静岡県における広葉樹の遺伝的構造（2）

静岡県産ケヤキ精英樹のハプロタイプと開芽日との関係

誌名	静岡県農林技術研究所研究報告 = Bulletin of the Shizuoka Research Institute of Agriculture and Forestry
ISSN	18828264
著者名	山田,晋也 山本,茂弘 片井,秀幸 袴田,哲司
発行元	静岡県農林技術研究所
巻/号	3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 33-38
発行年月	2010年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

静岡県における広葉樹の遺伝的構造(Ⅱ)†1

―静岡県産ケヤキ精英樹のハプロタイプと開芽日との関係―

山田　晋也・山本　茂弘・片井　秀幸・袴田　哲司

農林技術研究所森林・林業研究センター

Genetic structure of a broad leaf tree in Shizuoka Prefecture

―The relationship between haplotype and flushing time of *Zelcova serrata* plustrees selected in Shizuoka Prefecture―

Shinya Yamada , Shigehiro Yamamoto, Hideyuki Katai and Tetsuji Hakamata

Forestry and Forest Products Research Center / Shizuoka Res.Inst.of Agric.and For.

Abstract

To clarify the genetic and phenotypic variation of *Zelcova serrata* (Thunb.) Makino, in Shizuoka prefecture, we investigated the flushing time and the geographic distribution of chloroplast DNA haplotypes of *Z. serrata* plus tree done collected from 23 areas located throughout Shizuoka prefecture. Two chloroplast DNA haplotypes, named west and east haplotypes, were found in Shizuoka. These two haplotypes were separated at the boundary of the Abe River and the Ooi River. We examined the relationship between haplotypes and flushing time between 2007 and 2009, revealing that there was a significant difference at the 1% level between average flushing time of the west and east haplotypes. Flushing time of the east type was later than west type, when grown in the western region of Shizuoka.

キーワード:　開芽日　ケヤキ　ハプロタイプ

Ⅰ　緒　　言

静岡県は，県土の64%に当たる50万haは森林であり，そのうち63%に当たる314千haは針葉樹，31%に当たる154千haは広葉樹である†2．しかし，近年では放置された荒廃森林が増加し，緊急に整備が必要な森林が増加している．そのため，静岡県では森林の多面的機能の回復を目的として，平成18年度から「森林づくり県民税」の導入と，「森の力再生事業」をスタートし，針・広混交林や広葉樹林造成を進めている．

その一方，近年，無秩序な種苗の導入による遺伝子の攪乱や環境不適応等の問題が提起されている[18)24)]．主要造林樹種であるスギ，ヒノキなどの針葉樹においては種苗の配布区域が林業種苗法により制限されているが，広葉樹の種苗は配布区域が設定されていないため，遺伝的に離れた地域への植栽による環境不適応によって造林不成績となる可能性もある．また，遺伝的な違いを無視した植栽が，その地域における進化の過程で獲得された遺伝子の攪乱を招く恐れがある．

近年，樹木においてDNAマーカーを用いた系統地理学的研究が進められている[17)]．ケヤキでは葉緑体DNA変異に基づく遺伝子型(以下，ハプロタイプ)を用いた解析がなされ，静岡県内において複数のハプロタイプが検出されている[3)]．ブナでは，ハプロタイプの系統が異なると，他地域由来の個体は同一地域由来に比べて劣った生育を示す事例[6)]や冬芽がついた状態で梢端部の先枯れが起こる事例[9)]など，環境に対して不適応がおこることが報告されている．形質に関連する遺伝子情報の大部分は核にあり，遺伝的系統を解析するのに主に使われる葉緑体DNAと必ずしも関係するものではないが，上述の結果は，遺伝的系統から得られる地理的な構造(以下，遺伝的構造)が生理生態などの特性と関係することが多いことを示すものである．従って，広葉樹の適切な植栽を行うためには，遺伝的構造を明らかにし，その上で環境に適応した形質などを

†1本報告の一部は平成20年度日本森林学会中部支部大会（岐阜市）で発表した

†2林野庁統計情報（http://www.rinya.maff.go.jp/j/kouhou/toukei/index.html）

調査する必要がある. また, 遺伝的構造は, 過去の分布拡大の歴史的な背景をもって形成されていることから, 遺伝的攪乱を未然に防ぐ有用な情報となりうる. 更に, 種苗の配布区域等の策定や, 緑化工学会が示す地域性種苗[7,10]による適切な植栽を進めるためにも, 静岡県の広葉樹について遺伝的構造を明らかにする必要がある. 静岡県内ではケヤキ精英樹の37クローンが県内各地域より選抜されている[21]. 本県は, 地質的に異なる地域や気象条件が異なる地域が存在することから, それらは地域固有の遺伝的構造や地域への適応が異なる可能性がある.

そこで, 本研究では静岡県産ケヤキ精英樹37クローンのハプロタイプを決定し, 遺伝的系統を明らかにした. さらに, これら精英樹の母樹は天然木と思われる個体より選抜されていることから, 静岡県内におけるケヤキの遺伝的構造と地域環境との関係を明らかにした. また, 形質に関する調査は, 開芽日について行った. 開芽日は環境に適応する重要な形質の一つであると考えられ, 開芽日の異常木では晩霜害や虫害の被害を受ける可能性もあり, 長期的な視点から考えると, 成長量などに影響を与えると予想される. 従って, この結果とハプロタイプとの関係について調査することで, 静岡県におけるケヤキの適切な植栽方法について検討した.

Ⅱ 材料及び方法

1 植物材料

2007年4月下旬に, 静岡県農林技術研究所森林・林業研究センターの構内に植栽されている, 県内23産地より選抜した静岡県産ケヤキ精英樹[21] 37クローンの各個体より葉を採取した. それらは, 70%エタノールで汚れを取り除いた後, 約50mgずつポリ袋に小分けをして実験に供するまで−20℃で保存した.

2 DNAの抽出

採取した葉より, 山田・片井[19]の方法に従って全DNAを抽出し, 2%アガロースゲルで電気泳動(100V, 20分)し, エチジウムブロマイドで染色後, UV230nmを照射しDNAを確認した.

3 葉緑体DNA解析

葉緑体DNA用ユニバーサルプライマー[13,14]を用いて, PCRを行い目的の遺伝子領域の増幅を確認した. プライマーとして, *rp*S16intron , *trn*Q(UUG)-*rp*S16, *rp*S16-*trn*K(UUU), *psb*D-*trn*T(GGU), *trn*V(UAC)-*ndh*C, の4領域を増幅するセットを用いた(表1). PCRは10μLの反応系で, 以下の組成で行った. 鋳型DNA5ng, DNAポリメラーゼ(Go Taq; Promega Co.Ltd, Wisconsin, USA) 0.75unit, dNTPs (25mM) 1μL, $MgCl_2$(50mM) 0.6μL, 10×緩衝液1μLを用いた. PCR条件は94℃3分, (94℃45秒, 50℃45秒, 72℃1分)25サイクル, 72℃7分で行った. PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動(100V, 20分)し, エチジウムブロマイドで染色後, UV230nmを照射しDNA増幅を確認した. 増幅したDNAは, BigDye®Terminator3.1(Applied Biosystems, 以下ABIと略す)を用いて, PRISM 310 Genetic Analyzer(ABI)で塩基配列を決定した. 塩基配列のアライメントの作製はSeqScape®(ABI)を用いて行い, 塩基置換およびマイクロサテライトをもとにしてハプロタイプを決定した.

4 開芽日調査

当センターに集植されている静岡県産ケヤキ精英樹37クローン5ラメットについて2009年4月上旬〜5月上旬にかけて開芽日を調査した. 開芽調査は, 袴田・山本[4]の方法に準じて行い, 葉身が完全に開いた状態(図1)を開芽日として, 各個体を調査日ごとに観察した. また, 2008年の開芽日は山田ら[20], 2007年は袴田・山本[4]の結果を用いて, これらデータより平均開芽日と反復率[11]を算出した.

5 気温データ

佐久間, 天竜, 清水, 富士, 松崎の各地点の気温データは, 気象庁ホームページ(http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/ index.php)のデータを用いて、1月〜4月の平均気温の累積値を算出した.

表1　ユニバーサルプライマーの塩基配列

葉緑体DNA領域		塩基配列(5'→3')
*rp*S16intron	forward	AAACGATGTGGTARAAAGCAAC
	reverse	AACATCWATTGCAASGATTCGATA
*trn*Q(UUG)-*rp*S16	forward	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC
	reverse	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT
*rp*S16-*trn*K(UUU)	forward	AAAGTGGGTTTTTATGATCC
	reverse	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
*psb*D-*trn*T(GGU)	forward	CTCCGTARCCAGTCATCCATA
	reverse	CCCTTTTAACTCAGTGGTAG
*trn*V(UAC)-*ndh*C	forward	GTCTACGGTTCGARTCCGTA
	reverse	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC

Ⅲ 結　　果

1 葉緑体DNA解析によるハプロタイプの決定

葉緑体DNA領域*rp*S16intronおよび*trn*Q(UUG)-*rp*S16のうち, 600bpおよび650bpの塩基配列を決定した. 塩基配列のアライメントを作成し比較した結果, *rp*S16intronには1つの一塩基多型と1つのマイクロサテライトの変異, *trn*Q(UUG)-*rp*S16には1つの一塩基多型が検出された(表2). これらの各領域で検出された変異を基に, 静岡県産ケヤキ精英樹では, 安倍川・大井川を境界に2つのハプロタイプ(東タイプ

23 個体および西タイプ 13 個体)が検出された(図1). しかし, 引佐1は県の西部から選抜したクローンであるにもかかわらず東タイプとなり, 同一場所に植栽してある 4 ラメットもすべて東タイプであった.

表２　静岡県産ケヤキ精英樹のハプロタイプ

	*rp*S16intron		*trn*Q(UUG)-*rp*S16
ハプロタイプ	56bp	265bp	356bp
西	A	A_{10}	G
東	T	A_9	C

２　開芽日

2009 年に実施した開芽日調査の結果, 平均開芽日は 37 クローン間で 21 日間の違いが認められ, その遺伝的支配の強さを示す反復率を求めたところ, 0.825 という高い値を示した. 2009 年および 2007～2009 年の開芽日について平均値を一覧にしたところ, 同一産地のクローン間にばらつきがあり(図2, 3), 毎年ほぼ同じ産地順であることが分かった(図4, 5).

開芽日は一定時期からの積算温度と関係があることが明らかにされていることから[2], 気温条件と各産地のクローンの開芽日との関係性を調べるため, 佐久間, 天竜, 清水, 富士および松崎のアメダスデータを基にした 1～4 月の平均気温の累積値を調べたところ, 関係性を説明することは出来なかった.

３　ハプロタイプと開芽日・気温データの関係

開芽日を東西のハプロタイプに分けて比較した結果, 5%水準で有意差が認められ, クローンの植栽場所(県西部地域)における東タイプの開芽時期は西タイプよりも遅いことが明らかとなった(図4). 同様に 2007～2009 年の3ヵ年のデータを纏めて開芽日について検定したところ, 2009 年と同様に東タイプの開芽時期は西タイプよりも遅いことが明らかとなった(図6, 7). ハプロタイプの分布と 1～4 月の平均気温の累積値の関係を調べたところ, 関係性は存在しなかった.

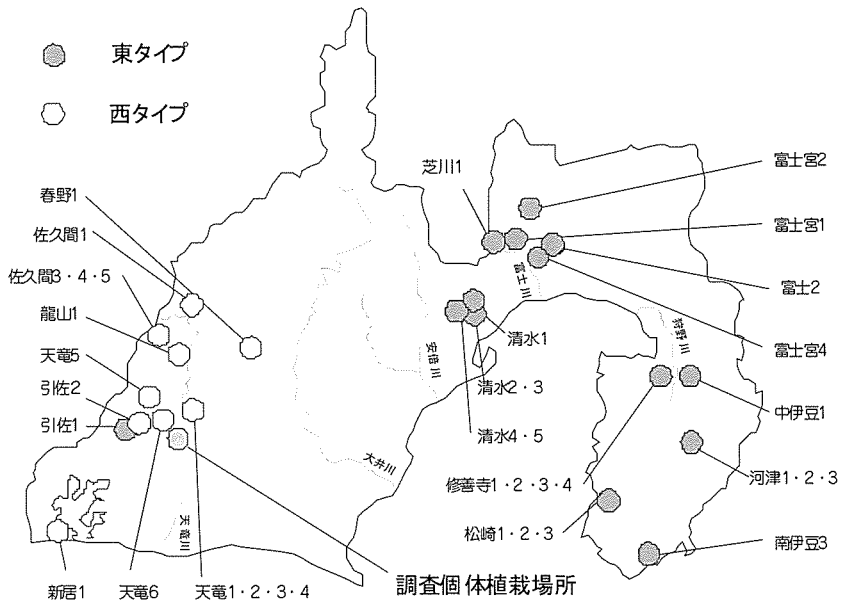

図１　葉緑体 DNA 変異に基づく静岡県産ケヤキ精英樹のハプロタイプ分布図

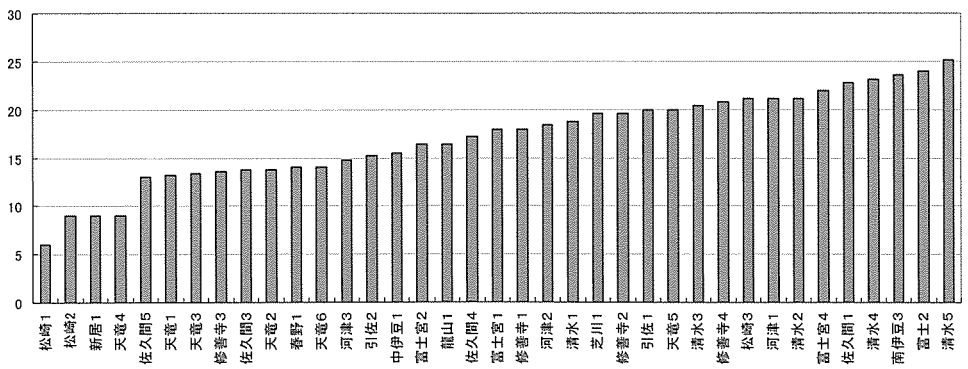

図２　2009 年の各産地の個体別の開芽日一覧

Y 軸は３月 31 日を起算日（0）として，各個体の開芽日数を示す

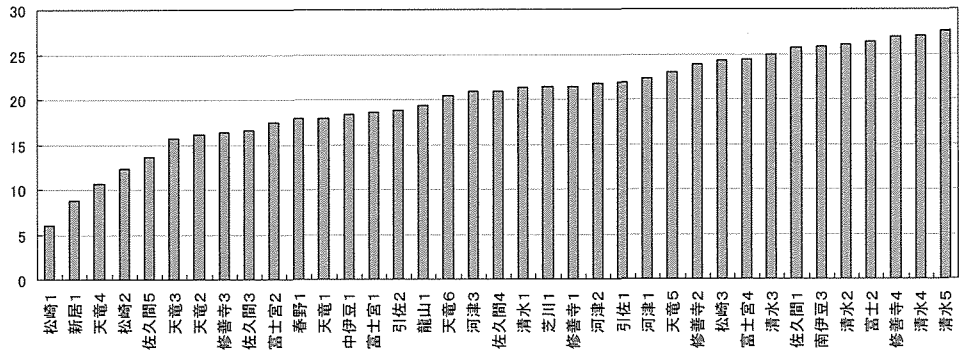

図３　2007-2009 年の各産地の個体別の開芽日一覧

Y軸は３月 31 日を起算日（０）として，各個体の開芽日数を示す

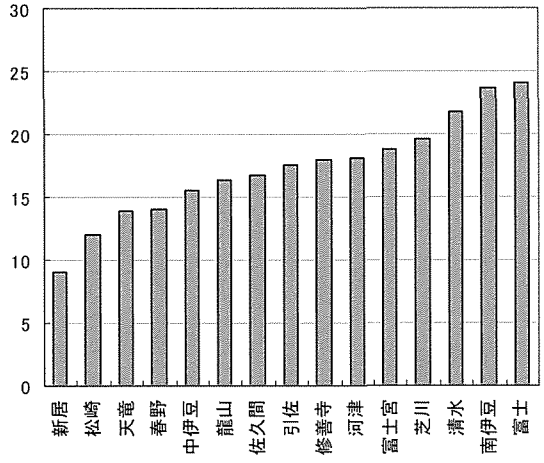

図４　2009 年の産地毎の開芽日一覧

Y軸は３月 31 日を起算日（０）として，各個体の開芽日数を示す

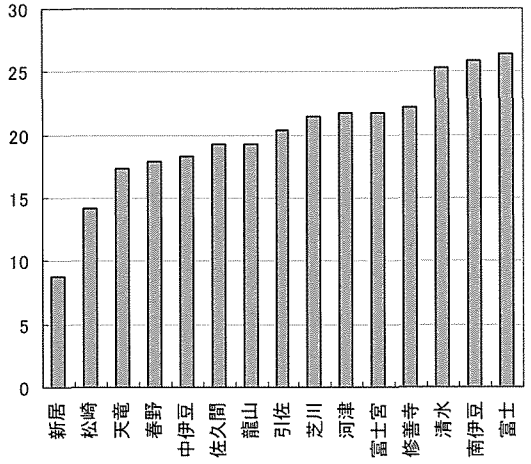

図５　2007-2009 年の産地毎の開芽日一覧

Y軸は３月 31 日を起算日（０）として，各個体の開芽日数を示す

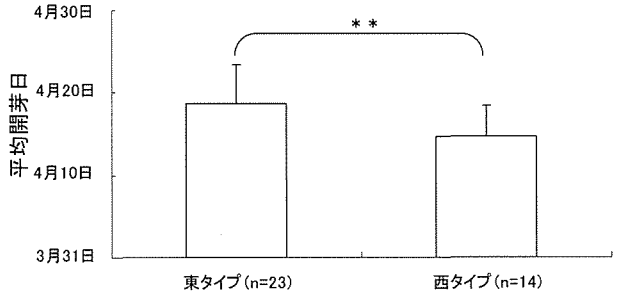

図６　ハプロタイプ別で比較した 2009 年の平均開芽日

＊＊：P<0.01 (Mann-Whitney's U test) エラーバーは標準偏差を示す

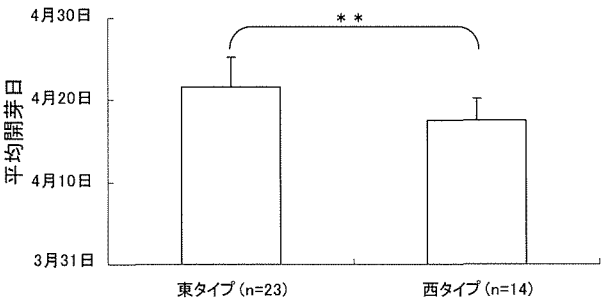

図７　ハプロタイプ別で比較した 2007-2009 年の平均開芽日

＊＊：P<0.01 (Mann-Whitney's U test) エラーバーは標準偏差を示す

Ⅳ 考　　察

近年，幾つかの広葉樹において遺伝的構造が明らかにされている[17]．その構造は樹種によって大きく異なるが，これは樹種ごとの生態的特性および集団の歴史的変遷に関係している．例えば，ブナでは全国に13種類のハプロタイプ[1]，ウダイカンバでは2種類のハプロタイプ[16]が確認されるなど，樹種ごとに異なる構造があることが明らかになっている．葉緑体DNAの系統が異なる林木を植栽すると，生育の遅延[6]や梢端部の先枯れ[9]など環境に適応できない現象が報告されている．形質に関連する遺伝子情報は，葉緑体DNAの系統と必ずしも関係するものではないが，遺伝的構造が生理生態などの特性と関係することが少なくない．ケヤキにおいては，全国に11種類のハプロタイプが存在する[3]ことが明らかとなっており，そのうち静岡県には3種類のハプロタイプが存在する．本県におけるケヤキのハプロタイプを決定した結果，安倍川・大井川を境界にして2種類に分類される地理的構造を有することが明らかとなった．この結果から，遺伝的攪乱を未然に防ぐ必要のある地域の植栽にはこれら結果を配慮し，西部地域と東部地域で分けて植栽する必要が示唆された．本研究においては2種類のハプロタイプしか検出されなく，これは使用したマーカー数が少なかったことが原因であると考えられた．今回，解析した2領域には合計2つの塩基置換と1つのマイクロサテライトの変異が検出されており，これら各変異は全て同一の西と東タイプに分類することができる．また，引佐1は県の西部から選抜したクローンであるにもかかわらず東タイプであった理由として，植栽時の誤植，または，近くに民家や旧街道があることから，過去に東部地域から持ち込まれた可能性が考えられる．

開芽時期は，晩霜害の回避や光合成可能時期など，各個体の生活史を特徴付ける上で重要な形質である．ケヤキについては，関東から静岡までの17産地に由来する177クローンを茨城県内に集植し調査され，開葉日の遺伝率は比較的高いことが確かめられている[22]，また，産地間に有意差はあるものの，産地内でのばらつきが大きく，産地の環境条件などとの間に一定の関係がないことが明らかになっている．本研究においても，上述の産地と比べ狭い範囲であるにもかかわらず産地間の開芽日に21日の開きがあったが気温条件と関係は無かった．

開芽日はハプロタイプ別で有意差があり，気温データとハプロタイプ別の間には関係は無いことが明らかになった．西部地域において，開芽日は西タイプと比べ東タイプが有意に遅く，東タイプの個体は何らかの環境不適応になる可能性もある．そのため，タイプごとに病害などの被害，成長量に違いが生じるのか，今後，現地の気象条件も含め調査を行う必要がある．

近年，生物多様性保全の観点より，地域性種苗が重要視されるようになった[7,10,17]．斉藤らは，治山用緑化木であるケヤマハンノキについて，富山県では天然林に2つのハプロタイプが存在するにもかかわらず，治山現場で植栽されているタイプはすべて一方のタイプであることを明らかにし，ハプロタイプを考慮した緑化が必要であると示している[12]．本県に於いて地域性種苗を用いた先行的な事業として，富士山静岡空港の滑走路法面緑化や富士山周辺の風倒被害跡地の植栽がある[5]．これら事業では遺伝的系統を調べた種苗を利用したものではないが，現場付近で採種した種子を使用して苗木生産から実施している．このような大規模な事業の場合は直営で苗木の生産体制をとることが出来るが，小規模な事業の場合は難しい．したがって，ある程度の範囲に出荷できる種苗生産体制を構築する必要があるが，その範囲については本研究で得られた遺伝的構造を参考に設定することが望ましいと思われる．しかしながら，造林目的の場合は，成長がよい種苗を植栽する必要があり，地域の遺伝的系統と異なる種苗を導入する可能性もあるため，県内に存在しない系統の成長量の比較調査も必要となる．今後，詳細な遺伝的構造，系統ごとの地域環境への適応差が明らかになれば，種苗移動範囲区域，地域性種苗の設定に重要な情報となりうるであろう．

Ⅴ 摘　　要

静岡県におけるケヤキの遺伝的，形質的特徴を明らかにするために，県内23産地より選抜したケヤキ精英樹クローンを対象に，葉緑体 DNA の遺伝的構造と開芽日を調査した．その結果，2 種類のハプロタイプに分類され，安倍川・大井川付近を境に東と西に分かれることが明らかとなった．また，これらのハプロタイプの種類と，2007～2009 年に調査した開芽日との関係を検討したところ，東タイプと西タイプとの平均開芽日には 1%水準で有意差が認められ，西部地域における東タイプの開芽時期は西タイプよりも遅いことが明らかとなった．

謝　　辞

本研究を実施するにあたり，山根のり恵氏、並びに井上由巳子には実験の補助をしていただいた．ここに感謝の意を表する．

引 用 文 献

1) Fujii, N., Tomaru, N., Okuyama, K., Koike, T., Mikami, T., and Ueda, K. (2002) Chloroplast DNA phylogeography of *Fugus crenata* (Fagaceae) in Japan. Plant Syst. Evol. 232: 21～23.

2) 藤本征司(2007)広葉樹29種の10年間の開芽フェノロジー観測に基づく開芽日予測法の検討. 日林誌 89:253～261.

3) 武津英太郎・高橋誠・中田了五・矢野慶介・渡邉敦史・小山泰弘・小谷二郎・斎藤真己・宮崎祐子・島田博匡・瀧井忠人・壁村勇二・生方正俊(2008)葉緑体DNA変異を用いたケヤキ(*Zelkova serrata*)の系統地理学的解析. 第119回日本森林学会大会講演要旨集:G28.

4) 袴田哲司・山本茂弘(2007)静岡県産ケヤキ精英樹クローンの開芽フェノロジー特性. 中森研 56:29～30.

5) 袴田哲司・山本茂弘・片井秀幸・山田晋也・平岡宏一・津田吉晃・武津英太郎・高橋誠・戸丸信弘・津村義彦(2009)静岡県におけるブナ、ケヤキの地理的変異と広葉樹植栽. 第119回日本森林学会大会講演会要旨集:G42.

6) 菅野学・陶山佳久・原正利・高橋誠・渡邊敦史・清和研二(2007)ブナの遺伝的地域特性に配慮した種苗配布範囲設定に関する分子系統地理学的研究. 第 54 回日本生態学会大会講演要旨集:A3-10.

7) 小林達明(2009)地域性種苗の現在と将来の見通し.日緑工誌 34:582～583.

8) 近田文弘(1981)静岡県の植物群落—静岡県の自然環境シリーズ— p1～6 第一法規出版 東京.

9) 小山泰弘・成瀬友季・高橋誠・渡邉敦史・戸丸信弘(2007)長野県ブナ人工林の系統と環境適応性. 第 118 回日本森林学会大会講演会要旨集:N14.

10) 日本緑化工学会(2002)生物多様性保全のための緑化植物の取り扱いに関する提言. 日緑工誌 27:481～491.

11) 大庭喜八郎・勝田柾(1991)林木育種学 p98～104.

12) 斎藤真己・長谷川幹夫・中島春樹(2009)富山県におけるケヤマハンノキ天然林の遺伝的分化に基づく種苗移動範囲の検討と地域性種苗の生産体制の安定化. 日林誌 91:173～177.

13) SHAW, J., LICKEY, E. B., BECK, J. T., FARMER, S. B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K. C., WINDER, C. T., SCHILLING, E. E. and SMALL, R. L. (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogentic analysis. Amerian Jounal of Botany 92(1): 142～166.

14) SHAW, J., LICKEY, E. B., BECK, J. T., SCHILLING, E. E. and SMALL, R. L. (2007) Comparison of whole chloroplast Genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. Amerian Jounal of Botany 94 (1): 275～288.

15) 高橋誠・後藤晋・梶幹男・渡邉敦史・福田陽子(2007)ブナ葉緑体ハプロタイプと適応的形質との関係:ブナ産地試験地のデータ解析の結果から. 54 回日本生態学会要旨集:G3-07.

16) Tsuda, Y., Ide, Y.(2005) Wide-range analysis of genetic structure of Betula maximowicziana, a long-lived pioneer tree species and noble hardwood in the cool temperate zone of Japan. Mol Ecol. 14(13):3929～3941.

17) 津村義彦・岩田洋佳(2003)遺伝的変異性を考慮した緑化とは. 日緑工誌 28:470～475.

18) 津村義彦(2008):広葉樹林の遺伝的攪乱. 林木の育種. 第 227 号:31～33.

19) 山田晋也・片井秀幸 (2009) 静岡県における広葉樹の遺伝的構造(Ⅰ)ー葉および冬芽を用いた DNA 抽出法の検討ー. 静岡県農林技術研究所研報 2:63～68.

20) 山田晋也・山本茂弘・片井秀幸・袴田哲司 (2009)静岡県産ケヤキ精英樹のハプロタイプと開芽フェノロジー特性の関係. 中森研 57:61～62.

21) 山本茂弘・袴田哲司(2004)静岡県産ケヤキ精英樹の選抜と組織培養によるクローン増殖. 静岡県林技セ研報 32: 1～13.

22) 矢野慶介・高橋誠・岩泉正和・宮本尚子・山田浩雄(2008)ケヤキの開葉フェノロジーのクローン間変異と遺伝性. 関森研 59:105～109.

23) 矢野慶介・高橋誠・岩泉正和(2007)ケヤキの紅葉・落葉フェノロジーのクローン間変異と産地の環境条件との関係. 第 118 回日本森林学会大会講演会要旨集:I07.

24) 吉丸博志(2004)広葉樹の植林における遺伝子攪乱:林業技術 748:3～7.