

## 【原著論文】

位山の天然林および実生の遺伝解析により推定された  
ヒノキとサワラ間の生殖隔離

木村 玲夢<sup>1,2</sup>・鶴田 燃海<sup>\*,1,3</sup>・岩泉 正和<sup>4</sup>・向井 譲<sup>1</sup>

Evidence for an interspecific reproductive barrier between *Chamaecyparis obtusa* and *Chamaecyparis pisifera* inferred from genetic analyses of natural populations and seedlings in Mt. Kuraiyama

Ryoumu Kimura<sup>1,2</sup>, Momi Tsuruta<sup>\*,1,3</sup>, Masakazu G. Iwaizumi<sup>4</sup>, Yuzuru Mukai<sup>1</sup>

**要旨：**日本固有で重要な林業用針葉樹であるサワラの天然林は、現在小集団化が進んでおり、遺伝的多様性の低下や周りに広く分布する近縁のヒノキ人工林からの遺伝子流動による遺伝子かく乱が懸念される。本研究では同所的に生育するヒノキとサワラの成木および実生集団の遺伝解析により、天然林における種間交雑の頻度を明らかにすることを試みた。SSR マーカー 5 座を用い、岐阜大学位山演習林に分布するヒノキ ( $N = 123$ ) とサワラ ( $N = 80$ ) の天然林集団の遺伝的多様性を調査した。また同林分の林床からヒノキ属の実生 ( $N = 175$ ) を採取し、同じ SSR マーカーおよび CAPS マーカーにより種の判別を行った。成木種間の遺伝子分化係数  $G_{ST}$  は 0.442 と高く、ベイズ推定によるクラスター解析 ( $K = 2$ ) においても両種は比較的明瞭に分化していることが示された。また、実生の解析でも種間雑種と判断された実生は一つも見られなかった。両種の天然林集団が明確に遺伝的に分化していること、実生の解析において雑種が確認されなかったことから、自然条件下では両種間での遺伝子流動はほとんどない、あったとしてもごく稀であると考えられた。

**キーワード：**雑種、種判別、生殖隔離、ヒノキ属

**Abstract:** Natural stands of sawara cypress (*Chamaecyparis pisifera*), an important conifer species endemic to Japan, are fragmented and declining. This raises concerns about the loss of genetic diversity and potential genetic swamping via frequent gene flow from widespread surrounding plantations of the closely related hinoki cypress (*Chamaecyparis obtusa*). To determine the extent of interspecific hybridization between the two species, we conducted genetic analyses of mature trees and seedlings growing in the natural forests. Using five nuclear microsatellite (SSR) markers, we examined the genetic diversity of hinoki cypress ( $N = 123$ ) and sawara cypress ( $N = 80$ ) in the Kuraiyama Experimental Forest of Gifu University. The genetic differentiation coefficient ( $G_{ST}$ ) of 0.442 and the results of Bayesian cluster analysis revealed clear differentiation between the two species.

\* E-mail: tsuruta\_momi140@ffpri.go.jp

<sup>1</sup> 岐阜大学応用生物科学部 Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, Gifu 501-1193, Japan

<sup>2</sup> 現所属：中部森林技術コンサルタンツ Chubu Forest Engineering Consultants, 1-7-17 Marunouchi Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-0002, Japan

<sup>3</sup> 現所属：森林総合研究所樹木分子遺伝研究領域 Department of Forest Molecular Genetics and Biotechnology, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI), 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki 305-8687, Japan

<sup>4</sup> 森林総合研究所林木育種センター関西育種場 Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, FFPRI, 1043 Uetsukinaka, Sho-o, Katsuta, Okayama 709-4335, Japan

2025 年 11 月 6 日受付、2025 年 12 月 19 日受理

Analysis of 175 *Chamaecyparis* seedlings collected from the forest floor of the same natural forest using same SSRs and cleaved amplified polymorphic sequences markers revealed their species identities, with none of the seedlings identified as interspecific hybrids. Given the clear genetic differentiation between the natural forest populations of the two species and the absence of hybrids among the seedlings, we conclude that gene flow between the two species under natural conditions is highly restricted or extremely rare.

**Key words:** *Chamaecyparis*, hybridization, isolation, species identification

## はじめに

ヒノキ科ヒノキ属のサワラ [*Chamaecyparis pisifera* (Siebold et Zucc.) Endl.] は、木曾五木にも挙げられる林業上重要な樹種である。サワラは日本固有の針葉樹で、天然林は中部地方を中心として九州から東北にかけて分布する(林 1960)。しかし、現在サワラの天然林は分断・小集団化されており、遺伝的多様性の低下が危惧される。加えてサワラ天然林は、近縁種であるヒノキ [*Chamaecyparis obtusa* (Siebold et Zucc.) Endl.] からの頻繁な交雑の機会に晒されている可能性がある。

ヒノキは日本における主要な造林木の一つで、植林により現在ヒノキ人工林の面積は 253 万 ha に達する(林野庁 2024)。このため、地域によってはサワラ天然林とヒノキ林とが接するようになっている。このような状況において、自然条件下で両種間の種間交雑が可能であるなら、ヒノキからの頻繁な遺伝子流動がサワラ天然林の遺伝子組成を改変してしまう恐れがある。近縁種からの頻繁な遺伝子流動は、孤立した天然林個体群の遺伝的特徴の消失、遠交弱勢や雑種崩壊による雑種後代の適応度の低下を引き起こし、個体群の崩壊を引き起こしかねない(Allendorf et al. 2001 ; Levin et al. 1996)。

このため、サワラ天然林の保全には近縁種との間でどれほど種間交雑が起こるのかの理解が不可欠である。これまでに両種の雑種形成については、人工交配からヒノキとサワラの間でごくまれではあるが雑種が形成され(種子の稔性は 0~数%程度、Fukuhara 1978 ; 福原 1989 ; 檜崎ら 1996 ; 大黒・岡村 1987)、一部は 3 倍体であること、またサワラを母樹とした組み合わせにおいてより雑種が形成されやすいことが示されている。また、ヒノキの精英樹として選抜された富士 2 号はヒノキとサワラの中間的な形態をしており、DNA 分析により両種の 3 倍体雑種であることが確認されている(Kondo et al. 1998 ; 前田・宮島 1977 ; 檜崎ら 1996)。一方で、天然林での交雑の実態を調べた研究は見られない。

近年、遺伝解析により花粉親の直接推定といった集団内の交配実態の把握や、種間の遺伝的多様性の比較から過去の遺伝子浸透の推定が可能となってきた(Paysseur and Rieseberg 2016 ; Rieseberg et al 1993)。しかし、これまでにヒノキとサワラ種間の遺伝的な分化は、葉緑体 DNA (Kusumi et al. 2000) や sequence-tagged site (Kado et al. 2008) の比較に限られ、同所的に生育する両種の集団分化の程度は明らかではなかった。そこで本研究は、ヒノキとサワラが同所的に生育し、かつ周囲にヒノキ人工林が広がる天然林において、マイクロサテライト (SSR) マーカーによる両種の成木の遺伝解析を実施し、種間の遺伝的多様性の比較を行った。また同じ SSR マーカーおよび種判別用に開発された cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーにより実生の雑種判定を行い、自然状態でのヒノキとサワラの種間交雑の有無を調べた。

## 材料と方法

### 調査地概要

本研究では、岐阜大学応用生物科学部附属位山演習林(下呂市萩原町山之口、東経 137.20°–137.24°、北緯 35.98°–36.02°)内のヒノキおよびサワラ天然林を対象に調査を行った。船山南西斜面(標高 825 m–1,451 m)に広がる 553 ha の同演習林には、冷温帯林のほか、ヒノキを中心とする人工林およそ 220 ha が広がる。また、演習林の周囲にもヒノキが広範囲に植林されている。ヒノキおよびサワラの天然林はこの演習林内に点在し、このうちの 4 箇所の天然林集団 (NP01, NP05, NP09, NP12) を調査対象とした(図-1)。それぞれの集団内では、ヒノキは尾根沿い、サワラは谷筋と、局所的な住み分けが見られる。同演習林では両種の開花時期および花粉の飛散が調査されており、林分単位では両種の開花期のピークには違いがあるものの、サワラの雌花の開花期に多くのヒノキ花粉が飛来することが分かっ

ている (Ikeru et al. 2017)。

### ヒノキ・サワラ天然林成木個体および実生の採取

それぞれの集団より、形態による判別を基に約30個体のヒノキおよびサワラ成木の葉を採取した。なお、NP09ではヒノキのみを採取した。近縁個体やクローン個体の採取をさけるため、成木はおよそ30m以上離してサンプリングした。採取した葉は、DNAの抽出まで-80度で保存した。加えて、NP01およびNP12集団の林床より、種を識別せずにそれぞれ58個体および117個体のヒノキ属の実生を採取した (Ss01, Ss12)。このとき、実生の種判別の目安として、初生葉の展開段数を記録した。なお、実生の採取時点で初生葉が脱落していた個体は、段数を不明とした。採取後、実生サンプルは-80度で保存した。

液体窒素により凍結させた成木の葉および実生をマルチビーズショッカー (安井機械) で粉碎した後、向井・山本 (1997) に従ってDNAを抽出した。

### CAPS マーカーによる実生の種判別

採取した実生の種を判別するため、葉緑体の *matK* 配列の多型を基に開発されたCAPS マーカー Chaps-

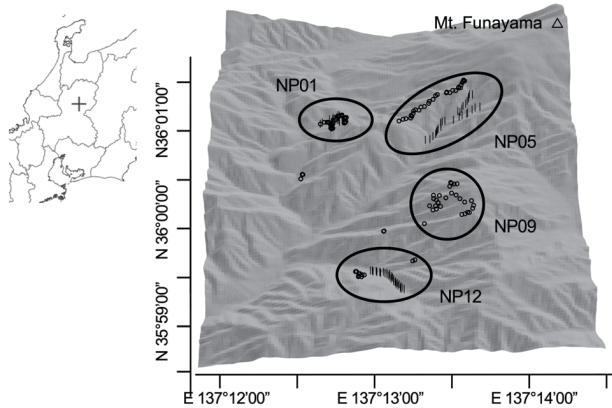


図-1 位山演習林および調査を行ったヒノキ属天然林集団の位置  
丸印はヒノキ個体、縦棒はサワラの個体を示す。

表-1 種判別に使用したCAPS マーカーとその増幅・切断断片長

マーカー名	増幅領域	制限酵素	増幅 (上段) および切断 (下段) 断片長 (base pair)	
			ヒノキ	サワラ
Chaps_matK01 <sup>a</sup>	Chloroplast <i>matK</i>	<i>Dra</i> I	492 (120, 372)	495 (88, 120, 287)
Chaps_its01	Nuclear ribosomal RNA, ITS1-5.8S-ITS2	<i>Msp</i> I	294 -	293 (137, 156)

<sup>a</sup>Ikeru et al. (2017)

matK01 (Ikeru et al. 2017) および、新たに核リボソーム RNA の配列を基に開発したCAPS マーカー (Chaps-its01) を用いた (表-1)。DNA データベースに登録された両種の核リボソームの internal transcribed spacer (ITS) 1-5.8s-ITS2 領域の配列 (AB030133, AB030132, FJ475231, FJ475232, HM023985, HM023986) を MEGA 5 (Tamura et al. 2011) を用いてアライメントし、制限酵素認識サイトの有無により両種が判別可能な領域を同定した。この領域を含む断片が増幅されるよう、一対のプライマーを設計した (F: 5'-CATTTCGCGGACAAGACC-3', R: 5'-GAGATATCCGTTGCCGAGAG-3')。

DNA 10 ng、2 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 1 × Buffer、0.2 mM dNTP、forward および reverse primer それぞれ 0.2 μM、Blend Taq polymerase (TOYOBO) 0.125 units を含む計 20 μl の反応液を、95°C で 5 分間熱変性を行った後、95°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 30 秒のサイクルを 32 回繰り返し、最後に 72°C 5 分間の条件で PCR を行った。PCR 産物 7 μl に 1 unit の制限酵素 (*Dra*I または *Msp*I) および REN buffer を加え、37°C で 1 時間反応させた。反応液を 1.2% アガロースゲルで電気泳動し、増幅断片の切断パターン (図-2) により実生の種を判別した。

### SSR マーカーによる集団内および集団間の遺伝的分化

ヒノキで開発された核 SSR マーカー 32 座 (Co 3 座 : Nakao et al. 2001、Cos 15 座 : Matsumoto et al. 2006、bcco 14 座 : Iwaizumi et al. 2011) を、ヒノキおよびサワラの成木それぞれ 8 個体を用いてスクリーニングを行い、両種ともに増幅可能な遺伝子座を探索した。10 ng の DNA、2 mM の MgCl<sub>2</sub> を含む 1 × Buffer、0.2 mM の dNTP、forward および reverse primer それぞれ 0.2 μM、IRDye800 (LI-COR 社製) で蛍光標識した forward primer 0.02 μM、Blend Taq polymerase (TOYOBO 社製) 0.125 units を含む反応液を、それぞれ文献に記載の条件で PCR 増幅した。IR<sup>2</sup> 4200S-1G (LI-COR 社製) を用いて電気泳動を行い、Saga generation ver. 3.1 (LI-COR 社製) を用い増幅断片長 (遺伝子型) を判断した。両種で多型が確認された 5 つの遺伝子座 (表-2) について、全 378 個体の遺伝子型を同様の手法で決定した。

GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse 2006, 2012) を用いて遺伝子座ごとに、ヒノキ (N = 123) およびサワラ (N = 80) の天然林の成木集団における対立遺伝子数 ( $N_a$ )、種ごとに固有な対立遺伝子の数 ( $P_{A_{sp}}$ )、遺伝子多様度 ( $H_o$ )、種内の集団間におけ

る遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ : Nei 1973) および Hedrick (2005) の補正值  $G'_{ST}$ 、両種間の  $G_{ST}$  および  $G'_{ST}$  を算出した。また、それぞれの種の集団ごとに、 $N_a$ 、有効な対立遺伝子数 ( $N_e$ )、固有な対立遺伝子数 ( $P_{A_{pop}}$ )、 $H_e$ 、および固定指数 ( $F_{IS}$ ) の遺伝的多様性パラメータを算出した。

### 天然林および実生集団の遺伝構造

SSR 5 座による両種の成木 203 個体の遺伝構造を、STRUCTURE ver. 2.3 によるベイズクラスタリング (Pritchard et al. 2000) から推定した。パラメータは admixture model、correlated allele frequencies、100,000 回の

burn-in および iteration 100,000 回とし、遺伝的なクラスターの数 ( $K$ ) を 1 から 6 まで設定し、それぞれの  $K$  につき 20 回の試行を行った。各  $K$  における尤度  $\ln P(K)$  の平均値および  $K$  間の差分から最適な  $K$  を決定した (Evanno et al. 2005)。最適な  $K$  において、それぞれのクラスターに割り振られる確率 ( $q$  value) を個体ごとに推定した。なお、遺伝子型を決定できた座数が 60% に満たない個体は解析から除外した。

上記の結果を基に、各実生がどのクラスターに割り振られるかを次のように解析した。STRUCTURE の POPINFO 機能を用い、ヒノキとサワラの成木をそれぞれ既知の集団 (リファレンスデータ: POPFLAG = 1) とした。このとき、採取時の形態による判別と上記 STRUCTURE 解析において 70% 以上の確率で割り振られるクラスターの型とが異なった種が曖昧な個体は、解析から除外した。 $K$  は上記の解析で最適と判断された値とし ( $K=2$ )、175 個体の実生個体 (POPFLAG = 0) を任意のクラスターへと割り振った。解析は先の成木でのモデルと同様の条件に加え、POPFLAG = 1 のデータのみを対立遺伝子頻度に用いるよう指定した。

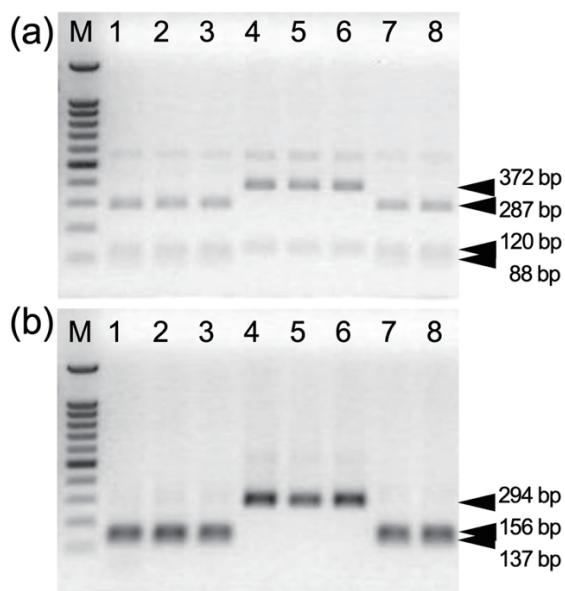


図-2 CAPS マーカー Chaps\_matK01 (a) および Chaps\_its01 (b) の電気泳動像とヒノキおよびサワラの種判別例

M: 100 bp ラダー、1~8: 実生。制限酵素による切断パターンの違い (表-1) により、1-3, 7, 8 はサワラ、4-6 はヒノキと判別できる。

## 結果

### CAPS マーカーによる実生の種判別

葉緑体の Chaps\_matK01 および核リボソームの Chaps\_its01 どちらの領域も、増幅断片を特定の制限酵素で処理することで、両種を識別できた (表-1、図-2)。開発した核 DNA のマーカー Chaps\_its01 により雑種が判定でき (雑種の場合はヘテロ接合)、またヒノキ科では葉緑体は父性遺伝するため (Kondo et al. 1998)、葉緑体 DNA のマーカー Chaps\_matK01 によりどちらの種が花粉親となっていたかが判定できる。

表-2 天然林成木集団における遺伝子座ごとの種内および種間の遺伝的分化

マーカー名	対立遺伝子長の範囲 (bp)	ヒノキ ( $N=123$ )					サワラ ( $N=80$ )					種間		
		$N_a$	$P_{A_{sp}}$	$H_e$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$	対立遺伝子長の範囲 (bp)	$N_a$	$P_{A_{sp}}$	$H_e$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$	$G_{ST}$	$G'_{ST}$
Cos1991	170-192	2	1	0.494	0.008	0.018	192-194	2	1	0.375	-0.005	-0.010	0.145	0.370
Cos2126	167-221	23	9	0.874	0.000	0.003	179-221	15	1	0.671	0.015	0.062	0.105	0.843
bcco0086	138-180	22	1	0.924	0.004	0.066	120-182	27	6	0.915	0.005	0.084	0.022	0.575
bcco0112	74-110	18	4	0.880	-0.000	-0.002	70-134	19	5	0.888	0.009	0.113	0.019	0.315
bcco0763	117-179	26	6	0.938	0.020	0.344	123-229	30	10	0.929	0.013	0.259	0.010	0.309
平均 (全体)		18.2	4.2	0.822	0.006	0.046		18.6	4.6	0.755	0.009	0.049	0.051	0.442

$N_a$ : 対立遺伝子数、 $P_{A_{sp}}$ : 種ごとに固有な対立遺伝子数、 $H_e$ : 遺伝子多様度、 $G_{ST}$ : 遺伝子分化係数、 $G'_{ST}$ : 遺伝子分化係数の補正值。

これらのマーカーを用いて採取した 175 個体の実生の種同定を行ったところ、ヒノキ 78 個体、サワラ 97 個体と判断された。また、雑種と判断された実生は見られなかった (図-3a)。このときヒノキと判断された実生の初生葉は 3 から 5 段、サワラでは 6 から 34 段であった (図-3b)。これらの判断に基づき、実生をヒノキ (Ss01\_Co, Ss12\_Co) とサワラ (Ss01\_Cp, Ss12\_Cp) 集団に分けた。

### SSR マーカーによる種内・種間の遺伝的多様性および分化

ヒノキで開発された SSR マーカーのスクリーニングの結果、およそ半数の 15 座においてサワラでも増幅断片を得ることができた。しかしこれらのうち、サワラで多型が見られた遺伝子座は 5 座のみであった。この SSR 5 座におけるヒノキおよびサワラの  $N_a$  および  $PA_{sp}$  は、どちらもヒノキ ( $N_a : 18.2, PA_{sp} : 4.2$ ) に比べサワラ ( $N_a : 18.6, PA_{sp} : 4.6$ ) で高い傾向にあった (表-2)。一方、 $H_e$  はヒノキで 0.822 (SE=0.083)、サワラで 0.755 (SE=0.106) となった (表-2)。この傾向は、集団ごとの  $N_e$  (ヒノキ : 7.4-8.8、サワラ : 6.3-6.8) および  $H_e$  (ヒノキ : 0.801-0.816、サワラ : 0.730-0.748) においても見られた

(表-3)。一方で実生における  $N_e$  (Ss01\_Co : 6.4, Ss12\_Co : 9.4, Ss01\_Cp : 6.7, Ss12\_Cp : 8.0) および  $H_e$  (Ss01\_Co : 0.775, Ss12\_Co : 0.831, Ss01\_Cp : 0.777, Ss12\_Cp : 0.792) は、どちらも Ss12 の集団において高い傾向にあった (表-3)。また遺伝子座平均で、それぞれの集団に 0.2 から 0.8 個の固有な対立遺伝子が見られた。

ヒノキおよびサワラの種内の集団間の  $G_{ST}$  はそれぞれ 0.046 および 0.049 で、同程度であった (表-2)。また両種間の  $G_{ST}$  および  $G'_{ST}$  は、それぞれ 0.051 および 0.442 となった (表-2)。なお、ヒノキと判断された実生とサワラと判断された実生との間の  $G_{ST}$  および  $G'_{ST}$  は 0.056 および 0.574 となり、成木の NP01 および NP12 集団における種間の値 ( $G_{ST} : 0.053, G'_{ST} : 0.460$ ) とほぼ同程度か高い傾向にあった。

### 天然林および実生集団における遺伝構造

成木集団における STRUCTURE 解析の最適なクラスター数  $K$  は 2 と推定された。これに従い、各個体は図-4 に示したようにそれぞれの種のクラスター (ヒノキ型およびサワラ型) に高い確率で割り振られた。ただし、同種クラスターへの  $q$  value が 6 割を下回る個体も、ヒノキで 7 個体、サワラで 6 個体見られた。

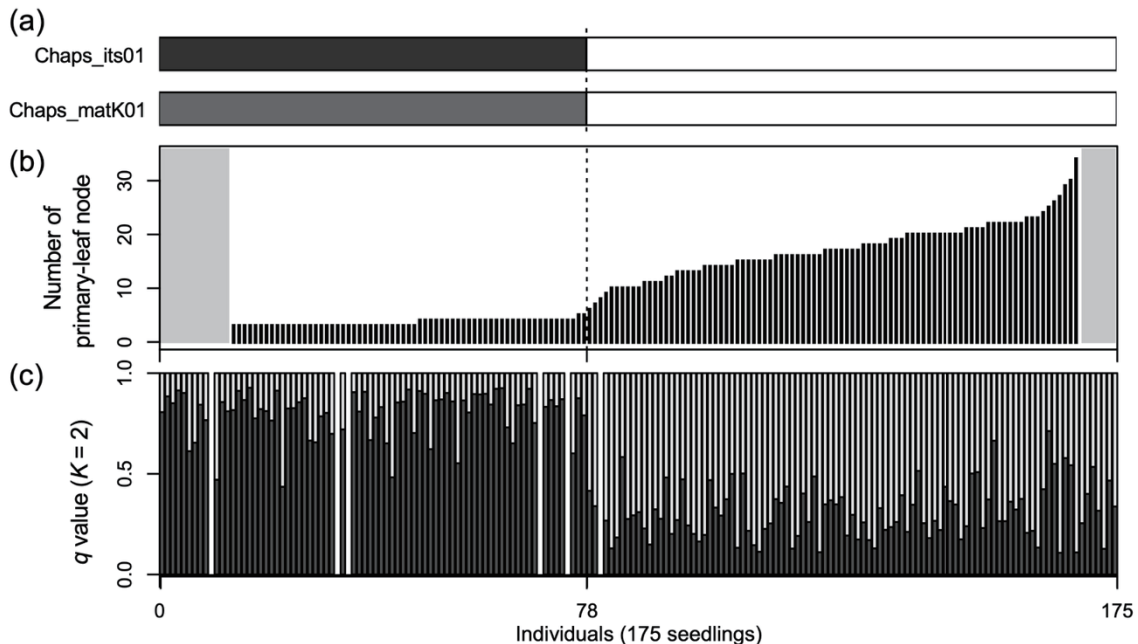


図-3 位山演習林から採取したヒノキ属実生の CAPS マーカーによるヒノキ (灰色) サワラ (白) の種判別結果 (a)、初生葉の段数 (b)、STRUCTURE 分析によるヒノキ型 (黒) およびサワラ型クラスター (灰色) に割り振られる確率 (c) 横軸は実生の個体 (初生葉の段数順) を表す。初生葉の段数が不明な個体をグレーで、遺伝子型決定不足による STRUCTURE 解析除外個体を白抜きで示した。

表-3 ヒノキとサワラの成木および実生の各集団における遺伝的多様性

サンプル	種	集団	$N$	$N_a$	$N_e$	$P_{A_{pop}}$	$H_e$	$F_{IS}$
成木	ヒノキ	NP01_Co	33	12.6	7.5	0	0.802	0.006
		NP05_Co	30	13.2	8.8	0	0.816	0.084
		NP09_Co	30	12.4	7.4	0	0.806	-0.042
		NP12_Co	30	13.8	7.7	0.6	0.801	0.018
	サワラ	NP01_Cp	20	10.4	6.4	0.4	0.748	0.185
		NP05_Cp	30	13.2	6.3	1.2	0.738	0.129
		NP12_Cp	30	12.2	6.8	0.6	0.730	0.101
実生 <sup>a</sup>	ヒノキ	Ss01_Co	32	10.8	6.4	0.2	0.775	0.009
		Ss12_Co	45	15.4	9.4	0.8	0.830	-0.043
	サワラ	Ss01_Cp	26	11.0	6.7	0.8	0.777	-0.050
		Sd12_Cp	72	15.2	8.0	0.4	0.797	0.027

$N$ : サンプル数、 $N_a$ : 対立遺伝子数、 $N_e$ : 対立遺伝子の有効数、 $P_{A_{pop}}$ : 固有な対立遺伝子数、 $H_e$ : 遺伝子多様度、 $F_{IS}$ : 固定指数。

<sup>a</sup>CAPS マーカーに基づいて分類した種ごとの実生集団。

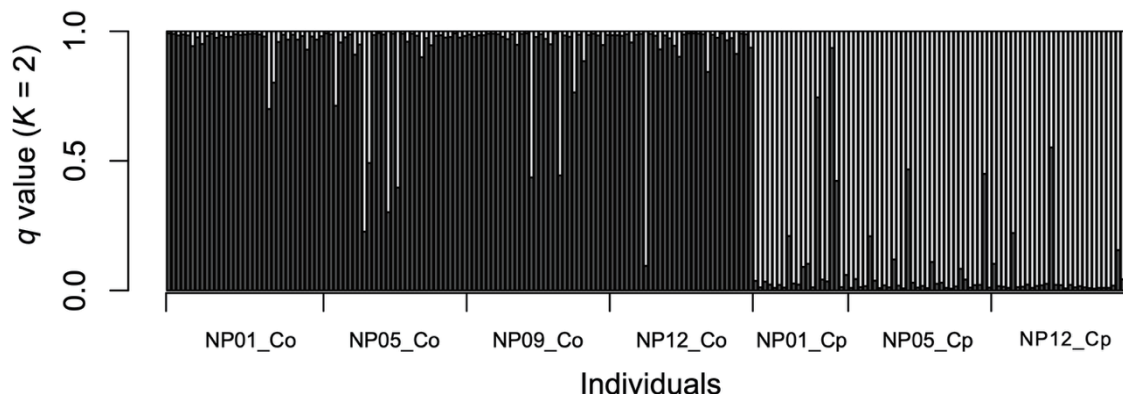


図-4 位山演習林のヒノキおよびサワラ成木における STRUCTURE 解析結果

ヒノキ型およびサワラ型クラスターに割り振られる確率を、それぞれ黒と灰色で示した。横軸は個体および採取した集団を表す (Co: ヒノキ、Cp: サワラ)。

成木集団における遺伝子組成の情報を基に実生の割り振りを行ったところ、おおむね CAPS マーカーにより判断された種と同種のクラスター型に割り振られた (図-3c)。ただし、 $q$  value は平均 0.737 (0.287-0.928) と成木集団ほど高くなく、両種の間間型のような個体や、0.5 を下回る個体もヒノキで 3 個体、サワラで 11 個体見られた。

### 考 察

本研究では共通の SSR マーカーを用いることで、同所的に生育するヒノキとサワラ天然林において、全遺伝子多様度のおよそ 45% が種間の多様性であることが示された ( $G'_{ST}=0.446$ 、表-2)。この遺伝的分化の値は位山演習林 1 地域の集団のみを対象としたものではあ

るが、それぞれの種内の集団間の値 ( $G'_{ST}=0.046, 0.049$ ) や、Matsumoto et al. (2010) による全国の天然林を対象としたヒノキの種内の値 ( $G_{ST}=0.040$ 、 $G'_{ST}$  に換算すると 0.188) と比べても二倍以上高かった。実際にはサワラにおいて増幅が得られない、または多型の見られない遺伝子座も多かったことから、両種間の遺伝的分化はこの値以上に大きいものと考えられる。

このような結果を反映し、天然林の成木個体のクラスター解析では、形態を基に判別した個体は概ね遺伝的にも別々のクラスターに割り振られた (図-4)。ただし、同種のクラスターに割り振られる割合が 6 割を下回る個体も少なからず見られ、これらは限られた数のマーカーを用いていることによる識別能の不足、あるいは過去の種間の遺伝子浸透、祖先多型の共有による不完全な系統分けの可能性が考えられる。

Ikeru et al. (2017) が開発した葉緑体の CAPS および

今回開発した核のリボソームの CAPS マーカーを用いることで、ヒノキ/サワラの種判別および雑種の判定が容易に可能となった。実生の種判別結果からは、雑種と判断された個体は一個体も見られなかった。また CAPS による判別結果を基にした初生葉の段数 (ヒノキ : 3-5 段、サワラ : 6-34 段) は、これまでの報告とほぼ同様の値 (ヒノキ : 3-6 段、サワラ : 8 段以上 ; 福原 1989) となった。STRUCTURE 解析の結果も、おおむね形態・CAPS マーカーによる判別結果を支持した。ただし、特定のクラスターに割り振られる確率は成木に比べて低下した (図-3c)。この原因としては、実生集団では同種の成木集団では見られなかった対立遺伝子が多く存在しており (表-3)、サンプリングを行った成木集団以外からの広範な遺伝子流動が起こっていたことが考えられる。

以上の結果より、位山演習林のサワラ個体群はヒノキと交雑可能な状況にあるものの (Ikeru et al. 2017)、現時点において実生の解析からは雑種個体は見られず、ほぼ種間交雑はほぼ起こっていない、またはあったとしても雑種実生の成立はごく稀であると考えられた。これを反映し、成木集団においても  $G'_ST$  および STRUCTURE 解析では両種間で明瞭な遺伝的な分化が見てとれた。両種間には、受粉後の生殖隔離、または発芽以降に生育適地が存在することなどにより、種間の遺伝子流動が制限されている可能性がある。一方で、両種は人工交配によりわずかではあるが雑種ができること (Fukuhara 1978 ; 福原 1989 ; 檜崎ら 1996 ; 大黒・岡村 1987)、STRUCTURE 解析では一部別種に割り振られた個体や両種の間接型の個体が見られたことから、過去の遺伝子浸透や雑種形成の可能性は否定できない。今後、ゲノムワイドな遺伝的多様性解析を行うなど、両種の遺伝的特性を慎重に評価し、種間交雑の可能性について明らかにしていく必要がある。

## 謝 辞

位山演習林におけるヒノキおよびサワラの成木集団および実生のサンプリングにあたり、岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学研究教育センターのスタッフに多大なる協力をいただいた。ここに記してお礼申し上げる。

## 引用文献

- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001) The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 613-622
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620
- Fukuhara N (1978) Meiotic observations in the pollen mother cell of interspecific hybrid between *Chamaecyparis obtusa* and *C. pisifera*. *Journal of the Japanese Forestry Society* 60: 437-441
- 福原檜勝 (1989) ヒノキとサワラの種間交雑の稔性と雑種の識別. 林業試験場研究報告 354: 1-38
- 林弥栄 (1960) 日本産針葉樹の分類と分布. 農林出版, 東京
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59: 1633-1638
- Ikeru A, Tsuruta M, Mukai Y (2017) Identification of Cupressaceae species from airborne pollen grains using chloroplastic markers: implications for reproductive interference evaluation in a remnant natural population of *Chamaecyparis pisifera* (Sieb. et Zucc.) Endl. *Journal of Forest Research* 22: 320-324
- Iwaizumi MG, Watanabe A, Isoda K (2011) Primer note: development of highly polymorphic nuclear microsatellite markers for hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). *Silvae Genetica* 60: 62-65
- Kado T, Matsumoto A, Ujino-Ihara T, Tsumura Y (2008) Amounts and patterns of nucleotide variation within and between Japanese conifers, sugi (*Cryptomeria japonica*) and hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) (Cupressaceae sensu lato). *Tree Genetics & Genomes* 4: 133-141
- Kondo T, Tsumura Y, Kawahara T, Okamura M (1998) Paternal inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in interspecific hybrids of *Chamaecyparis* spp. *Breeding Science* 48: 177-179
- Kusumi J, Tsumura Y, Yoshimaru H, Tachida H (2000) Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae sensu stricto based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences. *American Journal of Botany* 87: 1480-1488
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1996) Hybridization and the extinction of rare plant species.

- Conservation Biology 10: 10–16
- 前田武彦・宮島寛(1977) ヒノキ精英樹の細胞学的研究-ヒノキとサワラの種間雑種と考えられる富士2号の細胞学的観察-. 日本林学会誌 59: 213–220
- Matsumoto A, Tani N, Xin-Guo L, Nakao Y, Tomaru N, Tsumura Y (2006) Development and polymorphisms of microsatellite markers for hinoki (*Chamaecyparis obtusa*). Molecular Ecology Notes 6: 310–312
- Matsumoto A, Uchida K, Taguchi Y, Tani N, Tsumura Y (2010) Genetic diversity and structure of natural fragmented *Chamaecyparis obtusa* populations as revealed by microsatellite markers. Journal of Plant Research 123: 689–699
- 向井譲・山本直樹(1997) 木本植物のDNA・RNA単離法. 島本功・佐々木卓治監修, 新版植物のPCR実験プロトコール, 57–62. 秀潤社, 東京
- Nakao Y, Iwata H, Matsumoto A, Tsumura Y, Tomaru N (2001) Highly polymorphic microsatellite markers in *Chamaecyparis obtusa*. Canadian Journal of Forest Research 31: 2248–2251
- 檜崎康二・渡辺敦史・富田啓治・佐々木義則・白石進(1996) ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種のDNA分析. 日本林学会誌 78: 157–161
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences 70: 3321–3323
- 大黒正・岡村政則(1987) ヒノキ属の種間雑種(ヒノキ×サワラおよびローソンヒノキ)の形態および細胞学的研究. 林木育種場研究報告 5: 59–87
- Payseur BA, Rieseberg LH (2016) A genomic perspective on hybridization and speciation. Molecular Ecology 25: 2337–2360
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288–295
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics 28: 2537–2539
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945–959
- Rieseberg LH, Ellstrand NC, Arnold M (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization?. Critical Reviews in Plant Sciences 12: 213–241
- 林野庁(2024) 森林・林業統計要覧 2004. 林野庁, 東京
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739