ブナ (*Fagus crenata*) 近距離母樹間における両親間距離と交配頻度の関係 および花粉プールの多様性の差異

花岡 創^{*1}・袴田康子²・向井 譲³

近距離に分布するブナの母樹間において、両親間距離と累積交配頻度との関係や花粉プールの対立遺伝子の豊富さ (allelic richness), 有効花粉親数に差異が生じるのかを調査した。本研究では、互いに近接しているがわずかに環境の異なる 6 個体の母樹を調査対象とした。マイクロサテライト 7 遺伝子座を用いてそれらの母樹から採取した堅果由来の実生 823 個体の遺伝子型を決定し、父性解析を行い、花粉散布に関連するパラメータを算出した。父性解析の結果、近距離で交配頻度が高くなる傾向が共通して観測されたが、両親間距離に対する累積交配頻度の上昇傾向は母樹ごとに異なり、4 ha の調査プロット外からの花粉の移入率は 15.7% から 33.8% の間で変動した。花粉プールにおける対立遺伝子の豊富さの値は 8.524 から 12.803 と全母樹を通して同程度となったが、有効花粉親数 (N_{ep}) 値は 2.941 から 16.340 と大きく変動し、 N_{ep} 値の低い母樹では不健全堅果の生産される割合が高かった。これらの結果から、花粉散布のパターンや堅果充実率は近距離母樹間である程度一致するものの、母樹の立地環境により変動する可能性が示された。

キーワード：花粉を介した遺伝子散布, 堅果充実率, ブナ (*Fagus crenata*), 対立遺伝子の豊富さ (allelic richness), 有効花粉親数 (N_{ep})

So Hanaoka,^{*1} Yasuko Hakamada,² and Yuzuru Mukai³: Differences in the Relationship between Intermate Distance and Mating Frequency and the Diversity of the Pollen Pool among Neighboring Mother Trees of *Fagus crenata*. J. Jpn. For. Soc. 91: 239–245. We analyzed differences in the relationship between the intermate distance and the cumulative mating frequency, the allelic richness of the pollen pool, and effective number of pollen parents among neighboring trees of *Fagus crenata*. Six mother trees we studied were located relatively close together but under slightly different microenvironments. We determined genotypes of 823 seedlings derived from the mother trees at seven microsatellite loci. We assigned seedling paternity and estimated the three parameters of pollen dispersal. Patterns of increases in the cumulative mating frequency with the increasing intermate distance varied among the mother trees although short-distance matings were frequently observed. The pollen immigration rates from outside the 4-ha study plot varied from 15.7 to 33.8%. Among the mother trees, the allelic richness of pollen pools was very similar, with values ranging from 8.524 to 12.803, and the effective number of pollen parents (N_{ep}) varied from 2.941 to 16.340. In addition, the rate of unsound seeds production was high in mother trees with low N_{ep} value. In conclusion, patterns of pollen dispersal and seed soundness were similar among neighboring mother trees but varied in accordance with their microenvironments.

Key words: allelic richness, effective number of pollen parents (N_{ep}), pollen-mediated gene dispersal, seed soundness, siebold's beech (*Fagus crenata*)

I. は じ め に

日本の冷温帯林を代表する風媒の落葉広葉樹であるブナ (*Fagus crenata*) は、集団の縮小や断片化にともなう分布の衰退が危惧されており、その保護や保全が重要視されている。近年、植物集団の保全には個体数の確保のみならず、遺伝的多様性の保持も重要であることが実証的に示されてきた (たとえば, Newman and Pilson, 1997; Williams, 2001)。ブナは自家不和合性や近交弱勢を示すため (寺澤, 1997), 集団内の対立遺伝子数の減少や空間遺伝構造の強化は集団の衰退を加速させる可能性があり (Gilpin and

Soule, 1986), 遺伝的多様性を保持することはとりわけ重要である。植物集団の遺伝構造はおもに花粉と種子の移動の程度により決定される (Heuertz *et al.*, 2003)。ブナの堅果は母樹周辺の近距離に散布される傾向にあり (溝口・小見山, 1994), 空間遺伝構造を形成していた例もいくつかの集団で報告されている (Takahashi *et al.*, 2000, 2002; Asuka *et al.*, 2004b)。それゆえ、ブナは堅果の移動のみによって十分な遺伝的多様性が維持されるとは考えられず、花粉を介した遺伝子散布が次世代の遺伝的多様性の保持に果たす役割は大きい。

ブナ小集団における花粉を介した遺伝子散布研究では、

* 連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: so1223@nifty.com

¹ 岐阜大学大学院連合農学研究科森林生態学研究室 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1 (Laboratory of Forest Ecology, United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

² 岐阜大学大学院農学研究科森林生態学研究室 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1 (Laboratory of Forest Ecology, Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

³ 岐阜大学応用生物科学部 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1 (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan)

(2008 年 9 月 26 日受付; 2009 年 3 月 21 日受理)

両親間の距離と交配頻度には負の相関関係が、花粉親のサイズと交配頻度との間には正の相関関係があり、花粉の平均飛散距離が約 40 m であったことが報告されている (Hanaoka *et al.*, 2007)。また、ブナ以外の風媒樹種の研究では、花粉を介した遺伝子散布パターンが両親間距離や開花量だけでなく、開花フェノロジーや個体密度などにも影響を受けることが提示されてきた (たとえば, Burczyk *et al.*, 1996; Burczyk and Prat, 1997; Dyer and Sork, 2001; Robledo-Arnuncio *et al.*, 2004)。物理モデルによる花粉輸送パターンの推定研究などでは、風向・風速や樹冠付近の気流などの影響も提案されている (Okubo and Levin, 1989; Di-Giovanni and Kevan, 1991)。Klein *et al.* (2008) では、雄個体の相対的な繁殖成功度が両親間距離の効果のみならず、さまざまな要因の相互作用の結果として空間的に不均一になることが実証されており、花粉散布現象は決定論的に予測できるものではなく、確率論的にしか説明できない部分が多い。これらのことから、至近距離に存在する個体間であっても、立地条件によって受け取ることができる花粉の量や花粉親の多様性に差異が生じる可能性があると考えられる。ところが、これまでの花粉を介した遺伝子散布研究の多くは、距離を十分に離し、しかも花粉親候補が全方向に分布するように設定した母樹に対して生じた花粉散布を明らかにすることで、集団全体としての花粉の移動の傾向や、花粉散布に関連するパラメータ (他殖率、花粉親由来の対立遺伝子の数、有効花粉親数など) の推定が行われてきた。至近距離に存在する母樹間では両親間距離と交配頻度の関係、あるいは花粉散布に関連するパラメータが同様であるのかを実証的に検討した研究はなく、選定した母樹がその地点を代表するものとなっているかは疑問である。これらのことを調査しておくことは次世代の遺伝的多様性を考慮した林分管理や育苗用の堅果採取などにも有用であろう。

本研究では、6 個体の母樹を調査対象とし、至近距離 (15 m 以内) に存在する母樹間、および約 40 m 離れた母樹間で、両親間距離と交配頻度の関係や花粉プールの対立遺伝子の豊富さ (allelic richness)、有効花粉親数に差異が生じるかについて検討することを目的とした。

II. 材 料 と 方 法

1. 試験地、材料

試験地を岐阜県下呂市萩原町にある岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター位山演習林内に存在するブナ林 (N 36°00', E 137°13', 標高約 1,100 m) に設置した。9 ha の範囲に約 500 個体のブナが生育しており、この範囲を 1 集団と定義した。この集団の西端に 4 ha (160 m × 250 m) の調査プロットを設定した。調査プロット内はブナおよびミズナラが優占する広葉樹林となっており、プロットの西側および南側はヒノキの人工林、北側はカラマツの人工林となっている。2005 年にプロット内に存在する胸高直径 (d.b.h.) 10 cm 以上の個体をコンパ

図-1. 調査プロット内の母樹および花粉親候補の分布
等高線の間隔は 5 m となっている。●, 母樹; ○, 花粉親候補。

図-2. 交配および花粉親候補の方位別頻度分布

林分中央の 3 個体の結果を (a) に、林分南端 3 個体の結果を (b) に示す。

ス測量し、全 143 個体のブナの位置を確定した (図-1)。本調査地では 2005 年にブナの一斉開花があり、開花時期は 4 月 28 日から 5 月 8 日の間で概ね一致していたことが目視および空中花粉密度の観察から確認されている (Hanaoka *et al.*, unpublished)。

2005 年 6 月、プロット内のブナ全 143 個体から成葉を採取し、液体窒素で瞬間冷凍した後、 -80°C で保存した。また、プロット内に存在する成木 6 個体を母樹とし、2005 年

図-3. 母樹からの距離に対する花粉親候補累積頻度分布 (a) および交配頻度 (b), 累積交配頻度 (c) の関係

9月にそれらの樹冠から殻斗に包まれた状態の堅果をランダムに採取した。本研究で母樹として選定した6個体中3個体 (H681, H684, H724) は北向き斜面で広葉樹林のほぼ中央に位置しており, 花粉親候補はそれらの個体からみて比較的全方位に分布していた。一方, 同じく母樹として設定した残りの3個体 (H790, H795, H796) は斜面上部の尾根上, ブナ集団のほぼ南端でヒノキ林との境界に位置していた。特に東から南 (方位角 90° ~ 180°) にかけては花粉親候補が非常に少なかった (図-1, 2)。各母樹から20 m ごとに距離階級を区切り, 調査プロット内における距離階級ごとの花粉親候補の累積頻度分布をみると, いずれの母樹でもほぼ同様であり (図-3a), プロット内の全花粉親候補数に対する各距離階級までの累積花粉親候補数の比率にはすべての階級において有意な差はなかった (比率の差の検定; $p > 0.05$)。林分の中央の3母樹と林分南端の3母樹は水平距離で約40 m 離れており, 高低差は約15 m となっている。

6母樹から採取した殻斗は実験室に持ち帰ってすぐに堅果を取り出し, 合計で2,707個の堅果を得た。これらの堅果を健全堅果 (中身が詰まっている堅果), 虫害堅果, 不健全堅果 (シイナあるいは途中死した堅果) に区分した。得られた健全堅果の一部は低温湿層処理を約2カ月間行った

後にプランターに播種し, 発芽した実生823個体から子葉を採取し, 成葉と同様の手順で冷凍保存した。

2. DNA抽出, マイクロサテライト解析

プロット内のブナ143個体から採取した葉, および6個体の母樹から採取した堅果由来の実生の子葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNA抽出を行った。それらはすべてマイクロサテライト7遺伝子座 (*sfc0018*, *sfc0036*, *sfc0378*, *sfc1105*, *sfc1143*; Asuka *et al.*, 2004a; *FS1-03*, *SF4-46*, Pastorelli *et al.*, 2003) における遺伝子型の決定を行った。PCRおよび電気泳動は基本的に Hanaoka *et al.* (2007) と同様に行ったが, PCRについてはマルチプレックスPCR法を用いることとし, QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を利用した。マルチプレックスPCRのマーカーク組み合わせは以下のとおりである。セット1; *FS1-03*, *FS4-46*, *sfc1105*, セット2; *sfc0018*, *sfc0036*, *sfc0378*, セット3; *sfc1143*。

3. データ解析

決定した遺伝子型から最尤推定法 (Marshall *et al.*, 1998) による父性解析を実施した。計算はコンピュータプログラム Cervus ver. 2.0 (Marshall *et al.*, 1998) を用いて行った。計算に必要とされるシミュレーションの設定は以下のとおりとした; シミュレーションサイクル: 10,000, 花粉親候補: 143, 花粉親候補のサンプリング率: 30%, 遺伝子型を決定できた遺伝子座の割合: 97.8%, タイピングエラー率: 1.0%, 信頼レベル: 80%。ただし, 80%信頼レベルで花粉親が同定された場合であっても, 2遺伝子座以上で対立遺伝子のミスマッチがあった場合には不明な花粉親と再判定することとした。堅果充実率に影響を与える質的花粉制限の要因として, 空間遺伝構造は重要な意味をもつと考えられるため, 個体*i*と*j*ペアの空間距離とペアワイズ近縁係数 (F_{ij} ; Loiselle *et al.*, 1995) の関係を算出した。個体間距離を20 m ごとの階級に区切り, それぞれの階級に属している個体ペアの平均 F_{ij} を求めた。また, 個体位置の並べ替えを10,000回試行することで, F_{ij} 値の95%信頼区間を算出した。これらの計算はすべて SPAGeDi (Hardy and Vekemans, 2002) を用いて実施した。

調査プロット内における母樹からの空間距離に対する交配頻度の差異を検討するため, 20 m ごとに区切った距離階級別 (0~20 m から140~160 m まで) の累積交配頻度を算出した。また, 各母樹の全交配数に対する各距離階級内での累積交配数について比率の差の検定を行った。これに加えて, 林分中央の3個体および林分南端の3個体ごとに方位角 30° ごとの交配頻度も算出し, それと花粉親候補の頻度分布との差をコルモゴロフ・スミルノフ検定により検討した。

本研究では, 母樹間で実生サンプル数に違いがあるため, 花粉親由来の対立遺伝子の多様性および花粉親の多様性はサンプル数にできる限り依存しない二つの統計量を用いて行った。花粉親由来の対立遺伝子の多様性は花粉プールの対立遺伝子の豊富さ (allelic richness) (PA ; El Mousadik

and Petit, 1996) を最小のサンプルサイズの母樹 (母樹 H795; $n=70$) に合わせて算出した。また、すべての花粉親が等しく貢献度を有していたと仮定したときの花粉親数である有効花粉親数 (N_{ep}) を母樹内種子間の平均 F_{ij} ($=F_S$) を基にして算出した ($N_{ep}=1/2F_S$; Hardy *et al.*, 2004)。

不健全堅果の発生と N_{ep} の関係を調査するため、説明変数を N_{ep} に、応答変数を堅果の質 (不健全堅果の場合には 1, 健全堅果および虫害堅果の場合には 0) とし、誤差構造は二項分布、リンク関数をロジットとした一般化線形モデル (GLM) によるロジスティック回帰分析を行い、Wald の z 統計量によるパラメータ推定値の検定も行った。計算は R ver. 2.6.1 (R Development Core Team, 2005) 上の glm パッケージを用いた。

III. 結 果

健全堅果、不健全堅果、虫害堅果の割合は母樹ごとに変動した (表-1)。健全堅果の割合は虫害の程度により増減するため、母樹間における健全堅果の割合を単純に比較することは適切でない。それゆえ、不健全堅果の割合を比較すると、5.1% から 29.2% の間で母樹ごとに大きく変動し、解析堅果数に対する不健全堅果数の比率には母樹間で有意な差が検出された (比率の差の検定: χ^2 値 = 193.3, $p < 0.01$)。また、特に林分南端の 3 個体でやや高い値となった。

遺伝子型の解析に用いたマイクロサテライトマーカーはプロット内の個体間で高い多型性を示し、全遺伝子座を通した対立遺伝子数の平均は 17.3, ヘテロ接合度の観察値は平均で 0.831 となった。ハーディ・ワインバーク平衡からの有意な逸脱 (Wright, 1965) も観察されず、また、父性排斥率は 0.999 となり、父性解析を行うにあたってこれら

表-1. 堅果充実率の結果

母樹	健全堅果	不健全堅果	虫害堅果	合計
H681	917 (0.935)	50 (0.051)	14 (0.014)	981
H684	277 (0.718)	43 (0.111)	66 (0.171)	386
H724	504 (0.655)	205 (0.266)	61 (0.089)	770
H790	121 (0.560)	63 (0.292)	32 (0.148)	216
H795	99 (0.798)	15 (0.121)	10 (0.081)	124
H796	161 (0.700)	39 (0.170)	30 (0.130)	230
合計	2079 (0.768)	415 (0.153)	213 (0.079)	2707

括弧内の数値は割合を示す。

表-2. プナ 143 個体におけるマイクロサテライトマーカーの多様性および父性排斥率

遺伝子座	n	H_o	H_e	F_{IS}	P_e
FS1-03	13	0.843	0.829	-0.017	0.661
FS4-46	12	0.722	0.740	0.024	0.525
sfc0018	14	0.838	0.853	0.018	0.707
sfc0036	19	0.869	0.906	0.041	0.807
sfc0378	20	0.874	0.878	0.005	0.756
sfc1105	24	0.763	0.802	0.049	0.655
sfc1143	19	0.909	0.904	-0.006	0.801
平均	17.3	0.831	0.845	0.016	
全遺伝子座					0.999

n , 対立遺伝指数; H_o , ヘテロ接合度の観察値; H_e , ヘテロ接合度の期待値; F_{IS} , 近交係数; P_e , 父性排斥率。

のマーカーは十分な検出力を有していた (表-2)。また、いずれの母樹においても実生は母樹由来の対立遺伝子を保有していることが確認され、花粉親由来の対立遺伝子の判別についても高い精度で行うことができた。

父性解析の結果、自家受精由来であると判定された実生は 823 個体中 7 個体 (0.9%) であった。また、各母樹の実生サンプルのうち 61.3% から 84.3% について、花粉親を 4 ha の調査プロット内に決定することができた (表-3)。プロット内に花粉親を同定できなかった実生、すなわちプロット外からの花粉の移入率は 15.7% から 33.8% の間と推定され、母樹間で有意な差があった (比率の差の検定: χ^2 値 = 14.64, $p < 0.05$)。

空間遺伝構造を解析した結果、距離階級 0~20 m においてのみ平均 F_{ij} の 95% 信頼区間からの逸脱が観察されたものの (図-4)、その値はほぼ 0 であった ($F_{ij}=0.035$)。

交配頻度は 20 m 未満の距離階級で非常に高くなり、40 m までの距離階級で急激に減少するパターンが示された (図-3b)。両親間距離の増大に対する累積交配頻度の上昇傾向は母樹ごとに変動し、南方の尾根沿いに存在する 3 個体の

表-3. 父性解析および花粉プールの多様性

母樹	観察実生数			合計	PA	N_{ep}
	プロット内他殖	プロット外他殖	自殖			
H681	149 (0.772)	42 (0.218)	2 (0.010)	193	11.087	16.340
H684	144 (0.832)	29 (0.168)	0 (0.000)	173	10.317	8.850
H724	162 (0.723)	62 (0.227)	0 (0.000)	224	12.803	6.649
H790	49 (0.613)	27 (0.338)	4 (0.050)	80	10.435	5.388
H795	54 (0.771)	15 (0.214)	1 (0.014)	70	8.524	2.941
H796	70 (0.843)	13 (0.157)	0 (0.000)	83	10.906	5.988
合計	628 (0.763)	188 (0.228)	7 (0.009)	823		
平均					10.677	7.693

PA, 花粉プールの対立遺伝子の豊富さ; N_{ep} , 有効花粉親数。括弧内の数値は割合を示す。

図-4. 近縁係数 (F_{ij} , Loiselle *et al.*, 1995) による空間遺伝構造解析の結果

破線は 95% 信頼区間を表す。

表-4. GLM 解析によるパラメータの推定値

パラメータ	係数推定値	標準誤差	z 値	p 値
切片	-0.3345	0.1255	-2.665	<0.01
N_{ep}	-0.1529	0.0142	-10.767	<0.001

うち2個体(H790, H795)は特に累積頻度の上昇が緩やかで、残りの1個体(H796)も20 m未満での交配頻度が非常に高かったものの、それ以降の距離階級における累積頻度の上昇は緩やかとなる傾向があった(図-3c)。また、100 mまでの各距離階級では全交配数に対する各階級までの累積交配数の比率に母樹間で有意差が検出された(比率の差の検定: 100 m距離階級までの χ^2 値=28.9, 19.84, 24.3, 28.5, 35.5, $p<0.01$)。方位角30°ごとの交配頻度は北側3個体、南側3個体いずれにおいても大まかに花粉親候補の分布と一致し(図-2)、どちらにおいても交配の頻度分布と花粉親候補の頻度分布には有意な差が検出されなかった(コルモゴロフ・スミルノフ検定; 林分中央の3個体、林分南端の3個体の D 値=0.33, 0.25, $p>0.05$)。

実生の遺伝子型から算出した花粉親由来の対立遺伝子の豊富さ(PA)および有効花粉親数(N_{ep})の結果を表-3に示す。全遺伝子座における PA の平均値は8.524から12.803の間となり、母樹間の変動は小さかった。 N_{ep} 値は2.941から16.340の間となり、母樹間で大きな差があった。また、林分南端の3個体(H790, H795, H796)は林分中央のどの3個体(H681, H684, H724)よりも小さな値を示した。

N_{ep} 値と不健全堅果の発生との関係について、ロジスティック回帰分析を行った結果を表-4に示す。 N_{ep} の増大により不健全堅果の発生が抑えられる効果が検出された。

IV. 考 察

1. 堅果充実率

本研究では、林分中央の3個体における不健全堅果の割合が13.9%であったのに対して、林分南端の3個体では20.5%と高くなった(表-1)。また、すべての母樹に共通して、不健全堅果のほとんどは中身が空であるシナ堅果であった。ブナの人工交配実験では、ブナが強い自家不和合性を示すことに加え、遺伝的に近縁な個体どうしの交配では不健全堅果の発生する割合が増加することが確認されている(譲原ら, 未発表)。それゆえ、質的花粉制限による近交弱勢の発現が不健全堅果の発生する割合を増加させることが考えられる。また、無受粉処理を行った場合にはシナ堅果が発生することも確認されており(譲原ら, 未発表)、量的な花粉制限による受粉失敗も、不健全堅果の発生する割合を増加させる重要な要因であると考えられる。

調査プロット内の遺伝的多様性は高く、全遺伝子座の平均 F_{IS} 値は0.016であった(表-2)。また、空間遺伝構造を解析した結果、同祖的な個体が集中して分布する可能性が低いことも示された(図-4)。したがって、本研究では近縁個体間の交配により不健全堅果の割合が高くなった可能性は低いと考えられる。量的花粉制限を生じさせる原因の一

つとして、開花フェノロジーのずれなどが考えられるが、花粉散布が活発であった時期は5月1日から8日までの1週間に限定されていたことが目視および空中花粉密度の測定から明らかになっており、集団内の各個体の花粉放出時期はほぼ同調していたと考えられる。また、林分南端の3個体が共通して花粉散布の最盛期に雌花が未成熟状態であったとも考えられない。母樹からみた花粉親候補の累積頻度に差はなかったものの(図-3a)、林分中央の3個体では花粉親候補が比較的全方位に分布していたのに対して、林分南端の3個体は花粉親候補の分布に方向的偏りがあり(図-2)、また、斜面の上部の尾根沿いであるという立地環境であった。それゆえ、林分南端の3個体は花粉親候補の分布の方向的偏りや立地の影響で他家花粉の量的制限を受けていた、あるいは他家受粉に対する自家花粉の相対頻度が上昇し、質的花粉制限を受けていた可能性があるだろう。

2. 両親間距離と累積交配頻度の関係および花粉散布に関連するパラメータ

父性解析の結果、全母樹に共通して20 mまでの距離階級における交配頻度が高く、40 mまでの距離階級で交配頻度が大きく低下する傾向が得られた(図-3b)。母樹からの距離に対する花粉親候補の累積頻度はいずれの母樹においてもほとんど差がなかったにも関わらず(図-3a)、母樹からの距離に対する累積交配頻度の上昇傾向は母樹ごとに変動し(図-3c)、100 mまでのいずれの距離階級においても母樹間で有意な差が検出された。特に林分南端のより林縁的な場所に生育する2個体(H790, H795)では累積交配頻度の上昇が緩やかになる傾向が観察された。これらの結果から、ブナは20 mまでの近距離個体間での交配が優占するが、空間的に至近距離に位置する母樹間でも距離に対する累積交配頻度の上昇パターンは変動することが示唆された。また、方位別の交配頻度は花粉親候補の頻度分布とおおまかに一致していた(図-2)。Robledo-Arnuncio and Gil (2005)やGarcia *et al.* (2007)でも、花粉親候補の方位別頻度に依存して交配頻度が異なっていたことが報告されている。それゆえ、花粉親候補の分布の偏り具合がそれぞれの母樹の花粉プールに影響を与えていたと考えることができる。

全実生サンプルから算出されたプロット外からの花粉の移入率は約23%となったが、この値は他のブナ科樹種の先行研究と比較して低いものとなっている。たとえば、Dow and Ashley (1998)は*Quercus macrocarpa*について5 haプロットで調査を行い、交配の57%がプロット外からの花粉に由来していたと報告している。また、Streiff *et al.* (1999)では調査地の個体密度が本研究とほぼ同じであるにも関わらず、*Q. robur*では交配の35%が、*Q. petraea*では31%が5.76 haの調査プロット外からの花粉により成立していたことを報告している。これらの結果から、ブナは他のブナ科樹種と比較すると、狭い範囲内での交配数が多くなる可能性が示された。

最小サンプルサイズの母樹に合わせて算出した花粉親由来の対立遺伝子の豊富さ(PA 値)は母樹間変動が小さ

かった。一方、花粉親の多様性の指標となる有効花粉親数 N_{ep} は、林分南端の3個体が林分中央の3個体よりも小さな値を示す傾向がみられた。つまり、検出された花粉親由来の異なる対立遺伝子の数については同程度であったものの、林分南端の3個体ではその頻度の偏りが大きく、林分中央の3個体の方が近距離ではあるが多くの個体と交配が成立していた。 PA 値が母樹間で同程度となったことは、集団内の遺伝的多様性が高く、多くの対立遺伝子が存在する状況であったことに起因していると考えられる(表-2)。本研究で得られた N_{ep} 値の結果は他の風媒種と同程度の値であったが(*Larix occidentalis*, 9.1~16.1; El-Kassaby and Jaquis, 1996; *Q. lobata*, 3.7; Sork *et al.*, 2002), 林分南端の3個体で低くなる傾向が検出された。本試験地では空間遺伝構造が弱く近距離交配が制限されることはなかったと考えられる。それゆえ、近隣の個体密度がほぼ同様であっても、その分布に偏りが大きかったことが交配組み合わせを減少させる原因となったと考えることができるであろう。この可能性は不健全堅果の割合の結果からも支持される。一つの集団内で母樹ごとに N_{ep} 値が変動した例は報告されているが(Robeldo-Arununcio and Gil, 2005), 母樹の空間的位置と結びつけた議論はなされてこなかった。近距離に存在する母樹であっても空間的位置やその環境条件により花粉散布に関連するパラメータが変動する可能性が示されたことは花粉散布研究に対して有用な情報であろう。

不健全堅果の得られる予測確率は N_{ep} 値が増加するにつれて低下する傾向が得られた(表-4)。*Pinus strobus* では、種子サンプルの固定指数(F_{IS})と健全種子の割合の間には負の相関関係があったことが報告されている(Rajora *et al.*, 2002)。このことから、集団全体の遺伝的多様性が高くても花粉親の多様性が制限されてしまうような母樹では健全堅果の得られる割合が低下してしまう可能性が示された。

3. おわりに

本研究の結果から、近距離に存在する母樹間においても花粉散布に関連するパラメータが変動することが示された。これらの個体差や花粉散布の不確実性は、育種や育苗といった応用面で遺伝資源管理に影響を与える問題であり、今後の花粉散布研究における重要な検討項目であろう。また、母樹毎に変動があったものの近距離個体間の交配頻度が高くなることが確認された。現在、ブナ育苗用の堅果を確保する場合には天然林からの採取が現実的であるが、遺伝的に多様な堅果を確保するためには距離を離れた母樹から少量ずつ堅果を採取することが有効であろう。これらに加え、周辺の個体密度が同じであっても、花粉親候補の分布の偏りが花粉親の多様性を低下させる可能性が示された。それゆえ、できる限り個体分布に偏りが生じないように林分を管理することも堅果の生産性を維持するために有効となる可能性があるだろう。

本研究を進めるにあたって、岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センター位山演習林、石田

仁准教授、技術職員の青木達雄氏、谷口 昇氏、都竹彰則氏の多大なる協力をいただきました。また、岐阜大学応用生物科学部、加藤正吾助教、譲原淳吾氏、加藤珠理氏、東北大学大学院農学研究科、富田基史氏に本稿の執筆にあたり多くの助言をいただくとともに、近藤大介氏、伊藤大輔氏をはじめとする森林生態学研究室の皆様にも調査、実験、解析にあたり多くの協力をいただきました。ここに記して感謝の意を表します。本研究の一部は科学研究費補助金(No. 17380090)および笹川科学研究助成の助成によって行いました。

引用文献

- Asuka, Y., Tani, N., Tsumura, Y., and Tomaru, N. (2004a) Development and characterization of microsatellite markers for *Fagus crenata* Blume. *Mol. Ecol. Notes* 4: 101-103.
- Asuka, Y., Tomaru, N., Nishimura, N., Tsumura, Y., and Yamamoto, S. (2004b) Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 13: 1241-1250.
- Burczyk, J. and Prat, D. (1997) Male reproductive success in *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco: the effects of spatial structure and flowering characteristics. *Heredity* 79: 638-647.
- Burczyk, J., Adams, W.T., and Shimizu, J.Y. (1996) Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity* 77: 251-260.
- Di-Giovanni, F. and Kevan, P.G. (1991) Factors affecting pollen dynamics and its importance to pollen contamination: a review. *Can. J. For. Res.* 21: 1155-1170.
- Dow, B.D. and Ashley, M.V. (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *J. Hered.* 89: 62-70.
- Dyer, R.J. and Sork, V.L. (2001) Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* Mill. *Mol. Ecol.* 10: 859-866.
- El-Kassaby, Y.A. and Jaquish, B. (1996) Population density and mating pattern in western larch. *J. Hered.* 87: 438-443.
- El-Mousadik, A. and Petit, R.J. (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol. Ecol.* 5: 547-555.
- Garcia, C., Jordano, P., and Godoy, J.A. (2007) Contemporary pollen and seed dispersal in a *Prunus mahaleb* population: patterns in distance and direction. *Mol. Ecol.* 16: 1947-1955.
- Gilpin, M. and Soule, M.E. (1986) Minimum viable populations: the processes of species extinction. In *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Soule, M.E. (ed.), Sinauer Associates Inc., Sunderland. 13-34.
- Hanaoka, S., Yuzurihara, J., Asuka, Y., Tomaru, N., Tsumura, Y., Kakubari, Y., and Mukai, Y. (2007) Pollen-mediated gene flow in a small, fragmented natural population of *Fagus crenata*. *Can. J. Bot.* 85: 404-413.
- Hardy, O.J. and Vekemans, X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure. *Mol. Ecol. Notes* 2: 618-620.
- Hardy, O.J., Gonzalez-Martinez, S.C., Colas, B., Ferville, H., Mignot, A., and Olivieri, I. (2004) Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *Centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics* 168: 1601-1614.
- Heuertz, M., Vekemans, X., Hausman, F., Palada, M., and Hardy, J. (2003) Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. *Mol. Ecol.* 12: 2483-2495.
- Loiselle, B.A., Sork, V.L., Nason, J.D., and Graham, C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understory shrub. *Am. J. Bot.* 82: 1420-1425.
- Klein, E.K., Dessasis, N., and Oddou-Muratorio, S. (2008) Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. IV. Whole

- interindividual variance of male fecundity estimated jointly with the dispersal kernel. *Mol. Ecol.* 17: 3323–3336.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., and Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639–655.
- 溝口紀泰・小見山章 (1994) ブナ落下種子密度の平面分布パターンのモデル的解析. *日林論* 105: 365–368.
- Newman, D. and Pilson, D. (1997) Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51: 354–362.
- Okubo, A. and Levin, S.A. (1989) A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seeds and pollen. *Ecology* 70: 329–338.
- Pastorelli, R., Smulders, M.J.M., Van't Westende, W.P.C., *et al.* (2003) Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Mol. Ecol. Notes* 3: 76–78.
- Rajora, O.P., Mosseler, A., and Major, J.E. (2002) Mating system and reproductive fitness traits of eastern white pine (*Pinus strobus*) in large, central *versus* small, isolated, marginal populations. *Can. J. Bot.* 80: 1173–1184.
- R Development Core Team (2005) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Robledo-Arnuncio, J.J., Smouse, P.E., Gil, L., and Alia, R. (2004) Pollen movement under alternative silvicultural practices in native populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in central Spain. *For. Ecol. Manage.* 197: 245–255.
- Robledo-Arnuncio, J.J., and Gil, L. (2005) Patterns of pollen dispersal in a small population of *Pinus sylvestris* L. revealed by total-exclusion paternity analysis. *Heredity* 94: 13–22.
- Sork, V.L., Davis, F.W., Smouse, P.E., Apsit, V.J., Dyer, R.J., Fernandez-M. J.F., and Kuhn, B. (2002) Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone. *Mol. Ecol.* 11: 1657–1668.
- Streiff, R., Ducousso, A., Lexer, C., Steinkellner, C., and Gloessl, J. (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Mol. Ecol.* 8: 831–841.
- Takahashi, M., Mukouda, M., and Kono, K. (2000) Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. *Heredity* 84: 103–115.
- Takahashi, M., Tomaru, N., Ubukata, M., and Kono, K. (2002) Genetic structure in the northernmost marginal population of Japanese beech (*Fagus crenata* Blume): influence of the founding event on genetic structure. *Silvae. Genet.* 51: 219–225.
- 寺澤和彦 (1997) ブナの種子生産特性とその天然林施業への応用に関する研究, 北海道林試報告 第34号: 1–58.
- Williams, S.L. (2001) Reduced genetic diversity in eelgrass transplantations affects both population growth and individual fitness. *Ecol. Appl.* 11: 1472–1488.
- Wright, S. (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395–420.