

SSR マーカーを用いたスギ遺伝子保存林における遺伝的多様性の評価 —福島県会津地方に設定されている採種源林分と子林分の解析結果—

高橋 誠・渡邊敦史・宮本尚子（森林総研林育セ）・津村義彦（森林総研）・矢野慶介・
岩泉正和（森林総研林育セ）・小野雅子（森林総研林育セ関西）

要旨：優良な林木遺伝資源の生息域外保存のための一つの方策として遺伝子保存林が設定されている。本研究では、福島県会津地方に設定されているスギ遺伝子保存林の親林分 1 集団と子林分 2 集団について、SSR マーカーを用いて遺伝的多様性を評価した。親林分は、既に報告されている東日本の日本海側スギ天然林と同等以上の豊富な遺伝的変異を有していると推察された。子林分の遺伝的多様性は、親林分と比較して、アレリック・リッチネスにおいて 1%水準で有意な減少がみられた。アレリック・リッチネスの減少は、対立遺伝子頻度が 0.05 以下のレア・アレルの消失によるものであり、弱度のボトルネックの影響が現れたものと考えられる。

キーワード：スギ、遺伝子保存林、SSR マーカー、遺伝的多様性、採種母樹数

I. はじめに

遺伝資源とは、現在あるいは潜在的に利用価値のある遺伝的素材をさす。林木については、スギなどの林業上主要な樹種のほか、希少種も含めた、多くの樹種について、保存が進められている。森林総合研究所林木育種センターでは、林木遺伝資源の探索・収集、増殖・保存、特性評価、情報管理および配布を行っている。

林木は、個体サイズが長大で、長寿命であるため、その保存にあたっては、生息域内 (*in situ*) 保存と生息域外 (*ex situ*) 保存が併用されている。生息域内保存では、林木遺伝資源保存林などとして、集団単位で保存が図られている。生息域外保存には、集団単位で保存を図る遺伝子保存林 (Forest Tree Superior Gene Conservation Forest) と、保存単位が個体 (あるいはクローン) である遺伝資源保存園 (成体として保存) や、施設保存 (花粉や種子の生殖質として保存) などがある。

遺伝子保存林については、スギ、ヒノキなどの他、30 余樹種を対象に設定されており、天然林、人工林を問わず、優良な林分である全国 639 箇所、約 4,000ha が設定されている。この内、スギは、遺伝子保存林の設定が 229 箇所、約 800ha におよび、箇所数では全体の 35.8% を占めている。

遺伝子保存林は、採種源林分である親林分から採種・育苗した苗木により子林分を造成すれば、親林分が伐期

に達した際、伐採することが可能である。このため、遺伝子保存林による生息域外保存では、子林分造成の際 (あるいは子林分からの再造成の際)、親林分が保有する遺伝変異をいかに広く網羅して次代の遺伝子保存林に引き継ぐかが重要であり、それには採種方法が大きく影響すると考えられる。遺伝子プールを後代に引き継ぐ方法として、各遺伝子保存林の全個体をさし木ないしつぎ木で増殖する方法も考えられるが、発根率などの増殖効率を考慮すると、事業的に全個体を無性的に増殖するのは現実的ではない。採種方法を改良することの方が、費用対効果は大きいと考えられる。

現在、林木育種センターでは、スギ遺伝子保存林の再造成の方法について検討を進めている。その内、本研究では、福島県会津地方に設定されているスギ遺伝子保存林について、SSR マーカーを用いて遺伝的多様性を評価し、1)スギ遺伝資源保存林の保有する遺伝的多様性のレベルを近隣地域のスギ天然林の遺伝的多様性との比較、2)親林分と子林分の遺伝的多様性の比較を行った。また、3)子林分での遺伝的多様性の減少は、どのような要因によるものであるかを検討した。

II. 材料と方法

本研究では、会津森林管理署道長国有林 (福島県磐梯町) に設定されているスギ遺伝子保存林の親林分 (採種源林分、以下 AG10) と、そこから採種された種子を用

Makoto TAKAHASHI, Atsushi WATANABE, Naoko MIYAMOTO (Forest Tree Breeding Center, FFPRI, Hitachi, Ibaraki 319-1301), Yoshihiko TSUMURA (FFPRI, Tsukuba, Ibaraki 305-8687), Keisuke YANO, Masakazu G. IWAIZUMI (Forest Tree Breeding Center, FFPRI, Hitachi, Ibaraki 319-1301), Masako ONO (Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, FFPRI, Shouoh, Okayama 709-4335)
Genetic diversity of Sugi (*Cryptomeria japonica*) forest tree superior gene conservation forest stand examined by SSR markers: Pilot study of three stands located at Aizu region, Fukushima Prefecture.

いて、同森林管理署西会津国有林（福島県西会津町，以下，AG21）と亀ヶ沢国有林（福島県喜多方市，AG22）に造成された遺伝子保存林（子林分）2林分の合計3林分を調査した。AG10はクマシギ系の優良林分（人工林）である。

AG10, AG21, AG22から、それぞれ72個体，57個体，44個体からDNA分析試料として針葉を採取した。採取した針葉は、実験室に持ち帰り，DNA抽出まで冷凍保存した。DNA抽出には、改変CTAB法を用いた（5，7）。

SSR分析には，Cjgssr77（4），CJS0333，CS1226，CS1364（9）の4マーカーを用いた。PCR反応にはMultiplex PCR Kit（QIAGEN社製）を用い，Annealing温度60°Cから55°CのTouchdown PCRにより行った。得られたPCR産物は，3100 Genetic Analyzer（Applied Biosystems社製）によりキャピラリー電気泳動し，フラグメント・サイズはGenotyper Version 3.7 NT（Applied Biosystems社製）により確定した。

得られたSSRのフラグメント・サイズに基づく遺伝子型情報をもとに遺伝的多様性を表す指標を算出した。用いた指標は，1遺伝子座当たりの対立遺伝子数（ N_a ），アレリック・リッチネス（ A_R ）（1），平均ヘテロ接合体率の期待値（ H_E ）（6）と観察値（ H_O ），近交係数（ F_{IS} ）（10）である。 N_a は集団当たりのサンプル数の影響を受けるため，サンプル数が異なる集団間で直接値を比較することは好ましくない。 A_R は，生態学の分野でHurbert（2）が考案した手法を，集団遺伝学的な指標として応用したもので，遺伝子のコピー数が n （2倍体生物の場合，サンプル数は $n/2$ となる）の時に検出されると期待される対立遺伝子数で，サンプル数が異なる集団間での対立遺伝子数の比較を可能にする。通常 n はサンプル数が最も少ない集団の $n/2$ を基準に，それよりもやや少ない値に定める。今回の研究では，スギ遺伝子保存林の遺伝的多様性を天然林の結果（8）と比較するために， n を50とし， $A_R(50)$ を算出した。

天然林との遺伝的多様性の比較では，Takahashi et al.（8）の中から会津地方に比較的近隣な4集団（山内，本名，佐渡，立山）のデータを用いた。本研究と共通な3座（Cjssr77，CJS0333，CS1364）のデータを用いて，これら4集団の $A_R(50)$ を再計算した。

親林分と子林分の遺伝的多様性の比較では，個体のランダム・サンプリングを1,000回反復するブートストラップ法により， $A_R(50)$ の99%信頼区間を集団ごとに推定した。

III. 結果と考察

遺伝的多様性を表す指標を，スギ遺伝子保存林の親林分

（AG10）とスギ天然林4集団の両者で共通のマイクロサテライト・マーカー（SSR）3遺伝子座のデータを用いて算出した結果を表-1に示した。天然林の数値と比較すると，AG10は N_a ， H_E ， H_O のいずれについても天然林4集団と同等かあるいはそれ以上の値を示した。AG10は，東日本の日本海側スギ天然林と比較して，同等以上の豊富な変異を有していると推察された。AG10と山内，本名はやや大きい F_{IS} の数値を示しているが，これはCS1364の F_{IS} が上記の集団において0.11~0.16の値を示しているためである。Takahashi et al.（8）の29集団での平均値をみても0.15で，このような F_{IS} の偏りは，ヌル・アレルによるものと考えられる。CS1364を除外して F_{IS} を再計算すると，いずれの集団についても，値がほぼゼロ前後になる。

遺伝子保存林の親林分（AG10）と子林分2林分（AG21，AG22）の遺伝的多様性をあらわす指標の数値を表-2に示した。親林分（AG10）では，SSR4座での N_a の平均値と標準偏差は 23.80 ± 5.2 であった。同様に， H_E は 0.882 ± 0.046 ， H_O は 0.792 ± 0.117 ， F_{IS} は 0.103 ± 0.101 ， $A_R(50)$ は 16.42 ± 3.26 であった。同様に，AG21では， N_a は 16.0 ± 3.9 ， H_E は 0.878 ± 0.022 ， H_O は 0.852 ± 0.067 ， F_{IS} は 0.030 ± 0.056 ， $A_R(50)$ は 12.91 ± 2.71 で，AG22では， N_a は 18.8 ± 4.3 ， H_E は 0.860 ± 0.024 ， H_O は 0.825 ± 0.064 ， F_{IS} は 0.042 ± 0.054 ，

表-1. 共通のSSR3座のデータに基づいたスギ遺伝子保存林（親林分；AG10）とスギ天然林4集団との遺伝的多様性の比較（データはTakahashi et al.（2005）による）

集団名	N	N_a	H_E	H_O	F_{IS}	$A_R(50)$
山内	29	12.3	0.840	0.755	0.103	12.00
本名	28	12.3	0.822	0.755	0.095	11.99
佐渡	30	14.0	0.834	0.829	0.005	13.26
立山	30	14.0	0.834	0.829	0.005	13.26
AG10	72	23.3	0.874	0.750	0.160	16.19

表-2. SSR4座のデータに基づいたスギ遺伝子保存林（親林分；AG10）と子林分2集団（AG21，AG22）との遺伝的多様性の比較

集団名	N_a	H_E	H_O	F_{IS}	$A_R(50)$
AG10	23.8	0.882	0.792	0.103	16.42
AG21	16.0	0.878	0.852	0.030	12.91
AG22	18.8	0.860	0.825	0.042	13.68

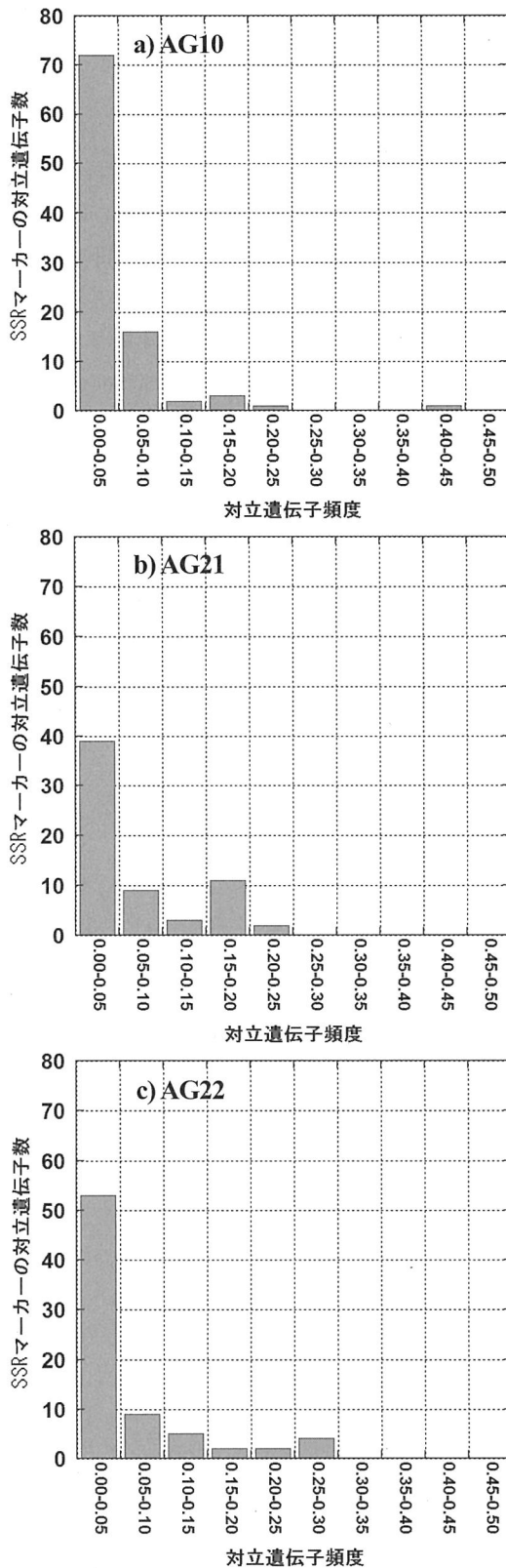


図-1 スギ遺伝子保存林（親林分；AG10）と子林分（AG21 と AG22）における対立遺伝子頻度別の対立遺伝子数

$A_R(50)$ は 13.68 ± 2.66 であった。

平均ヘテロ接合体率の期待値と観察値でみた場合、AG21 と AG22 は AG10 に対して顕著な減少はみられなかったが、 N_a と $A_R(50)$ では、AG21 と AG22 が AG10 に比べて顕著に低い値を示した。ブートストラップ法により、各集団の $A_R(50)$ の 99%信頼区間を推定したところ、AG10 では 13.74~16.57, AG21 では 10.01~13.47, AG22 では 10.37~13.60 であった。このため、AG10 と AG21, AG22 間のアレリック・リッチネスの差は 1%水準で有意な差で、子林分では親林分に比べ有意に遺伝的多様性が減少していることが明らかになった。

親林分 (AG10) と子林分 (AG21 と AG22) での対立遺伝子頻度別の対立遺伝子数の頻度分布を図-1 に示した。親林分では、AG10 では頻度が 0.05 未満のレア・アレル数が 72 (75.8%) なのに対し、AG21 ではレア・アレル数は 39 (60.9%), AG22 では 53 (70.7%) で、レア・アレルは数、割合とも減少しており、アレリック・リッチネスの減少には、レア・アレルの消失が密接に関わっていた。またその一方で、レア・アレル消失の影響を受けて、相対的に中程度の頻度 (0.10~0.30) の頻度の対立遺伝子の割合は 6.3%から AG21 では 4.0 倍, AG22 では 2.7 倍に増大し、それぞれ 25.0%, 17.3%になった。Luikart et al. (3) はシミュレーションなどにより、ボトルネックを受けた集団では、レア・アレルの割合が減少し中程度のアレルの割合が増加することを示している。このことから、子林分では、弱度のボトルネックの影響が現れたものと考えられた。

AG21 と AG22 を造成する際、AG10 の 27 個体を母樹として採取された混合種子を用いて苗木を育苗したとされている。子林分造成の際の母樹数が、子林分でのアレリック・リッチネスの減少に密接に関与していると思われる。今後、シミュレーションなどにより、採種母樹数が子林分の遺伝的多様性に及ぼす影響を、より定量的に把握することが重要である。

謝辞

本研究は関東森林管理局会津森林管理署のご協力のもとに実施した。会津森林管理署の方々に感謝申し上げます。

引用文献

(1) 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 to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* **92** : 832–839.
- (2) HURLBERT, S. H. (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52** : 577–586.
- (3) LUIKART, G., ALLENDORF, F. W., CORNUET, J. -M., and SHERWIN, W. B. (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottleneck. *J. Heredity* **89** : 238–247.
- (4) MORIGUCHI, Y., IWATA, H., UJINO-IHARA, T., YOSHIMURA, K., TAIRA, H., and TSUMURA, Y. (2003) Development and characterization of microsatellite markers for *Cryptomeria japonica* D. Don. *Theor. Appl. Genet.* **106** : 751–758.
- (5) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* **8** : 4321–4325.
- (6) NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, 512pp., New York.
- (7) 白石進・渡邊敦史 (1995) *rbcl* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. *日林誌* **77** : 429–436.
- (8) TAKAHASHI, T., TANI, N., TAIRA, H., and TSUMURA, Y. (2005) Microsatellite markers reveal high allelic variation in natural populations of *Cryptomeria japonica* near refugial areas of the last glacial period. *J. Plant Res.* **118** : 83–90.
- (9) TANI, N., TAKAHASHI, T., UJINO-IHARA, T., IWATA, H., YOSHIMURA, K., and TSUMURA, Y. (2004) Development and characterization of microsatellite markers for sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) derived from microsatellite-enriched libraries. *Ann. For. Sci.* **61** : 569–575.
- (10) WRIGHT, S. (1951) The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* **15** : 323–354.