

課題名	D-0901 熱帯林の減少に伴う森林劣化の評価手法の確立と多様性維持
課題代表者名	原田 光 (国立大学法人愛媛大学農学部森林資源学専門教育コース森林遺伝学研究室)
研究実施期間	平成21～23年度
累計予算額	219,272千円(うち23年度65,539千円) 予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) 生態系劣化評価1-繁殖構造による脆弱性の解析(大阪市立大学)
- (2) 生態系劣化評価2-土壌微生物を指標とした評価手法の確立(京都大学)
- (3) 遺伝的劣化評価1-地域集団の解析と多様性保全を目指した造林(愛媛大学)
- (4) 遺伝的劣化評価2-種および地域識別マーカーの開発と広域集団の解析((独)森林総合研究所)
- (5) 遺伝的劣化評価3-稀少種および絶滅危惧種の解析(フタバガキの遺伝的変異)(九州大学)
- (6) 遺伝的劣化評価3-稀少種および絶滅危惧種の解析(マングローブの遺伝的変異)(福岡女子大学)
- (7) 遺伝的劣化評価3-稀少種および絶滅危惧種の解析(マダガスカル方式による多様性保全を目指した造林)((財)進化生物学研究所)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

東南アジアの熱帯雨林は世界でも有数の生物多様性の高い地域とされるが、一方で伐採や、農地、プランテーションへの転換などの人為的要因により原生的な森林が過去半世紀のうちに急速に失われてきている。多様性の保全は地球温暖化対策と共に地球規模で議論すべき今後の大きな課題である。生物多様性は種、生態系、および遺伝子の三つのレベルでとらえられることが多いが、生態系の多様性や遺伝的多様性についてはまだ十分に理解されていないのが現状である。本研究プロジェクトではボルネオ島を中心とした熱帯多雨林樹木集団について遺伝子レベルで多様性の程度とその維持機構を解明すると共に、長期にわたる生態観測データの蓄積されているサラワク州ランビル国立公園とその周辺域の樹木集団の繁殖構造および土壌微生物の種構成について調べ、生態系の遺伝構造に変化をもたらす生態学的要因を明らかにする。遺伝的多様性の維持機構と生態系の多様性の創成機構について遺伝子という共通のツールを用いてアプローチすることにより相互の橋渡しをおこなう。これらが解明されればその裏返しである森林の劣化機構にも光を当てることができる。研究組織は前者として I. 遺伝的劣化評価、後者として II. 生態系劣化評価の研究グループを構成する。III. 多様性を維持した森林の再生では、これらの知見に立脚して造林試験を基本にした多様性回復の試みを行う。

2. 研究開発目的

I. 遺伝的劣化評価ではフタバガキ科樹木を中心にボルネオ島全域の地域集団と、島嶼東南アジアの広域集団について、マイクロサテライトマーカー、葉緑体遺伝子マーカー、核遺伝子マーカーを用いた遺伝的変異の解析を行う。前者では局所的遺伝構造の解明を高密度に行い(サブテーマ3)、後者では広域分布種の概略的な遺伝構造の解明を目指す(サブテーマ4)。また、森林破壊の遺伝的多様性に及ぼす効果は端的に絶滅危惧種や稀少種に表出されていると考え、フタバガキおよびマングローブ樹種を対象に近縁の普遍種との対比において遺伝的多様性の評価を行う(それぞれサブテーマ5, 6)。II. 生態系劣化評価では樹木集団の繁殖構造の違いにより森林攪乱に対する脆弱性が異なると考え、フタバガキ科樹木について個体群密度(高と低)と花粉媒介者(長距離と短距離)の違いの組合せについて遺伝的構造を原生林と二次林もしくは残存林のものとを比較する(サブテーマ1)。さらに

土壌微生物の組成が森林の劣化でどの様に変化するのかを天然林と残存林との比較により次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって明らかにする（サブテーマ2）。二次林化することによって顕著に失われる、もしくは増加する細菌や菌類が見つければこれを劣化の指標に出来る。これらの研究は共にランビル国立公園52ha調査区を中心に行う。さらにIII. 多様性を維持した森林の再生では本研究の理論基盤に基づいて、森林破壊による負のスパイラルを逆に戻す試み、すなわち多様性の回復と維持を目的とした実験的造林をボルネオ島のフタバガキ林（サブテーマ3）およびマダガスカル乾燥林固有種（サブテーマ7）を対象に行う。

3. 研究開発の方法

(1) 生態系劣化評価1-繁殖構造による脆弱性の解析

1) 攪乱に脆弱な繁殖特性の抽出

ボルネオ熱帯雨林（天然林）と隣接する択伐残存林で主要フタバガキ科の局所空間遺伝構造と花粉散布距離をマイクロサテライトマーカーを使って分析し、遺伝的特性と各種の生態特性の関係を解析して、攪乱に脆弱な特性を抽出した。

2) 攪乱に脆弱な生態特性の抽出

天然林に設置されている大面積調査区での10年間の動態データを解析し、伐採にともなう攪乱と乾燥の影響を受けやすいフタバガキ科樹種の生態特性を抽出した。

3) 遺伝的劣化と個体群動態の長期的関連

上記で得られたフタバガキ科の遺伝データと動態データを組み入れた遺伝個体群動態モデルを用いたシミュレーションによって、択伐、断片化が遺伝的多様性に与える長期的影響を種ごとに評価し、長期的な遺伝的劣化のリスクが高い種の特性を抽出した。

(2) 生態系劣化評価2-土壌微生物を指標とした評価方法の確立

次世代シーケンサーにより得られた土壌微生物の大規模塩基配列データの解析により、健全林と劣化林における微生物の組成、多様性や代謝機能を比較し、熱帯林劣化状態に関連する微生物や遺伝子を特定し、森林劣化指標として確立することを目的とした。そのために、マレーシア（サラワク）、インドネシア（ジャワ、スマトラ）、シンガポール及び日本の様々な森林を調査地として選び、採集した土壌から抽出したDNAとmRNAを材料として、以下の解析を行った。

1) 微生物組成と多様性の解析

抽出したDNAを鋳型として16SリボソームRNA領域（16S rRNA：細菌を対象）とリボソームRNA遺伝子間領域（ITS：菌類を対象）をPCR増幅し、次世代シーケンサー（Roche 454）によって塩基配列を決定した。得られた塩基配列を群集生態学的解析の手法を用いて、細菌および菌類の組成と多様性の地理的変異（上記東南アジアと日本）と時間的変化（サラワクと日本）を明らかにした。

2) 微生物組成と代謝機能特性の解析

抽出したDNAのゲノムランダムショットガン配列を次世代シーケンサー（Illumina GAII）によって決定した。メタゲノム解析を行い、微生物組成を決定するとともに、土壌細菌の潜在的遺伝子機能を推測した。得られた結果をサラワク（5調査地）と日本（1調査地）の森林間で比較した。

3) メタトランスクリプトーム解析

サラワクと日本のそれぞれ1カ所の調査地の土壌から抽出したmRNAのランダムショットガン配列を次世代シーケンサー（Illumina HiSeq 2000）を用いて決定した。配列が由来する分類群と遺伝子機能を同定し、微生物群集において顕在化している機能とその発現を行う分類群組成を推定した。

(3) 遺伝的劣化評価1-地域集団の解析と多様性保全を目指した造林

1) 遺伝的変異の解析

ボルネオ島を中心にしたフタバガキ地域集団の遺伝的変異の解析を行うため、*Dryobalanops*属全7種、テンカワン（*Shorea*属*Pachycarpae*節）7種、*Shorea curtisii*および*S. javanica*を対象樹種として、これらの集団サンプルをボルネオ島全域、マレー半島、スマトラ島、ジャワ島から採集した。遺伝的多様性に関して、葉緑体遺伝子領域（*trnL-trnF*、*trnH-psbA-trnK*、*psbC-trnS*、*trnS-trnFM*）および核遺伝子領域（*PgiC*、*GapC*、*GBSSI*、*Met*、*SBE2*）の塩基配列を決定し、変異の解析を行った。さらに*Shorea curtisii*、*S. javanica*および希少種である*Dipterocarpus littoralis*についてマイクロサテライト遺伝子座の変異を調査し、近交係数を含む遺伝的多様性指数を推定した。

2) 多様性保全のための造林手法の開発

西、中央および東カリマンタンで多様性造林に用いるフタバガキ種子の採集を行いポゴールの苗畑に植え付けた。インドネシア、中部ジャワ州、ワナガマとケンダルの人工林に11個のプロットを設け、立木密度、樹高、胸高直径の測定を行い、林分構造と遺伝的構造を調べた。

(4) 遺伝的劣化評価2-種及び地域識別遺伝子マーカー開発と広域集団の解析

フタバガキ科 *Shorea* 属の種の識別を行うために *Shorea* 属84種200個体を東南アジアから収集し、葉緑体DNAの4つの遺伝子間領域 (*trnL* intron、*trnL-trnF*、*trnH-trnK*、*psbC-trnS*) の塩基配列を決定した。得られた塩基配列データを用いて近隣接合系統樹を構築した。また、地域識別の遺伝マーカー開発のために東南アジアのフタバガキ科のなかで広域に分布し、しかも比較的個体密度の高い *Shorea leprosula* および *S. parvifolia* についてインドネシアおよびマレーシアの広域から材料の収集を行った。*S. leprosula* では葉緑体DNAで種内多型が見られた5領域 (*trnD-trnT*、*petB* intron、*petL-psbE*、*psbJ-petA*、*rps16-trnK*) の塩基配列を用いて採取し、集団の解析を行った。また、*S. parvifolia* では種内多型が見られた2領域 (*psbJ-petA*、*trnQ-rps16*) の塩基配列を用いて採取した集団の解析を行った。また *S. leprosula* の24集団を、34遺伝子座のEST-SSRで解析した。また *S. parvifolia* の13集団を14遺伝子座のEST-SSRで解析した。

(5) 遺伝的劣化評価3-希少種および絶滅危惧種の解析(フタバガキの遺伝的変異)

1) *Pinus krempfii* (希少種) と *P. yunnanensis* (普遍種)

ベトナムの6自然集団からとられたサンプルの、合計10カ所の遺伝子座、合計約9kbの領域の遺伝的変異について調査を行った。加えて、葉緑体マイクロサテライト (cpSSR) 7遺伝子座およびミトコンドリアの遺伝子座 (mtDNA) 14カ所の配列も決定した。各集団内の遺伝的多様性および集団間の遺伝的分化について解析を行った。

2) *Shorea balangeran* (希少種) と *S. leprosula* (普遍種)

インドネシアおよび筑波植物園から採集した2種の苗木から得られたRNAを用いてcDNAライブラリを構築した。得られたライブラリに基づき、シロイヌナズナで保存されている領域の配列を参考にして、両種で共通して増幅するプライマーを設計した。遺伝マーカー領域の配列を Roche 454 sequencing system を用いて解析を行い、得られたデータの集団遺伝学的解析を行った。

3) *Myoporum bontioides* (絶滅危惧種)

Myoporum bontioides において日本の8集団と中国1集団からサンプルを収集した。*M. bontioides* のマイクロサテライト (SSR) マーカーを29設計し、ジェノタイピングを行った。さらに葉緑体DNAの5カ所を増幅するプライマーを設計し、塩基配列を解析した。

(6) 遺伝的劣化評価3-希少種および絶滅危惧種の解析(マングローブの遺伝的変異)

サンプルはオヒルギ (*Bruguiera gymnorhiza*)、ヒルギダマシ (*Avicennia marina*)、マヤプシキ (*Sonneratia alba*)、オヒルギの近縁種 (*Bruguiera sexangula*) を用いた。採集はマダガスカル、オーストラリア、西表島、インドネシア、タイ、ベトナム、インドで行った。葉からCTAB法を用いて全DNAを抽出した。核遺伝子10領域、葉緑体遺伝子3領域をPCRで増幅し、必要に応じてクローニングを行った。これらの塩基配列を決定し、この配列情報をもとに集団遺伝学的解析を行った。

(7) 遺伝的劣化評価3-希少種および絶滅危惧種の解析(マダガスカル方式による多様性保全を目指した造林)

マダガスカル南部固有の乾生林は、種の固有率が90%を越し、稀少かつ絶滅が危惧される地球上に類を見ない植生である。この森で20年間にわたり森林の復元保全に取り組む日本のNGOの活動は、造林手法のみならず森林保全と住民生活の両立により持続性を目指す点で独自性があり、多大な成果を収めてきた。この活動につき自然科学と社会科学の両面から調査解析を行い、条件の異なる他地域にも適用し得る森林復元保全のガイドラインを策定する。

4. 結果及び考察

(1) 生態系劣化評価1-繁殖構造による脆弱性の解析

1) 攪乱に脆弱な繁殖特性の抽出

フタバガキ科種個体群の局所的空間遺伝構造は、種子散布距離、送粉者、及び、成木の空間配置と関係があり、種子散布、送粉距離が短く、成木が小さな集中斑に分割されている種ほど遺伝的に類似した個体が集まっていることが明らかになった。また、飛翔力の高いミツバチが花粉を運ぶ種では、成木の間隔が離れると送粉距離が延びるのに対し、飛翔力が低い甲虫倍の種では間隔が離れても送粉距離は変わらなかった。

2) 攪乱に脆弱な生態特性の抽出

攪乱と乾燥による死亡率が高いフタバガキ科樹種は、より湿潤な立地を好適ハビタットとし、高い回転率と早い成長速度で個体群を維持している種であることが明らかになった。

3) 遺伝的劣化と個体群動態の長期的関連

択伐、断片化が遺伝的多様性に与える長期的影響が大きい種は、元々個体群が小さな集中斑に分

かれていて、局所的空間構造が顕著な種であった。

(2) 生態系劣化評価 2-土壤微生物を指標とした評価方法の確立

2009年度はマレーシア・サラワク州5カ所と日本1カ所について、土壤採集とDNA抽出を行い、16S rRNAとゲノムランダムショットガン配列の解析を行った。両配列の解析から得られた細菌組成(門レベル)は、Acidobacteria,とProteobacteriaが全ての調査地において優占的細菌であったが、全ての分類レベルで分類群の頻度の不均一性が調査区間で検出され、調査森林特異的な細菌種が極めて高頻度で存在することが明らかになった。これらのことは、高次の分類群では森林の環境自体は細菌組成に大きな影響を与えないが、調査区特異的な要素が存在することを意味する。また、16S rRNAの解析によって推定された細菌群集の種多様性は、ランビル谷部と芦生演習林で最も高く、バカム二次林や火災被害林がランビル尾根部やバカム残存林よりも高かった。これは土壤微生物多様性と森林生態系の違い(熱帯林vs.冷温帯林、自然林vs.劣化林)に明確な関係がないことを示唆する。ゲノムランダムショットガン配列の解析から推定された潜在的な代謝機能は、全ての調査区においてElectron transport、Translation、Metabolic process、Proteolysis、Carbohydrate metabolic processの5プロセスが上位を占めた。この結果は調べた土壤微生物群集の潜在的機能は調査区間で共通していることを意味している。

2010年度から2011年度にかけては、インドネシア、シンガポール、日本(伊吹山)とサラワクの上記以外の合計29調査森林からの土壤採集とDNA抽出を行い、また時間的変化を解析するために、2009年度に調査した6調査区において、ほぼ半年間隔の土壤採集・DNA抽出を行って16S rRNA(細菌)とITS(菌類)領域について比較解析した。細菌組成については優占分類群の存在などについては初年度と同様の結果が得られたが、土壤pHが組成に強く影響することが判明した。細菌多様性は地理的に大きなばらつきがあるとともに、調査区特異的な細菌種の存在が確認された。細菌組成は、時間的に一定ではなく変化するが、その変化パターンに明確な規則性は検出できなかった。また細菌組成は時間的変化よりも地理的変異の方が大きいことが判明した。菌類の組成は、細菌と同様に優占分類群が調査区間で共通するが、森林タイプの間で細菌よりも著しく大きな不均一性が検出された。このことは、菌類は細菌よりも森林環境に大きく影響されることを示唆している。また、菌類の多様性(Chao1指数:10³)は細菌の多様性(10⁴)よりも低いことが判明した。

初年度に行った解析によって、調査した微生物群集の潜在的機能は共通しているという結果が得られたため、2011年度には実際に発現している遺伝子(mRNA)を決定し、森林環境と関連した遺伝子(機能)を同定することを目的にメタトランスクリプトーム解析を行った。ランビル尾根部と芦生の土壤から抽出した微生物mRNA配列について推定された微生物組成は、優占分類群が両調査区でも類似しており、発現している遺伝子群の組成にも大きな違いは検出されなかった。一方で、土壤微生物群集の潜在的な機能と顕在化された機能に違いがあることが明らかになった。ただし、これらの結果は得られたデータの3%を解析したものであり、最終的な結論を得るためには現在進行中の全データの解析結果を待つ必要がある。

(3) 遺伝的劣化評価 1-地域集団の解析と多様性保全を目指した造林

1) 遺伝的変異の解析

*Shorea*属4種および*Dryobalanops*属7種の葉緑体および核DNAの塩基配列データを解析し、遺伝的変異および遺伝的分化の程度を推定した。葉緑体DNAのAMOVA分析の結果、*S. curtisii*と*D. beccarii*はマレー半島とボルネオの集団間で高い分化が観察されたのに対し、*D. aromatica*は地域間、地域内集団間のいずれにおいても有意な遺伝的分化が見られなかった。一方、ボルネオ固有種である*S. beccariana*と*S. macrophylla*は地域内集団間で高い遺伝的分化が見られた。このように、遺伝的変異の地理的パターンと集団分化の程度は対象種の間で異なっていた。核遺伝子の遺伝子多様度は種ごとに異なり、0.17-1.10%の範囲を示した。

2) 多様性維持を目指した造林試験

中部ジャワにおいて43年生チークおよびマホガニー人工林の林分調査を行った結果、チーク林で3層の、マホガニー林で2層の階層構造が認められた。両林分の階層ごとに遺伝子解析に資する葉のサンプルを採集し、DNAを抽出した。

(4) 遺伝的劣化評価 2-種及び地域識別遺伝子マーカー開発と広域集団の解析

種識別では*Shorea*属の84種、200個体について葉緑体DNAの4領域(*trnL* intron (506 bp)、*trnL-trnF* (441bp)、*trnH-trnK* (1780 bp)、*psbC-trnS* (1559 bp))の塩基配列を解読した。得られたデータから、材の分類で言われているRed Meranti、Yellow Meranti、White Meranti、Balauの4つのグループは明瞭に識別が可能であった。種間で同じ塩基配列を持つものも存在し、それらは種間の組み合わせで1.64%存在したが、ほとんどの種は識別可能であった。また種内多型の存在も明らかな複数個体を

用いた47種のうち28種で種内多型が確認された。

また地域識別の研究では、マレーシア及びインドネシアの広域に分布する *S. leprosula* の遺伝的分化を調査した結果、ボルネオ島の集団とそれ以外（マレー半島、スマトラ島）で大きな遺伝的な違いが見られた。葉緑体DNAの5領域（合計4393bp）を解析した結果、21のハプロタイプが検出された。集団間の遺伝的な違いを表す遺伝子分化係数は $F_{ST} = 0.5851$ と高い値を示した。また、*S. parvifolia* の遺伝的分化の程度は *S. leprosula* に似ていたが、遺伝的分化係数は低い値であった。このことから、*S. leprosula* については、葉緑体DNAの多型データで大きな地域の産地識別はある程度可能であることが示された。核DNAのEST-SSRで解析した結果では、*S. leprosula* の場合、遺伝子分化係数は低いが（ $F_{ST} = 0.0671$ ）、ボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた。*S. parvifolia* では核のDNAマーカーでは同様にボルネオ島とそれ以外（マレー半島とスマトラ島）が遺伝的に分化していたが、遺伝子分化係数は $F_{ST} = 0.160$ と葉緑体に比べ低かった。本研究で得られたデータでは広域分布種である *S. leprosula* と *S. parvifolia* はボルネオ島とその他の地域（スマトラ島とマレー半島）で明瞭に遺伝的に分化していた。産地識別は、この大きな地域では可能であることが示された。

(5) 遺伝的劣化評価3－希少種および絶滅危惧種の解析（フタバガキの遺伝的変異）

1) *Pinus krempfii*（希少種）と *Pinus yunnanensis*（普遍種）

P. krempfii のハプロタイプ多様度は、アジアに広く分布している他のマツ科の3種（*P. tabuliformis*、*P. densata*、*P. yunnanensis*）と比べるとおよそ50%低い値であった。塩基多様度を比較してみても *P. krempfii* の多様性は他の3種よりも非常に低い。集団間で比較したところ、遺伝的分化が進んでいることが明らかになった。さらに *P. krempfii* の種子サンプルを収集し調べたところほとんどすべての種子の中身が空であった。自殖による適応度低下の状態にもあるということが出来る。

2) *Shorea balangeran*（希少種）と *Shorea leprosula*（普遍種）

Shorea balangeran と *Shorea leprosula* それぞれからcDNAライブラリの構築を行った。得られた配列のうちそれぞれ2682配列、2904配列について機能を推定することができた。これらの配列のうち、438配列は両種に共通して存在しかつ機能を推定することができたものである。96遺伝子座に絞り込み、次世代シーケンサーRoche FLX 454を用いて配列の解析を行った。遺伝的変異量を求めたところ、遺伝子座ごとに大きなばらつきが観察された。

3) *Myoporum bontioides*（絶滅危惧種）

10カ所の核SSRマーカーを用いた研究では、遺伝的変異を検出することができなかった。同様に、5カ所の葉緑体遺伝子領域においても、1サンプル1遺伝子座（*trnL-trnF*領域）を除き、変異を検出することができなかった。要因としては、日本の *M. bontioides* は分布の端に位置するという事実と、人為的な影響により生息域の急激な現象にさらされたという点を挙げる事が出来る。

(6) 遺伝的劣化評価3－希少種および絶滅危惧種の解析（マングローブの遺伝的変異）

オヒルギ全集団における核遺伝子10領域の平均の塩基多様度（ p ）は0.0078で、葉緑体遺伝子1領域の塩基多様度は0.00008であった。この結果は、核遺伝子の方が葉緑体遺伝子より高い多様度を持つことを示す。遺伝的多様性、集団構造の解析には、核遺伝子の方が葉緑体よりも有効であるということが示唆された。各集団における核遺伝子10領域の平均の塩基多様度は、0（インド2地点）～0.004（ベトナム）であり、集団ごとに変異量に差異があることがわかった。種としての変異量0.0078は樹木のみならず草本種を含めた他の植物種と比べても見劣りするものではないが、インド2地点のように集団内に変異が認められない場合が見つかった。これらの集団は環境変化に対して脆弱である可能性が考えられる。AMOVAによる集団構造解析の結果、 F_{ST} は0.853であり、集団間に遺伝的分化があることが明らかになった。さらに、STRUCTUREによる集団構造解析によって以下の3つの地域集団A、B、Cに分かれることが示唆された。それらは、A:マレー半島東部～バリ島、B:オーストラリア、C:マレー半島西部～インド～マダガスカル島である。地域集団AとB間、地域集団BとC間では遺伝的流動の存在が示唆されたが、遺伝的に異なる地域集団をまたぐような植林は避けることが望ましいと考えられる。

(7) 遺伝的劣化評価3－希少種および絶滅危惧種の解析（マダガスカル方式による多様性保全を目指した造林）

調査地において従来から行われてきた *Alluaudia procera* の挿し木による造林は極めて効率良く成果を収めてきた。本種は雌雄異株のため周囲の自然林からの送粉による次世代は遺伝的多様性の回復が望めるが、そうでない樹種では種子繁殖が望ましい。そこで、種子を土球に包埋するシードボール発芽法の導入試験を行い、試験開始1年後に生存率を調査した。調査の便宜のため平坦な陽地に設けた試験圃場では生存率が極めて低かったのに対し、任意に放置した被験外の残余シードボールは特に樹陰で数多く発芽生存しており、前駆林の存在が極めて有効と考えられる。このことは自然環境の異なる

る他地域の人工林においても確かめられた。

次に、調査地では住民主体による森林復元活動が行われており、製炭や製材など環境負荷が高い生活資源に代わる産業として木彫の指導がなされ、実質的にその効果が認められていたものの、具体的なデータで示されてはいなかった。そこで等価収入に対する森林資源の使用量を、製炭と木彫につき比較調査した結果、平均30kgの木炭1袋に約180kgの原木を使用するのに対し、それと等価の木彫3個は約100gであった。さらに1村落27家族を対象に、生業ごとの村落経済への貢献度を調査した結果、33.61%の製炭を筆頭に、木彫が30.46%、農業が24.21%、製材が7.95%、コーヒー販売が3.78%であった。木彫を営む5家族全ては専業で、15年前から製炭や製材から順次転業し、村落経済の1/3近くを担うようになった。外部からの旅行者や業者など新たな購買者がもたらす収入は村落経済を底上げし、従来の環境負荷が高く労働量が多い生業への依存度が減少した。それは、1991～2010年の衛星画像の解析の結果、森林の保全状況が周辺地域より明瞭に良いことに示される。

以上の3年間にわたる研究結果から自然環境の異なる地域へも普遍的に適用し得る要素を抽出し、策定した「森林復元保全のガイドライン」の概要を以下に示す。

- ・ 遺伝的多様性保全を目指す造林には種子繁殖が望ましく、シードボール法が有効な手段となりうる
- ・ 植生遷移を経た熱帯極相林の構成樹種はほとんどが陰樹で、森林復元には前駆林を経ることが必須と言える
- ・ 前駆林の育成には、最終目的とする樹種の生育と極相林への遷移を妨げない樹種の選定が極めて重要
- ・ 前駆林の樹種は在来種が理想的だが、上記の条件を満たすなら外来樹種の利用も検討すべきである（注：外来樹種の人工林内に自然種子散布による自然林構成樹種の若木が順調に生育する例を観察している）
- ・ 前駆林育成には、採種と発芽が容易、用材・薪炭材・蜜源などとして経済的付加価値があるなど、造林に携わる現地住民への負担が軽く、なおかつ生活資源をもたらす樹種が望ましい
- ・ 森林の復元保全の実現には、理論にとどまらず、自然環境と社会環境の双方を配慮し、それらの共存を図る「地域システム」という理念を基本に据えることが肝要である
- ・ 森林復元保全の現場を担うのは、地域住民であることを忘れてはならない

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

1) 送粉距離、空間遺伝構造が送粉者、種子散布能力だけではなく、個体の配置に影響されていることが初めて明らかになった。攪乱、乾燥の影響が種のハビタット特性と関連していることが明らかになり、ハビタット特性が種多様性と遺伝的多様性の両方に関係していることが示唆された。

2) 本研究で得られた全ての結果は熱帯林の微生物群集生態学研究における新知見である。また、地理的に広範囲に存在する細菌種の存在が明らかになり、それらは進化的祖先型と考えられる。一方、地域特異種と単一種の存在は、細菌群集内での活発な種分化と絶滅を示唆する。分子進化学的手法を用いてこれらの細菌種を解析すれば、細菌進化学にも貢献できる。さらに、微生物群集構造を集団遺伝学的に解析する「群集遺伝学」的研究展開を考えており、新しい遺伝学の分野を開拓できると考えている。

3) ボルネオ島を中心にした東南アジア熱帯林におけるフタバガキ科の主要樹種について葉緑体DNA変異を用いた集団の系統地理学的なネットワークを構築した。これから遺伝的分化のパターンが種によって異なることが明らかになり、それぞれの適応進化的な歴史を反映していることが示された。見出された変異の多くが種や地域を識別するマーカーとして利用価値を持つことも重要である。また変異の解析を核遺伝子についても行った結果、熱帯林の樹木集団の遺伝的変異量が、温帯林のそれに比べ決して大きくはないことが示された。これはこれまでの予想とは異なるものであった。希少種および絶滅危惧種の遺伝的変異解析では人為による影響と進化的年月にわたる影響の差違が示されつつある。総じて、自然あるいは人為による環境変動の効果がどの様に森林樹木集団の遺伝的組成を変化させるかについてこれまでにない新しい知見が得られつつある。

4) これらの情報は *Shorea leprosula* と *S. parvifolia* の遺伝子資源としてのどの地域が重要であるかを明らかにでき、現在のフタバガキ科林の成り立ちに関する基礎的なデータが得られたことに大きな科学的意義がある。

5) これまで絶滅の危機に瀕している生物の遺伝学的研究は限られていた。あるとしても絶滅危惧種のみを対象にした研究が主であった。近縁関係にある希少種・普遍種について、平行して集団遺伝学的解析を行なった研究例はこれまでに無い。系統関係が近くかつ異なる状態にある二種の遺伝的変

異をセットで調べることで、熱帯樹木種の絶滅の遺伝的要因について新たな知見をもたらすことができた。

6) マングローブの主要な樹木オヒルギについて、その生息域全体について、その遺伝的構造とその遺伝子タイプの地域分布を明らかにした。マングローブ(オヒルギ)では地域集団毎の遺伝的多様性は非常に低い種全体としてみたときの多様性は陸上の植物と同程度かそれ以上であることが分かった。また、分布域全体で大きく区分される遺伝構造があることが判明した。

7) 海外における森林復元保全事業において、これまで副次的に扱われることの多かった地域住民の生活環境につき社会科学的視点から調査解析を加え、実際に現場を担う彼らの役割に正当な認識を与えた。

(2) 環境政策への貢献

1) フタバガキ科の生態的多様性と遺伝的多様性には密接な関係が存在することを示唆し、これら多様性の劣化防止と保全には、各樹種の生態特性を考慮した保全・管理が重要であることを示す。

2) 本研究の目的であった森林劣化の指標微生物・遺伝子による評価方法を確立すれば、環境政策の運用面(熱帯林保護・保全活動)に貢献できる。具体的には保護・保全対象の熱帯林の劣化の程度を評価し、活動の必要度をランク付でき、保護・保全計画を策定する客観的な根拠となる。保全作業の進捗の程度や保全方法の比較・評価にも利用できる。

3) 本研究課題で得られつつある結果は、熱帯林における生物多様性が遺伝子のレベルでどの様に生成し維持されるのかを明らかにするものである。多様性の維持や創成の機構解明はその裏腹にある森林劣化の遺伝的、あるいは生態的な機序の解明につながるものであり、このことは劣化、縮小した熱帯林の修復再生を行うにあたって極めて有効な指針を与えることになる。

4) 東南アジアの遺伝的多様性のあり方が明らかになってきており、今後の保全に向けての政策立案の資料として活用が期待される。本研究の結果は、これまで熱帯域の多様性保全機能やその成り立ちを、遺伝学的手法を用いて評価するための手法を確立した点において重要な成果をもたらした。

5) 遺伝的変異をマーカーとして希少種および絶滅危惧種の保全・維持を行うためには、その種が本来持つべき遺伝的多様性の量やパターンを正当に評価する必要がある。本サブテーマの目的は熱帯樹木種の遺伝的多様性のいわば標準状態を明らかにし、絶滅リスクを査定するために必要な客観的知見を提供するものである。本研究のような遺伝学的研究は熱帯林の状態の正当な評価や保全方針の立案に貢献できると考えている。環境政策や保全ガイドラインの作成に反映されるよう、さらなる発展的研究の推進や成果の普及に勤める。

6) 本研究に伴い、最終的に以下の様な提言を行うことができた。

マングローブ樹木種の遺伝構造の解析結果に基づく植林ガイドライン：

1. IWP (Indo-West Pacific) 地域のマングローブ集団は大局的には3つの遺伝的グループ(マレー半島西側、東側、オーストラリア)に分けることが出来る。遺伝的かく乱を避けるためにこれら3つの遺伝的に異なる地域集団をまたぐような植林は避けること。

2. 上記遺伝的グループはそれぞれが地域特異的な遺伝的構造をもつ分集団より構成されている。植林は同一集団からの個体または種子を使用すること。

3. 上記2に付随し、それぞれの集団の遺伝的構成を反映するように個体または種子の数を調整して植林を行うこと。

4. 遺伝的変異が全く認められない分集団が確認された。これらの集団は環境変化に対して脆弱である可能性が考えられ、絶滅リスクが高い可能性が考えられる。当該集団よりシードバンク等を準備し、将来的な森林の再生(植林)に備えておくことが望ましい。

7) マダガスカル共和国の環境水源森林大臣が現地を視察し、従来の自然保護政策とは一線を画する、住民自らが主体となった取り組みを評価された。その後、会見した際、この方式の普及および、地域固有の自然と植生景観を社会教育や観光振興に活用する方策の提案を求められた。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

1) K. K. S. NG, S. L. LEE, Y. TSUMURA, S. UENO, C. H. NG and C. T. LEE: Molecular Ecology Resources 9, 393-398 (2009)

“EST-SSRs isolated from *Shorea leprosula* and their transferability to 36 species within the

- Dipterocarpaceae”
- 2) A. ITOH, T. OHKUBO, S. NANAMI, S. TAN and T. YAMAKURA: *Forest Ecology and Management*, 259, 323–332 (2010)
 “Comparison of Statistical Tests for Habitat Associations in Tropical Forests: a Case Study of Sympatric Dipterocarp Trees in a Bornean Forest”
 - 3) S. MASUDA, N. TANI, M. OHTANI AND Y. TSUMURA: *Conservation Genetics Resources*, 2, 109–111 (2010)
 “Characterization of 12 microsatellite loci for important tropical tree species *Shorea maxwelliana* and *S. laevis* (Dipterocarpaceae)”
 - 4) Y. TSUMURA, T. KADO, K. YOSHIDA, H. ABE, M. OHTANI, Y. TAGUCHI, Y. FUKUE, N. TANI, S. UENO, K. YOSHIMURA, K. KAMIYA, K. HARADA, Y. TAKEUCHI, B. DIWAY, R. FINKELDEY, M. NA’ IEM, S. INDRIOKO, K.K.S. NG, N. MUHAMMAD and S.L. LEE: *Journal of Plant Research*, 124, 35–48 (2011)
 “Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products”
 - 5) K. KAMIYA, Y.Y. GAN, S. LUM, M.S. KHOO, S.C. CHUA and N. FAIZU: *Tree Genetics & Genome*, 7, 297–306 (2011)
 “Morphological and molecular evidence of natural hybridization in *Shorea* (Dipterocarpaceae)”
 - 6) E.S. POESIE, T. SHIMAMURA, S.E. PAGE, I. NINOMIYA and S.H. LIMIN: *Tropics*, 19, 93–105 (2011)
 “Species Composition and Phylogenetic Diversity in a Tropical Peat Swamp Forest, Central Kalimantan, Indonesia”
 - 7) 吉田彰: 国立民族学博物館調査報告103, 55–72 (2012)
 「第3章 地域文化を育む自然環境とその継承」
 - 8) T. HARATA, S. NANAMI, T. YAMAKURA, S. MATSUYAMA, L. CHONG, M.B. DIWAY, S. TAN and A. ITOH: *Biotropica* (in press)
 “Fine-scale Spatial Genetic Structure of Ten Dipterocarp Trees in a Bornean Rain Forest”
 - 9) A. ITOH, S. NANAMI, T. HARATA, T. OHKUBO, S. TAN, L. CHONG, S.J. DAVIES and T. YAMAKURA: *Biotropica* (in press)
 “The Effect of Habitat Association and Edaphic Conditions on Tree Mortality during El Niño-Induced Drought in a Bornean Dipterocarp Forest”
 - 10) N.T. MIYASHITA, H. IWANAGA, S. CHARLES, B. DIWAY, J. SABANG and L. CHONG: *PLoS One* (in press)
 “Pyrosequencing-based analyses of soil bacterial community in five tropical forests in Southeast Asia and one temperate forest in Japan”
 - 11) E.S. POESIE, K. HAMAMOTO, K. MOMOSE, T. SHIMAMURA, S.E. PAGE, I. NINOMIYA and S.H. LIMIN: *Tropics* (in press)
 “Fruiting phenology affected by seed preference and fluctuation of seed predator activity in a Tropical Peat Swamp Forest”
 - 12) K. KAMIYA, S. NANAMI, T. KENZO, R. YONEDA, B. DIWAY, L. CHONG, M. A. AZANI, N. M. MAJID, S.K.Y. LUM, K.M. WONG and K. HARADA: *Biotropica* (in press)
 “Demographic history of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variations”
 - 13) M. OHTANI, S. UENO, N. TANI, S.L. LEE and Y. TSUMURA: *Conservation Genetics Resources* (in press)
 “Twenty-four additional microsatellite markers derived from the expressed sequence tags of an endangered tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae)”
 - 14) N. TANI, Y. TSUMURA, K. FUKASAWA, T. KADO, Y. TAGUCHI, S. L. LEE, C. T. LEE, N. MUHAMMAD, K. NIIYAMA, T. OTANI, T. YAGIHASHI, A. B. RIPIN and A. R. KASSIM: *Journal of Ecology* (in press)
 “Male fecundity and pollen dispersal in hill dipterocarps: significance of mass synchronized flowering and implications for conservation.”
 - 15) H. IWANAGA, K.M. TESHIMA, I.A. KHATAB, N. INOMATA, R. FINKELDEY, I.Z. SIREGAR, J. ULFAH, U.J. SIREGAR and A.E. SZMIDT: *Ecology and Evolution* (in press)
 “Population structure and demographic history of a tropical lowland rainforest tree species *Shorea parvifolia* (Dipterocarpaceae) from Southeastern Asia”

(2) 主な口頭発表 (学会等)

- 1) S. Nanami, A. Itoh, S. Tan, B. Diway & T. Yamakura: Annual Meeting of Ecological Society of America, Albuquerque, USA (2009)
 “Genetic structure and gene flow in *Dryobalanops aromatica*, an emergent tree species in a tropical rain forest, Sarawak, Malaysia”
- 2) 遠藤美佳、美濃部純子、小泉修、山崎常行：三学会九州支部大会 (2009)
 「マングローブの一種オヒルギの遺伝的多様性と地域分布」
- 3) 名波哲、伊東明、山倉拓夫、Sylvester Tan、Bibian Diway：日本熱帯生態学会 (2009)
 「リュウノウジュ個体群におけるサイズクラス間の遺伝構造の差異」
- 4) 原田光：第19回日本熱帯生態学会公開シンポジウム 進化の目で見る熱帯：多様性を育むメカニズム (2009)
 「ダーウィンと分子進化、熱帯の遺伝的多様性を生むしくみ」
- 5) 岸本光樹、原田光：日本熱帯生態学会 (2009)
 「葉緑体DNAを用いた*Dryobalanops*属 (フタバガキ科) の系統地理学的研究」
- 6) 原田剛、名波哲、伊東明、山倉拓夫、Bibian Diway、Sylvester Tan：日本生態学会 (2010)
 「マレーシア熱帯雨林におけるフタバガキ科10種の遺伝構造」
- 7) 浦志知恵・美濃部純子・小泉修・猪股伸幸：三学会九州支部大会 (2010)
 「マングローブ樹木種オヒルギの遺伝的変異と集団構造」
- 8) 永石美聡・美濃部純子・梅崎佐和子・小泉修：三学会九州支部大会 (2010)
 「マングローブの一種オヒルギの遺伝的多様性と地域分布Ⅱ」
- 9) 上谷浩一、原田光、名波哲、田中憲蔵、米田令仁、Bibian Diway、Lucy Chong、Mohamad Azani Alias、Nik Muhamad Majid、Shawn Lum、Khoo Meng Wong：日本熱帯生態学会 (2010)
 「セラヤ (*Shorea curtisii*) 地域集団の葉緑体DNA多型」
- 10) T. Harata, S. Nanami, S. Tan, A. Itoh, T. Yamakura, B. Diway and L. Chong: Annual Meeting of Association for Tropical Biology and Conservation, Sanur, Indonesia (2010)
 “Spatial genetic structure of ten dipterocarp species in a tropical rainforest, Sarawak, Malaysia”
- 11) K. Kamiya, S.K.Y. Lum and K. Harada: Annual Meeting of Association for Tropical Biology and Conservation, Sanur, Indonesia (2010)
 “Hybridization in *Shorea* species and its consequences”
- 12) Y. Tsumura, M. Ohtani, N. Tani, S. Ueno, S. L. Lee, K. K. S. Ng, N. Muhammad, B. Diway, R. Finkeldey, E. Khoo, K. Kamiya, K. Harada, S. Indrioko, and M. Na’iem: International Symposium on Forestry and Forest Products 2010, October 5-7, Kuala Lumpur (2010)
 “Phylogeographical study of wide-distributed tree species, *Shorea leprosula*, in Southeast Asia”
- 13) 岩永廣子、John Sabang、Bibian Michael Diway、Lucy Chong、宮下直彦：日本遺伝学会 (2010)
 「メタゲノム解析によるマレーシア熱帯雨林と劣化林における土壌微生物の多様性と機能の解明」
- 14) Y. Tsumura: FRIM/JIRCAS Ecology and Genetics of dipterocarps, -its role in sustainable forest management, January 25-26, Genting Highland (2011)
 “Species and population identification of *Shorea* using molecular markers”
- 15) 名波哲、原田剛、松山周平、伊東明、B.M. Diway、S. Tan、L. Chong、山倉拓夫：日本生態学会 (2011)
 「サラワク州ランビルヒルズ国立公園における*Shorea*属樹種の遺伝構造と遺伝子流」
- 16) 岸本光樹、原田光、上谷浩一、荒木智哉、旗谷章子、Lucy Chong、Bibian Diway、Joseph Jawa Kendawang、John Sugau、Eyen Khoo：日本生態学会 (2011)
 「葉緑体DNA変異に基づく*Dryobalanops*属の系統地理学的研究」
- 17) 岩永廣子、John Sabang、Bibian Diway、Lucy Chong、宮下直彦：日本熱帯生態学会 (2011)
 「メタゲノム解析によるマレーシア天然熱帯林および劣化林における土壌細菌・菌類の組成と多様性の解明」
- 18) 岩永廣子、Bibian Diway、John Sabang、Lucy Chong、宮下直彦：日本微生物生態学会 (2011)
 「メタゲノム解析によるマレーシア天然熱帯林と劣化林における土壌細菌・菌類群集の空間的・時間的変動の解明」
- 19) 伊東明：日本植物学会近畿支部大会 (2011)

- 「ボルネオ熱帯雨林の樹木群集の生態」（招待講演）
- 20) 河野安希子・美濃部純子・梅崎佐和子・小泉修：三学会九州支部大会（2011）
「マングローブの遺伝的多様性と地域分布Ⅲ」
- 21) 武市泰典、原田光、上谷浩一、Bibian Diway、Lucy Chong、Joseph Kendawang、Eyen Khoo、John Sugau、Joan Pereira：日本熱帯生態学会（2011）
「ボルネオにおける *Shorea* 属 *Pachycarpae* 節の葉緑体DNAに基づいた系統地理学的研究」
- 22) 上谷浩一、Henti HENDALASTUTI、原田光、名波哲、田中憲蔵、米田令仁、Bibian Diway、Lucy Chong、Mohamad Azani ALIAS、Nik Muhamad MAJID、Shawn LUM、Khoo Meng WONG：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「セラヤ (*Shorea curtisii*) 地域集団の核DNA配列多型」
- 23) 原田光、花田真美、上谷浩一、Bibian Diway、Lucy Chong、Joseph J. Kendawang、Eyen Khoo、John Sugau：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「フタバガキ科リュウノウジュ属6種の核遺伝子を用いた系統解析」
- 24) 原田光、上谷浩一、ビビアン・デワイ、ルーシー・チョン、ジョセフジャワ・ケンダワン：日本遺伝学会（2011）
「核遺伝子をもちいたマレーシア熱帯雨林リュウノウジュ属(フタバガキ科)の集団遺伝学的解析」
- 25) T. Harata, S. Nanami, T. Yamakura, A. Itoh, S. Matsuyama, L. Chong, B. M. Diway, S. Tan, O. J. Hard: The 5th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress, Shiga, Japan (2012)
“Estimation of seed dispersal from fine-scale spatial genetic structure in the dipterocarp tree populations”
- 26) A. Itoh, S. Miyazaki, S. Matsuyama, S. Nanami, S. Tan, L. Chong: Annual Meeting of the Association of Tropical Biology and Conservation Asia-Pacific Chapter, Xishuangbanna, China (2012)
“Effects of habitat and conspecific density on tropical tree seedlings: results of a transplantation experiment”

7. 研究者略歴

課題代表者：原田 光

1948年生まれ、九州大学理学部卒業、Ph.D.、理学博士、現在、愛媛大学農学部教授

研究参画者

(1) 伊東 明

1964年生まれ、京都大学農学部卒業、愛媛大学農学部助手、現在、大阪市立大学理学研究科教授

(2) 宮下 直彦

1955年生まれ、九州大学理学部卒業、現在、京都大学農学研究科准教授

(3) 原田 光 (同上)

(4) 津村 義彦

1959年生まれ、筑波大学大学院農学研究科修了、博士(農学)、森林総合研究所研究所研究員、現在、森林総合研究所研究所森林遺伝研究領域長

(5) Alfred E. Szmidt

1952年生まれ、ポーランドA. Mickiwics大学生物学部卒業、スウェーデン農業大学助教授、現在、九州大学大学院理学研究院准教授

(6) 小泉 修

1948年生まれ 九州大学理学部卒業 福岡女子大学専任講師、現在、福岡女子大学人間環境学部教授

(7) 吉田 彰

1949年生まれ、東京農業大学農学部卒業、現在、進化生物学研究所主任研究員、東京情報大学総合情報学部嘱託教授

D-0901 熱帯林の減少に伴う森林劣化の評価手法の確立と多様性維持

(1) 生態系劣化評価1-繁殖構造による脆弱性の解析

大阪市立大学・大学院理学研究科	伊東 明
大阪市立大学・大学院理学研究科	名波 哲
大阪市立大学・大学院理学研究科	山倉 拓夫
<研究協力者>	
マレーシア・サラワク林業公社	Lucy Chong
マレーシア・サラワク林業公社	Bibian Diway
スミソニアン熱帯林研究所	Sylvester Tan
大阪市立大学・大学院理学研究科（博士課程）	原田 剛

平成21～23年度累計予算額：34,835千円

（うち、平成23年度予算額：11,087千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 東南アジア熱帯雨林の重要樹種フタバガキ科の遺伝的多様性と生態的特性の関係を明らかにし、森林の伐採と断片化に対する脆弱性を評価するため、ボルネオの熱帯雨林と隣接する択伐残存林で調査を行った。フタバガキ科10種の成熟木の局所的空間遺伝構造をマイクロサテライトマーカーを用いて調べた結果、9種で遺伝的に似た個体が集中する空間遺伝構造が認められた。空間遺伝構造は、種子散布距離と送粉者の種間差に加え、成熟個体の空間配置とも関係しており、成熟個体が小さな集中斑に分かれて分布している種ほど遺伝的構造が強かった。天然林に比べ、択伐残存林では大きいサイズの個体の開花率が低下し、小さいサイズの開花率が上がった。飛翔能力の高いミツバチ媒、飛翔能力の低い甲虫媒のいずれでも、近接する成木間の花粉散布頻度が多く、花粉散布に制限が認められた。送粉距離は、送粉者と成熟個体の配置の相互関係で決まり、成熟木間の距離が遠くなると、ミツバチ媒の種では花粉散布距離が長くなったが、甲虫媒の種では花粉散布距離は変化しなかった。*Dryobalanops lanceolata*の自殖率は、種子、実生、稚樹の順に低下し、自殖由来の個体が近交弱勢によって更新初期に個体群から除去されることが示唆された。10年間の森林動態データから、攪乱と乾燥に対する脆弱性には種間差があり、より湿潤な立地を好適ハビタットとし、高い回転率と早い成長で個体群を維持している種ほど攪乱と乾燥に弱いことが示された。個体群動態に遺伝子的多様性を組み込んだモデルによるシミュレーションの結果、択伐、断片化によって長期的に遺伝的多様性が低下しやすいのは、元々個体が小さな集中斑に分かれ、局所的空間構造が強い種であると予測された。以上の結果は、フタバガキ科の遺伝的多様性が様々な種特異的生態特性（特に個体の空間配置）と関係していることを示しており、遺伝的多様性の劣化抑制と保全には種の生態特性を考慮する必要があることを示唆する。

[キーワード] 生物多様性、遺伝的多様性、熱帯雨林、生態系劣化、フタバガキ科

1. はじめに

熱帯雨林の伐採や断片化は、送粉者の枯渇と個体密度の減少を通じて近親交配を増加させ、近交弱勢によって森林の遺伝的劣化につながる恐れがある。また、遺伝的に劣化した森林では、種子生産量の減少、実生の生存率低下、等によって森林更新に障害が生じ、森林生態系の構造変化が引き起こされる可能性がある。そのため、熱帯雨林の断片化は、遺伝的劣化と生態的劣化に負のフィードバック効果を生じさせ、急速に森林生態系を劣化させる恐れがある。しかし、熱帯雨林の遺伝的多様性と森林生態系の構造の変化との相互関係に関する実証的研究は、これまで、ほとんどなされていない。

我々はマレーシア・ランビル国立公園の熱帯雨林に大面積調査区を設置し、20年に渡って詳細な樹木動態センサスを続けてきた。この調査区は世界最大級の面積をもち、直径1cm以上の全ての個体が識別されているなど、個体群の遺伝的多様性、遺伝構造、遺伝子流動の調査の基盤として極めて有用である。そこで、本サブテーマでは、この調査区を利用し、熱帯雨林樹木の遺伝的多様性と群集・個体群動態の関係を明らかにする研究を計画した。

2. 研究開発目的

上述の大面積調査区を利用し、東南アジア熱帯雨林の重要樹種フタバガキ科の遺伝的多様性と生態的特性の関係を明らかにするとともに、隣接する択伐残存林と天然林を比較することで、森林の伐採と断片化が熱帯雨林樹木の遺伝的劣化と個体群動態に及ぼす影響を評価することを本サブテーマの目的とする。具体的には、(1) 択伐や断片化で遺伝的劣化を受けやすいのはどんな繁殖特性を持つ種個体群か、(2) 択伐や断片化の影響を受けやすい種に共通の生態的特性は何か、(3) 遺伝的劣化と個体群動態の間に長期的関連が存在するか、を明らかにする。

3. 研究開発方法

(1) 攪乱に脆弱な繁殖特性の抽出

1) 局所的空間遺伝構造

遺伝的に近い個体が空間的に集まって分布する局所的空間遺伝構造があると分断化により近親交配が増加するリスクが増加する。そこで、主要フタバガキ科10種 (*Dipterocarpus globosus*, *D. crinitus*, *Dryobalanops aromatica*, *D. lanceolata*, *Shorea acuta*, *S. amplexcaulis*, *S. beccariana*, *S. curtisii*, *S. ovata*, *S. parvifolia*) を選び、天然林における空間遺伝構造を調べ、各種の生態特性との関係を解析した。大面積調査区内の全ての成熟個体(胸高直径30 cm以上の個体を成熟個体とした)から葉を採取してDNAを抽出し、マイクロサテライト(SSR) マーカー(各種6~16遺伝子座、平均9遺伝子座)を用いて個体の遺伝子型を特定した。PCソフトSPAGeDi¹⁾を用いて、局所的空間遺伝構造の強さを定量化し、各種の送粉者、種子散布能力、個体の空間分布と局所的空間遺伝構造との関係を解析した。

2) 断片化が開花、及び、花粉による遺伝子流動に及ぼす影響

森林の断片化がフタバガキ科の開花、結実に与える影響を推定するため、ランビル国立公園の

大面積調査区（天然林）とバカム試験地の択伐残存林において、一斉開花年（2009年）にフタバガキ科主要樹種の成熟個体（ランビル16樹種1,749個体、バカム13樹種95個体）の開花、結実を調べた。また、花粉の流動範囲を推定するため、ミツバチ媒の*Dryobalanops lanceolata*と小型甲虫媒の*Shorea ovata*について、ランビル大面積調査区内の結実個体各3個体から成熟果実を採取し、SSRマーカーを使って花粉親を推定し、自殖率と送粉距離を調べた。また、*Dryobalanops aromatica*の送粉について、実生を用いて同じ方法で推定した。断片化が送粉に与える影響を検討するために、*Shorea ovata*については、バカム残存林でも同様に送粉距離を推定した。また、自殖種子から育った実生に近交弱勢があるかどうかを推定するために、大面積調査区内の*Dryobalanops lanceolata*の成熟果実、実生、稚樹に占める自殖由来の個体の割合をSSRマーカーを用いて調べた。

（2）攪乱に脆弱な生態特性の抽出

択伐、断片化などに伴う攪乱に脆弱な生態特性を抽出するため、大面積調査区のデータを基盤にフタバガキ科樹木の個体群動態に関する詳細な解析を実施した。

1) フタバガキ科個体群の存続可能性分析

調査区を20m×20mの枠1,300個に分け、1992年、1997年、2002年の各調査時点で、胸直径1cm以上の枠あたり個体数をフタバガキ科の樹種ごとに数えた。 t 年時点での枠あたり個体数 $x(t)$ と5年後の個体数 $x(t+\Delta t)$ の関係に以下のモデルを当てはめ、個体数変動のシミュレーションを行った（図(1)-1）。

$$x(t+\Delta t) = a + b x(t) + c x^2(t) + e$$

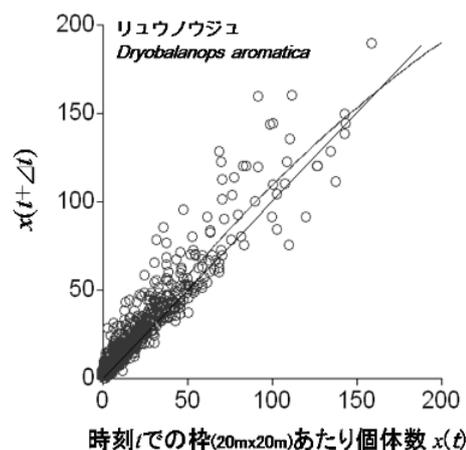
ここで、 a 、 b 、 c は種によってきまる定数。 e は誤差項で観察された誤差の中からシミュレーションによって無作為に選ばれる。

各種について、初期個体数を0～100まで1ずつ変え、それぞれ1,000回ずつシミュレーションを行った。個体数が負の値になった時点で絶滅とみなした。初期個体数と絶滅率の関係を個体群が安定していたリュウノウジュ（*Dryobalanops aromatica*）を基準にして、以下の式であらわされるユークリッド距離 Z によって評価した。

$$Z = \sqrt{\sum_{i=0}^{100} (z_{a,i} - z_i)^2 / 101}$$

ここで、 $z_{a,i}$ はリュウノウジュの初期個体数 i の絶滅確率、 z_i は対象種の初期個体数 i の絶滅確率。 Z の値が大きいほどリュウノウジュとの違いが大きいことを示す。

2) 森林の乾燥化が死亡率に及ぼす影響



図(1)-1 ある年の枠あたり個体数と5年後の個体数の関係の例。

択伐、断片化によって林床への入射量が増加するため、残存林は天然林より乾燥化することが多い。こうした残存林の乾燥化は、残された個体の生存と成長に悪影響を及ぼす可能性がある。乾燥化によって影響を受けやすい樹種の特性を明らかにするために、1998年に起きたエルニーニョによる異常乾燥の死亡率への影響を大面積調査区の森林動態データを使って解析した。胸高直径1~10 cmと10 cmの2つのサイズクラスに分けて、乾燥前（1992~1997）、乾燥期（1997~1999）、乾燥後（1999~2002）の死亡率を次の式で表されるロジスティック回帰モデルで解析した。

$$P = \left(\frac{1}{1 + \exp(-b_0 - b_1 x_1 - b_2 x_2 - b_3 (x_1 \times x_2) - b_4 \ln(x_3))} \right)^t$$

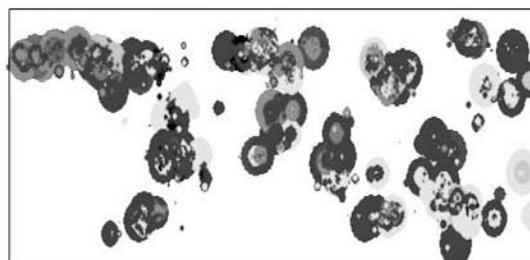
ただし、 P は死亡確率、 t は調査間隔（年）、 x_1 は乾燥指数、 x_2 は種のハビタット指数、 x_3 は種の個体群密度、 $x_1 \times x_2$ は乾燥指数とハビタット指数の交互作用、 $b_0 \sim b_4$ は係数。モデル係数は最尤法で推定した。モデルから予測される各時期の死亡率を比較し、種のハビタット特性と土壌の乾燥のどちらがより重要かを検討した。さらに、フタバガキ科の主要樹種について詳しい解析を行った。

3) 遺伝的劣化と個体群動態の長期的関連

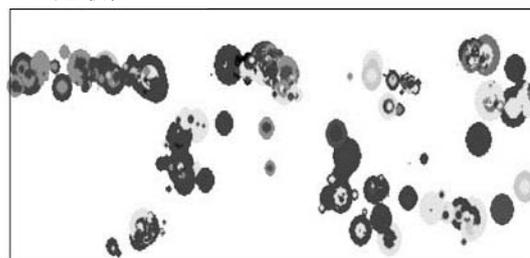
伐採による熱帯林の断片化は、種子や花粉による遺伝流動を制限し、残された森林の個体群動態と遺伝的劣化が相互に関わりながら長期的な影響を及ぼす恐れがある。しかし、寿命の長い樹木で、将来の世代に現れる遺伝的影響を実際に調べることは難しい。そこで、個体群動態モデルに遺伝子流動を組み込んだ個体ベースモデルECO-GENE²⁾を使い、森林の断片化がフタバガキ科樹木個体群の遺伝的多様性に与える長期的影響をシミュレーションによって予測した。

断片化の遺伝的影響には、花粉流動の差が特に重要と考え、飛翔能力の高いオオミツバチと低い小型甲虫に花粉が運ばれる種の間で結果を比較した。大面積調査区に生育するフタバガキ科からオオミツバチ媒4種（*Dipterocarpus globosus*, *D. crinitus*, *Dryobalanops aromatica*, *D. lanceolata*）と小型甲虫媒6種（*Shorea acuta*, *S. amplexcaulis*, *S. beccariana*, *S. curtisii*, *S. ovata*, *S. parvifolia*）を選び、シミュレーションを行った。シミュレーションには、各種の動態パラメーター（種子生産量、成長速度、死亡率）、生産パラメーター（開花頻度、送粉様式、送粉者の行動、自殖率、結実率、種子散布距離）、遺伝パラメ

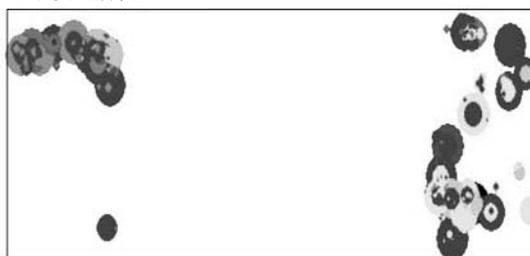
シナリオ1: 伐採なし



シナリオ2: 択伐



シナリオ3: 断片化



図(1)-2 シミュレーションの例

(*Dipterocarpus glagosus*)。

円の大きさは個体の直径を、色は対立遺伝子の違いを表している。

ター（対立遺伝子頻度、空間遺伝構造）が必要である。成長速度と死亡率は大面積調査区の10年間の動態調査の結果を、対立遺伝子頻度と空間遺伝構造は同調査区での成熟個体の遺伝調査（マイクロサテライト解析）の結果を用いた。その他のパラメーターは、文献と現地での観察に基づいて種ごとに推定した。1) 伐採なし、2) 択伐：直径60cm以上の個体の50%を40年に1度無作為に伐採、3) 断片化：調査区の中央部500 m × 600 mの全樹木を1度だけ伐採、の3つのシナリオでシミュレーションを行った（図(1)-2）。各シナリオについて500年間のシミュレーションを10回ずつ繰り返し、個体数、断面積合計、送粉距離、遺伝的多様性の変化を比較した。更に、断片化した森林の間に植林することで遺伝的劣化を止められるかどうかを、*Shorea ovata*を使ったシミュレーションで検討した。

4. 結果及び考察

(1) 攪乱に脆弱な繁殖特性の抽出

1) 局所的空間遺伝構造

調査したフタバガキ科10種の個体群の遺伝的多様性には、 H_e で0.52~0.84と幅があった（表(1)-1）。いくつかの種と遺伝子座にnull遺伝子が存在する可能性が高かったため、これを考慮して近交係数 F_{is} (IIM)を推定した（表(1)-1）。いずれの集団でも F_{is} (IIM)はゼロと統計的な有意差が無く、成熟木には近親交配の影響は認められなかった。調査した自然集団では、近親交配が少ないか、あるいは、近親交配でできた個体の多くは成熟できないと考えられる

表(1)-1. SSRマーカーに基づいた各種個体群の成熟木の遺伝的多様性。

N ：分析サンプル数、 P ：送粉昆虫（G：ハチ、B：小型甲虫）、 $Loci$ ：対立遺伝子座数、 N_a ：対立遺伝子数の平均、 N_e ：有効対立遺伝子数の平均、 H_e ：ヘテロ接合の期待値、 H_o ：ヘテロ接合の観察地、 F_{is} ：近交係数、 F_{is} (IIM)：null遺伝子を補正した近交係数。

Species	N	P	$Loci$ i	N_a	N_e	H_e	H_o	F_{is}	F_{is} (IIM)
<i>D. crinitus</i>	23	G	7	6.6	4.2	0.673	0.689	-0.002	0.002
<i>D. globosus</i>	289	G	6	28.7	9.1	0.843	0.798	0.056***	0.006
<i>D. aromatica</i>	375	G	10	14.5	4.9	0.589	0.640	0.081***	0.003
<i>D. lanceolata</i>	26	G	8	6.8	3.4	0.601	0.591	0.036	0.020
<i>S. acuta</i>	144	B	7	14.1	6.2	0.806	0.772	0.046***	0.006
<i>S. amplexicaulis</i>	27	B	10	11.5	5.7	0.739	0.589	0.221***	0.027
<i>S. beccariana</i>	115	B	10	18.0	6.5	0.792	0.660	0.170***	0.038
<i>S. curtisii</i>	50	B	16	5.1	2.6	0.521	0.545	-0.035	0.003
<i>S. ovata</i>	36	B	7	10.4	5.3	0.774	0.794	-0.011	0.007
<i>S. parvifolia</i>	42	B	9	15.0	8.0	0.819	0.749	0.100***	0.018

***: $P < 0.001$

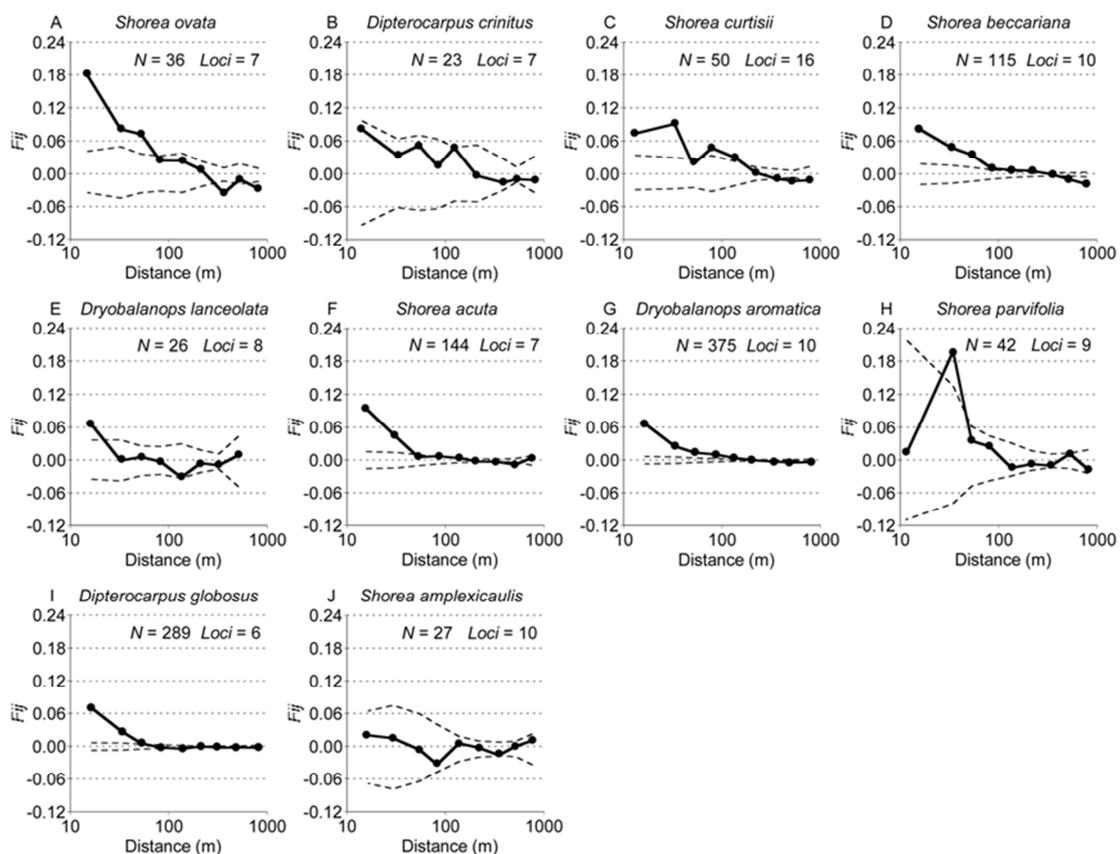
解析した10種のフタバガキ科の9種では統計的に有意な局所空間遺伝構造が認められ、遺伝的に似た個体が集中していた（図(1)-3）。また、多くの種では、空間スケール100m以下で遺伝構造がより明瞭で、100m以上になると不明瞭になった。これは、距離スケールによって遺伝構造を決めるメカニズムが異なっていることを示唆しており、これまでの研究では見過ごされてきた重要な点である。

そこで、赤池情報量（AIC）を用いて遺伝構造の強さに関係する要因を選択した結果、100m以

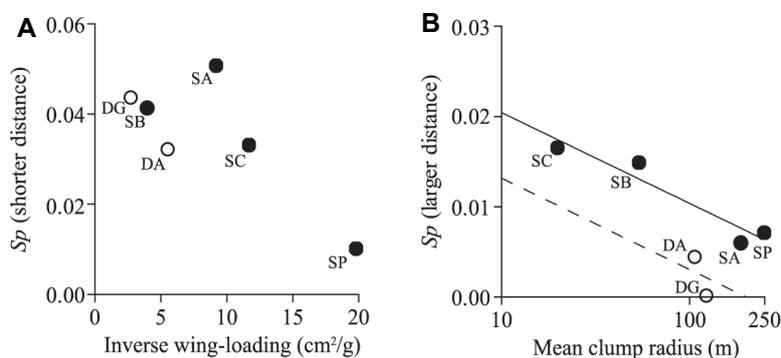
下のスケールでは種子散布能力のみが選ばれ、種子散布能力の小さい種ほど遺伝構造が強かった（図(1)-4A）。一方、100m以上の空間スケールでは、個体の分布様式と送粉者を含むモデルが選ばれ、成熟個体の集中斑の半径が小さく個体群が分断されている種、飛翔能力の低い甲虫に花粉が運ばれる種で遺伝構造が強いことが明らかになった（図(1)-4B）。

これらの結果は、以前から指摘されている通り、種子散布距離と送粉距離が局所的空間遺伝構造に関係していることを支持する。しかし、フタバガキ科樹種においては、これら2つの要因の影響は同等ではなく、種子散布の影響は小さい空間スケールで、送粉の影響は大きい空間スケールでより重要であることが初めて示された。これは、フタバガキ科の種子散布距離が送粉距離に比べて著しく短いことを予想させる。

最も注目すべき結果は、空間遺伝構造が種子散布、送粉のみではなく、個体の空間分布からも影響を受けている可能性が強く示唆された点である。成木個体群の空間構造が空間遺伝構造に影響を与えるのであれば、森林の伐採、断片化などによる個体群の空間構造の変化が、長期的な空間遺伝構造の変化につながる可能性を強く示唆する。



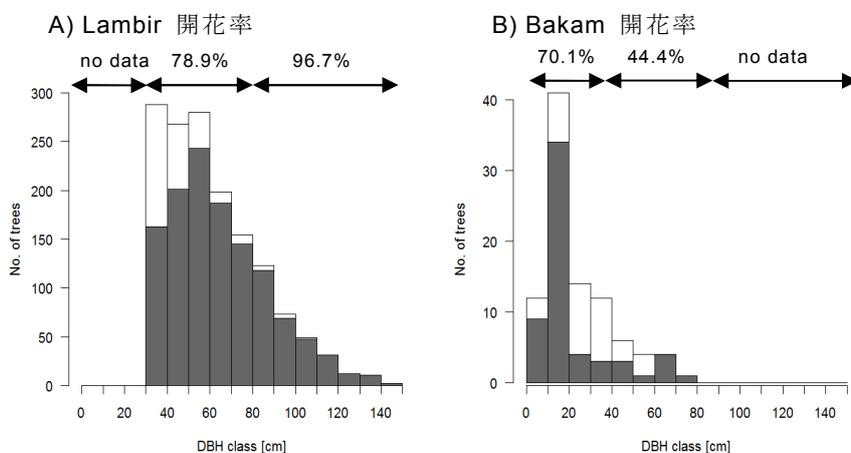
図(1)-3 フタバガキ科10種の局所空間遺伝構造。横軸は個体間の距離クラス、縦軸は個体間の遺伝的類似度(F_{ij})の平均。点線は95%信頼区間。



図(1)-4 A：種子散布能力の指数（inverse wing-loading）と小スケールの局所空間構造の強さ（ Sp 値）の関係． B：成木集中斑の平均半径（mean clump radius）と大スケールの Sp 値の関係． 黒丸は小型甲虫媒の種、白丸はオオミツバチ媒の種．

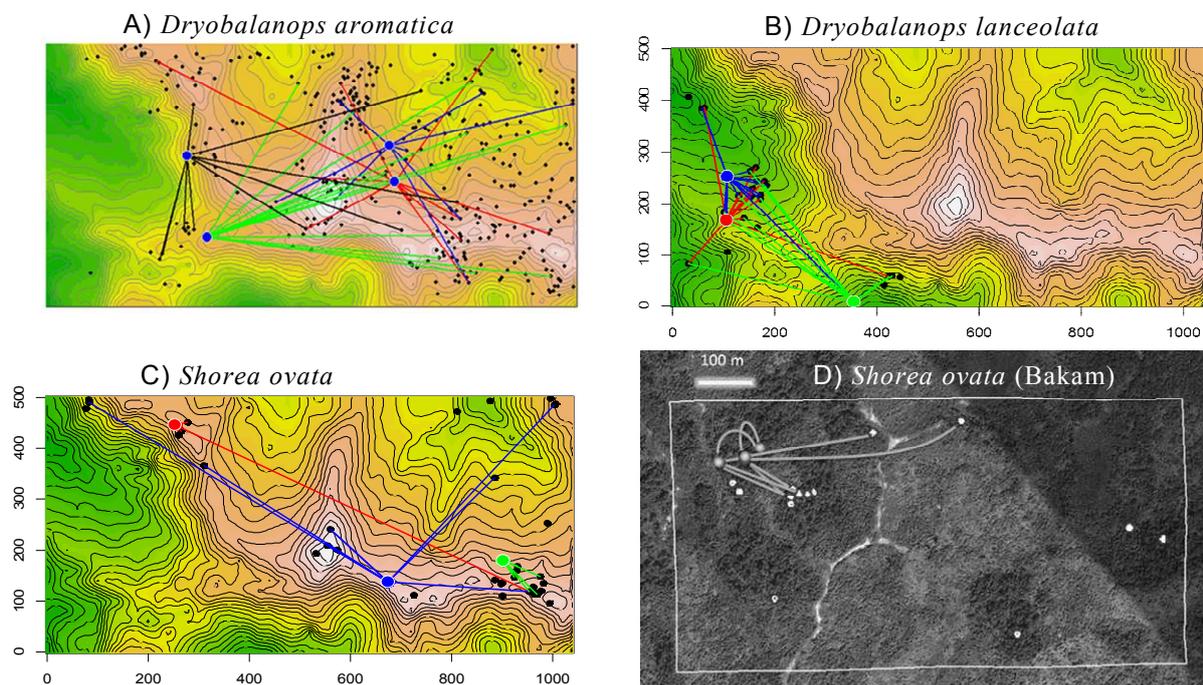
2) 断片化が開花、及び、花粉による遺伝子流動に及ぼす影響

2009年の一斉開花年にランビル天然林で調査したフタバガキ科16種の開花率（開花個体の割合）は、胸高直径30～80cmで78.9%、80cm以上で96.7%で、ほとんどの成木が開花した。一方、バカム残存林では、胸高直径30～80cmの開花率は44.4%しかなかった。一方、バカム残存林では、胸高直径30cm未満の小さな個体でも多くが開花した。ランビルでは30cm未満の個体の開花率は調べていないが、現地での観察から、開花個体は少ないと考えられる。1回の一斉開花年での観察しかしていないため、一般化は危険だが、残存林では大きなサイズの個体の開花率が悪くなる一方で、天然林では開花しない小さな個体が開花するようになるのかもしれない。伐採、断片化によって小さな個体まで樹冠が露出することが関係しているのかもしれないが、理由はわからない。詳細については今後の研究が必要だが、伐採、断片化はフタバガキ科の開花にも影響を与える可能性が高い。

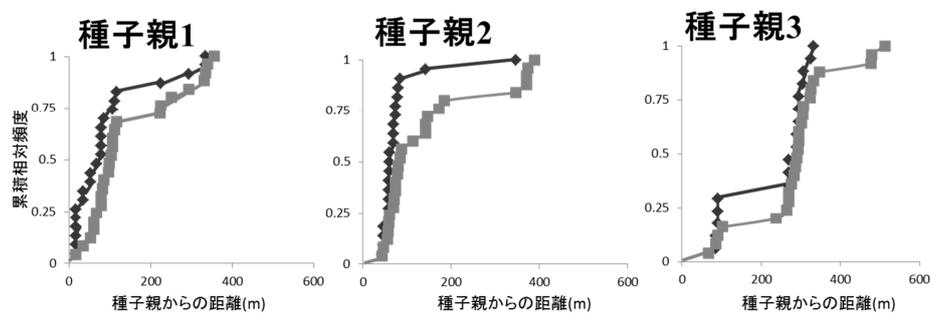


図(1)-5 一斉開花年における主要フタバガキ科の直径階別の開花（白）、非開花（黒）個体数． A：ランビル天然林． B：バカム残存林．

各調査母樹で推定された送粉経路を図(1)-6に示す。*Dryobalanops aromatica*, *D. lanceolata*, *Shorea ovata*のいずれの種においても、長距離の送粉も観察されたが、成熟個体間での自由交配(ランダム交配)から予想される場合よりも、近くの個体間での交配頻度が高かった(図(1)-7に*D. lanceolata*の例を示した)。この結果は、ミツバチ媒、甲虫媒ともに花粉流動に一定の制限が存在することを示す。飛翔能力の高いミツバチであっても近くの開花個体へ移動するケースが多いためであろう。

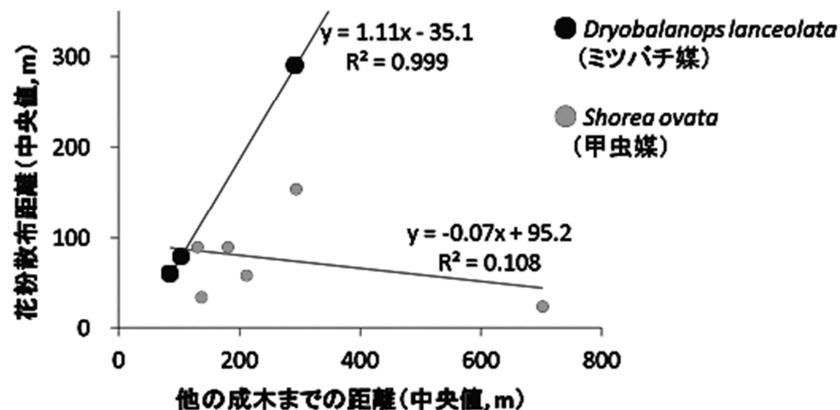


図(1)-6 マイクロサテライトマーカーによる父性解析で推定された送粉経路。A~C: ランピル天然林。D: バカム残存林。Aは実生、B~Dは成熟果実から推定した結果。



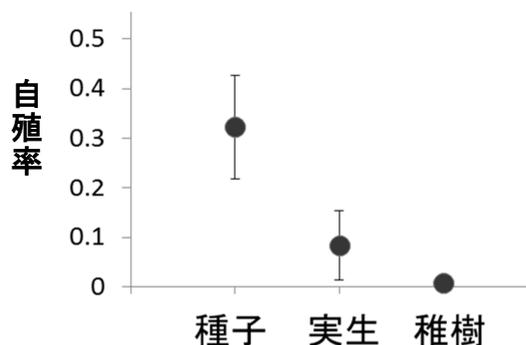
図(1)-7 *Dryobalanops lanceolata*成熟果実から推定した3母樹の送粉距離の累積頻度曲線(◆)。■は自由交配(ランダム交配)が行われている場合に期待される曲線。

図(1)-8に母樹ごとの他の成熟個体までの距離（中央値）と送粉距離（中央値）の関係を示す。甲虫媒の*Shorea ovata*では、他の成熟個体までの距離が遠くても送粉距離は100m前後で変化がないのに対し、ミツバチ媒の*Dryobalanops lanceolata*では成熟個体までの距離が遠くなると送粉距離も長くなっていった。これは、甲虫は飛翔能力が低いため、他の成熟個体までの距離が変化しても送粉距離が変化することが難しいためであろう。一方、飛翔能力の高いミツバチは、近くに成熟個体がいなくなると遠くまで花粉を運ぶと思われる。この結果は、択伐や断片化によって成熟個体間の距離が大きく離れた場合、ミツバチ媒の種では花粉散布距離を増加させることで交配が可能だが、甲虫媒の種では離れた個体との交配ができなくなる可能性が高いことを示唆する。ただし、今回調べた甲虫媒の*Shorea ovata*では、天然林においても個体群が小さな集中斑に分かれていたため、天然林と残存林で成熟個体間の距離があまり変化せず、送粉距離の違いも顕著ではなかった。



図(1)-8. *Dryobalanops lanceolata* (ミツバチ媒) と *Shorea ovata* (甲虫媒) の各母樹における他の成木までの距離と花粉散布距離の関係。

*Dryobalanops lanceolata*の成熟種子には自殖由来のものが32.3%含まれており、自殖個体の割合は、実生（8.4%）、稚樹（0.9%）になるにつれて統計的に有意に減少した（図(1)-9）。これは、*D. lanceolata*の自殖種子には強い近交弱勢が働いており、自殖由来の個体のほとんどは更新の初期段階で除かれていることを示唆する。これまでに他のフタバガキ科樹種でも自殖種子に発芽、成長において近交弱勢の影響が出ることが報告されている。そのため、フタバガキ科樹木では、伐採、断片化によって送粉が制限されて自殖率が高くなると、有効な種子の生産数が減少することにつながり、更新に支障が出る可能性が高いだろう。

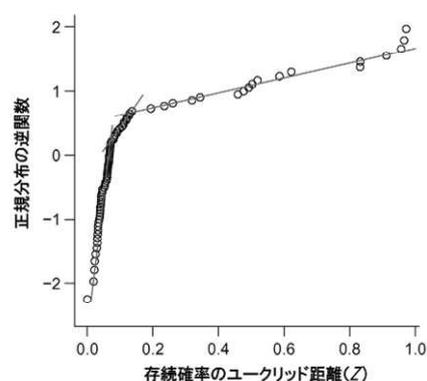


図(1)-9 *Dryobalanops lanceolata*の成熟種子、実生、稚樹の平均自殖率。

(2) 攪乱に脆弱な生態特性の抽出

1) フタバガキ科個体群の存続可能性分析

各種の個体数と存続確率の距離Zの間には統計的に有意な相関は認められなかった (Spearmanの順位相関 $r = -0.143, p = 0.204$)。各種のZ値を正規確率紙上にプロットしたところ、フタバガキ科80種が、存続可能性の特性の違う3つのグループに分かれることが示された (図(1)-10)。このうちZの大きいグループには存続確率の小さい18種が含まれた。これらの種の中には、調査区内に500個体以上が成育する普通種が6種も含まれていたが、こうした種は、死亡率、更新率がともに高く、高い回転率で個体群を維持しているのが特徴であった。

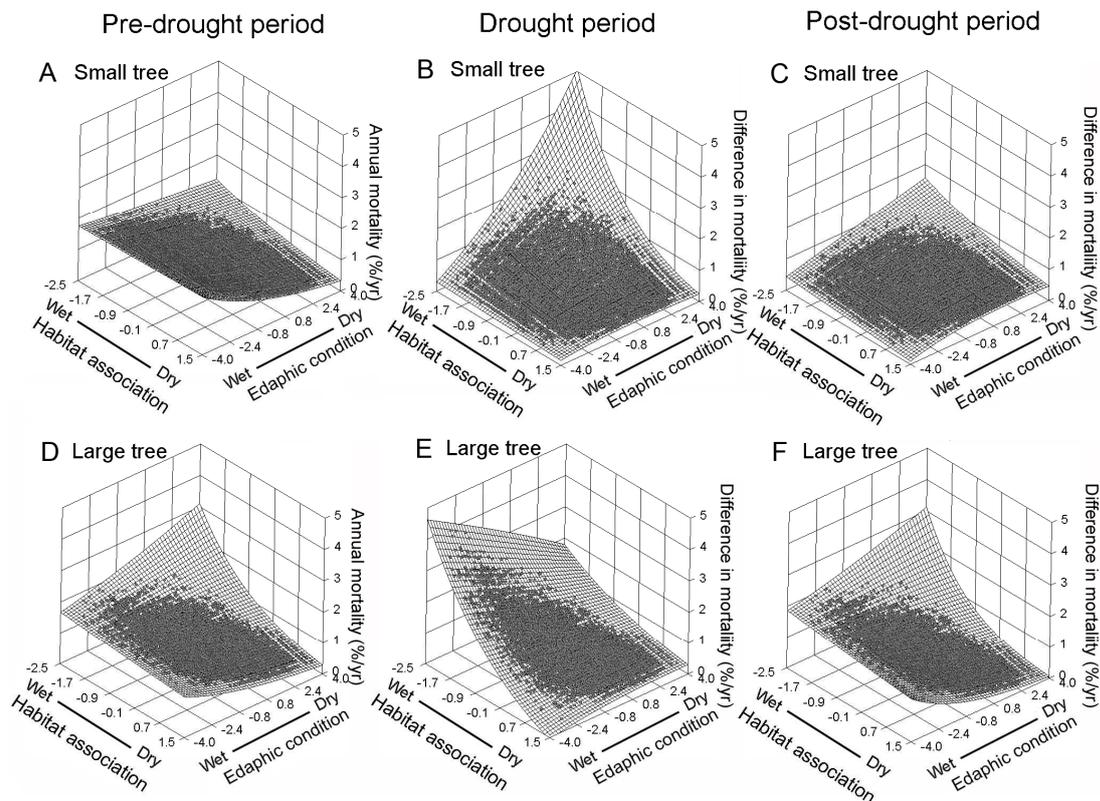


図(1)-10 フタバガキ科80種のZ値の正規確率紙へのプロット。

以上の結果は、現在、個体数が多い種の中にも攪乱に脆弱な種があることを意味しており、天然林内の個体数の多寡のみから攪乱の影響を評価することの危険性を示唆している。今後、存続確率の異なる種群に特徴的な生態特性を明らかにし、長期動態データがなくても攪乱に対する脆弱性のある程度推定できるようにする必要がある。

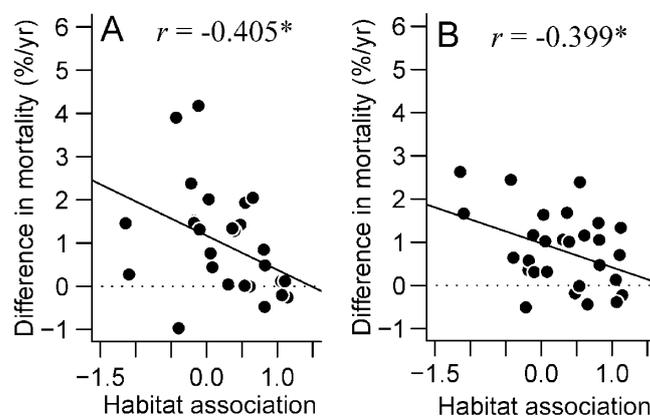
2) 森林の乾燥化がフタバガキ科の死亡率に及ぼす影響

エルニーニョに伴う異常乾燥時の死亡率に関するロジスティック回帰分析の結果から、乾燥の影響には、立地条件と種の間には統計的に有意な相互作用があることが明らかになった (図(1)-11)。乾燥時の死亡率は、乾燥前に比べて全体的に増加したが、増加の程度は一定ではなく、より湿った場所を好適ハビタットとする種ほど、乾燥時に死亡率が大きく増加した (図(1)-11B, E)。特に、胸高直径10cm未満の個体では、湿った場所をハビタットとする種の個体が乾燥する立地条件に生育していた場合に、死亡率が顕著に大きくなった (図(1)-11B)。一方、乾いた場所をハビタットとする種では、乾いた立地でも湿った立地でも死亡率はそれほど変わらなかった。これら結果は、湿った場所をハビタットとする種ほど乾燥に対する耐性が低く、異常乾燥の影響を受けやすいことを示唆する。



図(1-11) 乾燥前 (A, D)、乾燥時 (B, E)、乾燥後 (C, F) における、立地環境 (Edaphic condition)、及び、種の好適ハビタット (Habitat association) と死亡率の関係のロジスティック回帰モデルによる予測。A-C: 胸高直径1~10cmの個体。D-F: 胸高直径10cm以上の個

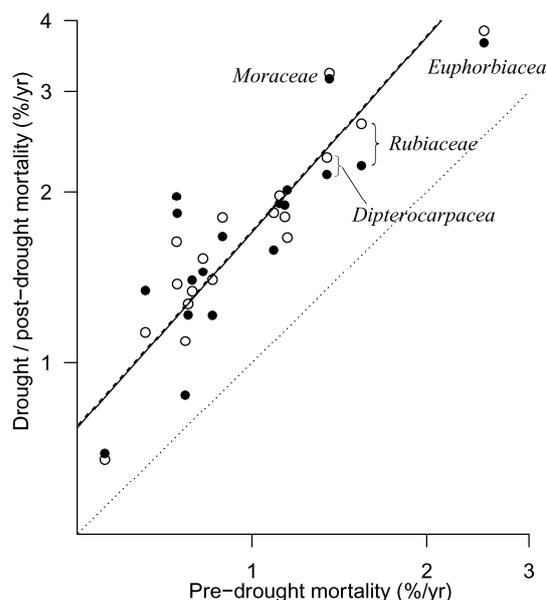
全種での解析と同様の結果が、フタバガキ科のみの解析でも得られた。フタバガキ科の中でもより湿った立地をハビタットする種ほど乾燥時の死亡率の増加量が多く、乾燥への耐性が低いことが示唆された (図(1-12))。



図(1-12) フタバガキ科樹種の好適ハビタット (Habitat association) と乾燥時の死亡率増加量の関係。A: 胸高直径1~10cmの個体。B: 胸高直径10cm以上の個体。

普段（乾燥前）の平均死亡率が高い科ほど乾燥による死亡率の増加量が大きく、乾燥の影響を受けやすいことが示された（図(1)-13）。また、フタバガキ科が、先駆種を多く含むトウダイグサ科（Euphorbiaceae）、クワ科（Moraceae）、アカネ科（Rubiaceae）に次いで乾燥の影響を受けやすい科であることがわかった。

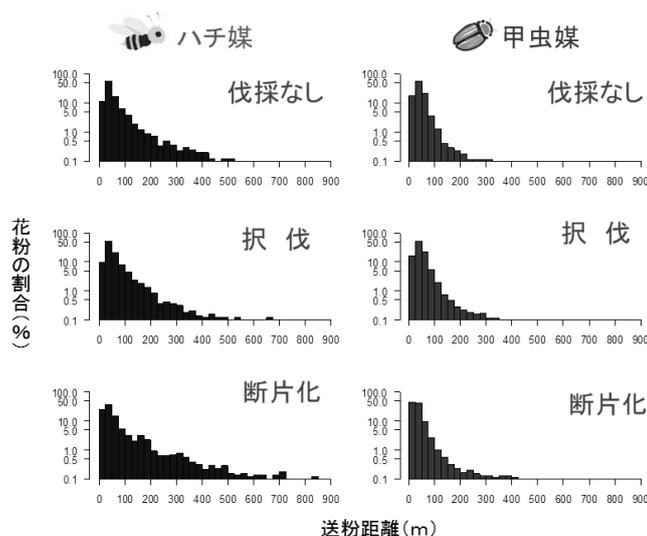
以上の結果は、伐採、断片化に伴い残存林が乾燥した状態になった場合、フタバガキ科樹種、中でも湿った場所をハビタットとする樹種に、特に悪影響が出る恐れが高いことを示唆する。これまでの森林動態データから、湿った場所をハビタットとする種ほど、成長は早いけど死亡率も高く、高い回転率で個体群を維持している傾向のあることがわかっている。前述の個体群の存続分析の結果と合わせると、湿った立地をハビタットとする回転率の高い樹種ほど、攪乱や乾燥に脆弱で、伐採、断片化の影響をより強く受けると予想される。



図(1)-13. 乾燥前と乾燥時(○)・乾燥後(●)の各科の平均死亡率の関係。

3) 遺伝的劣化と個体群動態の長期的関連

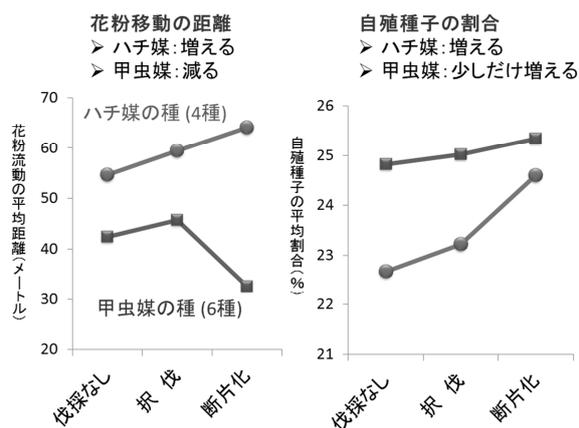
EcoGeneのシミュレーション結果から、択伐、断片化による送粉距離の変化はハチ媒の種で特に大きくと予測された。ハチ媒の樹種では、断片化によって遠距離の送粉頻度が増加する一方で、近接個体間の送粉頻度も増加した（図(1)-14）。甲虫媒の種でも同様の傾向が見られたが、変化の程度は小さく、断片化しても遠距離の送粉はあまり増えなかった。



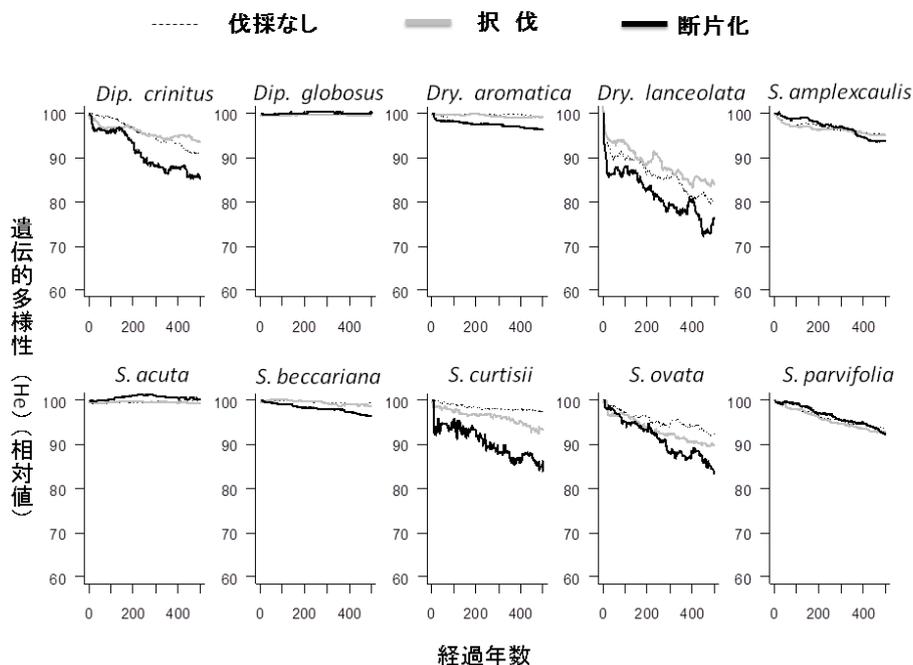
図(1)-14 EcoGeneシミュレーションにおける花粉散布距離の頻度分布。全シミュレーション（500年×10回）の値を合わせたもの。

ハチ媒では、伐採なし、択伐、断片化の順に平均送粉距離が増加したが、甲虫媒では断片化において平均送粉距離が最小になった（図(1)-15）。自殖種子の割合は、どの種でも、伐採なし、択伐、断片化の順に増える傾向があったが、自殖率増加の程度はハチ媒で特に大きかった（図(1)-15）。

遺伝的多様性は、いずれの種でも時間につれて徐々に減少した（図(1)-16）。これは、伐採、断片化によって個体群サイズ（個体数）が減少するためと考えられる。断片化によって遺伝的多様性が特に大きく減少しやすい種は、*Dipterocarpus crinitus*、*Shorea curtisii*、*Shorea ovata*の3種だった。これら断片化に脆弱と思われる種は甲虫媒、ハチ媒ともに存在したが、共通する特徴として、元々の個体数が少なく、遺伝的に類似した個体が集中する明瞭な空間遺伝構造を持つ種である点が上げられる（図(1)-17）。



図(1)-15 択伐、断片化による花粉流動の平均距離と自殖種子の割合の変化. EcoGeneのシミュレーション結果より集計.

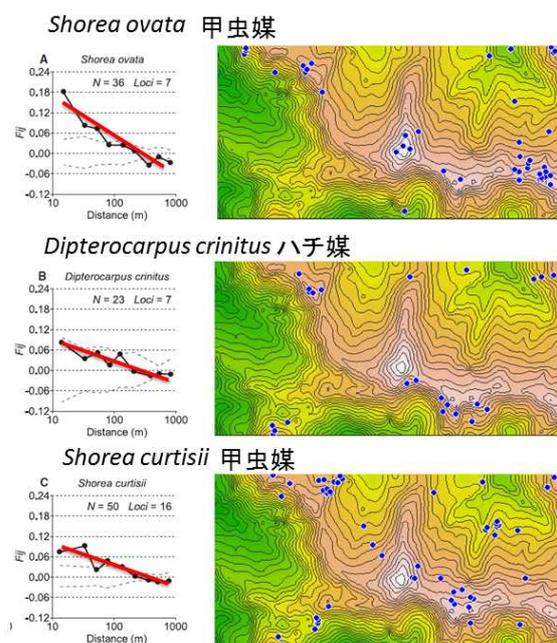


図(1)-16 フタバガキ科樹種の好適ハビタット (Habitat association) と乾燥時の死亡率増加量の関係. A: 胸高直径1~10cmの個体. B: 胸高直径10cm以上の個体.

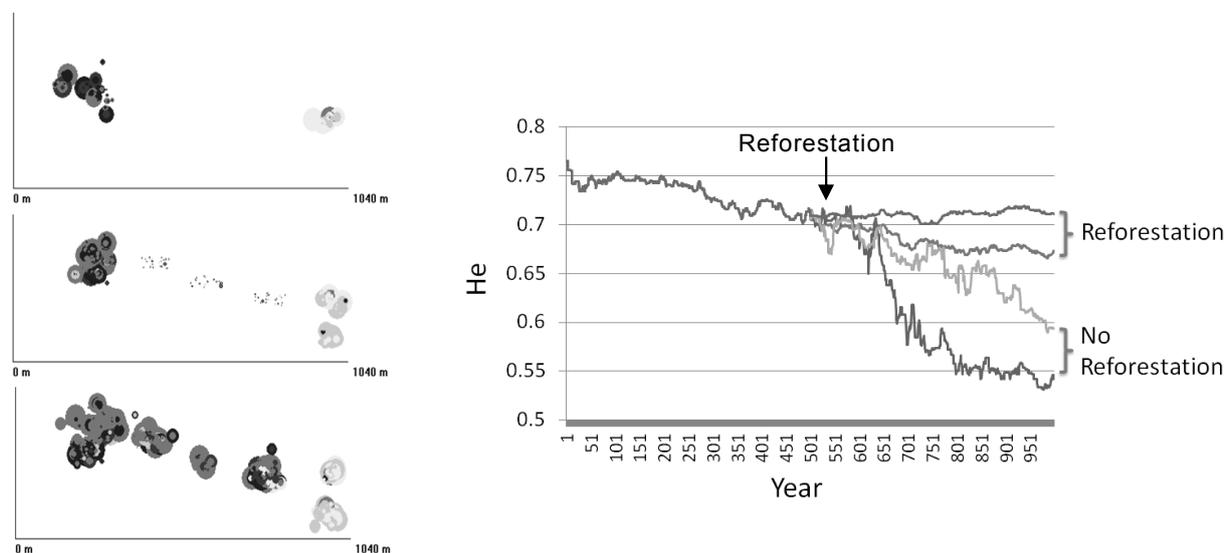
これらのシミュレーション結果は、残存個体の空間遺伝構造が遺伝的多様性の減少の程度に関係していることを示唆する。そのため、残存個体の空間遺伝構造を考慮した森林管理を行うことで、択伐や断片化の影響を軽減できる可能性がある。

そこで、*Shorea ovata*を例に、断片化した個体群の間に残存林で生産された種子を用いて植林するシミュレーションを行い、遺伝的多様性の変化を調べた（図(1)-18）。その結果、植林しない場合には、遺伝的多様性の減少が継続するのに対し、植林すると遺伝的多様性の減少が軽減された。このシミュレーションでは、外部の個体群からの遺伝子流入を仮定していないため、一度減少した遺伝的多様性が回復することはないが、さらなる遺伝的多様性の減少を止めることは可能であることが示唆された。

前述の通り、天然林内の局所的空間遺伝構造が成熟個体の空間分布が関係していたこととシミュレーション結果を合わせて考えると、フタバガキ科個体群の遺伝的多様性と遺伝構造が、個体群の空間分布に強く影響されることが示唆される。本研究は、フタバガキ科の長期的な遺伝的劣化を防ぐには、残存個体が小さな集中斑に分断されないよう、個体群構造を考慮した森林管理が重要であることを示している。



図(1)-17 断片化によって遺伝的多様性が減少しやすいフタバガキ科3種の分布図と局所的空間遺伝構造。



図(1)-18 断片化した*Shorea ovata*の残存林に植林をするシミュレーション（左）と遺伝的多様性の変化の例。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究は、フタバガキ科の局所的空間遺伝構造に樹種間で違いがあること、その違いが種子散布距離、送粉距離、成熟個体の配置と関係していることを明らかにした。また、成熟個体の配置は花粉流動にも影響を与えていることが示された。熱帯雨林樹木の遺伝子流動と空間遺伝構造が成熟個体の配置（個体群の空間構造）に影響されていることが明らかに示されたのは初めてであり、熱帯樹木の遺伝的多様性の維持、及び、遺伝構造形成過程の解明にとって重要な発見である。攪乱や乾燥を与える影響が、同じ熱帯雨林に共存する樹種間でも異なっており、特に湿潤な立地に生育し、個体群の回転率が大きい種ほど攪乱と乾燥に脆弱であることが示された。この結果は、熱帯雨林における多種共存のメカニズム解明に有意義であるとともに、各樹種の保全にとっても重要な知見である。熱帯雨林樹木の個体群動態と遺伝的多様性の関係については、ほとんど何も分かっていないが、本研究のシミュレーションによって、個体群動態と遺伝的多様性の変化の経過が樹種ごとに異なること、個体群の構造が遺伝的多様性の減少に関連している可能性があることが初めて示された。

(2) 環境政策への貢献

フタバガキ科の局所的空間遺伝構造が、種子散布と送粉者の違いに加え、各種の個体群構造とも密接な関係を持っており、個体群の断片化後の遺伝的多様性の減少にも個体群構造が関連していた。また、攪乱、乾燥に対する脆弱性にも種間差があり、高死亡率、高成長速度、湿潤なハビタットに生育している種ほど脆弱であることが示された。これらの結果は、フタバガキ科の生態的多様性と遺伝的多様性には密接な関係が存在することを示唆し、これら多様性の劣化防止と保全には、各樹種の生態特性を考慮した保全・管理が重要であることを示す。本研究の知見は、東南アジア熱帯の重要樹種であるフタバガキ科の遺伝的劣化リスクも考慮した伐採、及び、保全の方法の作成に利用可能であり、新たな指針の策定に貢献すると期待される。

6. 国際共同研究等の状況

本研究の基盤である大面積調査区は、サラワク森林局（マレーシア）、サラワク林業公社（マレーシア）、スミソニアン熱帯林研究所（アメリカ合衆国）との共同で設置、管理、測定されている。また、遺伝研究はサラワク森林局、サラワク森林公社と共同で実施した。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文（査読あり） >

- 1) A. ITOH, T. OHKUBO, S. NANAMI, S. TAN and T. YAMAKURA: Forest Ecology and Management, 259, 323-332 (2010)
 “Comparison of Statistical Tests for Habitat Associations in Tropical Forests: a Case Study of Sympatric Dipterocarp Trees in a Bornean Forest”
- 2) T. HARATA, S. NANAMI, T. YAMAKURA, S. MATSUYAMA, L. CHONG, M. B. DIWAY, S. TAN and A. ITOH : Biotropica (in press)

“Fine-scale Spatial Genetic Structure of Ten Dipterocarp Trees in a Bornean Rain Forest”

- 3) A. ITOH, S. NANAMI, T. HARATA, T. OHKUBO, S. TAN, L. CHONG, S. J. DAVIES and T. YAMAKURA: *Biotropica* (in press)

“The Effect of Habitat Association and Edaphic Conditions on Tree Mortality during El Niño-Induced Drought in a Bornean Dipterocarp Forest”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（２）口頭発表（学会等）

- 1) A. Itoh, S. Nanami, T. Yamakura, T. Ohkubo, S. Tan: Annual Meeting of Ecological society of America, Albuquerque, USA, 2009.
"Interacting effect of habitat and conspecific density on tree mortality in a Bornean rain forest"
- 2) T. Yamakura, A. Itoh, S. Nanami, S. Mori, T. Ohkubo, S. Tan, L.H. Seng, P.A. Palmiotto, S.J. Davies & P.S. Ashton: Annual Meeting of Ecological society of America, Albuquerque, USA, 2009
"1/f Noise in spatial patterns of dipterocarp trees in a tropical rainforest, Sarawak, Malaysia"
- 3) S. Nanami, A. Itoh, S. Tan, B. Diway & T. Yamakura: Annual Meeting of Ecological Society of America, Albuquerque, USA, 2009
"Genetic structure and gene flow in *Dryobalanops aromatica*, an emergent tree species in a tropical rain forest, Sarawak, Malaysia"
- 4) 名波哲・伊東明・山倉拓夫・Sylvester Tan・Bibian Diway: 第19回日本熱帯生態学会 年次大会（2009）
「リュウノウジュ個体群におけるサイズクラス間の遺伝構造の差異」
- 5) 原田剛・名波哲・伊東明・山倉拓夫・Sylvester Tan・Bibian Diway: 第19回日本熱帯 生態学会年次大会（2010）
「ホソバリユノウジュ個体群の遺伝構造と更新動態」
- 6) 伊東明・名波哲・山倉拓夫・大久保達弘・S. Tan: 第57回日本生態学会年次大会(2010)
「ボルネオ熱帯雨林の実生群集動態－ハビタットと同種密度効果の交互作用－」
- 7) 原田剛・名波哲・伊東明・山倉拓夫・Bibian Diway・Sylvester Tan: 第57回日本生態学会年次大会（2010）
「マレーシア熱帯雨林におけるフタバガキ科10種の遺伝構造」
- 8) A. Itoh: International Meeting for Promoting Asia-Pacific Biodiversity Observation Network (AP-BON), Tokyo, Japan, 2010
"Biodiversity Monitoring of Forest Ecosystems by Large-scale Plots: Examples in Malaysia, Thailand and Japan"
- 9) A. Itoh, S. Tan, S. Nanami, T. Yamakura, T. Ohkubo & C. Lucy: Sarawak Biological Resources Forum 2010, Kuching, Malaysia, 2010
"Long-term study on dynamics of a tropical rain forest with a large-scale plot in Lambir Hills National Park, Sarawak"

- 10) S. Nanami, T. Harata, S. Tan, B. Diway, A. Itoh, T. Yamakura & L. Chong: Sarawak Biological Resources Forum 2010, Kuching, Malaysia, 2010
"Spatial genetic structure of dipterocarp species in a tropical rain forest, Sarawak, Malaysia"
- 11) 伊東明・名波哲・山倉拓夫・S. Tan・L. Chong : 第20回日本熱帯生態学会年次大会(2010)
「ランビル熱帯雨林稚樹群集の8年間の動態」
- 12) 名波哲・伊東明・山倉拓夫 : 第20回日本熱帯生態学会年次大会(2010)
「サラワク州ランビルヒルズ国立公園における一斉開花時のフタバガキ科樹種の開花フェノロジー」
- 13) A. Itoh: International Workshop "Plant Ecology and Diversity Observation Network and Capacity Building in Indonesia", Sanur, Indonesia, 2010
"Twenty-year experience in establishment and maintenance of a large-scale forest dynamics plot at Lambir Hills National Park in Sarawak, Malaysia"
- 14) A. Itoh, S. Nanami, T. Yamakura, T. Ohkubo, C. Lucy, T. Tan & HS. Lee: Annual Meeting of Association for Tropical Biology and Conservation, Asia-Pacific Chapter, Sanur, Indonesia, 2010
"Effects of topography on tree mortality resulting from El Niño-induced drought: A study in a Bornean tropical rain forest"
- 15) S. Nanami, S. Tan, A. Itoh, T. Harata, T. Yamakura, B. Diway & L. Chong Annual Meeting of Association for Tropical Biology and Conservation, Asia-Pacific Chapter, Sanur, Indonesia, 2010
"Spatial distribution patterns of reproduction in dipterocarp trees in a tropical rainforest, Sarawak, Malaysia"
- 16) T. Harata, S. Nanami, S. Tan, A. Itoh, T. Yamakura, B. Diway & L. Chong Annual Meeting of Association for Tropical Biology and Conservation, Asia-Pacific Chapter, Sanur, Indonesia, 2010
"Spatial genetic structure of ten dipterocarp species in a tropical rainforest, Sarawak, Malaysia"
- 17) 伊東明・原田剛・名波哲・山倉拓夫 : 第58回日本生態学会年次大会 (2011)
「フタバガキ科の個体群動態と遺伝的多様性の関係」
- 18) 名波哲・原田剛・松山周平・伊東明・BM. Diway・S. Tan・L. Chong・山倉拓夫:第58回日本生態学会年次大会 (2011)
「サラワク州ランビルヒルズ国立公園における*Shorea*属樹種の遺伝構造と遺伝子流」
- 19) 原田剛・名波哲・伊東明・山倉拓夫・松山周平・BM. Diway・S. Tan・L. Chong:第58回日本生態学会年次大会 (2011)
「フタバガキ科10種個体群の遺伝構造と個体空間分布の関係」
- 20) 伊東明、名波哲、松山周平、宮崎祥子、山倉拓夫、Sylvester Tan、Lucy Chong : 第21回日本熱帯生態学会年次大会 (2011)
「熱帯雨林樹木10種の死亡に及ぼすハビタットと同種密度の影響の評価と実生を用いた野外実験による検証」
- 21) 山倉拓夫、名波哲、伊東明、Sylvester Tan : 第21回日本熱帯生態学会年次大会 (2011)
「フタバガキ科樹木種子の落下運動」
- 22) 伊東明 : 公開シンポジウム「遺伝子から見た熱帯林ー消えゆく熱帯雨林は救えるかー」(2001)

「森林伐採は熱帯林の遺伝的多様性を減らすか？ーボルネオ島のフタバガキ樹木の場合ー」

23) 伊東明：日本植物学会近畿支部大会（2011）

「ボルネオ熱帯雨林の樹木群集の生態」（招待講演）

24) T. Harata, S. Nanami, T. Yamakura, A. Itoh, S. Matsuyama, L. Chong, B. M. Diway, S. Tan, O. J. Hard : The 5th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress, Shiga, Japan, 2012

"Estimation of seed dispersal from fine-scale spatial genetic structure in the dipterocarp tree populations"

25) A. Itoh, S. Miyazaki, S. Matsuyama, S. Nanami, S. Tan, L. Chong : The 5th East Asian Federation of Ecological Societies International Congress, Shiga, Japan, 2012

"A field experiment on effects of habitat and conspecific density on tropical tree seedlings"

26) A. Itoh, S. Miyazaki, S. Matsuyama, S. Nanami, S. Tan, L. Chong : Annual Meeting of the Association of Tropical Biology and Conservation Asia-Pacific Chapter, Xishuangbanna , China, 2012

"Effects of habitat and conspecific density on tropical tree seedlings: results of a transplantation experiment"

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない

（４）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

（６）その他

特に記載すべき事項はない

８．引用文献

- 1) Hardy OJ, X. Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- 2) Degen B, Gregorius HR, Scholz F (1996) ECO-GENE, a model for simulation studies on the spatial and temporal dynamics of genetic structures of tree populations *Silvae Genetica* **45**, 5-6.

(2) 生態系劣化評価2-土壤微生物を指標とした評価手法の確立

京都大学・大学院農学研究科 宮下直彦

<研究協力者>

京都大学・大学院農学研究科 岩永廣子

平成21～23年度累計予算額 33,861千円

(うち、平成23年度予算額 10,762千円)

上記の予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 森林劣化指標となる微生物や遺伝子を同定するために、マレーシア（サラワク）、インドネシア（ジャワ、スマトラ）、シンガポールの熱帯林と日本の冷温帯林の土壤から抽出した微生物DNAを用いたメタゲノム解析とmRNAを用いたメタトランスクリプトーム解析を行った。メタゲノム解析では、16SリボソームRNA領域（16S rRNA：細菌対象）とリボソームRNA遺伝子間領域（ITS：菌類対象）の塩基配列を次世代シーケンサRoche 454を用いて、また抽出したDNAのランダムショットガン配列をIllumina GAIを用いて決定した。得られた塩基配列データの群集生態学的解析から、細菌の組成については森林植生や劣化状態に関わらず高次分類階級での優占分類群が共通であることが示された。種レベルでは調査地および採集地点に多くの特異的種が存在した。さらに森林土壤には数千の細菌種が存在するが多くは単独であり、平均2～3個体で存在するという微生物群集生態学の新知見を得た。一方で、細菌の組成・多様性は森林の地理的距離や植生・多様性と明確な関係がなく、森林環境は細菌の組成・多様性を決定する主要因ではないことが示唆された。一方、菌類は高次分類階級での優占分類群は共通するが、細菌より多様性は低く、森林特異性が高いことが判明し、森林劣化評価指標となり得ることが示唆された。ランダムショットガン配列の解析からは、高次分類階級での優占分類群が共通することが確認された。さらに、推測された微生物群集の潜在的機能に調査森林間に大きな違いは見られず、微生物組成が森林間で類似していることに対応している。メタトランスクリプトーム解析では、抽出に成功したサラワクと日本の森林土壤からのmRNAの解析を行った。推定された微生物の組成は、優占分類群が両調査森林でも類似しており、顕在化された代謝機能にも森林間で大きな違いは検出できなかったが、潜在的機能とは異なっていた。

[キーワード] 土壤微生物、次世代シーケンサ、メタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析

1. はじめに

土壤微生物（細菌・菌類）は森林の有機物を分解し、物質循環を通して生態系の維持に貢献する。したがって、土壤微生物とその機能（遺伝子群）は森林生態系の健全度や劣化度を評価する指標になると考えられた¹⁾。この考えに基づき、土壤微生物に着目した森林劣化評価手法を確立

するために、次世代シーケンサ^{2),3)}により得られた土壤微生物の大規模塩基配列データのメタゲノム解析⁴⁾とメタトランスクリプトーム解析⁵⁾を行った。

2. 研究開発目的

過度の伐採、農地開発、焼き畑などの理由による熱帯林の減少は、熱帯林生態系の破壊や生物多様性の消失につながるだけでなく、温暖化に伴う地球全体の気候変動にも大きく影響している。森林劣化評価手法の確立は、熱帯林から始まり地球全体の環境破壊につながる連鎖のカスケードを止めるために必要である。手法が確立できれば、環境政策の運用面（熱帯林保護・保全活動）に貢献できる。具体的には保護・保全対象の熱帯林の劣化の程度を評価し、活動の必要度をランク付でき、保護・保全計画を策定する客観的な根拠となる。保全作業の進捗の程度や保全方法の比較・評価にも利用できる。このような視点に立ち、本研究では熱帯林全体の物質循環に大きな役割を担う土壤微生物に注目し、最新の分子生物学的手法である次世代シーケンサとメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析によって、健全林と劣化林を比較し、森林劣化評価方法の確立を試みた。

3. 研究開発方法

(1) 天然熱帯林と劣化林における土壤細菌組成と多様性

マレーシア・サラワク州のランビルヒルズ国立公園の尾根部と谷部（天然フタバガキ林）、バカム試験地（劣化林：残存林、

二次林、火災被害林）と京都府南丹市京都大学芦生演習林（天然冷温帯林）の6森林を調査対象とし、各森林内5地点計30の土壤採集地点の16S rDNA配列データに基づく土壤細菌組成を解析

表(2)-1土壤採集地

調査森林	採集地ID	森林の特徴
ランビルズ国立公園（尾根部）	LR	自然林
ランビルズ国立公園（谷部）	LV	自然林
バカム試験区(残存林)	BR	残存林
バカム試験区(二次林)	BS	二次林
バカム試験区(火災被害林)	BB	火災被害林
芦生演習林	AS	自然林

した（表(2)-1）。土壤採集は2009年10-12月に実施した。土壤からのDNA抽出には、PowerSoil DNA Isolation kit (MO BIO社)を用いて、土壤10gあたり約10 μ gのDNAを得ることができた。16S rDNA領域をPCR増幅し、シーケンサFLX454により塩基配列を決定した。塩基配列データを解析し、土壤細菌の多様性を評価した。解析にはRibosomal Database Project (RDP:

<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)と Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME:

<http://www.qiime.org/>) のウェブツール群⁶⁾を用いた。

1) 高次分類階級における土壤細菌の組成

RDPのClassifierツールによって、各配列を門・綱・目・科レベルで分類群に分類した。各採集地点と調査森林の土壤の細菌組成を構築し、調査森林間の細菌組成の類似性を順位相関によって比較し、また調査森林間の各分類群の頻度の不均一性をカイ2乗検定により比較した。

2) 種レベルでの細菌多様性と細菌数の分布の比較

種多様性の検証のためにクラスター解析を行った⁷⁾。クラスター間の遺伝的距離が3%以下のものを一つの種 (OTU) として定義した。実験規模の妥当性を判断するために、rarefaction curve を

調査森林レベルで推定した。種多様性の指標であるChao1指数⁸⁾と、種均等性指標のShannon指数(H')⁹⁾を推定した。あるクラスター内の配列数は細菌種内の細菌(個体)数を反映すると考え、クラスター解析の結果を各採集地点のクラスターの分布に変換し、細菌数の分布を採集地点間と調査森林間で比較した。

3) 細菌種組成の類似度

構築されたクラスターの組成を比較し、採集地点間の全ての組合せについて、種レベルでの細菌組成の類似度であるジャカード指数¹⁰⁾を推定し、UPGMA系統樹を作成した。得られた系統樹に基づき、採集地点と調査森林の関係を解析した。

(2) 土壌細菌組成および多様性の地理的・時間的変異

地理的変異の解析のために、上記6調査森林(ランビルヒルズ国立公園、バカム試験区、芦生)に加え、インドネシア、マレーシア、シンガポールの異なる植生の森林(混交フタバガキ林、二次林、石灰岩林、火災被害林、アカシア植林地、アブラヤシ植林地、冷温帯林、ケランガス林、フタバガキ植林地を含む)及び日本(伊吹山)から土壌を採集し、微生物DNAを抽出した。土壌採集の方法は、各調査森林内において、10採集地点から採集した土壌サンプルをプールする形で行った。地理的変異について計29サンプルの配列データを得た。時間的変異に関しては、合計6森林(ランビルヒルズ国立公園、バカム試験区、芦生)を調査対象とし、2009年12月、2010年8月、2010年10月、2011年4月の4回の土壌採集およびDNA抽出をおこなった(芦生に関しては2010年8月のサンプルなし)。時間的変異について計46サンプルを得た。16S rDNA領域をPCR増幅し、シーケンサFLX454により塩基配列を決定した。解析方法は(1)と同様に、細菌組成、種多様性と組成の類似度の変化を地理的・時間的に比較した。

(3) 天然熱帯林と劣化林における土壌菌類(カビ、キノコ)組成の地理的・時間的変異

細菌16S解析に用いた時間的変異、地理的変異のサンプルのうち、時間的変異については38サンプル(ランビルヒルズ国立公園、バカム試験区、芦生6調査森林の各2地点より3~4回採集分)、地理的変異解析では23サンプルに関して、菌類の群集構造解析を行った。土壌微生物DNAより、菌類の核rRNA ITS領域¹¹⁾をPCR増幅し、次世代シーケンサFLX454によって塩基配列を決定した。塩基配列データを群集生態学的手法を用いて解析することにより、土壌菌類の多様性と組成を明らかにした。解析は(1)と同様に、菌類組成、種多様性と組成の類似度の地理的・時間的変異を調べた。

1) 相同性検索を使った土壌菌類の組成推定と指標菌種の同定

各配列が由来する菌の分類群を推定するため、検索ツールBLASTN¹²⁾により相同性検索を行った。相同性検索の結果に基づき、MEGANプログラム¹³⁾を用いて、各分類階級(門~種)で菌類の組成を推定した。組成データに基づき、自然林および劣化林に特異的な菌種を同定した。

2) 種レベルでの菌類多様性と菌類組成

(1)と同様に、クラスター間の遺伝的距離が3%以下のものを一つの種(OTU)として種の多様性を評価した。ITS配列のクラスター構築には、ESPRITプログラム¹⁴⁾を使用した。クラスター

の数と配列数に基づき、EstimateSプログラム(<http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>)を使って、多様性の指標であるChao1指数⁸⁾と、Shannon指数 (H')⁹⁾、及びサンプル間の菌類組成の類似度を示すジャカード指数¹⁰⁾を推定した。ジャカード指数に基づくUPGMA系統樹により、経時サンプル間および調査森林の関係を解析した。

(4) ゲノムランダムショットガン配列のメタゲノム解析

6調査森林(ランビルズ国立公園、バカム試験区、芦生)の土壌から土壌微生物DNAを抽出し、ランダムショットガン配列を次世代シーケンサIllumina GAIを用いて決定した。土壌からのDNA抽出には、PowerMax Soil DNA Isolation kit (MO BIO社)を用い、5~10gの土壌から抽出された100gのDNAを配列決定に使った。各配列が由来する微生物種と遺伝子を推定するため、検索ツールBLASTX¹²⁾によって相同性検索を行った。相同性検索の結果に基づき、MEGANプログラム¹³⁾を用いて、各土壌サンプルにおける微生物種と遺伝子機能の組成を推定した。

(5) メタトランスクリプトーム解析 (mRNAランダムショットガン配列解析)

ランビルヒルズ国立公園1カ所(尾根部)、芦生演習林1カ所、シンガポール・ブキティマ国立公園2カ所(天然林、二次林)の合計4カ所から土壌を採集し、100gの土壌から20~30μgの土壌微生物由来Total RNAを抽出した。RNA抽出にはRNA PowerSoil Total RNA Isolation Kit (MO BIO社)を使用した。1000gのTotal RNAをcDNAに逆転写し、Illumina DSN normalization protocolに従って、cDNAライブラリの標準化(リボソームRNAを減らし、mRNAを濃縮する)を行った。標準化されたcDNAライブラリを使って、次世代シーケンサ Illumina HiSeq 2000を用い、RNAランダムショットガン配列を決定した。メタゲノム解析と同様、配列が由来する分類群と遺伝子機能をBLATX¹²⁾によって推定し、MEGANプログラム¹³⁾を用いて、土壌微生物群集において発現している機能と、その発現を担う分類群の組成を推定した。

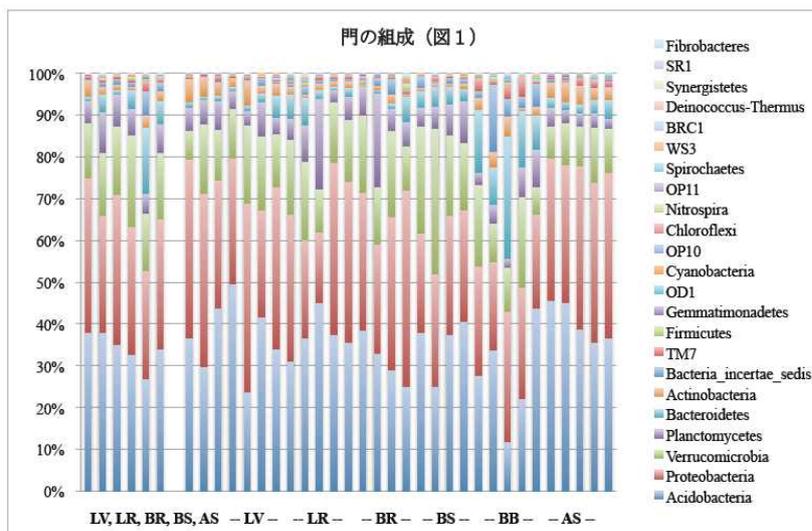
4. 結果及び考察

(1) 天然熱帯林と劣化林における土壌細菌組成および多様性

ランビルヒルズ国立公園、バカム試験地と芦生演習林の解析結果について以下に報告する。

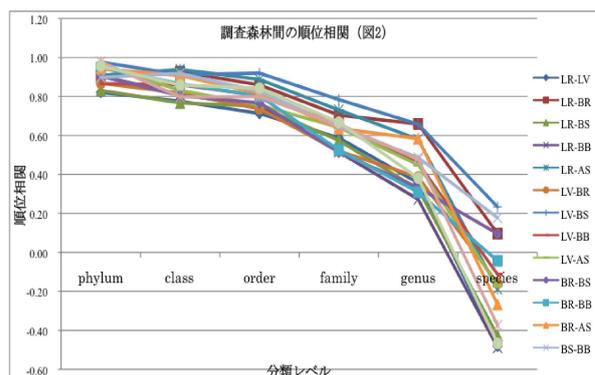
1) 高次分類階級における土壌細菌の組成

細菌組成を門・綱・目・科の階層で比較した。門では Acidobacteria, Proteobacteria (上位5門が90%以上を占める、図(2)-1)、綱では Acidobacteria, Alphaproteobacteria (上位5綱70%以上)、目では、Rhizobiales, Planctomycetales, (上位5目60%



図(2)-1 各調査森林(左6)と各採集地点(右5ずつ)の門の組成

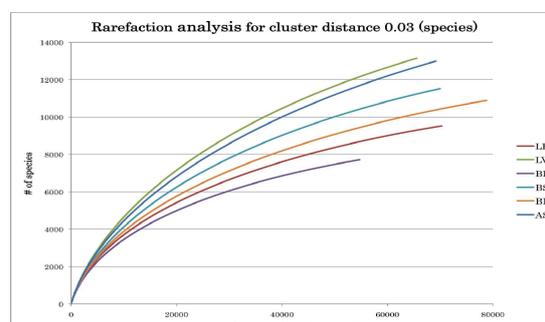
以上)、科ではPlanctomycetaceae, Chitinophagaceae, (上位5科50%以上) などの調査地でも優占分類群であった。共通優占分類群の存在は、分類群の順位相関係数が統計的に有意に正として確認された(図(2)-2)。一方、各分類群の頻度は調査森林と採集地点において4つの分類階層で多くの分類群に有意な不均一性が検出された。



図(2)-2 異なる分類レベルにおける調査森林間の順位相

2) 種レベルでの細菌多様性と細菌数の分布の比較

各調査森林のrarefaction curve (図(2)-3) から、解析した配列数が増加しても種数の推定値が定常状態(プラトー)に到達していないことが判明し、土壌微生物の多様性は極めて高く、本研究レベルでは多様性を十分推定できていない可能性が示唆された。採集地点・調査森林当たりの平均クラスター(種)数とChao1指数はサンプルの階層とともに種数推定値が増加し(表(2)-2)、採集地点・森林特異的な種の存在を意味する。ランビル谷部と芦生で種数が多く推定され、バカム2次林・火災被害林が健全なランビル尾根部・バカム残存林よりも多くの種を維持することは、土壌微生物多様性と森林生態系の違い(熱帯林vs.冷温帯林、自然林vs.劣化林)に明確な関係がないことを示唆する。一方、Shannon指数(H')はサンプルの階層に伴い6.99、8.14、9.66と変化がなく、少数の優先種と大多数の低頻度の種の存在を意味する。種数と個体数の分布の特性を調べた。採集地点では単一種(個体数=1)が全体の60%程を占め(図(2)-4)、種当たりの平均個体数は2.82と少ない。最大個体数は数百程であり、高頻度優先種は存在しない。多くの低頻度種の存在が確認され、採集地点・森林に特異的であった。この結果は共通の分布状態であり、森林土壌には数千の細菌種が存在するが多く



図(2)-3 各調査森林のrare faction curve

表(2)-2 クラスター解析による種の多様性と均等性

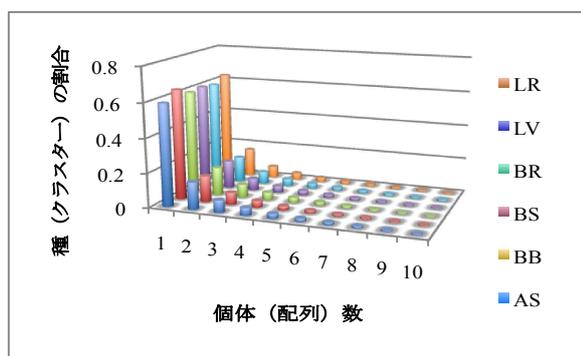
群集	配列数	クラスター数	Chao1	H'
1) 5 採集地点				
ランビル尾根	14,070	2,643.8	3,603.13	6.87
ランビル谷	13,115	3,545.4	5,427.02	7.33
バカム残存林	10,951	2,184.0	3,024.27	6.67
バカム2次林	14,002	3,035.4	4,297.08	7.00
バカム火災林	15,758	2,833.8	3,799.97	6.82
芦生	13,833	3,537.8	5,374.46	7.27
平均	13,621	2,963.37	4,254.32	6.99
2) 調査森林				
ランビル尾根	70,350	9,532	11,714.31	8.01
ランビル谷	65,574	13,149	17,751.58	8.45
バカム残存林	54,755	7,715	9,604.70	7.79
バカム2次林	70,009	11,524	14,769.70	8.17
バカム火災林	78,789	10,889	13,472.66	8.07
芦生	69,165	12,992	18,072.95	8.38
平均	68,107	10,966.83	14,230.98	8.14
3) 全体				
	408,642	53,637	63,309.54	9.66

1) は各5採集地点の平均、2) は調査森林全体の推定値、3) 30地点全体クラスター数：それぞれの群集階層のサンプルについて推定した

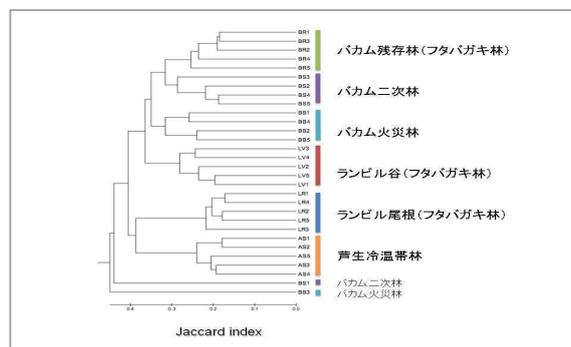
は単独であり、少個体数（平均2～3個体）の状態が存在するという微生物群集生態学の新知見を得た。

3) 細菌種組成の類似度

推定されたジャカード指数に基づいて、採集地点の関係を示すUPGMA系統樹を作成した(図5)。各森林内の採集地点はクラスターを形成し、森林内の土壌細菌の組成が類似していることを示している。系統樹の末端の長い枝は採集地点の細菌組成の大きな分化を意味し、多数の採集地点特異的な種の存在と対応する。また、芦生とランビル尾根部が隣接することやランビル谷部がバカムの多様な森林とクラスターを作ることから、土壌細菌の組成と地理的距離や森林の生態の状態には関連がないことが判明した。



図(2)-4 調査森林の採集地点における種当りの個体



図(2)-5 土壌細菌組成の類似度 (ジャカード指数)

に基づく採集地点間の関係

1) 地理的変異

調査した29森林の全てを考慮した解析は現時点では完了していないため、解析の終わった13調査森林(表3)の結果を報告する。分類群の組成については、前述の調査と同様に、高次の分類群では優占分類群は共通しているが、頻度に不均一性が検出された(図(2)-6)。各調査森林のrarefaction curveが示すように(図(2)-7)、解析配列

表(2)-3 土壌採集地

調査森林	採集地ID	森林の特徴
ランビルズ国立公園(尾根部)	Lrid1	自然林
ランビルズ国立公園(谷部)	Lval2	自然林
バカム試験区(残存林)	Brem3	残存林
バカム試験区(二次林)	B2nd2	二次林
バカム試験区(火災被害林)	Bbur1	火災被害林
芦生演習林	Ash1	自然林
パウ(二次林)	BAU2nd	二次林
パウ(石灰岩林)	BAUlim	自然林
ニア(混交フタバガキ林)	NIAmdf	自然林
ニア(石灰岩林)	NIAlim	自然林
バコウ(混交フタバガキ林)	BKOmdf	自然林
ブキ・ティガプル(フタバガキ林)	BTNmfd	自然林
ブキ・ティガプル(火災被害林)	BTNbur	火災被害林

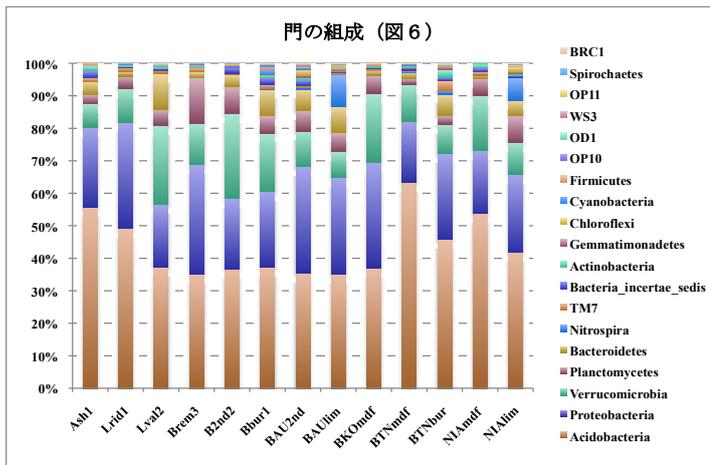
数が増加しても推定種数が平衡に達しないことから、いずれの調査地においても土壌細菌の多様性が極めて高く、この解析でも多様性のレベルは十分に推定できない可能性がある。調査森林における種多様性(クラスター数とChao1指数)には、森林間に大きなばらつきが検出された(図(2)-8)。

特にChao1指数に関しては、パウ石灰岩林において最も多くの種数

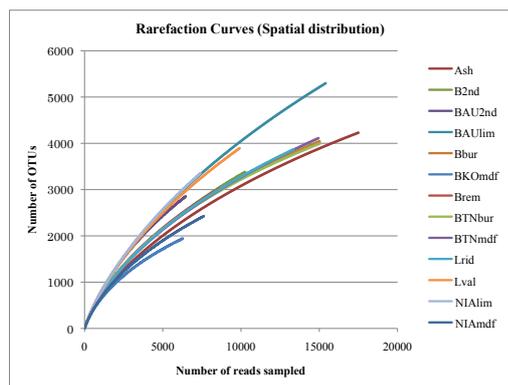
(11,318) が検出され、最小種数が検出されたバコウ混交フタバガキ林

(3,573) と約3倍の違いがあった。また、多様性の推定値である両値には明確な相関が存在せず、クラスター数の推定だけではなく、Chao1指数による補正が必要なことを示唆している。調査集団あたりに検出されたク

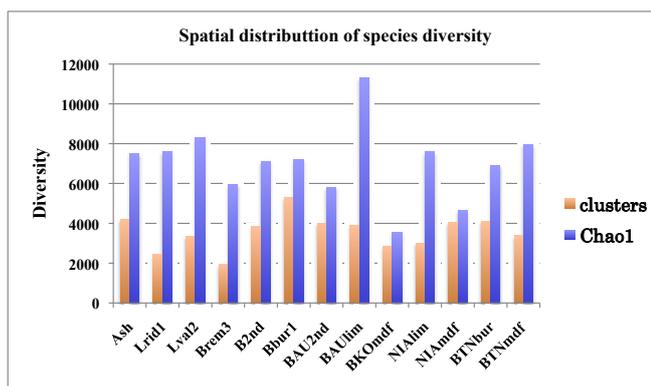
ラスタ (種) 数は2,000~5,000であるが、調査森林全体では25,807と増加することは、やはり調査森林特異的な種が多く存在することを示している。しかし、地域特異的や森林のタイプに特異的なものが存在するわけではない (表(2)-4)。



図(2)-6 各調査森林における門の組成



図(2)-7 各調査森林のrarefaction curve



図(2)-8 各調査森林の種多様性

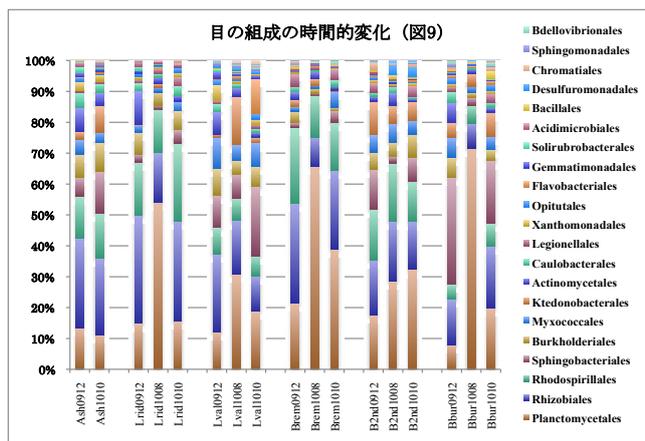
2) 時間的变化

調査した全ての46 サンプルの解析は現在進行中であり、部分的に解析した17サンプルの結果を報告する。分類群の組成の時間的变化について、門レベルでは優占分類群の割合は比較的大きな変化を示さないが、目以下の分類レベ

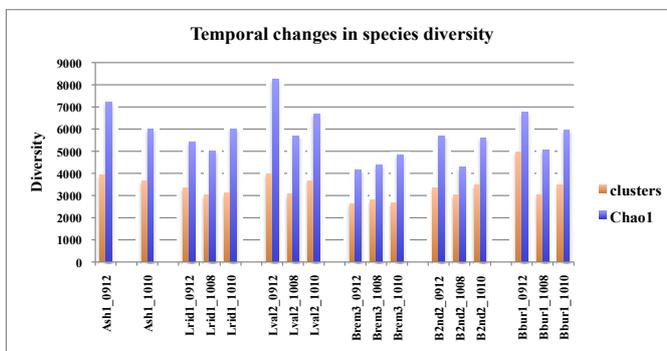
表(2)-4 調査森林・地域・森林タイプ特異的なクラスター数と割合

forest	# clusters	specific	% within	% total	region/type	# clusters	specific	% within	% total
Ash	4,231	1,610	0.38	0.06	Sarawak	12,946	0	0	0
Lrid1	3,870	937	0.24	0.04	Lambir	7,207	57	0.01	0.0022
Lval2	3,897	1,086	0.28	0.04	Bakam	8,486	10	0.00	0.0004
Brem3	3,026	781	0.26	0.03	Bau	7,154	571	0.08	0.0221
B2nd	3,383	1,053	0.31	0.04	Niah	5,592	54	0.01	0.0021
Bbur1	4,048	1,512	0.37	0.06	Indonesia	6,763	164	0.02	0.0064
BAU2nd	2,858	1,509	0.53	0.06	フタバガキ	11,275	0	0	0
BAUlim	5,303	2,466	0.47	0.10	二次林	6,135	28	0.0046	0.0011
BKOmdf	1,944	348	0.18	0.01	火災被害林	7,138	137	0.02	0.0053
NIAlim	3,354	1,044	0.31	0.04	石灰岩林	7,518	489	0.07	0.0189
NIAmdf	2,428	536	0.22	0.02					
BTNbur	4,113	1,151	0.28	0.04					
BTNmdf	4,001	1,032	0.26	0.04					
total	25,807				共通	25,807	1		

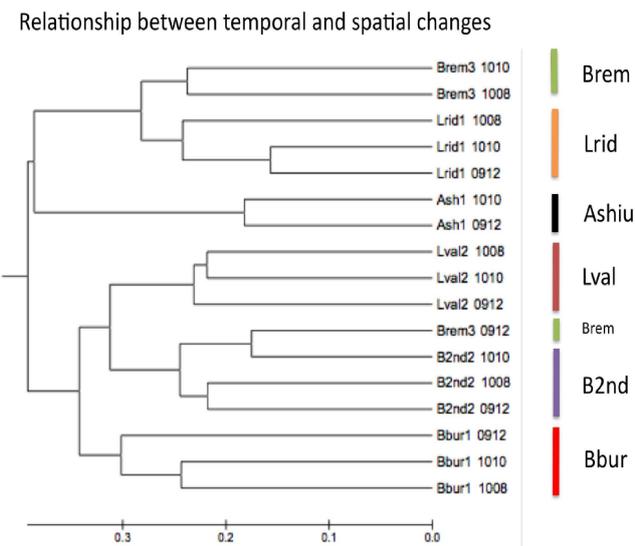
ルでは分類群の頻度に大きな変化が検出された（図には、森林間に大きなばらつきが検出された（図(2)-9）。このことは、比較的気候変動の幅が小さいと思われる熱帯林においても、雨期や乾期などの違いが下位の分類群の組成に影響していることを示唆している。種多様性の時間的変化（図(2)-10）については、8月（サラワクでは乾期に対応）に多様性（種・クラスター数）が減少するように見えるが、バカム残存林では大きな変化はなく、この周期性についてはさらなる検証が必要である。クラスターの出現頻度をサラワクの調査森林について調べたところ、3回とも検出されたクラスターはどの調査地においても検出されたクラスターの10%程度であるのに対し、1回だけ検出されたものが60%前後であった。このことは、種多様性が極めて高く、そのうちのごく一部しか検出されていないことを示唆する。また、極めて頻繁に種の絶滅と出現が繰り返されている可能性も示唆されるが、この可能性を検証するために今後配列レベルの進化遺伝学的解析を計画している。地理的変異と時間的変化の関係を調べるために、17サンプル間のジャカード指数を推定し、UPGMA系統樹を作成した（図(2)-11）。バカム残存林2009年12月サンプルがバカム二次林とクラスターを作る一つの例外を除いて、調査森林内の採集時期の違うサンプルは、一つのクラスターを作ることが判明した。このことは、地理的な要因（地理的適応に関する自然選択など）が採集時期の違いによる要因（季節変動に対する適応など）よりも細菌種の組成に大きく影響することを意味するが、系統樹の外側の枝がかなり長いことは、採集時期の違いも大きいことを示している。



(2)-9 目の組成の時間的変化



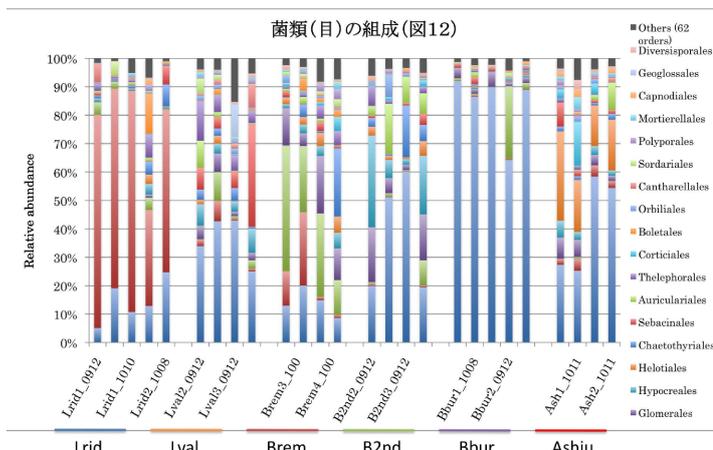
図(2)-10 種多様性の時間的変化



図(2)-11 地理的・時間的な細菌種組成の変化

(3) 天然熱帯林と劣化林における土壌菌類（カビ、キノコ）組成の地理的・時間的変異

現在までに終了した2009年と2010年のデータの解析結果について報告する。菌類の分類群組成は細菌のものよりも大きな地理的変異が検出された。門レベルでは優占分類群（BasidiomycotaとAscomycota）が全体の95%を占め、調査森林間で共通しているが、目以下のレベルでは森林間で分類群組成に大きな違いが検出された(図(2)-12)。種レベルでは、各サンプル当たり平均して1,123種の菌類が存在すると推定され、バカム二次林や火災林で種数が低く

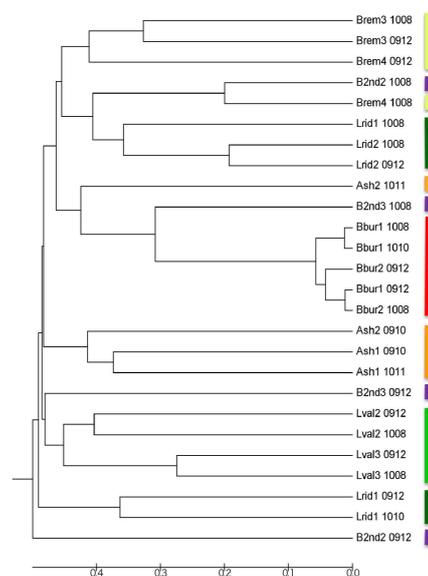


図(2)-12 菌類（目）の組成

(817~922種)、熱帯と冷温帯の天然

林で多様性が高かった(1200種以上)。菌類の多様性は森林劣化の影響を受けて低くなる傾向が示された。菌類の組成と地上部の植生や気候との間に明確な関連は見られなかったが、フタバガキ林に特異的な菌を11種特定できた。その中には共生菌根菌も含まれ、フタバガキ林の生態系に

重要な役割を担うことが示唆された。時間的変化は地理的変異に比べて、菌類の組成と多様性に関して変動は少なく、菌類が森林環境により大きく影響されることが判明した。地理的変異と時間的変化の関係を調べるために、全サンプル間のジャカード指数を推定し、UPGMA系統樹を作成した(図(2)-13)。採集地点ごとにクラスターを作ることは地理的影響が菌類の組成により大きな影響を与えることと対応する。しかし、注目すべきことは、バカム火災被害林が末端枝の短いクラスターを形成していることや、二次林が全くクラスターを作らないことである。これらの結果は、火災被害後に新しい菌類の侵入が起きたことや攪乱された環境(二次林)への局所的な適応を示唆する。これらの菌類についての結果は、土壌細菌よりも菌類のほうが森林の様々な違いに敏感に適応していることを示唆しており、共生菌根菌などは森林の状態を評価する指標となり得る可能性が高い。大量塩基配列解析による熱帯林の菌類に関する研究は行われておらず、これらの結果は本研究によって初めて明らかにされた新知見である。

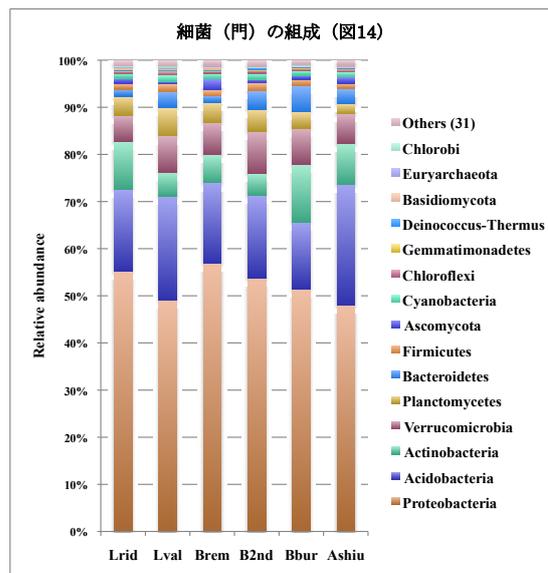


図(2)-13 菌類組成の地理的・時間的変化

(4) ゲノムランダムショットガン配列のメタゲノム解析

表(2)-1に示した6カ所の調査森林からの各サンプルあたり長さ50bpの塩基配列が800万から

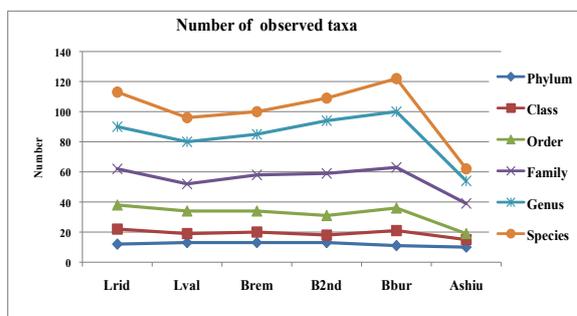
1700万リード得られた。しかし、BLASTXによる相同性検索によって分類群が決定できたのは全体の2.7%から5.1%であり、遺伝子や機能が特定できたものは2.7%~3.5%であった。これらの低い決定率は、ゲノムランダムショットガン配列が遺伝子間領域やイントロンなどの非構造領域の塩基配列を大量に含んでいることが主要な原因であると考えられる。また、検索した(タンパク質)データベースに登録されていない多くの未知のタンパク質を調査した土壤微生物群集が持っている可能性も否定できない。ここで解析できなかった95%以上の配列を今後何らかの形で解析できれば、これまでにない発見ができると考えている。



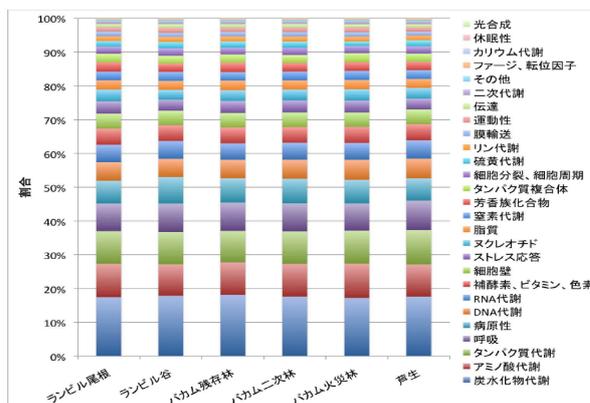
図(2)-14 細菌の組成(ランダムショットガン(門))

1) 土壤微生物の組成と多様性

分類群を特定できた配列を用いて、それぞれの調査森林の界・門・綱・目・科・属・種の分類レベルにおける微生物組成を構築した。界レベルでは、調査したどの土壤サンプルでも細菌が圧倒的に多く(6サンプルの平均96.7%)、菌類は0.5%以下であった。16S rRNAの解析結果と同様に、優占的細菌はどの土壤でも共通していたが、ランダムショットガン配列の解析では最優占である門はAcidobacteriaではなくProteobacteriaであった(図(2)-14)。この違いは検索に使ったデータベースの違いに由来するものと考えられる。また、どの分類レベルでも分類群頻度の順位相関は統計的に有意に正であり、調査森林間で組成が類似しているが、多くの分類群の頻度に調査森林間で有意な不均一性が検出された。これは、前述のように細菌の組成を決定する森林環境特異的な要因の存在を示唆している。微生物の多様性(分類群の数)を門以下の6分類レベルで推定した(図(2)-15)。ここで、種数はデータベース内に発見できた種の数であり、16S rRNAのクラスター解析によって推定された種数とは異なっている。全般的に調査森林間に多様性レベルの大きな違いは見られないが、芦生の多様性が比較的低かった。しかし、16S rRNAのクラスター解析から得られた結果(ランビルヒル谷部と芦生が比較的高い種多様性を持つ)とは異なっており、ここで用いたデータベースに依存した解析は、データベースに記載されていない未知の微生物が自然界では圧倒的に多数であるため、多様性の比較には適してい



図(2)-15 細菌の多様性(ランダムショットガン)



図(2)-16 細菌群集の潜在的代謝機能

ない可能性が考えられる。

2) 土壌微生物の機能

BLASTX相同性検索に基づき推定された各リードの遺伝子機能を生物学的プロセスに分類し、頻度を調査森林間で比較した（図(2)-16）。微生物組成とは異なり、生物学的プロセスにおいては土壌間でほとんど違いがなかった。これは、微生物組成に関して多少の割合の違いはあるが、優占分類群が共通しているため（図(2)-1、(2)-14）、微生物群集が総体として持つ潜在的な代謝機能がほぼ共通であることは当然期待される結果であった。6カ所の土壌サンプル間で輸送、DNA代謝、オルガネラ編成に関わる遺伝子の頻度に有意な不均一性が検出されたが、森林環境との関連は不明である。

表(2)-5 森林環境の指標となる微生物と遺伝子群

1、指標微生物		
特異性	微生物 (科) (%)	特徴
地域特異的		
Lambir	Pseudonocardiaceae (0.02)	Actinomycetes (放線菌)
Bakam	Methylococcaceae (0.03)	Nutrition methane bacteria
環境特異的		
自然林 (Lambir & Brem)	Tricholomataceae (0.04)	Ectomycorrhizal fungi
劣化林 (B2nd & Bbur)	Bacillaceae (0.04)	<i>B. cereus</i>
2、指標遺伝子群		
特異性	遺伝子 (%)	機能
地域特異的		
Lambir	Trehalose-6-phosphate synthase (0.17)	Trehalose synthesis
	Undecaprenyl pyrophosphate synthase (0.17)	Cell wall
Bakam	Superfamily II DNA helicase (0.14)	DNA複製
環境特異的		
Bakam 火災被害林	Multidrug transport system (0.71)	防御
	Antimicrobial peptide transport system (0.63)	防御

3) 森林環境の指標となる微生物および遺伝子の推定

地域特異的または環境特異的な微生物と遺伝子群を森林環境の指標候補として選抜した（表(2)-5）。これらの微生物は科レベルで推定されているため、具体的な役割などは明らかでない。しかし、これらのうち、ランビルヒルズ国立公園とその尾根部に近い植生であるバカム残存林で環境特異的に観察された担子菌Tricholomataceaeは、塩基配列の相同性から外生菌根菌*Laccaria bicolor*と推定された。この外生菌根菌は熱帯林樹木と共生すると考えられることから、自然林土壌環境の指標微生物である可能性が高い。また、劣化林（バカム二次林と火災被害林）で検出されたBacillaceae科の細菌は劣化林の評価に使える可能性がある。一方、ランビルヒルズ国立公園で検出されたトレハロース合成や細胞膜形成に関わる遺伝子群やバカム火災被害林で検出された防御に関与する遺伝子群などは、それぞれ自然林と劣化林の評価指標の可能性はある。今後これらの指標微生物や遺伝子群を森林環境評価指標として確立するためには、検出された環境特異的な微生物と遺伝子群について、PCR増幅を利用した森林環境評価のためのマーカーを作成した後、多様な地域・環境由来の土壌DNAサンプルに適用し、PCR増幅の有無や強弱と環境条件との関連

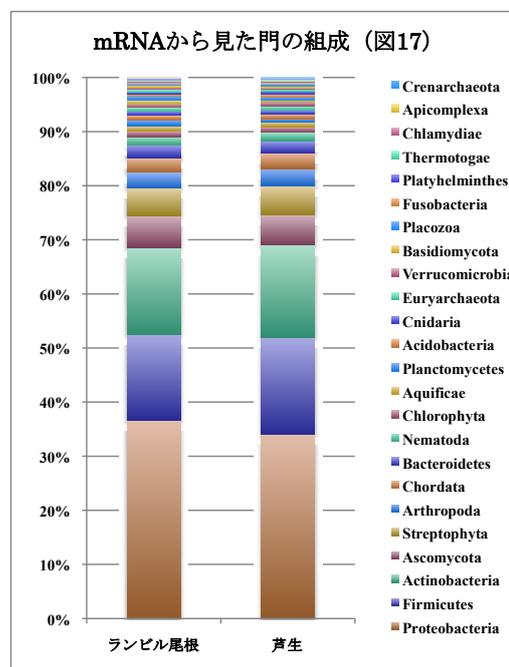
を検証することによってマーカーの妥当性を検討する必要がある。

(5) メタトランスクリプトーム解析 (mRNAのランダムショットガン配列解析)

ランビルヒルズ国立公園尾根部と芦生のサンプルについて配列決定が終了し、平均100bpのRNAショットガン配列をそれぞれ1億1千万個以上得た。現時点では全ての配列の解析は終わっていないため、各サンプル30万個の配列に対して行った解析結果を報告する。BLASTXによる同源性検索を行い、由来する分類群と遺伝子機能を推定した。分類群が推定できた配列の割合は26%で、メタゲノム配列に比べ10倍増加した。これは非翻訳領域が含まれないことと配列長が2倍長くなった結果だと考えられる。一方、機能が推定できた配列の割合は4.1%と、メタゲノムデータと同程度に低く、土壌微生物の多くの遺伝子機能は未知のものであることを示唆した。

1) 土壌微生物分類群の組成

分類群の組成はランビルと芦生で類似しており、門レベルでは、Proteobacteria、Firmicutes、ActinobacteriaのmRNA出現頻度が高く、3門を合わせて約70%を占めた(図(2)-17)。mRNA配列とDNA(ゲノムランダムショットガン)配列(図(2)-14)から推定された分類群の組成は異なり、多く存在している微生物が必ずしも多くの遺伝子を発現しているわけではないことが判明した。例えばAcidobacteriaはメタゲノムでは2番目に多く存在するが(約19%)、mRNA配列では0.8%しか占めず、土壌中に存在するAcidobacteriaの多くは活動停止状態にあることを示唆した。反対に、Ascomycota(子嚢菌門)はメタゲノムでは1.3%しか占めなかったが、RNA配列では約6%と4番目に多く出現した。これは菌類の活発な代謝をしており、分解者としての貢献が大きいことを示した。また、その他上位分類群にはStreptophyta(ストレプト植物)、Arthropoda(節足動物)、Chordata(脊索動物)、Chlorophyta(緑藻植物)やCnidaria(刺胞動物)など、上記の16S rRNAやゲノムランダムショットガン配列の解析では検出されなかった細菌や菌類以外の土壌微生物が検出されており、遺伝子発現のレベルで見ると土壌微生物の世界が想像以上に多様であることが判明した。



図(2)-17 mRNAから見た土壌微生物の組成

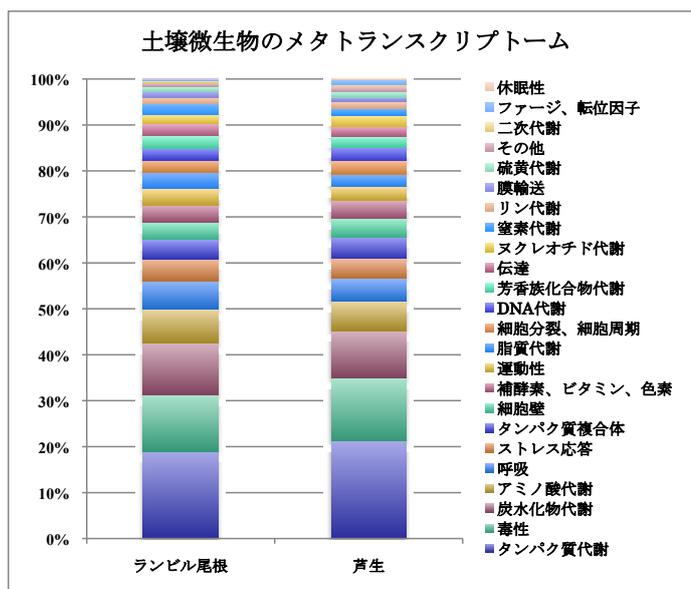
2) 土壌微生物のメタトランスクリプトーム

発現されている機能でも、機能カテゴリーや発現順位に関してランビルヒルズ尾根部と芦生の間に明確な違いは検出されていない(図(2)-18)。タンパク質代謝関連の遺伝子発現が最も多く、続いて毒性、炭水化物代謝、アミノ酸代謝に関わる遺伝子が多く発現し、合計約50%を占めた。毒性には、抗生物質や接合などに関わる機能が含まれ、土壌微生物群集では細胞間の相互作用が、

一次代謝と同レベルに活性化されていることが明らかになった。DNA代謝やヌクレオチド代謝に関する遺伝子の発現が比較的低レベルであることは、土壤微生物が必ずしも活発な細胞分裂を行っているわけではないことを示唆する。土壤微生物のメタトランスクリプトーム解析の成功例は少なく、本研究によって世界初の知見が得られている。

3) メタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析の比較

メタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析によって、土壤微生物群集の潜在的な機能と顕在化された機能の違いが明らかになり、優先的な土壤微生物が必ずしも活発に遺伝子発現を行っているわけではないことが判明した。しかし、データベースに対する相同性検索から同定された分類群や遺伝子からは、本研究の重要なテーマである森林間の違いを見出すことができなかった。両解析では、分類群や遺伝子機能を推定することができなかった配列が多く残っており、未知の分類群や遺伝子に由来するものが多く含まれると推測される。森林状態の指標となる遺伝子および機能を特定するためには、データベースに依存せずに遺伝子機能を推定し比較する解析方法を開発する必要がある、今後の研究の大きな課題である。



図(2)-18 土壤微生物のメタトランスクリプトーム

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究で行った次世代シーケンサを用いた熱帯林土壤微生物に関するメタゲノム・メタトランスクリプトーム解析は世界的にも初めての試みであった。また、この研究によってこれまでなかった東南アジアの熱帯林土壤微生物の群集構造や生態学に関する情報を得ることができた。具体的には、16S rRNA、rRNA ITS、ゲノムランダムショットガンとmRNAなどを対象とした本研究は、熱帯林土壤微生物群集の組成と代謝機能を様々な情報レベルで明らかにし、熱帯林の多様性研究に土壤微生物群集生態学という新しい分野を開拓できた。一方、本研究は熱帯林の遺伝的・生態的多様性と土壤微生物との関係を解明することを目指したが、土壤微生物の組成や代謝機能と森林環境との明確な関係を発見することはできなかった。しかし、多くのデータの解析は現在も進行中であり、今後新たな発見や成果が得られるものと考えている。本研究によって得られた結果がこれからの研究の重要な基礎となり、熱帯林土壤微生物の群集生態学的研究がより発展するものと考えている。また、本研究を通して、「群集遺伝学」という新しい研究分野の発想を得ることができた。今後群集遺伝学的研究を行うことによって、微生物群集の遺伝学的解析と生態学的解析の融合が進むとも考えている。

(2) 環境政策への貢献

本研究の目的である熱帯林劣化の指標微生物や遺伝子を研究期間内に最終的な特定をすることはできなかった。しかし、森林環境条件の指標候補となりうる微生物や遺伝子・機能を発見することができた。特に菌類は有望であり、それらの指標候補は今後の研究によって、多様な森林環境条件との相関を検証し、森林劣化指標として確立する必要がある。土壌微生物に着目した評価方法を確立できれば、環境政策の運用面、特に熱帯林保護・保全活動に大きな貢献ができると考えられる。具体的には保護・保全対象である熱帯林の劣化の程度を相対的に評価でき、保護・保全の必要度をランク付けすることで、保護・保全計画を策定するための有効かつ客観的な根拠となる。また、この方法は保全作業の進捗の程度や保全方法の比較や評価のためにも利用できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

カウンターパート氏名・所属・国名

Dr. Ulfah J. Siregar・Bogor Agriculture University・Indonesia

Lucy Chong・Sarawak Forest Corporation・Malaysia

Bibian Michael Diway・Sarawak Forest Corporation・Malaysia

John Sabang・Sarawak Forest Corporation・Malaysia

Suliana Charles・Sarawak Forest Corporation・Malaysia

Sylvester Tan・Center for Tropical Forest Science Laboratory・USA

参加・連携状況

当研究の遂行にあたって、インドネシア・スマトラ及びジャワとマレーシア・サラワク州における土壌サンプルの採取と土壌微生物DNAの抽出のために、国立公園入園許可、研究許可、DNAの持出し許可の取得、土性検査及び実験施設使用などに関して、上記メンバーの協力を得た。

7. 研究成果の発表状況

(1) 紙上発表

<論文(査読あり)>

1) N. T. MIYASHITA, H. IWANAGA, S. CHARLES, B. DIWAY, J. SABAN and L. CHONG: PLoS One (in press) (2012)

Pyrosequencing-based analyses of soil bacterial community in five tropical forests in Southeast Asia and one temperate forest in Japan.

(2) 口頭発表(学会等)

1) 岩永廣子、J. Sabang、B. M. Diway、L. Chong、宮下直彦：第20回熱帯生態学会(2010)

「熱帯林土壌微生物のメタゲノム解析による、生態系劣化評価のための指標微生物・指標遺伝子の探索」

2) N. T. Miyashita, H. Iwanaga : The 3rd GEN Network International Seminar: Sustainable Bio-resources for Global Welfare. Bali, Indonesia (2010)

“Metagenomics analysis on soil microorganisms in the South East Asia”

3) 岩永廣子、J. Sabang、B. M. Diway、L. Chong、宮下直彦：日本遺伝学会第82回大会（2010）

「メタゲノム解析によるマレーシア熱帯雨林と劣化林における土壌微生物の多様性と機能の解明」

4) 岩永廣子、J. Sabang、B. Diway、L. Chong、宮下直彦：第21回熱帯生態学会（2011）

「メタゲノム解析によるマレーシア天然熱帯林および劣化林における土壌細菌・菌類の組成と多様性の解明」

5) 岩永廣子、B. Diway、J. Sabang、L. Chong、宮下直彦：日本微生物生態学会第27回大会(2011)

「メタゲノム解析によるマレーシア天然熱帯林と劣化林における土壌細菌・菌類群集の空間的・時間的変動の解明」

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（4）シンポジウム、セミナーの開催

特に記載すべき事項はない。

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（6）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

1) Harris J (2009) Soil microbial communities and restoration ecology: Facilitators or followers? *Science* 325: 573-574.

2) Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 24: 133-141.

3) 菅野純夫、他 10 著者、2009 特集 次世代高速シーケンサーの応用と情報解析. 蛋白質・核酸・酵素 54: 1233-1275.

4) Daniel R (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews* 3: 470-478.

5) Bailly J et.al. (2007) Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *The ISME Journal* 1, 632-642.

6) Cole JR et al. (2008) The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis, *Nucleic Acids Research* 37: D141-D145.

7) Legendre P, Legendre I (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier, New York.

- 8) Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Statist.* 11: 265-270.
- 9) Krebs C (1989) *Ecological Methodology*. HarperCollins, New York.
- 10) Chao A et al. (2005) A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data, 2005 *Ecology Letters* 8: 148-159.
- 11) White TJ et al. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p315-322. In: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.
- 12) Altschul SF et al. (1990) Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- 13) Huson DH et al. (2007) MEGAN analysis of metagenomic data, *Genome Research* 17:377-386.
- 14) Sun YJ et al. (2009) ESPRIT: estimating species richness using large collections of 16S rRNA pyrosequences, *Nucleic Acids Research* 37: e76.

〔3〕 遺伝的劣化評価1—地域集団の解析と多様性保全を目指した造林

愛媛大学・農学部 原田 光
二宮 生夫
嶋村 鉄也

<研究協力者>

愛媛大学農学部 上谷 浩一

平成21～23年度累計予算額：49,775千円

(うち、平成23年度予算額：16,053千円)

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕 フタバガキ科リュウノウジュ属 (*Dryobalanops*) はボルネオ島を中心にマレー半島、スマトラ島に7種が分布している。これについてサバ、サラワク州を中心に37集団436個体分の葉のサンプルを採集し、葉緑体および核遺伝子を用いた集団遺伝学的解析を行った。葉緑体については非コード領域合計1,330bpの配列を決定した。これにより37のハプロタイプを決定した。ネットワーク解析の結果、*D. aromatica* と *D. beccarii* は祖先的なハプロタイプを共有するのに対し、他種ではそれぞれのハプロタイプは種特有のものであり、固有種として分布の限られているものはネットワークの末端に位置する傾向が見られた。同様の結果は核遺伝子を用いた解析でも裏付けられると共に、遺伝的分化に基づくクラスター構造もある程度明らかになった。同様の解析をショレア属パキカルパ節6種 (14集団212個体) についても行った。一方、マレー半島およびサバ州、サラワク州に広く分布する *Shorea curtisii* について9集団、123個体について、葉緑体DNAおよび核遺伝子を用いた集団遺伝学的解析を行った。葉緑体DNAの変異からは15のハプロタイプが決定され、これを用いたネットワークからマレー半島とボルネオ島で集団が大きく遺伝的に分化していることが示された。核遺伝子の塩基差異はマレー半島の集団平均が0.00921であるのに対し、ボルネオ島集団では0.00175となり、ボルネオ島で変異が減少していることが分かった。LAMARCによる解析の結果、半島部では集団が平衡もしくは増大傾向にあり、ボルネオでは減少していることが分かった。インドネシアでは稀少種である *Shorea javanica*、*Dipterocarpus littoralis*、およびモルッカ諸島の固有種 *Shorea selamica*、*S. assamica*、*S. montigena* について葉緑体、核遺伝子、およびマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析を行った。一方、インドネシア・ジャワ島の古いチーク人工林で毎木調査を行い、階層別にマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的多様性を調べた。この結果上層ほど多様性が高く、また仮想の密度の高いところで近親交配の程度が高いことが示された。

〔キーワード〕

フタバガキ、遺伝的多様性、葉緑体DNA、マイクロサテライト、核遺伝子、ボルネオ、人工林

1. はじめに

地球上にはアジア、アフリカ、南アメリカに大きな熱帯雨林が存在し、その炭素蓄積機能から地球環境の調節に大きな役割を担っているとされる。前世紀後半から伐採や農地・プランテーションへの転換などにより世界規模での森林の減少が起こり、これに対して地球温暖化問題と共に、近年生物多様性の価値とその保全についての議論が活発に行われるようになってきた。しかしながら、多様性が維持される仕組みについては未解明であることも多い。本研究では生物多様性の二つのレベル、すなわち生態系の多様性と遺伝子レベルでの多様性がどのような関係性を持つのかについて、島嶼熱帯アジア、特にボルネオ島を中心にフタバガキ科樹木の遺伝的多様性について集団遺伝学的研究を行い、森林劣化がどのようにして起こるのか、その糸口をつかみ、指標化する方法を開発しようとするものである。

2. 研究開発目的

遺伝的変異の調査は、適切な森林生態系管理方策を講じるための科学的知見として非常に重要度の高いものである。本サブテーマの目的は、(1) 遺伝的変異に基づく森林劣化の評価手法の開発および、(2) 多様性保全のための新しい造林手法の開発である。

3. 研究開発方法

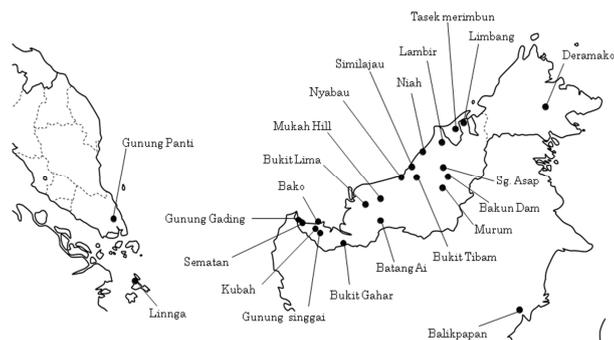
(1) 対象種

1) *Dryobalanops* sp.

Dryobalanops (リュウノウジュ) 属はフタバガキ科のなかでも例外的に構成する種数が少なく7種が知られるのみである。これらはマレー半島、ボルネオ島およびスマトラ島に分布するが、ボルネオ島のサバ、サラワク州にはすべての種が存在する。このうち、*D. aromatica*と*D. beccarii*、および*D. lanceolata*と*D. oblongifolia*は混交フタバガキ林に生育し、それぞれ葉の形態が類似するため、形態から分類することはしばしば困難とされる。これらは木材資源として経済的に重要なものであるが、あとの3種 (*D. rappa*, *D. fusca*, *D. keithii*) はボルネオ島の固有種で分布が限られ、稀少種となっている。これらについて北ボルネオ (マレーシア・サバ、サラワク州) およびマレー半島を中心にサンプル採集を行い、葉緑体および核遺伝子の変異を調べて分子集団遺伝学的解析を行った。

a. 葉緑体 DNA の変異に基づく系統解析

マレーシア・サバ、サラワク州を中心に37集団436個体分の葉を採集した (図(3)-1)。これには*D. aromatica* 5集団、*D. beccarii* 13集団、*D. lanceolata* 7集団、*D. oblongifolia* 6集団、*D. rappa* 3集団、*D. keithii* 1集団、および*D. fusca* 1集団が含まれる。これらの葉からCTAB法を用いてDNAを抽出した。これらについて18)を用いてアセンブルおよびアラインメントを行い、得られた変異に基づいてハプロタイプを決定した。ハプロタイプ間の系統関係はTCS ver. 1.21¹⁾によってネットワークを構築して解析すると共に、DnaSP ver. 5.10¹²⁾を用いて各種の集団遺伝学的パラメーターを算出した。集団間の遺伝的分化はArlequin v3.5.1.2³⁾に組み込まれたAMOVAを用いて解析した。



図(3)-1 リュウノウジュ属のマレー半島およびボルネオ島におけるサンプリングサイト

b. 核遺伝子を用いた集団遺伝学的解析

葉緑体DNAは母性遺伝をするため、種子散布によって拡散した系列 (lineage) を示すことが出来るが機能をもたない非コード領域を中心に調べているため適応進化的な変異を示すことが出来ない。このため種や集団の適応進化については核遺伝子を用いた解析が必要になる。また、葉緑体DNAより多くの変異が得られるので種の系統関係についてもより詳しく調べることが出来る。倍数性が疑われた*D. fusca*を除く6種について*D. aromatica* 4集団24個体、*D. beccarii* 3集団 11個体、*D. keithii* 1集団6個体、*D. lanceolata* 2集団9個体、*D. oblongifolia* 2集団8個体、*D. rappa* 2集団8個体の合計11集団 (ボルネオ島9集団、マレー半島2集団)、合計66個体について3つの核遺伝子、GBSSI (デンプン粒結合型スターチシンターゼI)、MetE (メチオニンシンターゼ)、およびSBE2 (スターチブランディングエンザイムII)の各部分的塩基配列を決定した。決定した配列の長さはそれぞれ、683bp、981bp、および678bpである。得られた配列はATGC (GENETYX, Japan)によってアッセンブルし、CLASTAL W¹⁸⁾をもちいてアラインメントした。結果はBioEdit⁷⁾によって検証した。各塩基配列の変異を領域毎に比較し、突然変異によって生じる塩基置換および挿入欠失を用いてディプロタイプに分けた。さらにDnaSP ver5.10¹²⁾を用いてハプロタイプを決定した。

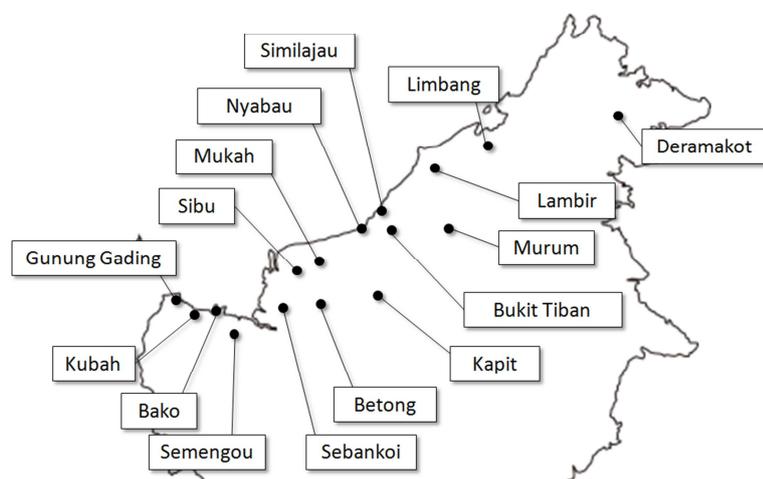
2) *Shorea* section Pachycarpae

*Shorea*属はフタバガキ科の中で最も大きな属であり、Ashtonによれば東南アジア熱帯雨林一帯で196種が知られている。*Shorea*属Pachycarpae節はボルネオ島に固有であり、低地フタバガキ林に10種が分布している。この研究ではPachycarpae節7種 (*S. amplexicaulis*, *S. beccariana*, *S. macrophylla*, *S. mecistopteryx*, *S. pinanga*, *S. praestans*, および *S. splendida*) について、種間の系統関係と種ごとの遺伝的多様性及び集団間分化の程度を明らかにすることを目的とする。このためマレーシア・サバ、サラワク州各地から、これらの7種について、14集団、212個体の葉のサンプルを採集し、DNAを抽出した。集団の位置および採集した種とその個体数を表(3)-1に示すと共に、その位置を図(3)-2に示した。

表(3)-1 *Shorea*属*Pachycrapae*節7種の採集地およびサンプル数

Population	Location	Species*							Total	
		1	2	3	4	5	6	7		
Sabah										
Deramakot	5°23'N/117°27'E	-	8	9	10	-	-	-	-	27
Sarawak										
Limbang	4°20'N/115°11'E	-	5	10	-	-	-	-	-	15
Lambir	4°12'N/114°01'E	-	7	10	-	-	-	-	-	17
Similajau	3°27'N/113°15'E	-	10	-	-	-	-	-	-	10
Bukit Tiban	3°27'N/113°26'E	2	-	-	-	10	4	-	-	16
Mukah	2°30'N/112°18'E	-	4	9	-	6	-	-	-	19
Sibu	2°00'N/112°00'E	-	10	10	-	-	-	-	-	20
Kapit	1°55'N/113°04'E	-	-	9	-	-	-	-	-	9
Sebankoi	1°57'N//111°25'E	-	-	-	-	5	-	6	-	11
Gunung gading	1°42'N/109°48'E	-	-	5	-	-	-	-	-	5
Bako	1°43'N/110°28'E	-	10	-	-	-	-	-	-	10
Kubah	1°35'N/110°09'E	8	10	10	-	-	-	6	-	34
Semengou	1°23'N/110°17'E	-	10	10	-	-	-	-	-	20
total		10	74	82	10	21	4	12	-	213

*Species: 1. *S.amplexicaulis*, 2. *S.beccariana*, 3. *S. macrophylla*,
4. *S.mecistopteryx*, 5. *S.pinanga*, 6. *S.preastans*, 7. *S.splendida*



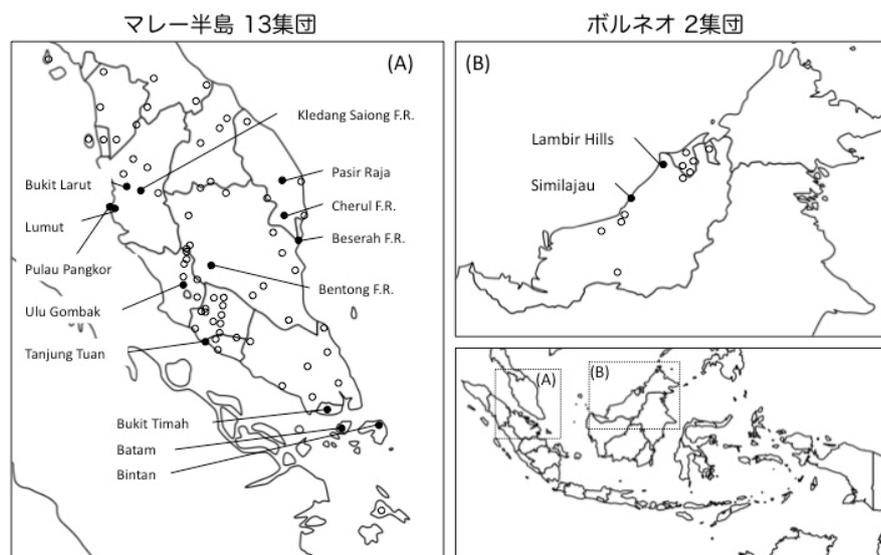
図(3)-2 *Shorea*属*Pachycrapae*節7種のサンプル採集地。

各個体について、葉緑体DNAの4遺伝子間領域と1遺伝子領域 (*trnH-psbA-trnK*および*trnL intron*、*trnL-trnF spacer*)をPCR増幅し、ダイレクト法で塩基配列を決定した。得られた塩基配列はBioEdit⁷⁾による検証を行ったのち、CLUSTAL W¹⁸⁾でアラインメントした。集団遺伝学的な各種のパラメーターはDnaSP v.5.10.01¹²⁾で決定した。アラインメントしたデータを基にTCS 1.21¹⁾でハプロタイプネットワークを作成しハプロタイプ間の系統関係を調べた。また複数の集団が得られた*S.beccariana*と*S.macrophylla*について集団構造を調べるためSAMOVA²⁾を用いて分散量を最大にす

る集団のグループ分けを行い、これに基づいてArlequin v3.5.1.2³⁾に組み込まれた分子分散分析(AMOVA)を行った。

3) *Shorea curtisii*

Shorea curtisii (現地名セラヤ)は、東南アジアの標高300-800mの丘陵フタバガキ林の優占種である。丘陵フタバガキ林は重要な森林資源であり、マレー半島において*Shorea curtisii*は択伐の対象となっている。この種はマレー半島の丘陵フタバガキ林や海岸性丘陵フタバガキ林に普遍的に分布しているが、ボルネオ島における分布はサラワク州中央部の海岸沿いの砂壤土に限定されている。本研究では、マレー半島から13、そしてボルネオ島から2カ所から集団のサンプルを採集し、DNA分析に供した(図(3)-3)。ボルネオ島では上記の2カ所以外に過去の分布記録のある3カ所での採集を試みたが、開発の進んだこれらの地点では*Shorea curtisii*の個体を見つけることができなかった。遺伝的変異の解析には、葉緑体塩基配列、核遺伝子塩基配列、およびマイクロサテライトマーカーを用いた。



図(3)-3 *Shorea curtisii*の採集地点

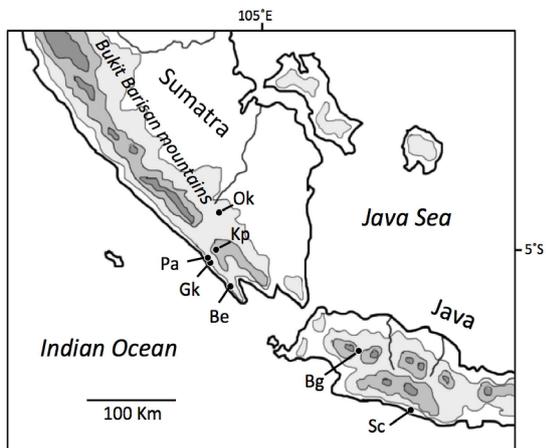
4) *Shorea javanica*

*Shorea javanica*はスマトラ島の南部の数カ所にのみ分布する希少種である。高品質のダマールが採取できるこの種は、古くから植林されているが、現在この種の自然植生はほとんど残っておらず、自生地としてサンプリングできた地点はKubu Perahu (Kp)の1カ所のみである。それ以外の地点は、植林された集団である。ボゴール植物園に植栽されている*Shorea javanica*は過去にジャワ島内の森林で採集されたものであると考えられており、過去にはジャワ島にも自然集団が存在したことが示唆されるが、その由来ははっきりしない。7地点から合計80個体の成木を採集し、DNA分析に供した(図(3)-4)。遺伝的変異の解析には、葉緑体塩基配列、核遺伝子塩基配列およびマイクロサテライトマーカーを用いた。

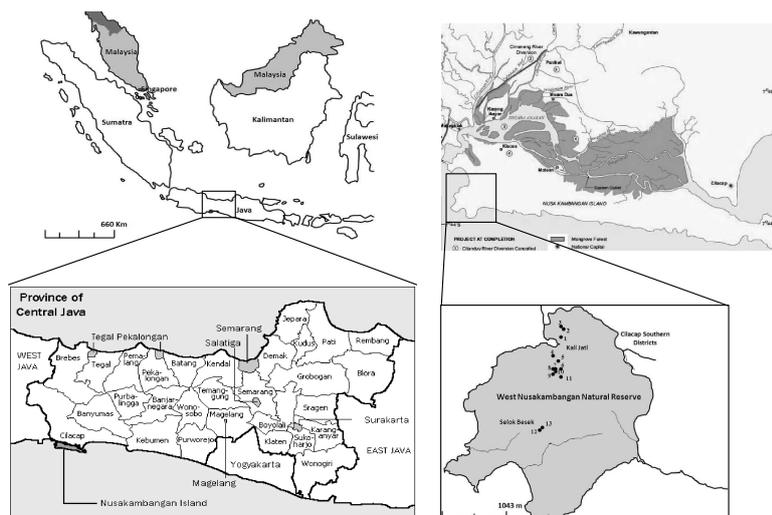
5) *Dipterocarpus littoralis*

*Dipterocarpus littoralis*は中央ジャワの南側に位置するヌサカンバンガン島の南西部にのみ分布

する希少種である。この種は、東南アジアの比較的標高の高い森林に広域分布する *Dipterocarpus retusus* が中央ジャワの海岸性環境に適応して派生した種であると考えられている。本研究では、西ヌサカンバン自然保護区全域からこの種の全成木18個体の葉のサンプルを採集すると同時に、成木の周りに生育する稚樹、合計71個体分のサンプルを採集し、DNA分析に供した(図(3)-5)。遺伝的変異の解析にはマイクロサテライトマーカーを用いた。



図(3)-4 *Shorea javanica*の採集地点



図(3)-5 *Dipterocarpus littoralis*の採集地点

(2) DNA解析手法

1) DNA配列の決定と解析

各個体から抽出したゲノムDNAを鋳型にして、葉緑体DNA領域 *trnH-trnK*、*trnL-trnF*、*psbC-trnS*、*trnS-trnfM* を特異的に増幅するユニバーサルプライマーを用いて、PCR増幅を行った。PCR産物の塩基配列はダイレクトシーケンシング法によって行った。一方、核遺伝子の配列はフタバガキ科の核遺伝子4領域 (*GapC*、*GBSSI*、*Met*、*PgiC*) それぞれを特異的にPCR増幅できるプライマーを用いて決定した。決定した塩基配列は種または種群ごとにまとめ、アライメントを行った後、ハプロタイプネットワークの作成や、遺伝的変異量、遺伝的分化の推定やコアレスセントシミュレーションに用いた。

2) マイクロサテライト解析

これまでに発表されているフタバガキ科のマイクロサテライトプライマーが本研究の対象種に利用可能であるかをテストした。その結果から、*Shorea curtisii*、*Shorea javanica*、*Dipterocarpus littoralis*の3種について、それぞれ8、7、7のマイクロサテライト遺伝子座を選択し、遺伝的変異の解析に用いた。これらのマイクロサテライト領域は個体ごとにマルチプレックスPCR法を用いて増幅し、DNAシーケンサによってそれらのサイズを決定した。得られたマイクロサテライトデータを用いて、対立遺伝子数やヘテロ接合度などのパラメーターを推定し、種間および集団間で遺伝的多様性量を比較した。

(3) チーク造林地

本研究はインドネシア、ジャワ島中部にある2つの地域で行われた。

1) ワナガマ演習林 (Wanagama I)

ジョグジャカルタ特別州、グヌンキドゥル県にあるガジャマダ大学 (Universitas Gadjadara) のワナガマ演習林 (110° 30' 38" - 110° 33' 03" E, 7° 53' 25" - 7° 54' 52" S) である。年間降水量1900mmで明瞭な乾期と雨期があり、比較的降水量の少ない地域である。年平均気温27.3°C、海拔200-600mである。当演習林は1964年に州政府からガジャマダ大学へ管理が委託され、同大学演習林として設立された。当時ジャワ島では土地の荒廃が深刻な問題となっており、当演習林周辺においても土壌を被覆する植生はなく、激しい雨滴により侵食された土地が広がっていた。現在ではガジャマダ大学の地道な取り組みにより植生が回復し、インドネシアにおける森林造成の成功事例の一つとして知られている。演習林内には熱帯産有用樹種 (チーク: *Tectona grandis* L.f., マホガニー: *Swietenia macrophylla* King., アカシア: *Acacia* spp., ユーカリ: *Eucalyptus* spp., コクタン: *Diospyros celebica* Bakh., ビヤクダン: *Santalum album* L. など) の植栽試験や、産地試験、交配試験、遺伝子保全林分などの様々な林分が造成されている。

2) 林業公社プルフタニ社ケンダル林業ユニット

中部ジャワ州、ケンダル県にある国営プルフタニ社によって管理される林業ユニット (109° 43' 28" - 110° 24' 35" E and 6° 51' 22" - 7° 7' 17" S) である。熱帯低地林に含まれるこの地域は年間降水量3500mm、年平均気温27.5°C、海拔は150~200mである。約2万haの林地にてトゥンパンサリというアグロフォレストリーによってチーク造林を行い、60年伐期施業でチーク材を生産している。同社はジャワ島、特に中部と東部においてチーク林業を展開し、ジャワにおける最も一般的な林業形態である。

3) 方法

a. 毎木調査

熱帯産樹種6種からなる11の一斉人工林 (モノカルチャー) においておこなわれた (表(3)-2)。0.08~0.25haの調査区を設置し、毎木調査により胸高直径 (以下DBHとする) ≥ 4 cmの個体を対象にDBH、樹高、樹種を記録した。

b. 葉のサンプリング

遺伝解析をおこなうためプロット内の全個体より葉組織をサンプリングした。得られたサンプル

ルよりDNAを抽出し、PCR増幅をおこなった。それらを遺伝子解析ソフト (Genemapper 3.0 Applied Biosystems) を用い解析をおこない、ヘテロ接合度と近交係数を算出した。

4) 解析

a. 階層構造の解析

林分の階層構造を明らかにするため M-w図⁸⁾を作成した。各個体の個体重 (w) を算出し降順にならべ、n番目に大きな個体の個体重 (w_n) と最も大きな個体の個体重 (w_{max}) からn番目までの個体重の平均 (M_n) を (1) 式によって求め、その関係を両対数グラフに表した。なお本研究では個体重にD²Hを用いた。

$$M_n = \sum_{i=1}^n w_i / n \cdot \cdot \cdot (1)$$

表(3)-2 調査区まとめ

Plot	Species	Study site	Age	Plot area
			Yr	[ha]
T-43	<i>Tectona grandis</i>	①	43	0.08
T-6	<i>Tectona grandis</i>	①	6	0.09
T-36	<i>Tectona grandis</i>	①	36	0.09
T-45	<i>Tectona grandis</i>	②	45	0.09
T-58	<i>Tectona grandis</i>	②	58	0.09
M-43-L	<i>Swietenia macrophylla</i>	①	43	0.25
M-43-S	<i>Swietenia macrophylla</i>	①	43	0.09
E-29	<i>Eucalyptus urophylla</i>	①	29	0.18
E-17	<i>Eucalyptus pellita</i>	①	17	0.24
E-12	<i>Eucalyptus hybrid</i>	①	12	0.12
G-18	<i>Gmelina arborea</i>	①	18	0.09

M-w図はいくつかの線分によって近似することができ (2) 式)、それらの線分は林分を構成する樹木の階層構造と関係する (Hozumi, 1975)。A, Bは線分ごとに決まる係数である。

$$M = A^w + B \cdot \cdot \cdot (2)$$

以上の解析で確認された階層は上層より第1層、第2層・・・・第x層とした。

b. 個体密度と平均個体重の関係

階層が確認された林分に対し、階層毎の個体密度、平均個体重、胸高断面積合計 (以下BAとする) を算出し、それらの階層における密度と個体重の関係を検討した。

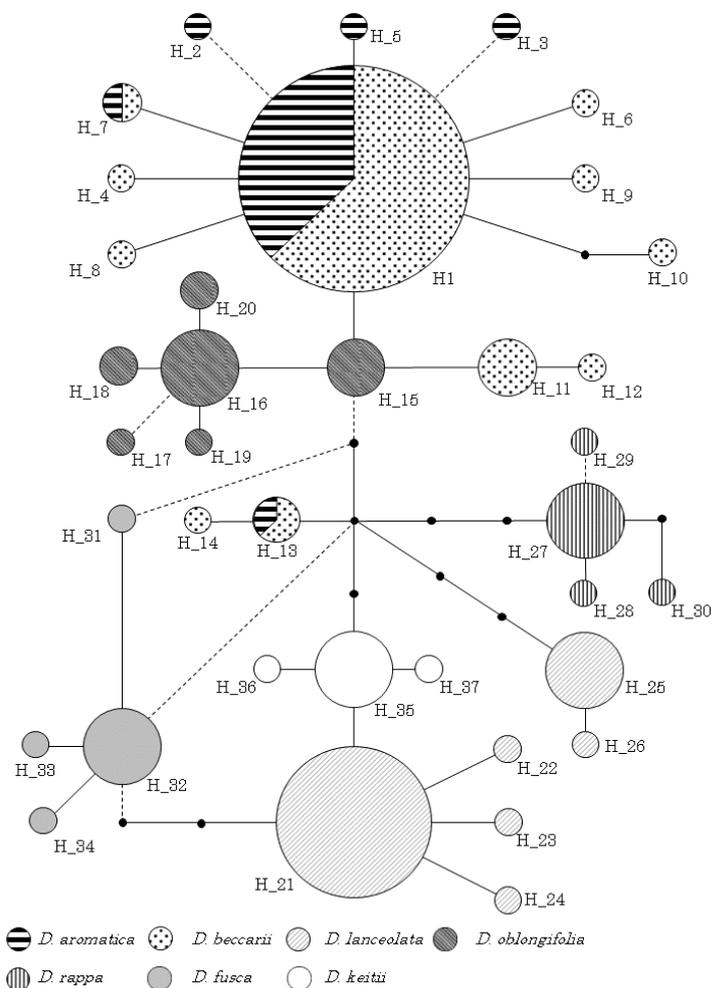
4. 結果及び考察

(1) *Dryobalanops* sp.

1) 葉緑体 DNA の変異に基づく系統解析

trnL-trnF 378bp, *trnH-psbA* 240bp, *psbA-trnK* 304bp および *trnL* 408bp の合計1330bpの塩基配列を決定した。その結果、38箇所の塩基置換と6箇所の挿入/欠失が見つかり、これにより37のハプロタイプが決定できた。これを用いて作成したTCSネットワークを図(3)-5に示した。ここでは *Shorea parvifolia* を外群として用いた。これによりハプロタイプH-5が祖先であることが分かった。*D. aromatica* と *D. beccarii* には14種のハプロタイプが存在するがそのうちH-1, H-7, H-13を共有していた。他種の間では共有されるハプロタイプはなく、それぞれのハプロタイプは種特有のものであった。*D. oblongifolia*, *D. rappa*, *D. fusca*, *D. keithii* ではそれぞれ、6, 3, 4, 3種のハプロタイプを持ち、単系統的となるグループを形成していた。*D. lanceolata* ではそれぞれ2個と4個からなる二つのハプロタイプ群が場所を隔てて多系統的に存在した。ハプロタイプネットワークから *D. aromatica* および *D. beccarii* が祖先的な種であり、これから最初に *D. oblongifolia* が分化し、更に *D. rappa*, *D. keithii*, *D. lanceolata* および *D. fusca* が分化したことが推測できる。ただし、*D. fusca* の派生した場所は特定できない。ボルネオ固有種は種分化の末端に位置し、起源の新しい種である

といえる。またハプロタイプの分布はこれらの種の地理的分布と大まかに一致し、リュウノウジュ属の起源となった種（多分は*D. aromatica*もしくは*D. beccarii*）が植生を広げていく過程で種が分化したと考えられる。



図(3)-5 リュウノウジュ属7種のTCSを用いて構築したハプロタイプネットワーク。ドットは仮想的なハプロタイプ、点線は挿入/欠失による関係。

DnaSPで算出した遺伝的変異（塩基多様度）の値を表(3)-3に示す。*D. beccarii* および*D. lanceolata*で大きな変異量が見られたのに対し、*D. aromatica*の変異量は最も少なかった。 F_{ST} の値から*D. beccarii*, *D. lanceolata*, *D. oblongifolia*で大きな遺伝的分化が生じているのに対し、*D. aromatica*および*D. rappa*では集団間の分化はわずかであることが示された。AMOVA解析により*D. beccarii* および*D. oblongifolia*ではマレー半島とボルネオ島のあいだで有意な遺伝的分化が起こっており、また*D. lanceolata*では北ボルネオと南ボルネオで有意な遺伝的分化が起こっていた。これらの種では地域間の遺伝的分化が大きいため全体的な遺伝的変異量が増加していることが明らかになった。

2) 核遺伝子を用いた集団遺伝学的解析

*Dryobalanops*属各種、および集団について塩基多様度 (π)¹⁴⁾と突然変異率 (θ)¹⁹⁾、集団間および種間での遺伝子分化係数 F_{ST} ⁹⁾と純塩基置換数 D_a ¹⁴⁾を求め、MEGA4¹⁷⁾を用いて F_{ST} と D_a の値からNJ法¹⁶⁾により系統樹を作成した。図(3)-6に集団ごとの各遺伝子の塩基多様度を示した。集団数の多い*D. aromatica*および*D. beccarii*についてみると変異量は集団ごとに大きくばらついていた。

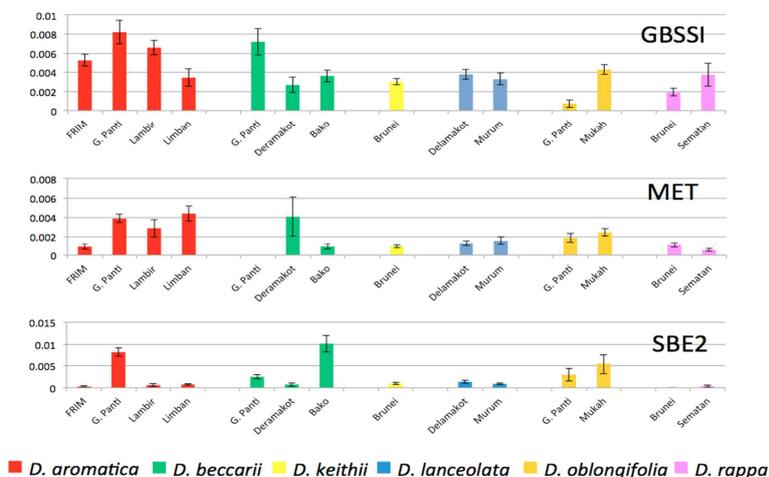
また遺伝子ごとにばらつきのパターンは異なり、遺伝子間で一定の傾向は見られなかった。次に遺伝子ごとの平均の塩基多様度を図(3)-7に示した。*D. aromatic*、*D. beccarii*、*D. lanceolata*、*D. oblongifolia*に比べて固有種*D. keithii*、*D. rappa*の多様性が小さい傾向がどの遺伝子でも見られた。各遺伝子毎の塩基多様度の平均値はGBSSIで 0.00501 ± 0.00210 、MetEで 0.00346 ± 0.00276 、SBE2で 0.00614 ± 0.00482 となり、遺伝子間で大きな違いはなかった。

表(3)-3 リュウノウジュ属各種の葉緑体DNA変異に基づく遺伝的多様性と遺伝的分化

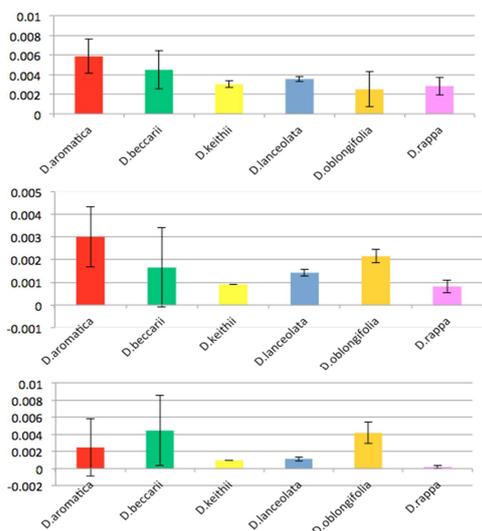
Species	Population	<i>N</i>	π	θ	F_{ST}
<i>D. aromatic</i>	Limbang	5	0.00000	0.00000	
	Lambir	20	0.00016	0.00044	
	Similajau	19	0.00000	0.00000	
	Lingga	6	0.00000	0.00000	
	Gunng Panti	23	0.00039	0.00063	
	All	73	0.00017	0.00080	0.03286
<i>D. beccarii</i>	Deramakot	11	0.00014	0.00027	
	Similajau	8	0.00039	0.00060	
	Nyabau	10	0.00000	0.00000	
	Bukit Tiban	8	0.00058	0.00090	
	Sg. Asap	3	0.00000	0.00000	
	Bakun Dam	4	0.00000	0.00000	
	Murum	7	0.00037	0.00032	
	Mukah Hill	15	0.00010	0.00024	
	Batang Ai	23	0.00000	0.00000	
	Gunng Singgai	10	0.00000	0.00000	
	Bako	28	0.00000	0.00000	
	Kubah	9	0.00000	0.00000	
	Gunng Gading	17	0.00000	0.00000	
	Gunng Panti	2	0.00078	0.00078	
All	155	0.00047	0.00194	0.79490	
<i>D. lanceolata</i>	Deramakot	24	0.00012	0.00021	
	Lambir	18	0.00000	0.00000	
	Niah	9	0.00017	0.00029	
	Bakun Dam	6	0.00000	0.00000	
	Sg. Asap	14	0.00000	0.00000	
	Murum	6	0.00026	0.00034	
	Balikpapan	16	0.00018	0.00023	
	All	93	0.00144	0.00152	0.92690
<i>D. oblongifolia</i>	Nyabau	17	0.00044	0.00046	
	Mukah Hill	16	0.00031	0.00024	

次に図(3)-8に遺伝子領域を非同義サイトとサイレントサイト（同義サイト及び非コード領域）に分けてそれぞれの塩基多様度を求め棒グラフで示した。非同義サイトとサイレントサイトのそれぞれの塩基多様度の比、 π_N/π_S はGBSSI遺伝子で0.9082、MetE遺伝子で0.1405、SBE2遺伝子で0.0410となった。MetEおよびSBE2遺伝子で強い選択的制約が働いているのに対し、GBSSI遺伝子では制約が弱く、この傾向はすべての種で見られた。従ってGBSSI遺伝子は*Dryobalanops*属の種分化の前に偽遺伝子化したことが示唆された。SBE2遺伝子では種間の変異はサイレントサイトのみで起

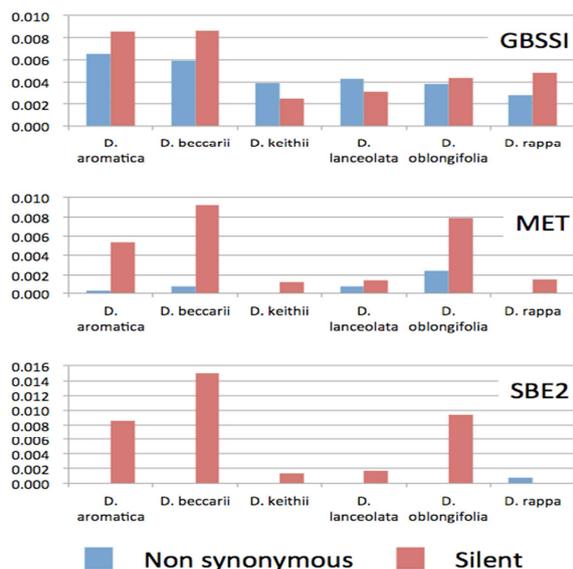
こっていたので系統間での進化速度に違いは生じないと考えられるので、この遺伝子を用いて系統樹を作成した（図(3)-9）。



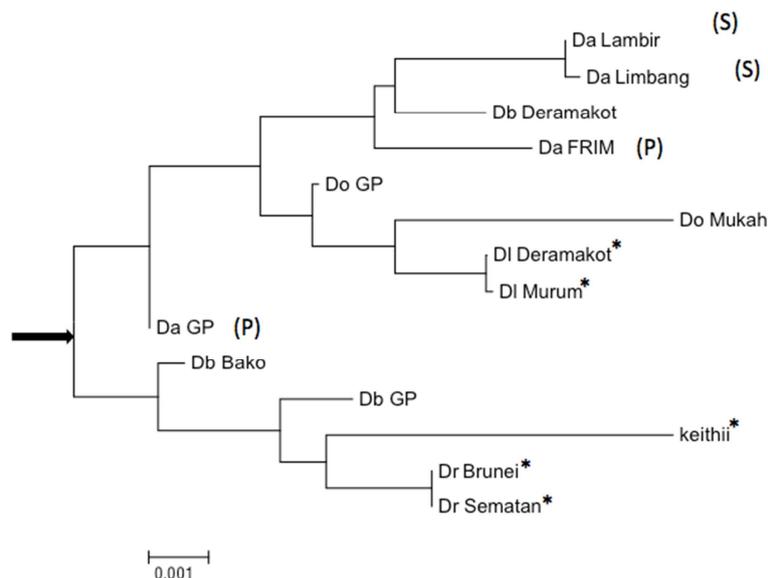
図(3)-6 リュウノウジュ属各種の集団毎の塩基多様度



図(3)-7 リュウノウジュ属各種の平均塩基多様度



図(3)-8 リュウノウジュ属各種の非同義およびサイレントサイトの塩基多様度



図(3)-9 SBE2遺伝子の集団間 D_a 距離に基づいて作成したNJ系統樹。矢印はUPGMA法によって得られた祖先の位置。*D. aromatica*について (P) はマレー半島の集団、(S)はボルネオ島サラワク州の集団を示す。*はボルネオ島固有種。

*D. aromatica*および*D. beccarii*が分岐の起点に位置するので、*Dryobalanops*属の種分化は最初に*D. aromatica*と*D. beccarii*が分化した後、*D. aromatica*の系列に*D. oblongifolia*が分岐し、さらに*D. lanceolata*が分化したこと、また*D. beccarii*の系列として、*D. rappa*と*D. keithii*が分化したことを示している。*D. aromatica*についてはマレー半島のものからボルネオ(S)が派生したことを示している。一方、Deramakotの*D. beccarii*が*D. aromatica*のグループに入り込んでいるが、これは種同定の誤りかもしれない。葉緑体DNAの変異、および核遺伝子の変異の解析を通して種の系統関係、集団毎の遺伝的多様性の程度、種による遺伝的多様性の程度などが明らかになった。

(2) *Shorea*, sect. *Pachycarpae*

*trnL*イントロンについて485bp、*trnT-trnL*および*trnH-psbA-trnK*スペーサーについてそれぞれ、366bp、1510bpの長さの配列を決定した。これらの全長は2363bpとなり、これから22の塩基置換および7つの挿入/欠失が見つかった。種ごとの塩基多様度を表(3)-4に示した。

*S. beccariana*および*S. pinanga*が他種と比較して大きな変異量を示した。また*S. macrophylla*の遺伝的変異は*S. beccariana*の1/3程度であった。つぎに葉緑体DNA配列変異を基にハプロタイプネットワークを作成した(図(3)-10)。その結果、ネットワークの中心に位置するハプロタイプは*S. beccariana*、*S. pinanga*、*S. amplexicaulis*、*S. splendida*の4種が共有しており、これら4種は互いに近縁であることが示唆された。*S. macrophylla*、*S. mecistopteryx*、*S. praestans*の3種はこれから派生していた。このうち*S. macrophylla*と*S. praestans*はハプロタイプを共有し、たがいに近縁関係にあるといえる。複数

の種で共通のハプロタイプが見つかったことから（１）*Pachycarpae*節の種分化が比較的最近に起こった結果、共通祖先で見られた遺伝子多型が現存種に未だに保持されている、（２）種間交雑の結果、同じハプロタイプが異種間で共有されていることの可能性が考えられた。現在の所、7種の間での種間交雑を示すデータはなく（１）の可能性が高いと考えられる。SAMOVAによって、*S.beccariana*の集団は3、そして*S.macrophylla*は2の遺伝的組成の異なるグループに分けることができた。これに基づいてAMOVA解析を行った。この結果を表(3)-5に示した。

表(3)-4 *Shorea*属*Pachycrapae*節7種の塩基多様度

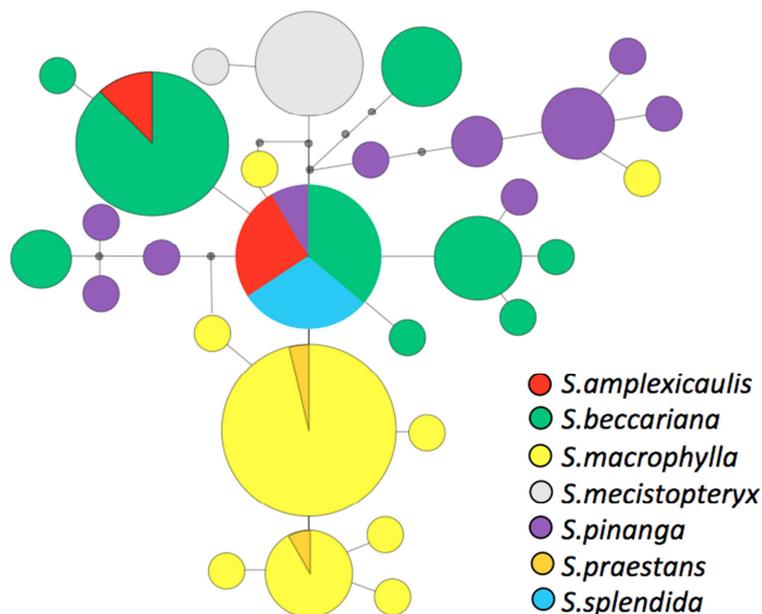
Species	S^a	π^b	θ^c
<i>S.amplexicaulis</i>	1	0.00023±0.00004 ^d	0.00015±0.00015
<i>S.beccariana</i>	15	0.00114±0.00012	0.00127±0.00045
<i>S.macrophylla</i>	10	0.00031±0.00005	0.00088±0.00028
<i>S.mecistopteryx</i>	1	0.00008±0.00006	0.00014±0.00014
<i>S.pinanga</i>	12	0.00111±0.00021	0.00136±0.00590
<i>S.praestans</i>	1	0.00027±0.00008	0.00022±0.00022
<i>S.splendida</i>	0	0	0

^a number of polymorphic sites (segregating sites)

^b nucleotide diversity (Nei, 1987)

^c scaled mutation rate (Watterson, 1975)

^d standard deviation



図(3)-10 *Shorea*属*Pachycrapae*節7種のTCSハプロタイプネットワーク

表(3)-5 AMOVAの結果

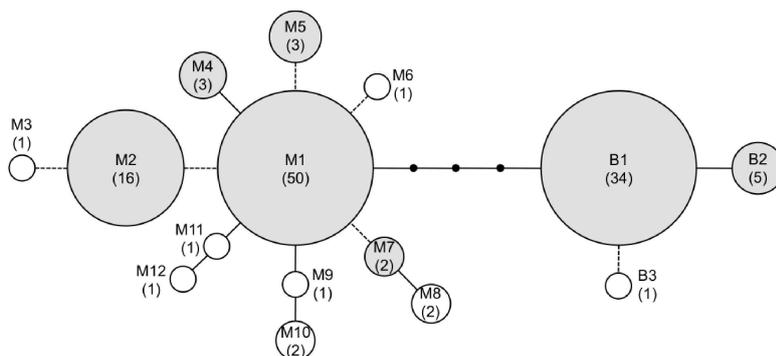
<i>S.beccariana</i>						
Source of variaton	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>F</i> statistics ^a	
Among regions	2	64.38	2.23346	68.87	$F_{CT} =$	0.6887*
Among populations within reigons	6	26.017	0.4627	14.27	$F_{SC} =$	0.45831***
Within populations	64	35	0.54688	16.86	$F_{ST} =$	0.83137***
total	72	125.397	3.24304	100.0		
<i>S.macrophylla</i>						
Source of variaton	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>F</i> statistics ^a	
Among regions	1	6.236	0.28802	41.82	$F_{CT} =$	0.41821 ^{ns}
Among populations within reigons	7	7.662	0.08721	12.66	$F_{SC} =$	0.21765***
Within populations	73	22.883	0.31346	45.52	$F_{ST} =$	0.54484***
total	81	36.781	0.68869	100.0		

****: *P*-value by permutation test less than 0.001. *: *P*-value by permutation test less than 0.05. ns: non significant

集団間分化の程度を示す F_{ST} は*S.beccariana*で0.83、*S.macrophylla*で0.54であったが、グループ内の集団分化は*S.macrophylla*で低かった($F_{SC} = 0.22$)。また、中立性の検定から、*S.macrophylla*集団では頻度の低い多型サイト数が有意に多いことが示された。このことは、この種が集団サイズの急激な減少と、その後の急速な集団サイズの増加を経験したことを示唆している。以上の結果から*S.beccariana*では歴史的な集団サイズの変動が比較的少なかったため、高い遺伝的変異と高度な集団分化が見られるのに対し、*S.macrophylla*ではボトルネックによって遺伝的多様性が減少した後、分布域を急速に拡大したため明確な集団分化が見られなかったと考えられる。

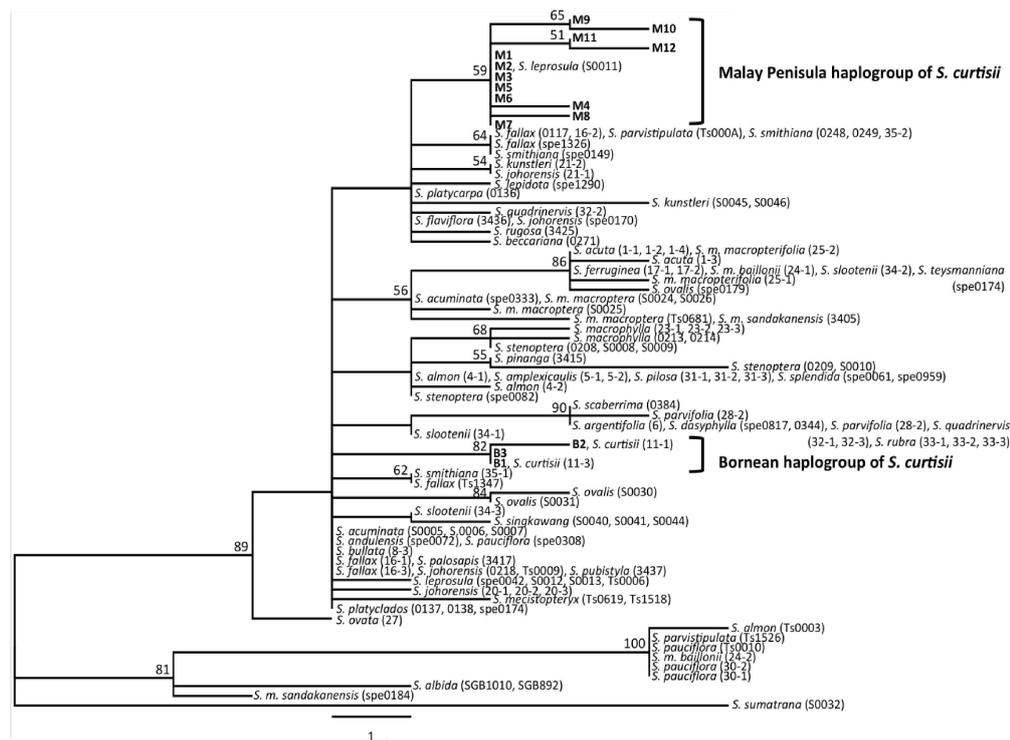
(3) *Shorea curtisii*

合計9集団、123個体について、葉緑体*trnH-trnK*と*trnL-trnF*の2領域、合計2.5kbの塩基配列を決定した結果、15の異なるハプロタイプが見つかった。ボルネオ島とマレー半島の集団はそれぞれ頻度の高いハプロタイプを一つずつ持っており(ハプロタイプM1とB1)、これらのハプロタイプの分岐は種分化直後に起こったと考えられた(図(3)-11)。



図(3)-11 *Shorea curtisii*の葉緑体ハプロタイプネットワーク。括弧内の数字はハプロタイプの頻度、白抜きのは集団に固有のハプロタイプである

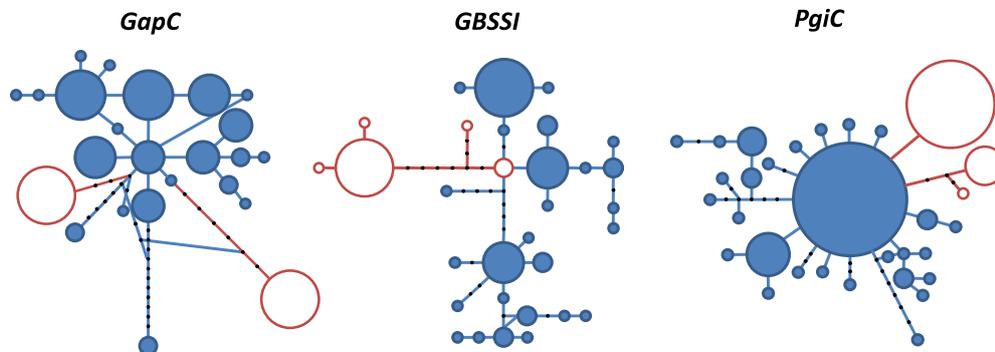
ハプロタイプM1、M2、B1以外のハプロタイプの頻度は5個体以下と低く、これらは頻度の高いM1またはB1から派生的に生じたことが示された。また、両地域間で共有されるハプロタイプは見つからなかった。マレー半島集団からは、12ハプロタイプが特定されたが、ボルネオ島の2集団で見つかったハプロタイプは3のみであった。塩基多様度はボルネオ島で0.00004であり、マレー半島のもの(0.00010)と比較して半分程度の値を示した。ランビルを含むサラワク州中央部は植生調査の結果から、ボルネオ島の他地域と比較しても種多様性が高いことがわかっている。このことはこの地域が長期間にわたり安定した湿潤環境にあり、多くの熱帯樹木が絶滅することなく維持されてきたことを示唆する。このような地域では、他種との競争効果の結果、*S. curtisii*が長期間小さい集団サイズによって維持されてきた可能性が考えられる。また、ボルネオ島におけるこの種の分布は、サラワク州北部の海岸沿いの丘陵地で見られる歴史の新しい砂質土壌に限定されており、内陸の丘陵フタバガキ林では見つからない。このようなハビタットの特異性も*S. curtisii*の遺伝的変異に影響していると考えられる。また、サブテーマ4で研究された、*Shorea*属近縁種の葉緑体ハプロタイプを含めて、系統樹を作成した結果、マレー半島とボルネオのハプログループの起源は非常に古く、両グループが分化した後に、他種で見られる多くのハプロタイプが分化したことが明らかになった(図(3)-12)。



図(3)-12 *Shorea*属葉緑体ハプロタイプの系統樹。太字で示された*Shorea curtisii*のマレー半島とボルネオのハプログループが分岐した後に、他種で見られる多くのハプロタイプが派生したことがわかる。

つぎに*S. curtisii*の15集団、178個体について、核遺伝子*GapC*、*GBSSI*、*PgiC*の塩基配列を決定し、遺伝的変異量を推定した。塩基多様度は葉緑体DNAに比べ、10倍ほど高く、どの遺伝子座においても多くの異なるハプロタイプが見られた(図(3)-13)。葉緑体DNA配列の結果と同様、ハプロタイプ数はマレー半島で多く、ボルネオ島からは2~5のハプロタイプしか観察されなかった。また、

ボルネオ集団で見られたハプロタイプ間には多くの塩基置換が蓄積しており、互いに遠縁であることが示された。また、葉緑体の結果と同様、マレー半島とボルネオの間で共有されるハプロタイプは見つからず、両地域集団間の高い遺伝的な分化は核遺伝子データからも示された。



図(3)-13 核遺伝子3領域のハプロタイプネットワーク。大きな○は高頻度、小さな○は低頻度のハプロタイプである。黒点は観察されなかった中間的なハプロタイプを示す。白抜きはボルネオ集団で見つかったハプロタイプを示す。

地域集団間（マレー半島-ボルネオ島）、地域内集団間、集団内個体間の差異によって生じている遺伝的変異の割合をAMOVA分析により算出した。その結果、葉緑体、核遺伝子領域ともに、全遺伝的変異の大部分が地域間と集団内個体間に由来し、地域内集団間の遺伝的差異は非常に小さいことが示された（表(3)-6）。また、地域間、地域内集団間、集団間の各階層における遺伝的分化（ F_{CT} 、 F_{SC} 、 F_{ST} ）はpermutation testではいずれも有意であったが、葉緑体DNAの F_{SC} は有意ではなかった。これらの結果から、遺伝的分化の程度はマレー半島-ボルネオ間で著しく高いが、各地域集団間は遺伝的にほとんど分化していないことが明らかになった。現在、東南アジア熱帯で優占する常緑広葉樹の多くは、氷河期の影響による気温低下と乾燥から逃れたいくつかの小集団が分布を拡げた結果であると考えられている。地域内集団間の低い遺伝的分化と多数の低頻度ハプロタイプの存在は、現在のマレー半島集団が氷河期以降に分布域を急速に拡大した結果であると考えられる。

表(3)-6 葉緑体と核DNA変異の分子分散分析（AMOVA）

	Chloroplast	<i>PgiC</i>	<i>GapC</i>	<i>GBSSI</i>
Percentage variation				
Among regions (Malay Peninsula – Borneo)	51.11	21.00	57.79	55.18
Among populations within regions	2.50	11.48	2.95	3.40
Within populations	46.38	67.52	39.26	41.42
Fixation indices				
F_{CT} (Among regions)	0.5112 ^{***}	0.2100 ^{**}	0.5779 ^{***}	0.5518 ^{***}
F_{SC} (Among populations within regions)	0.0512 ^{ns}	0.1453 ^{***}	0.0699 ^{***}	0.0759 ^{***}
F_{ST} (Among populations)	0.5362 ^{***}	0.3258 ^{***}	0.6074 ^{***}	0.5858 ^{***}

^{ns} not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

核遺伝子の塩基配列データから、プログラムLAMARCを用いて、遺伝的変異量を表す統計量である θ を推定し、集団間で比較した。この θ は集団遺伝学において、有効集団サイズ（ N ）と世代当

たりの突然変異率 (μ) によって定義される ($\theta = 4N\mu$)。また、集団サイズの増加率を示すパラメーター、 g を推定した (図(3)-14)。

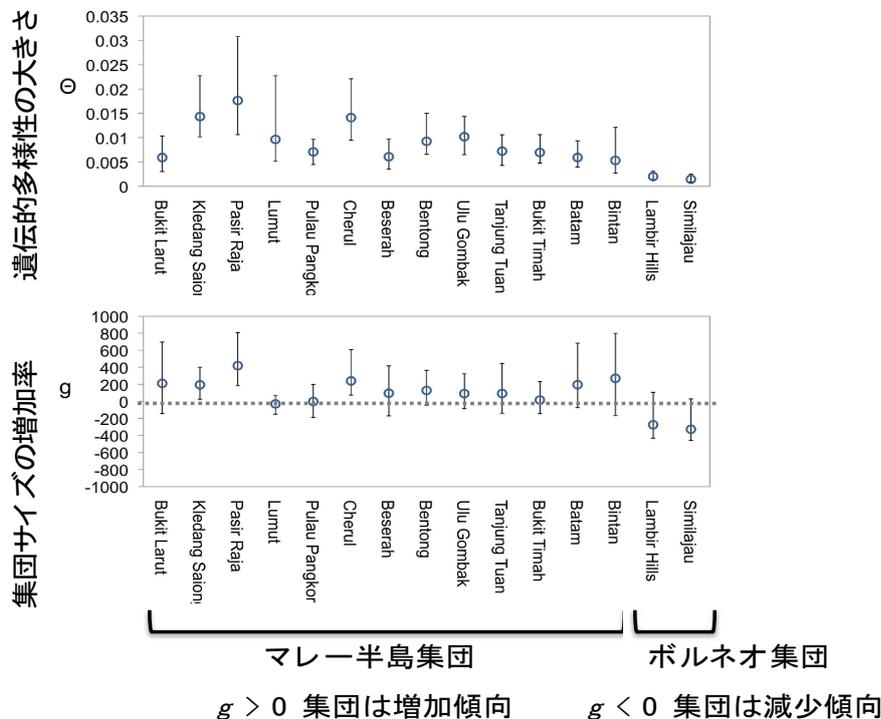


図 (3)-14 プログラム LAMARCを用いて推定した、*Shorea curtisii*各集団の遺伝的多様性の大きさ (θ) と集団サイズの増加率を示すパラメーター g の推定値。点がそれぞれの最尤推定値、そしてバーは95%信用区間を示す。

表(3)-7 マイクロサテライトデータから推定された*Shorea curtisii*各集団の遺伝的変異量

Population	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>Ae</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F</i>	
マレー半島	Bukit Larut	7	5.25	4.03	0.70	0.66	-0.07 ^{NS}
	Lumut	3	3.38	2.84	0.71	0.56	-0.27 ^{NS}
	Beserah	13	6.63	4.08	0.62	0.67	0.07 ^{NS}
	Pulau Pangkor	20	5.88	3.39	0.62	0.66	0.12 ^{NS}
	Ulu Gombak	16	6.38	3.65	0.60	0.63	0.05 ^{NS}
	Tanjung Tuan	20	6.13	3.72	0.58	0.63	0.09 ^{NS}
	Bukit Timah	20	6.88	3.51	0.60	0.62	0.03 ^{NS}
ボルネオ	Lambir Hills	20	2.88	1.64	0.36	0.36	-0.05 ^{NS}
	Similajau	20	3.50	2.19	0.39	0.40	0.02 ^{NS}

遺伝的多様性の大きさは集団間で異なっており、ボルネオの2集団の多様性はマレー半島のいずれの集団よりも有意に低かった。 θ の平均値はマレー半島で0.00921、ボルネオでは0.00175であった。マレー半島集団では、分布の端に位置する海岸性丘陵林の集団 (Pulau Pangkor、Beserah、Tanjung Tuan、Bukit Timah、Batam、Bintan) で、その他の内陸集団よりも多様性が低かった。 θ の平均値はマレー半島の内陸林で0.01159、海岸林では0.00644であった。また、マレー半島の内陸集団の多くは g が0以上を示しており、過去に集団サイズが増加したことが示唆された。マレー半島の海岸沿い集団の多くは、 g の推定値が0付近にあり、これらの集団サイズは歴史的に大きく変動していないことが示唆された。これは、海岸に面した丘陵林は分布をさらに拡大することができないことから、森林面積が小さく、また他の森林とも隔離されていることが原因であると考えられる。

一方で、ボルネオの2集団の g はいずれも負であった。このことは、これらの集団が過去にボトルネックを経験した結果、遺伝的変異量が小さくなったことを示唆している。マイクロサテライト8遺伝子座のデータから集団ごとの近交係数 (F) を推定したところ、有意な近交係数の上昇はいずれの集団でも見られなかった (表(3)-7)。遺伝的多様性の低かったボルネオ集団でも、近親交配の増加による近交係数の上昇が見られなかったことから、近交弱勢によって近親交配個体の多くが成熟前に死亡し、集団から除去されていることが考えられた。

(4) *Shorea javanica*

*Shorea javanica*では葉緑体遺伝子3領域の変異を調べたが、塩基置換サイトは見つからず単型的であった。また、核遺伝子の3領域、合計2,203塩基対からも塩基置換サイトは6しか見つからなかった (表(3)-8)。核遺伝子領域のサイレント塩基多様度は0.00108-0.00113と推定され、*Shorea curtisii*を含む、他のフタバガキ科樹木の変異量の1/5程度しかなかった。また、4集団において近交係数が有意に正の値を示し、これらの集団では高い割合で近親交配が起こっていることが示唆された (表(3)-9)。遺伝的分化の程度はほとんどの集団間で低かったが ($F_{ST} < 0.03$)、Ogan Komering Ulu (Oku) 集団は他のものとの間に有意な遺伝的分化があった ($F_{ST} < 0.07-0.16$)。Oku集団は、スマトラ島西海岸沿いを走るバリサン山脈の東側に位置し、西側に位置する他の集団と隔離されている (図(3)-4)。この結果、これらの集団間では比較的高い遺伝的分化が観察されたと考えられる。前に述べたとおり、良質なダマールが採れるこの種は、その利用価値が高い。しかしながら、唯一残る自然集団であるKubu Perahu (Kp) 集団でも、遺伝的変異はほとんど見られなかった。

表(3)-8 *Shorea javanica*の塩基配列多様性の程度

Loci	Length (bp)	Population	N	S	H_d	($\times 10^{-3}$)		Tajima's D
						π_s	π_n	
GapC	751	Pa	32	2	0.571	0.94	0.48	1.557
		Gk	32	1	0.514	0.95	0.46	1.634
		Kp	30	2	0.662	1.50	0.93	1.235
		Be	30	1	0.480	0.89	0.47	1.408
		Oku	30	2	0.660	1.56	0.93	1.356
		Java	6	1	0.536	1.11	0.81	1.445
		Total	160	2	0.581	1.22	0.65	1.223
GBSSI	778	Pa	32	1	0.498	1.02	0.51	1.535
		Gk	32	3	0.508	1.25	1.53	-0.422
		Kp	30	1	0.508	1.04	0.52	1.578
		Be	30	1	0.257	1.06	0.53	1.623
		Oku	30	1	0.370	0.76	0.52	0.727
		Java	6	1	0.536	1.10	0.79	1.167
		Total	160	3	0.509	1.08	1.09	-0.009
PgiC	674	Pa	32	1	0.508	1.16	0.57	1.578
		Gk	32	1	0.484	1.10	0.56	1.448
		Kp	30	1	0.434	0.99	0.57	1.124
		Be	30	1	0.515	1.17	0.56	1.647
		Oku	30	1	0.370	0.84	0.57	0.727
		Java	6	1	0.536	1.22	0.88	1.167
		Total	160	1	0.499	1.13	0.40	1.915

表(3)-9 マイクロサテライトデータから推定された*Shorea javanica*各集団の遺伝的変異量を示すパラメーター

Population	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>r</i>	<i>F_{IS/IM}</i>
Pa	16	2.50	2.00	0.456	0.418	-0.050	-0.012	0.021 (0.025)
Gk	16	2.25	2.05	0.344	0.432	0.234 [†]	0.032	0.049 (0.056)
Kp	15	2.50	2.01	0.217	0.423	0.513 ^{**}	0.063 [†]	0.086 (0.093)
Be	15	2.50	2.12	0.179	0.476	0.647 ^{**}	0.090 [†]	0.118 (0.130)
Oku	15	2.50	2.14	0.183	0.438	0.604 ^{**}	0.088 [†]	0.061 (0.086)
Ja	3	2.50	1.83	0.313	0.352	0.250	<i>na</i>	0.080 (0.107)
Total	80	3.00	2.17	0.281	0.477	0.383 ^{**}	0.068	0.077 (0.151)

(5) *Dipterocarpus littoralis*

*Dipterocarpus littoralis*はヌサカンバンガン島内でも川沿いのみに分布し、成木の分布も非常にまばらである。成木18個体について、7マイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型を調べた結果、ヘテロ接合度は0.457、遺伝子座当たりの対立遺伝子数は3.2と推定され、他のフタバガキ科近縁種よりも小さいことがわかった（表(3)-10）。

表(3)-10 *Dipterocarpus littoralis*のマイクロサテライトデータから推定した遺伝的多様性パラメーター

Population	Number samples		Mean number alleles		<i>H_o</i>		<i>H_E</i>		<i>F</i>	
	Adults	Saplings	Adults	Saplings	Adults	Saplings	Adults	Saplings	Adults	Saplings
Kali Jati	5	30	2.571	3.857	0.514	0.448	0.449	0.479	-0.180	0.058
Selok Besek	13	41	3.857	4.000	0.473	0.418	0.464	0.456	-0.028	0.025
Average			3.214	3.929	0.493	0.433	0.457	0.468	-0.104	0.042

さらに各遺伝子座およびすべての遺伝子座をこみにした固定係数をもとめた（図(3)-11）。*F_{IS}*は稚樹集団（0.089）で成木集団（0.006）よりも高く、樹齢の増加に伴う近交弱勢が示唆された。成木では2集団間に有意な遺伝的分化は観察されなかったが（*F_{ST}* = 0.014, *P* > 0.05）、稚樹集団の分化は有意であった（*F_{ST}* = 0.077, *P* < 0.01）。このことから、成木の分布がまばらであるために互いの遺伝子交換が制限された結果、次世代集団の多くが同集団内成木間の交配に由来していることが考えられた。

表(3)-11 *Dipterocarpus littoralis*のマイクロサテライトデータから推定した固定指数

Locus	<i>F_{IS}</i>		<i>F_{IT}</i>		<i>F_{ST}</i>	
	Adults	Saplings	Adults	Saplings	Adults	Saplings
All loci	0.006 ns	0.089**	0.020 ns	0.159**	0.014 ns	0.077**
DT07	-0.118 ns	-0.036 ns	-0.155 ns	0.000 ns	-0.033 ns	0.035 ns
DT09	-0.111 ns	0.064 ns	-0.026 ns	0.108 ns	0.077 ns	0.047 **
DT18	0.019 ns	-0.011 ns	-0.027 ns	-0.004 ns	-0.046 ns	0.007 ns
DT20	-0.050 ns	-0.089 ns	-0.121 ns	-0.064 ns	-0.068 ns	0.022 ns
DT29	0.277 ns	0.170 *	0.330 ns	0.329 **	0.073 ns	0.193 **
DT35	0.213 ns	0.145 ns	0.158 ns	0.209 *	-0.069 ns	0.075 **
DT39	0.290 ns	0.126 *	-0.252 ns	0.160 *	0.030 ns	0.039 *

(6) チーク造林地

1) 結果

a. 階層構造

図(3)-15と表(3)-12に調査区T-43のM-w図と、M-w図により分けられた各調査区の階層数と毎木調査の結果をそれぞれ示す。一般にモノカルチャー林分においては階層構造が発達しない単層であるといわれているが、T-43において4層の階層が確認され、最も階層構造が発達していた。T-45、M-43-1、M-43-2、E-29、E-17においては3層、T-58、E-12、G-18においては2層が確認された。T-6においては階層構造が発達せず単層であった。全調査区間の比較において階層数はBA、最大個体重、総個体重、最大DBHのバイオマス量に関係するものと正の相関が見られ、階層が多いほどバイオマス量が多いという結果となった。また、林齢、個体密度、最大樹高との相関は見られなかった。また、樹種特性を考慮し、チーク林分のみにおいて同様の関係を検討したところ、同様の結果が得られた。調査された11林分のうち9林分では、階層構造を構成する樹種は植栽種であり、植栽種以外の樹種の侵入は希であった。M-43-1において第1層は植栽種であるマホガニー、第2層はマホガニーとチーク、第3層はチークによって構成されていた。またG-18においては先駆種の*Melaleuca spp.* が植栽種とともに第1層に、*Anacardium occidentale*が第2層に侵入しており、上記2つの調査区においては植栽種以外の樹種が侵入し階層を構成していた。

表(3)-12 階層構造と毎木調査結

Plot	Layers	Density	DBH	Hinght	BA
		[trees/ha]	[cm]	[m]	[m2/ha]
T-43	4	1538	18.5	15.0	58.2
T-6	1	822	13.9	10.9	12.6
T-36	2	611	20.9	15.9	23.1
T-45	3	211	43.6	31.3	32.3
T-58	2	155	50.0	33.5	30.7
M-43-1	3	344	32.7	20.3	42.2
M-43-2	3	1122	21.7	13.5	51.4
E-29	3	361	30.8	24.7	25.6
E-17	3	258	32.5	25.1	29.4
E-12	2	750	16.5	19.1	18.2
G-18	2	1578	14.5	15.6	29.8

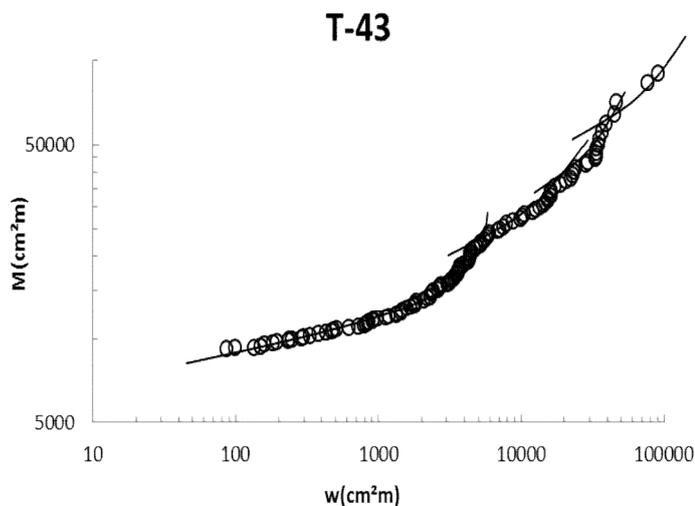
b. 個体密度と平均個体重の関係

階層毎の平均個体重、密度、BAを算出すると、どの調査区においても上層から下層にかけて各階層の平均個体重とBAは減少し、個体密度は高くなった。

ある個体群の利用できる空間資源の総和は有限であり、個体数の増加は個体あたりに配分される空間資源が減少を意味する。依田らは密度を変えて植栽された同種の個体群において、平均個体重(w)は密度(ρ)の3/2乗に反比例する(式(3))ことを明らかにし、それを自然間引きの3/2乗則とした(Yoda et al., 1963)²¹⁾。

$$w = A\rho^B \dots (3)$$

ここでのA, Bは線分ごとに決まる係数で、Bの値はほぼ1.5の値をとるとされる²¹⁾。調査林分の階層間において平均個体重と密度の関係を両対数グラフにプ

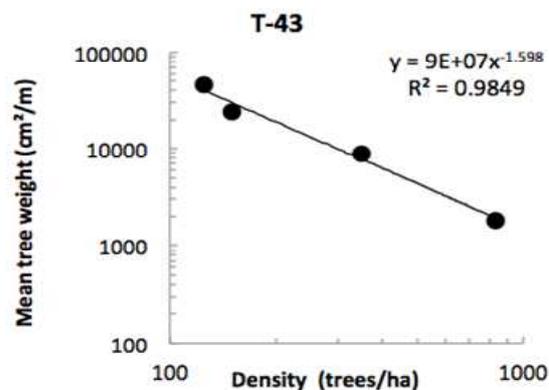


図(3)-15 階層構造

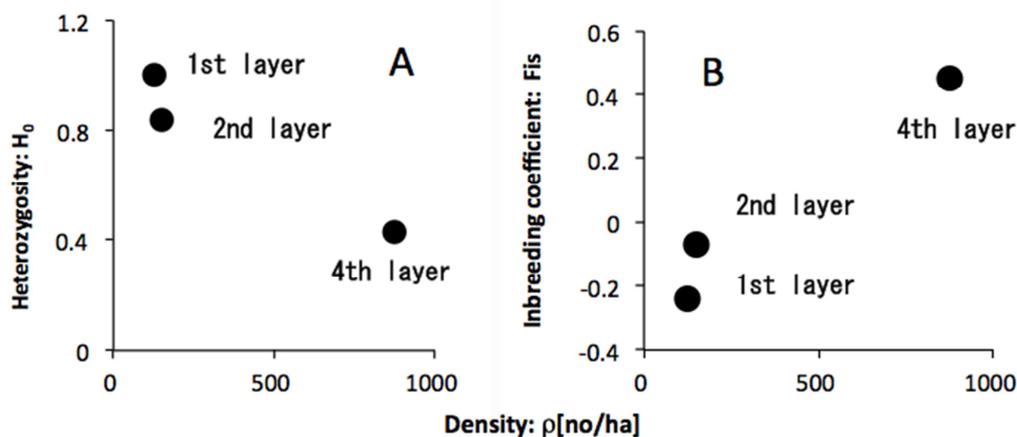
ロットし、式(3)によって回帰すると、T-43、T-36、M-43-2、E-29の階層間において自然間引きの3/2乗則に類似した関係がみられた(図(3)-16)。

c. 遺伝構造解析

サンプリングされた全個体の葉組織からのDNA抽出まで完了し、PCR増幅と遺伝子解析ソフトによる解析が現在進行中である。算出されたヘテロ接合度と近交係数とM-w図によって判別された階層との関係を検討する予定である。T-43において得られた結果を図(3)-17に示す。図(3)-17(A)は階層毎のヘテロ接合度、図(3)-17(B)は階層毎の近交係数の関係である。ヘテロ接合度は階層が上位であるほど高く、下位であるほど低くなった。近交係数は階層が上位であるほど低く、下位であるほど高くなった。



図(3)-16 T43における個体密度と平均個体重量



図(3)-17 T43における個体密度とヘテロ接合度(A)、および個体密度と近交係数(B)との関係

2) 考察

a. 階層構造

よく発達した天然林において、侵入、定着時期の異なる様々なサイズの個体や、多様な樹種構成によって階層構造が複雑になる。それらは光、温度、湿度などの環境因子に傾度を生じ、様々な生物に対してニッチを提供するため複雑な階層構造ができる。その結果、生態系として膨大な現存量や種多様性を維持していると考えられている。一方、調査された人工林において、階層構造の発達は見られたが、M-43-1、G-18を除いて、階層を構成する樹種は植栽種のみであり、サイズの異なる同種個体によって階層構造が生じていた。同種同齢のモノカルチャー林分においては資源、特に光資源を獲得するための種内競争が起こり、生長がよく適応度の高い個体が上層を優占し、適応度の低い個体を被圧した結果、階層構造が形成された。階層構造は非生物的環境要因に傾度を生じ、ニッチを提供するため、階層構造の発達した人工林において植栽種以外の生物種の生態系への侵入を可能にすると考えられる。人工林における植物種の定着には、植栽種の特徴(散

布型など)や植栽方法、種子源からの距離など様々な要因が影響する¹⁵⁾。なぜ調査された人工林においてDBH \geq 4cmの木本種の定着が希であったのか、本調査からは明らかではない。調査区を設置した人工林の林床では牧草 (*Pennisetum purpureum*) の植栽がおこなわれ、人口過密地域であるジャワ島特有の人為活動も、人工林における植物種の定着に何らかの影響を与えた可能性がある。

最も階層構造が発達したT-43において大径木の伐採痕と植栽後に天然更新したと思われる小径の個体が見られた。チークをはじめ、モノカルチャーに用いられる樹種は耐陰性の低い陽樹が一般的であるが、同調査区においては間伐による林床の光環境の改善が陽樹であるチークの天然更新を可能にさせ、階層構造を複雑にしたのではないかと考えられる。間伐等により人為的に階層構造を複雑に、植栽種の天然更新やあるいは他種の侵入・定着を可能にし、階層構造を複雑にさせることができるのではないかということを示唆している。また熱帯地域特有の高い太陽高度も、陽樹からなる森林の階層構造を発達させる要因ではないかと考えられる。

b. 個体密度と平均個体重の関係

どの林分においても上層から下層にかけて、各階層の平均個体重とBAは減少し、個体密度は高くなったが、これはつまり上層ほど個体数は少ないが、個体サイズが大きく、下層ほど個体数が多いが個体サイズが小さいということである。大きな個体ほど優占する空間は大きく、個体サイズの増大は密度効果として個体に影響した結果、上層では個体密度が低下し、個体サイズの小さい下層では高い個体密度となったと考えられる。興味深いことに、T-43、T-36、M-43-1、E-29の4つの林分の階層間において自然間引きの3/2乗則の関係がみられた。一般に自然間引きの3/2乗則は、自然間引きの起こっている植栽密度(個体密度)の異なる林分間(個体群間)にみられるが、本研究では人工林における階層間にそれらの法則がみられた。つまり、上記の林分は自然間引きの起こっている異なる個体密度の林分が同所的に存在している、と言い換えることができる。例えば2層からなる人工林は、低密度で個体サイズが大きい個体群(第1層)と、高密度で個体サイズの小さい個体群(第2層)という2つの異なる密度の個体群からなり、階層一つひとつは自己間引きをしている。調査された人工林は同種同齢個体群(コホート)であるから、植栽後の個体サイズの増加に伴い、コホートがサブ個体群(階層)へと分岐し、それが階層構造に発達した。階層構造の発達(サブ個体群への分岐)により個体密度を減らすことで、あるコホートが空間的棲み分けをしていると考えられる。階層数とBAの両者の関係に正の相関がみられたことも、これによって説明できる。

Yamakura²⁰⁾やFerozら⁵⁾はよく発達した天然林における階層間においても自然間引きの3/2乗則が確認されることを明らかにしている。それは自然間引きの3/2乗則がみられた人工林は、天然林と構造的特徴が類似していることを意味している。そのことは森林生態系内の構造的特徴に由来する非生物的環境要因(光や温度などの傾度)が類似し、それらは多様なニッチを他の生物種に提供している可能性があることを示している。しかし、階層構造を構成する種組成は単一で、多樹種から成る天然林とは全く異なっているため、提供されるニッチの多様性は大きく異なっているだろう。今後、単一樹種からなる人工林と天然林の構造的類似は、森林のもつ様々な機能にどのように影響するのかを明らかにし、より詳細な人工林生態系の評価を行うことが必要である。

c. 遺伝的構造

近親交配の度合いを表す尺度として用いられる近交係数は、適応度が高いと考えられる上位の階層ほど低くなった。またヘテロ接合度は上位階層ほど高くなった。これらの結果上位の個体は

ど適応度が高いという可能性を示した。今後は現在進行中の分析をおこない、データ数を増やし検討する予定である。

3) まとめと成果

本研究により、モノカルチャーの熱帯人工林は植栽種から構成される階層構造をもつことがわかった。いくつかの林分の階層間において自然間引きの3/2乗則がみられた。階層構造の発達には個体密度を減少させ、個体群がサブ個体群として分岐することで空間資源を有効利用し、空間的棲み分けをしていると考えられる。自然間引きの3/2乗則は天然林の階層間においても確認されており、上記の法則がみられる人工林生態系と天然林生態系は構造的に類似していると考えられる。この類似は人工林生態系が多様なニッチを提供していると考えられるが、階層構造を構成する種組成は全く異なっているため、提供されるニッチの多様性は低いだろう。これらの構造的類似は、森林のもつ様々な機能にどのように影響するのかを明らかにし、より詳細な人工林生態系の評価をしてゆくことが必要である。遺伝的構造は、階層構造の上層サブ個体群ほど適応度が高い事を示しており、同種同令の一斉人工林であっても、遺伝的に多様であるならば、少なくとも垂直構造は健全さを維持できることを示唆した。このことは、現実的な熱帯林修復再生方法である人工植栽において、遺伝的多様性の重要性を示している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

1) 熱帯林の遺伝的多様性

フタバガキ科の主要樹種数種についてボルネオ島、マレー半島、スマトラ島での遺伝的多様性の有り様が葉緑体および核DNAレベルで明らかになった。熱帯林は生物多様性が高い地域であると認識されてきたが、遺伝的多様性が同様に高いのかどうかについて詳しいデータがこれまでなかった。本研究により種内の遺伝的多様性の程度は温帯林と同程度であることが分かった。しかし、熱帯林では種多様性が高いことから属などの高次分類群では多様性が高くなることが考えられる。

2) 熱帯林の遺伝構造

フタバガキ科の主要樹種数種について集団の遺伝構造が明らかにされ、その地理的分布を示すことが出来た。集団ごとの遺伝的変異量に基づいて、新しい解析方法（LAMARCなど）を用いることによりクラスター間の遺伝子流動の方向性や集団の拡大、縮小の傾向を示すことができる。これらに基づいて種集団の適応地図を作製し、これに基づいた多様性や遺伝的分化に配慮した造林や森林の保全計画を立てることが出来る。

(2) 環境政策への貢献

東南アジア熱帯雨林のフタバガキ科樹種を中心にした樹木集団の遺伝的多様性及び遺伝構造が明らかになってきた。これによって、遺伝構造を踏まえた保全すべき林分の線引きが可能になり、また見出された変異そのものが種や産地の目印となり、育種にも適用できる遺伝子マーカーとして用いることが出来る。また、地域集団内において繁殖構造がどのように遺伝構造を規制するか

についての図式も明らかにされつつある。これをふまえて熱帯林の集団構造のモデル化を行った。このモデルによれば森林伐採や土地利用による森林の破壊（断片化、孤立化）は長時間の遺伝的変化（多様性の消失や近親交配の増加）を待つまでもなく、遺伝子流動の遮断や適応度の高い林分の消失により、急速に劣化が進むことが予想される。従って適応度の高い林分あるいは多様性の高い林分を見極め、遺伝子資源林として保全することが重要である。本研究の結果はこのような林分を特定する方法と、実質的なデータを提供するものである。また森林の遺伝構造は長時間を経て達成された多種共存の平衡状態の上に成立しており人工的にこれを復元することは難しい。森林修復は、普遍種、固有種、稀少種、絶滅危惧種など種の置かれた状況を判断し、それに応じた保全の方法を見極めたうえで行われる必要がある。すなわち、多様性造林の目的は失われた自然状態の復元ではなく、新しい価値をもった人工的な森林の造成であることもまた理解されるべきである。今後とも、ハビタットの遺伝的背景を考慮した、より適切な森林の保全や造林の方法を開発してゆき、それを広報し、普及に努めたい。

6. 国際共同研究等の状況

本研究は、以下の研究・教育機関との共同研究により実施された。

サラワク州森林公社	Lucy Chong, Bibian Diway
サバ州森林研究センター	Eyen Khoo, John Sugau, Joan Pereira
マレーシアプトラ大学	Mohamad Azani Alias, Nik Muhamad Majid
ボゴール農科大学	Iskandar Siregar
インドネシア森林局	Atok Subiakto
シンガポール国立教育研究所	Shawn Lum, Kang Min Ngo, Nik Faizu
シンガポール植物園	Wong Khoon Meng

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文（査読あり） >

- 1) K. KAMIYA, Y. Y. GAN, S. LUM, M. S. KHOO, S. C. CHUA AND N. FAIZU: *Tree Genetics & Genome* 7: 297–306 (2011)
“Morphological and molecular evidence of natural hybridization in *Shorea* (Dipterocarpaceae)”
- 2) E. S. POESIE, T. SHIMAMURA, S. E. PAGE, I. NINOMIYA, S. H. LIMIN: *Tropics*, 19, 93-105 (2011)
“Species Composition and Phylogenetic Diversity in a Tropical Peat Swamp Forest, Central Kalimantan, Indonesia”
- 3) E. S. POESIE, K. HAMAMOTO, K. MOMOSE, T. SHIMAMURA, S. E. PAGE, I. NINOMIYA, S. H. LIMIN: *Tropics* (in press)
“Fruiting phenology affected by seed preference and fluctuation of seed predator activity in a Tropical Peat Swamp Forest”
- 4) K. KAMIYA, S. NANAMI, T. KENZO, R. YONEDA, B. DIWAY, L. CHONG, M. A. AZANI, N. M. MAJID, S. K. Y. LUM, K. M. WONG, K. HARADA: *Biotropica* (in press)

“Demographic history of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variations”

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 原田光：林木の育種、No.232、pp.47-49（2009）
「熱帯林遺伝子研究の推進」
- 2) 原田光：月刊愛媛ジャーナル大学発産業行シリーズ（研究成果探訪）、5月号、pp.84-85（2010）
「熱帯林の遺伝子研究」
- 3) 上谷浩一：森林科学、第60号、p.39（2010）
「森林樹木の進化プロセスをはかる—遺伝子系統樹からわかること—」
- 4) 上谷浩一：森林科学、第62号、pp.3-7（2011）
「特集遺伝子から読み解く森林—熱帯アジア産樹木の進化と生物多様性に関するDNA研究」
- 5) 嶋村鉄也：日本熱帯生態学会ニューズレター、No.086、3-6（2012）
「インドネシアにおけるフィールドワーク」

（2）口頭発表（学会等）

- 1) 原田光：第19回日本熱帯生態学会公開シンポジウム 進化の目で見ると熱帯：多様性を育むメカニズム（2009）
「ダーウィンと分子進化、熱帯の遺伝的多様性を生むしくみ」
- 2) 上谷浩一、S.K. Shawn Y. Lum、G.Y. Yuen：第19回日本熱帯生態学会年次大会（2009）uen
「ショレア属種間雑種集団のDNA解析」
- 3) 岸本光樹、原田光：第19回日本熱帯生態学会年次大会（2009）
「葉緑体DNAを用いた*Dryobalanops*属（フタバガキ科）の系統地理学的研究」
- 4) 田中憲蔵、米田令仁、上谷浩一：第19回日本熱帯生態学会年次大会（2009）
「シンガポール孤立林におけるフタバガキ科雑種稚樹の葉の特性」
- 5) 上谷浩一、原田光、名波哲、田中憲蔵、米田令仁、B.Diway、L. Chong、M.A. Alias、N.M.Majid、S. Lum、K.M. Wong：第20回日本熱帯生態学会年次大会（2010）
「セラヤ (*Shorea curtisii*) 地域集団の葉緑体DNA多型」
- 6) 田中憲蔵、市栄智明、上谷浩一：第20回日本熱帯生態学会年次大会（2010）
「シンガポール断片化林におけるフタバガキ科雑種苗の光合成特性」
- 7) K. Kamiya, S. K. Shown S、 K. Y. Lum, K. Harada. The 2010 annual international meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation (ATBC), Bali (2010)
“Hybridization in *Shorea* species and its consequences”
- 8) K. Harada, K. Kamiya, S. Nanami, K. Tanaka, R. Yoneda, B. Diway, L. Chong, M. A. Alias, N.M. Majid, S.K. Shawn, Y. Lum, K.M. Won：4th Rispescia and 3rd GEN Network International Seminar Sustainable Bio-Resources for Global Welfare（2010）
“Chloroplast DNA polymorphism in the local populations Seraya (*Shorea curtisii* Dyer)”
- 9) H.H. Rachmat, I.Z. Iskandar, Supriyanto, K. Kamiya, K. Harada: 4th Rispescia and 3rd GEN Network International Seminar Sustainable Bio-Resources for Global Welfare（2010）

“Molecular variation of some endangered species in Indonesia”

- 10) 岸本光樹、原田光、上谷浩一、荒木智哉、旗谷章子、Lucy CHONG、Bibian DIWAY、Joseph Jawa KENDAWANG、John SUGAW、Eyen KHOO：日本生態学会第58回大会（2011）
「葉緑体DNA変異に基づく*Dryobalanops*属の系統地理学的研究」
- 11) 田中憲蔵、米田令仁、佐野真琴、上谷浩一、名波哲、Shawn LUM、則近由貴、市栄智明：第122回日本森林学会大会（2011）
「シンガポールの断片化された熱帯林におけるフタバガキ雑種稚樹の分布」
- 12) 武市泰典、原田光、上谷浩一、B. Diway、L. Chong、J. Kendawang、E. Khoo、J. Sugau、J. Perira：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「ボルネオにおける*Shorea*属*Pachycarpae*節の葉緑体DNAに基づいた系統地理学的研究」
- 13) 上谷浩一、H.H. Rachmat、原田光、名波哲、田中憲蔵、米田令仁、B. Diway、L. Chong、M.A. Aliash、N.M. Majid、S. Lum、K.M. Wong：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「セラヤ (*Shorea curtisii*) 地域集団の核DNA配列多型」
- 14) 原田光、花田真美、上谷浩一、B. Diway、L. Chong、J.J. Kendawang、E. Khoo、J. Sugau：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「フタバガキ科リュウノウジュ属6種の核遺伝子を用いた系統解析」
- 15) 田中憲蔵、佐野真琴、米田令仁、上谷浩一、名波哲、S. Lum、則近由貴、市栄智明：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「シンガポールの断片化熱帯林におけるフタバガキ科雑種稚樹の生育環境」
- 16) 岸本光樹、原田光、上谷浩一、荒木智哉、旗谷章子、L. Chong、B. Diway、J.J. Kendawang、J. Sugau、J. Perira、E. Khoo：第21回日本熱帯生態学会（2011）
“Phylogeographic study of genus *Dryobalanops* (Dipterocarpaceae) based on chloroplast DNA variation”
- 17) 嶋村鉄也、E. Poesie、藤巻玲路：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「熱帯泥炭湿地林における種多様性と一次生産量と現存量の関係」
- 18) 二宮生夫、嶋村鉄也、柳井彰人、B. Suparno：第21回日本熱帯生態学会（2011）
「インドネシア、中部ジャワ、ワナガマ地域における人工林の林分構造」
- 19) 原田光、上谷浩一、ビビアン・デワイ、ルーシー・チョン、ジョセフジャワ・ケンダワン：第83回日本遺伝学会（2011）
「核遺伝子をもちいたマレーシア熱帯雨林リュウノウジュ属（フタバガキ科）の集団遺伝学的解析」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

- 1) 遺伝子から見た熱帯林—消え行く熱帯林は救えるか？（2011年12月17日、大阪市立大学文化交流センター・ホール、観客40名）

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **10**, 1657-1660.
- 2) Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- 3) Excoffier L, Smouse PE (2000) Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. *Genetics*. 136: 343-359.
- 4) FAO(2010) Forest Recourses Assessment 2010
- 5) Feroz SM, Yoshimura K, Hagihara A (2008) Stand stratification and woody species diversity of a subtropical forest in limestone habitat in the northern part of Okinawa Island. *Journal of Plant Research* 121:329-337
- 6) Feroz S, M, Hagihara A, Yokota M (2006) Stand structure and woody species diversity in relation to the stand stratification in a subtropical evergreen broadleaf forest, Okinawa Island. *Journal of Plant Research* 119:293-301
- 7) Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids*. 41: 95-98
- 8) Hozumi K (1975) Studies on the frequency distribution of the weight of individual trees in a forest stand V. The M-w diagram for various types of forest stands. *Japanese Journal of Ecology* 25(3):123-131.
- 9) Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP (1992) Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132, 583-589.
- 10) Ishii H, Tanabe S, Hiura T (2004) Exploring the relationship among canopy structure, stand productivity and biodiversity of temperate forest ecosystems. *For.Sci.*, 50,342-355.
- 11) Jones CG, Lawton JH, Shachak M (1994) Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, 69, 373-386
- 12) Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452
- 13) Lindenmayer DB, Franklin JF (2002) *Conserving forest biodiversity: A comprehensive multiscaled approach*, Island Press.
- 14) Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- 15) Parrotta JA (1995) Influence of overstory composition on understory colonization by native species in plantations on a degraded tropical site. *J. Veg. Sci.* 6:627-636
- 16) Saitou N, Nei M (1987) The neighbor joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425
- 17) Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

- (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- 18) Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
- 19) Watterson G (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.*, **7**, 256-276
- 20) Yamakura T (1988) An empirical approach of the analysis of forest stratification. II. Quasi $-1/2$ power law of tree height in stratified forest communities. *Bot Mag Tokyo* 101:153-162
- 21) Yoda K, Kira T, Ogawa H, Hozumi K (1963) Self-thinning in over-crowded pure stands under cultivated and natural conditions (intraspecific competition among higher plants XI). *Journal of Osaka City University* 14:107-129
- 22) 長池卓男(2000) 人工林生態系における植物種多様性 日林誌 82:407-416
- 23) 武田博清(1994) 生態系生態学における群集研究—森林生態系の提供する「食物・住み場所」テンプレート。森林科学、10, 35-39

(4) 遺伝的劣化評価 2-種及び地域識別遺伝子マーカー開発と広域集団の解析

独立行政法人森林総合研究所

森林遺伝研究領域 樹木遺伝研究室 津村義彦

<研究協力者>

愛媛大学農学部 原田 光
上谷浩一

平成21～23年度累計予算額：33,623千円

(うち、平成23年度予算額：10,582千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 東南アジアで優占しているフタバガキ科樹木のうち生態的にも林業的にも重要な *Shorea* 属について葉緑体DNAの塩基配列を用いて種識別を行った。その結果、収集した98%の種の識別が可能であることが明らかとなった。東南アジア広域（インドネシア、マレーシア）から広域分布種である *Shorea leprosula* の27集団サンプルを収集した。葉緑体で種内多型が見られた5領域の塩基配列を解読し、27のハプロタイプを検出することができた。これらのハプロタイプの分布はカリマンタンとその他（マレー半島とスマトラ島）で大きく異なっていた。またカリマンタン内でもハプロタイプの分布に違いが見られ、東部でより遺伝的多様性が高い傾向があった。またマレー半島とスマトラ島では北部の集団の方が遺伝的多様性が高かった。また F_{ST} は0.649と高い遺伝的分化を示した。これらの結果から、カリマンタン島とその他を識別することは可能であるが、特定の集団を識別することが現段階では容易でないことが明らかとなった。また核DNAのEST-SSR遺伝子座を用いた解析結果は、葉緑体DNAの結果とよく似ており、カリマンタンとその他が明瞭に遺伝的に分化していたが、その遺伝的分化係数 F_{ST} は0.0671と低い値を示した。同様に広域分布種である *S. parvifolia* は13集団をスマトラ島、マレー半島、ボルネオ島から収集した。葉緑体DNAの解析結果では25のハプロタイプを検出し、 F_{ST} は0.499と高い遺伝的分化を示した。またEST-SSR14遺伝子座で解析した結果は F_{ST} が0.16であった。またボルネオ島とその他が遺伝的に分化していたが、*S. leprosula* ほど明瞭には分化していなかった。また集団特異的な変異は少なく、個々の集団を識別するほどの遺伝的な違いは見られなかった。これら2種ともボルネオ島とその他で明瞭な遺伝的分化が見られ、一部の集団では遺伝的多様性が高い集団も見られた。

[キーワード] フタバガキ科、種識別、広域分布種、遺伝的多様性、地域分化

1. はじめに

種多様性及び遺伝子資源の宝庫であると言われている熱帯林も急速な開発とともに、その森林面積は減少の一途をたどってきた。熱帯林では種多様性の減少にとどまらず、種が長い時間をかけて蓄積してきた遺伝的多様性の消失も引き起こしている可能性がある。現在でも残った森林は

その断片化により、種多様性の減少が起こり生態系としての十分な機能さえもなくしている可能性がある。このような森林生態系は遺伝的な多様性も減少し、容易に衰退するため、健全な森林が失われてしまうことが危惧される。遺伝子資源としても貴重な熱帯林の質の低下をこれ以上引き起こさないためにも、また将来にわたって進化する可能性を含んだ遺伝的多様性を維持するために適切な保全方法が望まれている。

DNAによる種識別や地域識別が可能になれば、材の起源が明らかにできる可能性があり、木材の認証にも役立てることができるようになる。また遺伝的多様性のホットスポットが明らかになることによって、遺伝的多様性の保全策を立てることにも可能である。

2. 研究開発目的

本研究では東南アジア地域で優占している樹種で生態的にも林業的にも重要であるフタバガキ科のうち最も大きなグループである *Shorea* 属を対象に葉緑体DNAを用いた種識別を行う。また *Shorea* 属で広域分布種である2種を対象として、東南アジア各国と協力しDNAレベルでの大規模な系統地理学的研究を行ない、DNAによる産地識別の可能性について調査する。またそれぞれの地域の保有する遺伝的な特徴を明らかにし、遺伝的多様性の成立機構を明らかにし、遺伝的多様性の保全の観点から重要な森林を明らかにする。

3. 研究開発方法

(1) 種識別のための材料の収集

フタバガキ科のなかでも種数が最も多く生態的にも林業的にも重要な *Shorea* 属について、インドネシア及びマレーシアの植物園、樹木園及び天然林から DNA 抽出用の葉組織を収集した。収集したサンプルの多くについては標本も作成した。合計で 84 種、200 個体について収集した。

(2) 種識別のための葉緑体 DNA の解析

これまでの研究で種識別が比較的容易な葉緑体 DNA の 4 つの遺伝子間領域 (*trnL* intron, *trnL-trnF*, *trnH-trnK*, *psbC-trnS*) を用いて塩基配列の解読を行った。PCR の条件は 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin, 9.1mM dNTP, 100 pmol プライマー, 0.2μg DNA, 2.5u Taq ポリメラーゼの反応液で 94°C 5 分後、94°C 1 分、55-60°C 1 分、72°C 2 分で 35 サイクル行い、最後に 72°C 5 分反応させた。得られた PCR 産物を生成し、シークエンス反応を行って、オートシークエンサーABI PRISM. 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の解読を行った。

得られた塩基配列データを用いて系統樹を近隣接合法を用いて構築した。この際に外群として *Vatica bella*, *V. oblongifolia*, *Anisoptera laevis* 及び *Cotylelobium lanceolatum* を用いた。またその際に材色での分類であるレッドメランティ、イエローメランティ、ホワイトメランティ、バラウが単系統であるかどうかの確認を行った。この分岐結果の信頼性を 1000 回のブートストラップ解析を行って調査した。これら 4 つの材色の分類がそれぞれ単系統である場合は、これらを識別する塩基サイトを調べた。また輸入する際に関税率が異なる *Shorea albida* についても他の *Shorea* 属樹種と識別できる塩基を調査した。

(3) 地域識別のための広域分布種の収集

東南アジアのフタバガキ科のなかで広域に分布し、しかも比較的個体密度が多い *Shorea leprosula* 及び *S. parvifolia* についてインドネシア及びマレーシアの広域から材料の収集を行った。*S. leprosula* はマレー半島、ボルネオ島、スマトラ島、ジャワ島で27集団を収集した。*S. parvifolia* は同様に4地域で13集団を収集した。

(4) 地域識別のための葉緑体 DNA 解析

葉緑体 DNA の中で地域識別が可能な多型的な領域探索のために17の遺伝子間領域のスクリーニングを行った。このスクリーニングには *S. leprosula* についてはマレー半島の2個体とボルネオ島の2個体の合計4個体を用いて行った。*S. parvifolia* についても同様に4個体を用いてスクリーニングを行った。*S. leprosula* では葉緑体 DNA で種内多型が見られた5領域 (*trnD-trnT*, *petB* intron, *petL-psbE*, *psbJ-petA*, *rps16-trnK*) の塩基配列を用いて採取した集団の解析を行った。また *S. parvifolia* では種内多型が見られた2領域 (*psbJ-petA*, *trnQ-rps16*) の塩基配列を用いて採取した集団の解析を行った。PCR の条件は 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.01% gelatin, 9.1mM dNTP, 100 pmol プライマー, 0.2µg DNA, 2.5u Taq ポリメラーゼの反応液で 94°C 5分後、94°C 1分、55-60°C 1分、72°C 2分で35サイクル行い、最後に72°C 5分反応させた。得られたPCR産物を生成し、シークエンス反応を行って、オートシークエンサーABI PRISM. 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の解読を行った。

(5) 地域識別のための核 EST-SSR の開発と集団解析

遺伝解析用のマーカーとしてcDNAライブラリーで得られたExpressed Sequence Tag (EST)配列情報を用いてEST-SSRマーカー40遺伝子座を開発した (Ng et al. 2009, Ohtani et al. 2012)。*S. leprosula* の24集団を、34遺伝子座のEST-SSRで解析した。また *S. parvifolia* については収集した13集団を14遺伝子座のEST-SSRで解析した。EST-SSR解析は以下のPCR条件で行った。10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 mM 各dNTP, 0.128µM 各プライマー, 12.5ngの鋳型DNAと0.5 units のTaqポリメラーゼ。94°Cで3分に続いて94°Cで45秒, 55-60°Cで30秒, の後72°Cで45秒を35サイクル行った後、72°Cで3分を行った。これらは GeneAmp PCR System Model 9600または9700(Perkin-Elmer ABI Co. Ltd)を用いて行った。その後、ハイダイホルムアミド10µlとサイズマーカーROX400HD (Applied Biosystems) 0.15µlをよく混合した液に、各マイクロサテライト遺伝子座のPCR産物0.5µlを加えた。それを95°Cで2分熱変性を行った後、氷上で急冷しヒートショックを行った。PCR産物の断片長の決定はオートシークエンサーABI PRISM. 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。検出されたPCR産物はGene Scan Analysis Ver.3.7 (Applied Biosystems)、Genotyper Ver.3.7 (Applied Biosystems) により解析を行い、遺伝子型を決定した。

4. 結果及び考察

(1) 種識別のための材料の収集

表(4)-1 フタバガキ科で最も大きな属である *Shorea* 属の種について、マレーシア森林研究所樹木園、サバ森林研究センター樹木園、サラワク州ランビル国立公園及び天然林から収集を行った。またドイツのゲッチンゲン大学が収集したサンプルについても分譲を受け解析を行った。

表-1 種識別で収集した材料					
属	種	材分群でのグループ名	Section no. ¹	採取地または起源	国と地域
<i>Shorea</i>	<i>atrinerrosa</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>atrinerrosa</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>biawak</i>	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>biawak</i>	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>biawak</i>	Balau	1b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>collina</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>crassa</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>domatosa</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>falcifera</i>	Balau	1a	Koh Moi	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>falciferoides</i>	Balau	1a	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>foxworthyi</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>guiso</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>havilandii</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>havilandii</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>havilandii</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>inappendiculata</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>isoptera</i>	Balau	3	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>laevis</i>	Balau	1b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>laevis</i>	Balau	1b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>laevis</i>	Balau	1b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>materialis</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>materialis</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>materialis</i>	Balau	1a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>maxwelliana</i>	Balau	1b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>obscura</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ochrophloia</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>seminis</i>	Balau	1a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>sumatrana</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>sumatrana</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>sumatrana</i>	Balau	1a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>superba</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>superba</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>superba</i>	Balau	1a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>acuminata</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>acuminata</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>acuminata</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>acuminata</i>	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>actua</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>actua</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>actua</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>actua</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>albida</i>	Red Meranti	6	Forest Research Centre Sarawak	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>albida</i>	Red Meranti	6	Forest Research Centre Sarawak	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>almon</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>almon</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>almon</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>amplexicaulis</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>amplexicaulis</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>andulensis</i>	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>argentifolia</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>beccariana</i>	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>bullata</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>curtisi</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>curtisi</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>dasyphylla</i>	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>dasyphylla</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>fallax</i>	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>ferruginea</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ferruginea</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>flaviflora</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>johorensis</i>	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>kunstleri</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>kunstleri</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>kunstleri</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>lepidota</i>	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>leprosula</i>	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>leprosula</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>leprosula</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>leprosula</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>leprosula</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macrophylla</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macrophylla</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macrophylla</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macrophylla</i>	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>macrophylla</i>	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i>	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i>	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i>	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i>	Red Meranti	9a	Plot, Deramakot FR	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>baillonii</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>baillonii</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>macropterifolia</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>macropterifolia</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>sandakanensis</i>	Red Meranti	9a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>macroptera</i> ssp. <i>sandakanensis</i>	Red Meranti	9a	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>meclistopteryx</i>	Red Meranti	8	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>meclistopteryx</i>	Red Meranti	8	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia

¹ Ashton (1982), 1: *Shorea* (1a; *Shorea*, 1b; *Barbata*), 2: *Pentacme*, 3: *Nchoopca*, 4: *Richtioides* (4a; *Polyandrac*, 4b; *Richtioides*); 5: *Anthoshorea*, 6: *Rubella*, 7: *Brachypterae* (7a; *Smithiana*, *Brachypterae*), 8: *Pachycarpae*; 9: *Mutica* (9a; *Auriculatae*, 9b; *Mutica*) and 10: *Ovalis*

表-1 種識別で収集した材料(つづき)					
属	種	材分種でのグループ名	Section no.¹	採取地または起源	国と地域
<i>Shorea</i>	<i>ovalis</i>	Red Meranti	10	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ovalis</i>	Red Meranti	10	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ovalis</i>	Red Meranti	10	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>ovata</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>palosapis</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvifolia</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvifolia</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvifolia</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvifolia</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvifolia</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvistipulata</i>	Red Meranti	7b	Domingo trail, Deramakot FR	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>parvistipulata</i>	Red Meranti	7b	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pauciflora</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pauciflora</i>	Red Meranti	7b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pauciflora</i>	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>pauciflora</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pitosa</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pitosa</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pitosa</i>	Red Meranti	8	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pinanga</i>	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>platyclados</i>	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>platyclados</i>	Red Meranti	7b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>platyclados</i>	Red Meranti	7b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>platycarpa</i>	Red Meranti	9b	Sungai Karang	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pubisyla</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>quadrinervis</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>quadrinervis</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>quadrinervis</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rubra</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rubra</i>	Red Meranti	9b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rugosa</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>scaberrima</i>	Red Meranti	7b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>singawang</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>singawang</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>singawang</i>	Red Meranti	9b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>slootenii</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>slootenii</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>slootenii</i>	Red Meranti	9a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Forest Research Centre arboretum	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>smithiana</i>	Red Meranti	7a	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>splendida</i>	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>splendida</i>	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>stenoptera</i>	Red Meranti	8	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>teymanniana</i>	Red Meranti	9b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>ugami</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ugami</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>assamica</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>assamica</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>assamica</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>bracteolata</i>	White Meranti	5	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>bracteolata</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>confusa</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>confusa</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>confusa</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>henryana</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>javamica</i>	White Meranti	5	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>ochracea</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ochracea</i>	White Meranti	5	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ochracea</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>ovata</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rosburghii</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rosburghii</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rosburghii</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rosburghii</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>rosburghii</i>	White Meranti	5	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>symingtonii</i>	White Meranti	5	Domingo trail, Deramakot FR	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>virscens</i>	White Meranti	5	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>virscens</i>	White Meranti	5	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>acuminatissima</i>	Yellow Meranti	4b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>acuminatissima</i>	Yellow Meranti	4b	PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Shorea</i>	<i>acuminatissima</i>	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>acuminatissima</i>	Yellow Meranti	4b	Domingo trail, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>faguetiana</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>faguetiana</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>faguetiana</i>	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>faguetioides</i>	Yellow Meranti	4b	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>gibbosa</i>	Yellow Meranti	4b	Plot, Deramakot forest reserve	Sabah, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>longiflora</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>longiflora</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>longisperma</i>	Yellow Meranti	4b	Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>maxima</i>	Yellow Meranti	4b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>maxima</i>	Yellow Meranti	4b	Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>musangensis</i>	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>patiensis</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>patiensis</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>patiensis</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>patiensis</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Shorea</i>	<i>pelata</i>	Yellow Meranti	4b	Georg-August University of Goettingen	Indonesia
<i>Shorea</i>	<i>xanthophylla</i>	Yellow Meranti	4b	Lambir Hills National Park	Sarawak, Malaysia
<i>Hopea</i>	<i>dryobalanoides</i>			Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Hopea</i>	<i>mengaravun</i>			Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Hopea</i>	<i>mengaravun</i>			PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Hopea</i>	<i>mengaravun</i>			PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Neohalanocarpus</i>	<i>heimii</i>			Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Vatica</i>	<i>bellii</i>	Out group		Forest Research Institute Malaysia	Peninsular, Malaysia
<i>Vatica</i>	<i>oblongifolia</i>	Out group		PT Sari Bumi Kusuma	Indonesia, Kalimantan
<i>Anisoptera</i>	<i>laevis</i>	Out group		Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia
<i>Caylebium</i>	<i>lancoletum</i>	Out group		Forest Research Institute Malaysia arboretum	Peninsular, Malaysia

¹ Ashton (1982), 1: Shorea (1a: Shorea, 1b: Barbata), 2: Pentacme, 3: Neohopea, 4: Richetioides (4a: Polyantrae, 4b: Richetioides), 5: Anthoshorea, 6: Rubella, 7: Brachypterae (7a: Smithiana, Brachypterae), 8: Pachycarpae, 9: Mutica (9a: Auriculatae, 9b: Mutica) and 10: Ovalis

(2) 種識別のための葉緑体 DNA の解析

Shorea 属の 84 種、200 個体について葉緑体 DNA の 4 領域 (*trnL* intron (506bp)、*trnL-trnF* (441bp)、*trnH-trnK* (1780bp)、*psbC-trnS* (1559bp)) の塩基配列を解読した。合計で 4286bp の塩基配列データを得ることができた。これらの塩基情報は日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した。種を識別する多型サイトはイエローメランティの 17 サイトからレッドメランティの 128 サイトの範囲で塩基配列が長くなるほど多型サイトが多くなる傾向があった (表(4)-2)。各材色グループ内での塩基多様度はホワイトメランティで最も高く、イエローメランティが最も低かった (表(4)-3)。このデータでは材の分類で言われている Red Meranti、Yellow Meranti、White Meranti、Balau の 4 つのグループは明瞭に識別が可能であった^{1), 2)}。

表(4)-2 材色の分類ごとの多型サイト数

グループ	<i>trnL</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnH-psbA-trnK</i>	<i>psbC-trnS</i>	合計
	506 bp	441 bp	1780 bp	1559 bp	
ホワイトメランティ	11 (4, 7)	14 (0, 14)	42 (7, 35)	39 (4, 35)	106 (15, 91)
イエローメランティ	3 (2, 1)	4 (1, 3)	5 (3, 2)	5 (4, 1)	17 (10, 7)
バラウ	7 (2, 5)	18 (6, 12)	35 (24, 11)	41 (12, 29)	101 (44, 57)
レッドメランティ	11 (7, 4)	26 (9, 17)	48 (27, 21)	43 (30, 13)	128 (73, 55)

表 4(4)-3 材色グループごとの葉緑体 DNA の 4 領域の塩基多様度

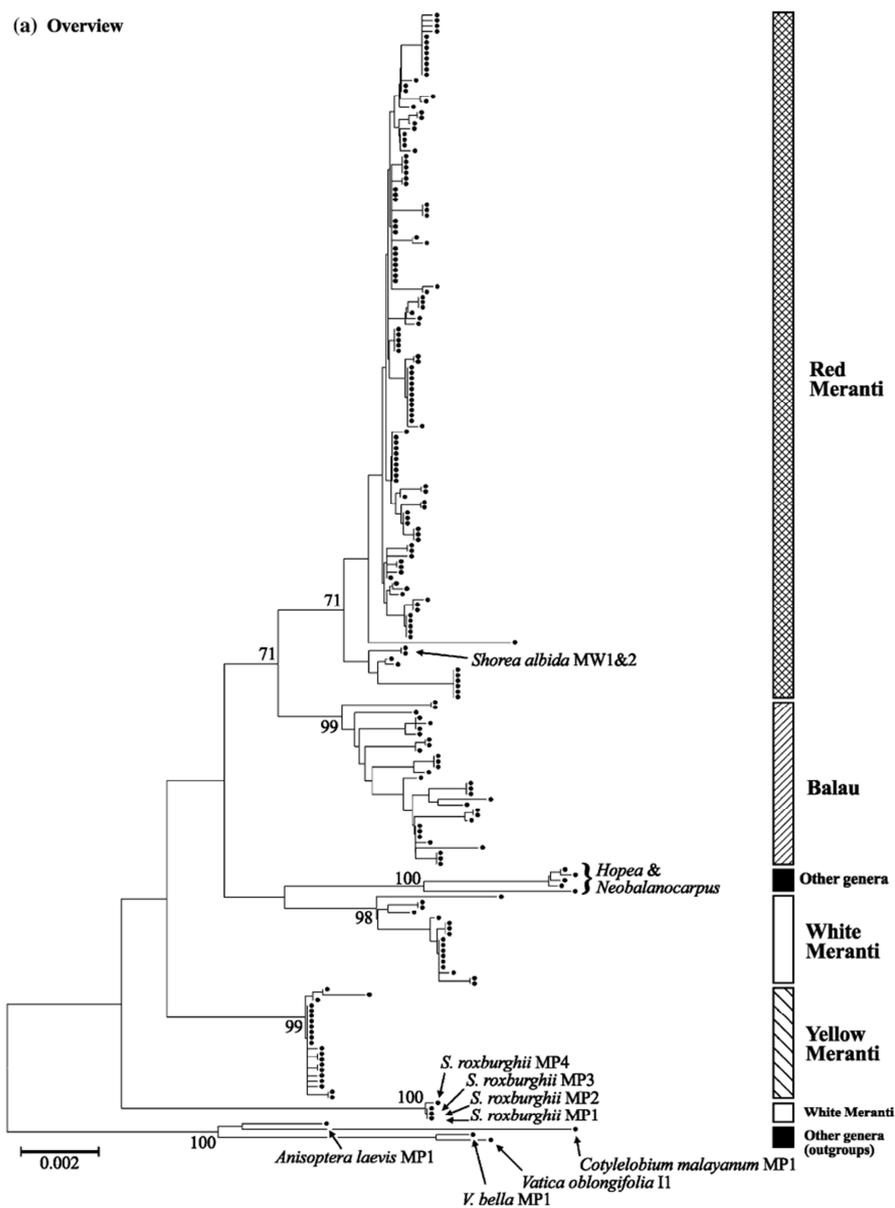
グループ	<i>trnL</i> (S.D.)	<i>trnL-trnF</i> (S.D.)	<i>trnH-psbA-trnK</i> (S.D.)	<i>psbC-trnS</i> (S.D.)
ホワイトメランティ	0.00468 (0.00098)	0.01043 (0.00194)	0.00679 (0.00148)	0.00555 (0.00161)
イエローメランティ	0.00075 (0.00030)	0.00164 (0.00039)	0.00060 (0.00013)	0.00037 (0.00022)
バラウ	0.00176 (0.00050)	0.00674 (0.00097)	0.00282 (0.00050)	0.00418 (0.00048)
レッドメランティ	0.00149 (0.00019)	0.00515 (0.00052)	0.00142 (0.00024)	0.00129 (0.00027)

表 4(4)-3 材色グループを識別する塩基

グループ	<i>trnL</i> (bp)					<i>trnL-trnF</i> (bp)							<i>trnH-psbA-trnK</i> (bp)					
	190	214	285	296	358	17	52	203	220	245	269	300	92	637	1416	1509	1532	1681
ホワイトメランティ	C	T	T	T	T	G	C	A	C	T	C	C	C	A	C	G	C	T
イエローメランティ	T	G	C	G	T	G	C	G	T	G	G	T	T	G	A	G	A	T
バラウ	C	T	C	T	A	G	T	G	C	T	C	T	T	T	G	C	T	C
レッドメランティ	C	T	C	T	T	A	C	G	C	T	C	T	T	T	G	C	G	C
グループ	<i>psbC-trnS</i> (bp)																	
	74	109	484	526	637	655	709	766	1139	1378	1394	1414	1445	1553				
ホワイトメランティ	C	C	C	G	T	G	C	T	A	A	T	A	C	G				
イエローメランティ	T	C	C	A	T	T	T	T	A	T	T	A	T	A				
バラウ	C	C	T	A	C	T	T	C	A	T	T	G	C	G				
レッドメランティ	C	T	T	A	T	T	T	T	T	T	C	A	C	G				

またそれらの分岐のブートストラップ値も高い値を示した (図(4)-1)。系統解析の結果、材色での 4 グループは *S. roxburghii* を除いて単系統であることが支持された (図(4)-2)。それらを識別する塩基サイトはホワイトメランティ、イエローメランティ、レッドメランティ、バラウでそれぞれ 9、11、6、5 の塩基サイトが存在した (表(4)-4)。また 4 つの材色のグループの分岐はそれぞれ 99、61、64 のブートストラップ値を示した。それぞれのグループ内で同一の塩基配列を示した種も存在した (図(4)-3)。セクション *Pachycarpae* に属する *S. amplexicaulis*、*S. pilosa*、*S. splendida*、*S. stenoptera*、*S. macrophylla* は同一の塩基配列を持っていた。また異なるセクションに属する種が同一の塩基配列をもつものもあった ((i) *S. smithiana* (MS3)、*S. slootenii* (MW3)、*S. leprosula*

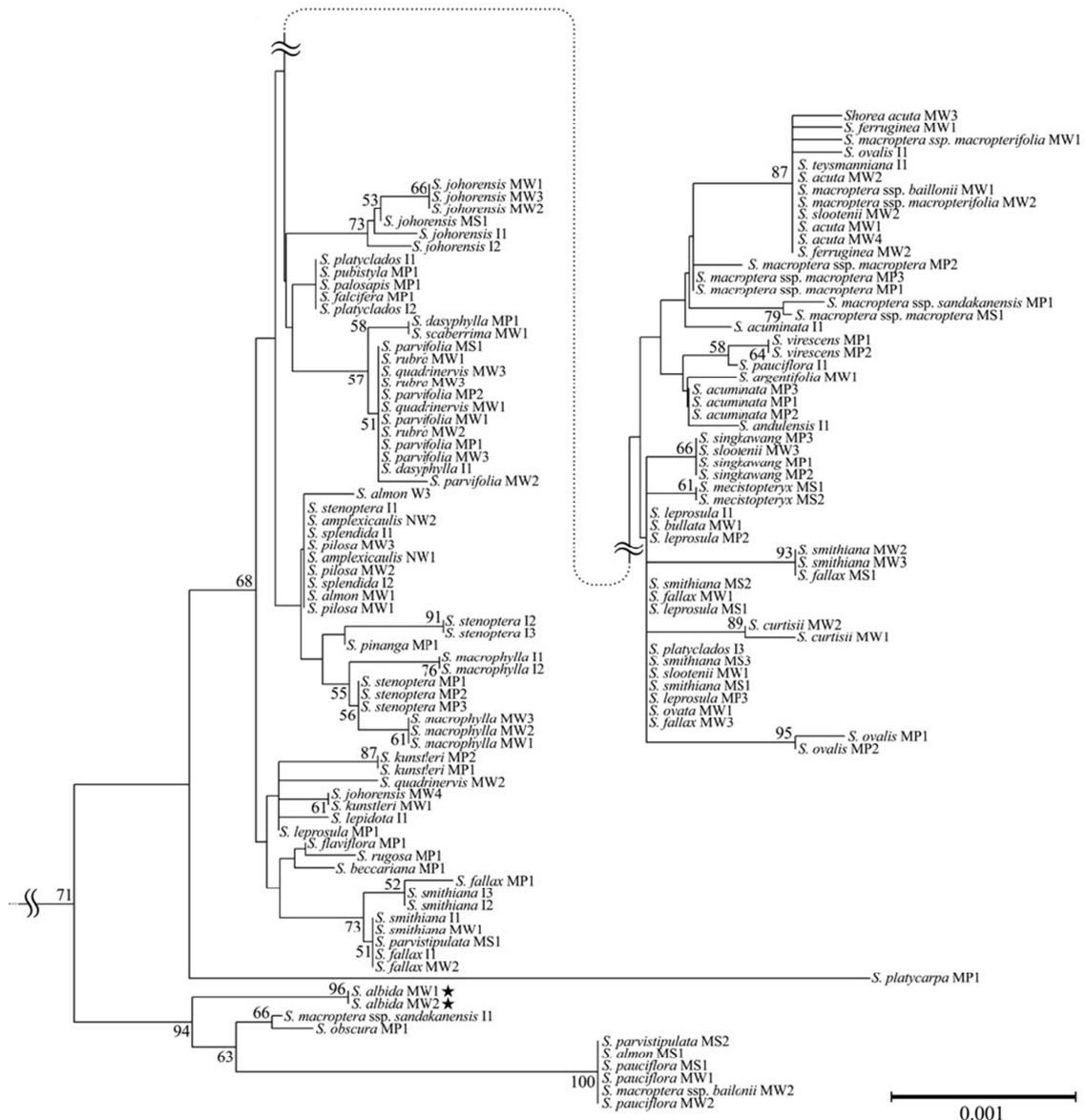
(MP3) and *S. fallax* (MW1) (ii) *S. smithiana* (MS1), *S. leprosula* (MS1), *S. fallax* (MW1), *S. bullata* (MW), *S. leprosula* (MP3), *S. platyclados* (I), and *S. smithiana* (MS2).)。これらの種は2つのセクション *Brachypterae* と *Mutica* に属し、両セクションともレッドメランティであった。多く種の種内で複数の葉緑体ハプロタイプが見られた。いくつかの種は他種と葉緑体ハプロタイプを共有していたが、その中でもレッドメランティに属するものはその関係が複雑であった。しかし、葉緑体ハプロタイプは材の識別グループを越えて共有することはなかった。調査した塩基配列で *S. albida* と他の *Shorea* 種を識別する2つの塩基が見つかった (*trnH-psbA-trnK* の11番目と1225番目の塩基)。種間で同じ塩基配列を持つものも存在し、それらは種間の組み合わせで1.64%存在したが、ほとんどの種は識別可能であった。また種内多型の存在も明らかな複数個体を用いた47種のうち28種で種内多型が確認された。



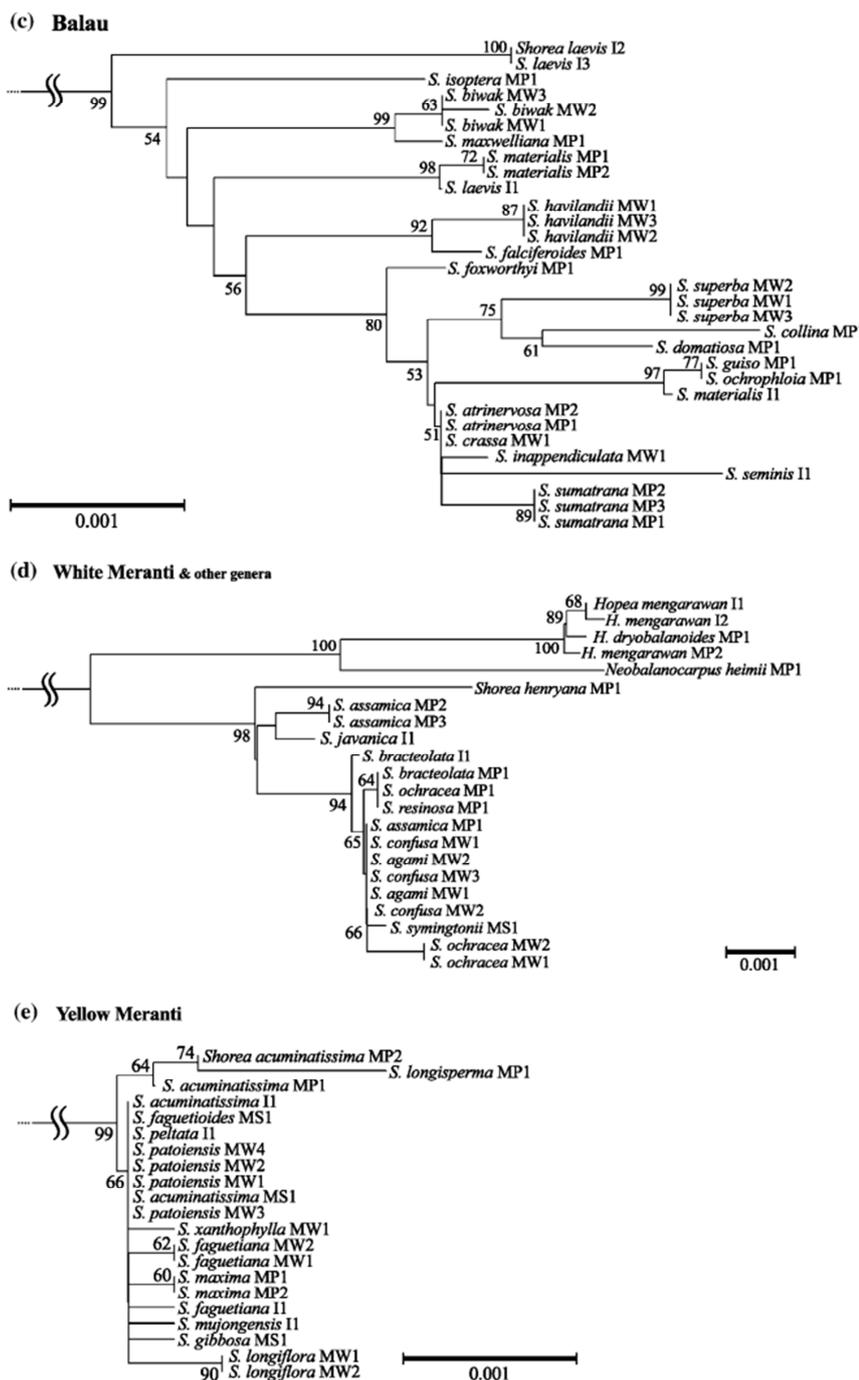
図(4)-1 *Shorea*属の葉緑体DNAによる分子系統樹。

この研究では葉緑体 DNA の 4.2kb の塩基配列を解析したが、いくつかの種で同じ塩基配列を共有する種が存在し全ての種を識別するには至らなかった。これら近縁種は同一の塩基配列を持つ場合があるが、さらに葉緑体 DNA のいくつかの領域を調査して確認する必要がある。またある種が雑種起原である場合は、葉緑体 DNA または核 DNA の ITS (Internal transcribed spacer) などの領域を調査する必要がある。得られたデータセットで材色を識別する多くの塩基置換が見つかった。これらを特異的に増幅する例えば対立遺伝子特異的 PCR などを行うことにより、簡便な識別マーカーの開発が可能になる。

(b) Red Meranti



図(4)-2 *Shorea*属のレッドメランティグループの分子系統樹

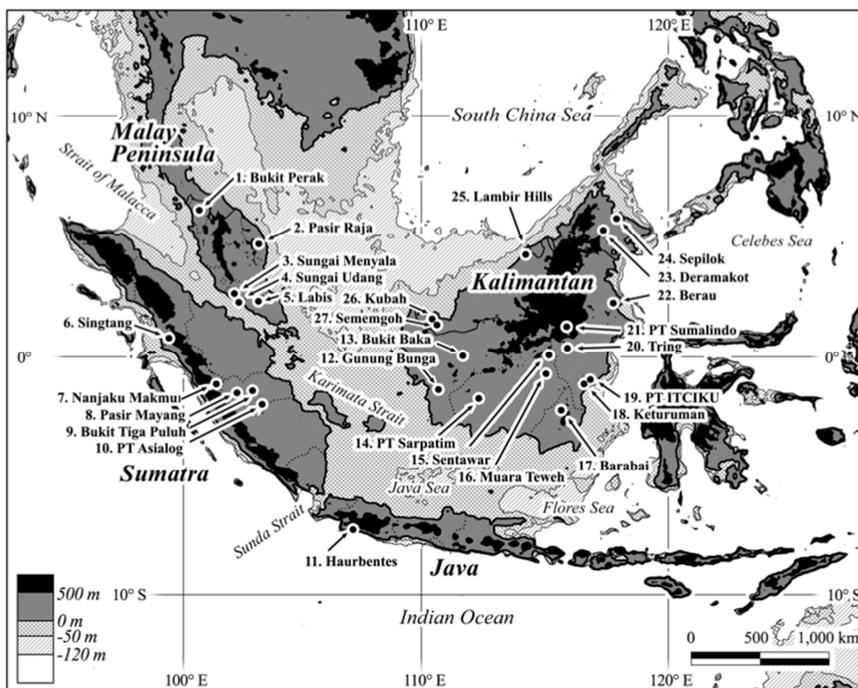


図(4)-3 *Shorea*属のホワイトメランティ、イエローメランティ、バラウグループの分子系統樹

(3) 地域識別のための広域分布種の収集

広域分布種である *S. leprosula* 及び *S. parvifolia* はスマトラ島、マレー半島、ボルネオ島などに分布している。両種とも低地から丘陵地底部にかけて分布する種である。これらの採取のためにマレー半島、ボルネオ島、スマトラ島を訪問し材料の採取を行った (図(4)-4)。マレー半島では

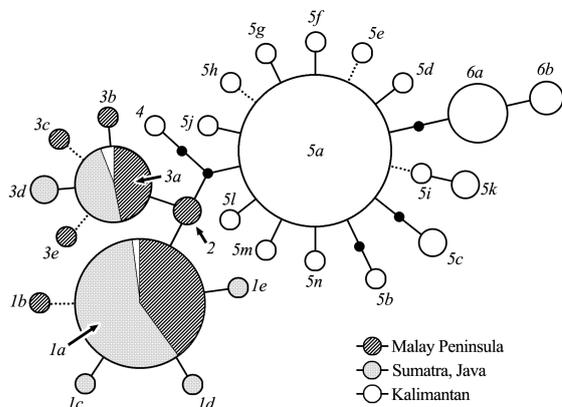
マレーシア森林研究所の協力の下に 5 集団から集団サンプルの収集ができた。またスマトラ島ではガジャマダ大学の協力で 1 地域で 2 種の集団サンプルを採取することができた。スマトラ島のその他の集団はゲッチング大学で分析することができるようになった。またボルネオ島のほとんどの集団はガジャマダ大学の協力の下に採取ができた。



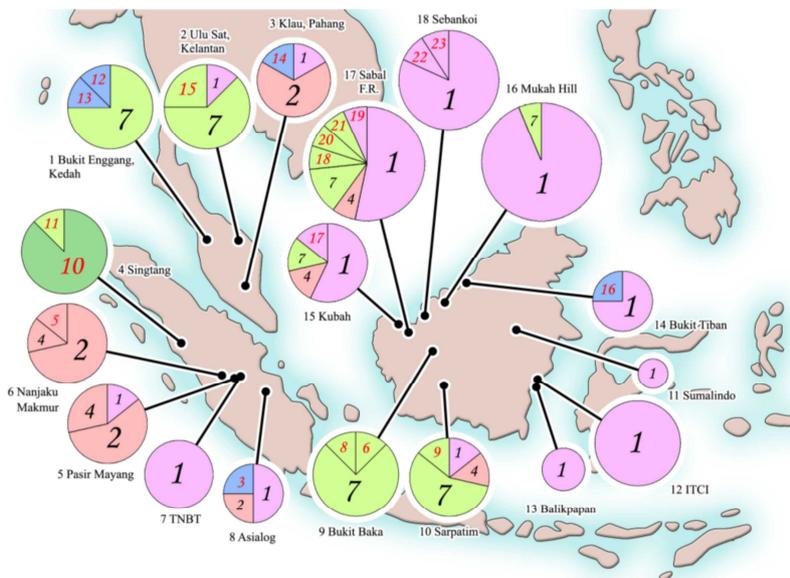
図(4)-4 広域分布種の 2 種の採取集団の位置

(4) 地域識別のための葉緑体 DNA を用いた集団解析

マレーシア及びインドネシアの広域に分布する *S. leprosula* の遺伝的分化を調査した結果、ボルネオ島の集団とそれ以外（マレー半島、スマトラ島）で大きな遺伝的な違いが見られた。葉緑体 DNA の 5 領域（合計 4393bp）を解析した結果、21 のハプロタイプが検出された（図(4)-5、(4)-6）。集団間の遺伝的な違いを表す遺伝子分化係数は $F_{st} = 0.5851$ と高い値を示した。



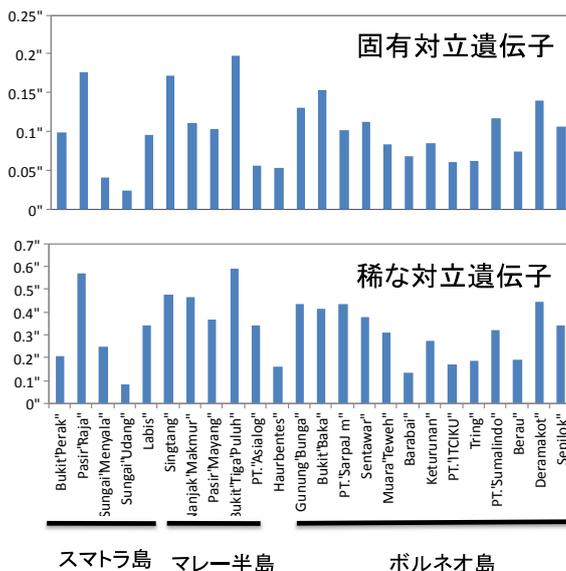
図(4)-5 *Shorea leprosula* の葉緑体 DNA ハプロタイプネットワーク。



図(4)-8 *Shorea parvifolia* の葉緑体 DNA ハプロタイプでの東南アジアでの分布。

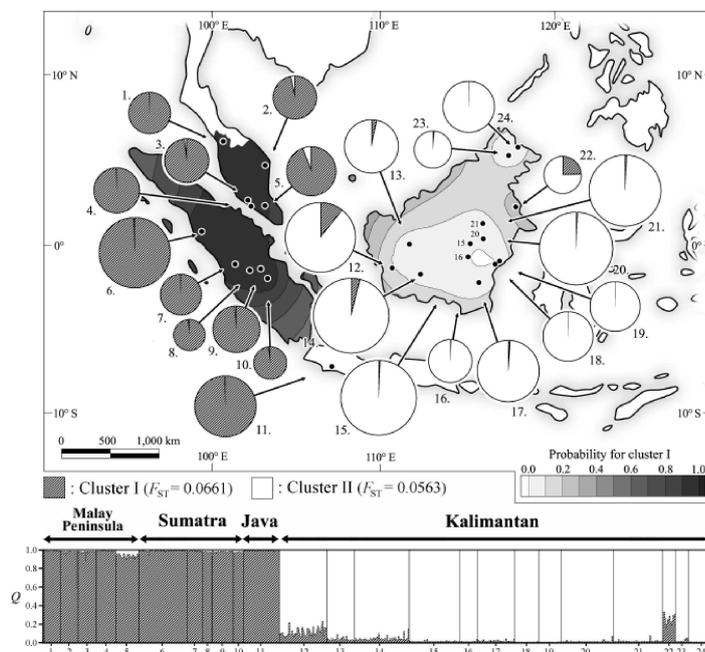
(5) 地域識別のための核 EST-SSR の開発と集団解析

S. leprosula の EST ライブラリーを用いて EST-SSR マーカー40 遺伝子座を開発した。そのうち *S. leprosula* では6 遺伝子座はハーディーワインベルグの法則から有意に歪んでいたため、これらを除いて 34 遺伝子座で集団の遺伝的多様性や遺伝構造の解析を行った。集団のヘテロ接合度は 0.370~0.472 の値をとり、アレリックリッチネスは 2.458~3.198 までの値であった。また遺伝的多様性を集団固有な対立遺伝子及び稀な対立遺伝子で調査したところ明瞭な傾向は見られなかった (図(4)-9)。これらの地域的な傾向ではマレー半島やスマトラ島などの西部の集団が、明瞭ではないが遺伝的多様性が高い傾向にあった。

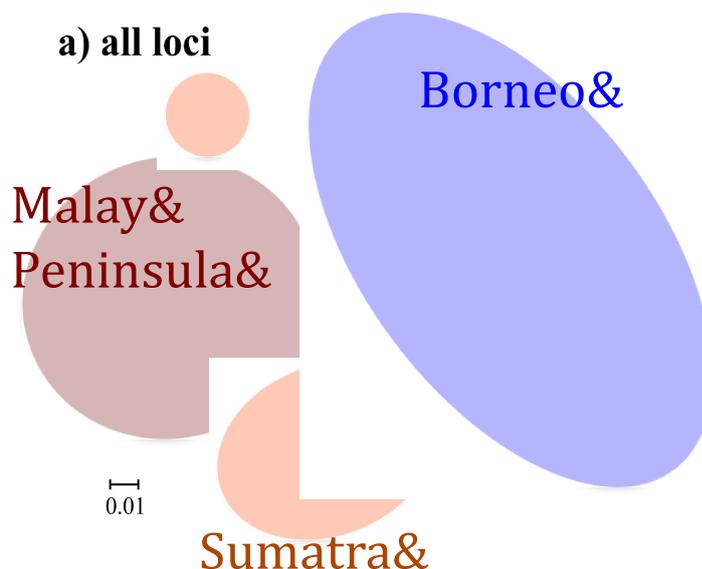


図(4)-9 *S. leprosula* の集団固有な対立遺伝子及び稀な対立遺伝子頻度

遺伝的多様性の所在を調べたところ、カリマンタン島、スマトラ島、マレー半島などの地域間にあるものが 4.38% で、地域内の集団間にあるのが 6.09% で、集団内にあるのが 89.53% で、約 9 割の遺伝的変異が集団内にあることが明らかとなった。遺伝子分化係数は低い ($F_{ST} = 0.0671$)、ボルネオ島の集団とそれ以外が明瞭に分化していた (図(4)-10、図(4)-11)。

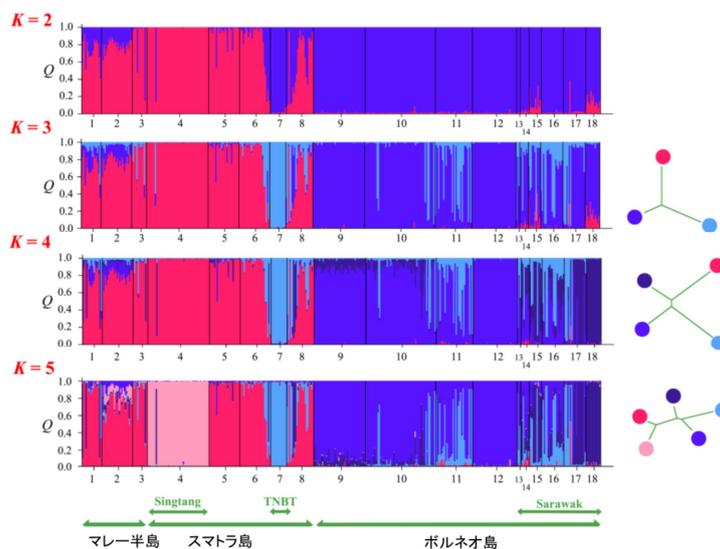


図(4)-10 *Shorea leprosula* の EST-SSR の遺伝子型データに基づく STRUCTURE 解析結果。ボルネオ島集団とその他 (スマトラ島及びマレー半島集団) が遺伝的に明瞭に分化している。

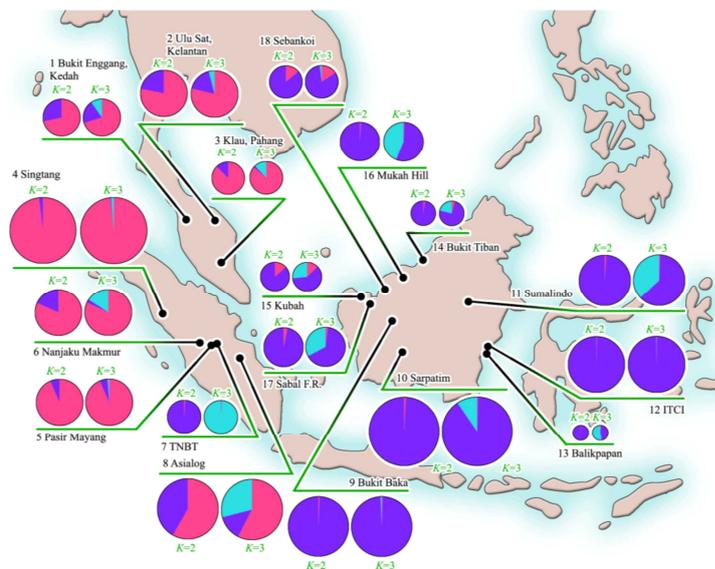


図(4)-11 *Shorea leprosula* の EST-SSR の遺伝子型データに基づく集団の系統樹 (Neighbor-joining 法)。ボルネオ島集団とその他 (スマトラ島及びマレー半島集団) が遺伝的に明瞭に分化している。またスマトラ島とマレー半島も遺伝的な分化が見られる。

S. parvifolia では核の DNA マーカーでは同様にボルネオ島とそれ以外（マレー半島とスマトラ島）が遺伝的に分化していたが、遺伝子分化係数は $F_{st} = 0.160$ と葉緑体に比べ低かった(図(4)-12、図(4)-13)。DNA による地域識別は島レベルであると可能であるが、狭い地域を特定するには至らなかった。これは例えば島内の地域間の遺伝的分化があまり高くなかったことが原因であった。核 DNA レベルでは *S. leprosula* よりも遺伝的分化は高かった。



図(4)-12 *Shorea parvifolia* の EST-SSR の遺伝子型データに基づく STRUCTURE 解析結果。ボルネオ島集団とその他（スマトラ島及びマレー半島集団）が遺伝的に明瞭に分化している。



図(4)-13 *Shorea parvifolia* の EST-SSR の遺伝子型データに基づく STRUCTURE 解析の各地域の分布図。ボルネオ島集団とその他（スマトラ島及びマレー半島集団）が遺伝的に明瞭に分化している。

本研究で得られたデータでは広域分布種である*S. leprosula*と*S. parvifolia*はボルネオ島とその他の地域（スマトラ島とマレー半島）で明瞭に遺伝的に分化していた。産地識別はこの大きな地域では可能であることが示された。これは東南アジア地域が長期的な気候変動の結果、氷河期に陸続きとなり大きな大陸（スンダ大陸）となり、暖かくなった間氷期にまた隔離されるということを繰り返してきた結果、植物も氷期に異動していたことが考えられるが、少なくとも最終氷期の頃には東南アジアは陸続きになっていたが、この2種はほとんど異動していないことを示している。またボルネオ島とその他の地域の遺伝的な違いは、葉緑体DNAの突然変異から推定すると数十万年以上前に形成された遺伝構造であると考えられる。

本研究結果から、これら遺伝的に異なる2つの地域はそれぞれ別に保全すべきで、*S. leprosula*ではマレー半島の北部やボルネオ島東部にユニークな葉緑体DNAハプロタイプが見られる。また*S. parvifolia*ではスマトラ島東部にユニークなハプロタイプが見られる。これらの地域は優先的な保全が必要である可能性がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

東南アジアの広域分布種である*S. leprosula*及び*S. parvifolia*の葉緑体DNAの解析結果で高い集団間分化がみられ、また核DNAのEST-SSRの解析結果でも遺伝的分化度は高くはないが、明瞭な遺伝構造が検出された。これら情報が*S. leprosula*と*S. parvifolia*の遺伝子資源としてのどの地域が重要であるかを明らかにでき、現在のフタバガキ科林の成り立ちに関する基礎的なデータが得られたことに大きな科学的意義がある。

(2) 環境政策への貢献

東南アジアの遺伝的多様性のあり方が明らかになってきており、今後の保全に向けての政策立案の資料として活用が期待される。本研究の結果は、これまで熱帯域の多様性保全機能やその成り立ちを、遺伝学的手法を用いて評価するための手法を確立した点において重要な成果をもたらした。様々な関係機関を通じ、成果の広報・普及に努める。

6. 国際共同研究等の状況

この研究はすべてマレーシア森林研究所（FRIM）、ガジャマダ大学（UGM）及びゲッチングン大学（GU）との共同研究により行なわれた。

カウンターパート： Lee Soon Leong (FRIM), Kevin K. S. Ng (FRIM), Norwati Muhammad (FRIM), Mohamad Na'iem (UGM), Spto Indrioko (UGM), Reiner Finkeldey (GU)

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文（査読あり） >

1) K. K. S. NG, S. L. LEE, Y. TSUMURA, S. UENO, C. H. NG, C. T. LEE: Molecular Ecology Resources 9: 393-398(2009)

“EST-SSRs isolated from *Shorea leprosula* and their transferability to 36 species within the Dipterocarpaceae.”

2) Y. TSUMURA, T. KADO, K. YOSHIDA, H. ABE, M. OHTOMI, Y. TAGUCHI, Y. FUKUE, N. TANI, S. UENO, K. YOSHIMURA, K. KAMIYA, K. HARADA, Y. TAKEUCHI, B. DIWAY, R. FINKELDY, M. NA' IEM, S. INDORIKO, K. K. S. NG, N. MUHAMMAD, and S. L. LEE: *Journal of Plant Research* 124:35-48 (2011)

“Molecular database for classifying *Shorea* species (Dipterocarpaceae) and techniques for checking the legitimacy of timber and wood products.”

3) M. OHTANI, S. UENO, N. TANI, L. S. LEE, Y. TSUMIRA: *Conservation Genetics Resources* (in press)

“Twenty-four additional microsatellite markers derived from the expressed sequence tags of an endangered tropical tree *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae).”

4) N. TANI, Y. TSUMURA, K. FUKASAWA, T. KADO, Y. TAGUCHI, S. L. LEE, C. T. LEE, N. MUHAMMAD, K. NIYAMA, T. OTANI, T. YAGIHASHI, A. B. RIPIN, A. R. KASSIM: *Journal of Ecology* (in press)

“Male fecundity and pollen dispersal in hill dipterocarps: significance of mass synchronized flowering and implications for conservation.”

5) S. MASUDA, N. TANI, M. OHTANI, Y. TSUMURA: *Conservation Genetics Resources* 2: 109-111 (2010)

“Characterization of 12 microsatellite loci for important tropical tree species *Shorea maxwelliana* and *S. laevis* (Dipterocarpaceae).”

<その他誌上発表（査読なし）>

1) Tsumura, Y.: R. Wickneswari & C. Cannon (eds) *Managing the Future of Southeast Asia's Valuable Tropical Rainforests: A Practitioner's Guide to Forest Genetics*, pp57-68, Springer (2011)

“Gene Flow, Mating Systems, and Inbreeding Depression in Natural Populations of Tropical Trees.”

（2）口頭発表（学会等）

1) Tsumura, Y., M. Ohtani, N. Tani, S. Ueno, S. L. Lee, K. K. S. Ng, N. Muhammad, B. Diway, R. Finkeldey, E. Khoo, K. Kamiya, K. Harada, S. Indrioko, and M. Na'iem (2010) Phylogeographical study of wide-distributed tree species, *Shorea leprosula*, in Southeast Asia. *International Symposium on Forestry and Forest Products 2010*, October 5-7, Kuala Lumpur.

2) Tsumura, Y. (2011) Species and population identification of *Shorea* using molecular markers. *FRIM/JIRCAS Ecology and Genetics of dipterocarps, -its role in sustainable forest management*, January 25-26, Genting Highland.

（3）出願特許

「特に記載すべき事項はない」

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

「特に記載すべき事項はない」

(5) マスコミ等への公表・報道等

「特に記載すべき事項はない」

(6) その他

「特に記載すべき事項はない」

8. 引用文献

- 1) Ashton PS (1982) Flora Malesiana. Series I-Spermatophyta. Flowering Plants Vol.9, part 2, Dipterocarpaceae. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands.
- 2) Symington CF (1943) Malayan Forest Records No.16. Foresters' Manual of Dipterocarps. (Reprinted with plates and historical introduction, University of Malaya Press, Kuala Lumpur.

(5) 遺伝的劣化評価 3 - 希少種および絶滅危惧種の解析(フタバガキの遺伝的変異)

九州大学大学院 理学研究院 生物科学部門

Alfred E. Szmidt

猪股伸幸 (平成21-22年度)

<研究協力者>

九州大学大学院 理学研究院 生物科学部門

手島康介

九州大学大学院 理学研究院 システム生命科学府 (博士課程) 生命理学

Wei Lun Ng

平成21～23年度累計予算額：27,368千円

(うち、平成23年度予算額：8,131千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 熱帯林の減少に伴う森林劣化の評価を行うために普遍種と希少種の遺伝的多様性を比較することを目的とする。本サブテーマでは、(1) *Pinus krempfii* (希少種) と *Pinus yunnanensis* (普遍種)、(2) *Shorea balangeran* (希少種) と *Shorea leprosula* (普遍種)、および(3) *Myoporum bontioides* (絶滅危惧種) の3グループを対象にして集団遺伝学的研究をすすめた。(1) *Pinus* 属の解析では10核遺伝子領域、11葉緑体SSR、14ミトコンドリア遺伝子領域の解析を行った。総じて希少種の遺伝的変異量は普遍種と比較して非常に低いという結果が得られた。(2) *Shorea* 属を用いた研究ではcDNAライブラリの構築を行った。159核遺伝子領域のPCRプライマーを設計し、増幅を確認した。また、普遍種である *Shorea parvifolia* の遺伝的変異の解析を行い、その結果を論文にまとめている。(3) 絶滅危惧種である *Myoporum bontioides* を用いた研究では、日本のサンプルに加え、中国のサンプルを加えて解析を続けている。この種からは、ほとんど変異が観察されなかった。

[キーワード] 希少種、絶滅危惧種、遺伝的多様性、SSR多型、塩基配列多型

1. はじめに

希少種や絶滅危惧種を保全し再生に導くためにはその森林の状態を正確に把握しなければならない。遺伝的変異の解析はそのための方法の一つを提供する。本サブテーマでは以下の3グループの樹木種を対象とし、希少種とそれに近縁な普遍種の遺伝的変異の集団遺伝学的解析を行った。

(1) *Pinus krempfii* (希少種) と *Pinus yunnanensis* (普遍種)

Pinus krempfii (希少種) は1921年にベトナム南部山岳地帯で発見された針葉樹であり、高さ30-35mに達し、胸高直径は150-200cm以上になる高木である。*Pinus krempfii* はマツ属の中で最も南に分布するというだけでなく、対称な平たい葉(幅約12mm、長さ約100mm)を持つという点においても特徴のある種である。特徴ある平たい針葉、放射仮道管の欠如、その他材の特徴などからマツ属の中でも独特の存在である。*Pinus krempfii* は絶滅が危惧されている状態であり、その分布もカインホア(Khanh Hoa) およびラムドン(Lam Dong) の2省に限られている¹⁰⁾。他のマツ属の

種とは異なり純林を形成しない。標高1000から2000mの広葉および針葉の熱帯モンスーン林に混在し、小規模な群落または孤立する。自然状態における*Pinus krempfii* 林再生の頻度は非常に低いと言われている。生物学および経済学的重要性にも関わらず、*Pinus krempfii* 集団の遺伝的要請に関する情報は存在しない。種の遺伝的変異に関する情報は、この独特な種の保全および再生の方法を検討するためには不可欠である。

Pinus yunnanensis (普遍種) は中国南西部の雲貴高原に分布する。*P. krempfii* や他の熱帯性マツ科樹木 (*P. kesiya*, *P. merkusii*) と異なり、山の斜面に広大な純林を形成する。20cmにも達する長いとげを持つことを除くと、形態的・組織的に典型的なマツ科の特徴を有する。

(2) *Shorea balangeran* (希少種) と *Shorea leprosula* (普遍種)

フタバガキ科の*Shorea*属は東南アジアの熱帯雨林の林冠を構成する種である。およそ190種が存在し、南アジアと東南アジアのみに分布している。*Shorea leprosula* (普遍種) はマレー半島、スマトラ島、ボルネオ島の低地の熱帯雨林において林冠を構成する。*Shorea balangeran* (希少種) はインドネシアの湿地帯にのみ分布する。その分布域は人間の活動や山火事により減少している。

(3) *Myoporum bontioides* (希少種)

Myoporum bontioides (ハマジンチョウ) は沿岸部に生育する常緑低木である。塩環境・岩礁に適応しているが塩環境以外でも生育する。種子は海流により散布される。九州・沖縄地方を含む日本南部から中国南部、台湾、ベトナムの熱帯域まで分布している。日本では環境省により絶滅危惧種に指定されている。日本において分布が限られている理由としては、この種の生育環境や気候が限られていることや近年の沿岸開発の影響などが挙げられる。この種は上記(1)(2)の2グループと異なり、対照とするのに適当な普遍種が存在しない。しかし、分布の中心である東南アジアの熱帯林の集団と日本集団とを比較することで、希少集団と普遍集団の遺伝的組成の比較を行うことが可能である。

2. 研究開発目的

本サブテーマは、

- (1) 希少種 (絶滅危惧種) と普遍種が保有する遺伝的変異の量とパターンを明らかにすること
- (2) 希少および絶滅危惧種が絶滅するリスクを遺伝的多様性データに基づいて推定すること
- (3) 希少および絶滅危惧種の保全・管理・再生に向けた遺伝的データの利用を提案することを目的として研究を行う。

3. 研究開発方法

(1) *Pinus krempfii* (希少種) と *Pinus yunnanensis* (普遍種)

本研究の中心的課題は*P. krempfii*の遺伝的変異量を求めて、分集団間の分化を明らかにすることである。この目的のもと、我々は6自然集団からとられたサンプルの、合計10カ所の各遺伝子座、合計約9kbの領域の遺伝的変異について調査を行った。加えて、葉緑体マイクロサテライト (cpSSR) 7 遺伝子座およびミトコンドリアの遺伝子座 (mtDNA) 14カ所の配列も決定した。とくに分集団内の遺伝的変異の量を求め、分集団間の遺伝的変異の程度を明らかにし、この種における保全・管

理・再生を行うためのガイドラインを提唱することを目的として研究を進めた。

ベトナムの6カ所の自然林から採取された*P. krempfii* 57個体の葉を用いた。サンプル地点は以下の通りである: Long Lanh (Da Chay 89A, Da Chay 90A, Da Chay 91A)、Cong Troi (Cong Troi 102、Cong Troi 103)、Tuong Da Nhim (Bidoup)。それぞれの集団の中からランダムに個体を選んだ。DNA抽出までのサンプルの保存にはシリカゲルを用いた。DNAは乾燥葉から改良されたCTAB法を用いて抽出された⁸⁾。TaKaRa ExTag Polymerase (宝酒造) を用いてPCRを行った。PCRプロトコールはタッチダウンPCRとアニーリング温度を一定にしたPCRの2通りの方法を用いた。泳動の結果バンドが複数観察されたものに関してはゲルから切り出して精製を行った。ABI PRISM Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてシークエンス反応を行い、CleanSEQ (Agencourt Bioscience Corporation)を用いて精製した後、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)で配列の解析を行った。断片長に多型があったもの、ヘテロ接合体、増幅がうまくいかなかったものに関してはpGEM-T(Easy) Vector Systems (Promega)を用いてクローニングを行った後に解析した。いくつかの遺伝子座(4CL, TPP1, SOS27, IFG8612)ではダイレクトシークエンスの結果に基づきネストしたプライマーを設計して解析を行った。それぞれのサンプルの配列はATGC ver. 6 (Genetyx)を用いて補正し、アセンブルを行った。ClustalX¹²⁾を用いてアラインメントを行った後、BioEdit 7.0.5.2⁵⁾を用いてマニュアルで修正をおこなった。領域内の遺伝的多様性はハプロタイプ多様度(Hd ⁹⁾、塩基多様度(π ⁹⁾, θ ¹³⁾)を用いて測った。解析にはDnaSP ver. 5.10.01⁷⁾を用いた。集団間の遺伝的分化はAMOVA³⁾を用いて行った。集団間の分化の程度は F_{ST} ¹⁴⁾を用いて測った。 F_{ST} は遺伝的分散のうち、集団間の違いに起因する部分の割合を意味している。この統計量の検定は10,000回繰り返して行ったシミュレーションの結果を用いて行った。これら一連の解析にはArlequin v. 3.5.1.2²⁾を用いた。

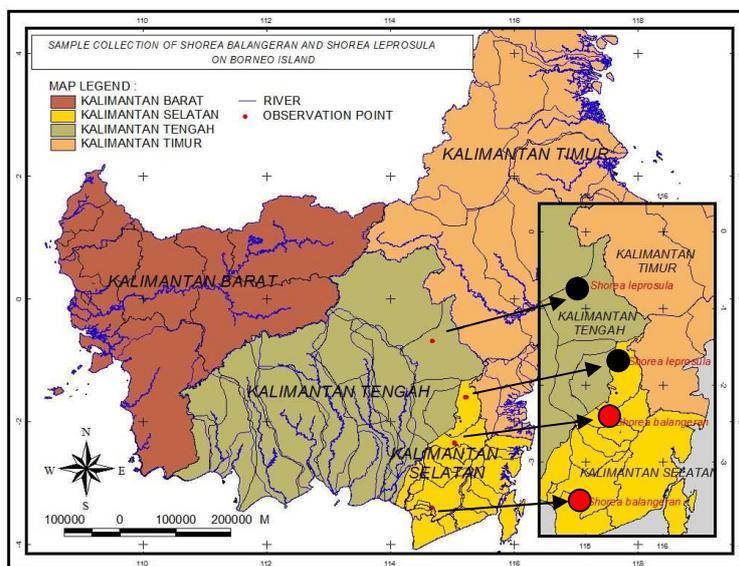
(2) *Shorea balangeran* (希少種) と *Shorea leprosula* (普遍種)

これら2種の多型解析は核遺伝子座を遺伝子マーカーとするが、その開発にあたり、EST解析と配列データベースをもとにしたプライマーの設計を行った。EST解析を行なうため、インドネシアで採集した2種の苗木と筑波植物園で栽培されている*S. leprosula*の枝を採集し、RNA抽出を行った。抽出したRNAを用いて希少種と普遍種両方のcDNAライブラリを構築した。得られたライブラリに基づき、シロイヌナズナで保存されている領域の配列を参考にして、両種で共通して増幅するプライマーを設計した。最終的に159領域の核遺伝子領域のプライマーをデザインすることができた。

Shorea leprosula および *Shorea balangeran* の両種においてボルネオ島の2カ所でサンプリングを行った。それぞれの地点において15個体からサンプルを収集した。さらにDramagaの人工林からもサンプリングを行った。基本的に各個体から1-3枚の葉を取り、シリカゲルで乾燥させた。おおよそのサンプリング地点は図(5)-1に示す通りである。

乾燥させた葉からCTAB法を用いてゲノムDNAを抽出した。TaKaRa ExTag Polymeraseを用いて設計した核遺伝子マーカーのPCRを行った。吸光度を測定してPCR反応産物の濃度を定量し、サンプルごとにすべての反応産物を等量混ぜ合わせた。サンプルごとにMIDタグをライゲートした後、Roche 454 sequencing system (Roche)を用いて配列の解析を行った。得られた配列データを解析して、塩基多様度 (θ , π) の推定およびTajima's D ¹¹⁾の値を推定した。さらに上記2種に加え、普遍種で

ある *Shorea parvifolia* の遺伝的変異データを解析した。



図(5)-1. 本研究で用いた *Shorea leprosula* および *Shorea balangeran* の
サンプリング地点

(3) *Myoporum bontioides* (絶滅危惧種)

絶滅危惧マングローブ様灌木である *Myoporum bontioides* において日本の8集団と中国1集団からサンプルを収集した。*M. bontioides* の合計20カ所のマイクロサテライト (SSR) マーカーの両端にプライマーを設計し、確認を行った。まず、*M. bontioides* のゲノムDNAを4カッター制限酵素 (Sau3AI) で切断し、アダプターを接続した。ビオチン修飾した2塩基SSR ((AC)₁₅および(AG)₁₅) を用いてSSRマーカーを含む配列をキャプチャーした。300の候補クローンの配列決定を行い、その中から最終的に29カ所のSSRマーカーを選抜しプライマーを設計した。実際のサンプルで確認を行ったところ、10マーカーは設計通り増幅し、マーカーとして用いることができることが確認された。残りのマーカーは増幅効率が悪いか、ゲノム中の複数の箇所を増幅することがわかったため使用しなかった。ジェノタイピングはABI3100シークエンサーを用いて行い、GeneMapper v4.0を用いて解析を行った。解析を行ったすべての集団サンプルにおいて10 SSR 遺伝子座のデータを収集した。さらに、葉緑体DNAの5カ所を増幅するプライマーを設計し、配列を解析した。

4. 結果及び考察

(1) *Pinus krempfii* (希少種) と *Pinus yunnanensis* (普遍種)

本研究は *P. krempfii* の遺伝的変異について調べた初めての研究である。本研究以前にはプライマーを設計するために必要な配列情報も存在しなかった。本研究では、他のマツ科の種の配列情報を用いて *P. krempfii* のプライマーを設計し、10コーディング領域、合計およそ9kbの解析を行った。ハプロタイプ多様度および塩基多様度を表(5)-1に示す。10遺伝子座のうち、最もハプロタイプ数が多かったのはCFX遺伝子座でその数は23であった。最も少なかったのはTPPI遺伝子座で3ハプロ

タイプであった。塩基多様度は0.0000から0.0059の間にあり、Bidoupに集団からとられたサンプルがすべての遺伝子座において最も高い塩基多様度を示した。遺伝子座ごとにみても *GSTG2* 遺伝子座が最も多様性が高く、*4CL*、*Rav2* および *TPPI* をはじめとする7遺伝子座においてはほとんど多様性が観察されなかった。同義座位、非同義座位および非同義+非コード領域の変異量についても表(5)-1に示してある。概して非コード領域の変異量はほとんどの遺伝子座において非常に小さかった。

表(5)-1 核遺伝子座の遺伝的変異 (*4CL*, *CFX*, *GSTG1*)

Locus	Populations	n	S	h	Hd	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Tajima's D test
						Synonymous	Synonymous	Nonsynonymous	Nonsynonymous	Silent	Silent	Total	Total	
<i>4CL</i> (1089 bp) ^a	Da Chay 90A	26	5	4	0.3450	0.0022	0.0051	0.0001	0.0004	0.0009	0.0022	0.0005	0.0012	-1.7092 ^{ns}
	Da Chay 91B	24	4	5	0.4070	0.0021	0.0040	0.0001	0.0004	0.0009	0.0017	0.0005	0.0010	-1.4566 ^{ns}
	Da Chay 89A	18	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Cong Troi 102	6	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Cong Troi 103	20	1	2	0.1890	0.0000	0.0000	0.0003	0.0005	0.0000	0.0000	0.0002	0.0003	-0.5915 ^{ns}
	Bidoup	20	2	3	0.4160	0.0021	0.0027	0.0000	0.0000	0.0009	0.0018	0.0004	0.0005	-0.5278 ^{ns}
	Total	114	7	7	0.2760	0.0013	0.0037	0.0001	0.0009	0.0006	0.0016	0.0003	0.0012	-1.7031 ^{ns}
<i>CFX</i> (1102 bp)	Da Chay 90A	26	13	11	0.8740	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045	0.0039	0.0037	0.0031	0.7132 ^{ns}
	Da Chay 91B	24	9	7	0.8260	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0030	0.0026	0.0025	0.0022	0.4573 ^{ns}
	Da Chay 89A	18	9	6	0.6860	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0036	0.0028	0.0030	0.0024	0.9175 ^{ns}
	Cong Troi 102	6	3	3	0.8000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0017	0.0014	0.0014	0.0012	1.1241 ^{ns}
	Cong Troi 103	20	11	12	0.9210	0.0061	0.0051	0.0000	0.0000	0.0030	0.0034	0.0025	0.0028	-0.3438 ^{ns}
	Bidoup	20	10	9	0.8580	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0045	0.0031	0.0038	0.0026	1.6614 ^{ns}
	Total	114	16	23	0.8960	0.0012	0.0034	0.0000	0.0000	0.0039	0.0033	0.0033	0.0027	0.5462 ^{ns}
<i>GSTG1</i> (815 bp)	Da Chay 90A	26	3	3	0.3940	0.0024	0.0023	0.0009	0.0012	0.0007	0.0007	0.0008	0.0010	-0.3026 ^{ns}
	Da Chay 91B	24	14	6	0.4760	0.0069	0.0097	0.0002	0.0006	0.0059	0.0007	0.0029	0.0048	-1.4032 ^{ns}
	Da Chay 89A	18	3	3	0.2160	0.0009	0.0025	0.0002	0.0006	0.0059	0.0005	0.0004	0.0011	-1.7130 ^{ns}
	Cong Troi 102	6	2	3	0.6000	0.0053	0.0077	0.0012	0.0010	0.0015	0.0023	0.0014	0.0011	-0.7093 ^{ns}
	Cong Troi 103	20	3	3	0.5320	0.0033	0.0024	0.0008	0.0006	0.0014	0.0014	0.0012	0.0010	0.4211 ^{ns}
	Bidoup	20	3	4	0.2840	0.0017	0.0025	0.0002	0.0006	0.0007	0.0015	0.0005	0.0010	-1.4401 ^{ns}
	Total	114	19	12	0.4010	0.0034	0.0100	0.0006	0.0013	0.0020	0.0085	0.0012	0.0044	-2.0903 [*]

表(5)-1 核遺伝子座の遺伝的変異(*GSTH2*, *IFG-1934*, *IFG-8612*)

Locus	Populations	n	S	h	Hd	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Tajima's D test
						Synonymous	Synonymous	Nonsynonymous	Nonsynonymous	Silent	Silent	Total	Total	
<i>GSTH2</i> (494 bp)	Da Chay 90A	26	7	7	0.7450	0.0094	0.0060	0.0042	0.0038	0.0028	0.0037	0.0031	0.0037	-0.4630 **
	Da Chay 91B	24	8	10	0.8700	0.0113	0.0062	0.0044	0.0039	0.0045	0.0045	0.0044	0.0043	0.0799 **
	Da Chay 89A	18	6	6	0.8300	0.0121	0.0067	0.0056	0.0042	0.0050	0.0033	0.0051	0.0035	1.4693 **
	Cong Troi 102	6	4	5	0.9330	0.0134	0.0101	0.0039	0.0032	0.0035	0.0037	0.0036	0.0035	0.1490 **
	Cong Troi 103	20	7	7	0.8320	0.0120	0.0065	0.0019	0.0020	0.0074	0.0048	0.0059	0.0040	1.5533 **
	Bidoup	20	6	9	0.9000	0.0102	0.0065	0.0037	0.0020	0.0043	0.0039	0.0041	0.0034	0.6711 **
	Total	114	8	15	0.8540	0.0116	0.0043	0.0040	0.0027	0.0048	0.0032	0.0046	0.0030	1.1899 **
<i>IFG-1934</i> (765 bp)	Da Chay 90A	26	2	3	0.4800	0.0031	0.0027	0.0000	0.0000	0.0031	0.0028	0.0008	0.0007	0.2724 **
	Da Chay 91B	24	2	4	0.3080	0.0020	0.0028	0.0000	0.0000	0.0020	0.0028	0.0005	0.0007	-0.6072 **
	Da Chay 89A	18	2	3	0.4640	0.0033	0.0031	0.0000	0.0000	0.0033	0.0031	0.0008	0.0008	0.2204 **
	Cong Troi 102	6	1	2	0.3333	0.0018	0.0023	0.0000	0.0000	0.0018	0.0023	0.0004	0.0006	-0.9330 **
	Cong Troi 103	20	4	5	0.4421	0.0025	0.0045	0.0003	0.0005	0.0025	0.0045	0.0009	0.0015	-1.2058 **
	Bidoup	20	2	4	0.5737	0.0035	0.0030	0.0000	0.0000	0.0035	0.0030	0.0009	0.0007	0.4354 **
	Total	114	4	6	0.4440	0.0028	0.0030	0.0001	0.0003	0.0028	0.0030	0.0007	0.0010	-0.4748 **
<i>IFG-8612</i> (966 bp)	Da Chay 90A	26	4	5	0.7720	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.0012	0.0018	0.0011	0.1359 **
	Da Chay 91B	24	4	5	0.7140	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0011	0.0013	0.0010	0.0011	-0.3204 **
	Da Chay 89A	18	4	5	0.7320	0.0032	0.0084	0.0000	0.0000	0.0013	0.0014	0.0011	0.0012	-0.3022 **
	Cong Troi 102	6	1	2	0.3330	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0004	0.0005	0.0003	0.0004	-0.9330 **
	Cong Troi 103	20	4	4	0.6840	0.0000	0.0000	0.0008	0.0024	0.0013	0.0010	0.0013	0.0012	0.1862 **
	Bidoup	20	7	8	0.8420	0.0029	0.0082	0.0000	0.0000	0.0018	0.0024	0.0015	0.0021	-0.8673 **
	Total	114	11	11	0.7360	0.0010	0.0055	0.0001	0.0016	0.0013	0.0023	0.0012	0.0022	-1.1816 **

表(5)-1 核遺伝子座の遺伝的変異(*Rav2*, *SOS27*, *TPPI*)

Locus	Populations	n	S	h	Hd	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Tajima's D test
						Synonymous	Synonymous	Nonsynonymous	Nonsynonymous	Silent	Silent	Total	Total	
<i>Rav2</i> (752 bp)	Da Chay 90A	26	1	2	0.3230	0.0000	0.0000	0.0007	0.0005	0.0000	0.0000	0.0004	0.0003	0.3809 **
	Da Chay 91B	24	1	2	0.3440	0.0000	0.0000	0.0007	0.0006	0.0000	0.0000	0.0005	0.0004	0.4803 **
	Da Chay 89A	18	1	2	0.4710	0.0000	0.0000	0.0010	0.0006	0.0000	0.0000	0.0006	0.0004	1.1661 **
	Cong Troi 102	6	1	2	0.3330	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0020	0.00016	0.0004	0.0006	-0.9330 **
	Cong Troi 103	20	1	2	0.5210	0.0000	0.0000	0.0011	0.0006	0.0000	0.0000	0.0007	0.0004	1.5313 **
	Bidoup	20	3	4	0.5740	0.0000	0.0000	0.0011	0.0013	0.0003	0.0010	0.0008	0.0011	-0.6428 **
	Total	114	3	4	0.4370	0.0000	0.0000	0.0009	0.0008	0.0001	0.0007	0.0006	0.0007	-0.3515 **
<i>SOS27</i> (1252 bp)	Da Chay 90A	26	9	3	0.1510	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0012	0.0023	0.0010	0.0019	-1.4989 **
	Da Chay 91B	24	11	4	0.2390	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0029	0.0007	0.0023	-2.3329**
	Da Chay 89A	18	9	4	0.3140	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0011	0.0028	0.0009	0.0020	-2.2329**
	Cong Troi 102	6	11	4	0.8670	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0039	0.0048	0.0031	0.0038	-1.1937 **
	Cong Troi 103	20	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Bidoup	20	8	2	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0008	0.0022	0.0006	0.0018	-2.1746**
	Total	114	14	8	0.2140	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0009	0.0028	0.0008	0.0021	-1.7782 **
<i>TPPI</i> (1195 bp)	Da Chay 90A	26	1	2	0.0770	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	-1.1555 **
	Da Chay 91B	24	1	2	0.0830	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	-1.1593 **
	Da Chay 89A	18	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Cong Troi 102	6	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Cong Troi 103	20	0	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
	Bidoup	20	1	2	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0002	-1.1644 **
	Total	114	2	3	0.0520	0.0000	0.0000	0.0001	0.0005	0.0000	0.0002	0.0001	0.0003	-1.2920 **

表(5)-1 核遺伝子座の遺伝的変異(*TPS4*)

Locus	Populations	n	S	h	Hd	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Pi(n)	Theta (θw)	Tajima's D test
						Synonymous	Synonymous	Nonsynonymous	Nonsynonymous	Silent	Silent	Total	Total	
<i>TPS4</i> (520 bp)	Da Chay 90A	26	2	3	0.2180	0.0006	0.0021	0.0004	0.0006	0.0006	0.0022	0.0004	0.0010	-1.2234 ^{ns}
	Da Chay 91B	24	3	4	0.5330	0.0031	0.0044	0.0006	0.0007	0.0031	0.0044	0.0017	0.0015	-0.6322 ^{ns}
	Da Chay 89A	18	1	2	0.2090	0.0000	0.0000	0.0005	0.0007	0.0000	0.0000	0.0004	0.0006	-0.5290 ^{ns}
	Cong Troi 102	6	2	3	0.6000	0.0027	0.0036	0.0008	0.0011	0.0027	0.0036	0.0013	0.0017	-1.1320 ^{ns}
	Cong Troi 103	20	1	2	0.2680	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0000	0.0000	0.0005	0.0005	-0.0861 ^{ns}
	Bidoup	20	1	2	0.1000	0.0000	0.0000	0.0002	0.0007	0.0000	0.0000	0.0002	0.0005	-1.1644 ^{ns}
	Total	114	3	4	0.2950	0.0010	0.0031	0.0005	0.0005	0.0010	0.0031	0.0006	0.0011	-0.7913 ^{ns}

集団間分化についてAMOVAを用いて解析した結果を表(5)-2に示す。*CFX*, *GSTG1*および*GSTH2*の3遺伝子座において有為な集団分化が検出された。*4CL*や*IFG1934*, *TPP1*, *TPS4*などの遺伝子座においてはどの集団の組み合わせでも有為な分化は検出されなかった。他方で*CFX* and *GSTH2*遺伝子座ではCong Troi 102、Cong Troi 103、Bidoupなどの集団を含む組み合わせで有為な分化が検出された。他の集団間の比較では、ほとんど分化が検出されないか ($F_{ST} \sim 0$)、負の F_{ST} が検出された。負の値はサンプルサイズが少なすぎたか、集団の分化が非常に小さいことに起因するものであろう。特にDa Chayの集団間で集団間分化は小さかった。このことはこれらの集団が同じ地方 (Long Lanh) に由来し、数キロしか離れていないという事実からも理解できる。

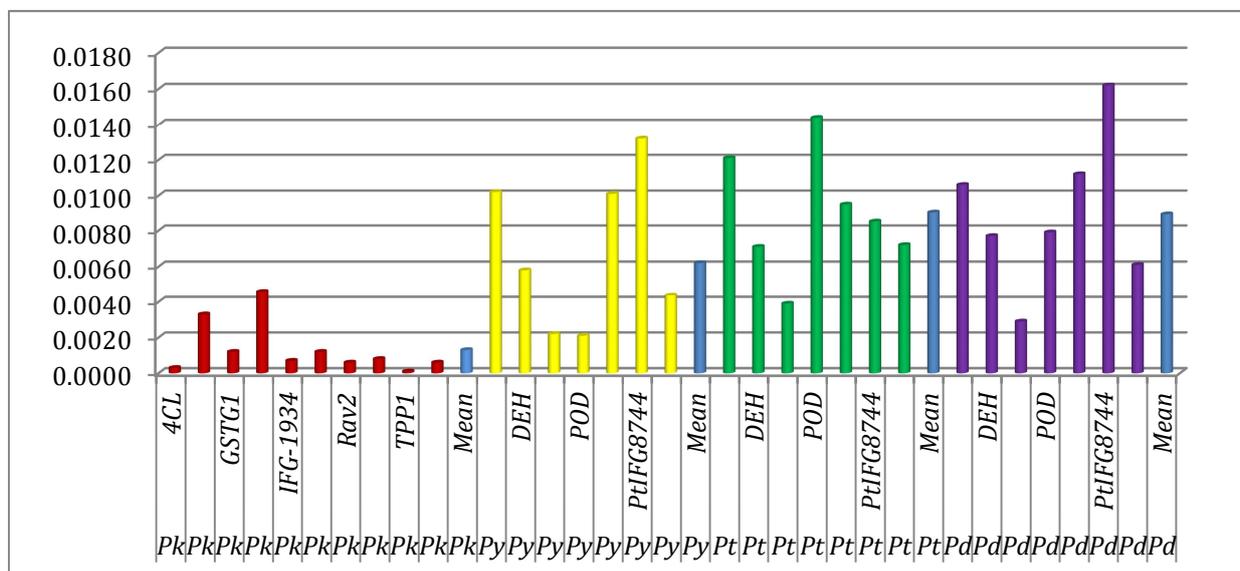
表(5)-2 Results of AMOVA analysis

Loci	<i>Fst</i>	<i>p-value</i>
<i>4CL</i>	0.01890	0.12805±0.01156
<i>CFX</i>	0.08521*	0.00000±0.00000
<i>GSTG1</i>	0.03940*	0.03030±0.00487
<i>GSTH2</i>	0.04316*	0.02346±0.00390
<i>IFG1934</i>	0.00243	0.39589±0.01173
<i>IFG8612</i>	0.01238	0.28837±0.01570
<i>RAV2</i>	0.02566	0.17204±0.01196
<i>SOS27</i>	-0.00157	0.44379±0.01423
<i>TPP1</i>	-0.01925	0.90714±0.00806
<i>TPS4</i>	0.00535	0.34707±0.01232

それぞれの遺伝子座におけるTajima's $D^{(1)}$ の値を調べた (表(5)-1)。*GSTG1*遺伝子座において有為な負の値が検出された。*SOS27*遺伝子座ではDa Chay 89Aと Da Chay 91Bおよび Bidoup集団において有為な負の値が検出された。集団サイズの減少や集団の分断は絶滅の危機に瀕している種に共通している現象であり、適応度の現象につながるとみられている。集団サイズの減少や集団の分断がもたらす悪影響の一つは遺伝的多様性の減少である。遺伝的浮動により、特に低頻度のアレルが集団から失われ、長期的にみると種全体の遺伝的変異量が低下する。集団サイズの減少および集団の分断化によってホモ接合体が増え、適応度の低下や致死を招くという別の側面もある。

このような近交弱性は動物でも植物でもよく知られている¹⁴⁾。これらの両要因が結果的に絶滅の危機に追いやるものと考えられている¹⁴⁾。

本研究の結果は、少なくともこれらの要因が*P. krempfii*の自然集団において現実に働いていることを示唆するものであった。*P. krempfii*のハプロタイプ多様度は、アジアに広く分布している他のマツ科の3種 (*P. tabuliformis*, *P. densata*, *P. yunnanensis*) と比べると凡そ50%低い値である。すなわち*P. krempfii*の遺伝子座あたりのアレル数は他のマツと比べて非常に少ないことを意味している。塩基多様度を比較してみても*P. krempfii*の多様性は他の3種よりも非常に低い(図(5)-1)。*P. krempfii*のミトコンドリアDNAには変異が見つからず、対して他の3種のミトコンドリアにはかなりの量の塩基多型が報告されている(Wang, unpublished data)。これらの結果は*P. krempfii*の遺伝的変異量が低いということをサポートしている。葉緑体マイクロサテライトの解析からは*P. krempfii*が最近に集団サイズの拡大あるいは変異の固定を経験したことを示唆する結果が得られた。現在の集団サイズが限られていることからこの結果は集団の拡大ではなく、長い間の遺伝的浮動の効果によって多型が失われた結果ではないかと考えられる。さらに*P. krempfii*の種子サンプルを収集し、自殖率の推定も試みた。しかしほとんどすべての種子の中身が空であったため、推定はできなかった。マツは自家不和合であることが知られており、空の種子は自殖を意味する⁶⁾。よって前述の遺伝的浮動による多様性の消失だけでなく、*P. krempfii*は自殖による適応度低下の状態にもあるということが出来る。以上のように、遺伝的情報に基づく研究から、*P. krempfii*は遺伝的劣化が著しく緊急に保護しなければならない状態にあることが明らかになった。さらに空の種子が多いということから再生には困難が伴うことが予想される。



赤: *P. krempfii* (Pk), 黄: *P. yunnanensis* (Py), 緑: *P. tabuliformis* (Pt), 紫: *P. densata* (Pd)

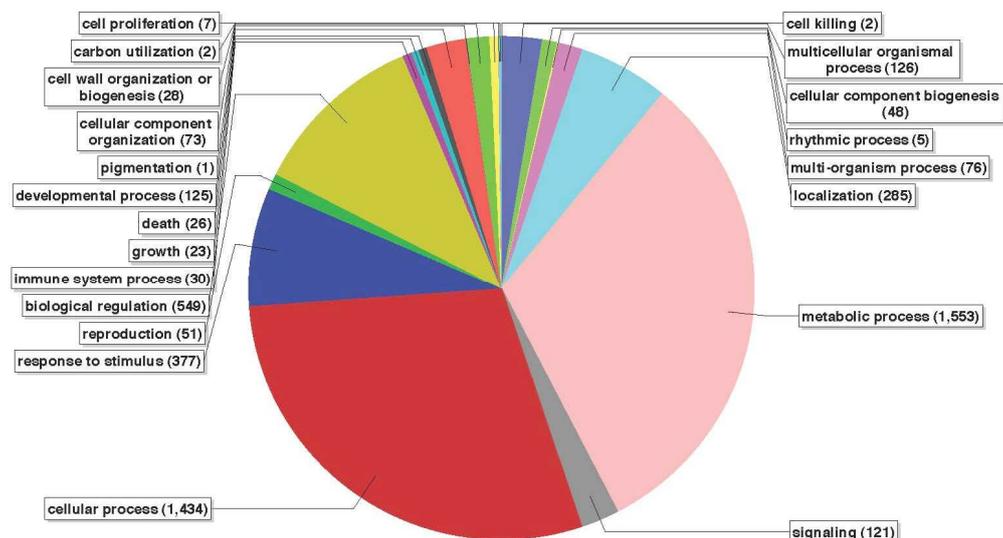
図(5)-2. *P. krempfii*と近縁3種の塩基多様度 (π)

AMOVA解析では3つの遺伝子座(*CFX*, *GSTG1*, *GSTH2*)において有為な集団の分化が確認された。しかし、2集団間の組み合わせで F_{ST} の値を調べたところ、10遺伝子座中5遺伝子座で集団の分化がみられた。最も分化が大きかった集団の組み合わせはCong TroiとBidoupであった。葉緑体マイク

ロサテライトを用いた研究でも同様の結果が得られた。それぞれの集団は比較的近傍に位置しているにもかかわらず、分化が進んでいることが明らかになった。*P. krempfii* は他のマツ科の種と異なり純林を構成せず、他の樹種に混ざって小規模に群落を形成または孤立する。このことは種子や花粉の散布が限られることを意味している。さらに散布能力が限られていることから集団間分化が進行することを表している。この点は*P. krempfii* の保護を考える上で重要なポイントである。各分集団においては遺伝的多様性が失われる傾向にあっても、種全体でみても多様性が維持される可能性があることを意味するからである。集団間の分化は集団サイズが小さいことから遺伝的浮動の影響であると考えられることができる。しかし本研究では調べた遺伝マーカーの数が限られているため、自然選択の影響も排除できない。ゲノムの他の領域を調べてみる必要があるであろう。もし自然選択が集団間の分化に寄与していれば、各分集団特異的な適応をしていることを意味する。仮にそうであれば、種の保全を考える際に各分集団から集められた種子を混ぜ合わせて用いることは避けるべきであり、その地に適応した種子を用いるべきである。

(2) *Shorea balangeran* (希少種) と *Shorea leprosula* (普遍種)

*Shorea*を対象とした遺伝学的研究は行われているが、少数の遺伝子座を用いた研究がほとんどを占めており、ゲノムレベルでの研究はほとんど存在しない。ゲノムレベルの遺伝的変異データは、集団の構造や動態を推定するためには不可欠である。本研究ではまずゲノムレベルの解析を行うために必要となるライブラリの構築を行った。*Shorea balangeran*と*Shorea leprosula*それぞれからRNAを抽出し、次世代シーケンサーRoche FLX 454を用いてcDNAライブラリの構築を行った。その結果、*Shorea balangeran* (*S.bal*)からは6169配列、*Shorea leprosula* (*S.lep*)からは7520配列を得た。得られた配列のうちそれぞれ2682配列、2904配列について機能を推定することができた(*S.bal*の結果について図(5)-3に示す)。



図(5)-3 *S.bal*から得られた転写産物の機能分布(生物学的プロセス)

また、遺伝マーカーを構築するため、これらの配列のうち両種に共通して存在しかつ機能を推定することのできた438配列をもとにして、PCRプライマーの設計を行った。159遺伝子座についてプ

ライマーデザインを完了し、両種においてその増幅を確認した。159遺伝子座からさらに96遺伝子座に絞り込み、PCRを行って増幅した後、次世代シーケンサRoche FLX 454を用いて配列の解析を行った。遺伝的変異を求めたところ、遺伝子座ごとに変異量のばらつきが非常に大きかった。この解析結果が実際の変異量を正確に反映しているものなのか、あるいはデータ処理上の見かけのものなのか、現時点では両方の可能性を排除できない。今後さらに詳細にデータ解析を進めていく必要がある。

Shorea balangeran (希少種) と *Shorea leprosula* (普遍種) に加え、7集団からサンプルされた *Shorea parvifolia* (普遍種) 78個体について5核遺伝子座の遺伝的変異パターンの解析を行い、ボルネオ島とスマトラ島-マレー半島との間に遺伝的な分化が存在することを確認した。シミュレーションから分集団の分岐がおよそ300,000年前であると推定された。この結果は論文にまとめ投稿し、受理された。

(3) *Myoporum bontioides* (絶滅危惧種)

10カ所の核SSRマーカーを用いた研究では、遺伝的変異を検出することができなかった。同様に、5カ所の葉緑体遺伝子領域においても、1サンプル1遺伝子座 (*trnL-trnF*領域)を除き、変異を検出することができなかった。この結果から、以下のように考察することができる。

本来SSRマーカーは変異率が高く、遺伝的変異を多く含んでいると考えられている。にもかかわらず、我々の研究では10カ所のSSR遺伝子座において変異を検出することができなかった。我々が設計したSSRマーカーはゲノム中からランダムに選んだものであり、従ってもし実際に集団が変異を保有しているのであれば、10遺伝子座すべてで変異を観察できないということは考えられない。他方で、本研究で用いたSSRのリピート数が小さくまたSSRの突然変異率はリピート数と正の相関があるという説もあるため、今回用いたSSRマーカーに多型が少なかつただけであるという可能性は排除できない。今後、さらにリピート数の多い領域を用いて解析することでこの点については明らかにすることができるであろう。さらに葉緑体上の5カ所の非コード領域の配列を決定した。非コード領域はコード領域に比べて突然変異率が高いため多型を多く保持しており、多くの研究において集団レベルで遺伝的変異を比較するとき用いられている。しかしながら、SSRの場合と同様にただ1個体において一つの塩基置換が見つかったただけであった。

SSRの結果とあわせて考えると、この結果は *M. bontioides* の九州地方の集団と少なくとも一部の中国の集団において遺伝的変異が存在しないという結論を導くことができる。この結論に対して、いくつかの要因を考えることができる。まず、*M. bontioides* はお互いに枝や根が絡み合っている灌木である。従って個体の判別が容易ではなく、同一個体が複数回サンプルされる可能性を考えることができる。しかしながら我々のサンプルは異なる茂み、異なる島など異なる地点からとられている。よって同一個体からのサンプルが混ざっているという要因だけでは今回の結果を説明することはできない。第二の要因としては、日本の *M. bontioides* は分布の端に位置するという事実がある。さらに、人為的な影響により生息域の急激な現象にさらされたという点も挙げることができる。

我々の研究において明らかにされた遺伝的変異が非常に少ないという事実は、現在および将来の *M. bontioides* 集団の適応度に対し悪影響を与えることが考えられ、結果として絶滅のリスクを高めることが考えられる。本研究の結果は2010年3月にマレーシアのクアラルンプールにおいて開催

された国際会議 “Sustainable Utilisation and Conservation of Forests in the Genomics Era” において発表した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで絶滅の危機に瀕している生物の遺伝学的研究は限られていた。あるとしても絶滅危惧種のみを対象にした研究が主であった。近縁関係にある希少種・普遍種について、平行して集団遺伝学的解析を行なった研究例はこれまでに無い。系統関係が近くかつ異なる状態にある二種の遺伝的変異をセットで調べることで、熱帯樹木種の絶滅の遺伝的要因について新たな知見をもたらすことができた。

(2) 環境政策への貢献

遺伝的変異をマーカーとして希少種および絶滅危惧種の保全・維持を行うためには、その種が本来持つべき遺伝的多様性の量やパターンを正当に評価する必要がある。本サブテーマの目的は熱帯樹木種の遺伝的多様性のいわば標準状態を明らかにし、絶滅リスクを査定するために必要な客観的知見を提供するものである。本研究のような遺伝学的研究は熱帯林の状態の正当な評価や保全方針の立案に貢献できると考えている。環境政策や保全ガイドラインの作成に反映されるよう、さらなる発展的研究の推進や成果の普及に勤める。

6. 国際共同研究等の状況

本研究は、以下の研究・教育機関との共同研究により実施された。

Dr. Iskandar Siregar, Department of Silviculture, Faculty of Forestry, Bogor Agricultural University, Indonesia

Dr. Phi-Hong Hai, Research Center for Forest Tree Improvement, Forest Science Institute of Vietnam, Vietnam

Dr. Suchitra Changtragoon, Royal Forest Department, Thailand

Dr. Xiao-Ru Wang, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, China

Dr. B. Nagarajan, Institute of Forest Genetics and Tree Breeding, Coimbatore, India

Dr. Marjan Khalili Mahani, Umea University, Sweden

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) H. IWANAGA, K. M. TESHIMA, I. A. KHATAB, N. INOMATA, R. FINKELDEY, I. Z. SIREGAR, U. J. SIREGAR, and A. E. SZMIDT: Ecology and Evolution, in press (2012)

“Population structure and demographic history of a tropical lowland rainforest tree species *Shorea parvifolia* (Dipterocarpaceae) from Southeastern Asia”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（２）口頭発表（学会等）

- 1) Alfred Szmidt: IUFRO Kuala Lumpur (2010)
“Genetic diversity of a mangrove-like species, *Myoporum bontioides*”
- 2) Wei Lun Ng, Nobuyuki Inomata, Makoto Yoko-o, Mutsunori Tokeshi, Alfred E. Szmidt:
Sustainable Utilisation and Conservation of Forests in the Genomics Era (2010)
“Genetic diversity of a mangrove-like species, *Myoporum bontioides*”
- 3) Alfred Szmidt: Workshop for initiating a global genetic diversity assessment (2012)
“Genetic diversity loss of tropical trees in Asia”

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない

（４）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

（６）その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) DeSalle R (2005) Conservation genetics - Genetics at the brink of extinction. *Heredity*, **94**, 386-387.
- 2) Excoffier L, Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.
- 3) Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- 4) Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**, 131-140.
- 5) Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- 6) Kärkkäinen K, Koski V, Savolainen O (1996) Geographical variation in the inbreeding depression of Scots pine. *Evolution*, **50**, 111-119.

- 7) Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.
- 8) Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**, 4321-4325.
- 9) Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- 10) Nguyen HN (1993) Two-flat-needle pine endemic to Vietnam. *Forestry Review*, **32**, 10-11.
- 11) Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- 12) Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **24**, 4876-4882.
- 13) Watterson G (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, **7**, 256-276.
- 14) Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.

(6) 遺伝的劣化評価 3 - 希少種および絶滅危惧種の解析 (マングローブの遺伝的変異)

福岡女子大学 人間環境学部 小泉 修 美濃部純子
国際文理学部 猪股伸幸 (平成23年度)

平成21～23年度累計予算額：25,927千円

(うち、平成23年度予算額：6,542千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] マダガスカル全域から、マングローブ樹種のうち、オヒルギ、マヤプシキ、ヒルギダマシの生態的状態の記録とサンプル(葉)を採集した。オーストラリアの東北部の数地域からオヒルギ、マヤプシキ、ヒルギダマシの生態観察とサンプル採集を行なった。西表島の数地点にて、オヒルギ、ヒルギダマシ、マヤプシキ、ヒルギモドキの生態観察とサンプルの採集を行った。これらのサンプルからDNAを抽出し、核遺伝子および葉緑体DNAの変異解析を行った。この結果、熱帯地方全体を考えると、核遺伝子および葉緑体DNAによっても、それなりに遺伝的多様性が見られた。しかし、遺伝子タイプは、5地域に明確に区別でき、各地域内の遺伝的変異は非常に低く、分化していることが判明した。更に、マングローブ樹種3種について広域な分布域内の12地点でサンプル採集を行い、DNAを抽出した。葉緑体と核遺伝子数個について種内変異を解析した。オヒルギについては、各地域内の遺伝的変異は非常に低く、海域ごとに分けられる5地域グループ間のハプロタイプの遺伝的分化は大きかった。ヒルギダマシとマヤプシキについては、オヒルギよりさらに遺伝的変異が低い傾向が見られた。マングローブ林構成種に特徴的な大きな遺伝的分化と低い地域内変異は、今後のマングローブ林の保存・再生を考える際に十分に考慮されるべき特徴と思われる。上記の暫定的な結論を更に検証するために、最終年度ではマングローブ3種について分布域全域をカバーする広域集団について遺伝的多様性と集団構造について解析した。得られた結果にもとづいて遺伝的に劣化していると思われる種や地域集団を明らかにし、絶滅のリスクを検討した。また、絶滅危惧集団を保全するための植林ガイドラインを作成した。

[キーワード] マングローブ、葉緑体DNA、核遺伝子、遺伝子種内変異、遺伝子多様度

1. はじめに

熱帯から亜熱帯地域の河口汽水域に形成されるマングローブ林はCO₂吸収源として地球温暖化防止に役立っており、豊かな生態系をつくるのにも重要な働きをしている。しかし、FAO(国連食糧農業機構)によると、過去25年間(1980-2005)に世界のマングローブ林の20%が失われており、とくにアジア・太平洋地域での減少が著しいとされる。従って地域によっては、普通種であったものが希少種や絶滅危惧種化している可能性がある。マングローブ林の消失を防止するためには、減少しつつある集団の適応力(生存力)が低下しているのかどうかを調べるのが重要である。そこで本研究では、マングローブ樹種について、遺伝的変異量と遺伝的集団構造を解析した。

2. 研究開発目的

我々はこれまでに、広い分布域を持つオヒルギを西表、東南アジア、インド、マダガスカル、オーストラリアで採取し、核遺伝子*GapCp* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、と葉緑体*trnL-trnF* の変異を調べてきた¹⁾。本研究では対象とするマングローブ樹種の数と採集地を増やし、同様に核と葉緑体DNAの遺伝子領域も増やしつつ遺伝的変異の解析をすすめた。

3. 研究開発方法

サンプルはオヒルギ (*Bruguiera gymnorrhiza*)、ヒルギダマシ (*Avicennia marina*)、マヤブシキ (*Sonneratia alba*) を用いた。採集はマダガスカル、オーストラリア、西表島 (21年度) インドネシア、タイ、ベトナム (22年度) で行った。葉からCTAB法を用いて全DNAを抽出した。マーカーとして21年度は、葉緑体遺伝子 (*trnL-trnF* 間スペーサー領域) と核遺伝子3領域 (*GapCp*、*Acl*、*PAL*) を用い、22年度は新たに*trnL*のイントロン領域と*mangrin* (核遺伝子) を加えた。

最終年度においては、前2年間で得られた暫定的な結論を更に検証するために、マングローブ樹種のオヒルギについて分布域全域をカバーする以下の10地点の集団サンプルを解析した。：(1) ハノイ (ベトナム)、(2) クチン (マレーシア・ボルネオ島北西部)、(3) バリ (インドネシア)、(4) ケアンズ (オーストラリア北東部)、(5) バリナ (オーストラリア南東部)、(6) ランカウィ (マレーシア・マレーシア半島西部)、(7) カキナダ (インド東部)、(8) ゴア (インド西部)、(9) トラニャロ (マダガスカル南東部)、(10) モロンダバ (マダガスカル西部)。各地点から10-15個体、合計140個体のゲノムDNAを抽出した。また、オヒルギの近縁種*Bruguiera sexangula*をマレーシア半島西部集団より入手し、9個体からゲノムDNAを抽出した。新規に核遺伝子8領域の遺伝子領域の増幅を確立した。既存の領域と合わせて、核遺伝子10領域、葉緑体遺伝子1領域をPCRで増幅し、必要に応じてクローニングを行い、オヒルギとその近縁種*Bruguiera sexangula*の149個体について塩基配列を決定した。この配列情報をもとに集団遺伝学的解析を行った。

4. 結果及び考察

(1) オヒルギ (*Bruguiera gymnorrhiza*)

葉緑体*trnL-trnF* 間スペーサー領域：21年度は西表からオーストラリア、インド、マダガスカルにわたり108個体のサンプルについて300塩基配列を決定し、6つのハプロタイプ (cp1~cp6) を報告した。22年度はベトナムの40個体について塩基配列を決定した。40個体全てがハプロタイプ cp2であり、集団内に変異は見られなかった。この結果は昨年までの地域グループごとのハプロタイプ分布に一致していた。ハプロタイプの地理的分布を図(6)-1Aに示した。

葉緑体*trnL* のイントロン領域 (c-d)：22年度に西表から東南アジア、オーストラリア、インド、マダガスカルにわたる10集団165個体について603塩基配列を決定した。全個体で塩基配列が一致し、全集団でも変異は全く見られなかった。

核*GapCp* 遺伝子：10集団86個体のサンプルについて、572塩基の配列を決定し、その内コード領域は149塩基であった。コード領域内では変異は見られなかった。5つのハプロタイプ (ga1~ga5) を報告し、それらの地理的分布を示した (図(6)-1B)。(21年度)

核*Acl* 遺伝子：21年度は6集団111個体の493塩基配列を決定した。全塩基のうち6サイトで変異がみられ、6つのハプロタイプ（*Acl1*～*Acl6*）を報告した。22年度はマレーシアの2集団から10個体の配列を決定した。7サイトで変異がみられた。マレー半島西側では*Acl3*が、ボルネオ島では2つの新しいハプロタイプ（*Acl7*、*Acl8*）が見られた。地理的分布を図(6)-1Cに示した。

核*PAL* 遺伝子：21年度は6集団53個体から861塩基配列を決定した。4つのハプロタイプ（*PAL1*～*PAL4*）を報告した。22年度は西表とマレーシアの3集団の15個体の配列を決定した。西表とボルネオ島の集団では*PAL3*のみ見られた。マレー半島西側では新しいタイプ*PAL5*が見られた。

核*mangrin* 遺伝子：西表から東南アジア、オーストラリア、マダガスカルにわたる10集団111個体について1052塩基配列を決定した。全集団では9種類のハプロタイプが確認された（*mg1*-*mg9*）。これらの地理的分布を図6-1Dに示した。インドネシアとオーストラリアの集団では複数のハプロタイプが見られたが、それ以外の7集団では1タイプしか見られなかった。（22年度）

オヒルギの上記6つの遺伝子領域について、塩基多様度および固定指数を表(6)-1に示した。上記の結果を考えあわせると、オヒルギ集団においては、（1）そのハプロタイプの分布は、数箇所の地域に明確に分けることができ、（2）集団全体では、遺伝子変異は他の植物と比較しても低くない程度に見られるが、各地域内では非常に変異が低いことが判明した。

（2）ヒルギダマシ (*Avicennia marina*)

21年度は葉緑体*trnL-trnF* 領域の294塩基配列を152個体について決定した。西表、マダガスカル

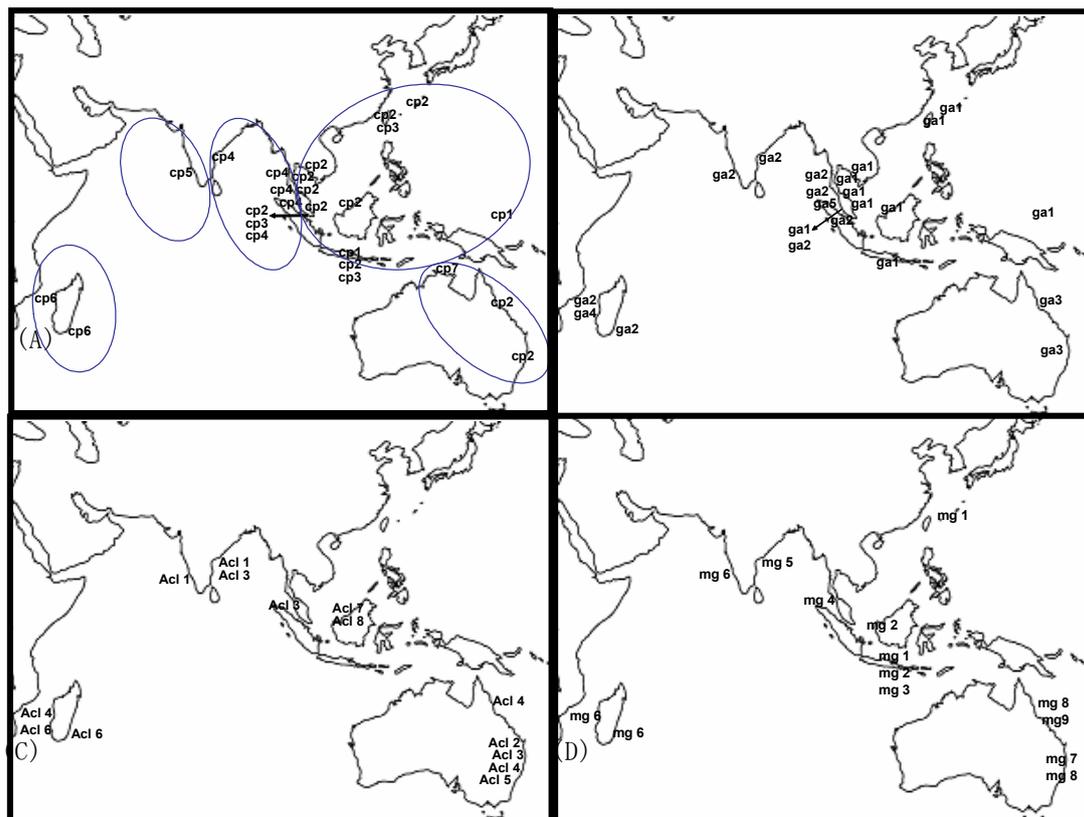
の4集団、オーストラリアの3集団の全サンプルで塩基配列は一致し、変異は見られなかった。22年度は複数の核遺伝子について塩基配列決定を試みた。

（3）マヤブシキ (*Sonneratia alba*)

葉緑体*trnL-trnF* 間スペーサー領域：西表、マダガスカル、オーストラリアの6集団の95個体から379塩基配列について決定した。全個体で塩基配列は一致し、変異は見られなかった。

核*GapCp*遺伝子：西表、オーストラリア、マダガスカルの6集団137個体について521塩基の配列を決定した。全個体で塩基配列が一致し、全集団でも変異は全く見られなかった。

ヒルギダマシ、マヤブシキについては、今回調査した遺伝子領域に関しては、広範囲にわたり多様性が全く見られなかったのも、オヒルギよりもかなり多様性が低くなっており、環境変化に対してさらに脆弱な可能性が示唆された。上記の暫定的な結論に対して、より、正確な検証を行った最終年の結果は、以下の通りである。オヒルギ全集団における核遺伝子10領域の平均の塩基多様度 (π) は0.0078で、葉緑体遺伝子1領域の塩基多様度は0.00008であった。この結果は、核遺伝子の方が葉緑体遺伝子より高い多様度を持つことを示す。遺伝的多様性、集団構造の解析には、核遺伝子の方が葉緑体よりも有効であるということが示唆された。各集団における核遺伝子10領域の平均の塩基多様度は、0（インド2地点）～0.004（ベトナム）であり、集団ごとに変異量に差異があることがわかった。種としての変異量0.0078は樹木のみならず草本種を含めた他の植物種と比べても見劣りするものではないが、インド2地点のように集団内に変異が認められない場合が見つかった。これらの集団は環境変化に対して脆弱である可能性が考えられる。



図(6)-1 ハプロタイプの地理的分布 (A) *trnL-trnF*、(B) *GapCp*、(C) *Acl*、(D) *mangrin*

表(6)-1 *Bruguiera gymnorrhiza*の5つの遺伝子領域における塩基多様度および固定指数

	地域集団の平均 (π_s)	全集団 (π_t)	固定指数 (F_{ST})
<i>PAL</i> (コード領域)	0.00015	0.00152	0.901
<i>Acl</i> (コード領域)	0.00089	0.00364	0.756
<i>mangrin</i> (コード領域)	0.000412	0.00266	0.818
<i>GapCp</i> (コード領域)	0.00000	0.00000	-
<i>trnL-F</i> (非コード領域)	0.00003	0.00191	0.983
<i>trnL</i> (非コード領域)	0.00000	0.00000	-

AMOVAによる集団構造解析の結果、 F_{ST} は0.853であり、集団間に遺伝的分化があることが明らかになった。さらに、STRUCTUREによる集団構造解析によって以下の3つの地域集団A、B、Cに分かれることが示唆された。それらは、A:マレー半島東部～バリ島（研究開発方法中の(1)～(3)）、B:オーストラリア（研究開発方法中の(4)、(5)）、C:マレー半島西部～インド～マダガスカル島（研究開発方法中の(6)～(10)）である。地域集団AとB間、地域集団BとC間では遺伝的流動の存在が示唆されたが、遺伝的に異なる地域集団をまたぐような植林は避けることが望ましいと考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

マングローブの主要な樹木オヒルギについて、その生息域全体について、その遺伝的構造とその遺伝子タイプの地域分布を明らかにした。マングローブ(オヒルギ)では地域集団毎の遺伝的多様性は非常に低いが生種全体としてみたときの多様性は陸上の植物と同程度かそれ以上であることが分かった。また、分布域全体で大きく区分される遺伝構造があることが判明した。

(2) 環境政策への貢献

マングローブ樹種に共通な特徴である、高い地域間分化と低い地域内の遺伝的変異は、マングローブの維持・再生を図る際に考慮する必要がある。

本研究に伴い、最終的に以下の様な提言を行うことができた。

マングローブ樹木種の遺伝構造の解析結果に基づく植林ガイドライン：

- 1、IWP (Indo-West Pacific)地域のマングローブ集団は大局的には3つの遺伝的グループ（マレー半島西側、東側、オーストラリア）に分けることが出来る。遺伝的かく乱を避けるためにこれら3つの遺伝的に異なる地域集団をまたぐような植林は避けること。
- 2、上記遺伝的グループはそれぞれが地域特異的な遺伝的構造をもつ分集団より構成されている。植林は同一集団からの個体または種子を使用すること。
- 3、上記2に付随し、それぞれの集団の遺伝的構成を反映するように個体または種子の数を調整して植林を行うこと。
- 4、遺伝的変異が全く認められない分集団が確認された。これらの集団は環境変化に対して脆弱である可能性が考えられ、絶滅リスクが高い可能性が考えられる。当該集団よりシードバンク等を準備し、将来的な森林の再生（植林）に備えておくことが望ましい。

6. 国際共同研究等の状況

本プロジェクトにおいて、現地におけるサンプル採集と生態的観察に協力したカウンターパートは以下の通りである。 オーストラリア：Southern Cross Univ. P.Saenger教授、マダガスカル：Antananarivo大学 L. Faliniaina博士、西表島：琉球大学熱帯生物圏センター西表実験所 馬場繁幸教授、渡辺信准教授、インド：French Institute of Pondicherry B.R. Ramesh博士、インドネシア：Bogor大学 Kusmana博士、ベトナム、H.Hai博士。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 小泉修：福岡女子大学広報、No.74,7(2009)

「環境省地球環境研究総合推進費プロジェクト」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 遠藤美佳、美濃部純子、小泉修、山崎常行：三学会九州支部第62回大会（2009）
「マングローブの一種オヒルギの遺伝的多様性と地域分布」
- 2) 永石美聡・美濃部純子・梅崎佐和子・小泉修：三学会九州支部第63回大会（2010）
「マングローブの一種オヒルギの遺伝的多様性と地域分布Ⅱ」
- 3) 河野安希子・美濃部純子・梅崎佐和子・小泉修：三学会九州支部第64回大会（2011）
「マングローブの遺伝的多様性と地域分布Ⅲ」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Minobe S, Fukui S, Saiki R, Kajita T, Changtagoon S, AbShukor N, Latiff A, Ramesh BR, Koizumi O, Yamazaki T (2010) Highly differentiated population structure of a Mangrove species, *Bruguiera gymnorhiza* (Rhizophoraceae) revealed by one nuclear *GapCp* and one chloroplast intergenic spacer *trnF-trnL*. *Conservation Genetics*, **11**, 301-310.

(7) 遺伝的劣化評価 3 - 希少種および絶滅危惧種の解析 (マダガスカル方式による多様性保全を目指した造林)

財団法人 進化生物学研究所
資源植物研究室 主任研究員

吉田 彰

<研究協力者>

財団法人 進化生物学研究所
資源植物研究室 研究員

蒲生 康重

財団法人 進化生物学研究所

多肉植物研究室 研究員

橋詰 二三夫

マダガスカル国立アンタナナリヴ大学

理学部 准教授

Lucien Faliniaina

平成21～23年度累計予算額：13,883千円

(うち、平成23年度予算額：2,382千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 自然林の減少は年を追うごとに深刻化し、もはや保護保全だけでなく積極的な復元が急務になりつつある。そこで重要なのが、森林面積の回復のみならず、種および遺伝的多様性が自然林集団に近い森の再現である。なぜなら、自然林は、動物の生息空間であり、地域住民の生活と文化の基盤だからである。したがって、こうした活動は地域住民の理解と協力なしに成り立たず、持続もしない。本研究は、マダガスカル南部乾燥地に固有の乾生林で地域住民とともに20年にわたって自然林の復元保全に取り組み、その実績が高く評価されている日本のNGO、ボランティア サザンクロス ジャパン協会の活動を、自然科学および社会科学の両面から調査解析し科学的評価を加えるととともに、この種の活動に一般的に適用し得る要素を抽出し、「地域システム」としての森林復元保全のガイドラインを提示するものである。

[キーワード] 自然林、多様性、復元保全、地域システム

1. はじめに

近年、減少の一途をたどり、もはや保護だけでは存続が危ぶまれる自然林は、積極的な復元保全の手立てが施されなければならない状況に置かれている。しかしながら、単に森林面積を回復させればよいという問題ではない。自然林のもつ植物種とその遺伝的多様性を最大限に継承することが重要で、これによって森は健全性と持続性を保つことが可能になる。自然林は、さまざまな動物種の生息空間であり、地域住民にとっては生活や伝統文化を支える基盤でもある。すなわち、この3者はいわば一蓮托生なのである。

ところで、自然林減少の一因が地域住民の生活様式の変化にあるのは疑う余地がない。その変

化をもたらしたのは、直接的にしる、間接的にしる、グローバルゼーションによる経済環境の変化である。これは、もはや不可逆的なものであると考えてよい。そして、森林減少をもたらしたのは地域住民だとすれば、それを復元し保全して行ける立場にあるのも彼らである。森林の多様性を維持する理論や造林手法が重要なのはもちろんだが、森林復元において最も困難な問題は、じつは地域住民との関係である。したがって、彼らの理解と協力なくして実現はおぼつかないと言っても過言ではない。それには、住民に大きな負担を与えず、成果が何らかの実利につながり、主体性をもって取り組める環境を作り出す方策が望まれる。

本研究はこの点に注目し、マダガスカル南部フォールドファン市の西方約60kmの乾燥地において地域住民とともに20年にわたり森林の復元保全活動に携わり、その実績が高い評価を得ている日本の環境NGO、ボランティア サザンクロス ジャパン協会の活動をモデルケースとし、「地域システム」という観点から調査研究を行った。

この活動が行われている地域に固有の乾生林は、種の固有率が90%を超すマダガスカル国内でも有数の希少かつ特異な植生である。異様ともいえるその植生景観は、地球上に類を見ない。また、年間降水量が500mmに満たない過酷な自然環境のため荒廃すると再生がきわめて困難であり、近年急速に進む資源利用と開発による絶滅が危惧されている。この活動は、ときに住民に不利益な規制を伴う自然保護の排他性や、多様性保全への配慮を欠く植林の実利主義を良しとせず、自然環境を担う一員として地域住民を尊重する「自然林復元」を理念に掲げる。そして、自然景観の維持と住民生活の安定に一定の成果を挙げつづけていることは、多くの人が認めるところとなっている。しかし、その成果の科学的検証は、これまで充分になされなかった。本研究は、自然科学および社会科学の両面から調査解析を加えることで、この活動のもつ特異性と普遍性を把握し、森林の復元保全に対する指針の提示を試みるものである。

2. 研究開発目的

森林の復元保全の手法は、地域の自然環境や社会環境により異なるのは当然だが、一方、各地で共有しうる基本的かつ有効な手法や条件も少なからずあると考えられる。そこで、この種の取り組みとして大きな成果を挙げているマダガスカルの事例の調査解析に基づく科学的検証により普遍的な要素を抽出し、ガイドラインとして提言することを目的とした。

3. 研究開発方法

自然科学的調査研究

- ・ *Alluaudia procera*の挿し木による復元林集団と自然林集団との比較調査研究
- ・ 薬用植物の種類と用途に関する聞き取りおよびフィールド調査
- ・ 製炭用樹木の種類と材質、および分布頻度につき聞き取りおよびフィールド調査
- ・ シードボール（種子を埋蔵した土球）による種子繁殖法の導入試験研究
- ・ 衛星画像による森林減少の推移の比較解析

社会科学的調査研究

- ・ 製炭法および作業日数と木炭1袋（平均30kg）の価格の聞き取り調査、1袋あたりに使用する原木重量の実測調査
- ・ 木炭1袋と等価の木彫の個数の聞き取り調査と、それに使用する原木重量の実測調査

- ・ 村落の27家族を対象とする生業とそれぞれの年間収入の聞き取りによる社会調査

4. 結果及び考察



図(7)-1 ディディエレア科 *Alluaudia procera*

(1) 自然科学的調査研究

*Alluaudia procera*は固有科ディディエレア科に属し、現地植生を優占する代表的樹種である（図(7)-1）。板材に最適な木材資源として経済価値があり、挿し木繁殖が容易なことから、これまでの森林復元のための植栽樹種として専ら用いられてきた。現場での直挿しの活着率は60%前後で、厳しい環境の乾燥地としてはきわめて効率のよい造林が可能で、20年間の植栽本数は11万本、植生復元面積は1,000ha近くに達する。挿し木はクローン増殖なので遺伝的多様性維持の観点からは好ましくないとされるが、雌雄異株の本種は周囲の自然林の雄株からの送粉により種子形成する確立が高いと考えられ、次世代における多様性回復が期待できる。その検証のため復元林集団から採種育成した次世代の遺伝子解析を計画したが、気候不順で発芽生育が悪く十分な資料が得られなかった。

薬用植物の調査では162種が認められ、現地名とあわせて効能、使用部位、処方の情報収集を行った。製炭用樹種の調査は、同定用の標本採集を兼ねてフィールドで調査を行い村落周辺のみで32種を認めた。同時に、聞き取りにより材質と分布頻度の情報を収集した。これらの調査は、純林に近い状態の*A.procera*復元林に、今後、生活資源になりうる樹種を付加するための基礎資料とするものである。収集した情報から判断した結果、薬用、製炭用の樹種はいずれも栄養繁殖が困難なハードウッドの種類で種子繁殖が必要とわかり、遺伝的多様性維持の観点からも好ましい。

極度に乾燥した現地の環境下では直播による種子繁殖の効率が極めて悪く、その改善を目的にシードボール法の導入を計画し、試験を行った。結果調査の便宜上、植被の少ない平坦な場所を選んでAntanivinaky, Ranomainty, Ankapokaの3村に試験圃場を設け、平成22年度の雨季（2月上旬）に開始した。試験に供した種子は延べ9種で、*Adansonia za*, *Cordia varo*, *Terminaria monoceros*の3種は各村に共通、残り6種は適宜各村に2種ずつ振り分けた。シードボールの素材はその土地の土壌と粉碎した蟻塚の2区を設け、水で練って硬球大の大きさとし、それぞれ種ごとに10粒ずつ包埋した。シードボールの設置は地表と部分埋設の2区を各圃場に2列ずつ設けた。すなわち、供試したシードボールは1圃場につき40個、合計120個である。実地への適用に即し、結果調査は平成23年度の1月下旬、すなわち約1年後の生存率について行った。生存率はきわめて低かったが、地域住民の報告によると試験開始直後の発芽は概ね良好だったようで、年間8か月以上の乾季に炎天下

の圃場の厳しい環境下で多くが枯死したと思われる。シードボールの素材については、挿し木繁殖で好成績が得られるという経験則に基づき蟻塚の区を設けたが、一般土壌よりやや優位な結果が得られた。また、設置方法では有意差がないと言える（表(7)-2）。

表(7)-2 種子の発芽試験の結果

Survived species and its rate							
<i>Acacia farnesiae</i>		<i>Adansonia za</i>		<i>Cardia varo</i>		<i>Terminalia monoceras</i>	
16/320	5.00%	38/960	4.06%	12/960	1.25%	1/960	0.10%
Species notd survived							
<i>Arariothamnus vaginata</i>		<i>Gyrocarpus americanus</i>		<i>Rhus sp.</i>		<i>Strychnos decussata</i>	
<i>Terminalia sp.</i>							
Survival rate depending on seed-ball material				Survival rate depending on embedding condition			
powdered anthill		soil		partially buried		put on the ground	
38/68	55.90%	30/68	44.10%	35/68	51.47%	33/68	48.53%

ところで、残余のシードボールを圃場外に無作為に放置したところ、ブッシュの樹陰で多くの生存苗が認められた。このことから、適当な樹陰を作る前駆植生の育成がきわめて有効と考えられる。供試した樹種の中では、発芽率、性状とも*Acacia farnesiae*がこれに適している。

また、活動開始当時の1991年7月、2001年9月、2006年9月、2010年10月の衛星画像を比較したところ、植生が復元された部分は解像されないほど狭い範囲に過ぎないが、伐採された部分は明瞭に確認できる面積である。しかし、活動区域とその周辺を較べると、その進行速度はあきらかに遅いことが見てとれる。

(2) 社会科学的調査研究

製炭に関して作業日数と価格について聞き取り調査を行った。炭焼の作業は大まかに、原木の採集、長さ揃えと太さの仕分け、枠を組みと積み上げ、土砂をかぶせ窯を築造、焼成、冷却、袋詰め工程があり、窯の規模にもよるが、全行程に3~4週間を要する。生産量は1回あたり10~15袋である。販売単位は平均30kg入りの袋で、単価は3,000アリアリ（2012年1月現在で約120円）である。また、原木の重量を実測し1袋あたりに換算したところ、約180kgであった。これに対し、木彫について同様の調査を行ったところ、最も売れ筋の小さなサル単価は1,000アリアリで、3個が木炭1袋分に相当する。これに用いる原木は100g程度の乾燥材である。製炭のような一定の工程がないので正確な作業日数は確定できなかった（図(7)-3）。

また、1村落における主要な生業とそれぞれの年間収入につき27家族を対象にアンケート調査を行ったところ、職種別で1位が製炭8家族の33.61%、2位が木彫5家族30.45%、3位が農業14家族の24.21%、4位が製材4家族の7.95%、5位がコーヒーショップ1家族の3.78%で、無職無収入が3家族であった。

(3) 総合考察

活動地域においても森林減少は進んでおり、その最大の原因は製炭にあると考えて間違いない。しかし、活動地では周辺地域に較べて減少速度がきわめて緩やかなことが衛星画像から読み取れ、この活動が森林減少の抑止に大きく貢献していることは明白である。では、何がその抑止力になっているのだろうか。

まず、製炭と木彫を比較すると、等価収入に対する使用森林資源の差には歴然たるものがある。しかも木彫には乾燥材が適し、自然倒木を採集するので生木を伐採することはなく、実質的な森林への負荷はゼロである。木彫に従事するのは製炭からの転向者である。そして、15年にして村の経済の3分の1近くを担うようになった。その収入は旅行者や民芸品業者など外部からもたらされる。それが村の経済を底上げし、村はそのぶん豊かになった。彼らはすべてが専業であり、例えば食料を購入することで農業従事者を潤す。農業を営む家族のうち5家族は製炭を兼業しており、多少なりとも製炭への依存度が軽減したであろう。また、そうした経済効果は活動地内の他の2村にも及んでいるはずである。そのことは、水源森林観光省フォルドーファン支所の2010年の製炭量統計資料にも表れている。すなわち、活動地で製炭を営む2村の年間合計が2,027袋なのに対し、活動地外の3村共同の出荷量は33,600袋である。それぞれの従事者数が示されていないが、それを差し引いてもおそろべき大差である。森林の問題は、住民をも含めた「地域システム」の問題とみなすことができるのである。(図(7)-3)



図(7)-3 森林の持続的復元保全システムを実現する地域システムの例

ところで、都市ガスが皆無のマダガスカルにおける森林減少は、主に都市部の人口増加に伴う木炭需要の増加にある。したがって、ある地域で木炭の生産を抑制すれば、その分が他の地域にしわ寄せが及び、自然林はおろか植林地までがどんどん草原化することになる。この状況を言い換えれば、炭を焼いていれば食いつぱぐれがないということで、この状況は当分の間続くと予想できる。もしかして、今、森林復元以上に必要なのは、草原化した土地に、持続的に木炭が生産できる日本の里山のような森林運営システムを構築することではないか。しかしながら、マダガスカルにおいては保護保全を謳う政策ばかりで、その根源に思いをいたし、解決に動こうとする気配は、今のところ見られない。

以上に述べてきたことから普遍性のあることがらを抽出して策定した森林復元保全のガイドラインの概要を以下に示す。

- ・ 遺伝的多様性保全を目指す造林には種子繁殖が望ましく、シードボール法が有効な手段となりうる
- ・ 植生遷移を経た熱帯極相林の構成樹種はほとんどが陰樹で、森林復元には前駆林を経ることが必須と言える
- ・ 前駆林の育成には、最終目的とする樹種の生育と極相林への遷移を妨げない樹種の選定が極めて重要
- ・ 前駆林の樹種は在来種が理想的だが、上記の条件を満たすなら外来樹種の利用も検討すべきである（注：外来樹種の人工林内に自然種子散布による自然林構成樹種の若木が順調に生育する例を観察している）
- ・ 前駆林育成には、採種と発芽が容易、用材・薪炭材・蜜源などとして経済的付加価値があるなど、造林に携わる現地住民への負担が軽く、なおかつ生活資源をもたらす樹種が望ましい
- ・ 森林の復元保全の実現には、理論にとどまらず、自然環境と社会環境の双方を配慮し、それらの共存を図る「地域システム」という理念を基本に据えることが肝要である
- ・ 森林減少を招く直接的、間接的要因を把握し、その解決策をシステムに組み入れる
- ・ 「地域システム」を動かす主役は、地域住民であることを忘れてはならない

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

海外における森林復元保全事業において、これまで副次的に扱われることの多かった地域住民の生活環境につき社会科学的視点から調査解析を加え、実際に現場を担う彼らの役割に正当な認識を与えた。

(2) 環境政策への貢献

マダガスカル共和国水源森林観光省大臣が現地を視察し、従来の自然保護政策とは一線を画す住民自らが主体となった新たな取り組みを評価され、その後、会見を果たした際にこの方式の普及を依頼された。また、南部乾燥地に特有の自然と植生景観を資源として社会教育と観光振興に活用するアイデアの提案を求められた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 吉田 彰：国立民族学博物館調査報告, 103, 55-72 (2012).
「第3章 地域文化を育む自然環境とその継承」

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

（2）口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

（3）出願特許

特に記載すべき事項はない

（4）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない

Establishment of methods for assessing forest degradation caused by deforestation and maintenance of biodiversity

Principal Investigator: Ko Harada

Institution: Faculty of Agriculture, Ehime University
3-5-7 Tarumi, Matsuyama-City, Ehime 790-8566, JAPAN
Tel: +81-89-946-9870 / Fax: +81-89-946-9870
E-mail: kharada@agr.ehime-u.ac.jp

Cooperated by: Osaka City University, Kyoto University, Forestry and Forest Products Research Institute, Kyushu University, Fukuoka Women's University, Institute of Evolutionary Biology

[Abstract]

Key Words: Forest degradation, Borneo, Genetic variation, Ecosystems, Rehabilitation, Dipterocarps

This research project was planned to develop methods to evaluate ecological and genetic deteriorations in the Southeast Asian tropical rain forests and further to study how they are related each other. We are also evaluating the past efforts of afforestation intended to conserve genetic diversity and finding new guidelines for conservation and rehabilitation of forest ecosystems.

In the evaluation of ecological deterioration, two subthemes were included. In subtheme 1 (Osaka City University), an integrated study of genetic diversity and forest dynamics of dipterocarp trees in natural and degraded Bornean rain forests revealed that fine-scale spatial genetic structure, pollen dispersal and vulnerability to forest degradation were all related to species-specific ecological traits, such as pollinators, seed dispersal distance, spatial distribution of adult trees, and habitat associations. In subtheme 2 (Kyoto University) soil microbial communities in Malaysia, Indonesia Singapore and Japan were investigated by metagenome and metatranscriptome analyses by using next-generation sequencers. Unprecedented new findings of microbial composition, diversity and metabolic characteristics were obtained.

For the evaluation of genetic deterioration, five subthemes were included, in which two were also intended to evaluate the effects of man-made forests for recovering genetic diversity. Subtheme 3 (Ehime University) was planned to evaluate the genetic variation of local populations of various kinds of dipterocarp species. Phylogenetic and phylogeographic relationships were clarified in *Dryobalanops* species and some *Shorea* species in section Pachycarpae. Genetic variation and genetic structure were also investigated in wide spread species of *Shorea curtisii* and several Indonesian endangered species. Molecular classification database of *Shorea* species was developed in subtheme 4 (FFPRI) using chloroplast DNA sequence data. The genetic

structure of wide spread *Shorea* species, *S. leprosula* and *S. parvifolia*, in Southeast Asia was also investigated to find out the region specific DNA markers and genetic unique populations. Genetic variation of endangered species was investigated in subtheme 5 (Kyushu University) and subtheme 6 (Fukuoka Women's University). Comparative studies were done on endangered and common species of *Shorea* and *Pinus* in subtheme 5. CDNA libraries for these two species were also constructed for metagenomic analysis. Genetic variation of wide spread mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) was investigated in subtheme 6, and three genetically differentiated groups were identified in Indian Ocean, South China Sea, and east coast of Australia. Evaluation of past afforestation efforts was done in Indonesian teak forests in subtheme 3 and for endemic species in the Madagascar dry forests in subtheme 7.

熱帯林の減少に伴う森林劣化の評価手法の確立と多様性維持

D-0901

I. 遺伝的劣化評価

(愛媛大学)
フタバガキ地域集団の
遺伝子解析
・遺伝的変異量と適応度との
関係解明

(森林総研)
フタバガキ広域集団の
遺伝子解析
・種特異的マーカーの開発
・地域特異的マーカーの開発

(九州大学)
希少種・絶滅危惧種の
遺伝子解析
・フタバガキ科を中心に危惧種
のマッピング

(福岡女子大学)
希少種・絶滅危惧種の
遺伝子解析
・マングローブ樹種を中心に
危惧種のマッピング

遺伝的劣化

生態系劣化

DNA解析

逆スパイラル
を試みる

III. 多様性を維持した森林の再生

(愛媛大学)
造林樹種の多様性維持
・遺伝的多様性の初期定着率
に対する影響

(進化生物学研究所)
希少種・絶滅危惧種の多
様性維持
・住民参加型マダガスカル方式
による植林の試み

II. 生態系劣化評価

(大阪市立大学)
繁殖構造による脆弱性
評価
・樹木の繁殖構造の違いと
遺伝的劣化との関係解明

(京都大学)
土壌微生物による指標化
・天然林と二次林の微生物
構成の網羅的解析

遺伝的劣化と生態系
劣化は相互に関係あっ
て、負のスパイラルによ
る森林劣化を引き起す

本研究から得られる科学的知見
熱帯林の遺伝的多様性と生態系の多様性の
相互の関係に対するより深い理解

社会経済的影響
生物多様性の重要性の一般的理解がまる

地球環境政策への貢献
森林劣化の遺伝学的生態学的要因が明らか
になり、これに基づいた生態系保全の方策を
提言

マレーシア熱帯雨林

ベトナムマングローブ林