したがって、林分間で異なるのは前世代の母樹の密度であるが、カジザカおよびマネザワの遺伝的構造は 10 あるいは 15m と同程度であったことから、両林分は前世代の母樹密度は同程度であったと考えられる。

一方、個体密度から算出したドウザワの平均個体間距離は約 22m である。そのため、仮にカジザカおよびマネザワと同程度の遺伝構造が過去に存在していたとしても、林分の成熟が進んで個体間距離が長くなったことにより、自ずから構造が崩壊した可能性が考えられる。あるいはナラノキと同様、そもそも構造が存在しなかった、またはサンプル数が不足していた、という可能性も否定することはできない。

以上のことから、暖温帯においてモミは林分の発達に伴い個体数密度が減少するため、おおよそ 90 本をひとつの林分とみなした場合、より大きな面積をひとつの林分と捉えることができる。このとき、林分の遺伝的多様性は成熟するに伴って高くなった。これ

は面積の効果と考えることができる。また、空間的遺伝構造が存在する林分が見られ、モミは林分内に空間的遺伝構造を形成しうる種であることが明らかとなった。他方、同程度の成熟段階にあっても、異なる遺伝的特性を示す林分も見られ、前世代の母樹密度が影響を与えているのではないかと推察された。

今後は、遺伝構造を検出するためのサンプリング方法に問題がある可能性が指摘されたナラノキの面積を広げたサンプリングにより、再度遺伝的構造の有無を検討する。また、空間的遺伝構造があるということは、近親個体間の繁殖が多く行われている可能性が考えらるため、本研究で対象としたような個体間距離が異なり空間的遺伝構造の有無も異なる林分において、次世代の遺伝的多様性がどのように異なるかを明らかにしていく予定である。

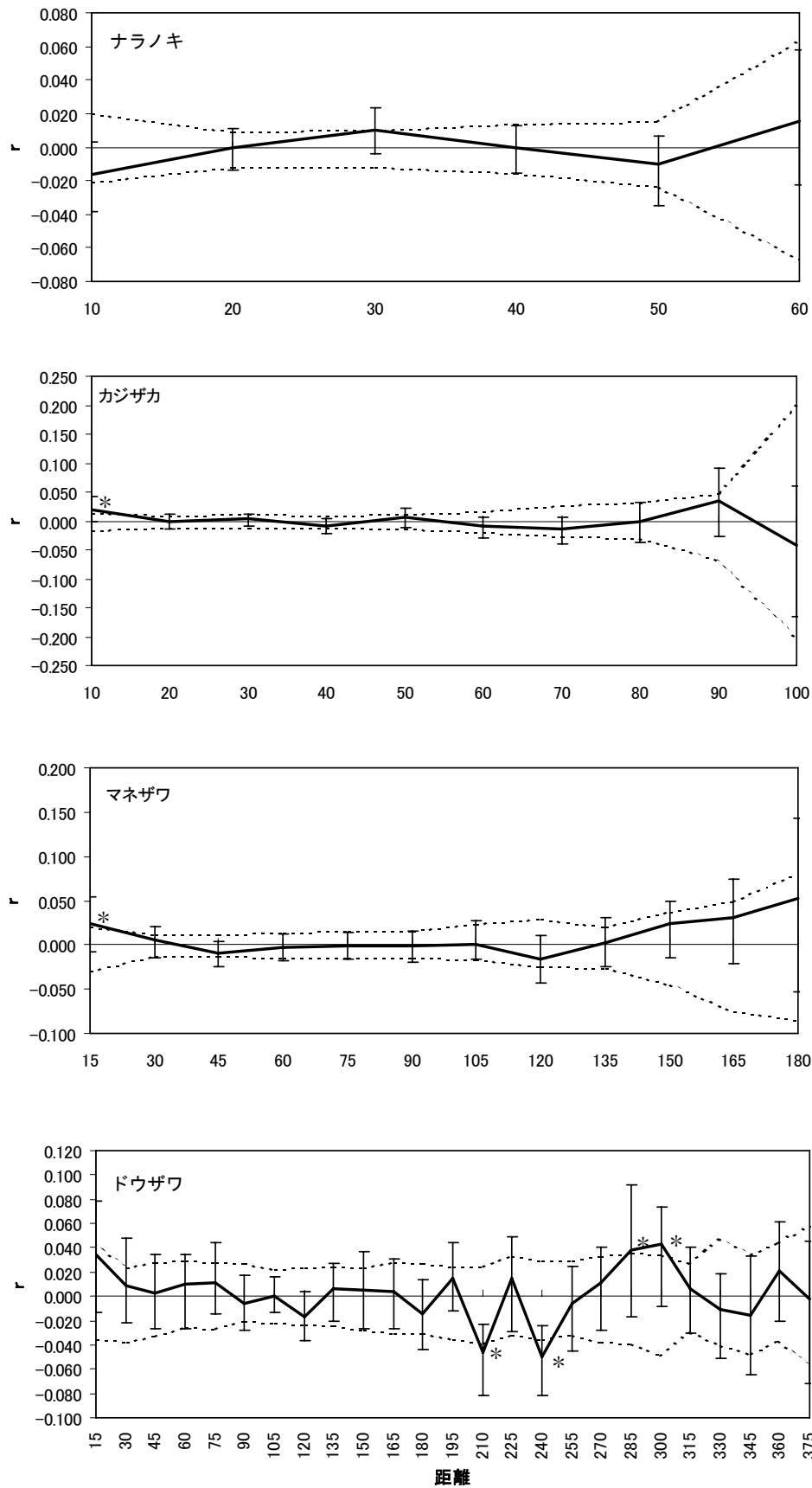


図 2 成熟段階の異なる 4 つのモミ林分における対立遺伝子の空間的自己相関係数 r (Smouse and Peakall, 1999) のコレログラム 実線は平均値、点線は 95% 信頼区間

引用文献

- 荒上和利(1987)九州中部山岳地帯におけるモミ・ツガ天然林の成立過程に関する研究
九大演報 57:17-108
- Buchert, G. P. Rajora, O. P., Hood, J. V. and Dancik, B. P. (1997) Effect of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. *Conservation Biology* 11:747-758
- Cavers, S., Degen, B., Caron, H., Lemes, M. R., Margis, R., Salgueiro, F., and Lowe, A. J. (2005) Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* 95:281-289
- Chung, M. Y. Epperson, B. K. and Chung, M. G. (2003) Genetic structure of age classes in *Camelia japonica*(Theaceae). *Evolution* 57:62-73
- El-kassaby, Y. A., Dunsworth, B. G. and Krakowski, J. (2003) Genetic evaluation of alternative silvicultural systems in coastal montane forests: western hemlock and amabilis fir. *Theor. Appl. Genet.* 107:598-610
- Epperson, B. K. (1989) Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evol. Biol.* 27:95-155
- Gomory, D. (1992) Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology and Management* 54:215-223
- Goudet, J. (2001) FSTAT; a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3.
<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hamrick, J. L., Murawski, D. A. and Nason, J. D. (1993) The influences of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* 107/108:281-297
- Hansen, O. H., Vendramin, G. G., Sebastiani, F. and Edwards, K. J. (2005) Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus *Molecular Ecology notes* 5:784-787
- Jones, F. A., Hamrick, J. L., Peterson, C. J. and Squiers, E. R. (2006) Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within population of *Pinus strobus* and *Quercus rubra*. *Molecular Ecology* 15:851-861
- 蒲谷肇(1974)房総丘陵におけるモミ・ツガ天然林の分布変遷と保護 第21回日本生態学会講演要旨集 p83
- 蒲谷肇(1975)房総丘陵の植生に関する生態学的研究I モミ・ツガ天然林の分布と構造 東大演報 67:51-62

- 梶幹男(1975)房総半島におけるモミ林の生態的位置に関する研究. 東大演報 68:1-23
- Kalisz, S., Nason, J.D., Hanzawa, F.A. and Tonsor, S.J. (2001) Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*; the role of dispersal, mating, history and selection. *Evolution* 55:156-1568.
- Lian, C., Oishi, R., Miyashita, N., Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z. and Hogetsu Taizo (2003) Genetic structure and reproduction dynamics of *Salix reinii* during primary succession on Mount Fuji, as revealed by nuclear and chloroplast microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12 :609-618
- 岡野哲郎・荒上和利(1999)九州山地のモミ・ツガ天然林における 12 年間の林分構造の変化 日林誌 81:1-9
- 大沢雅彦(1988)清澄山の植物 日本の生物 2:35-40
- 尾崎煙雄・大沢雅彦(1988)上部暖温帯における地形的群落とモミ・ツガの位置 第 35 回日本生態学会大会講演要旨集 p50
- Premoli, A.C. and Kitzberger, T. (2005) Regeneration mode affects spatial genetic structure of *Nothofagus dombeyi* forests. *Molecular Ecology* 14:2319-2329
- Rajora, O.P. Rahman, M.H. Buchert, G.P. and Dancik, B.P. (2000) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology* 9:339-348
- Saito, Y., Lian, C.L., Hogetsu, T. and Ide, Y. (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* and interspecific amplification in other Japanese *Abies* species. *Molecular Ecology notes* 5:234-235
- Smouse, P. E., and Peakall, R. (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82:561-573
- Smouse, P. E., and Peakall, R. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295
- Sokal, R.R. and Jacquez, G.M. (1991) Testing inferences about microevolutionary processes by means of spatial autocorrelation analysis. *Evolution* 45:152-168
- 鈴木英治(1984)暖温帯におけるモミ・ツガ林の更新 遺伝 38:56-61
- 鈴木誠(2002)千葉演習林におけるモミ林の更新と生育事例 平成 11 年度～13 年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))成果報告書 代表 井出雄二「暖温帯における生物の種及び遺伝的多様性の総合的評価」 p2-16
- 高杉欣一(1974)千葉演習林沿革史資料(1) 演習林 18:46-51
- 吉井義次・吉岡邦二(1951)日本植物群落の断面 II 生態学研究 12:71-78

東京大学北海道演習林の天然林択伐が トドマツの遺伝的多様性に与える影響

井出雄二・綿野好則・津田吉晃・高橋康夫・後藤 晋・齊藤陽子

はじめに

木材は再生産可能な資源として、近年の地球温暖化との関連から注目されているが、木材の大部分は未だ天然林の伐採に依存しているのが現状である。こうした中で、天然林資源を有効かつ持続的に利用しながら、森林生物の多様性の保全も図ろうとする新たな森林施業への取り組みが行なわれ始めている。

生物の多様性は、遺伝子・種・生態系・景観の4つのレベルで理解されるが、特に遺伝的多様性は、その種の個体群が存続していくために基盤となる重要な要素である(樋口 1996)。そのため、持続的な天然林の利用のための森林管理においては、遺伝的多様性の維持に配慮した森林管理法の確立が必須である。

これまで、こうした観点から森林経営や施業が遺伝的多様性に与える影響について様々な研究が行われてきた。これらの結果から、人工植栽や林分の大部分を伐採するような方法では遺伝的多様性が低下すること(Gömöry, 1992, Buchert *et al.*, 1997, Rajora *et al.*, 2000)、天然更新施業や低い伐採率での択伐では、結果は複雑であり、高い伐採率の下でも遺伝的多様性への影響が見られない樹種がある(Rajora *et al.*, 2000) 一方、30%程度の比較的低い伐採率でも遺伝的多様性への影響が見られる樹種があること(El-Kassaby *et al.*, 2003)、さらに繁殖様式による違いが見られることもなどが認められている(Obayashi *et al.*, 2002,)。いずれにせよ施業が森林の遺伝的多様性に及ぼす影響が少なからず報告されている以上、遺伝的多様性維持を意識した森林管理が継続して行われる必要がある。

ところで、東京大学北海道演習林においては、これまで50年余りにわたって、持続的な収穫を目指した天然林施業が行われ、その成果は高く評価されている。

林分施業法は、異なった林齢からなる多層の森林を創生すること、および大きい蓄材積現存量を維持しながら木材の生産性を高めることである。これにより、質の高い木材の安定的な供給を目指している。伐採は択伐が基本であり、回帰年8~10年(8~10年間隔)で老齢木を除去することにより材積の13~17%を収穫している。択伐林分では、菌害木、形質不良木、成長阻害木、老齢過熟木等を成長量に見合った分だけ伐採している。こうした、長期にわたる一貫した方針のもとに実施され、高密度路網の設置により低伐採率による経営が為されていること、立地ごとに地表処理や補植などの確実な更新法を採用したことなどから、一般的な択伐作業・傘伐作業とは異なった天然林施業技術を確立している。

しかし、多様性維持上で問題がないわけではない。林分施業法の実行過程で見られる

種構成・齢構成の変動に伴って、補植林分では優良個体だけが保全され、樹群としての健全性が阻害されている。補植林分や択伐林分において、針葉樹の成長を促すため優良広葉樹の小径木の残置・保育がおろそかになった。などの施業上の問題が生じている(渡邊, 2003)。また、伐採に伴うヤツバキクイムシの密度の増大、エゾマツ更新の不確実性(Nakagawa *et al.*, 2001)、トドマツの更新木の成長やギャップへの補植による若木個体数の増大、などのために、エゾマツ蓄積の極端な減少、トドマツ本数・蓄積の増大(北畠ら 2003)、といった林分内容の変化が起こっている。

特に、遺伝的多様性の点から林分施業法を見てみると、択伐は不良木を中心として行なわれるため、人為による淘汰圧が一定方向に働いている可能性があり、保存林分と比較して択伐林分の遺伝的組成が変化したり、遺伝的多様性が低下したりする恐れがある。保存林と択伐林における実生とその母樹の遺伝的多様性の違いについてアロザイムマーカールを用いた研究の結果、択伐によりホモ個体が淘汰され、林分のヘテロ接合度の観察値(H_0)は高まるが、潜在的な遺伝的多様性(H_E)を減少させている可能性があることが指摘されている(高橋 1997; 木佐貫ら 1999)。また、択伐林において林班により延べ択伐率・択伐回数が異なることから、その影響も無視できない。

そこで、本研究ではその主要な構成樹種でありかつ伐採量も多いトドマツを対象に、主として施業、特に択伐がその遺伝的多様性の及ぼす影響を評価しようと試みた。

1. 択伐林分と保存林分の比較

調査地と方法

東京大学北海道演習林内には、面積は少ないが施業がほとんど行なわれていないほぼ自然状態の保存林が設定されている。調査地として保存林から3ヶ所選択し、それに隣り合う択伐林を3ヶ所を設定した(表-1)。

表-1 調査林分の概況

林種	名称	林小班	標高(m)	平均 DBH±S.D.(cm)	植生概況*
保存林	Pr1	6a	440-460	42.33±10.1	トドマツ、エゾマツ、シナノキ、 924 本/ha、460m ³ /ha、NL 比=64 : 36
	Pr2	7c	690-720	45.48±12.5	資料なし
	Pr3	7b	550-570	41.43±7.7	トドマツ、エゾマツ、シナノキ、 852 本/ha、419m ³ /ha、NL 比=66 : 34
択伐林	Se1	4a	430-440	46.64±10	トドマツ、シナノキ、イチイ、 12,557 本/ha、122m ³ /ha、NL 比=67 : 33
	Se2	7c	660-690	37.61±8.8	資料なし
	Se3	7b	530-550	41.40±12.1	トドマツ、エゾマツ、シナ類、 522 本/ha、277m ³ /ha、NL 比=71 : 29

*演習林の毎木調査資料によった。

各調査地において、約 4ha のプロットを設定し、30m以上の間隔において DBH25cm 以上のトドマツ 32 個体をランダムに選び、それぞれ針葉を採取した。採取した針葉は

シリカゲルを用いて乾燥保存し実験に供した。

採取した針葉から改変 CTAB 法 (Lian 2003) を用いて DNA を抽出し、PCR のテンプレートとした。トドマツの核 SSR 4 マーカー (Lien *et al.* unpublished)、モミの核 SSR 1 マーカー (Saito, Y. *et al.* 2005) およびクロマツの葉緑体 SSR 2 マーカー (Vendramin, G. G. *et al.* 1997) を用いて PCR を行い、ABI 社の Genetic Analyzer3100 およびその多型解析ソフト Gene Mapper を用い電気泳動および遺伝子型を決定した。

核 SSR における集団内の遺伝的多様性を示す統計量としては、対立遺伝子多様度 (A_R) (El Mousadik & Petit 1996)、稀な対立遺伝子数 (頻度 5% 以下) (R_A)、集団固有の対立遺伝子数 (P_A)、ヘテロ接合度の観察値 (H_O)、遺伝子多様度 (H_E)、集団内の任意交配からのずれを示す近交係数 (F_{IS}) (Weir and Cockerham 1984) を算出した。集団間の遺伝的変異の統計量としては、集団間の遺伝的分化程度を示す G_{ST} 、 F_{ST} 、および Stepwise Mutation Model (Goldstein *et al.* 1995) に基づいた遺伝子分化係数 R_{ST} (Slatkin 1995) により評価した。さらに、 H_s と H_t を求め、それらから遺伝的分化係数 G_{ST} 、 F_{ST} を求めた。

葉緑体 SSR における集団内の遺伝的多様性の統計量としては、検出されたハプロタイプ頻度から対立遺伝子多様度 (A_R)、稀なハプロタイプ数 (頻度 5% 以下) (R_H)、集団固有のハプロタイプ数 (P_H)、遺伝子多様度 (H) を算出した。集団間の遺伝的変異の統計量としては、 G_{ST} 、 F_{ST} 、 R_{ST} により評価した。

結果

どの集団もトドマツやエゾマツが優占し、NL 比もおおよそ 7 : 3 と針葉樹の割合が高かった。また材積は、保存林の平均 439.5 m³/ha に対して択伐林が平均 199.5 m³/ha と著しく低かった。これは伐採によるものと考えられる。調査個体の平均 DBH は各集団ほぼ同様の値を示した (表-1)。

核 SSR について、集団内、集団間の遺伝的多様性の統計量を表-2 および表-3 に示す。保存林、択伐林それぞれの平均値を比較すると、遺伝子多様度 H_E はほぼ同様の値を示し、近交係数は択伐林で低かったが、他の指標は択伐林で高かった (表-2)。しかし、いずれの指標においても、t 検定の結果その差は有意とはいえなかった。分集団内の遺伝子多様度 H_s 、全集団の遺伝子多様度 H_t とともに 0.823 と、両者は全く同じ値を示した。また、遺伝子分化係数 G_{ST} 、 F_{ST} 、 R_{ST} はそれぞれ $G_{ST}=0.000$ 、 $F_{ST}=0.000$ 、 $R_{ST}=-0.003$ となり、集団間に遺伝的分化はみられなかった (表-3)。

葉緑体 SSR の分析の結果、2 遺伝子座の組み合わせにより 53 個のハプロタイプが検出された。ハプロタイプ頻度から求めた各集団の遺伝的多様性の統計量を表-3、表-4 に示す。表-4 から、ハプロタイプ多様度 A_H の平均値は保存林で高く、遺伝子多様度 H は保存林のほうが低い値を示したが、これらの差は t-検定の結果有意とはいえなかった。また、表 III-3 から分集団内の遺伝子多様度 H_s は 0.970、全集団の遺伝子多様度 H_t は

0.972 とほぼ同じ値を示した。また、遺伝子分化係数 G_{ST} 、 F_{ST} 、 R_{ST} はそれぞれ $G_{ST}=0.002$ 、 $F_{ST}=0.004$ 、 $R_{ST}=-0.008$ となり、集団間の遺伝的分化は認められなかった。

表-2 保存林と隣接択伐林における核 SSR の集団内変異

集団	N	$A_{[32]}$	R_A	P_A	H_O	H_E	F_{IS}
Pr1	32	12.6	38	2	0.781	0.822	0.050
Se1	32	11.6	31	1	0.794	0.802	0.010
Pr2	32	12.8	38	4	0.756	0.824	0.083
Se2	32	14.8	48	9	0.744	0.837	0.112*
Pr3	32	11.6	30	1	0.725	0.823	0.119*
Se3	32	11.8	30	1	0.794	0.833	0.047
保存林平均	32	12.3	35	2	0.754	0.823	0.067
択伐林平均	32	12.7	36	4	0.777	0.824	0.029

* <0.05

N：サンプル数、 $A_{[32]}$ ：対立遺伝子多様度、 R_A ：稀な対立遺伝子数（頻度 5%以下）、 P_A ：集団固有の対立遺伝子数、 H_O ：ヘテロ接合度の観察値、 H_E ：遺伝子多様度、 F_{IS} ：近交係数

表-3 核 SSR の各遺伝子座および葉緑体 SSR はプロタイプにおける集団間分化度

遺伝子座	F_{IS}	H_O	H_S	H_T	D_{ST}	G_{ST}	F_{ST}	R_{ST}
As08	0.083	0.729	0.795	0.795	0.000	0.000	0.000	0.000
As13	0.043	0.885	0.925	0.925	0.001	0.001	0.001	-0.006
As16	0.027	0.896	0.920	0.921	0.000	0.000	0.001	-0.004
As32	0.037	0.807	0.839	0.839	0.000	0.000	0.001	-0.004
Af13	0.198	0.510	0.636	0.635	-0.001	-0.001	-0.003	0.001
平均	0.070	0.766	0.823	0.823	0.000	0.000	0.000	-0.003
cpSSR			0.970	0.972	0.002	0.002	0.004	-0.008

表-4 保存林と隣接択伐林における葉緑体ハプロタイプの集団内変異

集団	N	A _H	R _H	P _H	H
Pr1	32	23	16	4	0.976
Se1	32	23	15	4	0.978
Pr2	32	24	20	5	0.964
Se2	32	22	17	2	0.966
Pr3	32	21	15	2	0.948
Se3	32	22	16	2	0.970
保存林平均	32	22.7	17	4	0.963
択伐林平均	32	22.3	16	3	0.971

N：サンプル数、A_H：ハプロタイプ多様度、R_H：稀なハプロタイプ数（頻度 5%以下）P_H：集団固有のハプロタイプ数、H：遺伝子多様度

考察

高橋（1997）はアイソザイム遺伝子において、有効な対立遺伝子数において、保存林 1.32、択伐林 1.22、と保存林の方が大きく、また、ヘテロ接合度の観察値が択伐林で高く、遺伝子多様度は保存林の方が高かったことから、択伐によるホモ個体淘汰によるヘテロ接合度の観察値の増加と、遺伝的多様性低下の可能性を指摘した。しかし、核 SSR の結果からは、いずれの指標においても保存林と択伐林の間に有意な差は認められず、択伐が及ぼす影響はほとんどないものと考えられた。同様に、葉緑体 SSR の結果についても、いずれの統計量にも有意な差は見られなかった。さらに、集団間の遺伝的変異についても核 SSR・葉緑体 SSR のいずれにおいても遺伝的分化はみられなかった。

これらから、施業による遺伝的多様性への明確な影響は認められず、演習林で行なっている 20%以下の弱度の伐採率での施業では遺伝的多様性への影響が少ないものと考えられた。Obayashi *et al.*（2002）は *Shorea curtisii* の林において、伐採率 30%の択伐プロットの遺伝的多様性が非施業プロットのそれと同程度であったとしている。また、El-Kassaby *et al.*(2003)は、*Abies amabilis* 林において、50%を超える高い伐採率でも遺伝的多様性に違いが見られなかったことを示している。

北海道演習林のトドマツは非常に高い集団内の遺伝的多様性をもつため、施業により多少の個体が間引かれたとしても遺伝的多様性において、違いが明確になりにくいといえる。伐採の影響は繁殖様式への影響を通じて次世代において顕著になる可能性がある。本研究では DBH 25cm 以上の成木を供試したが、今後、若齢木を対象とした調査により、施業が遺伝的多様性へ与える影響を明確にする必要がある。

2. 択伐率の異なる林分間の比較

調査地と方法

東京大学北海道演習林の標高 600m 以下の地域において、林分の施業履歴をもとに延べ択伐率と施業以前の立木密度を算出しその関係について調べた。そのうち施業以前の

立木密度が 1,500m³/ha 前後で、述べ択伐率が異なる 7 集団を選び核 SSR および葉緑体 SSR の多様性を調査した。それらの施業履歴について表-5 に示す。サンプルの採取ならびに DNA 分析法、多様性解析法は、前項と同様とした。

表-5 択伐率の異なる林分間の比較に供した集団の概況

集団	林小班	標高(m)	調査 個体 数	延べ択 伐率(%)	択伐 回数	立木密度(本/ha)		優占種および NL 比
						現在	施業前*	
Lo11	50c	400-430	32	24.06	2	415	1722.3	トマツ、エゾマツ、78 : 22
Lo10	48c	520-530	32	34.33	2	502	1462.0	シナノキ、トマツ、エゾマツ、 71 : 29
Lo12	95a	440-510	32	43.72	3	752	1720.0	トマツ、エゾマツ、シナノキ、 61 : 39
Lo3	33b	410-440	32	46.11	4	774	1677.6	トマツ、イタヤ、ホノキ、35 : 65
Lo8	3c	540-560	32	48.97	5	741	1512.9	エゾマツ、トマツ、ウダカソ バ、28 : 72
Lo2	81a	530	32	50.12	4	832	1659.9	トマツ、シナノキ、イタヤカエデ、 38 : 63
Lo9	18a	490-510	32	50.28	5	684	1359.7	トマツ、エゾマツ、40 : 60

*現在の立木密度と延べ択伐率から計算

結果

分析に用いた集団の施業履歴について見ると、延べ択伐率は 24.06～50.28% で平均値は 42.51% であった。また択伐回数は 2～5 回、平均 3.6 回であった。また、現在の延べ択伐率から推定される密度と施業開始以前の立木密度は 1359.7～1722.3 本/ha、平均 1587.8 本/ha であった（表-5）。

核 SSR の集団ごとの遺伝的多様性の統計量を表-6 に示す。全ての集団で近交係数 F_{IS} の 0 からの有意な偏りは見られず、任意交配集団とみなすことが出来た。遺伝子多様度 H_E は 0.820～0.856 と、どの集団においても大きな違いは認められなかった。対立遺伝子多様度、希な対立遺伝子数、集団固有の対立遺伝子数は、集団によって大きく異なる場合が認められたが、これらと延べ択伐率、択伐回数、現在および施業前の立木密度との相関係数を求めたところ、何れも有意な相関は認められなかった。

葉緑体 SSR 集団内多様性については、2 遺伝子座の組み合わせにより 60 のハプロタイプが検出された。このハプロタイプ頻度から求めた遺伝的多様性の統計量を表-7 に示す。遺伝子多様度は 0.942～0.978 で、どの集団も同程度であったが、対立遺伝子多様度、希なハプロタイプの数および集団固有のハプロタイプ数は集団によりバラバラが見られた。しかし、これらについても核 SSR の場合と同様に、延べ択伐率、択伐回数、現在および施業前の立木密度との相関係数を求めたところ、何れも有意な相関は認められなかった。

表-6 択伐率の異なる林分における核 SSR5 遺伝子座の集団内変異

集団	延べ択伐率(%)	N	$A_{[32]}$	R_A	P_A	H_O	H_E	F_{IS}
----	----------	---	------------	-------	-------	-------	-------	----------

Lo11	24.06	32	12.4	36	4	0.775	0.820	0.054
Lo10	34.33	32	13.4	36	4	0.781	0.840	0.070
Lo12	43.72	32	13.6	40	1	0.812	0.846	0.039
Lo3	46.11	32	13.6	40	2	0.781	0.856	0.087
Lo8	48.97	32	12.0	29	0	0.788	0.822	0.041
Lo2	50.12	32	13.8	43	1	0.775	0.825	0.060
Lo9	50.28	32	14.8	50	5	0.787	0.820	0.040

N：サンプル数、 $A_{[32]}$ ：対立遺伝子多様度、 R_A ：希な対立遺伝子数（＜5%）、 P_A ：集団固有の対立遺伝子数、 H_O ：ヘテロ接合度の観察値、 H_E ：遺伝子多様度、 F_{IS} ：近交係数

表-7 択伐率の異なる林分における葉緑体ハプロタイプの集団内変異

集団	延べ択伐率(%)	N	A_H	R_H	P_H	H
Lo11	24.06	32	22.0	15	4	0.972
Lo10	34.33	32	17.0	10	0	0.942
Lo12	43.72	32	22.0	15	3	0.970
Lo3	46.11	32	23.0	18	2	0.972
Lo8	48.97	32	22.0	14	4	0.976
Lo2	50.12	32	21.0	12	2	0.974
Lo9	50.28	32	24.0	19	6	0.978

N：サンプル数、 A_H ：ハプロタイプ多様度、 R_H ：希なハプロタイプ数（＜5%）、 P_H ：集団固有のハプロタイプ数、 H ：遺伝子多様度

考察

核および葉緑体 SSR の集団ごとの多様性の結果から、いずれの多様性の指標においても択伐率や択伐回数との有意な相関は認められず、本研究の範囲では択伐率に違いによって、遺伝的多様性に影響が生じる恐れはないと考えられた。Rajora *et al.* (2000) は老齡ストローブマツを対象に、核 SSR マーカールを用いて施業による遺伝的多様性の変化を調べた。その結果、林分密度が 75%減少した場合、対立遺伝子数が 26%、頻度 1～25%の対立遺伝子数が 21%、希な対立遺伝子数（＜1%）が 92%減少しており、特に、希な対立遺伝子数の減少に対して、伐採の影響が顕著に現れた。本研究の場合、各集団における希な対立遺伝子の割合は 50%を超えており、今後、択伐の影響が現れるとすれば、まず、この変化が起るものと推定されるが、これまでのところ北海道演習林においてそのような影響は認められないと判断できる。

引用文献

- Buchert, G.P., Rajora, O.P., Hood, J.V. and Dancik, B.P. (1997) Effects of harvesting on genetic diversity in old-growth eastern white pine in Ontario, Canada. *Conservation Biology*, 11 (3): 747-758.
- El Mousadik, A. and Petit, R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 832-839

- El-Kassaby, Y.A., Dunsworth, B.G. and Krakowski, J. (2003) Genetic evaluation of alternative silvicultural systems in coastal montane forests: western hemlock and amabilis fir. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 598-610.
- Goldstein, D.B., Linares, A.R., Cavalli-Sforza, L.L. and Fedman, M.W. (1995) An evaluation of genetic distance for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471
- Gömöry, D. (1992) Effect of stand origin on the genetic diversity of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations. *Forest Ecology and Management*, 54: 215-223.
- 木佐貫博光・高橋瑞樹・井出雄二 (1999) 東京大学北海道演習林における択伐施業がトドマツ集団の遺伝的変異に与える影響. 北海道の林木育種, Vol.42, No.2: 11-14.
- 北畠琢郎・後藤晋・高橋康夫・笠原久臣・犬飼雅子 (2003) 冷温帯針広混交林における択伐施業がトドマツの個体群動態に及ぼす影響. 日本林学会誌, 85(3): 252-258.
- Lian, C., Miwa, M. and Hogetsu, T. (2001) Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity*, 87: 88-98.
- Nakagawa, M., Kurahashi, A., Kaji, M. and Hogetsu, T. (2001) The effects of selection cutting on regeneration of *Picea jezoensis* and *Abies sachalinensis* in the sub-boreal forests of Hokkaido, northern Japan. *Forest Ecology and Management*, 146: 15-23.
- Obayashi, K., Tsumura, Y., Ihara-Ujino, T., Niiyama, K., Tanouchi, H., Suyama, Y., Washitani, I., Lee, C.-T., Lee, S.L. and Muhammad, N. (2002) Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. *International Journal of Plant Sciences*, 163 (1): 151-158.
- Rajora, O.P., Rahman, M.H., Buchert, G.P. and Dancik, B.P. (2000) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobes*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology*, 9: 339-348.
- Saito, Y., Lian, C.L., Hogetsu, T. and Ide, Y. (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* and interspecific amplification in other Japanese *Abies* species. *Molecular Ecology Notes*, 5: 234-235.
- Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, 139: 457-462.
- 高橋瑞樹 (1997) 東京大学北海道演習林におけるトドマツ天然集団におけるアイソザイム変異に関する研究. 東京大学農学生命科学研究科修士論文, 108pp.
- Vendramin, G.G. and Ziegenhagen, B. (1997) Characterisation and inheritance of polymorphic plastid microsatellites in *Abies*. *Genome*, 40: 857-864.

渡邊定元 (2003) 天然林施業技術の評価と課題－天然林施業が定着できずに森林劣化が起こった技術的問題点の総括－. 日本林学会誌, 85 (3): 273-281.

Weir, B.S. and Cockerham, C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

景観スケールにおけるアカエゾマツ集団の

遺伝的多様性と遺伝構造

後藤 晋・津田吉晃・小池征寛・井出雄二

1. はじめに

近年、アロザイムや DNA などの遺伝マーカーを利用して、様々な植物種の遺伝的多様性や遺伝構造が調査されている(Hamrick et al.1992). 我が国の樹木種についても、天然分布域全体を対象とした集団遺伝学的研究が進められ、ある程度の知見が集約されつつある(例えば, Tomaru et al. 1997; 津村 2001; Tsuda & Ide 2005). 一般に、樹木種は花粉や種子の交流範囲も広く、集団内の遺伝的多様性が高く、集団間の遺伝的分化度は低い傾向にある(Hamrick et al. 1992). 当初は、地域個体群の中に遺伝的な違いは少ないと考えられてきたが、マイクロサテライトなどの解像度の高いマーカーの普及によって、対象樹種の分布変遷や生活史によっては、森林集団内でも遺伝的な構造が生じることが明らかになってきた(Takahashi et al. 2000; Ueno et al. 2002 など). このような種特性だけでなく、択伐、植栽などの森林施業も樹木集団の遺伝的多様性や構造に大きな影響を与える(Rajora 1999; Rajora et al. 2000; Obayashi et al. 2001). 択伐―天然更新を基調とした天然林施業では、施業対象樹種の健全な繁殖や更新が可能となるように、集団の遺伝的多様性を維持していく必要がある. また、人工造林や地はぎなどの人為的な更新補助作業によって次世代を育成する場合にも、植栽する種苗の遺伝的な多様性が一定レベル以上であること、またその遺伝的構成が周囲の天然林とそれと大きく異ならないことが重要である(Montalvo et al. 1997; Montalvo & Ellstrand 2000; Goto et al. 2004). これを実現するためには、施業対象なる景観スケールでの遺伝的多様性や構造に関する知見が不可欠であるが、このようなスケールでの研究は意外と少ない.

我が国のような山岳地帯では、同一景観スケール内であってもかなりの標高差が生じ、標高による環境勾配(クライン)が発生することがある. 特に、高標高域では、強風や乾燥、霜を伴う低温、雪などの物理条件が厳しく、植物の個体群動態や生活史にも大きな影響を与える(Premoli et al. 2003; Green 2005). また、標高が異なると、開芽や開花などの植物季節が大きく変化することがある(Schuster et al. 1989; Jordano & Godoy 2000). このような条件では、比較的狭い地域内であっても、遺伝的交流が起こりにくくなり、標高による遺伝的な分化(倉橋・濱谷 1981; Premoli 2003; Maghuly et al. 2005)が発生しやすくなると考えられる.

アカエゾマツは主に北海道や樺太などに天然分布する針葉樹であり(館脇, 1943)、北海道以南では岩手県の早池峰山に隔離個体群があるのみである(Ishizuka 1961). 本種は、

特殊な環境要因に純林のような状態で成立することが多く、館脇(1943)はこれらを湿原系、蛇紋岩系、火山灰礫地系など 6 つに分類した。雌阿寒岳や十勝岳山麓には高山帯に矮化した大きな個体群が見られるが(松田 1989)、これもアカエゾマツ特有の分布形態の一つといえるだろう。アカエゾマツの材質は極めて緻密で、ピアノの響板やバイオリンなど楽器材としても賞用されており、重要な林業樹種となっている。また、最近では、造林樹種としての人気が高く、事業的な規模で造林が行われている(岡田 1975)。アカエゾマツの遺伝的変異については、道内各地から採種・育成した種苗を用いた産地試験によって、苗高と開葉時期(岡田, 1975)、成長と材の容積密度(飯塚ら, 2001)、枝枯れ等の被害状況(門松ら, 2001)についての報告がある。また、飯塚ら(1999, 2000)は、精英樹クローンの材質に関する調査を行っている。遺伝マーカーを用いた研究としては、Wang & Nagasaka (1997)が北海道に天然分布する 10 集団について、アロザイム 12 遺伝子座で集団遺伝学的解析を行っている。また、早池峰山に隔離分布する個体群内については、マイクロサテライトマーカーを用いて吉丸ら(2003)が更新過程におけるジーンフローと遺伝的多様性についての報告を行っている。しかし、景観スケールでの遺伝的多様性や構造に関する知見はこれまで得られておらず、その実態は不明となっている。

北海道富良野に位置する東京大学大学院農学部附属演習林・北海道演習林(以下、演習林とする)は約 23,000ha の面積を有し、針葉樹と広葉樹が自然に混交する広大な天然林を有している。ここでは、その天然林を対象に林分施業法という独自の施業体系で持続的な森林の経営管理を行い、択伐―天然更新を基調とした天然林施業が毎年計画的に実行されている(Watanabe & Sasaki 1994)。アカエゾマツは当演習林においても重要な林業樹種であり、また個体数が少ないことから特に保続性を念頭においた択伐施業を行うことが必要とされている。一方、造林樹種としても重要な位置を占め、特に山火事や風害後の復旧造林では大規模な人工造林が実施されてきた。現在、北海道演習林では、比較的高標高の湿地帯から種子を採取し、造林用種苗を育成しているが、これらを様々な環境に植栽することの是非については検討を要する課題として認識されている。

本研究では、施業対象となる景観スケールに相当する北海道演習林の各地に分布するアカエゾマツの集団について、マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝解析を行い、遺伝的多様性や遺伝的構造について明らかにした。また、それらの知見をもとに、造林用種苗の採種源について考究した。

2. 調査地と方法

調査地とサンプリング

北海道の中央部である富良野市に位置する演習林内に点在するアカエゾマツ 12 集団合計 362 個体を調査対象とした (Table 1 ; Fig. 1). 本研究では, 1~5 ha 程度の面積に 30 個体以上のアカエゾマツ成木 (DBH>20 cm) が存在するものを集団とみ

Table 1. Allelic diversity of microsatellite markers overall san

Locus	k	H _O	H _E	PIC
GC1	13	0.775	0.792	0.766
CT1	3	0.470	0.501	0.432
GG3	24	0.840	0.905	0.897
pj05	10	0.301	0.366	0.338
pj07	10	0.548	0.678	0.642
pj08	13	0.556	0.648	0.608
pj13	10	0.733	0.788	0.760
Mean	11.9	0.603	0.668	0.635

なした. 各集団では, 隣接木を避けて, 個体間距離がなるべく 20m 以上になるようにランダムに針葉のサンプリングを行った. 調査対象木は, ナンバーテープを付けるとともに, GPS 受信機 (Venture, Garmin 社) で個体位置を特定し, 直径テープで胸高直径 (DBH) を測定した. 集団の位置座標や標高は, 集団ごとに全調査個体の平均値を求めて, 各集団の代表値とした. 標高は低標高の神社山 (JJY : 296m) から大麓山山頂付近 (DTP : 1449 m) まで 1000m 以上の標高差があった. 地理的距離は, 最も近い大麓山山頂付近 (DTP) と大麓山登山口 (DTE) で 0.5 km, 最も遠い大麓山山頂付近 (DTP) と神社山 (JJY) で 19.7km であった. 各集団については, 調査範囲地内の現存する大体の個体数 (Na) を踏

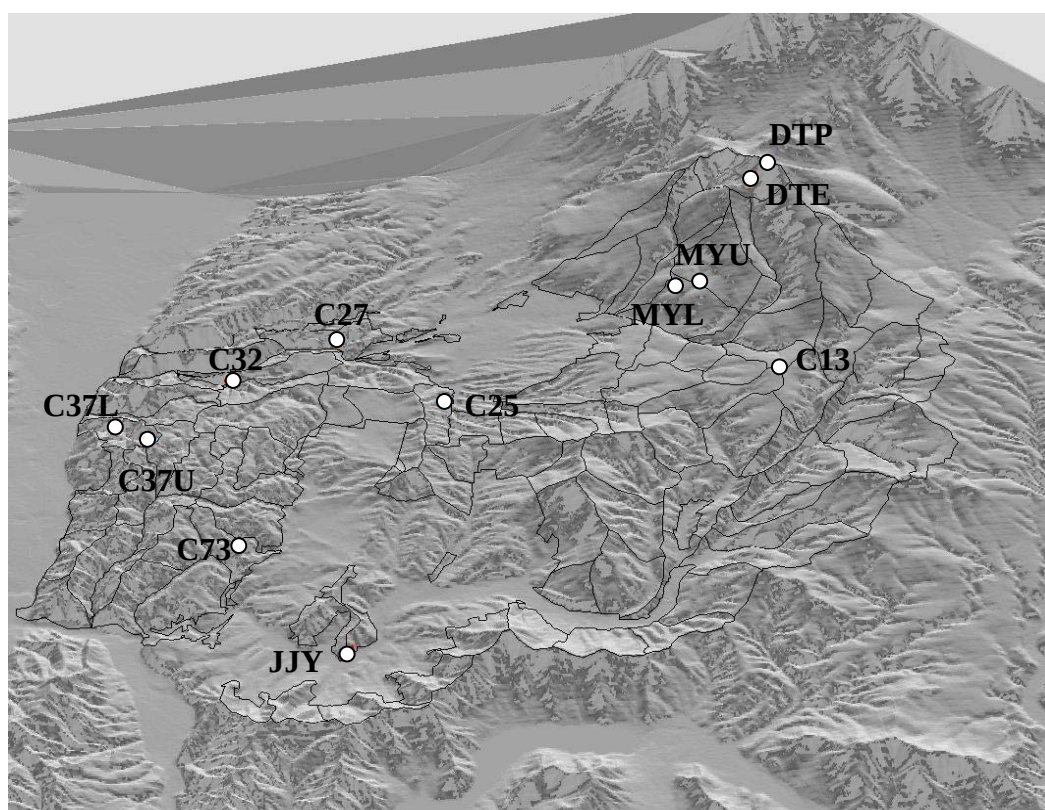


Fig.1 Location of 12 populations surveyed in this study.

査によって推定し、また集団のタイプを湿地帯 (Swamp)、蛇紋岩地帯(Alkaline soil)、高山帯(High Altitude)、火山礫地帯(Tuff)の 4 タイプに分類した。

マイクロサテライト分析

採取した針葉サンプルは、シリカゲルを入れて室温で十分に乾燥させた後、トミー精工の MicroSmash で粉砕し、キアゲン社の DNeasy Plant Mini Kit を用いて DNA 抽出を行った。PCR 反応は、キアゲン社の Multiplex PCR キットを用いて PCR 増幅し、Prism 3100 Genetic Analyzer で泳動を行い、GeneScan ソフトウェア (ABI) を用いて遺伝子型のタイピングを行った。PCR のアニーリング温度は 60°C、サイクル数は 35 サイクルとした。使用したプライマーは GC1, CT1, GG3 (Pfeiffer et al. 1997), pj03, 05, 07, 13 (Lian et al. 未発表) の 7 種類である。

データ解析

全サンプルを用いて、アレル数、ヘテロ接合度 (観察値と期待値)、固定指数 (FIS), PIC (Polymorphic Information Content) を計算した。また、集団ごとの遺伝的多様性のパラメータとして、アレル数 (k), Allelic Richness (El-Mousadik & Petit 1996), ヘテロ接合度の期待値 (H_E , Nei 1987), F_{IS} を各遺伝子座について Fstat ver. 2.9.3 (Goudet 2001) を用いて計算し、7 遺伝子座の平均値を集団の代表値とした。また、各集団が過去にボトルネックを受けたかどうかについて、コンピュータプログラム BOTTLENECK ver 1.2.02 (Piry et al. 1999) を用いて推定した。これらの推定では、IAM と SMM の 2 つのモデルを仮定し、さらに Sign 検定 (Cornuet & Luikart 1996) と Wilcoxon 検定 (Piry et al. 1999) の 2 つの手法で有意確率を求めた。集団間の分化程度について、全体の F_{ST} および集団総当りの F_{ST} (Weir & Cockerham 1984) を Fstat を用いて算出し、距離による隔離が起こっているかどうかについて、コンピュータプログラム GeneAlex ver. 5.1 (Peakall & Smouse 1999) を用いて $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ と地理的距離の対数変換値の相関関係を求めた。また、各集団の遺伝的な関係について、遺伝距離 D_A (Nei et al. 1983) を用いて近隣結合法に基づき系統樹を作成した。

3. 結果

使用した 7 遺伝子座の遺伝的変異性

全データセットを用いて 7 プライマーのアレル多様性を評価した (Table 2)。アレル数は 3~24 で平均 11.9、ヘテロ接合度の期待値は 0.366~0.905 で平均 0.668、PIC は 0.338~0.897 で平均 0.635 であり、詳細な解析に十分な多型性を有していた。また、ハーディワインベルグ平衡からの有意な偏りは認められなかった。

Table 2. Description of *Picea glehnii* populations used in this study

	Population	Type	Alt.	Latitude	Longitude	Na	No. sampled	Mean DBH
1	DTE	High Alt.	1229	43.338	142.626	800	30	44.0
2	C13	Swamp	731	43.278	142.624	150	30	42.2
3	MY	Swamp	689	43.311	142.604	250	30	50.0
4	MYL	Swamp	619	43.311	142.596	300	30	42.4
5	JJY	Tuff	296	43.202	142.479	60	36	28.2
6	DTP	High Alt.	1449	43.340	142.632	200	32	8.3
7	C27	Tuff	345	43.305	142.483	60	32	38.5
8	C37U	Alkalic soil	508	43.271	142.421	40	30	41.7
9	C37L	Alkalic soil	330	43.279	142.410	60	30	38.2
10	C32	Tuff	386	43.292	142.448	100	29	40.2
11	C25	Tuff	338	43.280	142.517	60	30	45.5
12	C73	Tuff	306	43.228	142.447	30	23	30.2

Table 3. Averages of genetic diversity parameters within populations

	Population	k	Ar	H _E	F _{IS}
1	DTE	7.000	6.695	0.641	0.056
2	C13	5.429	5.194	0.611	0.049
3	MY	6.429	6.126	0.627	0.070
4	MYL	7.143	6.712	0.667	0.115
5	JJY	6.714	5.924	0.656	0.063
6	DTP	7.571	7.066	0.692	0.032
7	C27	6.857	6.501	0.632	0.118
8	C37U	6.857	6.468	0.653	0.030
9	C37L	6.857	6.420	0.641	0.094
10	C32	7.000	6.729	0.696	0.093
11	C25	7.000	6.524	0.634	0.077
12	C73	6.571	6.571	0.679	0.113
	Mean	6.786	6.411	0.653	0.076

集団の遺伝的多様性

各集団の遺伝的多様性のパラメータを Table 3 にまとめた。7 遺伝子座の平均アレル数は 5.429 (C13) ～7.571 (DTP) の範囲であり、12 集団を平均すると 6.786 であった。Allelic richness は 5.194 (C13)～7.066 (DTP)の範囲であり、12 集団平均で 6.411 であった。ヘテロ接合度の期待値は、0.611 (C13) ～0.696 (C32) であり、12 集団平均で 0.653 であった。また、F_{IS}は 0.030 (C37 U) ～0.118 (C27) であり、12 集団平均で 0.076 であった。標高と Allelic richness, 標高とヘテロ接合度については、標高が高い集団が高くなる傾向が認められたが、いずれも有意な相関は認められなかった (Fig. 2, Allelic richness vs Altitude, $r=0.263$, $p=0.419$; Heterozygosity vs Altitude, $r=0.125$, $p=0.707$)。低い標高の集団ほど F_{IS} が低くなるという有意な相関関係が認められた (Fig.2, F_{IS} vs Altitude, $r=-0.581$, $p<0.05$)。一方、現存する個体数の推定値 (Na) とこれらの多様性のパラメータとはいず

れも有意な相関は認められなかった (Data not shown). 集団を森林タイプ別に比較した結果, Allelic richness やヘテロ接合度などの遺伝的多様性の高さを示すパラメータは湿地帯で低く, 高山帯で高い傾向が認められた. 逆に, F_{IS} は高山帯で低いという結果であった (Fig.3).

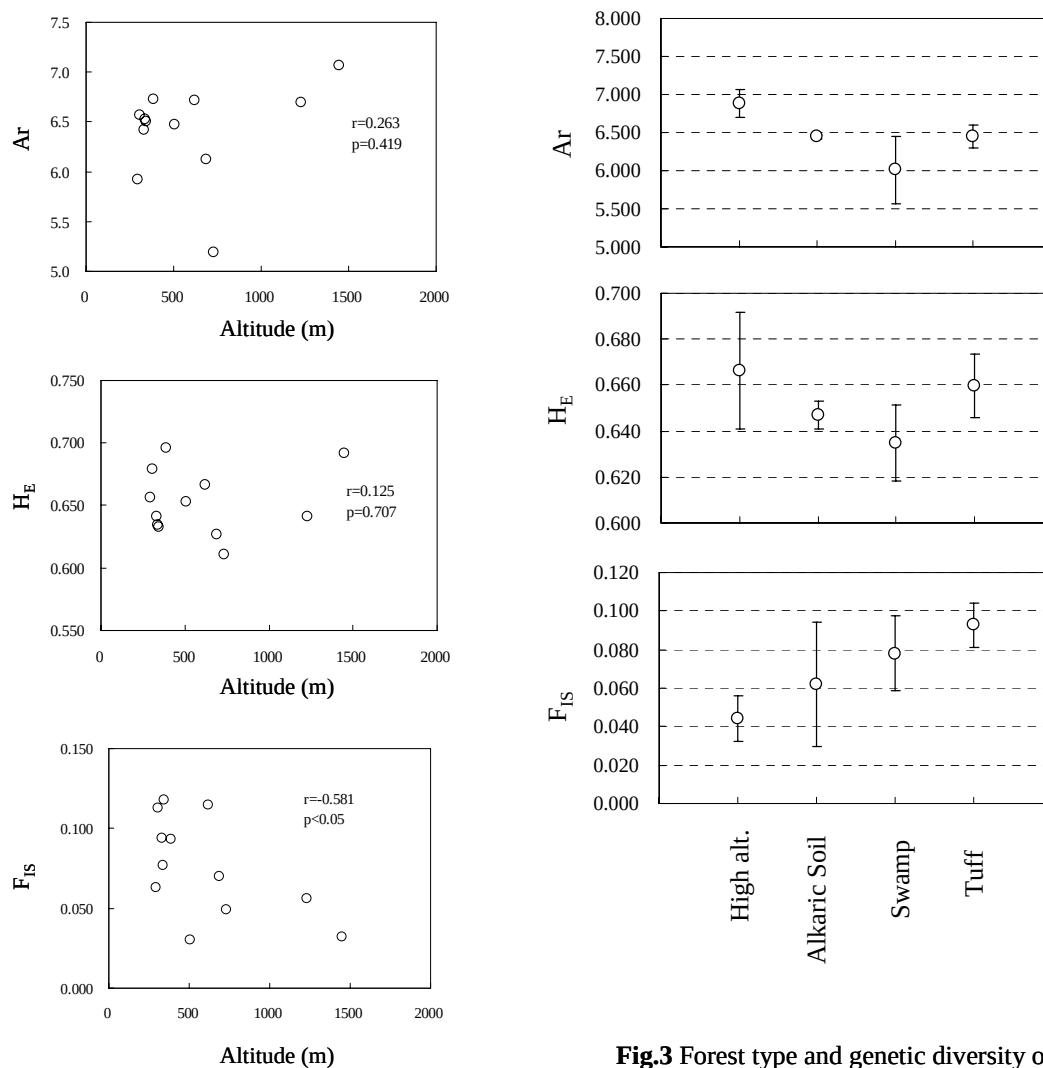


Fig.2 Relationship between altitude and genetic diversity parameters of populations.

Fig.3 Forest type and genetic diversity of *Picea glehnii* populations. Average and standard errors of parameters are shown in this figure.

ボトルネック・テスト

集団が過去にボトルネックを受けたかどうかについて, IAM と SMM の 2 つのモデルで, Sign 検定と Wilcoxon 検定を行った (Table 4). IAM モデルで有意だったのは, C13 集団について Wilcoxon 検定をした場合のみであった. SMM モデルでは, C13, MYU, C37L の 3 集団はどちらの検定法でも 5%水準で有意な結果となり,特に C13 集団はどちらも 1%水準で有意な結果となった. 一方, DTE は Sign 検定, C25 は Wilcoxon 検定のみで有意な

結果となり，もう一つの検定法では有意ではなかった．

Table 4. Probability of significance of bottleneck detection

Population		SIGN			Wilcoxon		
		IAM	SMM		IAM	SMM	
1	DTE	0.621	0.020	*	0.469	0.055	
2	C13	0.129	0.019	*	0.023	0.039	*
3	MY	0.145	0.002	**	0.297	0.008	**
4	MYL	0.387	0.102		0.375	0.055	
5	JJY	0.388	0.308		0.109	0.297	
6	DTP	0.397	0.297		0.109	0.109	
7	C27	0.630	0.100		0.109	0.078	
8	C37U	0.134	0.301		0.297	0.109	
9	C37L	0.132	0.019	*	0.297	0.023	*
10	C32	0.393	0.304		0.078	0.469	
11	C25	0.337	0.128		0.109	0.039	*
12	C73	0.386	0.310		0.055	0.375	

集団間分化

12 集団全体で算出した全体の集団間の F_{ST} は 0.026 であり，景観レベルの比較的狭いスケールにしては，集団が分化していることが示された．集団のペアごとに見ると，5%水準で有意に分化していない集団ペアは 13 ペアのみであり，ほとんどの集団ペアで有意な分化が認められた． $F_{ST} / (1-F_{ST})$ と距離の対数変換値に相関があるかどうか調べた結果，5%水準で有意な相関が認められた (Fig. 4)．集団間の遺伝的關係について，遺伝距離 D_A

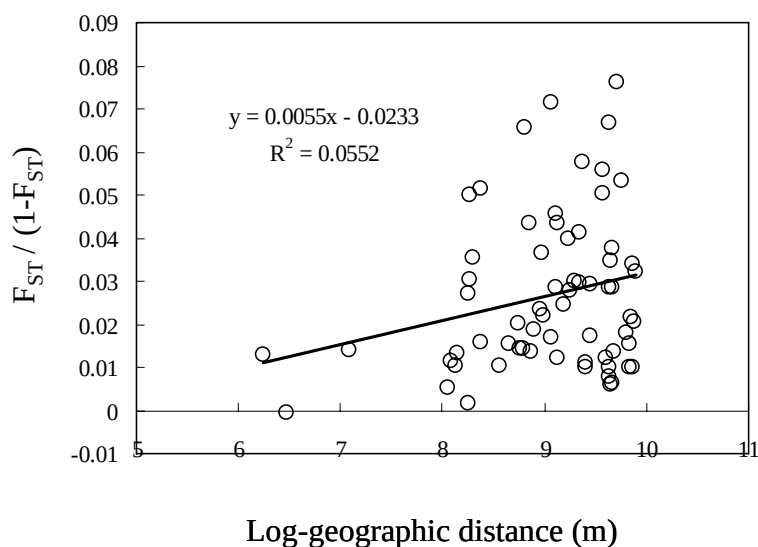


Fig.4 The relationship between $F_{ST} / (1-F_{ST})$ and log-geographic distance. The significance was tested by Mantel test using 999 iterations using computer program GenAlex (Peakal and Smouse 1999).

(Nei et al. 1983) に基づいて系統樹を作成した結果，DTE，MYU，MYL，C13 など大麓山麓のグループと C25，C27，C32，C37U，C37L などの布部地域の里山グループに大

きく分かれるが、大麓山の山頂（DTP）のみは里山のグループの中に入っていた（Fig. 5）.

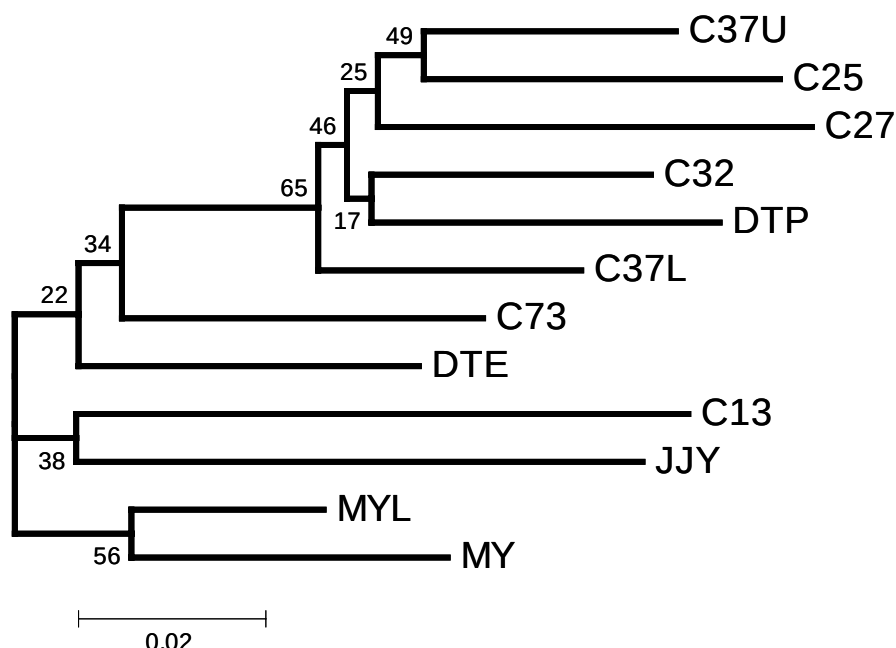


Fig.5 Genetic relationship among *Picea glehnii* populations based on D_A distance.

4. 考察

近年、天然林の保続的な利用や保全管理の場面において、遺伝的な多様性や構造に関する知見が不可欠だという認識がされるようになってきた（Rajora 1999；Rajora et al. 2000；Obayashi et al. 2001）. アカエゾマツについては、Wang & Nagasaka (1997)によって北海道内の系統地理的な研究が行われ、地域によって遺伝的多様性の程度に違いがあることが指摘されている. また、産地別植栽試験などによって、成長や材質、諸病に対する感受性等に関する遺伝的な変異に関する情報が蓄積されつつある（岡田 1975；飯塚ら 2001；門松ら 2002）. しかし、標高差による垂直分布に伴う遺伝的変異に関する知見はなく、また、地域個体群内の遺伝的な多様性や構造に関する情報は皆無であった. 本研究では、東京大学の演習林という施業対象となりうるスケールの地域個体群内を対象として、マイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的な研究を行い、いくつかの知見を得ることができた.

本研究では、標高によってアカエゾマツ集団の遺伝的多様性の程度に違いがあり、標高が高いほど遺伝的多様性が高い、また F_{IS} は低い傾向が認められた. 同じ演習林において、トドマツの標高別変異をアロザイムマーカーや核と葉緑体のマイクロサテライトマーカーで調査した例では、逆に、標高が高いほど遺伝的多様性が低下することが示されている（綿

野, 2005). Premoli et al. (2003)も、アンデス地域の低標高(1000m)から高標高(1600m)まで連続分布する落葉広葉樹 *Nothofagus pumili* の 12 集団について、アロザイムマーカーを用いて遺伝的多様性を調べた結果、標高が上がるにつれて多型的な遺伝子座の割合が減少するという明確な傾向を見出している。一方、Maghuly et al. (2005)は、ヨーロッパトウヒ (*Picea abies*) の高齢集団と若齢集団を低標高 (960m)、中標高 (1260m)、高標高(1520 m)の 3 地域からそれぞれサンプリングして、核と葉緑体のマイクロサテライトマーカーを用いて集団遺伝学的な解析を行い、標高の高い集団の方がヘテロ接合度の期待値がわずかに高かったとしている。Jørgensen ら(2002)がカリフォルニアの海岸部からロッキー山脈まで隔離分布するシモフリマツ (*Pinus flexilis*) 30 集団についてアロザイムマーカーを用いて調べた結果は複雑であり、海岸部の集団は山岳地帯の集団に比べて遺伝的多様性は高いが、同時に近交係数 F_{IS} も高いというものであった。このような樹種による標高と遺伝的多様性の関係の違いには、各樹種の分布変遷が大きく関与すると思われる (津村 2001)。

標高が高いほど遺伝的多様性が高いという結果から、アカエゾマツの分布変遷について、どのようなことが類推できるのであろうか。現在、アカエゾマツの天然分布域は北海道、特に黒松内低地帯以北がその中心となっているが、更新世の地層からは、東北各地からもその植物遺体が見つかった (Miki 1956)。これは、地峡の過去に繰り返された寒冷の気候による大気温の降下、それに伴う海水面の低下がもたらした津軽海峡の陸地化などによって、北方性の動植物が本州に南下したものと考えられている (松田 1989)。このような気候の変動を繰り返しながら、地球は約 2 万年前の最寒冷期を境に温暖化に向かうのであるが、早池峰山のアカエゾマツもこの寒冷期の生き残りであり、様々な条件によって隔離分布されたものとされている (Ishizuka 1961)。北海道においても、同じ時期の温暖化の際に分布域が標高の高いところに押し上げられ、高標高域に避難地 (レフュージア) を形成された可能性がある。その後の寒冷化にともなって、次第に標高の低いところへと分布を広げる際、アカエゾマツの場合は侵入定着できる場所が湿地帯や蛇紋岩などの特殊な土壌であったために、現在のような個体群が演習林内に点在するような分布形態へと変化したのかもしれない。標高が高い集団の F_{IS} が低く、最も標高が高く地理的には離れている大麓山の山頂付近 (DTP) が 37 林班 (C37U) や 32 林班 (C32) と遺伝的に近かったことから (Fig. 5)、限られた個体群サイズの中で近親交配が行われ、低標高域の特殊な環境を有する地域に飛び火するようにしてアカエゾマツの集団が成立したのではないかと推察された。

森林タイプ別に見ると、蛇紋岩帯や火山礫帯に比べて、湿地帯に分布する集団の遺伝的多様性が低いことが示された (Fig. 4)。また、湿地帯の一集団 (C13) では、過去にボトルネックが起こったことが示唆された (Table 3)。松田 (1989) は、湿地帯では厳しい環境の中で、小群状に、そして不連続に更新を行っており、地下部の過湿によって成長は非常に緩慢で諸被害が多いことから、湿地帯のアカエゾマツ集団は極相林や特殊土壌におけるそれとは同じ時系列に並ばない独自のものであると指摘している。実際、湿地林では最近

の更新は全く認められず、湿地林の一つ（MYU）では枝枯れなどの衰退現象が見られ始めている。また、Wang & Nagasaka (1997)は、天然分布するアカエゾマツ 10 集団のうち、水位が高く、地温・栄養分が低い、低地帯に属する根室の集団が、アレル数、多型的な遺伝子座の割合、ヘテロ接合度の観察値が他の集団と比べて最も低かったとしている。この根室の環境条件は、本研究で調査対象とした湿地帯と類似している。Wang & Nagasaka (1997)は、そのような厳しい環境では、選択圧が強くなり、結果として遺伝的多様性が減少するだろうと考察している。このように、湿地帯という厳しい環境下で起こる独特の更新と成長における自然選択が、アカエゾマツ集団の遺伝的多様性にも影響を与えている可能性がある。

現在、当演習林では、湿地帯である MYU をアカエゾマツの主要な採種源にしているが、低標高域の集団との遺伝的な関係、集団内の遺伝的多様性の低さ、過去のボトルネックの影響、現在の衰退現象などを考慮すると、採種源を再考するべきだと考えられた。本研究では、地理的距離と遺伝的距離に有意な相関が認められたが、全体の F_{ST} が 3%以内であったことを考えると、他集団との遺伝的な分化度が特に高い C13 と JJY を外せば、二次元での空間的な距離についてはそれほど重大に捉える必要はないと考えられる。現在の造林対象地の多くが低標高から中標高に分布していることを考えると、その分布域に適した種苗の生産が優先されるべきであり、多様性が一定レベル以上で、 F_{IS} も低い値を示しており、現存数も多い C32, C25, C37U などが採種地候補としては有望であると考えられる。今後、これらの地域から採種した種子について、充実率、発芽率などの形質調査を行い、採種源としての評価を行っていく必要がある。

謝辞

東京大学北海道演習林の皆様にはフィールド調査、図面作成等の様々な場面でご協力を頂き、考察にも有用なアドバイスを頂いた。特に、高橋康夫、小川瞳の両氏には、サンプリングと調査にご協力いただいた。また、中川雄治氏には GIS データの解析と地図作成でご協力を頂いた。梶幹男氏には、アカエゾマツの分布変遷についてのコメントを頂いた。練春蘭氏には未発表のエゾマツ SSR 遺伝子座の情報を教えて頂き、解析に利用させて頂いた。これらの方々をはじめ、本研究を進めるにあたりご協力を頂いた皆様に厚く謝意を表する。

引用文献

Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.

El Mousadik, A., Petit, R.J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) endemic of Morocco. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 832-839.

- Goto S, Tsuda Y, Nagafuji K *et al.* (2004) Genetic make-up and diversity of regenerated *Betula maximowicziana* Regel. sapling populations in scarified patches as revealed by microsatellite analysis. *Forest Ecology and Management*, **203**, 273-282.
- Goudet, J (2001) FSTAT; a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Green DS (2005) Adaptive strategies in seedlings of three co-occurring, ecologically distinct northern coniferous tree species across an elevational gradient. *Canadian Journal of Forest Research*, **35**, 910-917.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L., 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**, 95-124.
- Hiura T, Sano J, Konno Y (1996) Age structure and response to fine-scale disturbances of *Abies sachalinensis*, *Picea jezoensis*, *Picea glehnii*, and *Betula ermanii* growing under the influence of a dwarf bamboo understory in northern Japan. *Canadian Journal of Forest Research*, **26**, 289-297.
- Igarashi Y (1994) Quaternary forest and climate history of Hokkaido, Japan, from marine sediments. *Quaternary Science Review*, **13**, 335-344.
- 飯塚和也・安久津久・板鼻直栄 (1999) アカエゾマツ精英樹クロンの材質変異. 日本林学会誌 **81**, 325-329.
- 飯塚和也・林英司・板鼻直栄 (2000) さまざまな採種園に植栽されたアカエゾマツ精英樹クロンの成長と材質諸形質の比較解析. 日本林学会誌 **82**, 80-86.
- 飯塚和也・生方正俊・坂本庄生 (2001) アカエゾマツの成長および容積密度数の産地間変異. 日本林学会誌 **83**, 53-57.
- Ishizuka K (1961) A relict stand of *Picea glehnii* Maseters on Mt. Hayachine, Iwate prefecture. *Ecological Review*, **15**(3), 155-162.
- Jordano P, Godoy JA (2000) RAPD variation and population genetic structure in *Prunus mahaleb* (Rosaceae), an animal-dispersed tree. *Molecular Ecology*, **9**, 1293-1305.
- Jørgensen S, Hamrick JL, Wells PV (2002) Regional patterns of genetic diversity in *Pinus flexilis* (Pinaceae) reveal complex species history. *American journal of Botany*, **89**(5), 792-800.
- 門松昌彦・金子潔・有倉清美・市川一・車柱榮 (2001) アカエゾマツ産地系統別植栽地においてみられた枝枯れ・針葉黄変被害の母樹系統間差異. 日本林学会誌 **83**, 347-350.
- 倉橋昭夫・濱谷稔夫(1981) トドマツの垂直分布に伴う変異. 東京大学演習林報告 **71**, 101-151.
- 松田 疆(1989) アカエゾマツ林の更新と成長. 北海道大学演習林報告 **46**(3), 595-717.
- Maghuly F, Pinsker W, Praznik W, Fluch S (2005) Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management*, in press.

- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, **7**, 639-655.
- Miki S (1956) Remains of *Pinus koraiensis* S. et Z. and associated remains in Japan. *Botanical Magazine*, **69**, 447-454.
- Montalvo, A.M., Ellstrand, N.C., 2000. Transplantation of the subshrub *Lotus scoparius*: Testing the home-site advantage hypothesis. *Conserv. Biol.* **14**, 1034-1045.
- Montalvo AM, Williams SL, Rice KJ et al. (1997) Restoration biology: a population biology perspective. *Restoration Biology*, **5** (4), 277-290.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- 岡田滋 (1975) アカエゾマツの産地間変異 (I) 苗高と開葉時期の産地間差異. *日本林学会誌* **57**, 305-310.
- Obayashi K, Tsumura Y, Ihara-Ujino T, Niiyama K, Tanouchi H, Suyama Y, Washitani I, Lee CT, Lee SL, Muhammad N (2001) 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.
- Peakall R, Smouse PE (2001) GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.M., 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Heredity* **90**, 502-503.
- Pfeiffer A, Olivieri AM, Morgante M (1997) Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea Abies* K.). *Genome*, **40**, 411-419.
- Premoli AC (2003) Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity*, **94**(3), 218-226.
- Rajora OP (1999) Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theoretical Applied Genetics*, **99**, 954-961.
- Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP (2000) Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology*, **9**, 339-348
- Schuster WS, Alles DL, Mitton JB (1989) Gene flow in limber pine: evidence from pollination phenology and genetic differentiation along an elevational transect. *American Journal of Botany*, **76**, 1395-1403.
- Takahashi M, Mukouda M, Kono K (2000) Difference in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. *Heredity*, **84**, 103-115.
- 館脇 操 (1943) アカエゾマツ林の群落学的研究. 北海道大学農学部演習林報告, **13**(2),

1-181.

- Tomaru N, Mitsutsuji M, Takahashi M, Ohba K (1997) Genetic diversity in *Fagus crenata* (Japanese beech): Influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity*, **78**, 241-251.
- Tsuda, Y., Ide, Y., 2005. Wide-range analysis of genetic structure of *Betula maximowicziana*, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. *Mol. Ecol.* **14**, 3929-3941.
- 津村義彦(2001)集団遺伝学的知見から考えられるわが国の針葉樹の分布変遷. 植生史研究 **10**, 3-16.
- Ueno S, Tomaru N, Yoshimaru H, Manage T, Yamamoto S (2002) Size-class differences in genetic structure and individual distribution of *Camellia japonica* L. in a Japanese old-growth evergreen forests. *Heredity*, **89**, 120-126.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1997) POPGENE, version 1.20 edition. University of Alberta, Edmonton, Alta.
- 吉丸博志・杉田久志・金指達郎 (2003) マイクロサテライトマーカーを用いた早池峰山アカエゾマツ集団の更新における遺伝的多様性の解析. 第 114 回日林学術講演集: 390.
- Wang ZM, Nagasaka K (1997) Allozyme variation in natural populations of *Picea glehnii* in Hokkaido, Japan. *Heredity*, **78**, 470-475.
- Watanabe S, Sasaki S (1994) The silvicultural management system in temperate and boreal stands: A case history of the Hokkaido Tokyo University Forest. *Canadian Journal of Forest Research*, **24**, 1176-1185.
- 綿野好則(2005)東京大学北海道演習林におけるトドマツ天然林の遺伝的多様性と施業がそれに与える影響に関する研究. 東京大学修士論文.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.

