



Title	ミズナラの地域変異に関する研究
Author(s)	門松, 昌彦; KADOMATSU, Masahiko
Citation	北海道大學農學部 演習林研究報告, 40(1), 1-48
Issue Date	1983-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21078
Type	departmental bulletin paper
File Information	40(1)_P1-48.pdf



ミズナラの地域変異に関する研究*

門 松 昌 彦**

Studies on Geographical Variations of Mizunara
Oak (*Quercus mongolica* FISCH. var.
grosseserrata REHD. et WILS.)*

By

Masahiko KADOMATSU

目 次

第1章 序 論	2
第2章 ザイモグラフィーにおける酵素と試料の検討	4
第1節 ザイモグラフィー	4
1) アイソザイム	4
2) ザイモグラフィー	7
第2節 使用する酵素	10
1) 試料と方法	11
2) 結果と考察	13
第3節 試料の採取部位と時期	14
1) 試料と方法	14
2) 結果と考察	16
第3章 ベルオキンダーゼ・アイソザイムにみられる地域変異	18
第1節 試料と方法	18
第2節 結 果	22
第3節 考 察	29
第4章 葉の形態形質にみられる地域変異	31
第1節 試料と方法	31
第2節 結 果	33
第3節 考 察	40
摘 要	42
引用文献	43
Summary	47

* 1982年8月31日受理 Received August 31, 1982.

** 北海道大学農学部造林学研究室

** Laboratory of Silviculture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

第1章 序 論

従来、林学では、造林樹種という観点からか、その研究対象が針葉樹に偏っていた。しかし、針葉樹とともに天然林の主要な構成要素であること、木材としての利用価値も高いことなどを考えるならば、もっと広葉樹に目を向けるべきであろう。

ミズナラ (*Quercus mongolica* FISCH. var. *grosseserrata* REHD. et WILS.) は、日本の温帯林を構成する代表的広葉樹のひとつで、九州・四国・本州・北海道と日本各地に広く分布するとともに、樺太・千島にも存在する⁵⁹⁾。北海道には、同じコナラ属 (*Quercus*) に属する種として、他にコナラ (*Quercus serrata* THUNB.) とカシワ (*Quercus dentata* THUNB.) が分布している。コナラは温帯から暖帯にかけて分布し、北海道では南部に分布域が限られるが、これに対してカシワはほぼ北海道全域にわたって分布する^{29,49)}。カシワは北海道において海岸林を構成しているが、道東のオホーツク海沿岸と道北の日本海沿岸では、分類学上ミズナラの基本種であるモンゴリナラ (*Quercus mongolica* FISCH.) がこれに代わって海岸林を形成しているという記述がある^{49,51)}。なお、モンゴリナラは主として、樺太・朝鮮・中国北部・モンゴル・東シベリアに分布する^{49,59)}。

ミズナラの材は重く、硬く、ち密である。そして、環孔材である点や大きな放射組織を持つ点、さらに構成要素が複雑でその方向が錯綜している点によって、板目と柾目の両断面が完全に違うという特徴を持っている。特に放射組織が柾目面に光沢のある美しい虎斑を現わすために、ナラ材は高く評価されている。用途としては家具材、建築材など幅広く、また北海道からはインチ材として輸出されている²⁶⁾。

北海道はミズナラなどの天然林の宝庫である。面積で比べてみると、1976年現在、全国の天然林率は57%であるのに対し、北海道では70%もあった⁷²⁾。天然林の蓄積をみると、北海道は約4億7千万立方メートルの蓄積を有し、これは、北海道の森林の全蓄積の91%、全国の天然林蓄積の34%に相当する^{33,72)}。さらにナラ類(コナラ・カシワ・ミズナラの3種の他、全国の統計資料ではアベマキを含む)の蓄積を資料の関係上国有林に限って比較すると、北海道は全国の60%を占める⁷¹⁾。

しかし、1966年から1976年の10年間で、北海道の天然林の蓄積は約5億2千万立方メートルから約4億6千万立方メートルに減り、ナラ類の蓄積も約5千6百万立方メートルから約4千7百万立方メートルに減少している^{32,33)}。

広葉樹の育種を行なう時、その母材は少なくとも当面は天然林からしか得られず、また仮に採種園などが整備されたとしても、遺伝子給源として天然林は必要である。これらの点で、林木育種における天然林の持つ意味は非常に大きい。その天然林が減少しつつある状況の中で、広葉樹についての遺伝・育種学的研究は急務となって来ている。

コナラ属は遺伝・育種的にいくつか興味を引く問題を持っている。ひとつは、他の広葉樹

にあまりみられない更新面における特徴に起因する。すなわち、コナラ属はタネの散布様式として重力散布の形をとり、また萌芽更新を比較的容易にすることである。その結果として、遺伝的に近縁な個体が極めて狭い範囲に集中することが考えられる。そのため、一般にいろいろな障害が生ずるとされている近親交配がかなりの高率で起こることが予想される。その実状を把握することは、ひとつの課題であろう。

また、コナラ属は、TUCKER⁹¹⁾が指摘しているように自然に種間雑種を起こしやすく、2種の間中間タイプのものが出現することがある。北海道のミズナラについては、山根⁹⁷⁾が足寄、陸別、定山溪、野幌のミズナラの堅果や葉などを調べ、個体変異や地域変異があることを述べるとともに、モンゴリナラ的なものがあることに触れている。斉藤⁷⁶⁾は、道北地方のミズナラの堅果と殻斗の産地間の違いを調べ、モンゴリナラ型とミズナラ型のものが混在していると報告している。筆者は石狩海岸で、海寄りのカシワ林とその後背に隣接するミズナラ林との境に、外部形態上カシワとミズナラとの中間タイプと思われる個体を観察している。これらの事例は移入交雑との関連で興味を引くとともに、ミズナラを研究する場合常に留意しておくべき問題である。

このような諸問題はあるが、筆者は、まず道内のミズナラが地域的にどのような変異を持っているかを知ることが、ミズナラに関する遺伝・育種学的研究の重要な足がかりとなると考える。

地域変異の研究は、ニレ属 (*Ulmus*)^{69,70)}、トガサワラ属 (*Pseudotsuga*)^{28,73)}、トウヒ属 (*Picea*)^{2,11,62,64)}、モミ属 (*Abies*)⁶¹⁾などの多くの樹種で古くから行なわれているが、もっぱら形態的形質や生理的形質に基づいてなされてきた。コナラ属では稚樹の開芽時期や成長などの産地間変異^{14,37,46)}、材質の産地による違い⁴⁰⁾が調べられている。

動植物のアイソザイムに関する研究が進み、多くの知見が得られるにつれて、遺伝的変異の解明がより容易となった。アイソザイムは一般的に個々の遺伝子の直接的産物とみなしてよいから、世代交代の遅い林木においては特に意義が大きい。

本研究では、このアイソザイムとともに葉の形態を調べ、北海道内のミズナラ天然林にみられる地域変異を明らかにした。そして林分間ないし地域間に認められた遺伝的差異をもとに、ミズナラの北海道内における繁殖の中心地と分布経路の推定を試みた。

ミズナラのアイソザイムについては報告が少ないため、研究目的に沿う酵素や試料の採取時期など不明な点が多いので、第2章においてこれを検討した。アイソザイムにみられた地域変異については第3章で述べる。葉の形態形質にみられた地域変異については第4章で述べる。

なお、本研究をまとめるにあたって多くの方々にお世話になった。終始ご指導いただいた前北海道大学教授故武藤憲由博士に衷心からの謝意を手向ける。同じく当初からご教示とご助言を賜わった国立遺伝学研究所名誉所員酒井寛一博士に深く感謝する。また本論文の校閲を賜わった北海道大学教授津田周彌博士、同教授東三郎博士、同助教授柴草良悦博士に心から謝意

を表わす。また実験技術のご指導等お世話になった農林水産省林業試験場の松浦堯主任研究官、データ処理においてご協力いただいた国立遺伝学研究所の井山審也博士および農林水産省林業試験場北海道支場の向出弘正室長、マイクロ・コンピューター利用の便宜を与えて下さった北海道大学助教授菱沼勇之助博士に厚くお礼を申し上げる。

また、試料の採取などで、北海道営林局および各支局、木古内・森・定山溪・厚賀・浦河・中標津・網走・天塩・浜頓別の各営林署の方々、檜山支庁林務課近藤孝之氏、函館・倶知安林務署の方々、北海道立静内農業高等学校教諭尾崎弘康氏、東京大学北海道演習林の関係者の皆様、北海道大学天塩地方演習林・中川地方演習林・雨竜地方演習林の林長始め教職員の皆様、同檜山地方演習林林長工藤弘氏、農林水産省林業試験場北海道支場の鮫島惇一郎室長および育種研究室の皆様、北海道林木育種場の皆様、北海道大学農学部附属植物園の関係者の方々、同林学科の大学院生および学生各位のご協力をいただいた。深く感謝の念を表わす。一部のデータ処理に関しては、北海道大学大型計算機センターを利用した。ここに報告するとともに謝意を表わす。

なお、本論文は北海道大学審査学位論文である。

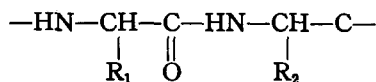
第2章 ザイモグラフィーにおける酵素と試料の検討

第1節 ザイモグラフィー

1) アイソザイム

1959年、MARKERT & MØLLER はいくつかの種の乳酸脱水素酵素が電気泳動法によって数本のバンドに分離することを発見した。彼らは同じ組織内に存在し、しかも同じ触媒作用をもちながら、分子構造が異なるために電気泳動法によって分離できるような多型的酵素を「アイソザイム(同位酵素 isozyme)」と呼ぶことを提唱した。「アイソザイム(isozyme)」という用語の代わりに「アイソエンザイム(isoenzyme)」という用語も広く使われている^{24,30,60}。

酵素(enzyme)によってはコファクター(cofactor)と呼ばれる非タンパク性補足グループに依存している場合もあるが、一般的には、酵素は全てタンパク質であると考えてよい。タンパク質は、20種類にもおよぶアミノ酸同士が、 α -カルボキシル基と α -アミノ基とでペプチド結合を行ない、ポリペプチド鎖を形成した分子量の大きな物質として定義される⁶⁹。その一般化学式は、



で示すことができ、その分子量は $10^4 \sim 10^5$ である。最も単純な酵素の分子量は12,000から40,000の間で、アミノ酸の分子量は75~200である。よって単純な酵素でも100~400のアミノ酸からできていることになる。

酵素は、それ自体は変化することなく、生体内で触媒作用を行ない、生命現象で重要な役割を担っている。酵素は有機反応の速度を著しく速めることができるが、この触媒反応は次の3つの過程から成っている。すなわち、

① 反応の第1段階で、基質(substrate)が酵素(enzyme)と結合し、酵素-基質(ES)錯体を生成すること。ただし、この時の結合は共有結合ではない。

② ある酵素はある特定の基質を選んで反応すること。つまり酵素は基質特異性を持つ。通常は酵素はただ1種類の化合物を基質とするが、時には化学構造が非常に似通った2つ以上の物質を基質とすることもある。

③ 触媒作用そのもの。

以上の3つである。なお、これまでに確認された酵素触媒反応の種類は1,000以上にもなるが、作用機構について厳密な意味で完全な説明が与えられているものは少ないようである。

酵素は、それらが触媒となる化学反応の特性に基づき、①酸化還元酵素(oxidoreductase)、②転移酵素(transferase)、③加水分解酵素(hydrolase)、④リアーゼ(lyase)、⑤異性化酵素(isomerase)、⑥リガーゼ(lygase)すなわち合成酵素(synthetase)の6主要グループに分けられる。そして、反応物の性質や作用を受ける結合のタイプなどによって、これらはさらに細かく分けることができる。本章第2節で、研究目的に沿うかどうかを検討した酵素のうち、ペルオキシダーゼ(oxidase)は、酸化還元酵素のグループに属し、エステラーゼ(esterase)と酸性フォスファターゼ(acid phosphatase)およびアルカリ性フォスファターゼ(alkaline phosphatase)の3者は加水分解酵素のグループに含まれる²⁴⁾。

酵素は前述のとおりアミノ酸から構成されているので、その化学的性質は多くの場合アミノ酸に似ている。アミノ酸は、1個の分子中に酸性であるカルボキシル基とアルカリ性であるアミノ基の両方を持つ両性電解質で、解離すると両方の荷電を持つ。そのため、アミノ酸分子は、それを溶かした溶液のpHに依存して正にも負にも荷電することができる。従って酵素も酸性もしくはアルカリ性溶液中で荷電し、その電荷の強さは一連のポリペプチドの持つアミノ基群およびカルボキシル基群の数と種類で決まる。これを利用したのが電気泳動法であり、酵素は一般に緩衝液がアルカリ性ならば陽極へ、酸性ならば陰極へ移動する。

電気泳動法においては、複数の酵素を同時に調べることも可能で、例えば、デンプンゲルを担体とする場合、泳動後ゲルを上下に二分し、それぞれ酵素の基質特異性に即した処理を行なえば、2種の酵素を検出できる。ただし、これらの酵素の移動方向または移動距離は、酵素の分子構造により当然ながら異なり得る。ところが、同じ基質特異性を持ち、触媒作用も同じであるにもかかわらず、言い替えれば酵素としての呼び名は全く同一であるにもかかわらず、分子構造——電荷と分子の大きさのわずかな相違から、電気泳動によって分離する一群の酵素がある。これをアイソザイムと呼ぶ。なお、同じ個体でも、器官または組織によってアイソザイムは異なる。

1971年に、それまでの研究成果に基づいて国際生化学連合の生化学命名委員会は、アイソザイムを以下のように分類することを提案した²⁰⁾。

- ① 遺伝的に独立のタンパク質。
- ② 2つまたは3つのポリペプチド鎖から形成される非共有結合のヘテロポリマー。
- ③ 遺伝的変異体 (対立遺伝子支配)。
- ④ 他のグループと結合しているタンパク質。
- ⑤ 1つのポリペプチド鎖から誘導されたタンパク質。
- ⑥ 1つのポリペプチド単位から形成されるポリマー群。
- ⑦ 立体構造の異型。

これに対し、遠藤²⁰⁾は遺伝学的立場から以下のように再分類した。

I. 同一遺伝子座に支配されるもの。

- ① アレリック・アイソザイム (対立酵素 allelic isozyme, allozyme と略す)。
- ② アレリック・アイソザイム間の雑種。
- ③ プロトマー (タンパク分子を構成する単位ポリペプチド) のいろいろな重合体。
- ④ 生化学的に修飾されたプロトマー。
- ⑤ コンフォーマー (回転異性体 conformer)。

II. 異なる遺伝子座に支配されるもの。

- ⑥ 独立遺伝するアイソザイム。
- ⑦ 独立遺伝するアイソザイム間の雑種。

そして、遺伝育種学的に重要なものは、アレリック・アイソザイムと独立遺伝するアイソザイムであると述べている。

大羽⁶⁰⁾は、アイソザイムを

- ① 各々別個の遺伝子座に支配されるもの。
- ② 単一遺伝子座上の複対立遺伝子に支配されるもの。
- ③ タンパク質成分の基本単位は同一であるが、その結合している数や、タンパク質以外の物質の量に違いがあるもの。

④ 2個以上の独立した遺伝子座に支配されるアイソザイム群 (ただし、それぞれのつくる異なったポリペプチド鎖が結合した時酵素活性が現われる)。

以上の4つに分類した。この分類における①は、前述の遠藤による分類の⑥に、また②は前者の①に、③は前者の③~⑤に、④は前者の⑦に相当する。そして、大羽も、集団中の遺伝的変異を調べるという観点からは、アレリック・アイソザイムが問題となるとしている。

本研究では、適当な実験材料が得られなかったために遺伝子分析ができなかった。そのためミズナラのアイソザイムの遺伝様式は不明であるが、それぞれのアイソザイムが別々の遺伝子座によって支配されているか、もしくは1遺伝子座にある複対立遺伝子によって支配されて

いると仮定して論議を進める。

アイソザイムはホルモンによって調節されるという考え方⁵²⁾があり、また医学における臨床的活用や植物での例^{8,92)}が示すように病害や損傷を被ることにより変化する場合もあるが、その影響は主として酵素活性に現われるようで、アイソザイムは本質的には遺伝子をかかなり直接的に反映すると考えてよい。

遺伝子、化学的にはデオキシリボ核酸 (DNA) は、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の4つの塩基を持ち、これらの塩基が組み合わさって遺伝情報となる。核内の DNA の持つ遺伝情報は、リボ核酸 (RNA) のひとつの伝令 RNA により複製される。伝令 RNA は核から細胞質に移動し、リボソームと結合して、転移 RNA が運んで来る遊離アミノ酸を遺伝情報に基づいて並ばせる。アミノ酸は酵素を媒介としてペプチド結合し、高分子のタンパク質を合成する。酵素自体もタンパク質なので同様に生成される。従って、アイソザイムは遺伝子と密接に結びついているということができ、遺伝育種学的研究においては非常に有効な形質である。

さらに、酒井⁷⁾は、アイソザイムの育種学的特性として、①アイソザイム・パターンは自然淘汰や生物の適応値と関係がないと考えられること、②個体の発生段階や器官などの条件が一定ならば、遺伝子型に特有のパターンは同じであること、③多くの生物集団でアイソザイムに多型現象がみられること、以上の3点を挙げている。

これらのアイソザイムの特性から、アイソザイムを利用した遺伝育種学的研究は数多く、その研究対象も動物から植物までと幅広い^{5,10,27,38,39,58,67,68,96)}。

林木でのアイソザイムの研究は、1970年代初頭から行なわれ始め、その分野も、品種や類種の識別などの分類学的研究^{25,50,82)}や自殖に関する研究^{1,54,55,56,74,88)}、また天然林を対象として、林分内の遺伝的構造の研究^{15,90)}や集団の分化を含んだ地域変異に関する研究^{6,7,23,43,48,53,66,78,79,98)}など多岐に渡っている。さらにアイソザイムの遺伝様式についての基礎的研究もなされている^{12,21,22,35,63,75,87,93,94)}。

2) ザイモグラフィー

ザイモグラフィー (zymography) とは、エンザイム (酵素 enzyme) とクロマトグラフィー (chromatography) の2つの言葉を組み合わせた造語で、ゲルを担体とするゾーン電気泳動法を基礎とする実験手法と定義できる⁴²⁾。

電気泳動法 (electrophoresis) は、1937年に TISELIUS の考案した方法により飛躍的な進歩を遂げ、さらに改良に改良を重ねられて今日に至っている。すなわち、TISELIUS の方法後濃紙電気泳動法が考案され、以後、デンブンゲル電気泳動法、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ディスク電気泳動法と発展して来た^{3,31)}。電気泳動法は自由電気泳動法とゾーン電気泳動法に大別される。TISELIUS の方法は、U字管の中の溶液に通電し成分を分離しようというもので、前者に属する。ゾーン電気泳動法は、セルローズ、セルローズ・アセテート、デンブン、シリカ

ゲル、粉ガラス、寒天、ポリアクリルアミドなどを担体とする方法で、これらの担体上に各成分が帯状に分離することからこの名称がつけられている。自由電気泳動法では、各成分が重なり合うため完全な分離はできなかつたが、この欠点を改良したのが、ゾーン電気泳動法である³¹⁾。

また、電気泳動法は構造的な違いから次のようにも分けられる。一次元の水平式、垂直式、薄層式と、二次元のそれらである。

本研究においては、SMITHIES³⁶⁾と遠藤^{18,19)}に準じて一次元の水平式デンブengel電気泳動法を用いた。各方法ともそれぞれ一長一短があるが、操作の簡便さ、分離能の良さ、担体の無害性と経済性、さらに林木育種に電気泳動法が導入された当初⁵⁰⁾から用いられ、現在まで多くの研究者によって利用されて来た経過から、前述の方法を採用した。以下、実験装置、担体であるデンブengelの調製、緩衝液の調製、ゲル調製から泳動、染色に至る一連の実験操作について順を追って述べる。

電気泳動装置の一式を次に示す。

① 定電圧直流発生装置	1台
② 白金電極付泳動槽(泳動用ゲル容器6本用)	2台
③ 泳動用ゲル容器(カバー付)	12個
④ カッティングボード(カバー付)	1個
⑤ 垂直切断用ゲルカッター	1枚
⑥ 水平切断用ゲルカッター	1枚
⑦ 染色用バット	2個
⑧ ゲルホルダー	1個
⑨ 重し	24個
⑩ ビニールテープ	1巻
⑪ サランラップとアルミホイル	各1巻

泳動用デンブengelは市販されているが、実験で多量に使用する際は不経済なので、普通のバレイショデンブengelを加水分解して用いた。その工程を略述すると、①ビーカーにデンブengel 1.5kgとアセトン1ℓを入れ、サランラップとアルミホイルでカバーし、恒温水槽(52±1°C)で約4時間加熱。②湯浴のまま、濃塩酸10mlを加えずによく攪拌し、80分~90分(室温により異なる)の間放置する。③加水分解終了後上澄液を捨てる。蒸留水を加え攪拌し、プフナロートで吸引濾過する。引き続き、蒸留水を加えながら塩酸イオンを除く。④デンブengelを別のビーカーに移し、蒸留水で混濁状態にして約1時間放置。⑤上澄液を捨て、再び吸引濾過する。⑥これを濾紙上に拡げ2日間室温で乾燥し、40メッシュのふるいに通す。こうしてできた泳動用デンブengelは密閉容器に入れ、冷蔵庫内で保存する。

デンブengel電気泳動法の緩衝液には、ゲル用緩衝液と電極用緩衝液の2者があり、両方とも同じ試薬が用いられる場合と、異なる場合とがある。同じ場合を連続系、違う場合を不連

続系というが、本研究では連続系の緩衝液を用いた。対象となる酵素によって緩衝液の種類は異なる。本章第2節では、ペルオキシダーゼ、エステラーゼ、酸性フォスファターゼ、アルカリ性フォスファターゼの4酵素を検討するが、ここでは主として用いた緩衝液について述べる。なお泳動用緩衝液の他に酵素染色時にも緩衝液が使われるが、これも酵素により種類もしくは使用量が違う。この染色用緩衝液に関しては、本章第2節にて染色用の試薬とともに述べる。

本研究で専ら使われ、また複数の種類の酵素にも使用した緩衝液はゲル用、電極用ともホウ酸緩衝液である。ゲル用緩衝液は保存のため10倍溶液として調製し、ホウ酸18.0g、水酸化ナトリウム2.1gに蒸留水を1ℓ加えた。電極用緩衝液は、ホウ酸18.5g、水酸化ナトリウム3.4gに蒸留水1ℓを加えた。いずれもpH 8.5となる。

デンブングルの調製について述べる。加水分解したデンブun 65gとゲル用緩衝液500mlを一緒に丸底フラスコに入れ、激しく振とうしてよく攪拌する。ゲル用緩衝液は予め10倍の濃度で調製してあるので希釈して用いる。次にフラスコを沸騰したウォーターバスに漬け、回転攪拌する。デンブunと緩衝液の混濁液が半透明となり粘性が高くなったら、さらに10回程振る。フラスコを取り出し、水流サッカーで減圧し気泡を抜く。大きな気泡がフラスコの底の方から生ずるようになったら、減圧を停止する。このような手順を経て調製したゲルをゲル容器12本に流し込み、カバーをそっとかぶせる。この時カバーとゲル表面との間に気泡が生じないように注意する。次いで重しを容器の両端に乗せ、一晩放置しておく。なお、ゲル容器の脚部はビニールテープで底を封じておく。また、ゲル容器とカバーには流動パラフィンを塗布する。

試料の調製と挿入は次のように行なう。試料は、個別に乳鉢でよくすりつぶす。試料が冷凍保存中に若干乾燥してしまった場合は極少量の蒸留水を補給してからすりつぶす。この搾汁を濾紙片に浸透させ、濾紙片に付着した余剰の搾汁はスパテルで除去する。

ゲルは、端から120mm、180mmの所でそれぞれ垂直に切断する。この2つの切断箇所の内、端からの距離の短い方に前述の濾紙片(5×9mm)2枚を互いに重ならないように注意してはさみ込む。この濾紙片を設置した箇所を原点と呼ぶ。もう一つの切断箇所のちょうど真中には、泳動打切りの目安とするブromフェノールブルー(B.P.B.)色素で染めた濾紙片(5×2mm)をはさむ。

なお、濾紙片の大きさを変えることによって、1個のゲル容器(内径6×20×200mm)で1個から複数個の試料を電気泳動させることができる。しかし、試料が多過ぎると、濾紙片の大きさも小さくなって扱いにくく、バンドの判読も難しくなるので、試料はゲル容器1個あたり2個とした。

このようにして試料の挿入を終えたゲル容器は、脚部のビニールテープをはずし、色素のある方が陰極側となるように泳動槽にセットする。この際、切断箇所にすき間が無いことを確認するとともに、ゲル容器の脚部の底に気泡が付着しないように留意する。

電気泳動は保冷庫内で行ない、初めの10分間は定電圧100Vで、次いで定電圧400Vで

約2時間通電する。ブロムフェノールブルー色素が打ち切り点(原点から陽極側100mmの位置)に達したゲル容器は泳動槽から取り出し、各ゲルの移動度が均一になるように図った。泳動中は、ゲル容器をサララップでカバーし、ジュール熱による乾燥を防いだ。

泳動の終了したゲルは、更に打ち切り点で垂直に切断し、途中で切れないように注意しながら容器からカッティングボードに移す。今度はゲルを水平方向に切断し、その切断面を上にして染色用パットに並べる。通常は二分したゲルの下部のみを使用する。

染色は、検出したい酵素の基質特異性に合わせた染色液にゲルを浸漬して行なう。染色中はパットをアルミホイルでおおい、室温にて放置する。アイソザイムがバンド状に呈色して反応が停止したら、蒸留水で4~5回洗う。

水洗したゲルはアクリル板上に順序よく並べて写真を撮り、その後個々のアイソザイム・バンドの原点からの移動距離と濃度を測定し、方眼紙にスケッチする。濃度は8区分で評定した。バンドがあるのではないかと推定できる程度の濃さを0.1, バンドの存在が確認できる最低の濃さを0.5とし、さらに濃度測定器で測定した場合の曲線の高さを想定して0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0と肉眼観察でバンドを分別した。

電気泳動実験は同一試料について2回反復を原則としたが、次の基準で修整した。

- ① アイソザイム・バンド本数の多い方を採用。
- ② 活性の高い方を採用。
- ③ アイソザイム・バンド幅の広い方を採用。

第2節 使用する酵素

MARKERT & MØLLER⁴¹⁾が、乳酸脱水素酵素(LDH)、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)、イソクエン酸脱水素酵素(IDH)の3種類の脱水素酵素にアイソザイムを見い出して以来、多種多様な酵素について調べられている。植物だけでも、酸化還元酵素、転移酵素、加水分解酵素、リパーゼ、イソメラーゼの5グループ、50種近い酵素についてアイソザイムが分析されている²⁰⁾。

一方、これまで林木でアイソザイムの研究がなされてきた樹種は針葉樹類に偏っており、ミズナラに関する研究は皆無に等しかった。ある動植物を初めて研究する場合、どの酵素にアイソザイムが認められるか、どんな試料をいつ採取すればよいか問題となる。

本節では、ペルオキシダーゼ、エステラーゼ、酸性フォスファターゼ、アルカリ性フォスファターゼの4種類の酵素について、多型現象がみられるかどうかを検討した。

ペルオキシダーゼは過酸化水素(または酢酸)が存在するとアミノ類、フェノール類、ロイコ色素などを酸化触媒し、一般に植物界に広く存在する。エステラーゼはエステル加水分解反応で触媒として作用し、動植物組織に存在する。フォスファターゼはフォスモノエステラーゼとも呼ばれ、広義にはエステラーゼの一種でリン酸のモノエステルの加水分解を触媒する。フォスファターゼは最適なpH値によって酸性フォスファターゼとアルカリ性フォスファターゼに分けられ、動植物にみられる。

1) 試料と方法

試料として利用が可能であると考えられる器官および組織は、花粉、堅果、茎、根、葉、樹皮などであるが、以下の条件を考慮すると葉が試料として適している。

地理的変異などの研究では、各地域のものを、しかもできるだけ多くの個体を調べる必要があるが、そのためには随時比較的容易に試料が採取できなければならない。また、遺伝子分析や家系分析などアイソザイムの他の研究分野を考えるならば、樹齢に係らずどんな個体からも採れることが望ましい。さらに、できるだけ個体を傷つけないことが好ましい。

これらの条件から、採取時期が短く性的成熟を必要とする生殖器官や堅果よりも葉を選んだ。葉は、アイソザイムの試料であると同時に形態変異を調べる材料としても使えるという利点を持っている。

1976年7月中旬、農林水産省林業試験場北海道支場(札幌市羊ヶ丘)の構内の天然林にあるミズナラ9個体(平均樹高15m前後)を任意に選び、葉を採取した。本章第3節で述べる採取部位によるアイソザイム・パターンの検討も行なうため、試料の葉は各個体とも樹冠の下部(高さ3m付近)の枝と、上部(高さ8m付近)の陽当りのいい所の枝からランダムに採った。ただし、秋伸びの枝は除いた。試料は採取後ポリエチレン袋に入れて、できるだけ速やかに -20°C で冷凍保存した。

実験方法はデンブングル電気泳動法を用いたが、その詳細は本章第1節で述べたとおりである。実験は試料採取の約1カ月後に行なった。実験で使用したゲル用緩衝液と電極用緩衝液は酵素により異なった。

① ペルオキシダーゼ、酸性フォスファターゼおよびアルカリ性フォスファターゼの場合。

この場合の緩衝液は本研究でよく使われたものである。ゲル用緩衝液は、ホウ酸 1.80 g/l 、水酸化ナトリウム 0.21 g/l を含み、pH 8.5である。電極用緩衝液はホウ酸 18.5 g/l 、水酸化ナトリウム 3.4 g/l を含み、pHは8.5である。

② ペルオキシダーゼ、エステラーゼの場合。

ペルオキシダーゼに関しては緩衝液を変えて試みた。ゲル用緩衝液は、第1リン酸カリウム 0.136 g/l 、第2リン酸カリウム 0.174 g/l を含み、pHは7.0~7.1である。電極用緩衝液は、第1リン酸カリウム 1.361 g/l 、第2リン酸カリウム 1.742 g/l を含み、pHは7.0~7.1である。

緩衝液と同様に、染色液も酵素によってそれぞれ異なる。各試薬のゲル6本あたりの分量を以下に示す。

① ペルオキシダーゼの場合。

この酵素の受容体としては、酢酸ベンジジン、オルト・ジアニンジン、アミノエチルカルバゾールの3種類がある。

a. 酢酸ベンジジンによる染色。

酢酸ベンジジン 300 mg を蒸留水で10倍に希釈したトリス・アセテート緩衝液 150 ml で

溶かし、この混合物をスターラーでよく攪拌する。使用直前に30%過酸化水素水を1.5 ml 加えて、ガーゼで濾過しながらゲルを入れたバットに注ぐ。アイソザイム・バンドが青色に呈色し反応が停止した後、蒸留水で洗う。

トリス・アセテート緩衝液は、トリス6.05 g、水酢酸30 ml に蒸留水を加えて500 ml になるように調製する。pH は4.0である。

b. オルト・ジアニシジンによる染色。

オルト・ジアニシジン75 mg と β -ナフトール45 mg をアセトン30 ml で完全に溶解させる。酢酸ベンジジンで用いたトリス・アセテート緩衝液15 ml と蒸留水をこれに加え、150 ml の溶液とする。30%過酸化水素水1.5 ml を使用直前に添加し、6本のゲルを浸漬する。約1時間程して呈色したら水洗する。

c. アミノエチルカルバゾールによる染色。

アミノエチルカルバゾール42 mg、 β -ナフトール28 mg をアセトン20 ml で溶かし、前述のトリス・アセテート緩衝液10 ml にこれを加える。さらに蒸留水を加え全体を99 ml とする。この溶液に使用直前に30%過酸化水素水を1 ml 加える。約30分程染色液にゲルを浸漬したまま放置してから、蒸留水で数回洗う。

② エステラーゼの場合。

蒸留水100 ml にファースト・ブルー・RR 塩150 mg を加え完全に溶解する。次にリン酸緩衝液15 ml、アセトン基質1.5 ml、さらに全体で150 ml となるように蒸留水を加える。

リン酸緩衝液はpH 7.0で、第1リン酸カリウム68.05 g、第2リン酸カリウム87.09 g を蒸留水1 l に溶かし調製する。

アセトン基質、すなわち1, 2-ナフチルアセテートは、1 (α)-ナフチルアセテート1.241 g、2 (β)-ナフチルアセテート0.621 g をアセトン80 ml で溶解し、蒸留水を加えて100 ml の溶液とする。

上記の染色液で一晩呈色反応させた後、水洗する。

③ 酸性フォスファターゼの場合。

蒸留水100 ml でファースト・ガーネット・GBC 塩150 mg を15分以内に完全溶解させ、 α -ナフチル・リン酸ナトリウム1.5 ml、酢酸ナトリウム緩衝液15 ml、蒸留水を加え、全体として150 ml となるように調製する。

α -ナフチル・リン酸ナトリウムの調製は次のとおりである。すなわち、 α -ナフチル・リン酸-2-ナトリウム塩1.881 g を蒸留水30 ml に溶かし、さらにエチルアルコール10 ml を加える。これに蒸留水を加えて最終的に50 ml とする。

酢酸ナトリウム緩衝液は無水酢酸ソーダ20.5 g と水酢酸8 ml に蒸留水を加えて500 ml とする。pH は5.0である。

染色液にゲルを一晩浸漬してから、水洗する。

④ アルカリ性フォスファターゼの場合。

トリス塩酸緩衝液 15 ml, 3% ポリビニールピロイドン水溶液 15 ml, 10% 塩化マグネシウム水溶液 0.1 ml, β -ナフチル・リン酸ナトリウム溶液 1.5 ml, ファースト・ガーネット・GBC 塩 150 mg, これに蒸留水を加え全体として 150 ml とする。

トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) は, トリス 30.3 g, 濃塩酸 15.0 ml を含む 500 ml の水溶液として調製する。

β -ナフチル・リン酸ナトリウム溶液は, β -ナフチル・リン酸ナトリウム 3.76 g をアセトン 70 ml で溶解し, さらに蒸留水を加えて 100 ml の溶液とする。

染色は一晩かけて行ない, 呈色後水洗する。

なお, ① の b, c および ② の場合は, それぞれ次のように試薬の量を変えて検討した。

① の b で, オルト・ジアニンジンと β -ナフトールの両者の 1 倍量, 5 倍量, 10 倍量を比較した。① の c では, アミノエチルカルバゾールと β -ナフトールの両者のそれぞれ 1 倍量, 5 倍量, 10 倍量を比較した。これらはペルオキシダーゼについて適当な染色剤を割り出すための試験であるが, ② エステラーゼでも, ファースト・ブルー・RR 塩の 1 倍量, 5 倍量, 10 倍量を比較検討した。

2) 結果と考察

ペルオキシダーゼ, エステラーゼ, 酸性フォスファターゼ, アルカリ性フォスファターゼの 4 つの酵素のうち研究目的にかなうものは何か, また染色用試薬の適量はどのくらいかを検討した結果, 次のようになった。

4 種類の酵素中, アイソザイム・バンドが観察されたのは, ペルオキシダーゼ, 酸性フォスファターゼの 2 つであった。アイソザイム・バンドが出現しても, そのパターンが全個体とも一致しているならば, それは意味を持たない。すなわち, 遺伝的変異の究明のためには, アイソザイム・パターンが個体によって異なるような多型現象を示さなければならない。酸性フォスファターゼでは, バンドは観察されるが多型的変異が認められなかった。このため, 酵素としては, バンドが多型的で変異があるペルオキシダーゼが利用上有利であることがわかった。

遠藤³⁰⁾がトウモロコシ (*Zea mays* L.) のアイソザイムの遺伝子分析の研究例を酵素別にリストアップしているが, 12 種にもおよぶ酵素の中でペルオキシダーゼとエステラーゼが非常に多くのアイソザイム・バンドを出現させていた。また, ヨーロッパブナ (*Fagus sylvatica* L.) ではロイシン・アミノペプチダーゼと酸性フォスファターゼの遺伝様式が調べられているが³⁵⁾, ミズナラと同属のアルバナラ (*Quercus alba* L.) では, ペルオキシダーゼを用いて研究がなされている⁴⁵⁾。

ペルオキシダーゼの場合, 染色剤として酢酸ベンジジン, オルト・ジアニンジン, アミノエチルカルバゾールの 3 種類が試されたが, いずれもバンドを染色した。しかし, オルト・ジアニンジンとアミノエチルカルバゾールを使って酢酸ベンジジンと同じくらいに鮮明にバンドを

呈色させるには、一般に使われる量ではバンドの濃度が薄く、逆に試薬の分量が多いと過剰の染色剤がゲルに付着してみづらくなった。そこで、オルト・ジアニシジンとアミノエチルカルバゾールの試薬の使用量は、草本植物で普通使われる量の5倍量前後が適量と考えられた。

なお、酢酸ベンジジンとオルト・ジアニシジンではゲル用緩衝液および電極用緩衝液にホウ酸系とリン酸系とを用いたが、両染色剤ともホウ酸系の方が好成績を得た。

第3節 試料の採取部位と時期

同じ酵素のアイソザイムでも、種によってそのパターンが異なる。また同一種でも、組織や器官が異なれば質的差異がみられることが知られている。これをアイソザイムの器官特異性という。

ヒバ (*Thujaopsis dolabrata* SIEB. et ZUCC.)¹⁶⁾ では、芽、葉、雌花のグループと形成層、雄花のグループを比べるとそのアイソザイム・パターンが基本的に異なり、さらに芽と葉の酵素活性に違いがあることが明らかにされている。カンバ属 (*Betula*)⁸⁵⁾ では、葉よりも雄花穂のペルオキシダーゼ・アイソザイムの方が多型的であり、器官特異性を示した。

一方、同じ器官でも、器官が発達するにつれてアイソザイム・パターンが変化することが多い。

BARNETT & NAYLOR⁴⁾ はマツ属 (*Pinus*) の種子の組織で、アルコール脱水素酵素の活性が発芽後変化することを報告している。これはアイソザイムについて直接触れたものではないが、アイソザイム・パターンの発生・発育に伴う変化を示唆する。

CONKLE¹³⁾ はアテヌアタマツ (*Pinus attenuata* LEMMON) で、5酵素のアイソザイム・パターンの発芽中の変化について調べた。その結果、ペルオキシダーゼとエステラーゼでは、生長が進むにつれてアイソザイム・バンドの数と活性が増加することがわかった。

また加齢的变化として、トドマツ (*Abies sachalinensis* MASTERS) の当年生葉と1年生以上の葉を比べた場合、採取時期によるアイソザイム・パターンの変動が当年生葉のみに認められたという報告⁴⁴⁾ がある。

ミズナラでは、本章第2節で述べたような理由から試料として葉を用いたが、前述のように採取する時期によってアイソザイム・パターンが異なるかもしれない、採取する部位によっても違うかもしれない。本節ではペルオキシダーゼに関してこの点を検討した。

1) 試料と方法

目的に応じて2とおりの試料を採取した。採取部位を検討するための試料は、前節と同じものを用いた。すなわち、天然林内の9個体の樹冠上部(高さ8m付近)と樹冠下部(高さ3m付近)の枝から葉を採取した。光条件による違いも考慮して、上部の枝は日あたりのよい位置にあるものを選んだ。

採取時期の検討のための試料として別に北海道大学農学部附属植物園内のミズナラ2個体(No. 1, No. 2)の樹冠下部の枝から葉を採取した。No. 1の個体の樹高は10m, 枝下高2m, 胸

高直径 29 cm で、No. 2 の個体は樹高 10 m、枝下高 1 m、胸高直径 14 cm であった。1976 年 6 月中旬から 10 月上旬にかけて、毎月上・中・下旬の 3 回ずつ計 12 回試料を採取した。試料は採取後速やかに -20°C で冷凍保存した。

コナラ属では秋伸びがみられることが知られており、試料を得た個体においても認められた。しかし、秋伸び現象は環境条件や樹勢によって左右され、必ずしも全ての個体に現われるわけではない⁹⁾。そこで秋伸びの葉は、いずれの場合も試料として用いなかった。

実験方法は、本章第 1 節で詳述した電気泳動法である。ただし、採取部位の検討では、染色剤として草本植物の常用量の酢酸ベンジジンとオルト・ジアニジンをを用い、緩衝液はホウ

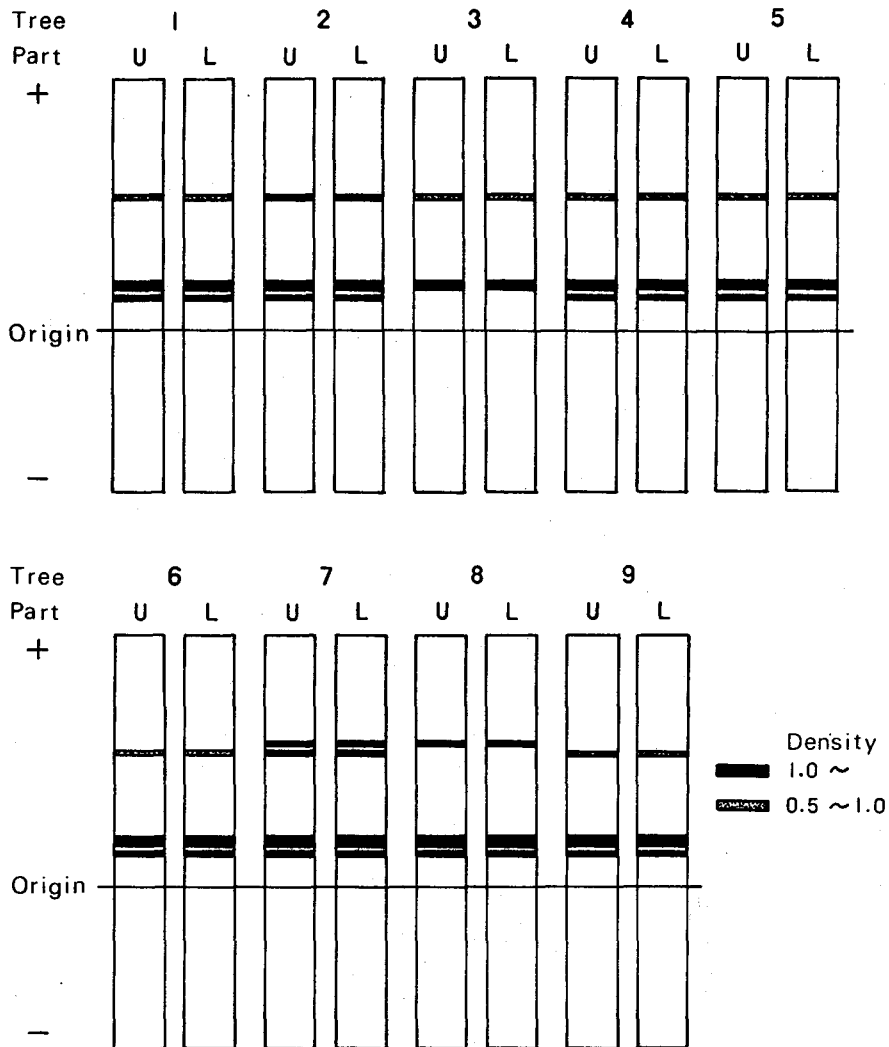


Fig. 1. Schematic illustration of isozyme patterns of peroxidase in leaves which were collected from the upper part (U) and the lower part (L) of each crown. (Peroxidase was stained with Benzidin Acetate).

酸緩衝液を用いた。採取時期の検討では、アミノエチルカルバゾール(草本植物で通常使用される量の5倍量)を染色剤として使用し、ホウ酸緩衝液を用いた。

2) 結果と考察

試料の採取部位別のペルオキシダーゼ・アイソザイムのパターンを Fig. 1 と Fig. 2 に示す。

酢酸ベンジジンで染色した場合 (Fig. 1), アイソザイム・バンドは2本~4本出現した。オルト・ジアニジンで染色した場合 (Fig. 2) は最高2本出現したが, 9個体中7個体では1本のバンドしか出現しなかった。染色剤によって出現バンド本数が異なっているが, オルト・ジアニ

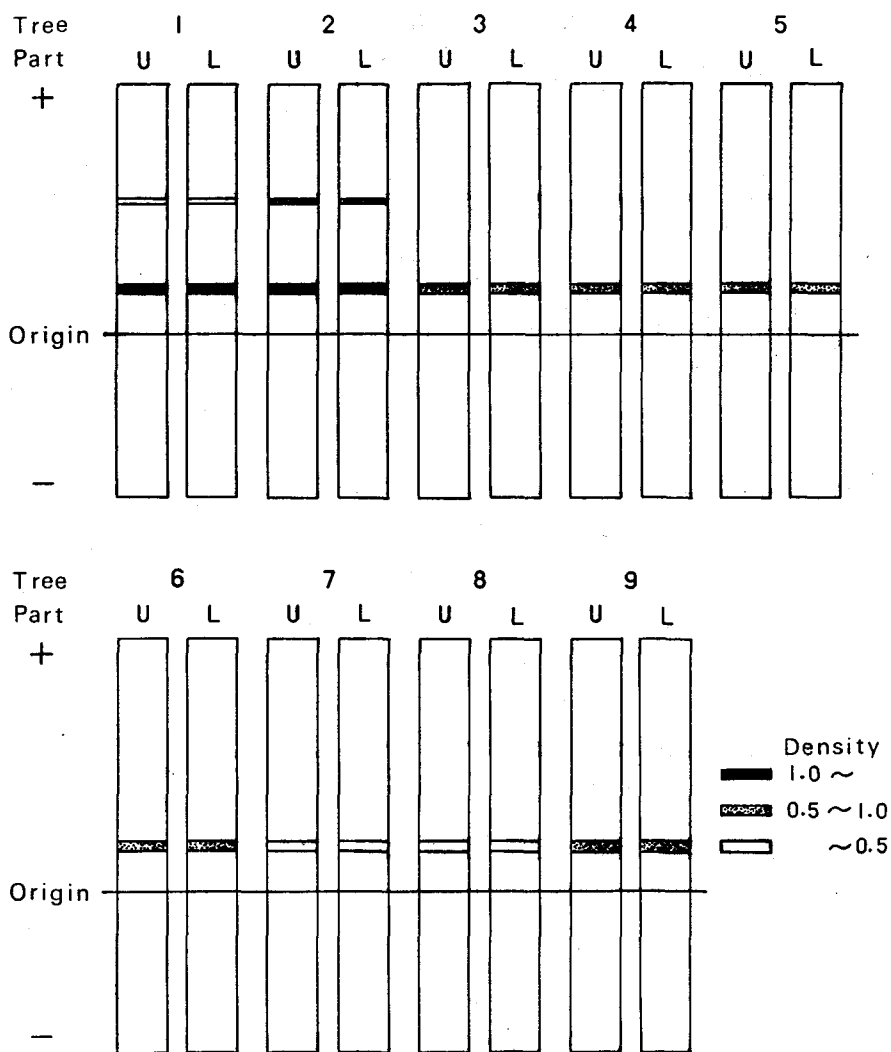


Fig. 2. Schematic illustration of isozyme patterns of peroxidase in leaves which were collected from the upper part (U) and the lower part (L) of each crown. (Peroxidase was stained with O-Dianisidine).

シジンを染色した場合バンドの濃度が一般的に低いので、この試薬の使用量が適切でなかったことがその原因として考えられる(本章第2節参照)。

いずれにしても、個体によってアイソザイム・パターンは違うが、同一個体内の樹冠上部と下部を比べると、どちらの染色剤でも、アイソザイム・パターンに差は認められなかった。スギ(*Cryptomeria japonica* D. DON)でも針葉のペルオキシダーゼのアイソザイム・パターンに樹冠内上下の差はみられず⁵⁰⁾、トドマツでも針葉の年生が同じならば採取部位による違いはなかった⁴⁴⁾。そこでミズナラの場合も、これらの針葉樹と同様に、試料の採取部位について特別な考慮を払わないでよいと思われる。

次に試料の採取時期を検討する。Fig. 3 に時期別のアイソザイム・パターンを模式的に示

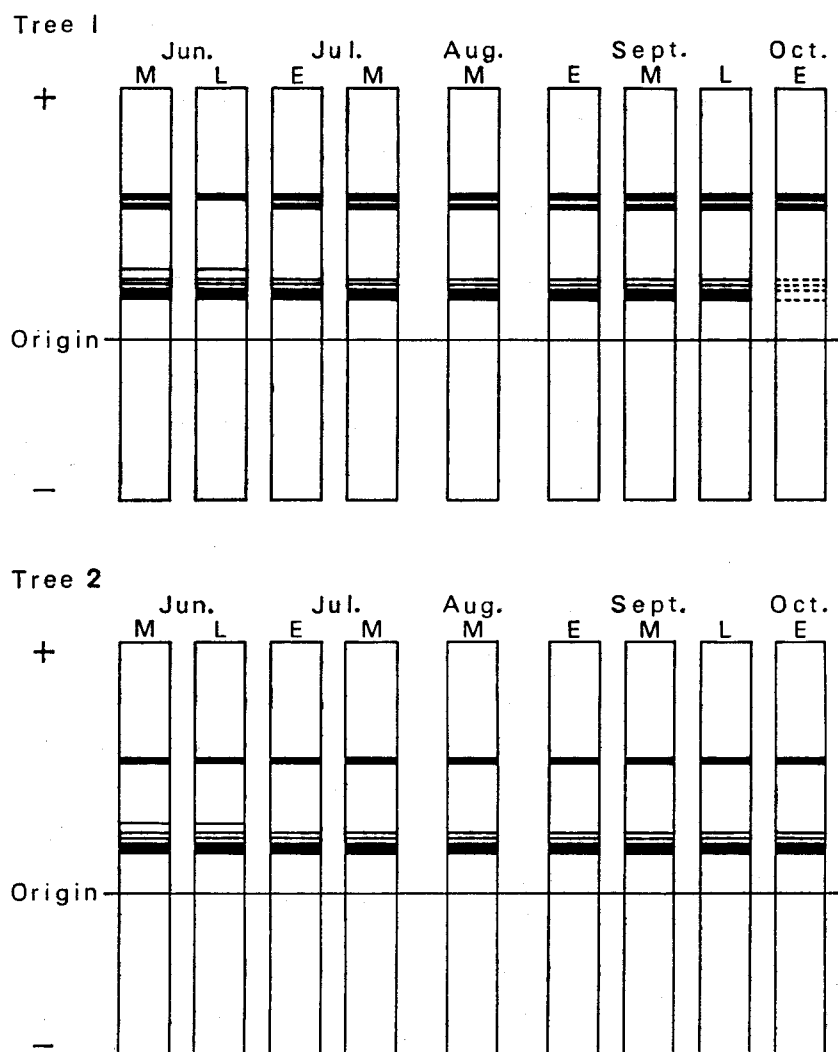


Fig. 3. Schematic illustration of isozyme patterns of peroxidase at different sampling times. E: Early, M: Middle, L: Late.

す。6月中旬から10月上旬までのアイソザイム・パターンをみると、個体 No. 1, No. 2 ともに7月上旬以降はほとんど同じで安定している。個体 No. 1 において10月上旬で原点に近いバンドが欠けているのは、試料が冷凍保存中に乾燥したことが原因ではないかと思われる。

PERRY⁶⁵⁾ はルブルムカエデ (*Acer rubrum* L.) の芽のアイソザイムを調べた結果、11月から3月にかけてバンド本数と濃度が増加すると述べ、さらに展葉した葉では芽で認められた本数の数倍のバンドを観察している。MAYBERRY & FERET⁴⁶⁾ は、アルパナラの稚苗の葉のペルオキシダーゼ・アイソザイムについて、発芽後5週間にバンドの種類や濃度が変化することを報告している。これらの報告と本実験での試料の採取時期は必ずしも一致していないが、時期によってアイソザイム・パターンが変動することは共通している。また、器官の発達の初期にその変化が著しいと言えよう。

北海道では、ミズナラは5月中旬に開芽し5月の終わりに全ての葉が展開を終える³⁴⁾。実験結果からみて、ミズナラの場合展葉後約1カ月以上経った葉(7月上旬以降の葉)ならいつでも試料として採取してよいと考えられる。ただし黄葉すると酵素に変化が起これると考えられるので、採取は9月末を期限とし、それ以降は避けた方が無難であろう。

第3章 ペルオキシダーゼ・アイソザイムにみられる地域変異

第1節 試料と方法

1976年から1980年にかけて、Fig. 4 に示すように、木古内、函館、森、倶知安、定山溪、札幌、山部(2林分)、厚賀、静内、浦河、中標律(3林分)、網走、雨竜、中川、問寒別(2林分)、稚咲内、浜頓別)の計17地区21林分から試料として葉を採取した。なお、採取地の緯度と経度をTable 1 に表示する。

第2章第3節で検討した採取部位および時期の適否の結果に基づき、7月上旬以降9月下旬までの期間に、個体別に任意の部位の枝から葉を数枚採った。アイソザイム・パターンが変化しうることを考えて、秋伸びの葉または罹病していると思われる葉や虫食いの葉は避けた。試料は、個体毎にポリエチレン製の袋に密封し、 -20°C で冷凍保存した。標本個体は各林分ともおよそ0.25 ha か、それよりやや広い範囲から無作為に選び、個体数は24個体であった。各林分の概況を以下に述べる。なお、樹高、胸高直径は概数である。

木古内(函館営林支局木古内営林署碓盤坂担当区1129林班を小班)の林分は、知内川流域の屋根近い南斜面に位置する。標高は220 m ほどである。この林分は、樹高が15~18 m、平均約16 m、胸高直径が15~25 cm、平均約20 cm のミズナラの純林で、若干のカエデ類(*Acer* spp.) やブナ(*Fagus crenata* BLUME) を混ざる。胸高直径が比較的小さいこと、また付近に炭焼窯跡があることから、薪炭林、部落自家燃料用林として利用されてきたようである。

函館の林分は、函館市蛾眉野の民有林で、樹高4~11 m、胸高直径2~18 cm のミズナラを主とし、他にハリギリ(*Kalopanax pictus* NAKAI)、イヌエンジュ(*Maackia amurensis* RUPR.

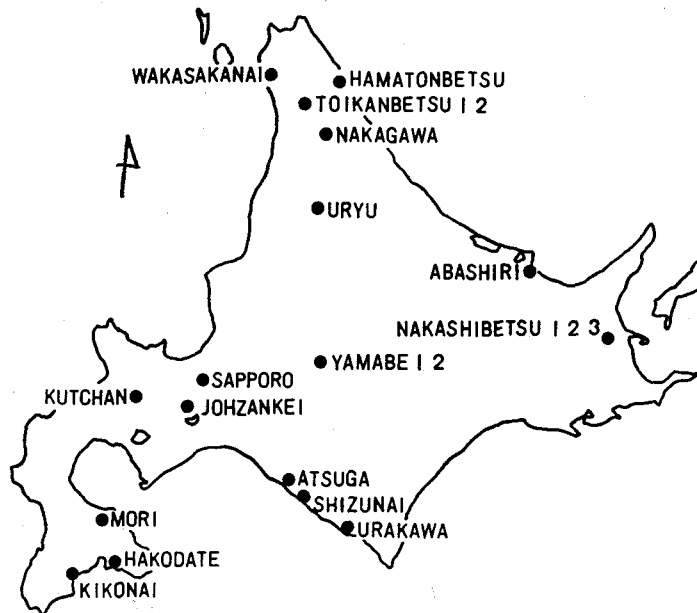


Fig. 4. Location of 21 stands from which leaves of *Quercus mongolica* FISCH. var. *grosseserrata* REHD. et WILS. used in this study were collected.

Table 1. Latitude and longitude of 21 stands

Stand	Lat. (N)	long. (E)
Kikonai	41°33'	140°15'
Hakodate	41 48	140 58
Mori	42 03	140 39
Kutchan	42 51	140 46
Johzankei	42 51	141 08
Sapporo	42 59	141 24
Yamabe 1	43 18	142 28
" 2	43 13	142 25
Atsuga	42 24	142 18
Shizunai	42 25	142 32
Urakawa	42 12	142 48
Nakashibetsu 1	43 36	144 46
" 2	43 36	144 46
" 3	43 35	144 45
Abashiri	43 42	144 18
Uryu	44 19	142 18
Nakagawa	44 46	142 14
Toikanbetsu 1	45 04	142 07
" 2	45 01	142 02
Wakasakanai	45 05	141 39
Hamatonbetsu	45 13	142 05

et MAXIM. var. *buergeri* C. K. SCHN.), キタコブシ (*Magnolia kobus* DC. var. *borealis* SARG.) などを混ざる。およそ20年ほど前まで薪炭用として利用され、ミズナラは萌芽して株状にまわっていた。遺伝的に同一なものが重複することを避けるため、1つの株状の個体群からは1個体のみを選び試料を採取した。

森の林分は函館営林支局森営林署赤井川担当区部内の1194林班と1195林班にまたがる、駒ヶ岳山腹に沿った帯状の林分である。少なくとも昭和5年の駒ヶ岳噴火では壊滅の状況に陥ったと考えられ、樹高は3~8m、平均7m、胸高直径2~20cm、平均10cmほどの若い林相のミズナラ林である。ここでも萌芽を思わせるような株立の個体群がみられたが、1つの株からは1個体を選んだ。この林分には数本のコナラが混在していた。

倶知安の林分は、倶知安林務署倶知安経営区2林班、羊蹄山山麓の半月湖付近の広葉樹林である。ダケカンバ (*Betula ermanii* CHAM.), ミズナラを主とし、ナナカマド (*Sorbus commixta* HEDL.), ハリギリ、イタヤカエデ (*Acer mono* MAXIM.) などから成る。ミズナラは、樹高4~17m、胸高直径4~30cmであった。

定山溪(北海道営林局定山溪営林署奥定山溪担当区115, 116林班)の林分は、定山湖上流の標高約700mの所に位置し、ミズナラ、ダケカンバ、エゾマツ (*Picea jezoensis* CARR.) などから成る針広混交林である。ミズナラは比較的本数が多く、樹高5~26m、平均20m、胸高直径は10~80cm、平均45cmと大径木が多かった。

札幌の林分は、札幌市羊ヶ丘の農林水産省林業試験場北海道支場構内の実験林で、山火跡の二次林ではないかと思われる。ミズナラにシラカンバ (*Betula platyphylla* SUKATCHEV var. *japonica* HARA) と他の広葉樹が混交し、ミズナラの樹高は5~22m、平均樹高13m、胸高直径8~30cm、平均直径18cmであった。

山部では2林分から試料を得た。いずれも東京大学北海道演習林内にある。山部1は布部と麓郷の中間地点、布部川の北側河岸に位置する林分で、標高260mほどの急斜地にある。この林分(30林班e小班)はトドマツ、ミズナラ、シナノキ (*Tilia japonica* SIMONKAI), ウダイカンバ (*Betula maximowicziana* REGEL) などの混じる針広混交林で、ミズナラの大きさは樹高で10~20m、平均14m前後、径級では6~50cm、平均16cmであった。一般施業地となっており、過去に1ないし2回択伐している。

山部2は、東山に近い西達布川北岸の丘陵地にある林分(74林班a小班)で、山部1の南南西約11kmの地点にある。この2つの林分の間には標高500m程度の山がいくつかある。なお山部2の標高は260mほどであった。ミズナラの平均樹高は15mぐらい、平均胸高直径は20cmぐらいであった。

厚賀(北海道営林局厚賀営林署厚賀担当区174林班)の林分はミズナラを40%ほど混じ、他にイタヤカエデ、シナノキなどから成る広葉樹林である。ミズナラは樹齢約70年、平均樹高13m、平均胸高直径16cmである。かつて薪炭林として利用されたそうであるが、株状になっ

ている立木はなかった。採取林分の標高は100 m, 南向きのなだらかな斜面に位置する。

静内は静内川上流静内ダム近くの農屋にある静内農業高等学校林で、町有林との境界沿いのコナラ属を主とする広葉樹林(標高170 m)である。コナラ属中、ミズナラ、カシワ、コナラの3種とも出現したが、コナラは散在する程度で、半分近くはミズナラであった。樹高は7~13 m, 平均樹高10 m, 胸高直径は10~25 cm, 平均直径は20 cm ほどであった。

浦河は浦河町町有林183林班21小班のシイタケ原木林施業モデル事業施業試験林である。丘陵地の北西面(標高140 m)に位置し、林齢30年の天然生二次林である。ナラ類、シナノキ、ハリギリなどの広葉樹林で、ナラ類とはミズナラ、コナラである。コナラは少なく、ミズナラの平均樹高は14 m, 平均直径は15 cm ぐらいであった。

中標津は帯広営林支局中標津営林署養老牛担当区部内の3林分から試料を採取した。3林分の林班名はそれぞれ、73林班よ小班(中標津1)、72林班は小班(中標津2)、55林班む小班(中標津3)である。各林分の標高はおよそ300 m 前後で、中標津1と中標津2の林分は隣接し、中標津3は両林分から南方約4 km 離れた所に位置する。中標津1の林分の径級は10 cm ないし20 cm で、中標津2の林分はこれよりやや小さく、また中標津3の林分は中標津1とはほぼ同じぐらいの直径であった。

網走は、北見営林支局網走営林署東藻琴担当区270林班の学術参考保護林指定(1973年)の林分である。藻琴山の西北西斜面、標高420 m に位置する。平均樹高24 m, 平均直径40 cm のミズナラの純林で、精英樹に選ばれたミズナラもある。

雨竜は北海道大学雨竜地方演習林内の母子里407林班の広葉樹林である。本数で70%近いミズナラは平均樹高20 m, 平均直径40 cm ほどの大きさであった。なお、この林分は標高380 m の平坦地に位置する。

中川は北海道大学中川地方演習林幌加186林班にあり、標高350 m の北東の緩斜面に位置する。この林分は樹高3~25 m, 平均樹高19 m, 胸高直径3~60 cm, 平均33 cm のミズナラを主とし、他にダケカンバなどを混ざる広葉樹林である。

問寒別1と問寒別2は北海道大学天塩地方演習林内にある。問寒別1(河東49林班)はゆるやかな丘陵の上部にあり、標高は80 m である。樹高は17~25 m, 胸高直径20~60 cm のミズナラの純林であった。問寒別2は問寒別川をはさんで、問寒別1の林分の西南西約8 km の所にあり、採取地は河西34, 35林班にまたがる。地形はなだらかな東斜面で、標高はおよそ100 m である。1969年に択伐され全体としてやや疎な広葉樹林で、ミズナラは樹高10~24 m (平均約20 m), 胸高直径10~100 cm (平均約30 cm) であった。

稚咲内は旭川営林支局天塩営林署豊富担当区172林班で、海岸砂丘上(汀線より約1 km 内陸側)に成立したミズナラ林である。樹高6~15 m (平均12 m), 胸高直径5~60 cm である。

浜頓別(旭川営林支局浜頓別営林署猿払担当区37, 39林班)はトドマツ、エゾマツ、ミズナラの混交林である。狩別川上流の標高100 m ほどの丘陵地に位置する。ミズナラは平均樹高

18 m, 平均直径 40 cm で, 比較的大きい。この林分はほとんど伐採されておらず, 1963 年頃に択伐, 1976 年頃に虫害木整理が行なわれた。

アイソザイムの検出には, デンプンゲル電気泳動法を用い, 実験は各林分とも試料採取年度内に行なった。

デンプンゲル電気泳動法については第2章第1節に実験装置, 電気泳動用デンプンの精製, 緩衝液の調整および一連の実験操作を詳しく述べたので, ここでは使用した緩衝液と染色液を中心に述べる。

冷凍保存していた葉の切片を個体別に乳鉢内ですりつぶした。その搾汁をそれぞれ濾紙片に浸透させ, これを前もって準備してあったデンプンゲルの中にセットした。ゲルは, 電気泳動を行なう前日, ゲル用緩衝液 (ホウ酸と水酸化ナトリウムで調製) で溶かしたデンプンを加熱して作って置いた。

試料をセットしたゲルは同じくホウ酸と水酸化ナトリウムで調整した電極用緩衝液を満たした泳動槽内で通電した。試料の濾紙片とは別の位置にセットしたブロムフェノールブルー色素の移動距離を目安として, 個々のゲル毎に泳動を打切った。

次にこのゲルを後述の染色液に浸し, アルミホイルでカバーしたまま呈色終了まで室温で放置した。呈色後は水洗し, 出現したペルオキシダーゼ・アイソザイムのバンドの移動度と濃度を測定した。

染色には, 札幌の林分ではオルト・ジアニジン 375 mg, β -ナフトール 225 mg (いずれも通常使用量の5倍量) の溶液 150 ml をゲル6本分として使用し, 札幌以外の林分ではアミノエチルカルバゾール 168 mg, β -ナフトール 112 mg (いずれも通常使用量の4倍量) を含む溶液 100 ml をゲル6本分として用いた。

電気泳動は同一個体について2回行なうようにしたが, 毎回別々の葉を試料とした。このように反復して得たアイソザイム・バンドのパターンを第2章第1節で述べた基準で修整し, その個体のアイソザイム・パターンとした。濃度に関しては, 各個体とも0.5以上, すなわちバンドの存在が確認できる最低の濃度より濃いアイソザイム・バンドを採用した。

以上の方法で得たアイソザイムのデータについて1個体あたりのバンド本数とバンドの種類別の出現頻度を求め, これらの値を基に林分間ないし地域間を比較検討した。

第2節 結 果

21 林分 504 個体の試料について電気泳動を行なったが, 中川で24個体中1個体に, 雨竜と浜頓別では24個体中3個体に泳動乱れなどの実験上の不備が生じたため, これらを測定から除いた。従って, 以下で検討する標本個体数は, 中川が23個体, 雨竜・浜頓別が21個体となり, 全林分で計497個体である。

1977年に, 電気泳動済みの9林分216個体の全てを照合してアイソザイム・バンドを整理した。ミズナラのアイソザイム・バンドは試料を挿入した原点 (ゲルの陰極側の端から80 mm

の所) から陽極側に16本認められ、原点からの移動度が遅いバンドから順にアルファベットを対応させた。1980年静内の試料について電気泳動実験を行なったところ、全く新しいバンドが出現し、その位置からこのバンドをK'と名づけた。よってミズナラではK'を含むAからPまでの計17本のペルオキシダーゼ・アイソザイム・バンドが確認された。その模式図をFig. 5に示す。

これらのバンドの1個体あたりの本数をそれぞれの林分についてまとめ、Table 2に示した。全林分を通してみると、バンドを数本しか持たない個体が多いけれども、中には10本も持つ個体もある。林分別では、1個体あたりの平均バンド本数が1.08(山部2)~4.33(静内)、バンド本数の変異を示す標準偏差は0.28(山部2)~2.25(札幌)と幅があり、林分によって様々であった。また同じ地区でも、例えばバンド本数で比べると、山部1, 2がそれぞれ3.71, 1.08, 中標津1, 2, 3がそれぞれ3.00, 3.12, 1.67, そして間寒別1, 2がそれぞれ3.04, 1.71というように林分によって違っていた。しかし、定山溪, 札幌, 山部1, 静内は、平均バンド本数, 標準偏差ともに他の林分より比較的大きい値を示している。なお、平均バンド本数と標準偏差の相関係数は0.782という正の値であるが、これは平均値と標準偏差の間で一般的にみられる「統計学的相関」とでも言うべきものと考えられる。

次にTable 3に21林分におけるペルオキシダーゼ・アイソザイムのバンド別出現頻度を示す。まずバンドBがどの林分でも100%出現していることに気づく。すなわちバンドBは標本個体計497個体の全てに出現した。一方、バンドB以外のバンドは、林分によって出現頻度が異なっていた。ただ、バンドNは4%(山部2)から79%(札幌)と幅があるもののどの林分でもみられ、バンドC, M, Oもかなりの林分で出現しているのに対して、バンドA, I, J, K, K'は限られた林分にしか出現しなかった。バンドAは倶知安, 定山溪, 札幌, 山部1, 厚賀, 静内, 浦河, 中標津3, 稚咲内の9林分に出現し、頻度は4~67%であった。バンドIは札幌(8%)と浦河(4%)だけに出現した。バンドJは定山溪(8%)と札幌(8%)の2林分に、バンドKも定山溪(4%)と札幌(21%)の2林分だけに出現した。特にバンドK'は、静内のみに限定され頻度も8%と低かった。また林分では、札幌がバンドK'を除くほとんど全てのバンドを持っていることは注目すべきことである。

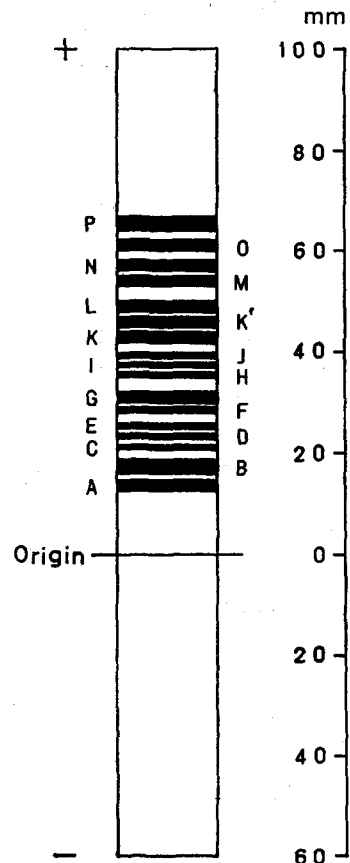


Fig. 5. Schematic illustration of isozyme bands of peroxidase observed in 21 stands of *Quercus mongolica* FISCH. var. *grosseserrata* REHD. et WILS.

Table 2. Variation in number of isozyme bands per tree in 21 stands

Stand	No. of trees	Number of isozyme bands per tree										Mean	S.D.
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Kikonai	24	15	1	7	0	1	0	0	0	0	0	1.79	1.14
Hakodate	24	11	6	5	2	0	0	0	0	0	0	1.92	1.02
Mori	24	4	8	9	2	1	0	0	0	0	0	2.50	1.02
Kutchan	24	5	6	5	4	2	0	1	1	0	0	3.04	1.85
Johzankei	24	2	2	7	7	3	2	1	0	0	0	3.71	1.49
Sapporo	24	3	4	6	5	1	2	1	0	2	0	3.79	2.25
Yamabe 1	24	1	4	8	7	2	0	0	1	0	1	3.71	1.92
" 2	24	22	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1.08	0.28
Atsuga	24	13	5	2	2	1	1	0	0	0	0	2.00	1.44
Shizunai	24	0	3	6	5	3	4	3	0	0	0	4.33	1.63
Urakawa	24	4	9	5	3	2	1	0	0	0	0	2.71	1.37
Nakashibetsu 1	24	1	10	4	7	1	1	0	0	0	0	3.00	1.22
" 2	24	4	5	1	11	3	0	0	0	0	0	3.12	1.37
" 3	24	13	6	5	0	0	0	0	0	0	0	1.67	0.82
Abashiri	24	4	4	10	6	0	0	0	0	0	0	2.75	1.03
Uryu	21	15	1	4	0	1	0	0	0	0	0	1.62	1.12
Nakagawa	23	5	12	4	2	0	0	0	0	0	0	2.13	0.87
Toikanbetsu 1	24	2	5	8	8	1	0	0	0	0	0	3.04	1.04
" 2	24	16	3	3	0	2	0	0	0	0	0	1.71	1.23
Wakasakanai	24	7	5	3	4	3	1	1	0	0	0	2.92	1.79
Hamatonbetsu	21	19	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1.14	0.48

S.D.: Standard deviation.

The correlation between mean and standard deviation was 0.782.

今、21 林分をその所在地域と前述のアイソザイムの変異とを考慮して、一応4つの林分群に分けてみる。林分群の構成は以下のとおりである。

林分群 I……渡島半島にある木古内、函館、森の3林分。

林分群 II……ほぼ道央にある倶知安、定山溪、札幌、山部1、山部2、厚賀、静内、浦河の8林分。

林分群 III……道東の中標津1、中標津2、中標津3、網走の4林分。

林分群 IV……道北の雨竜、中川、問寒別1、問寒別2、稚咲内、浜頓別の6林分。

これらの4林分群について、1個体あたりのバンド本数を林分群毎に検討してみる。前述のように1個体あたりのバンド本数の平均値と標準偏差には正の相関があったので、ここでは1個体あたりの平均バンド本数の方を取り上げた。各林分群の1個体あたりの平均バンド本数の頻度分布とその標準偏差(林分間変異)を Table 4 に示す。

林分群毎の平均バンド本数は林分群 I, II, III, IV がそれぞれ 2.070, 3.046, 2.635, 2.093 であり、また林分間変異はそれぞれ 0.378, 1.079, 0.662, 0.756 であった。すなわち、林分群 II が

Table 3. Frequency of occurrence in percent of each isozyme bands of peroxidase in 21 stands.

Stand group	Stand	Frequency of occurrence (%) per isozyme band																
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	K'	L	M	N	O	P
I	Kikonai	0	100	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	38	17	0
	Hakodate	0	100	8	13	0	0	4	0	0	0	0	0	0	21	38	8	0
	Mori	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	75	33	8
II	Kutchan	33	100	29	4	13	0	13	4	0	0	0	0	13	21	63	8	4
	Johzankei	54	100	38	8	8	0	8	0	0	8	4	0	13	50	54	25	0
	Sapporo	33	100	0	21	13	21	8	21	8	8	21	0	8	13	79	21	4
	Yamabe 1	67	100	17	63	8	8	13	0	0	0	0	0	8	4	63	21	0
	" 2	0	100	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
	Atsuga	33	100	21	4	0	8	4	0	0	0	0	0	0	8	8	13	0
	Shizunai	58	100	46	8	8	0	29	4	0	0	0	8	13	54	75	29	0
	Urakawa	17	100	21	0	0	4	4	4	4	0	0	0	13	25	63	17	0
	III	Nakashibetsu 1	0	100	17	33	13	0	0	4	0	0	0	0	71	38	25	0
"		2	0	100	13	54	21	8	0	0	0	0	0	38	63	13	8	
"		3	4	100	4	0	0	0	0	0	0	0	0	17	33	8	0	
Abashiri		0	100	17	46	4	0	8	4	0	0	0	0	46	42	8	0	
IV	Uryu	0	100	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	10	19	19	0	
	Nakagawa	0	100	4	17	0	4	0	0	0	0	0	0	13	61	13	0	
	Toikanbetsu 1	0	100	17	50	25	0	0	0	0	0	0	0	21	33	54	4	
	" 2	0	100	4	13	13	0	0	0	0	0	0	0	21	21	0	0	
	Wakasakanai	8	100	38	38	17	4	8	0	0	0	0	0	29	38	8	4	
Hamatonbetsu	0	100	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0		

Sample size was 21 for Uryu and Hamatonbetsu, 23 for Nakagawa, and 24 for the rest.

Table 4. Frequency distribution and variation among stands (σ_s) of mean number of isozyme bands per tree in four stand groups.

Stand group	No. of stands	Mean number of isozyme bands per tree										Mean	Variation among stands (σ_s)
		0.1	0.6	1.1	1.6	2.1	2.6	3.1	3.6	4.1	4.6		
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0		
I	3				2	1						2.070	0.378
II	8			1	1		2		3	1		3.046	1.079
III	4				1		2	1				2.635	0.662
IV	6			1	2	1	2					2.093	0.756

最もバンド本数が多く、林分間変異も最大であり、一方林分群 I はバンド本数が最も少なく、林分間変異も最少であった。このことは、林分群 II ではバンド本数の多い林分が主体を占めるが、バンド本数の少ない林分もあることを意味している。逆に林分群 I では、バンド本数に関し林分間に大差がなかった。

バンドの出現のしかたも林分群によって特徴的である。Table 5 に各バンドが存在してい

Table 5. Number and percentage of stands having the given bands of isoperoxidases.

Stand group	Number (upper line) and percentage (lower line) of stands														
	A	C	D	E	F	G	H	I	J	K	K'	L	M	O	P
I	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	1
n=3	0	67	33	0	0	33	0	0	0	0	0	0	100	100	33
II	7	6	7	5	4	7	4	2	2	2	1	6	7	7	2
n=8	88	75	88	63	50	88	50	25	25	25	13	75	88	88	25
III	1	4	3	3	1	1	2	0	0	0	0	0	4	4	1
n=4	25	100	75	75	25	25	50	0	0	0	0	0	100	100	25
IV	1	6	6	4	2	1	0	0	0	0	0	0	5	4	2
n=6	17	100	100	67	33	17	0	0	0	0	0	0	83	67	33
Total	9	18	17	12	7	10	6	2	2	2	1	6	19	18	6
n=21	43	86	81	57	33	48	29	10	10	10	5	29	91	86	29

Band B, N were omitted from the table, because they appeared in all stands.

Table 6. Frequency of occurrence in percent of each isozyme band of peroxidase in four stand groups.

Stand group	Frequency of occurrence (%) per isozyme band																
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	K'	L	M	N	O	P
I	0	100	4	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	25	50	19	3
II	37	100	21	14	6	5	10	4	2	2	3	1	8	22	51	17	1
III	1	100	13	33	9	2	2	2	0	0	0	0	0	43	44	14	2
IV	1	100	12	21	10	1	1	0	0	0	0	0	0	16	29	16	1

Number of samples is 24 for each of stand groups I, II and III, but 23 for the stand group IV.

る林分の数と割合を、Table 6 に各林分群のバンド別出現頻度を示す。

Table 5 によれば、バンド A, F, G, I, J, K, K', L がある林分は林分群 II に集中し、バンド H を持つ林分は林分群 II, III に集中している。バンド C については林分群 III, IV にやや多かった。バンド O は林分群 I, III に多い傾向があった。反対に、バンド D, E を持つ林分は林分群 I に極めて少なかった。

さらに、Table 6 の林分群のバンド別出現頻度をみると、バンド A の頻度は林分群 II が特に高かった。バンド I, J, K, K', L は林分群 II だけに出現したが、その頻度は極めて低かった。バンド F, G, H は林分群 II の頻度がやや高かった。バンド C は、前述のように林分群 II での出現林分数はさほど多くなかったが、このバンドの存在している林分の出現頻度が比較的高かったため、林分群 II が最高の頻度を示した。一方、バンド C, D, E の出現頻度は林分群 I が最も低かった。バンド O, P は林分群間ではあまり差がなかった。

ミズナラが分布を広げてゆく場合、遺伝子の突然変異がない限りいったん消失したアイソザイム・バンドは伝わらず、分布の末端ほど消失したバンド数が多いはずである。Table 7 に消

Table 7. Number of isozyme bands lost from each stand.

Stand group	Stand	No. of bands lost from the stand	
			Mean
I	Kikonai	12	11.3
	Hakodate	10	
	Mori	12	
II	Kutchan	5	6.4
	Johzankei	5	
	Sapporo	2	
	Yamabe 1	6	
	" 2	14	
	Atsuga	8	
	Shizunai	5	
III	Urakawa	6	9.0
	Nakashibetsu 1	9	
	" 2	8	
	" 3	11	
	Abashiri	8	
IV	Uryu	10	9.8
	Nakagawa	10	
	Toikanbetsu 1	9	
	" 2	11	
	Wakasakanai	6	
	Hamatonbetsu	13	

失したバンドの本数, すなわち出現頻度が0%であるバンドの本数を示す。林分群 I は 10~12 本, 平均 11.3 本, 林分群 II は 2 本から 14 本までバラつくが大半が 5, 6 本で, 平均 6.4 本であった。林分群 III は 9~11 本で平均 9.0 本, 林分群 IV は稚咲内 (6 本) 以外が 10 本前後で平均 9.8 本であった。つまり消失バンド本数は林分群 II が最少, 林分群 I が最多であった。

ここで, 林分同士を比べる尺度としてアイソザイムの多様性というものを考えたい。SINGH & JAIN⁸⁵⁾ は, アイソザイムにみられる多型現象を数量化する指数として多型指数を用いているが, この指数は本来遺伝子頻度から求めるものであって, アイソザイムの遺伝様式が不明な場合正確さを欠くと考えられる。

本研究では, MARGALEF の種多様度指数を応用してアイソザイムの多様性を表わしてみた。MARGALEF の指数は, もともと動物群集の多様性や種類の豊富さを比較するための指数で, 情報理論に基づいた種数と個体数に関する情報量である。この指数は, 次式のとおり組み合わせ総数の対数で表わされる全情報量を 1 個体あたりの情報量に直したもので, 大きい値をとれば群集構造は複雑であり, 小さい値ならば単純ということになる⁸⁶⁾。

$$\text{MARGALEF の指数: } H = \frac{1}{N} \log \frac{N!}{n_1! \cdot n_2! \cdot \dots \cdot n_i! \cdot \dots \cdot n_s!}$$

ただし, $N = \sum_{i=1}^s n_i$ で, n_i はある種 i の個体数。

上式をアイソザイムに適用するにあたっては, H を1バンドあたりの情報量と考え, n_i はそれぞれのバンドが出現した個体数(最大値は林分の標本個体数に等しい。)とした。

このようにして求めたアイソザイムの多様度指数と出現バンドの種類数を Table 8 に示す。バンドの種類数は, 林分群 II が 11.7 と極めて種類が多く, それに次いで林分群 III が 8.0, 林分群 IV の 7.1 であった。林分群 I は 5.6 本しかなく林分群 II の半分にも満たなかった。

多様度指数の比較では, やはり林分群 II の多様性が高く, 0.698 という指数を得た。また林分群 I のそれは 0.517 と最低で多様性は低かったが, 林分群 IV の指数も 0.525 と比較的近い値を示した。

さらに, 各林分群間の分化の程度を調べるために判別関数を求めた。その関数は, 一般式で表わすと,

$$Y = c_1 X_1 + c_2 X_2 + \dots + c_n X_n$$

Table 8. Number of observed bands and the modified Margalef's index of diversity in isozymes.

Stand group	Stand	No. of bands		Index of diversity	
			Mean		Mean
I	Kikonai	5	5.6 (0.48)	0.46	0.517 (0.74)
	Hakodate	7		0.54	
	Mori	5		0.55	
II	Kutehan	12	11.7 (1.00)	0.78	0.698 (1.00)
	Johzankei	12		0.83	
	Sapporo	15		0.90	
	Yamabe 1	11		0.78	
	" 2	3		0.11	
	Atsuga	9		0.60	
	Shizunai	12		0.86	
	Urakawa	11		0.72	
	III	Nakashibetsu 1		8	
" 2		9	0.73		
" 3		6	0.45		
Abashiri		9	0.68		
IV	Uryu	7	7.1 (0.61)	0.46	0.525 (0.75)
	Nakagawa	7		0.54	
	Toikanbetsu 1	8		0.72	
	" 2	6		0.49	
	Wakasakanai	11		0.77	
	Hamatonbetsu	4		0.17	

Values in parentheses are the ratio of the mean value of each stand to the value of the stand group II as unity (1.00).

Table 9. Standardized discriminant function coefficients between stand groups.

Stand group	Discriminant function coefficients (c)						
	A	D	E	G	H	L	M
I × II	-1.77*	1.75*	0.05	-0.58*	0.06	-0.97*	2.55*
II × III	0.48	-0.39	-0.02	0.28	0.05	0.70*	-1.04*
IV	1.49*	-0.71*	-0.05	-0.37	0.27	0.32	-0.71*
(III+IV)	0.86*	-0.11	-0.29	-0.13	0.36	0.49	-0.53*
III × IV	0.50*	0.42	-1.01*	-0.68*	0.38	0.00	1.12*

* Absolute value is above 0.50.

To construct the discriminant functions, those bands which showed difference in frequency of occurrence among four stand groups were used.

となるが、Table 9 に判別係数 (c) だけを示した、判別分析には、林分群間に差があるとみられたバンド A, D, E, G, H, L, M の 7 バンドの出現頻度を用いた。判別係数の絶対値が 0.5 以上のバンドをみると、林分群 I と林分群 II とでは、A, D, G, L, M の 5 本、林分群 II と林分群 III とでは L, M の 2 本、林分群 II と林分群 IV とでは A, D, M の 3 本であった。林分群 III と林分群 IV をこみにして林分群 II との間の判別式を求めたところ、A, M の 2 本のバンドの判別係数が絶対値 0.5 以上であった。林分群 III と林分群 IV との間の判別式で、係数の絶対値が 0.5 以上のバンドは A, E, G, M の 4 本であった。

第 3 節 考 察

21 林分を北海道の南西部にある林分群 I, 道中部の林分群 II, 道東部の林分群 III, 道北部の林分群 IV の 4 つに分けて、1 個体あたりバンド本数、各バンドが存在する林分数、平均バンド出現頻度、消失バンド本数、バンドの種類数と多様度指数を比較検討した。1 個体あたりバンド本数の林分群平均とその標準偏差で表わされる林分間変異との間には、各林分の平均バンド本数と林分内個体間の標準偏差との間でみられたように正の相関があり、その値は 0.787 であった。ただ、この相関は後者の「統計学的相関」とは異なり、本来その統計学的根拠がなく、いわば生物学的な意味を持つ相関と考えられないこともないので、平均バンド本数と林分間変異は別々に考察すべきであろうと思われる。

検討した結果をまとめると次のようになる。

- 1) 1 個体あたりの平均バンド本数では、道中部が最多で、道南西部が最小であった。道東部は道北部より多かった。
- 2) 1 個体あたりバンド本数にみられる林分間変異も、道中部が最大で道南西部が最も小さかった。道東部と道北部とでは大きな差はなかった。
- 3) 各バンドが存在する林分の数と、バンド別出現頻度の林分群間の比較の結果、道中部は各バンドが存在する林分の数が比較的多く、その出現頻度も高かった。道南西部は、2, 3 のバンドにおいて、それが存在する林分数および出現頻度が最低であった。

4) 消失バンド本数は道央部が最小、南西部が最多だった。道東部は道北部よりやや少なかった。

5) アイソザイム・バンドの種類数と多様度指数をみると、道央部の多様性が最も高く、南西部の多様性が最も低かった。道東部と道北部とでは、前者の多様性が高かった。

以上のように、道央部に属する林分は一般的に、多数のバンドを持ち、多くの種類のバンドをかなりの頻度で出現させ、多様性も高い。そこで、アイソザイムが遺伝子を直接的に反映するという前提にたてば、道央部は最も遺伝的変異に富んでいると言えよう。逆に道南西部については、バンド本数が少ないこと、消失バンドが多いこと、多様性が低いことなどから、4つの地域の中で最も変異が乏しいと考えられる。一般的に言って、遺伝的変異が豊かであるためには、1) 多くの突然変異が起きるために、その集団が十分な数の個体を保有すること。2) 出現した突然変異体が生き残りやすい温和な環境であること。以上の2条件が必要である。道中部は道南西部に比べ環境の温和さでまさるとは思えないが、道南西部はアイソザイムの変異が道央部より乏しいことから、ミズナラは道央部から道南西部へと分布を拡げて行ったと考えられる。結局、道央部がかっての北海道におけるミズナラの繁殖の中心地であって、分布の中心となったのではないかと推察される。

この推論は、花粉分析学的研究によっても裏付けることができる。中村⁵⁷⁾は、石狩川低地帯北端の秩父別の花粉分析を行なった。その結果を函館付近の熊の湯のそれと比較検討した上で、コナラ属、ニレ属、クルミ属 (*Juglans*) などの広葉樹の両地方への分布時期は大差がなく、これらの温帯系の樹種が、氷期以降本州から北上分布したと単純に考えられないとしている。そしてウルム氷期中に北海道内に残存していた所から、ミズナラが分布を拡大して行った可能性を否定していない。

次に、1個体あたりのアイソザイム・バンド本数の林分間変異について考察する。ミズナラの分布・移動が何回か起きた場合、林分間には標本抽出誤差的な要因による遺伝的な相違が生じてくるであろうし、また一部で、ミズナラの集団が何らかの要因で隔離され、それに伴って集団の小規模化が起きた場合、遺伝的浮動の効果が生じて林分間に差が出て来よう。従って、林分間変異が大きい所は、移動の回数が多く、移動の歴史が古いと考えられるだろう。逆に林分間変異が小さい所は移動の回数が少なかったのであろう。さらに分布して行った集団の最初の規模が小さければ、遺伝的浮動が一部に起きたとしても、林分同士は似ていて林分間変異は小さくなるであろう。

南西部の林分間変異は小さいので、道央部から南西部の渡島半島へは、初め小さな集団が「始祖原理」(founder principle)に従って分布して行ったと推測された。

それでは、道央部から道東、道北へはどのように拡がって行ったのであろうか。前述のとおり、道東部と道北部とでは、バンド本数が多いこと、消失バンドがやや少ないこと、多様性が高いことなど、道東部の遺伝的変異の方が大きいことが示唆された。そこで、拡がり方とし

て次の2つが想定される。1) 道央部から道東・道北へと別々に分布したが、道東へ分布して行った集団の方が規模が大きく変異もかなり保たれた。2) 道央部から道東へ、そこから道北へ分布して行った。

各地域集団間の分化の程度は、集団間の判別関数から考察できる。判別係数の絶対値が0.5以上のバンドが集団間の判別に重要であるとするならば、道央の集団と南西の集団とでは5本もあって両者の相違点は多いことになる。これによって、渡島半島への経路に関する前述の推論は裏付けられよう。また、道央の集団と道東、道北の両集団を合わせたものを比べたところ、重要なバンドはバンド A, M の2本であるのに対し、道東の集団と道北の集団との間ではバンド A, E, G, M の4本もあるので、道東の集団と道北の集団とは決して同質ではないことがここでも示唆された。

道央の集団と道東の集団との間では、バンド L, M の2本が、道央の集団と道北の集団とでは、バンド A, D, M の3本の重要性が大きかった。もし道東から道北へ分布して行ったと仮定すれば、道央の集団と道北の集団との判別に重要なバンドの中に、道央の集団と道東の集団との間で重要であったバンド L を含んでいるはずであるし、また重要なバンドの数も道東の集団と道北の集団との間のバンドの数4本よりも多くなければならぬであろう。よって、ミズナラは道央部から東、北の2方向に分布し、道東へは遺伝的変異をかなり保ちながら拡がって行ったと推察された。

第4章 葉の形態形質にみられる地域変異

第1節 試料と方法

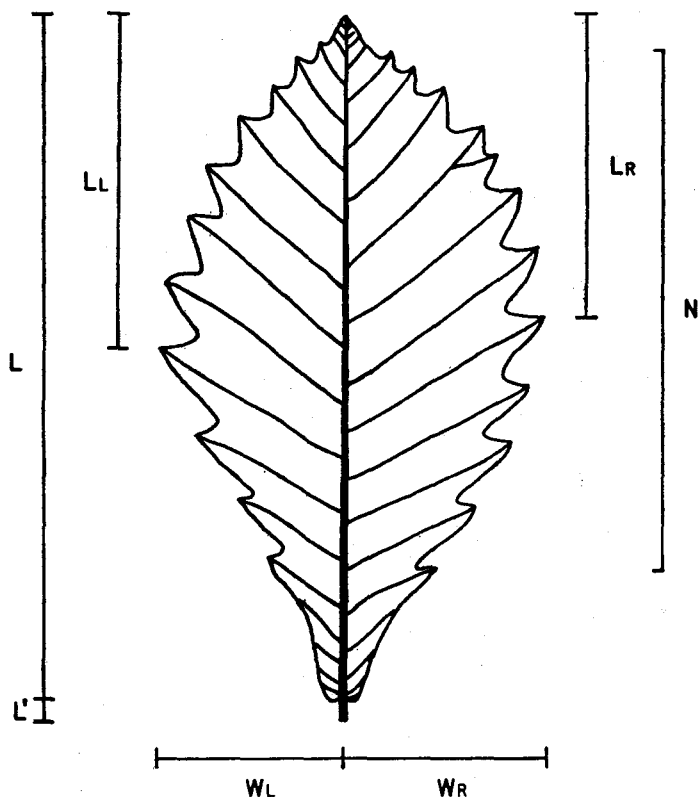
形態形質測定用の葉は、アイソザイム分析用の試料と同じ林分から同時に採取した。林分の位置と概況は第3章第1節に示したとおりである。1つの林分からの採取個体は、無作為に選んだ30個体で、そのうち24個体はアイソザイム分析用の個体と同じであった。株状を呈している個体群では、アイソザイム分析の試料と同様に、その中の1個体を選んだ。

試料としての葉は、1個体あたり10枚を無作為に採取し、ポリエチレンの袋に密封してから -20°C で冷凍保存した。

このようにして21林分630個体分の葉が集められ、葉長(L)、葉柄長(L')、葉の左右の最大幅(W_L, W_R)、葉の先端から左右の最大幅までの距離(L_L, L_R)、左右の鋸歯数合計(N)の5項目をこれらの葉について測定した(Fig. 6 参照)。

これらの測定値の大きさやアイソザイムにみられた変異とは全くの無関係に道南西部からは森、道央部からは定山溪、道東部からは網走、道北部からは浜頓別の計4林分を選び、測定した形質とそれらから算出される形質の「反復率」を求めた。

量的な形質は、遺伝と環境が相互に作用し合った表現型としてとらえることができるが、環境の影響をどの程度受けるかは形質によって異なる。形態形質で地域変異を論議する場合、



- L: Length of leaf.
 L': Length of petiole.
 W_L : Maximum width of left side of leaf.
 W_R : Maximum width of right side of leaf.
 L_L : Length from the tip of leaf to the point where " W_L " was measured.
 L_R : Length from the tip of leaf to the point where " W_R " was measured.
 N: Total number of primary teeth.

Fig. 6. Schematic illustration of foliar morphological characters measured in this study.

環境の影響をなるべく受けにくい形質を選ぶ必要がある。形質がどのくらい遺伝的なものであるかどうかを示す値として「遺伝率」がある。遺伝率の算出方法としては、1) 単一クローン品種とクローン複合品種または実生品種との比較による方法。2) 半きょうだい家系間の比較による方法。3) 全きょうだい家系間の比較による方法。4) 親木と子供の似通いから求める方法。5) 隣接した林木間の相関に基づいて求める方法。の5つがある。遺伝率は、4) で回帰係数もしくは相関係数の形で表わされる以外、遺伝子型分散の表現型分散に対する比として表わされる。

本研究では、クローンないし家系は育成されなかったもので、1)~4)の方法は使えず、また5)では同齢の人工林であることが条件となるので、不適である。そこで遺伝率は求められなかったが、それに代わるものとして「反復率」を求めた。「反復率」は、分散分析における個体間

の分散成分を、それと個体内の分散成分との和で割った値として示された。すなわち、「反復率」は級内相関として算出された。

全ての個体が全く同じ環境下にある場合、個体間の分散成分は遺伝子型の分散成分と考えられ、「反復率」は遺伝率と同一のものとして扱える。通常、個体間の分散成分は遺伝子型の分散成分と個体が置かれている環境と遺伝との相互作用の分散成分から成るので、「反復率」は過大評価された遺伝率と言えるかもしれない。なお、個体内の分散成分は、個体の遺伝子発現に微妙に影響を与える微環境および機械的または機会的誤差による分散成分と考えられる。「反復率」は、ある形質でみられた変異がどのくらいの再現性を持つかということを表わす目安と言えよう。

「反復率」は次の9形質について算出した。

- 1) 葉長 L (mm)
- 2) 葉柄長 L' (mm)
- 3) 葉柄長と葉長との比 $L'/L \times 100$
- 4) 最大幅までの葉端からの距離 (L_L, L_R) と葉長との比の平均 $\frac{1}{2L} (L_L + L_R)$
- 5) 葉の最大幅 $W = W_L + W_R$ (mm)
- 6) 葉長と葉幅との比 L/W
- 7) 左右の最大幅とそこまでの葉端からの距離との比の平均 $\frac{1}{2} (L_L/W_L + L_R/W_R)$
- 8) 鋸歯数の左右合計 N (個)
- 9) 単位長あたりの鋸歯数 $N/2L \times 100$ (個/mm)

以上の形質の「反復率」を分散分析によって4林分それぞれについて求めた。その4林分での平均値を比較して、「反復率」の高い形質を選んだ。

選ばれた形質について個体別の平均を求め、その林分での平均と標準偏差を算出し、林分間および地域間の比較を試みた。なお、平均と標準偏差との間に有意な正の相関が認められたものに関しては変動係数(標準偏差の平均値に対する割合)を求めて比較した。

さらに、各形態形質の平均値同士の相関と、これらの形質と林分の所在地の緯度・経度との相関を求めた。また、アイソザイムにみられた変異と形態形質の変異(標準偏差もしくは変動係数)との相関を求めた。

第2節 結 果

21林分各30個体について葉の形質を測定し、4林分について全9形質の「反復率」を計算した。その結果をTable 10に示した。

各形質の平均の「反復率」をみると、0.127~0.558と幅があるが、これを大きい順に並べた場合、形質を2つのグループに分けることができた。すなわち、「反復率」が0.400以上の形質群と、「反復率」が0.300以下の形質群である。そこで、前者の形質群に属する、葉柄長(L')、葉柄長(L')と葉長(L)との比($L'/L \times 100$)、鋸歯数(N)、単位長あたりの鋸歯数($N/2L \times 100$)の計

Table 10. Repeatability estimates for nine morphological characters in four stands.

Stand	Repeatability								
	L	L'	$\frac{L'}{L} \times 100$	$\frac{L_L + L_R}{2L}$	$\frac{W}{(W_L + W_R)}$	$\frac{L}{W}$	$\frac{1}{2} \left(\frac{L_L}{W_L} + \frac{L_R}{W_R} \right)$	N	$\frac{N}{2L} \times 100$
Mori	0.207	0.461	0.504	0.138	0.349	0.319	0.221	0.434	0.415
Johzankei	0.103	0.397	0.573	0.167	0.084	0.219	0.204	0.348	0.379
Abashiri	0.152	0.362	0.428	0.091	0.056	0.107	0.059	0.533	0.486
Hamatonbetsu	0.466	0.507	0.725	0.114	0.360	0.287	0.090	0.463	0.620
Mean	0.232	0.432	0.558	0.127	0.212	0.233	0.143	0.445	0.475

Repeatability estimates obtained according to the following formula:

$$\text{Repeatability} = \text{Intra-class correlation} = \frac{\sigma_B^2}{(\sigma_B^2 + \sigma_W^2)}$$

σ_W^2 : Within-tree component of variance. σ_B^2 : Between-tree component of variance.

Characters measured were represented in Fig. 6.

Table 11. Petiole length (L') in 21 stands.

Stand	Petiole length (mm)										Mean	S.D.	C.V. (%)
	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0			
Kikonai				1	5	8	11	5			6.07	1.1214	18.5
Hakodate				1	4	11	8	6			5.92	1.0113	17.1
Mori			9	11	6	3	1				3.66	1.0489	28.7
Kutchan			8	9	9	4					3.88	1.0168	26.2
Johzankei		1	13	13	2		1				3.17	0.8468	26.7
Sapporo					9	9	5	7			5.72	1.1280	19.7
Yamabe 1			1	7	7	7	5	2	1		5.11	1.3732	26.9
" 2		5	14	11							2.68	0.7308	27.3
Atsuga			2	12	14	1	1				4.04	0.8126	20.1
Shizunai			1	9	13	7					4.22	0.7932	18.8
Urakawa				7	13	7	3				4.66	0.9316	20.0
Nakashibetsu 1			6	10	8	5	1				3.91	1.0784	27.6
" 2		2	4	11	10	3					3.78	0.9529	25.2
" 3		1	2	15	8	2	2				3.92	1.0651	27.2
Abashiri			6	13	8	3					3.62	0.9052	25.0
Uryu			8	11	9	2					3.64	0.8892	24.5
Nakagawa			6	10	11	2	1				3.82	0.9911	25.9
Toikanbetsu 1			5	15	7	3					3.83	0.8895	23.2
" 2		1	5	15	7	2					3.51	0.7776	22.2
Wakasakanai		2	7	14	5	2					3.47	1.0165	29.3
Hamatonbetsu			7	10	8	2	3				3.92	1.1172	28.5

S.D.: Standard deviation.

C.V.: Coefficient of variation.

Sample size was 30 for each stand.

The correlation between mean and standard deviation was 0.570, and it was significant at 1% level.

4 形質について、林分毎に平均と標準偏差を求めた。

21 林分における葉柄長の度数分布と平均および標準偏差を Table 11 に示す。なお、平均と標準偏差との間には1%水準で有意な正の相関($r=0.570$)があったので、変動係数を算出し同じ Table に載せた。

ミズナラの葉柄長はおよそ1mm~9mmの間の値をとった。林分平均では、山部2の2.68mmが最も短かった。葉柄長が最大の林分は木古内(6.07mm)で、次いで函館、札幌、山部1が比較的長く5mmを越えていた。標準偏差は0.7308(山部2)から1.3732(山部1)の幅があった。変動係数は17.1%(函館)~29.3%(稚咲内)の値を示した。

同じく21林分における葉柄長と葉長との比の度数分布と平均および標準偏差を Table 12 に示す。葉柄長と葉長との比は約0.50~約6.00とかなり値に開きがあった。木古内と函館が比率の高い方に偏っていて、平均値も高く、共に4.000以上であった。他の林分は両林分よりもやや小さく、最低は山部2の2.003であった。標準偏差は0.4594(雨竜)~0.7335(森)であっ

Table 12. Ratio of petiole length to leaf length ($L'/L \times 100$) in 21 stands.

Stand	Ratio of petiole length to leaf length											Mean	Standard deviation
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5		
Kikonai						3	9	9	6	3		4.162	0.5682
Hakodate						1	10	9	6	3	1	4.337	0.5971
Mori			8	8	6	5	1	2				2.533	0.7335
Kutchan			5	4	8	8	3	2				2.842	0.7107
Johzankei		2	8	14	2	3				1		2.261	0.6920
Sapporo				2	3	7	8	5	5			3.696	0.6792
Yamabe 1				3	7	8	9		3			3.318	0.6979
" 2		8	10	3	8	1						2.003	0.5830
Atsuga			1	5	9	10	4	1				2.968	0.5875
Shizunai				5	5	10	8	2				3.208	0.5771
Urakawa				3	8	13	3	2	1			3.157	0.5707
Nakashibetsu 1			4	5	9	9	3					2.799	0.6350
" 2		2		8	7	9	3	1				2.814	0.6344
" 3		1		7	10	6	4	1	1			2.921	0.7068
Abashiri			5	8	11	4	1	1				2.576	0.6026
Uryu			4	12	8	6						2.506	0.4594
Nakagawa		1	2	6	10	8	2	1				2.801	0.5838
Toikanbetsu 1			1	4	13	8	3	1				2.899	0.5228
" 2		1	5	8	9	6	1					2.518	0.5471
Wakasakanai	1		7	8	8	5		1				2.411	0.6691
Hamatonbetsu			7	5	6	10	2					2.679	0.6415

Sample size was 30 for each stand.

The correlation between mean and standard deviation was -0.043 , and was not significant.

Table 13. Total number of primary teeth (N) in 21 stands.

Stand	Total number of primary teeth											Mean	Standard deviation
	14 16	16 18	18 20	20 22	22 24	24 26	26 28	28 30	30 32	32 34	34 36		
Kikonai				4	6	8	7	3	1	1		25.36	2.9328
Hakodate				3	5	8	9	2	2	1		25.67	2.7893
Mori					7	9	4	5	4		1	26.56	3.1139
Kutchan				2	9	13	3	3				24.79	1.9198
Johzankei			1	2	11	7	4	5				24.77	2.6889
Sapporo			4	3	7	12	3			1		23.82	2.4993
Yamabe 1			3	9	14	2	2					22.46	1.7998
" 2			2	1	9	7	7	4				24.77	2.5782
Atsuga			1	3	9	9	7			1		24.37	2.4429
Shizunai				4	11	10	4	1				24.15	1.8020
Urakawa			1		2	5	13	4	4	1		25.15	2.8756
Nakashibetsu 1				4	12	9	5					21.98	1.9806
" 2				8	7	10	4	1				21.83	2.2651
" 3	2	4	9	9	4	1	1					19.89	2.5725
Abashiri		3	6	7	6	4	2	1	1			22.17	3.5390
Uryu			5	8	8	6	3					22.43	2.3514
Nakagawa			1	11	8	7	3					22.87	1.9677
Toikanbetsu 1			8	6	7	5	2	1	1			22.63	3.2100
" 2			1	7	7	5	6	2	2			24.38	3.1681
Wakasakanai			1	2	11	9	4	3				24.44	2.2962
Hamatonbetsu			1	7	4	9	8	1				24.30	2.7450

Sample size was 30 for each stand.

The correlation between mean and standard deviation was 0.222, and was not significant.

た。平均と標準偏差との相関は $r = -0.043$ で、統計的に有意でなかった。

鋸歯数(左右合計)の林分毎のデータは Table 13 に示す。

鋸歯数はだいたい14.0個~36.0個の間に入る。林分平均では19.89個(中標津3)~26.56個(森)の値をとった。標準偏差は平均と有意な相関がなく($r = 0.222$), 1.7998(山部1)~3.5390(網走)であった。

単位長あたりの鋸歯数の度数分布を Table 14 に示す。

単位長あたりの鋸歯数は個体により異なり約4個~14個であった。林分毎で見ると、平均の最大値は函館の9.489個、最小値は山部1の7.458個であった。標準偏差は浜頓別(1.4547)が最大で、中標津1(0.8195)が最小であった。なお、平均と標準偏差との相関は $r = 0.085$ で、統計的に有意でなかった。

以上の4形質を第3章第2節で分けた4つの林分群毎にまとめてみた。各形質の林分平均について林分群別の平均を求め、Table 15 に示す。

Table 14. Mean number of primary teeth per 100 mm ($N/2L \times 100$) in 21 stands.

Stand	Mean number of primary teech per 100 mm										Mean	Standard deviation
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0		
	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0		
Kikonai				7	10	10	2		1		8.831	1.1187
Hakodate					10	13	5	2			9.489	0.8617
Mori				2	8	10	8	2			9.430	0.9958
Kutchan				1	9	14	5	1			9.437	0.8627
Johzankei			2	3	6	14	3	2			9.103	1.2148
Sapporo			9	11	8	1	1				7.760	0.9665
Yamabe 1		2	9	9	8	2					7.458	1.0019
" 2				1	10	10	8	1			9.403	1.0071
Atsuga			1	6	9	4	6	4			9.149	1.3758
Shizunai				2	9	10	8	1			9.317	0.9356
Urakawa				7	15	6	1		1		8.666	1.0312
Nakashibetsu 1		1	2	14	9	4					8.000	0.8195
" 2			3	12	7	6	2				8.257	1.0748
" 3 1			9	7	12	1					7.572	1.0304
Abashiri		1	3	11	11	2	1	1			8.115	1.1074
Uryu			5	11	12	2					7.884	0.8590
Nakagawa				9	14	4	3				8.627	0.9097
Toikanbetsu 1			2	5	12	6	4		1		8.748	1.2204
" 2			1	3	14	7	4	1			8.941	0.9596
Wakasakanai				9	10	8	2	1			8.735	1.0519
Hamatonbetsu			2	9	10	6	1	1		1	8.620	1.4547

Sample size was 30 for each stand.

The correlation between mean and standard deviation was 0.085, and was not significant.

Table 15. Means of four morphological characters in four stand groups.

Stand ^a group	Mean of foliar morphological character			
	L'	$L'/L \times 100$	N	$N/2L \times 100$
I	5.213 mm	3.677	25.86	9.250
II	4.185	2.932	24.29	8.786
III	3.806	2.777	21.47	7.986
IV	3.696	2.636	23.51	8.593

Characters measured were represented in Fig. 6.

これによると、葉柄長は林分群 I, II, III, IV の順に、5.213 mm, 4.185 mm, 3.806 mm, 3.696 mm と短くなっており、また葉柄長と葉長との比も同様に、3.677, 2.932, 2.777, 2.636 と小さくなっていった。鋸歯数では、林分群 I, II, IV, III の順に少なくなり、その値はそれぞれ 25.86 個, 24.29 個, 23.51 個, 21.47 個となっていた。単位長あたりの鋸歯数は林分群 I~IV の値がそれぞれ 9.250 個, 8.786 個, 7.986 個, 8.593 個となっており、鋸歯数と同じく林分群 I,

II, IV, III の順に少なくなっている。

これらの4形質の林分毎の平均値間の相関と、さらに林分所在地の緯度および経度との相関を求め、Table 16 に示した。

林分所在地の緯度と経度については Table 1 に既に示した。

Table 16 によると、緯度と有意な相関があった形質は、葉柄長、葉柄長と葉長との比、鋸歯数であった。いずれも5%水準で有意な負の相関であった。一方、経度と有意な相関があった形質は、鋸歯数と単位長あたりの鋸歯数の2形質であった。これらの相関係数は、1%水準で有意な負の値をとった。なお、緯度と経度との間に相関がなかった。

次に、形質同士の相関をみると、葉柄長と、葉柄長と葉長との比の間に、また鋸歯数と単位長あたりの鋸歯数との間に1%水準の高い正の相関が認められた。

さらに、各形質の林分内の変異を表わす標準偏差を林分群毎にまとめ、平均を出した。葉柄長では標準偏差と平均との間に相関があったので、この形質に限って変動係数で林分内変異を表わした。その結果を Table 17 に示す。

各形質について林分内変異の大きい順に林分群を整理すると、葉柄長では変動係数が林分群 III (26.3%), 林分群 IV (25.6%), 林分群 II (23.2%), 林分群 I (21.4%) と並んだ。葉柄長と葉

Table 16. Correlation coefficients between means of four morphological characters and geographical data of 21 stands.

	Lat.	Long.	L'	$L'/L \times 100$	N	$N/2L \times 100$
Latitude	—	0.284	-0.511*	-0.535*	-0.458*	-0.323
Longitude		—	-0.311	-0.270	-0.813**	-0.580**
L'			—	0.972**	0.179	-0.165
$L'/L \times 100$				—	0.155	-0.056
N					—	0.791**
$N/2L \times 100$						—

Characters measured were represented in Fig. 6.

* Significant at 5% level. ** Significant at 1% level.

Table 17. Variations of four morphological characters in four stand groups.

Stand group	Variation of foliar morphological character			
	L' (C.V.)	$L'/L \times 100$ (S.D.)	N (S.D.)	$N/2L \times 100$ (S.D.)
I	21.41	0.6329	2.9453	0.9920
II	23.20	0.6372	2.3258	1.0494
III	26.25	0.6447	2.5893	1.0080
IV	25.60	0.5706	2.6230	1.0758

Characters measured were represented in Fig. 6.

C.V.: Coefficient of variation (%).

S.D.: Standard deviation.

長との比では標準偏差が林分群 III (0.6447), 林分群 II (0.6372) 林分群 I (0.6329), 林分群 IV (0.5706) の順となった。鋸歯数に関しては林分群 I (2.9453), 林分群 IV (2.6230), 林分群 III (2.5893), 林分群 II (2.3258) の順であった。単位長あたりの鋸歯数については林分群 IV (1.0758), 林分群 II (1.0494), 林分群 III (1.0080), 林分群 I (0.9920) の順に並んだ。

林分内変異について、4 形質間の相関を求めた。同時にアイソザイムの平均バンド本数、バンド本数の標準偏差、バンドの種類数、多様度指数と、前述の形態形質の林分内変異について相互の相関係数を算出し、Table 18 にその結果を示す。

形態形質の標準偏差もしくは変動係数間には、ほとんどの場合有意な相関が認められなかった。葉柄長の変動係数と、葉柄長と葉長との比の標準偏差との間に 5% 水準で有意な正の相関 ($r=0.473$) がみられただけであった。

アイソザイムの平均バンド本数、バンド本数の標準偏差、バンドの種類数、多様度指数の相互には正の相関があり、その値は 1% 水準で統計的に有意であった。しかし、これらの値と形態形質の変異との間には、全く相関が認められなかった。

Table 18. Correlation coefficients between variations of isozymes and variations of four morphological characters of 21 stands.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 No. of isozyme bands per tree (Mean)	—	0.782**	0.857**	0.928**	-0.100	0.336	-0.355	-0.182
2 No. of isozyme bands per tree (S.D.)		—	0.903**	0.868**	-0.235	0.316	-0.398	-0.219
3 No. of observed bands			—	0.911**	-0.222	0.276	-0.367	-0.150
4 Index of diversity in isozymes				—	-0.207	0.266	-0.276	-0.223
5 L' (C.V.)					—	0.473*	-0.150	0.074
6 $L'/L \times 100$ (S.D.)						—	-0.208	0.027
7 N (S.D.)							—	0.374
8 $N/2L \times 100$ (S.D.)								—

Morphological characters (5-8) were represented in Fig. 6.
 S.D.: Standard deviation. C.V.: Coefficient of variation.
 * Significant at 5% level. ** Significant at 1% level.

Table 19. Repeatability estimates for four morphological characters in 21 stands.

Character	L'	$L'/L \times 100$	N	$N/2L \times 100$
Repeatability				
Min.	0.252	0.185	0.132	0.146
Max.	0.530	0.725	0.533	0.620
Mean	0.385	0.384	0.347	0.377

Characters measured were represented in Fig. 6.

最後に、葉柄長、葉柄長と葉長との比、鋸歯数、単位長あたりの鋸歯数の「反復率」を21林分について求め、その最小・最大・平均値を Table 19 に記す。

「反復率」の平均をみると、0.347~0.385 で、0.37 前後の値をとった。

第3節 考 察

葉柄長、葉柄長と葉長との比、鋸歯数、単位長あたりの鋸歯数について林分群間の比較を試みた結果、標準偏差もしくは変動係数で表わされる林分内変異は、形質によって変異の大きな林分群が異なった。また1例を除いて形質間に有意な相関はなかった。唯一、相関が認められたのは、葉柄長の変動係数と葉柄長と葉長との比の標準偏差という2形質の林分内変異同士の間であった。ただしこの2形質間では平均値においても相関がみられ、いわば絶対的葉柄長と相対的葉柄長という違いがあるにしても、2形質はほとんど同じものとみなすことができると思われる。いずれにしても林分内変異に関して、葉柄長もしくはその葉長に対する比とその他の形質に共通な一般的傾向は認められなかった。

さらに、葉の形態形質の変異とアイソザイムのバンド本数や多様性との間に有意な相関はみられなかった。一方、アイソザイムの多様性は、バンドの種類数と出現頻度に関連し、本来1個体の持つバンド本数とは無関係と考えられるが、アイソザイムの多様さ(バンドの種類数、多様度指数)とバンド本数とに1%水準で統計的に有意な相関が認められた。

このようにアイソザイムの変異を表わす個々の指標は同じ傾向を示すのに、これらとそれぞれの形態形質の変異にみられた傾向は一致しない。ただし、形態形質の変異がアイソザイムのそれと全く逆の傾向を示したわけではなく、両者が矛盾しているとは言えない。

4つの形態形質の「反復率」は、全林分について算出した結果、平均で0.347~0.385であった。先にも述べたとおり、個体の置かれている環境が同じ場合には、「反復率」は遺伝率と等しくなるが、普通遺伝率よりも過大評価される。従って前述の4形質の遺伝率は、0.347ないし0.385よりも小さいであろう。

遺伝率が形質によって異なることは、先に述べた11形質の「反復率」にみられた幅からも推察されるし、また SAYED⁸⁴⁾ はパン小麦 (*Triticum aestivum* L.) の1個体あたり穂数、1穂あたりの小穂数、1穂あたりの穀粒数、千粒重、1小穂あたりの穀粒数の遺伝率(広義)が35%~60%と違っていたことを報告している。さらに同じ形質でも種によって遺伝率は違いうるであろう。

樹木の葉に関する形質の遺伝率を2, 3例挙げる。EINSPAHR *et al.*¹⁷⁾ はアメリカヤマナラシ (*Populus tremuloides* MICHX.) の3倍体のクローンを用いて、材質や成長量とともに葉の形態形質の遺伝率を調べた。この場合、同一クローン内の個体間にみられるバラつきを環境分散として扱っている。これによると、葉長の遺伝率は56%、葉幅では69%、葉柄長では82%、葉脚の角度では61%、葉端の角度では87%、1cmあたりの鋸歯数では43%であった。WRIGHT⁹⁵⁾ はヨーロッパアカマツ (*Pinus sylvestris* L.) で半きょうだいを使い家系の遺伝率を推定したが、

葉長は約50%の遺伝率を示した。

また、酒井ら⁸¹⁾はスギの針葉形質の遺伝率を求めている。彼らの報告における遺伝率は本研究での「反復率」と同じ算出方法であるが、針葉長、針葉角度、弯曲度、展葉幅、針葉密度、緑枝長は70%~95%の値を示した。

以上の例の遺伝率と比べると、ミズナラの葉の形質の遺伝率(反復率)はやや低いと言える。

一般的に葉器官は他の器官より環境の影響を受けやすいと言われている。TUCKER & EMMINGHAM⁸⁰⁾は、アメリカツガ(*Tsuga heterophylla* SARG.)で日陰になっている樹と日あたりのよい所の樹とを比べ、前者の葉の方が後者の葉よりも薄く、単位重量あたりの葉面積が大きいことを報告している。さらに、日陰になっていた葉は上木を伐採したことにより、日あたりのよい所の葉に似て来たとも述べている。またMELCHIOR⁸⁷⁾は、サワラ(*Chamaecyparis pisifera* SIEB. et ZUCC., ap. ENDL.)の葉の形に幼型を含む3タイプとそれらの複合タイプがあり、これらが加齢的に変化すること、そしてその変化のしかたがクローンによって異なり、中には幼型のままのクローンもあったことを報告している。

ミズナラにおいても、低い反復率を考慮すると、葉の形態形質は環境の影響をかなり受けやすいと推察される。そこで、ミズナラの分布変異を検討する場合は、葉の形態よりも堅果などの環境に左右されにくいと思われる器官の形態やアイソザイムの方が好ましいであろう。

なお、葉柄長およびその葉長に対する比と鋸歯数は緯度と負の相関があり、道南から道北へ向かうにつれて、葉柄長は短かく、鋸歯数は少なくなっていた。また、鋸歯数と単位長あたりの鋸歯数は、経度と負の相関があり、道東へ向かうに従って鋸歯数は減る。

ミズナラと同じ属に分類されるコナラ、カシワ、モンゴリナラを比較すると、コナラの葉柄は他の3種に比べて長く、またモンゴリナラ、カシワはまばらな鋸歯を有する⁸⁹⁾。そこで北海道の南西部のミズナラは、葉柄と鋸歯数に関する限りコナラ的要素を持ち、道北ないし道東のミズナラはカシワあるいはモンゴリナラの要素を持っていると言えよう。

この点について、2つの別々の要因が考えられる。すなわち、1) これらの変異は、環境条件のストレスに関連した緯度変異もしくは生態変異であるという考え方と、2) ミズナラと他の3種との間に移入交雑が起こり、その結果として前述の傾向がみられるとする考え方があるだろう。

移入交雑が起きた場合、アイソザイムのパターンにも通常変化が生ずると考えられる。YADAVA *et al.*⁹⁶⁾はアブラナ属(*Brassica*)の数種のアイソザイムを調べ、バンドの類似性は20~55%であったと報告している。カシワ、コナラ、モンゴリナラのアイソザイム・パターンはまだ不明であるが、前述の報告例から、少なくとも若干の相異はあるであろうと推察される。

従って、移入交雑が起きているかも知れないと考えられる地域のミズナラのアイソザイム・バンドの個体あたり本数や種類数は、交雑が起きていないと考えられる地域に比べ多い可能性が高いと思われる。しかし、第3章で示したように、アイソザイム・バンドの本数や種類数は、

道央部が最も多く、それに比べ道南西部、道東部、道北部は少なかった。そこで、葉柄長と鋸歯数にみられた地理的クラインは、移入交雑に起因するとみるよりも、緯度変異もしくは生態変異とみた方がよいかもしれない。ただ、この問題については、ミズナラ以外の種のアイソザイムを検討することが必要であろう。

摘 要

本研究では、ミズナラの地域変異を明らかにするため、葉のアイソザイムと葉の形態形質を調べた。アイソザイムについては研究に適している酵素、試料の採取部位および採取時期も検討した。その結果は、次のとおりである。

1. デンプンゲル電気泳動法によって、ミズナラの葉の中のペルオキシダーゼ、エステラーゼ、酸性フォスファターゼ、アルカリ性フォスファターゼを調べた。4酵素中、アイソザイム・バンドが観察され、かつアイソザイム・パターンが多型的であった酵素は、ペルオキシダーゼであった。ミズナラのアイソザイムの研究には、ペルオキシダーゼが有望であることがわかった。

2. 電気泳動法のための試料の採取部位による違いを検討した。樹冠の上部(高さ8m付近)と下部(高さ3m付近)で、ペルオキシダーゼのアイソザイム・パターンに差は認められなかったので、採取部位について特に注意しなくてもよいことがわかった。

3. 葉のペルオキシダーゼのアイソザイム・パターンは、7月上旬から9月下旬まで安定していた。電気泳動法のための試料は、この期間に採取すべきである。

4. 北海道内21林分から試料の葉を集め、アイソザイムと葉の形質の地域変異を調べた。これらの林分を、アイソザイムの変異とその所在地から、道南西部の林分群I、道央部の林分群II、道東部の林分群III、道北部の林分群IVの4つの林分群に分けることができた。

5. アイソザイムの変異は、4林分群中林分群IIが最も大きかった。遺伝的変異が最も大きい所は繁殖の中心地であるという仮説から、北海道におけるミズナラの繁殖の中心地は道央部、すなわち札幌近郊にあったと推察した。

6. アイソザイムの変異を林分群間で比較して、ミズナラは道央部から3つの経路を通過して分布を拡げて行ったと推察した。第1の経路は渡島半島に向かうもので、初め小さな集団が「始祖原理」に従って分布して行ったと推測した。第2の経路は道東へ向かうもので、遺伝的変異を保ちながら大きな集団が分布して行ったと推定した。残りの経路は道央部から道北部へ向かうもので、北に向かうにつれ遺伝的変異は減少したと推察した。

7. 葉柄長、葉柄長と葉長との比、鋸歯数、単位長あたりの鋸歯数、以上4つの形態形質について林分内変異を林分群間で比較した。その結果、形質によって変異の最も大きい林分群は異なった。また、形態形質の変異とアイソザイムの変異との間に共通する傾向は認められなかった。

8. ミズナラの葉の形態形質は、その反復率の低さから、分布変異の検討には好ましくないと考えられた。

9. 前述の形態形質に地理的勾配が認められたが、これは移入交雑に起因するのではなく、緯度変異もしくは生態変異ではないかと考えられた。

引用文献

- 1) ADAMS, W. & JOLY, R.: Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. *Silvae Genetica* 29 (1): 1-4, 1980.
- 2) ANTOINE, J.: Unterschiede im Kronenaufbau bei Klonen und Herkünften der Fichte (*Picea abies* (L.) KARST.). *Silvae Genetica* 23 (5): 156-159, 1974.
- 3) 青木幸一郎, 中基栄三, 大井優一: 電気泳動実験法。—チセリウスからディスクまで—。185 pp. 広川書店, 東京, 1971.
- 4) BARNETT, J. & NAYLOR, A.: Alcohol dehydrogenase activity and ethanol utilization in germinating longleaf and slash pine seeds. *For. Sci.* 15 (4): 400-403, 1969.
- 5) BENITO, C. & PÉREZ de la VEGA, M.: The chromosomal location of peroxidase isozymes of the wheat kernel. *Theor. Appl. Genet.* 55: 73-76, 1979.
- 6) BERGMANN, F.: Genetische Untersuchungen bei *Picea abies* mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung von Forstsaatgut. *Allg. Forst- u. J.-Ztg.* 142 (11): 278-280, 1971.
- 7) BERGMANN, F.: Genetischer Abstand zwischen Populationen. II. Die Bestimmung des genetischen Abstands zwischen europäischen Fichtenpopulationen (*Picea abies*) auf der Basis von Isoenzym-Gehäufigkeiten. *Silvae Genetica* 23 (1-3): 28-32, 1974.
- 8) BIRECKA, H. & GARRAWAY, M.: Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis*. *Plant Physiol.* 61: 561-566, 1978.
- 9) BORCHERT, R.: Endogenous shoot growth rhythms and indeterminate shoot growth in oak. *Physiol. Plant.* 35: 152-157, 1975.
- 10) BROWN, A.: Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157, 1978.
- 11) CHYLARECKI, H. & GIERTYCH, M.: Variability of *Picea abies* (L.) KARST. cones in Poland. *Arboretum Kórnickie* 14: 39-71, 1969.
- 12) CONKLE, M.: Inheritance of alcohol dehydrogenase and leucine aminopeptidase isozymes in knobcone pine. *For. Sci.* 17: 190-194, 1971.
- 13) CONKLE, M.: Isozyme specificity during germination and early growth of knobcone pine. *For. Sci.* 17: 494-498, 1971.
- 14) DICKE, St. & BAGLEY, W.: Variability of *Quercus macrocarpa* MICHX. in an eastern Nebraska provenance study. *Silvae Genetica* 29 (5-6): 171-176, 1980.
- 15) 栄花 茂: 岩手県早池峯山におけるヒバ天然林の遺伝的構造. 87 回日林論: 177-178, 1976.
- 16) 栄花 茂, 寺田貴美雄: ヒバのアイソザイム分画型の確定と器官特異性. 87 回日林論: 175-176, 1976.
- 17) EINSPAHR, D., BUIJTENEN, J. & PECKMAM, J.: Natural variation and heritability in triploid aspen. *Silvae Genetica* 12 (2): 51-58, 1963.
- 18) 遠藤 徹: ザイモグラフィ序説 (I). 科学レポート, 26, 1968.
- 19) 遠藤 徹: ザイモグラフィ序説 (II). 科学レポート, 27, 1968.
- 20) 遠藤 徹: アイソザイムの進歩と応用. 遺伝, 27 (2): 5-13, 1973.
- 21) FERET, P.: Isoenzyme variation in *Picea glauca* (MOENCH) VOSS seedlings. *Silvae Genetica* 20 (1-2): 46-50, 1971.
- 22) FERET, P.: Peroxidase inheritance in siberian elm. *For. Sci.* 17: 472-475, 1971.
- 23) FERET, P.: Genetic differences among three small stands of *Pinus pungens*. *Theor. Appl.*

- Genet. 44: 173-177, 1974.
- 24) FERET, P. & BERGMANN, F.: Gel electrophoresis of protein and enzymes. In: Modern Methods in Forest Genetics. (Ed. MIKSCHE, J.) pp. 49-77. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1976.
 - 25) FLORENCE, L. & HICKS Jr. R.: Further evidence for introgression of *Pinus taeda* with *P. echinata*: electrophoretic variability and variation in resistance to *Cronartium fusiforme*. *Silvae Genetica* 29 (2): 41-43, 1980.
 - 26) 深沢和三: ナラ素材および組織構造. 北方林業, 22: 95-101, 1970.
 - 27) GORDON, J.: Changes in total nitrogen, soluble protein, and peroxidase in the expanding leaf zone of eastern cottonwood. *Plant. Physiol.* 47: 595-599 1971.
 - 28) GRIFFIN, A. & CHING, K.: Geographic variation in Douglas-fir from the coastal ranges of California. I. Seed, seedling growth and hardiness characteristics. *Silvae Genetica* 26 (5-6): 149-157, 1977.
 - 29) 林 弥栄: 有用樹木図説. 林木編. 472 pp. 誠文堂新光社, 東京, 1969.
 - 30) 平井秀松: イソ酵素について. 北海道の林木育種, 15 (2): 1-6, 1973.
 - 31) 平井秀松, 阿部正和, 島尾和男: 電気泳動実験法. 443 pp. 文光堂, 東京, 1967.
 - 32) 北海道: 北海道林業統計. 昭和40年度. 142 pp. 1966.
 - 33) 北海道: 北海道林業統計. 昭和50年度. 148 pp. 1976.
 - 34) 菊沢喜八郎: 広葉樹の葉の生存曲線. 遺伝, 32 (8): 57-62, 1978.
 - 35) KIM, Z.: Inheritance of leucine aminopeptidase and acid phosphatase isozymes in beech (*Fagus sylvatica* L.). *Silvae Genetica* 28 (2-3): 68-71, 1979.
 - 36) 木元新作: 生態学研究法講座 14. 動物群集研究法 I. —多様性と種類組成—. 51-94, 共立出版, 東京, 1976.
 - 37) KRIEBEL, H., BAGLEY, W., DENEKE, F., FUNSCH, R., ROTH, P., JOKELA, J., MERRITT, C., WRIGHT, W. & WILLIAMS, R.: Geographic variation in *Quercus rubra* in North Central United States plantations. *Silvae Genetica* 25 (3-4): 118-122, 1976.
 - 38) LEWONTIN, R. & HUBBY, J.: A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609, 1966.
 - 39) LIANG, G., LEE, K., CHUNG, K., LIANG, Y. & CUNNINGHAM, B.: Regulation of internodal length by peroxidase enzymes in grain sorghum. *Theor. Appl. Genet.* 50: 137-146, 1977.
 - 40) MAEGLIN, R.: Natural variation of tissue proportions and vessel and fiber length in mature northern red oak. *Silvae Genetica* 25 (3-4): 122-126, 1976.
 - 41) MARKERT, C. & MØLLER, F.: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 45: 753-763, 1959.
 - 42) 松浦 堯: 林業におけるザイモグラフィーの応用. 北方林業, 244: 202-205, 1969.
 - 43) 松浦 堯: 同位酵素によるトドマツの系統的変異の究明. 北海道の林木育種, 15 (2): 15-19, 1973.
 - 44) 松浦 堯, 真鍋忠久, 田中京子: トドマツ針葉の採取部位と時期によるアイソザイムパターンの変動. 北方林業, 262: 28-31, 1971.
 - 45) MAYBERRY, J. & FERET, P.: Peroxidases in developing acorns and seedlings of *Quercus alba* L. *Silvae Genetica* 26 (5-6): 218-223, 1977.
 - 46) MCGEE, C.: Elevation of seed sources and planting sites affects phenology and development of red oak seedlings. *For. Sci.* 20 (2): 160-164, 1974.
 - 47) MELCHIOR, G.: Some results on changes of leaf characters and readiness to flower in *Chamaecyparis pisifera*. *Silvae Genetica* 25 (1): 26-27, 1976.
 - 48) 三上 進: カラマツの同位酵素における産地間変異. 83回日林講: 195-197, 1972.
 - 49) 官部金吾, 工藤祐舜: 北海道主要樹木図譜. 第2巻. 64 pp. 北海道, 1925.
 - 50) MIYAZAKI, Y. & SAKAI, K.: Use of zymography for identification of a clone in *Cryptomeria japonica* D. DON. *J. Jap. For. Soc.* 51 (9): 235-239, 1969.

- 51) 宮脇 昭: 日本の植生. 535 pp. 学習研究社, 東京, 1977.
- 52) 桃谷好英: 植物ホルモンとアイソザイム. 蛋白質・核酸・酵素, 14 (1): 28-37, 1969.
- 53) MUHS, H.: Distinction of Douglas-fir provenance using peroxidase-isozyme-patterns of needles. *Silvae Genetica* 23 (1-3): 71-76, 1974.
- 54) MÜLLER, G.: A simple of method of estimating rates of self-fertilization by analysing isozymes in tree seeds. *Silvae Genetica* 25 (1): 15-17, 1976.
- 55) MÜLLER, G.: Untersuchungen über die natürliche Selbstbefruchtung in Beständen der Fichte (*Picea abies* (L.) KARST.) und Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Silvae Genetica* 26 (5-6): 207-217, 1977.
- 56) MÜLLER, G.: Cross-fertilization in a conifer stand inferred from enzyme gene-markers in seeds. *Silvae Genetica* 26 (5-6): 223-226, 1977.
- 57) 中村 純: 北海道第4紀堆積物の花粉分析学的研究 V. ウルム氷期以降の植生変遷. 高知大学術研報 17: 39-51, 1968.
- 58) NAMKOONG, G., ROBERDS, J., NUNNALLY, L. & THOMAS, H.: Isozyme variations in population of southern pine beetles. *For. Sci.* 25 (1): 197-203, 1979.
- 59) 大井次三郎: 日本植物誌. 顕花篇. 1560 pp. 至文堂, 東京, 1965.
- 60) 大羽 滋: 集団の遺伝. 164 pp. 東大出版会, 東京, 1977.
- 61) 岡田 滋: トドマツ苗木の産地特性について (III). 苗高と二次生長発生率の産地間, 母樹間変動. 日林誌, 51 (1): 6-11, 1969.
- 62) 岡田 滋: アカエゾマツの産地間変異 (1). 苗高と開葉時期の産地間変異. 日林誌, 57 (9): 305-310, 1975.
- 63) 朴 竜求, 酒井寛一: マツのパーオキシンダーゼに関する遺伝学的研究 (I). 同位酵素の遺伝. 82回日林講: 139-140, 1971.
- 64) PELKONEN, P. & LUUKKANEN, O.: Gas exchange in three populations of Norway spruce. *Silvae Genetica* 23 (5): 160-164, 1974.
- 65) PERRY, T.: Seasonal and genetic differences in fats, phenols, isoenzymes, and pigments of red maple. *For. Sci.* 17 (2): 209-212, 1971.
- 66) RASMUSON, B. & RUIDN, D.: Variation in esterase zymogram patterns in needles of *Pinus sylvestris* from provenances in northern Sweden. *Silvae Genetica* 20 (1-2): 39-41, 1971.
- 67) RICKEMAN, V. & DESBOROUGH, S.: Inheritance of three electrophoretically determined protein bands in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 52: 187-190, 1978.
- 68) RICKEMAN, V. & DESBOROUGH, S.: Elucidation of the evolution and taxonomy of cultivated potatoes with electrophoresis. I. Groups *Tuberosum*, *Andigena*, *Phureja* and *Stenotomum*. *Theor. Appl. Genet.* 52: 217-220, 1978.
- 69) RICHENS, R.: Studies on *Ulmus*. III. The village elms of southern Cambridgeshire. *Forestry* 31: 132-146, 1958.
- 70) RICHENS, R. & JEFFERS, J.: Multivariate analysis of the elms of northern France. II. Pooled analysis of the elm populations of northern France and England. *Silvae Genetica* 27 (3-4): 85-95, 1978.
- 71) 林野庁: 林業統計要覧. 1977. 210 pp. 林野弘済会, 1977.
- 72) 林野庁: 林業統計要覧. 1978. 210 pp. 林野弘済会, 1978.
- 73) ROWE, K. & CHING, K.: Provenance study of Douglas-fir in the Pacific Northwest Region. II. Field performance at age nine. *Silvae Genetica* 22 (4): 115-119, 1973.
- 74) RUDIN, D., ERIKSSON, G., EKBERG, I. & RASMUSON, M.: Studies of allele frequencies and inbreeding in Scots pine populations by the aid of the isozyme technique. *Silvae Genetica* 23: (1-3): 10-13, 1974.
- 75) RUDIN, D. & EKBERG, I.: Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. —using macrogametophyte. *Silvae Genetica* 27 (1): 1-12, 1978.
- 76) 斉藤新一郎: ミズナラの稚苗の形態について (II). 道北における産地間の違い. 日林北支講, 29: 86-88, 1980.

- 77) 酒井寛一: 育種にアイソザイムはどう使えるか. 育種学最近の進歩, 14: 77-84, 1974.
- 78) SAKAI, K. & PARK, Y.: Genetic studies in natural populations of forest trees. III. Genetic differentiation within a forest of *Cryptomeria japonica*. Theor. Appl. Genet. 41: 13-17, 1971.
- 79) SAKAI, K., MIYAZAKI, Y. & MATSUURA, T.: Genetic studies in natural populations of forest trees. I. Genetic variability on the enzymatic level in natural forests of *Thujaopsis dolabrata*. Silvae Genetica 20 (5-6): 168-173, 1971.
- 80) SAKAI, K. & MIYAZAKI, Y.: Genetic studies in natural populations of forest trees. II. Family analysis: a new methods for quantitative genetic studies. Silvae Genetica 21 (5): 149-154, 1972.
- 81) 酒井寛一, 有田 学, 井山審也, 岩神正明, 岡田幸郎, 富田浩二, 林 重佐, 宮崎安貞: 魚梁瀬スギ天然林の遺伝子保存に関する調査報告書. 71 pp. 関西林木育種場四国支場, 1978.
- 82) 鮫島和子: カンパ属植物のアイソザイム. 北方林業, 24: 341-344, 1972.
- 83) 鮫島和子: カンパ属植物のアイソザイム (II). 雄花穂のパーオキシダーゼ. 北方林業, 26: 281-283, 1974.
- 84) SAYED, H.: Inheritance of five quantitative characters of bread wheat. Theor. Appl. Genet. 52: 73-76, 1978.
- 85) SINGH, R. & JAIN, S.: Population biology of *Avena*. II. Isoenzyme polymorphism in populations of the Mediterranean region and Central California. Theor. Appl. Genet. 41: 79-84, 1971.
- 86) SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochem. J. 61: 629-641, 1955.
- 87) SNYDER, E. & HAMAKER, J.: Inheritance of peroxidase isozymes in needles of loblolly and longleaf pines. Silvae Genetica 27 (3-4): 125-129, 1978.
- 88) 田島正啓: ヒノキの自殖に関する遺伝学的研究. 九大演報, 51: 39-124, 1978.
- 89) 田伏岩夫: 酵素反応機構. 307 pp. 学会出版センター, 東京, 1977.
- 90) TUCKER, G. & EMMINGHAM, W.: Morphological change in leaves of residual western hemlock after clear and shelterwood cutting. For. Sci. 23 (2): 195-203, 1977.
- 91) TUCKER, J.: Studies in the *Quercus undulata* complex. III. The contribution of *Q. arizonica*. Amer. J. Bot. 50: 699-708, 1963.
- 92) VANCE, C., ANDERSON, J. & SHERWOOD, R.: Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. Plant Physiol. 57: 920-922, 1976.
- 93) WITTER, M. & FERET, P.: Inheritance of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes in Virginia pine megagametophytes. Silvae Genetica 27 (3-4): 129-134, 1978.
- 94) WITTER, M. & FERET, P.: Inheritance of esterase and acid phosphatase isozymes in Virginia pine and the application of the isozyme technique to a seed orchard population. Silvae Genetica 28 (5-6): 213-220, 1979.
- 95) WRIGHT, J.: Genetic variation among 140 half-sib scotch pine families derived from 9 stands. Silvae Genetica 12 (3): 83-89, 1963.
- 96) YADAVA, J., CHOWDHURY, J., KAKAR, S. & NAINAWATEE, H.: Comparative electrophoretic studies of proteins and enzymes of some *Brassica* species. Theor. Appl. Genet. 54: 89-91, 1979.
- 97) 山根八重子: ミズナラの育種について. 昭和50年度林木育種研究発表会講演集: 27-30, 1975.
- 98) YANG, J., CHING, T. & CHING, K.: Isoenzyme variation of coastal Douglas-fir. I. A study of geographic variation in three enzyme systems. Silvae Genetica 26 (1): 10-18, 1977.

Summary

In the present study, the isozymes and the morphological characters of leaves were investigated to determine the geographical variations of mizunara oak (*Quercus mongolica* FISCH. var. *grosseserrata* REHD. et WILS.). For isozyme, suitable enzyme system to this study, sampling position of leaves and sampling period were also investigated. The results are summarized as follows.

1. Peroxidase, esterase, acid phosphatase and alkaline phosphatase in leaves of mizunara oak were investigated with starch gel electrophoresis. From four enzyme systems, the isozyme bands of peroxidase were observed and their isozyme patterns were polymorphic. Therefore, it was found that the isozymes of peroxidase were suitable to the genetic studies of mizunara oak.

2. The difference between samples for electrophoresis collected from the upper parts (about 8 m in height) and the lower parts (about 3 m in height) of crowns of trees were studied. It was found that no special care needed to be used in sampling position, because the isozyme patterns of peroxidase were constant in the parts of crown.

3. The isozyme patterns of peroxidase were observed continually from the beginning of July to the end of September. Leaves for electrophoresis should be collected this period.

4. Leaves of mizunara oak were collected from 21 stands in Hokkaido. Geographical variations of isozymes and leaf characters were studied. Taking the consideration of variation of isozymes and location of stands, these stands were classified into four stand groups. Stand group I was located in the south-western peninsula, stand group II in the central part, stand group III in the eastern part, and stand group IV in the northern part of Hokkaido.

5. The variation in isozyme patterns measured from several viewpoints was always greatest in stand group II, and thus, on an assumption that the greatest genetic variation would be found in the center of propagation of the species, a center of propagation of mizunara oak in Hokkaido was presumed to be around the central part of Hokkaido or the neighborhood of Sapporo district.

6. On the basis of comparison among stand groups of variation of isozymes, stand group II had probably migrated to other districts by three routes. One of those routes might have been toward Oshima peninsula as a small size population, which has been suggested by the so-called "founder principle". The second route might have been toward the eastern part of Hokkaido. The migration in that case might have occurred with a large size population involving great amount of genetic variation. The remaining route might have been from the center toward the northern part of Hokkaido, and the genetic variation have been decreasing gradually on the way to the north.

7. For four morphological characters of leaf — petiole length, ratio of petiole length to leaf length, number of primary teeth, number of primary teeth per 100 mm, the variations were compared among four stand groups. The result showed that the stand group which had the greatest variation in each character was random among four stand groups. The tendency in common variation of morphological characters and variations of isozymes was also not found.

8. No morphological character in leaves might be suitable for study of distributional varia-

tion, because the repeatabilities of these characters were low.

9. There were geographic clines in ~~these~~ morphological characters. It might not be caused by the introgression, but by the latitudinal or ecological variations.