

北海道内におけるアオダモの産地間変異 -葉緑体 DNA および初期成長における変異-

森林総合研究所林木育種センター北海道育種場 福田陽子・花岡 創・矢野慶介・西岡直樹
森林総合研究所林木育種センター東北育種場 宮本 尚子 那須仁弥
森林総合研究所林木育種センター 田村 明 山田浩雄

はじめに

アオダモ (*Fraxinus lanuginosa* Koidz. *f. serrata*) は朝鮮半島, 南千島および北海道, 本州, 四国, 九州に分布する亜高木性の落葉広葉樹である。堅く粘りの強い材質を持ち, 古くから家具材や器具材として利用されてきた樹種であり, 近年では特に北海道産のアオダモは優良なバット材として利用されてきた。しかし, 伐採が進む一方でササやシカの被害によって更新が阻害され, 資源の減少が危惧されることから, 北海道森林管理局や北海道, 日本野球連盟などが中心となってアオダモの人工造林が進められている。

人工造林を行う場合には, 植栽する苗木の遺伝的背景を考慮する必要がある。在来集団と遺伝的に大きく異なる苗木を植栽した場合, 植栽地の環境に適応できずに成長量が低下する, あるいは枯死に至る可能性があるからである。また, 成熟して周辺の天然集団との交雑が進行した場合には, 長い時間をかけて形成された天然集団の遺伝的組成を変化させてしまう可能性もある。アオダモは種子の豊凶が顕著であり, 豊作年の周期が 5~10 年と長い¹⁾ため, 種苗が不足した場合には遠隔地由来の種苗が植栽される可能性が考えられる。しかし, これまでにアオダモの遺伝的変異について研究された例はなく, 種苗の移動範囲に関する知見はない。本研究では, 葉緑体 DNA の塩基配列における変異と複数の産地由来の種苗を植栽した産地試験での初期成長の結果から, 北海道内における種苗の移動の適否について検討した。

材料と方法

1. 葉緑体 DNA 塩基配列における地理的変異

北海道内の 12 林分を含む全国の 66 天然林において(図-1), 各 2~3 個体から葉を採取し, 改変 CTAB 法によって DNA を抽出した。ユーカリの葉緑体 DNA 塩基配列⁶⁾から設計した 14 プライマーセットおよび公表されているユニバーサルプライマー²⁾の 27 セットについて, 8 個体の DNA サンプルを使用して増幅の可否を調べた後, 増幅した領域について 32 個体の DNA サンプルを用いて一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) の有無を検討した。その結果, 多型が検出された領域について, 北海道で採取した 12 林分 38 個体を含む 66 林分 144 個体を対象に, 塩基配列を決定した。その結果から, 個体ごとにハプロタイプを決定した。

ターゲット領域を増幅するための PCR 反応にはサーマ

ルサイクラー-PTC200 (MJ リサーチ社) または Veriti (アプライドバイオシステムズ社) を使用した。PCR 反応は, recombinant Taq DNA polymerase (インビトロジェン社) または Multiplex PCR kit (キアゲン社) を使用して行なった。recombinant Taq DNA polymerase を使用する場合は, 総反応液量を 10 μ l とし, dNTP 0.2 μ M, MgCl₂ 1.5mM, プライマー濃度 0.2 μ M, TaqDNA polymerase 0.25U となるように調整し, 94 $^{\circ}$ C で 2 分間熱変性した後, 95 $^{\circ}$ C で 1 分の熱変性, 55 $^{\circ}$ C で 1 分のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C で 1 分の伸長反応のサイクルを 30 回繰り返す, 最後に 72 $^{\circ}$ C, 3 分間の伸長反応を追加した。Multiplex PCR kit を使用する際には添付のプロトコールに従い, アニーリング温度を 57 $^{\circ}$ C として PCR 反応を行なった。得られた PCR 反応液を Exonuclease I (タカラバイオ社) および Shrimp Alkaline Phosphatase (タカラバイオ社) で処理し, プライマーおよび dNTP を除去した後, 添付のプロトコールに従って Big Dye Terminator v3.1 によるシーケンス反応を行い, 精製と変性の後, ABI PRISM 3130xl ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズ社) を使用してシーケンス解析を行った。



図-1. サンプルを採取した林分と検出された葉緑体ハプロタイプ (同じ印は同じハプロタイプを示す。)

2. 産地試験地の設定と初期成長の調査

2.1. 試験地の設定

豊作年であった 2007 年, 北海道内の 6 林分において母樹別に各林分 5~20 個体から採種を行い (図-2), 室内で乾燥後, 4 $^{\circ}$ C で保存した。2008 年 5 月に果皮を除去後,

Yoko FUKUDA, So HANAOKA, Keisuke YANO, Naoki NISHIOKA (Hokkaido Regional Breeding Office, FFPRI, Ebetsu 069-0836), Naoko MIYAMOTO, Jin'ya NASU (Tohoku Regional Breeding Office, FFPRI, Takizawa, 020-0621), Akira TAMURA, Hiroo YAMADA (Forest Tree Breeding Center, FFPRI, Hitachi, 329-1301)

Provenance variation of *Fraxinus lanuginosa* Koidz. *f. serrata* in Hokkaido

一晚流水にさらした後に黒土を入れた育苗バットに播種した。発芽した実生苗の本葉が開葉した後、黒土:パーミキュライト:ピートモス=1:1:1 を用土として充填したココナツファイバーポットに移植し、野外にて3年間育成した。これらの実生苗は2011年春に新冠町(日高南部森林管理署管内2101林班の小班)に設定したアオダモ産地試験地(新冠試験地)に植栽した。試験地は4ブロック構成とし、各ブロックには、表-1に示した家系構成で1家系あたり5個体ずつ、単木混交で植栽した。植栽時には、定植後の根の成長を妨げないようココナツファイバーポットの側面に大きくカッターで切り目を入れた。また、シカの食害防除のため、産地試験地周囲に高さ約2mのネットを設置した。

2010年にも2009年と同様の方法で育苗バットに播種後、発芽した実生苗をマルチキャビティコンテナ(JFA300)に移植した。マルチキャビティコンテナでの育苗にも、ココナツファイバーポットと同様黒土:パーミキュライト:ピートモス=1:1:1を用いた。2010年に播種した実生苗は、2013年春、千歳市(石狩森林管理署管内5243林班、5244林班)に設定したアオダモ産地試験地(千歳試験地)に植栽した。試験地は5ブロック構成とし、表-1に示した家系構成で、各ブロックには各家系4個体ずつのプロット植栽とした。千歳試験地に植栽した20家系は全て新冠試験地にも植栽されている。ここではシカの食害防除のため、植栽直後にツリーシェルターを設置した。



図-2. 採種地(●)と試験地(○)の位置

表-1. 採種地(産地)と試験地ごとの家系統数

産地	新冠試験地	千歳試験地
足寄(九州大学演習林)	11	3
日高(国有林)	9	3
江別(北海道育種場内)	9	3
平取(国有林)	7	3
釧路(国有林)	10	4
苦小牧(国有林)	4	4
計	50	20

2.2. データ解析

新冠試験地と千歳試験地のいずれにおいても、植栽年の秋から毎年成長期終了後に苗高および被害の調査を行った。2016年秋の時点で、新冠試験地では5年次、千歳試験地では4年次の調査が終了していた。千歳試験地においては生存率が高く、家系間の生存率の差異がないと考えら

れたため、生存率に関する解析は行わなかった。新冠試験地の生存率における産地家系間差異を検討するため、4年次の生死を目的変数とし、1年次の苗高、産地、ブロック、家系の全てまたは一部を説明変数とする一般化線形モデルを仮定してロジスティック回帰を行ない、各モデルのAICを比較することにより、産地の効果および1年次の苗高の影響を検討した。

初期成長についてはまず、2試験地に共通した4年次の苗高における産地間変異を検討した。具体的には、4年次の苗高を目的変数、試験地内ブロックをランダム効果とし、試験地、産地、家系(産地を固定効果を含む場合は産地にネストされた家系)、家系と試験地の交互作用、またはこれらの一部を固定効果とする線形混合モデルを仮定し、各モデルのAICを算出して比較することにより、産地および家系の効果、家系と試験地の交互作用を検討した。その後、試験地ごとに初期成長における産地および家系の効果を検討した。新冠試験地では5年次の苗高、千歳試験地では4年次の苗高を目的変数、ブロックをランダム変数として、産地と産地にネストされた家系、または家系のみを固定効果とする2つの線形混合モデルを仮定し、それぞれについてAICを算出して比較し、産地および家系の効果を検討した。選択されたモデルに基づく分散分析を行い、各説明変数の効果について検討した。

統計解析には、統計ソフトウェアR ver. 3.3.1³⁾のパッケージlme4を使用した。

結果と考察

1. 葉緑体DNA塩基配列における地理的変異

8個体を材料としてスクリーニングを行った41領域²⁾⁴⁾のうち、PCRで増幅が確認されたのは25領域であった。32個体を用いてこれらの25領域(トータル約17500塩基)について塩基配列を決定した結果、SNPが検出されたのは13領域であった。この13領域のうち、6領域について(表-2)³⁾⁴⁾⁵⁾、全144個体の塩基配列を決定した。検出されたSNPの組み合わせから、6つのハプロタイプが存在が確認され、北海道内ではこのうち1ハプロタイプのみが検出された(図-1)。本研究の結果では北海道内において葉緑体ハプロタイプの変異は存在しなかった。

表-2. 本研究で使用した葉緑体DNA領域

領域	塩基配列長	塩基置換数	プライマー配列	プライマー由来
<i>psbA-trnA</i>	500	1	forward 5' ACCATCAATATCTACTGGAGGAGCAG 3' reverse 5' CGACTAGTTCGGGGTTTCGAG 3'	ユーカリ葉緑体塩基配列
<i>ycf3</i>	802	2	forward 5' CAGGAGTAAGCGGTATAGCTTGTTC 3' reverse 5' TTTTCGGGCACTAGAACGAAACCCGT 3'	ユーカリ葉緑体塩基配列
<i>ndhC</i>	447	1	forward 5' ACGGACTCGAACCGTAGACCTTCTCG 3' reverse 5' GCTCAGTTAGGTAGAGCACCTCGT 3'	ユーカリ葉緑体塩基配列
<i>petL-psbE</i>	802	4	forward 5' AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTGA 3' reverse 5' TATCGAATACTGTGTAATAATATGAGC 3'	Shaw et al.(2007)
<i>rbcL</i>	575	1	forward 5' ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC 3' reverse 5' GTAATAATCAAGTCCACCRCG 3'	Kreese and Erickson(2007)
<i>trnH-psbA</i>	443	4	forward 5' CGGCGATGGTGGATTGCAATCC 3' reverse 5' GTTATGCATGAACGTAATGCTC 3'	Kreese and Erickson(2007)

2. 産地試験地における初期成長の産地および家系間変異

2.1. 生存率における産地および家系間変異

千歳産地試験地では、ツリーシェルターによる保護効果によりシカや野兎による食害や下刈り時の誤伐の影響がなかったため、いずれの家系も死亡個体は0~2個体であり、生存率が高かった。新冠試験地では誤伐が多く見られ、(14%)。一部は枯死したものの、側枝が伸長して成長を

続けた個体も多く観察されたが、本研究では一度でも誤伐された個体は除外して解析を行った。また、アオダモは萌芽性が高いため、一度枯死と判定されても翌年以降、成長が認められる個体があった。このため、2年以上継続して枯死と判定されたもののみを死亡個体とすることとし、4年次までの生存データを使用した。また、植栽時の苗高が生存率に影響を与えた可能性も考えられたため(図-3)、4年次の生存率について、1年次の苗高を固定効果として含む6つのモデルを仮定して各モデルのAICを算出した結果、ブロックと1年次を説明変数とするモデルのAICが最少となり、最も適合性の高いモデルとして選択された(表-3)。したがって、生存率において産地および家系の効果は小さく、植栽時の苗高が植栽後の生存率に及ぼす影響が大きいと考えられた。

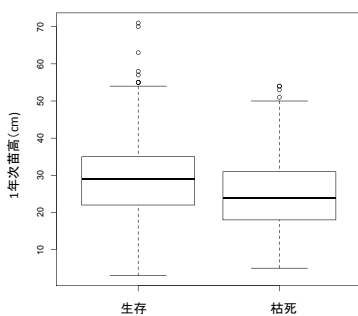


図-3. 新冠試験地における4年次の生存個体および枯死個体の1年次の苗高

表-3. 新冠試験地における生存率に関する各モデルのAIC

説明変数(固定効果)	AIC
ブロック	895.75
1年次の樹高	910.09
ブロック, 1年次の苗高	876.73
ブロック, 1年次の苗高, 家系	914.29
ブロック, 産地, 1年次の苗高, 家系	914.29
ブロック, 家系, 家系とブロックの交互作用, 1年次の苗高	1019.5

2.2. 初期成長における産地および家系間変異

2試験地の4年次の苗高について仮定した4つのモデルのAICを比較した結果(表-4)、試験地のみを固定効果としたモデルが選択され、産地と家系の効果は小さいと考えられた。4年次の平均苗高は、新冠試験地では55.4cmであったのに対して千歳試験地では138.8cmと顕著な差があり、その差異は保育に起因するものと考えられた。この結果から、初期成長についても試験地ごとに、産地および家系間の変異を検討することにした。

新冠試験地における5年次までの苗高の家系平均値の推移を図-4に示した。2年次の苗高の平均値が1年次と比較して低下している家系が見られたが、その理由として気象害による先枯れなどが考えられる。2年次は植栽した翌年であり、越冬に際して寒風害による先枯れまたは雪害による先折れを起こした影響が現れているのかも知れない。産地と産地内家系を固定効果とするモデルと家系のみを固定効果とするモデルについて、それぞれ算出されたAICを表-5aに示した。2つのモデルのAICは同等であり、初

期成長に及ぼす産地の効果は小さいと考えられた。一方、分散分析において有意な家系間変異がみとめられたことから(表-5b, $p=0.013$)、優良な家系を選択して植栽することにより、下刈等保育の労力およびコストを削減できる可能性が示唆された。

千歳産地試験地における4年次までの苗高の家系平均値の推移を図-5に示した。千歳試験地では、新冠試験地のような2年次の苗高平均値の低下は見られなかった。これは、ツリーシェルターによる気象害からの保護効果によるものと考えられる。千歳試験地においても、2つのモデルAICは同等であり(表-5a)、初期成長に及ぼす産地の効果は小さいと考えられた。家系を説明変数とした分散分析では、新冠試験地での結果と異なり、有意な家系間変異は認められなかった(表-5b, $p=0.153$)。その理由として、生存率と同様ツリーシェルターによる保護効果により気象害や下草との競合による成長阻害を受けにくく、家系間の差が小さくなったことが考えられる。

表-4. 2試験地の4年次苗高について仮定した各モデルのAIC

説明変数(固定効果)	AIC
試験地	8312.2
試験地, 産地, 家系	8355.0
試験地, 家系	8355.0
試験地, 家系, 試験地と家系の交互作用	8367.3

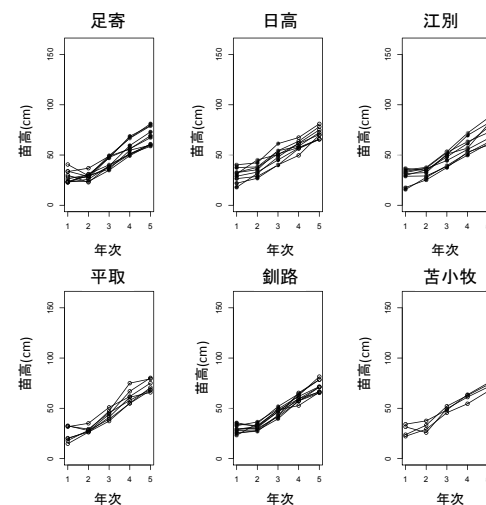


図-4. 新冠試験地における苗高の家系平均値の推移

表-5. 新冠試験地における5年次の苗高に関する各モデルのAIC(a)および選択された説明変数による分散分析表(b)

説明変数(固定効果)	AIC
家系	5024.9
産地, 産地内家系	5024.9

説明変数	自由度	平均平方	F値	p値
家系	49	595.32	1.54	0.013
誤差	527	388.13		

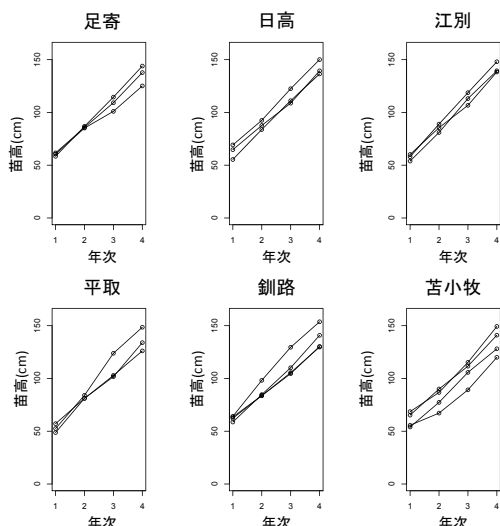


図-5. 千歳試験地における苗高の家系平均値の推移

表-6. 千歳試験地における5年次の苗高に関する各モデルのAIC(a)および選択された説明変数による分散分析表(b)

a

説明変数(固定効果)	AIC
家系	2863.2
産地, 産地内家系	2863.2

b

説明変数	自由度	平均平方	F値	p値
家系	19	1247.7	1.35	0.153
誤差	287	926.7		

まとめ

本研究では、葉緑体DNAハプロタイプ、産地試験地における初期成長のいずれにおいても、北海道内のアオダモにおいて明らかな産地間変異は認められなかった。したがって北海道内であれば、アオダモの種苗の移動可能であると考えられる。一方で、千歳産地試験地における4年次の平均苗高は新冠試験地のおよそ2.5倍に達しており、保育の重要性が明らかになった。アオダモを含め広葉樹は一般的

に成長が遅く、人工造林が困難である場合が多いが、ツリーシェルターの設置により健全に成林できる可能性が示された。今後は、千歳試験地においてツリーシェルターの撤去時期や樹形への影響を検討し、アオダモの育成手法の改良に向けた試験も進めたいと考えている。

謝辞

材料の収集および試験地の設定、管理に当たっては北海道森林管理局を始め多くの方々にご協力いただいた。葉緑体DNAの多型の検索に使用したユーカリ由来のプライマーの設計は、九州大学農学研究院准教授渡辺敦史博士にご助力いただいた。本研究は、森林総合研究所ダイバーシティ推進室による研究支援を受けて行った。ここに感謝申し上げる。

引用文献

- (1) 福田陽子 (2012) 北海道育種場内のアオダモ天然集団の開花周期と結実状況. 北海道の林木育種 55(2): 19-22.
- (2) Kress WJ and Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: The *rbcl* coding gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. Plos one <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- (3) R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- (4) 佐々木忠兵衛 (1985) 道央自生広葉樹の着果の周期性. 日林北支講 34: 130-132.
- (5) Shaw J, Lickey EB et al. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequence choose non coding regions for phylogenetic studies in angiosperms. Am J Bot 94(3): 275-288.
- (6) Steane DA (2005) Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from the Tasmanian blue gum, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). DNA Res. 12(3): 215-20