

博士論文

植物個体群の維持機構と遺伝子流動 に関する集団生物学的研究

Population Biological Study of Plant Regeneration and Gene Flow

2002年3月

広島大学大学院国際協力研究科

亀山慶晃

広島大学大学院国際協力研究科

論文名: 植物個体群の維持機構と遺伝子流動に関する集団生物学的研究

学位の名称: 学術博士


学生番号: D1155005

氏名: 亀山慶晃


2002年 2月 14日

審査委員会


委員長・教授

中越信和 


教授

石橋昇 


助教授

井鷲裕司 

生物圏科学研究科教授


堀越孝雄 

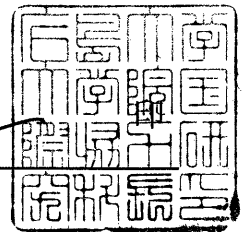
生物圏科学研究科教授

桜井直樹 

2002年 2月 / 日

研究科長

中山修 



目次

第 I 章 序論

I-1	はじめに.....	1
I-2	従来の遺伝子流動の測定方法と問題点.....	2
	II-2-1 種子, 花粉の追跡.....	2
	II-2-2 分子マーカーの利用.....	3
I-3	マイクロサテライト遺伝マーカーについて.....	5
I-4	研究の目的.....	6
I-5	対象種と調査地の選定.....	7
	I-5-1 対象種.....	7
	I-5-2 調査地.....	8
I-6	論文の構成.....	9

第 II 章 実生のセーフサイト

II-1	はじめに.....	13
II-2	方法.....	13
	II-2-1 実生, 成木の定義.....	13
	II-2-2 セーフサイトの検証.....	14
II-3	結果.....	15
II-4	考察.....	17

第 III 章 花粉の散布パターン

III-1	はじめに.....	33
III-2	方法.....	34
	III-2-1 野外調査.....	34
	III-2-2 実験方法.....	35
	III-2-2-1 DNA の抽出.....	35
	III-2-2-2 PCR 法によるマイクロサテライト部位の増幅.....	36
	III-2-2-3 電気泳動と遺伝子型の特定.....	37

III-2-3	父性分析.....	37
III-3	結果.....	40
III-3-1	各個体の開花パターン.....	40
III-3-2	花粉親の組成.....	40
III-4	考察.....	42
III-4-1	父性分析の信頼性.....	42
III-4-2	花粉の散布パターン.....	43

第 IV 章 実生バンクへの遺伝子流動

IV-1	はじめに.....	53
IV-2	方法.....	55
IV-2-1	野外調査.....	55
IV-2-2	実験.....	55
IV-2-3	親子分析.....	56
IV-3	結果.....	58
IV-3-1	サブ個体群間の遺伝子流動.....	58
IV-3-2	サブ個体群内部における遺伝子流動：距離・樹高の影響....	60
IV-3-3	サブ個体群内部における花粉フロー.....	62
IV-4	考察.....	63
IV-4-1	サブ個体群内部における遺伝子流動.....	63
IV-4-2	サブ個体群内部における花粉散布パターン.....	68
IV-4-3	長距離の遺伝子流動.....	69

第 V 章 血縁構造の形成と維持

V-1	はじめに.....	83
V-2	方法.....	86
V-2-1	野外調査および実験方法.....	86
V-2-2	血縁度の推定.....	86
V-2-3	マンテルテスト.....	90
V-3	結果.....	92

V-3-1	血縁構造の全体像.....	92
V-3-2	血縁構造の階層構造.....	93
V-3-3	サブ個体群内部における血縁構造.....	95
V-4	考察.....	96
第 VI 章 無性生殖と有性生殖 —湿地個体群との比較—		
VI-1	はじめに.....	110
VI-2	方法.....	111
VI-2-1	調査地.....	111
VI-2-2	野外調査.....	111
VI-3	結果.....	113
VI-3-1	林分構造.....	113
VI-3-2	ホンシャクナゲ個体群の構造.....	114
VI-4	考察.....	115
第 VII 章 総合考察		
VII-1	はじめに.....	133
VII-2	種子, 花粉を介した遺伝子流動.....	134
VII-2-1	成木の開花から種子形成まで.....	135
VII-2-2	種子の散布および定着の過程.....	138
VII-2-3	実生バンクへの遺伝子流動.....	141
VII-3	遺伝子流動のパターンと血縁構造の形成.....	144
VII-4	無性生殖による個体群の維持.....	147
	謝辞.....	150
	摘要.....	151
	引用文献.....	156

第1章 序論

1-1 はじめに

ある地域に生育する同種個体の集まりは個体群と呼ばれ、種の具体的な構成単位である。各個体群の内部には、個体群密度の違いからなる空間構造、対立遺伝子や遺伝子型の不連続な分布による遺伝的構造、サイズや年齢の違いによって生じるサイズおよび齢構造など、様々な構造が存在する (Silvertown & Doust 1993)。さらに、各個体群は大小の相互作用、即ち個体や遺伝子の移入・移出によって、個体群の集合であるメタ個体群を形成する (Hanski & Simberloff 1997)。

植物個体群の維持機構は生育段階に分けて考えることができる。典型的な種子植物個体群を例に挙げると、散布された種子は埋土種子集団を形成し、環境のふるいにかけられる。発芽した実生集団はいくつかの幼植物段階を経て成熟に至り、開花し、種子をつくる。散布された種子は再び埋土種子集団となり、一連のサイクルが完結する (Harper 1977)。個体群サイズの変化を決定する4つの基本的な個体群統計学的過程は、出生、死亡、移入、移出であり、これらのパラメータは環境の変動や競争者、捕食者の存在、個体群の分布様式など、様々な要因によって大きく変化する。個体群統計学とは、生活環のすべての段階において個体群に見られる様々な変化を量的に調べる研究分野であり、今日まで数多くの研究が行われてきた。

しかしながら、植物個体群の構成員を個体ではなく遺伝子として捉えたとき、野外調査や実験に基づいた従来の研究手法だけでは個体群の維持機構を正確に把握することは極めて困難であった。例えば、花粉による個体間の遺伝的交流はどの程度あるのか、結実した種子はどこまで散布されるのか、林床に定着した実生はどの個体に由来するものなのか、個体間の血縁関係はどのくらいなのか、といった問題は、これまで有効な解析手法が無く、ほとん

ど明らかになっていない。本研究の目的は、野外でのデータ採取に加えて、最新の分子マーカーであるマイクロサテライト遺伝マーカーを用いることによって、種子・花粉の散布および定着の過程、即ち遺伝子流動を正確に把握し、植物個体群の更新過程や遺伝的構造の形成プロセスを明らかにすることである。まず初めに、従来の遺伝子流動の測定方法とその問題点についてまとめてみたい。

1-2 従来の遺伝子流動の測定方法と問題点

1-2-1 種子、花粉の追跡

遺伝子流動を推定する最も一般的な方法は、散布された種子や花粉を直接または間接的に追跡することである (Adams 1992; Ellstrand 1992)。種子散布は、風散であれば母樹の周辺にシードトラップを設置し、各距離における種子数を求めることによって、動物散布の場合には動物の行動を追跡することによって推定できる (Levin & Kerster 1974)。同様に、花粉の散布パターンは花粉媒介者の探索行動 (Schmitt 1980; Handel 1983; Hamrick 1987)、あるいはマーキングを施した花粉や花粉類似の色素粒子を追跡 (Thomson *et al.* 1986; Waser 1988; Campbell & Waser 1989) することで推定できる。これら数多くの研究によって、大部分の種子、花粉の散布距離は限られており、散布数は距離とともに指数関数的に減少すること、一般に種子散布は花粉散布よりも限られていることなどが明らかになった (Levin & Kerster 1968; Bos *et al.* 1986)。

しかしながら、これらの方法で推定された種子・花粉の散布パターンと実際の遺伝子流動とは、様々な理由によって大きく異なっている (Levin 1981; Handel 1983; Hamrick & Schnabel 1985)。例えば、花粉媒介者の行動から花粉の散布パターンを推定する際には、ある花で媒介者に付着した全てもしくは大部分の花粉が、次に訪れた花に付着することが前提となる。従って、花粉が複数の花に持ち越される場合、媒介者の行動から推定された花粉の散布距

離は実際よりも過小に評価されることになる (Schaal 1980; Thomson & Plowright 1980; Marshall & Ellstrand 1985; Adams 1992). さらに、遺伝子流動とは散布された花粉が受粉し、稔性のある種子となり、周辺に散布され、発芽した後、個体として定着するまでのプロセス全てを含めた概念である。野外個体群では花粉間競争や近交弱勢、発芽サイトの有無や被食による死亡など、種子・花粉の散布前後に様々な生態学的、遺伝学的な要因が働くため、遺伝子の散布パターンと遺伝子流動とは大きく異なっている (Levin 1981; Marshall 1988; Waser 1989; Young & Stanton 1989). 従って、遺伝子流動を正確に推定するには分子マーカーの利用が不可欠といえる。

1-2-2 分子マーカーの利用

分子マーカーを用いた遺伝子流動の推定方法は、大きく2つに分けられる。一つは集団の遺伝的構造に基づき、世代当たりの平均的な遺伝子流動の値を推定する方法、もう一つは個体の遺伝子型を比較することによって、実生の両親や花粉親を特定する方法である。

集団の遺伝構造から遺伝子流動を推定するには、特定の状態を仮定した理論的なモデルが必要である (Sork *et al.* 1999). 最も広く用いられているライトの島モデル (Wright 1969) では、突然変異が十分に小さな場合、遺伝的浮動による集団分化を促進する力と、遺伝子流動によるそれを妨げる力とが平衡状態にあると仮定し、さらに遺伝子流動や個体群サイズは一定で、時間や空間によって変化しないと考える。このモデルでは、個体群間の距離に関わらず遺伝子流動は常に等しいと仮定しているため、現実的とは言えない。遺伝子は世代ごとに隣接する個体群のみを移動すると仮定したステップングストーン (飛び石) モデル (Kimura & Weiss 1964) や、遺伝子流動の量は地理的な距離と共に減少するとした *isolation-by-distance* モデル (Wright 1969) は空間情報を取り入れたモデルであり、より現実に近いと考えられる。しかし、

これらいずれのモデルを用いたとしても、推定された遺伝子流動の値は長時間に渡って形成された個体群の遺伝的組成に基づいたものであり、現存集団における今現在の遺伝子流動の量やパターンを直接反映するものではない (Sork *et al.* 1999).

理論的なモデルによらず、個体の遺伝子型を比較することによって実生の両親や花粉親を特定する方法は、現存集団における種子や花粉の動きを直接推定できるという点で有利である。例えば、ある母樹から種子を採取し、種子、母樹、および周辺に生育する全ての花粉親候補の遺伝子型を特定すれば、それらを比較することによって花粉親を推定でき、どの個体からどの程度花粉が供給されているのかを明らかにできる (父性分析, *paternity analysis*)。同様に、林床に定着した実生であっても、実生の遺伝子型と周辺の成木集団の遺伝子型とを比較することによって、実生の両親を推定することができる (親子分析, *parentage analysis*)。

植物個体群への分子マーカーの応用は、1960年代に電気泳動と酵素の活性染色を組み合わせた多型の検出技術、即ちアロザイム分析の手法 (Markert & Møller 1959) が確立されたことに始まる。アロザイム分析は大量のサンプルを比較的 low cost で解析できるため、植物の交配様式や遺伝的構造、遺伝子流動の推定など、数多くの研究に用いられてきた。しかし、アロザイムマーカーは利用できる遺伝子座、および各遺伝子座における対立遺伝子の数が少ないために、親子分析 (Meagher & Thompson 1987; Schnabel & Hamrick 1995) や父性分析 (Godt & Hamrick 1993; Broyles *et al.* 1994; Schnabel & Hamrick 1995) をおこなう場合、極めて多くの候補が残ってしまうという欠点があった。そのため、これらの研究では複数の親候補の中から親である確率が最も高いものを選択する方法 (*most-likely method*) や、複数の親候補に親である確率を割り振っていく方法 (*fractional paternity method*) などが用いられてきた (Adams 1992)。しかし、統計的手法を用いたとしても、方形区外からの遺

伝子流動を方形区内のものとして認識してしまう確率 (cryptic gene flow) が極めて高く (Ouborg *et al.* 1999), 推定される遺伝子流動のパターンも信頼できるとは言えなかった。

本研究で用いたマイクロサテライト遺伝マーカーは、対立遺伝子数や分析可能な遺伝子座数が非常に多いこと、バンドパターンの違いを明確に区別できることなど、様々な利点を持っている。次にマイクロサテライト遺伝マーカーの特徴とその利点をまとめてみたい。

1-3 マイクロサテライト遺伝マーカーについて

マイクロサテライトとは、DNA を構成する4つの塩基 (G, A, T, C) が、(CA) や (AGC) といった1~5塩基からなる単純なモチーフをつくり、連続した反復配列を形成している場所のことである。マイクロサテライトは真核生物のゲノム中に広く分布しており、反復数が極めて変異に富んでいること、メンデル遺伝に従うことなどが分かっている (Bruford & Wayne 1993; Queller *et al.* 1993; Ashley & Dow 1994)。マイクロサテライト部位の対立遺伝子は、モチーフの反復数の違い、即ち DNA の長さの違いとして認識され、PCR によるマイクロサテライト部位の特異的増幅と電気泳動によって検出することができる。マイクロサテライトの対立遺伝子数は遺伝子座あたり数個から数十個と極めて多く、アロザイムマーカーのヘテロ接合度が 0.15 程度であるのに対して、マイクロサテライトマーカーでは多くの遺伝子座で 0.5 以上 (Jarne & Lagoda 1996)、ヒトゲノム中の AC リピートを 5,264 座位にわたって調べた例では平均 0.7 (Dib *et al.* 1996) と大きな値を示すことが知られている (井鷲 2001)。さらに、対立遺伝子がたがいに共優性であること、各遺伝子座を PCR で特異的に増幅するため、劣化した微量のサンプルでも解析できること、対立遺伝子を明確に判別できることなど、特に親子分析や父性分析、血縁度の推定に適したマーカーである。しかしながら、マーカーそのものを開発する

ために数ヶ月程度の時間を要するため、野外集団、特に植物個体群への応用は遅れていた。個体群の動態や更新過程に興味を持つ多くの研究者にとって、DNA の抽出、制限酵素処理、ベクターへのライゲーション、形質転換、スクリーニング、陽性クローンのシーケンシング、PCR プライマーの設計と有効性のチェックという一連のマーカー開発作業は容易ではなく、多額の初期投資も必要である。しかし、近年様々な生物を対象にマイクロサテライトマーカーの開発が進んでいること、近縁種に関しては共通のマーカーが利用できる場合が多いこと (Bruford *et al.* 1996) などから、マーカー開発をすることなく、目的とする種の遺伝解析を行うことが可能になりつつある。今後、マイクロサテライトマーカーを用いた研究が増加することは間違いなく、マーカーの開発や遺伝解析にとどまらず、様々な野外データ、実験データを組み込んだ総合的な研究が求められていると言えるだろう。

1-4 研究の目的

植物個体群の維持機構を明らかにする上で、種子・花粉の散布および定着の過程、即ち遺伝子流動を推定することは極めて重要な意味を持っている。マイクロサテライト遺伝マーカーの出現によって父性分析、親子分析の精度が飛躍的に向上し、野外集団の遺伝子流動を正確に推定できるようになったが、実際にこのような研究を行い、個体群の維持機構を明らかにした例はほとんどない。本研究の目的は、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた遺伝分析とフィールドでのデータ採取の両面から、植物個体群の維持機構を明らかにすることである。特に、開花個体間の花粉の散布パターン、結実個体から実生バンクへの遺伝子の供給プロセス、種子の発芽・定着に適したセーフサイトの条件、集団内部および集団間の血縁構造の形成、といった問題を明らかにする。

従来、個体群統計学的研究の多くは、個体群内部の均質性と独立性を仮定

していた。しかし、先に述べたとおり、個体群内部には空間構造、遺伝構造、サイズや年齢構造など、様々な構造が存在する。また、各個体群は遺伝子の移入、移出によって大小の相互作用を保ち、全体として一つのメタ個体群を形成している。本研究では、構造の異なる複数のサブ個体群を対象として、各サブ個体群における遺伝子流動のパターン、サブ個体群間の遺伝的交流の有無、サブ個体群内部およびサブ個体群間の遺伝的構造の形成プロセスについて明らかにする。

1-5 対象種と調査地の選定

1-5-1 対象種

本研究の対象種として、ツツジ科ツツジ属の常緑亜高木、ホンシャクナゲ (*Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai) を選んだ。ツツジ属はアジアで最も種数が多く、ホンシャクナゲが属しているシャクナゲ亜属はヒマラヤから中国大陸南部の山岳地帯で極めて多様な種を分化させている。日本列島には北方系のキバナシャクナゲ、ハクサンシャクナゲ、南方系のヤクシマシャクナゲ、ツクシシャクナゲ、アズマシャクナゲ、エシユウシャクナゲの計6種のシャクナゲが分布しているが、それぞれ特徴的な生育環境と地理的分布を有しており、異なる種が同じ場所に見られることはめったにない (堀田 1995)。

ホンシャクナゲはツクシシャクナゲの変種とされ、本州の中部地方以西および四国北部の尾根筋や溪谷の岩盤、湿地周辺などに分布している。ハビタツトの特異性から、個体群は帯状、あるいはパッチ状の分布形態を示すことが多く、各個体群の林床には実生バンクが形成されている。開花時期は5月中旬で、花粉はトラマルハナバチ (*Bombus diversus diversus* Smith) やコマルハナバチ (*Bombus ardens ardens* Smith) によって媒介される。サブ個体群の形成、実生バンクの維持、昆虫による花粉の媒介、といった本種の生態学的

特性は、多くの植物に一般的にみられ、かつ遺伝子流動のパターンを決定する重要な要因であると考えられる。

1-5-2 調査地

ホンシャクナゲが広範囲に渡って生育していること、破滅の危惧のある群落としてレッドデータブック（環境庁 1996）にも記載されていることなどから、広島県中部、広島市白木町の鎌倉寺山（標高 613m）周辺を調査地として選定した（Fig. I-1）。一帯は深層に達する黒雲母花崗岩からなり、風化されやすい地質になっている。鎌倉寺山山頂から南西に伸びる尾根は急峻で、各所で花崗岩が露出している。尾根の北側斜面には複数のホンシャクナゲ個体群が分布しており、アカマツコバノミツバツジ群集のツクシシャクナゲ群（正確にはホンシャクナゲ群）に区分される（渡辺 1976）。鎌倉寺山の南東には準平原化したなだらかな山塊があり、ホンシャクナゲは小さな谷や湿原の周りに生育している。特に、福富町竹仁地区のクロボヤ峡（Fig. I-1）には湿原を取り囲むように大規模なホンシャクナゲ群落が形成されており、昭和 26 年に広島県の天然記念物に指定されている。鎌倉寺山から南へ 13km ほど離れた東広島市（標高 220m）における 1988 年から 1997 年の年平均降水量は 1512.2mm、年平均気温は 12.1℃である。

本研究の調査は、第 VI 章を除いて、全て鎌倉寺山山頂付近に設置した 150 m × 70 m の方形区内で行った（Fig. I-2）。方形区を東西に横切る主稜線からは、北西に 3 本の支尾根が伸びている。ホンシャクナゲは支尾根の北側斜面に帯状に分布しており、サブ個体群 A1, A2, A3 を形成している。各サブ個体群は方形区の北側にも支尾根に沿って不連続に分布しており、方形区の東側 20 m には別のサブ個体群がある。方形区の西側および南側は、数百メートルに渡ってホンシャクナゲは生育していない。各サブ個体群の林床に 10 m × 10 m のプロット（plot S1, S2, S3）を設置し、親子分析の際、実生をサンプリングす

るために用いた。また、plot S3 では実生のセーフサイトについて検討をおこなった。

第 VI 章では、上記の 150 m×70 m の方形区から東へ 200 m ほど離れた場所、および鎌倉寺山から南東に 1.5 km ほどはなれた福富町のクロボヤ峡に 10 m×10 m のプロットを 1 つずつ設置し、山地個体群と湿地周辺の個体群における個体群構造や更新様式の違いについて検討した。それらの方形区の詳細については第 VI 章に記載している。

1-6 論文の構成

本論文は全 7 章からなり、本章以下の構成は次の通りである。

第 II 章では、ホンシャクナゲ実生のセーフサイトを明らかにするため、地表面の状態と林冠条件に着目して plot S3 を 12 に区分し、各サイトにおける実生の個体群密度を算出した。また、実生の生存、枯死、生長、新規加入を 2 年間追跡し、どのようなサイトが実生の定着、生存に有利なのかを明らかにした。

第 III 章では、開花時期、開花数の違いに着目して 4 個体の母樹から 5 つの果実 (216 個の種子) を採取し、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析によってそれらの花粉親を特定した。これにより、マイクロサテライト遺伝マーカーの有効性を示すとともに、各果実の花粉がどのような個体に由来しているのか、花粉散布距離や自殖率はどのくらいなのかといった問題を明らかにした。

第 IV 章では、各サブ個体群の林床に設置した 10 m×10 m のプロット (S1, S2, S3) から 70 個体ずつ、計 210 個体の実生をランダムにサンプリングし、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析によって、実生の両親を特定した。これにより、種子・花粉を介した実生バンクへの遺伝子流動の量およびパターンを明らかにするとともに、個体群構造の違いが遺伝子流動に及ぼ

す影響について考察した。

第 V 章では、各個体の遺伝子型に基づいて個体間の血縁度を推定し、ホンシャクナゲ個体群における遺伝的構造の有無を検証した。さらに、各サブ個体群の遺伝的構造を比較することにより、どのような要因が遺伝的構造の有無や強弱を決定しているのかを検証した。

第 VI 章では、湿地周辺の個体群についても調査をおこない、鎌倉寺山に分布する山地個体群との相違点、共通点を明らかにするとともに、それらを決定している要因と、それらがホンシャクナゲ個体群の動態に及ぼす影響について考察した。

第 VII 章では、各章の結果に基づいてホンシャクナゲ個体群の維持機構について総合的な議論をおこない、植物個体群の維持機構と遺伝子流動について総括した。

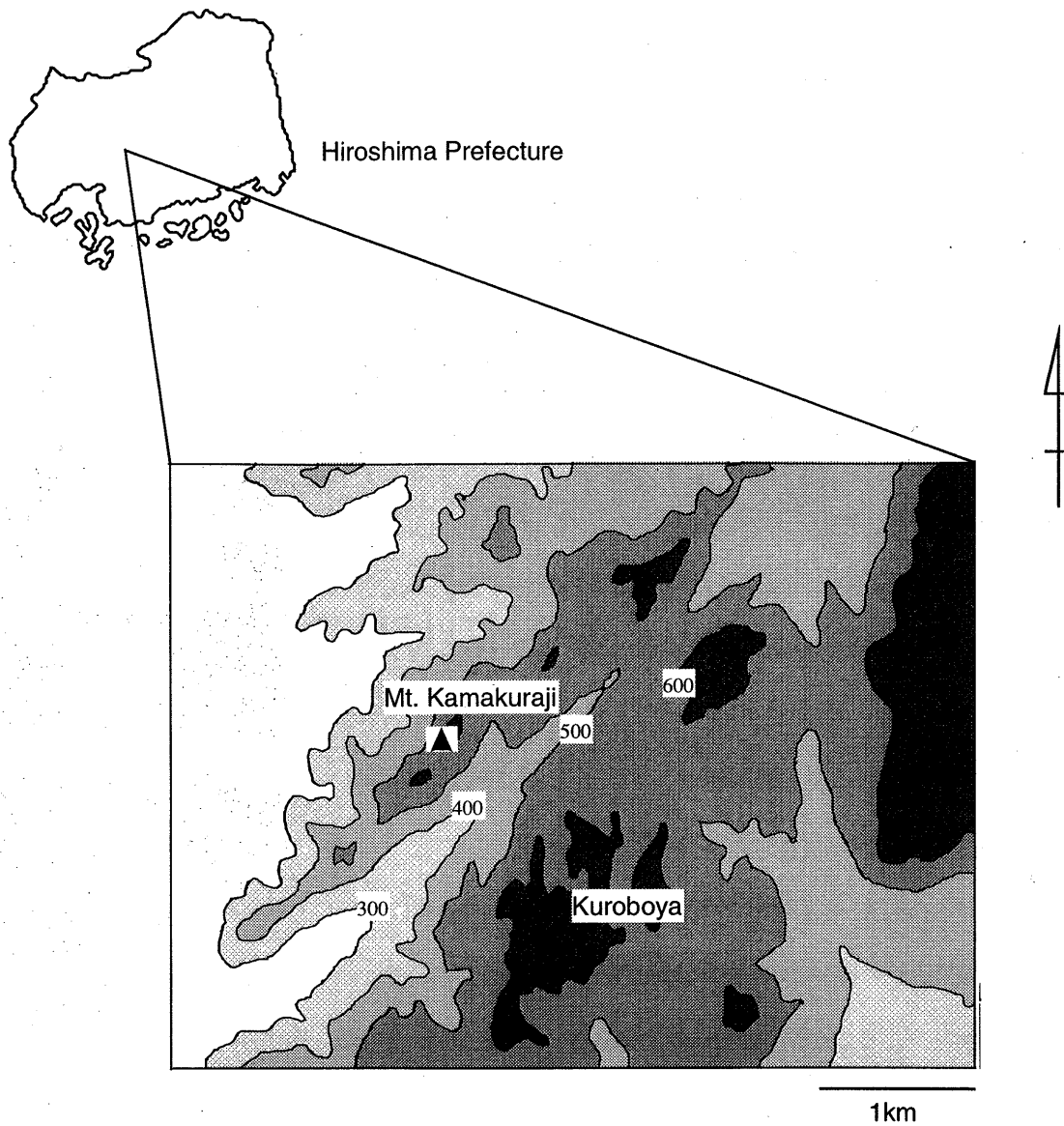


Fig. I-1. Map of study site. Several local populations of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai were found in this region: 1) along the north slope of the steep ridges in Mt. Kamakuraji and 2) in a mesic valley at Kuroboya, Hiroshima Prefecture, Japan.

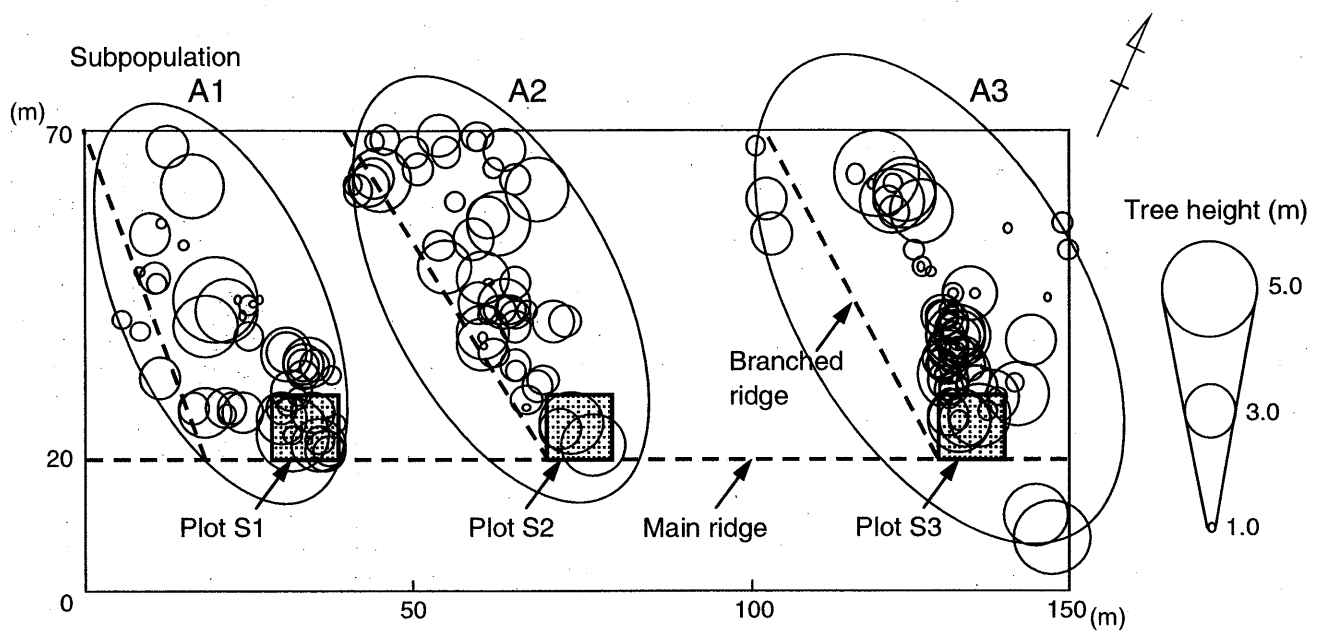


Fig. I-2. Map of the study quadrat near the top of Mt. Kamakuraji. Three stripe-shaped subpopulations of *Rhododendron metternichii* (A1, A2, A3) grew along the northern slopes of branch ridges off the main ridge. Each subpopulation continued intermittently along the branch ridges beyond the northern boundary of the quadrat. The southern and western sides of the quadrat were isolated by several hundred meters from other *R. metternichii* populations. Small plots with 10 m \times 10 m areas (S1, S2, S3) were set on the forest floor of each subpopulation.

第 II 章 実生のセーフサイト

II-1 はじめに

物理的・生物的な要因によって植物の生育環境はモザイク状に細分化されている。例えば、倒木 (Christy & Mack 1984; Harmon & Franklin 1989), 林冠ギャップ (Runke 1981; Yamamoto 1996), 根返りによって生じた裸地 (Nakashizuka 1989), 地表面の微地形 (Harper *et al.* 1965; Hamrick & Lee 1987), 蘚苔類 (Johnson & Thomas 1978, Sohlberg & Bliss 1987; Nakamura 1992), 落葉 (Facelli & Pickett 1991; Facelli 1994) などは林床を構成する重要なマイクロサイトであり, これらの時間的, 空間的变化は, 植物個体群の更新過程に大きな影響を及ぼしている。特に, 種子の発芽に適した場所はセーフサイトと呼ばれており, セーフサイトの存在は実生集団の成立にとって極めて重要な意味を持っている (Harper 1977)。発芽条件を決定する環境要因については実験的手法を用いて様々な研究が行われているものの (Harper 1977), 野外集団を対象として実生のセーフサイトを明らかにした例はほとんど無い。

本研究の目的は, 野外におけるホンシャクナゲの実生およびマイクロサイトの分布状況から実生のセーフサイトを明らかにすることである。マイクロサイトの区分は地表面の状態と林冠条件を個々のレイヤーに投影し, 重ね合わせるによって行った。さらに, 区分したマイクロサイトを実生の分布図と重ね合わせることで, 各サイトにおける実生の個体群密度を算出し, どのような条件が実生の発芽・定着に適しているのかを明らかにした。

II-2 方法

II-2-1 実生, 成木の定義

ホンシャクナゲの成木と実生について定義するため, 鎌倉寺山に設置した 150 m×70 m の方形区内 (Fig. I-2) に生育する高さ 10 cm 以上のホンシャク

ナゲ 148 個体を対象として，過去の開花経験の有無を調査した．ホンシャクナゲの花柄は開花後も数年間は残っているため，花柄の有無から過去の開花経験を推察することができる．その結果，高さ 150 cm 以上のホンシャクナゲ 37 個体のうち 36 個体に開花経験があり，高さ 50 cm 未満の個体は全く開花経験が無かった (Fig. II-1)．また，高さ 50 cm 以上，150 cm 未満のホンシャクナゲ 33 個体のうち，19 個体については開花経験が認められた．この調査結果に基づき，ホンシャクナゲの実生は，開花能力が認められなかった高さ 50 cm 未満の個体と定義した．

II-2-2 セーフサイトの検証

150 m×70 m の方形区内に設置した 10 m×10 m のプロット S3 (Fig. I-2) において，詳細な地形図を作成するとともに，根際直径 0.5 mm 以上の全てのホンシャクナゲの樹高を測定し，地図上に位置を記録した (Fig. II-2)．方形区内の等高線は，1 m 間隔で設置した格子点 (計 121 地点) でレベル測量をおこない，ソフトウェア SYSTAT 5.2 を用いて決定した．林分構造を把握するため，樹高 3.5 m 以上の全ての樹木を対象に胸高直径の測定をおこなった．さらに，全てのホンシャクナゲ成木および樹高 3.5 m 以上の樹木を対象に樹冠投影図を作成し，プロット内の林冠条件を決定した．林冠条件は，ホンシャクナゲ，常緑樹，落葉樹，上部開放の 4 つに区分し，複数の樹冠が重なっている場合には，ホンシャクナゲ，常緑樹，落葉樹の優占順位で林冠を決定した (Fig. II-3)．地表面の状態は，岩盤，蘚苔類，土壌の 3 つに区分した (Fig. II-3)．4 つの林冠条件および 3 つの地表面の状態から，プロット内のマイクロサイトは 12 に区分することができる．各サイトの面積はパソコンに取り込んだ画像データから NIH Image (アメリカ国立衛生研究所，<http://rsb.nih.gov/nih-image/>) を用いて算出した．実生の位置，各サイトの区分ともにデジタルデータとなっているため，理論的には，両者をパソコン上で重ね合わせることによって

各実生がどのようなサイトに生育しているのかを明らかにできる。しかし、蘚苔類のパッチは極めて小さく、それらを正確に地図上に再現し、実生の分布と重ね合わせることは不可能である。従って、各実生の生育している地表面の状態は、フィールド調査に基づいて区分することとした。

これらの調査は全て 1996 年の秋に行い、2 年後の 1998 年秋に実生の樹高、地表面の状態および新規加入個体の数を調査した。1996 年に確認された実生のうち、125 個体については、第 IV 章で述べる遺伝解析のために葉のサンプリングを行ったため、2 年間の生存率および生長量に関する解析はこれらの個体を除いて行った。また、2 年間で地表面の状態が変化していた 38 個体の実生についても、生長量の解析から除外した。地表面の状態と死亡率との関係については、1996 年の状態に基づいて解析をおこなった。

II - 3 結果

プロット内に生育する高さ 3.5 m 以上の樹木は 14 種、41 個体、基底面積合計は 1683.6 cm²/100m²であった (Table II-1)。最も優占していた常緑樹はヤマグルマ (*Trochodendron aralioides* Sieb. et Zucc) とソヨゴ (*Ilex pedunculosa* Miq.) で、全基底面積の 37.4%を占めていた。落葉樹ではネジキ (*Lyonia ovalifolia* (Wall.) Drude var. *elliptica* (Sieb. et Zucc) Hand.-Mazz.) が優占しており、全基底面積の 18.8%を占めていた。個体数、基底面積ともに、これら 3 種だけで全体の半分程度を占めていた。また、プロット内で確認された蘚苔類は、ナガヒツジゴケ (*Brachythecium buchananii* (Hook.) Jaeg.)、カモジゴケ (*Dicranum scoparium* Hedw.)、ムチゴケ (*Bazzania pompeana* (Lac.) Mitt.) の 3 種であった。

林冠条件によって区分されたマイクロサイトは、ホンシャクナゲに覆われている面積が全体 (100 m²) の 14.7%、他の常緑樹が 36.6%、落葉樹が 15.0%、上部開放のサイトが 33.6%であった (Table II-2)。地表面の状態は、岩盤が 9.7%、蘚苔類が 12.2%、土壌が 78.1%を占めていた。林冠条件および地表面の状態に

よって 12 に区分された各サイトの面積は、Table II-2 にまとめた通りである。プロット内には 519 個体のホンシャクナゲ実生が生育していた (Fig. II-2) が、このうち 5 個体に関しては樹木の幹に生育していたため、残り 514 個体について各サイトにおける個体数 (Table II-3) および実生の個体群密度 (Table II-4) を算出した。

実生の個体群密度は蘚苔類の存在に強く依存しており、全ての林冠条件において、蘚苔類上の実生密度は土壤上、岩盤上よりも著しく大きかった (χ^2 検定, $P < 0.001$)。また、土壤上、岩盤上の実生の個体群密度は林冠が欠失したサイトで有意に小さく、林冠下で大きな値を示した (χ^2 検定, 土壤: $P < 0.001$, 岩盤: $P < 0.005$, 但し各サイトの期待値が 5 以下となるのを避けるため、ホンシャクナゲと常緑樹は一つのカテゴリーとして扱った) のに対し、蘚苔類上の個体群密度は落葉樹の樹冠下で最も大きく (χ^2 検定, $P < 0.001$)、ついで上部開放、常緑樹、ホンシャクナゲの順になっていた。

実生サイズの違いによるマイクロサイトへの依存性の変化を検証するため、地表面の状態に着目して、各樹高階における実生の定着サイトを比較した (Fig. II-4)。その結果、樹高 0-2 cm の実生の 87.7% は蘚苔類上に生育しており、土壤上に生育していた個体はわずか 2.7% であった。しかし、この傾向は実生サイズの増加とともに徐々に逆転し、高さ 10 cm 以上の個体では蘚苔類上に生育していたのはわずか 6.1% に過ぎず、81.8% が土壤上に生育していた。生育段階初期における蘚苔類への依存性は、2 年後 (1998 年) の新規加入個体の調査でも示された (Table II-5)。新たに加入した 16 個体の実生のうち、15 個体が蘚苔類上に生育していたのに対し、土壤上、岩盤上に生育していた個体はそれぞれ 1 個体、0 個体であった。

各サイトにおける枯死率の違いは、葉のサンプリングを行った個体を除く、計 393 個体を対象に解析した (Table II-6a)。2 年間の調査期間中に枯死した 44 個体の実生のうち、土壤上に生育していたものは 17 個体 (17%)、蘚苔類上

に生育していたものは26個体(9.8%)であった(Table II-6b)。蘚苔類上の個体の方が土壌上の個体よりも死亡率が低い傾向を示したが、有意差は認められなかった(χ^2 検定, $P = 0.076$)。また、2年間の樹高生長量を算出した結果、いずれのサイトにおいても大部分の実生は0-0.5 cmしか生長しておらず、1 cm以上生長していたのは、全体の6.9%であった(Fig. II-5)。蘚苔類上の個体と土壌上の個体との間で、生長量に有意差は認められなかった(Mann-Whitney U -test, $P > 0.10$)。

2年間の調査期間中、38個体の実生に関しては、生育している地表面の状態そのものに変化がみられた(Table II-7)。その内訳は、蘚苔類から土壌へ変化したものが最も多く25個体、蘚苔類から岩盤への変化が3個体、土壌から蘚苔類、岩盤から土壌への変化はそれぞれ5個体であった。蘚苔類から土壌への変化は、土壌から蘚苔類への変化よりも、より頻繁に起きていることが確認された(χ^2 検定, $P = 0.037$)。

II-4 考察

蘚苔類の存在は植物の発芽、定着に大きな影響を及ぼす(During & Van Tooren 1990)。いくつかの森林(Nakamura 1987)、砂漠(St. Clair *et al.* 1984)などでは、蘚苔類によって実生の定着が促進されることが知られているが、草原(Keizer *et al.* 1985)、森林(Perttula 1941)、ヒース(Clément & Touffet 1981; Mallik *et al.* 1984)、荒野(Johnson & Thomas 1978)などでは、蘚苔類によって実生の定着が抑制されている例も報告されている。

ホンシャクナゲ実生の定着は蘚苔類の存在に強く依存しており、実生の個体群密度は蘚苔類上で著しく大きく、土壌上で小さな値を示していた。林冠条件の違いは土壌条件ほど明瞭な影響を及ぼしていなかったが、土壌上、岩盤上の個体群密度は林冠の欠失したサイトで有意に小さな値を示した。一方、蘚苔類が存在するサイトでは、実生の個体群密度は落葉樹の樹冠下で最も大

大きく、上部開放、常緑樹、ホンシャクナゲの順に小さくなっていた。

蘚苔類は土壤水分の消失 (Van Tooren *et al.* 1985) や土壤温度の変動 (Richardson 1958) を抑制することが知られている。ホンシャクナゲ実生の定着が蘚苔類によって促進されているのは、蘚苔類に覆われていない土壤では地表面の状態が不安定で、種子・実生が埋没する確率が高いこと、土壤水分の蒸発による乾燥の影響を受けやすいことなどが原因として考えられる。ホンシャクナゲ実生の個体群密度は、「蘚苔類-落葉樹」、「蘚苔類-上部開放」のサイトで極めて大きく、「土壤-上部開放」、「岩盤-上部開放」のサイトで最も小さな値を示していた。この結果は、「蘚苔類-落葉樹」、「蘚苔類-上部開放」のサイトでは、蘚苔類による土壤水分の維持と林冠からの光によってホンシャクナゲ実生の発芽、定着に最適な条件が揃っていること、蘚苔類が生育せず、上部の林冠が欠失したサイトでは乾燥による負の効果が強まり、実生が定着できないことを示唆している。

Hieracium piloselloides の実生の生存率は、裸地よりも蘚苔類で覆われたサイトで有意に高いことが報告されている (Johnson & Thomas 1978)。彼らは、蘚苔類の下では土壤水分条件が適度に保たれており、実生の死亡要因は主として乾燥であると結論づけている。一方、発達した蘚苔類は、種子を乾燥させ、発芽を抑制すること、幼根が地表に到達するのを阻害し、枯死させることが知られている (Van Tooren 1988; Nakamura 1992)。Cross (1981) によると、*Rhododendron ponticum* の実生の定着は、高さ 1 cm 以下の蘚苔類に強く依存しており、蘚苔類が存在しない場合、高さ 1cm を越える蘚苔類が生育する場合のいずれも、実生の定着は著しく妨げられた。本研究において、プロット内に生育していた蘚苔類はナガヒツジゴケ、カモジゴケ、ムチゴケの 3 種であり、いずれも高さ 1 cm を越える事はなく、実生の定着に有利に働いているものと考えられる。

ホンシャクナゲの実生は、定着の初期段階では蘚苔類の存在に強く依存し

ているものの、サイズが大きくなるにつれてその傾向は弱まり、樹高 10 cm 以上の実生の 80%以上は土壌上に生育していた。この現象を説明するには、

(1) 蘚苔類上の実生の死亡率が、土壌上の個体より著しく高い、(2) 蘚苔類上の実生の成長率が、土壌上の個体より著しく低い、(3) 実生の土壌条件自体が変化しており、しかも蘚苔類から土壌への変化は逆の変化よりも頻繁に起きている、という3つの仮説が考えられる。2年間の追跡調査によって、蘚苔類上に生育する実生は土壌上の個体より死亡率が若干低いか、両者に違いは無いという結果が得られた。また、生長量に関しても、蘚苔類上の個体と土壌上の個体との間に有意差は認められず、仮説1および2を支持する結果は得られなかった。地表面の状態の変化を追跡した結果、2年間で生育環境が蘚苔類から土壌に変化した実生が25個体、その逆の変化が起きた個体は5個体であり、統計的にも有意差が認められた。この結果は仮説3を支持するものであり、サイズの大きな実生ほど土壌上に生育している割合が増加しているのは、実生が蘚苔類上に定着した後、何らかの原因によって蘚苔類が土壌へと変化するためと推察された。

蘚苔類のマットの存続期間は、基盤の違いに強く依存しており (Herben 1994)、河岸のハビタットで半年から2年 (Kimmerer & Allen 1982)、動物の糞便で3年から5年 (Lloret 1991)、倒木上では数十年 (Jonsson & Esseen 1990) に及ぶ。維管束植物と蘚苔類が共存している他の様々なハビタットにおいて、蘚苔類のマットがどのくらい存続し続けるのかは明らかになっていないが、森林内においては少なくとも数十年は安定であると考えられる。このことは、本研究で示された蘚苔類から土壌への変化は、蘚苔類自体が持っている生得的な現象ではなく、外部からの何らかの力に起因することを示唆している。樹高 5 cm 以上に生長したホンシャクナゲの実生は、5-10cm に達する葉を5枚程度つけている。ホンシャクナゲ実生の葉群による遮光効果は、実生と蘚苔類との間に光をめぐる一方向的な競争をもたらし、蘚苔類の消失を引き起

こしている可能性がある。

ホンシャクナゲの実生は、種子の発芽・定着といった生育段階の初期には、土壌の物理的安定性を高め、水分条件、温度環境を良好に保つ蘚苔類の存在に強く依存している。しかし、生長とともに根茎、葉群を発達させ、環境の変動に対する耐性が獲得されれば、蘚苔類への依存性は低下する。サイズの大きな実生ほど土壌上に生育する割合が増加しているのは、光をめぐる一方向的な競争による蘚苔類の消失と、それと同時に獲得される蘚苔類への依存性の低下によるものと推察された。

Table II-1. Density and basal area of each tree (trees over 3.5 m in height were investigated)

	Density (trees/100m ²)	Relative density (%)	Basal area (cm ² /100m ²)	Relative basal area (%)
<i>Trochodendron aralioides</i>	8	16.3	332.9	19.8
<i>Lyonia ovalifolia</i> var. <i>elliptica</i>	9	18.4	316.0	18.8
<i>Ilex pedunculosa</i>	7	14.3	297.6	17.7
<i>Cleyera japonica</i>	3	6.1	118.4	7.0
<i>Clethra barbinervis</i>	4	8.2	114.7	6.8
<i>Pieris japonica</i>	2	4.1	107.6	6.4
<i>Ilex sugerokii</i> var. <i>longipedunculata</i>	1	2.0	84.2	5.0
<i>Illicium religiosum</i>	3	6.1	69.5	4.1
<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	2	4.1	66.8	4.0
<i>Magnolia salicifolia</i>	3	6.1	53.2	3.2
<i>Quercus glauca</i>	1	2.0	46.3	2.8
<i>Evodiopanax innovans</i>	3	6.1	34.1	2.0
<i>Amelanchier asiatica</i>	2	4.1	27.4	1.6
<i>Fraxinus sieboldiana</i>	1	2.0	14.8	0.9
Total	41	100.0	1683.6	100.0

Table II-2. Areas of microhabitats

Ground conditions (m ²)	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	Canopy conditions (m ²)			Total
		evergreen	deciduous	open	
soil	10.5	29.9	11.8	25.9	78.1
rock	1.0	2.3	1.4	5.0	9.7
moss	3.2	4.4	1.8	2.8	12.2
Total	14.7	36.6	15.0	33.6	100.0

Table II-3. Number of seedlings in each microhabitat

Ground conditions (n)	Canopy conditions (n)			Total	
	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	evergreen	deciduous		open
soil	35	69	32	29	165
rock	6	17	5	11	39
moss	53	107	70	80	310
Total	94	193	107	120	514

Table II-4. Seedling density in each microhabitat

Ground condition (n/m^2)	Canopy conditions (n/m^2)			Total
	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	evergreen	deciduous open	
soil	3.3	2.3	1.1	2.1
rock	6.1	7.4	2.2	4.0
moss	16.5	24.2	29.0	25.5
Total	6.4	5.3	3.6	5.1

Table II-5. Seedling recruitments during two years (1996–1998)

Ground conditions (n)	Canopy conditions (n)			Total
	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	evergreen	deciduous	
soil	0	0	0	1
rock	0	0	0	0
moss	3	7	3	15
Total	3	7	3	16

Table II-6a. Number of seedlings surveyed after two years (1998)

Ground conditions (n)	Canopy conditions (n)			Total	
	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	evergreen	deciduous		open
soil	24	42	20	14	100
rock	6	11	3	9	29
moss	45	91	60	68	264
Total	75	144	83	91	393

Table II-6b. Number of dead seedlings during two years (1996–1998)

Ground conditions (n)	Canopy conditions (n)			Total	
	<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	evergreen	deciduous		open
soil	6	7	3	1	17
rock	1	0	0	0	1
moss	6	9	7	4	26
Total	13	16	10	5	44

Table II-7. Observed changes of ground conditions for seedlings during two years (1996–1998)

Ground conditions in 1996 (<i>n</i>)	Ground conditions in 1998 (<i>n</i>)			Total
	soil	rock	moss	
soil	–	0	5	5
rock	5	–	0	5
moss	25	3	–	28
Total	30	3	5	38

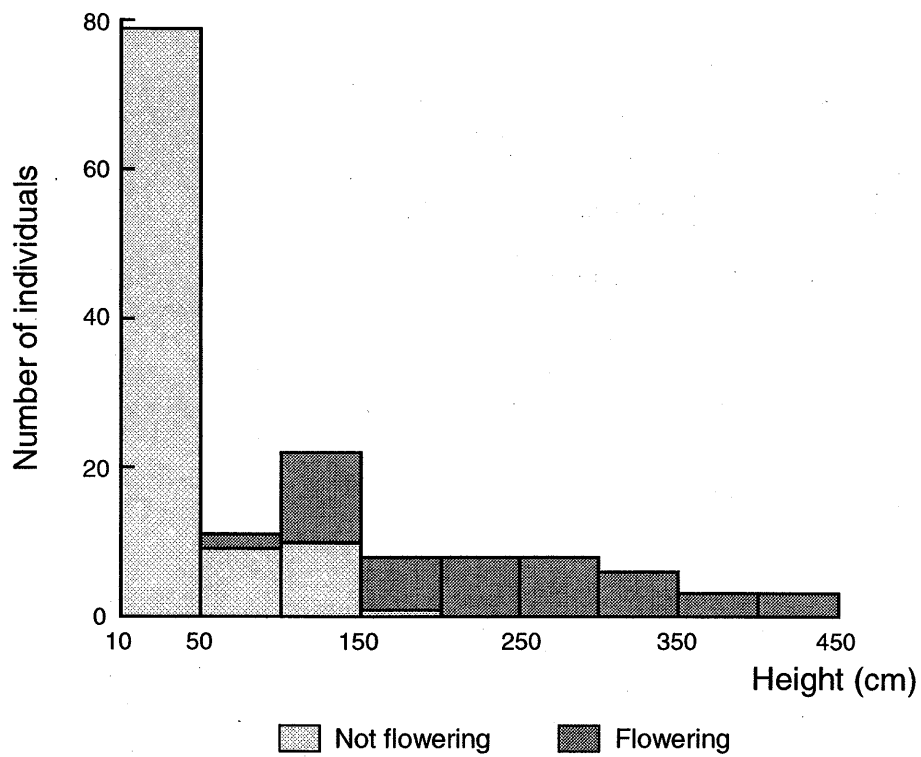


Fig. II-1. Minimum size for flowering in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense*. One hundred and forty-eight individuals over 10 cm in height were investigated. Flowering experiences were judged from the existence of inflorescences which were kept on trees several years after flowering.

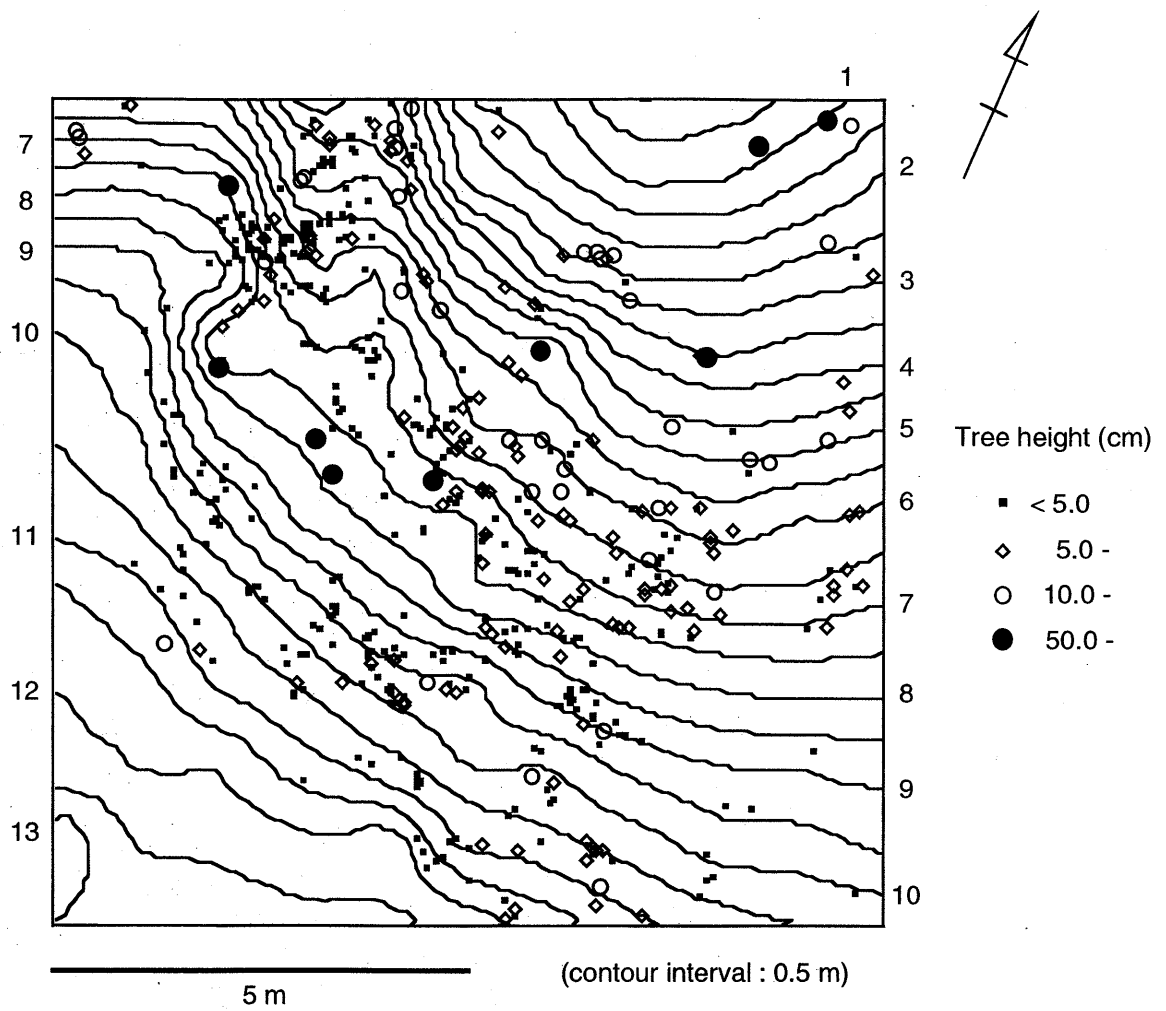
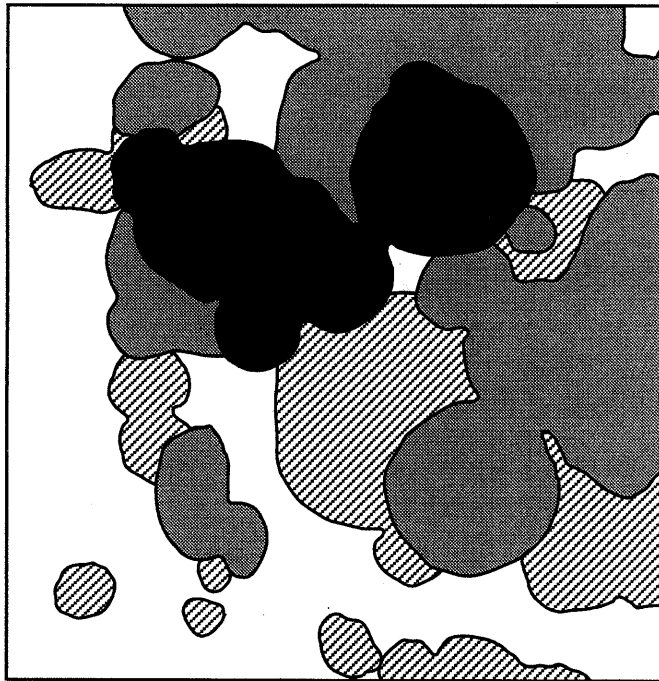


Fig. II-2. Detail map of study site (plot S3). All individuals of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* over 0.5mm in diameter at ground surface are shown. There are nine adult trees (over 50 cm in height) and 519 seedlings in this quadrat.



- *R. metternichii* var. *hondoense*
- evergreen trees ▨ deciduous trees
- open

Canopy condition



- rock ■ moss □ soil

Ground condition

Fig. II-3. Classification of canopy and ground conditions. Canopies of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* over 50 cm in height (adult trees) and other trees over 3.5 m in height were drawn. If some canopies overlaped each other, we took priority over the canopies of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense*, evergreen trees and deciduous trees in this order. Ground condition was classified into rock, moss and soil.

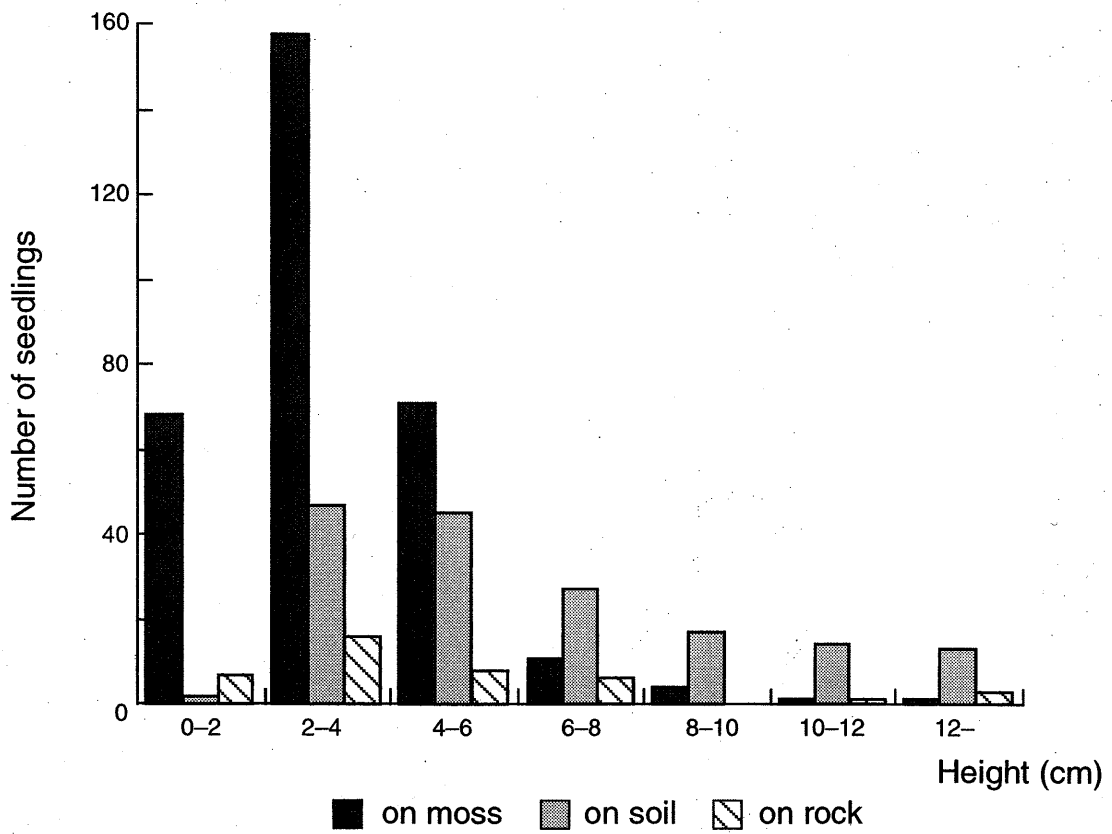


Fig. II-4. Height distribution of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* at each ground condition. Because only seedlings over 0.5 mm diameter were investigated, some seedlings 0-2 cm in height were not included in this study.

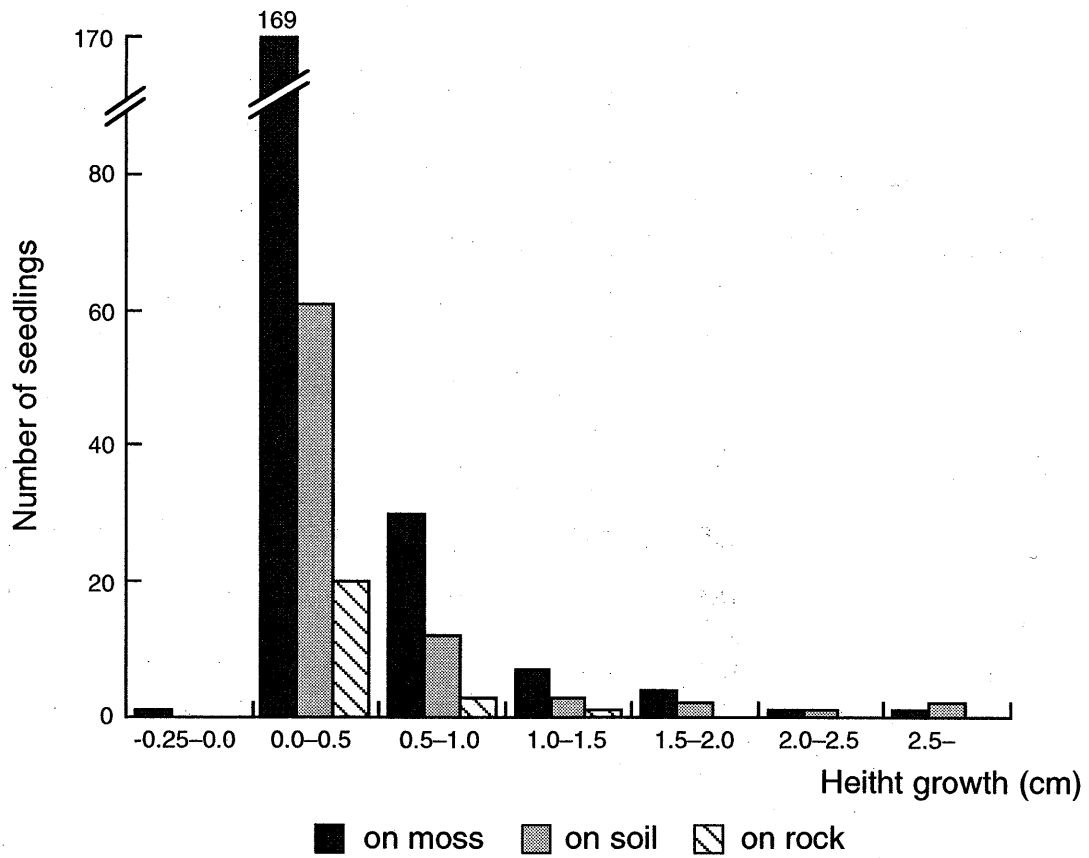


Fig. II-5. Height growth of *Rhododendron metternichii* seedlings at each ground condition during two years (1996-1998).

第 III 章 花粉の散布パターン

III-1 はじめに

本章では、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析によって、特定の母樹から採取した種子の花粉親を明らかにし、各果実の花粉がどのような個体に由来しているのか、花粉散布距離や自殖率はどのくらいなのかといった疑問を明らかにする。

第 I 章で述べたとおり、マイクロサテライト遺伝マーカーは父性分析、親子分析、血縁度の推定といった個体レベルでの遺伝解析に極めて有効なマーカーである。特に、個体間の花粉のやりとりを明らかにすることは野外調査だけでは極めて難しく、これまで用いられてきた花粉媒介者の行動、マーキングを行った花粉や花粉類似物の追跡といった方法にも様々な問題点があった。

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いて野外集団における花粉の散布パターンを初めて明らかにしたのは、コスタリカの低地帯に分布する熱帯林において、スズメガ媒花の高木樹種 *Pithecellobium elegans* の花粉フローを調査した Chase ら (1996) である。彼らは数百メートル四方の調査区内に生育する 28 個体の成木から 6 個体を選び、167 個の種子を採取し、5 つのマイクロサテライト遺伝マーカーを用いて父性分析をおこなった。確認された 72 通りの花粉フローのうち、花粉親を特定できたものは 41 通り (56.9%)、花粉親が調査区外に生育していたのが 20 通り (27.8%)、自殖に由来すると思われるものが 9 通り (12.5%)、複数の親候補がいるために花粉親を特定できなかったのは僅かに 2 通り (2.8%) であった。この研究によって、*P. elegans* の花粉フローは平均 142 m、最大で 350 m に達することが明らかになった。Chase ら (1996) の研究は、マイクロサテライトの有効性を初めて証明した例として注目される。

その後、ハチ媒花のマメ科植物 *Gliricidia sepium* (Dawson *et al.* 1997), 風媒でブナ科植物の *Quercus macrocarpa* (Dow & Ashley 1998), *Q. robur* と *Q. petraea* (Streiff *et al.* 1999), 昆虫媒花で熱帯のエマージェント (林冠から突出する樹木) である *Neobalanocarpus heimii* (Konuma *et al.* 2000) などを対象にマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析が行われた。これらの研究によって花粉の散布距離が正確に推定され、花粉散布が従来考えられていたよりも広範囲で起きていることが明らかになったが、依然として研究例は限られており、ホンシャクナゲのように各果実が多数の種子を含んでいる場合、それらがどのような花粉親によって結実しているのか、果実や個体によって花粉の散布パターンは変化するのかといった問題についてはほとんど分かっていない。

このような状況を踏まえ、本研究ではマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析によって花粉親を正確に推定すると共に、開花時期、開花数の違いによって花粉親の組成がどの程度異なっているのかを明らかにする。また、本章ではマイクロサテライト遺伝マーカーの実験方法についても III-2-2 としてまとめた。この節で述べた実験方法は、使用したマーカーの種類および数を除いて、第 IV 章、第 V 章にも共通するものである。

III - 2 方法

III - 2 - 1 野外調査

調査は鎌倉寺山の山頂付近に設置した 150 m×70 m の方形区内でおこなった (Fig. III-1)。調査地および方形区の概要は第 1 章, I-5-2 で述べたとおりである。1998 年の 5 月, 方形区内で開花した全 18 個体を対象として, 5 日おきに開花した花序数をカウントした。また, 開花時期と開花数の違いに着目して, 4 個体から 5 つの果実を採取した。各果実は 4℃ に保たれた部屋に 1 ヶ月間保管した後, 温室内で播種し, 発芽させた。発芽してきた全ての実生

(果実あたり 29-65 個体, 計 216 個体) を対象に, マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析をおこなった.

III - 2 - 2 実験方法

III - 2 - 2 - 1 DNA の抽出

Stewart & Via (1993) の CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) 法を一部改変し, 下記の手順で DNA の抽出をおこなった.

1) 抽出液の調整

以下の試薬を調合し, 抽出液とした.

<u>試薬名</u>	<u>最終濃度</u>
PVP-40	2.0 %
CTAB	2.0 %
NaCl	1.42 M
EDTA (pH 8.0)	20 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
アスコルビン酸	5 mM
DIECA	4 mM
β メルカプトエタノール	0.5 %

2) 抽出液にサンプルを浸し, 乳鉢ですりつぶす.

3) 乳鉢の中の抽出液 600 μ l を 1.5 ml チューブに移し, 55°C, 30 分静置.

4) 500 μ l のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (体積比 24 : 1) を加え, 15 分間攪拌.

5) 10000g, 22°C で 5 分間遠心し, 上澄みを新しい 1.5 ml チューブに移す.

- 6) 移した上澄みに対して 70%容量のイソプロパノールを加え、上下撹拌した後、5分間静置。
- 7) 10000g, 4℃で20分間遠心。
- 8) 70%エタノール 500 μ l でリンス。その後、10000g, 4℃で2分遠心(3回繰り返す)
- 9) 減圧乾燥後、50-100 μ l のミリ Q 水に溶かし、4℃の冷蔵庫で保存。

III - 2 - 2 - 2 PCR 法によるマイクロサテライト部位の増幅

本章では、内藤ら (1998) によって開発されたホンシャクナゲの7つのマイクロサテライト遺伝マーカーのうち、RM2D2, RM3D1, RM3D2, RM3D4, RM9D1, RM9D6 の6つを用い、PCR 法によるマイクロサテライト部位の増幅をおこなった (Table III-1)。各プライマーペアのうち、上流のプライマーは TET, HEX, 6-FAM のいずれかの蛍光物質でラベルした。

PCR 反応は各サンプルにつき 10 μ l を下記の通り調整しておこなった。

<u>物質名</u>	<u>最終濃度</u>
DNA	10 ng
PCR プライマー	5 pmol
Taq polymerase (Ampli TaqGold, ABI)	0.25 U
dNTP	200 μ M
MgCl ₂	1.5 mM
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
KCl	50 mM
ゼラチン	0.001%

調整した反応液は、サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9600, ABI)

を用い、初期変性 (94℃, 9分) の後, 30 サイクルの変性 (94℃, 30 秒), アニーリング (各プライマーのアニーリング温度, 30 秒), 伸長反応 (72℃, 1分) をおこない, 最後に 72℃で7分放置した.

III - 2 - 2 - 3 電気泳動と遺伝子型の特定

PCR 反応を行ったサンプルは, 5%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動をおこない, オートシーケンサー ABI377 および GeneScan™ analysis software (ABI) によるバンドサイズ, 即ち遺伝子型の特定をおこなった.

ポリアクリルアミドゲルの組成は次の通りである.

<u>試薬名</u>	<u>最終濃度</u>
Long Ranger™ (宝酒造株式会社)	5%
尿素	0.36 g/l
TBE	1×
10% APS	0.005 容量
TEMED	0.0005 容量

III - 2 - 3 父性分析

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析の基本的な考え方は, 極めて単純かつ明解である. まず, 花粉親を知りたい種子 (あるいはその芽生え) と母樹, および周辺の全ての花粉親候補の遺伝子型を特定する. 種子と母樹の遺伝子型を比較して, 種子に特有の対立遺伝子が存在すれば, それが花粉親に由来することは明らかであり, その対立遺伝子を持たない全ての個体を花粉親候補から除くことができる (Fig. III-2). この方法は除去分析 (exclusion analysis) と呼ばれ, 複数の遺伝子座において同様の分析を続けることによって最終的にただ一つの候補, 即ち花粉親を見つけ出すことができ

る。

しかし、除去分析には、推定された花粉親の信頼度が分からないという欠点がある。マイクロサテライト遺伝マーカーがいかに多型に富み、アロザイムマーカーと比較すると信頼度が大幅に高まったとはいえ、花粉親の信頼性を評価できなければ、科学的に議論を進めることはできない。マイクロサテライト遺伝マーカーを用いて父性分析をおこなった先例はいくつかあるものの、ほとんどが除去分析によるものであり (Chase *et al.* 1996; Dawson *et al.* 1997; Dow & Ashley 1998; Streiff *et al.* 1999), 信頼度を推定するための統計的手法の確立が望まれていた。

この問題は、Marshall ら (1998) が最尤法による花粉親の推定と、シミュレーションによる信頼度の算出方法を考案し、コンピュータプログラム CERVUS 1.0 を作成したことによって解決した。この方法では、ある種子と花粉親候補の遺伝子型を比較することによって、その個体が花粉親である確率 (尤度) が、任意に選んだ他の個体の尤度に対してどのくらい大きいかを、尤度の比 (尤度比) に基づいて判断する。即ち、尤度比の最も大きい個体が花粉親として選択されることになる。複数の遺伝子座を解析する場合には、各遺伝子座で算出された尤度比を互いに掛け合わせることで、全体の値を求めることができる。掛け合わされた尤度比の自然対数は、LOD score (Meagher 1986) と呼ばれる。Marshall ら (1998) は、最も尤度比の大きい個体と 2 番目に尤度比の大きな個体との、尤度比の比率の自然対数 (仮に 2 個体の尤度比を A, B とすると、 $\ln(A/B)$ となる)、即ち LOD score の差をデルタ (Δ) と定義した。 Δ が大きければ大きいほど、推定された個体が真の花粉親である確率が高いといえる。CERVUS 1.0 (Marshall 1998) は、観察された対立遺伝子頻度に基づいて真の花粉親と偽の花粉親をランダムに作り出し、ある信頼度のもとで花粉親を特定するための Δ の基準値を決定するプログラムである。本研究では、シミュレーションの回数を 10,000 回、親候補の数を

18 個体（方形区内の全ての開花木の数）、遺伝子型のタイピングエラー確率を 0.00、信頼度を 95.0%として CERVUS 1.0 による花粉親の推定をおこなった。

マイクロサテライト遺伝マーカーの欠点の一つに、ヌル対立遺伝子（null allele, 無効対立遺伝子）の存在が挙げられる。マイクロサテライトは変異に富んでいる事が最大の利点であるが、PCR プライマーと相補的な塩基配列の部分までが突然変異などで変化してしまうと、マイクロサテライト部位の増幅が行われなくなってしまう。この場合、もしヌル対立遺伝子がホモ接合（例えば、ヌル対立遺伝子を N とすると NN）であれば、バンドが見えないことによってその存在を認識できるが、ヘテロ接合（例えば、別の対立遺伝子を A とすると NA）であれば、見かけ上はホモ接合（AA）として認識されてしまう。本研究では、遺伝子座 RM3D2 と RM3D4 において、種子と母樹との間に多くの遺伝子型の不一致がみられた。これは、母樹に存在するヌル対立遺伝子が種子に伝わったことが原因である。例えば、母樹が NA、花粉親が BB という遺伝子型のとき、種子の遺伝子型が AB ならば母樹から A、花粉親から B という対立遺伝子を受け取ったと判断できる。しかし、母樹からヌル対立遺伝子 N を受け取った場合、種子の遺伝子型は NB となり、見かけ上は、母樹 AA と種子 BB の間に遺伝子型の不一致が生じることになる。

ヌル対立遺伝子の存在は、花粉親の推定に大きな誤差を生じさせることになる。本研究では、母樹と種子との不一致がヌル対立遺伝子に由来することが明らかであるため、遺伝子座 RM3D2 と RM3D4 における全てのホモ接合は、ヌル対立遺伝子を持つヘテロ接合であるとして、CERVUS 1.0 によるシミュレーションの前に、通常の除去分析によって遺伝子型の比較をおこなった。この方法では、実際にホモ接合の個体であってもヌルを持つ個体として取り扱うため、花粉親候補を除去できる確率は低くなるものの、真の花粉親を除去する可能性は無く、信頼できる方法といえる。

III - 3 結果

III - 3 - 1 各個体の開花パターン

調査を行った 150 m×70 m の方形区内には、174 個体のホンシャクナゲの成木、即ち樹高 50 cm 以上の個体が生育している (Fig. III-1)。ホンシャクナゲは主稜線の南側にはほとんど生育しておらず、支尾根の北側に、帯状にサブ個体群 A1, A2, A3 を形成している。

1998 年 5 月、174 個体の成木のうち 18 個体が開花した (Fig. III-1)。開花した個体から 32 個の花序をランダムに選び、花序あたりの花数を数えた結果、各花序は 10.84 ± 2.22 (平均 \pm SD) 個の花をつけていた。各サブ個体群における花序数は、サブ個体群 A1 で 29 個、サブ個体群 A2 で 7 個、サブ個体群 A3 で 75 個であった (Table III-2)。各開花個体の ID、5 日ごとの開花花序数については Table III-2 にまとめた通りである。同年 9 月に観察した果実数は、サブ個体群 A1 で 29 個、サブ個体群 A2 で 7 個、サブ個体群 A3 で 158 個であった (Table III-2)。

開花時期と開花花序数の違いに着目し、開花個体 D6, D7, D137 から 1 つ、D134 から 2 つ、計 5 個の果実を採取した。果実を採取した D6 と D7 はそれぞれ 1 個、2 個の花序を咲かせ、開花時期は D7, D6 の順である (Table III-2)。D7 はサブ個体群 A2 で最も早く開花しており、集団全体でみても早咲きの個体といえる。サブ個体群 A1 に生育する D134, D137 は 5 月 10 日から 15 日に開花し、集団全体の平均的な開花パターンを示している (Table III-2)。しかし、開花花序数は大きく異なり、D134 は 1 花序、D137 は 9 花序である。

III - 3 - 2 花粉親の組成

採取した 5 つの果実に含まれる種子を発芽させ、それぞれ 29~65 個体、計 216 個体の実生について、CERVUS 1.0 (Marshall *et al.* 1998) による花粉親の

最尤推定と信頼度の算出をおこなった (Fig. III-3). その結果, 216 個体の実生のうち, 複数の花粉親候補が存在するために花粉親を特定できなかったものはわずかに 3 個体 (1.4%) であった. 49 個体の実生 (22.7%) については, 方形区内に生育する 18 個体の開花個体全てが負の LOD score を示し, 方形区外の個体から花粉を受け取っていることが明らかになった. 残り 164 個体 (75.9%) の実生については, 95%の信頼度で花粉親を特定することができた.

まず初めに, サブ個体群 A1 に生育し, 開花花序数がそれぞれ 1 個, 9 個と異なっている D134 および D137 (Fig. III-1, Table III-2) の方形区内における花粉親組成を比較する. 1 花序しか花を咲かせなかった D134 から採取した 2 つの果実 D134-1 と D134-2 はよく似た傾向を示し, 最も近くで開花した D133 からそれぞれ 35.4%, 43.8%, D137 からはそれぞれ 24.6%, 25.0%, D136 から 7.7%, 3.1%の花粉を受け取っていた (Fig. III-3). D134 の自殖率は D134-1 と D134-2 それぞれ 1.5%, 3.1%と低い値を示していた. 一方, 9 つの花序を咲かせた D137 から採取した果実は 62.1%の種子が自殖由来で, 他個体からの花粉は, D136 から 10.3%, D134 から 6.9%, D133 から 3.4%であった (Fig. III-3). D134, D137 のいずれにおいても, 他のサブ個体群からの花粉フローはみられなかった.

サブ個体群 A2 に生育し, 開花時期が異なる D6 および D7 (Fig. III-1, Table III-2) の花粉親組成は著しく異なっていた. 先に開花した D7 に対する花粉フローは, 62.5%が D6, 7.5%が自花からのもので, 他のサブ個体群からの花粉フローは見られなかった (Fig. III-3). 一方, D6 への花粉は, サブ個体群 A2 に生育する D10 からの 14.0%, 自殖による 8.0%の合計 22%がサブ個体群内部の個体に由来するものであり, 多数の花粉が西側のサブ個体群 A1 から供給されていた (Fig. III-3). 特に D134 からは 56.0%もの花粉が供給されており, D133 からの 6.0%, D137 からの 2.0%を合わせると, サブ個体群 A1 から D6 への花粉フローは 64.0%に達していた.

方形区内で特定された花粉親のみに着目すると、(1) 62%もの高い自殖率を示す D137, (2) その D137 を含め、隣接する個体から多くの花粉を受け取っている D134, (3) 64%の花粉が別のサブ個体群に生育する個体, 特に D134 から供給されていた D6, (4) さらにその D6 から 63%もの花粉を受け取っていた D7 というように、花粉の動きをまとめることができる。即ち、自殖の D137→D137 に隣接する D134→別のサブ個体群の D6→D6 に隣接する D7 という一方向的な花粉フローがみえてくる。

方形区外の個体に由来する花粉フローは、各果実につき、20-30%に達していた (Fig. III-3)。果実を採取した個体から方形区外の開花木までの距離は 40-50 m 以上あり、長距離の花粉散布の存在を示唆している。

III - 4 考察

III - 4 - 1 父性分析の信頼性

III-2-3 で述べた通り、マイクロサテライト遺伝マーカを用いた従来の父性分析のほとんどが信頼度の推定をおこなっておらず、唯一の例外は CERVUS 1.0 (Marshall 1998) を用いた Konuma ら (2000) の論文だけである。

Konuma ら (2000) は、熱帯のエマージェントである *Neobalanocarpus heimii* の成木 30 個体と、5 個体の成木周辺から採取された 248 個体の幼木を対象に、4 つのマイクロサテライト遺伝マーカを用いて父性分析をおこなった。しかし、248 個体の幼木のうち、95%の信頼度で花粉親を特定できたのは 64 個体 (25.8%)、80%信頼度では 29 個体 (11.7%)、70%信頼度で 4 個体 (1.6%)、60%信頼度で 9 個体 (3.6%)、55%信頼度で 6 個体 (2.4%) であった。さらに、55%以上の信頼度で花粉親を推定できた 112 個体全ての幼木を花粉散布パターンの解析に使用しており、データの信頼性に問題が残る。

本章の研究では、父性分析をおこなった 216 個体のホンシャクナゲ実生のうち、複数の花粉親候補が存在するために花粉親を特定できなかったものは

わずかに3個体(1.4%)、方形区外の個体から花粉を受け取っている個体は49個体(22.7%)であり、残りの164個体(75.9%)の実生については95%の信頼度で花粉親を特定することができた。従来の研究と比較すると、本研究で推定された花粉親の信頼性は非常に高いといえる。

III-4-2 花粉の散布パターン

各果実の花粉親組成は、すぐ近くで採取されたものであっても個体間で著しく異なっていた。花粉散布パターンを決定する要因はいくつか考えられる。多くの既存研究によって、花粉のやりとりは隣接個体間で最も頻繁に起こり、leptokurtic な分布を示すことが知られている(Levin & Kerster 1974; Willson 1983; Hamrick 1987)。本章の結果でも、個体D134から採取された2つの果実はわずか0.4 mしか離れていない最隣接個体D133から最も多くの花粉を受け取り、他の2個体の花粉親D136, D137も、それぞれ4.0 m, 11.27 mと比較的近い距離に生育していた(Fig. III-1, III-3)。D7から採取した果実ではこの傾向はさらに強く、62.5%の花粉が1.7 m離れた最隣接個体D6によって供給されていた(Fig. III-1, III-3)。

多くの花はより多くの花粉媒介者を誘引する一方、探索行動の範囲を狭め、隣接個体間の交配や自家受粉を増加させる(Handel 1983; Fenster 1991; Schnabel & Hamrick 1995)。本研究で採取したD6, D7, D134の果実はいずれも1.5–8.0%と比較的低い自殖率を示していたのに対し、D137の自殖率は62.1%と著しく高かった(Fig. III-3)。自殖率の低いD6, D7, D134はそれぞれ1個、2個、1個の花序しか咲かせなかったのに対し、D137は9個の花序をつけており(Table III-2)、これが自殖率を増加させた原因と考えられる。

ホンシャクナゲの各個体の開花パターンは、5日ごとに花序レベルで調査しており、それぞれの花の開花時期を正確に反映するものではない(Table III-2)。しかし、1999年におこなった788個の花(86花序)の開花調査によ

って、各花の開花期間は 8.30 ± 2.42 (平均 \pm SD) 日、花序レベルでの開花期間は 11.24 ± 2.25 (平均 \pm SD) 日、同一の花序において最初に咲いた花と最後に咲いた花の開花日の差は 1.95 ± 1.43 (平均 \pm SD) 日であることが明らかとなっている。これらのデータは、花序内における各花の開花時期は大きく異なっておらず、本研究で用いた花序レベルでの開花時期を花レベルのものとして扱えることを示している。

本研究で果実を採取したサブ個体群 A2 の D6, D7 は互いに 1.7 m しか離れておらず、開花花序数もそれぞれ 1 個、2 個とほとんど違いがない。にもかかわらず、花粉親の組成は著しく異なっており、D7 が 62.5% の花粉を D6 から受け取っていたのに対して、D6 の花粉親のほとんどは別のサブ個体群 A1 に生育する個体で、D7 からは全く花粉を受け取っていなかった (Fig. III-3)。この現象は、他の果実のように個体間の距離や開花数では説明できず、花レベルでの開花時期の違いを考慮する必要がある。

ホンシャクナゲの葯は開花前に成熟しており、開花直後に裂開した葯から花粉が放出され、送粉者によって散布される。一方、雌しべが成熟して柱頭が花粉を受け取る準備ができるのは、開花後数日たってからである。このようなホンシャクナゲの雄性先熟性は、後に咲いた花 (♂) から先に咲いた花 (♀) への一方向的な花粉散布が起きる可能性を示唆している。サブ個体群 A2 に生育する個体 D7 は 5 月 5 日に咲き、開花した時点では周辺に開花木はほとんどなかった (Table III-2)。この D7 に 62.5% もの花粉を供給していたのは、後から咲いた隣接個体 D6 である。5 日ごとに調査した各個体の開花花序数では D7 と D6 の開花時期は完全にずれているが、花序レベルでの開花期間が 11.24 ± 2.25 (平均 \pm SD) 日であることを考えると、両個体の開花時期に重複があったものと推察できる。即ち、ホンシャクナゲの雄性先熟性によって、先に咲いた D7 は周辺の個体に花粉を供給することができず、後から咲いた D6 から多量の花粉を受け取ったと考えられる。

D7 に多数の花粉を供給した D6 は、後から咲いた D10 から 14.0%の花粉を受け取る一方、別のサブ個体群 A1 に生育する個体 D133, D134, D137 から計 64.0%もの花粉を受け取っていた (Fig. III-3). 先述したように、多くの花があるほど花粉媒介者の行動範囲は狭くなり、隣接個体間の交配や自家受粉が増加する (Handel 1983; Fenster 1991; Schnabel & Hamrick 1995). 各サブ個体群における花序数は、サブ個体群 A1 で 29 個、サブ個体群 A2 で 7 個、サブ個体群 A3 で 75 個であり、D6 の生育するサブ個体群 A2 の花序数が非常に少ないことがわかる (Table III-2). さらに、D6 のとなりで開花している D7 は、D6 よりも早く開花したために花粉を供給することができない。これら複数の要因によって、50–60 m 離れたサブ個体群 A1 から多数の花粉が D6 に運ばれたものと推察される。

以上の結果をまとめてみる。まず、サブ個体群 A1 で開花した D137 は、非常に多くの花を咲かせたために多数の自家受粉が生じた。同じくサブ個体群 A1 に生育し、わずか 1 花序しか花を咲かせなかった D134 は、周辺で比較的多くの花を咲かせた D133, D136, D137 から多数の花粉を受け取った。サブ個体群 A2 に生育する D7 は、後から咲いた隣接個体 D6 から非常に多くの花粉を受け取ったが、ホンシャクナゲの雄性先熟性を反映して、D6 に対して花粉を供給することは無かった。その D6 は、周辺に開花個体が少なく、D7 からの花粉も受け取れないため、サブ個体群 A1 に生育する個体の花粉によって結実した。その結果、自殖の D137→D137 の隣接個体 D134→別のサブ個体群の D6→D6 の隣接個体 D7 という一方向的な花粉フローが起きたと考えられる。

ここまでの議論では、方形区外からの花粉フローについては触れなかったが、採取した 5 つの果実の種子の 20–30%は方形区外に生育する個体によって結実していた (Fig. III-3). 果実を採取した個体から方形区外に生育する開花木までの距離は 40–50 m 以上あること、サブ個体群 A2 の個体 D6 に対しても、

50–60 m 離れたサブ個体群 A1 の個体から多数の花粉が供給されていたことから、ホンシャクナゲ個体群では数十メートル以上の花粉散布が普通に起きていると推察される。花粉の散布は隣接個体間で最も頻繁に起こり、leptokurtic な分布を示すと考えられており (Levin & Kerster 1974; Willson 1983; Hamrick 1987), 本研究でも大部分の花粉散布は隣接個体間で起きていた。しかし、leptokurtic な曲線は通常の曲線よりも長い裾を持っており、少量の長距離散布でも累積するとかなりの量になることが予想される (Hamrick 1987)。さらに、個体群に遺伝的構造が存在し、隣接個体間で近交弱勢が働いた場合、より遠くから散布された花粉の方が受粉に有利になることも考えられる (Waser 1993)。

Streiff ら (1999) は、風媒のブナ科植物 *Quercus robur* と *Q. petraea* の花粉散布パターンを 5.76 ha の調査区で解析した。マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析の結果、*Q. robur* の花粉散布距離は平均 22.1–58.4 m、*Q. petraea* では平均 18.4–64.6 m であった。調査区内における花粉散布曲線は指数関数的な減少曲線によって説明でき、 $R^2 > 0.90$ という高い決定係数を示していたが、*Q. robur* では平均 65%、*Q. petraea* では平均 69% の花粉が調査区外の個体に由来するものであった。これらの解析結果に基づき、Streiff ら (1999) は、*Quercus robur* と *Q. petraea* の花粉散布は数百メートル以上におよび、近距離の負の指数関数的散布と長距離散布との二山型の分布を示していると結論している。さらに、アロザイムマーカーを用いた熱帯の昆虫媒花高木 *Tachigali versicolor* および *Platygodium elegans* の花粉散布パターンの解析でも、750 m を越える長距離散布が 20% 以上の割合で起きていること、30–50% の割合を占める近距離散布と併せて、花粉散布曲線は二山型の分布を示すことが明らかになっている (Hamrick & Murawski 1990)。

本研究で対象としているホンシャクナゲは、虫媒の低木種で、複数のサブ個体群を形成するという特徴がある。風媒花であるブナ科植物や、熱帯に低

密度で生育している高木種で推定された結果をそのまま適用することはできないが、花粉の散布が従来考えられていたよりも長距離で起きていること、散布曲線は単純な指数関数ではなく、二山型あるいはさらに複雑な分布を示していること、それらの散布特性は開花数や開花パターンによって著しく変化していることは明らかである。

Table III-1. Microsatellite primers of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense*. Ta is optimal annealing temperature (modified from Naito *et al.*, 1998)

Locus	Ta (°C)	Repeat structure	Size (bps)	No. of alleles	PCR primer sequences
RM3D2	46.1	(GA) ₁₈	124	21	F: TCAACACATAATAAACAAC R: GAAAAGAAGGGCAAGTAAGT
RM9D1	48.6	(CT) ₂₁	129	12	F: TGACCAAGTGCGACCTAATC R: TAACTCCTAACAACCAAAAC
RM3D1	52.2	(CT) ₂₁ (AT) ₉ (GT) ₉	322	11	F: CTCCACAGCAGTCCTTGATAC R: GGAAACAGCAACAGAAAACA
RM2D2	49.8	(CT) ₁₆	137	10	F: ATGTGTTTCGTTGCTACTGT R: ATGGTTGGTTTGTTCCTA
RM3D4	52.1	(CT) ₇ (CT) ₁₉	194	7	F: CTCCCAACAAACAATCCAT R: CACCGAACGAAGACACTCAG
RM9D6	55.2	(GA) ₁₆	201	6	F: CTCGCCTCCAAAAGCAAT R: CGTGTCTCACCCCGTAAC

Table III-2. Individual IDs, number of flowering inflorescences (every 5 day and in total), and number of fruits.

Subpopulation	ID	Number of flowering inflorescences					Total	Number of fruits
		Flowering date (May 1998)						
		5th	10th	15th	20th	25th		
1	D119	0	2	2	0	0	2	5
	D122	0	6	6	3	0	6	8
	D133	0	6	6	3	0	6	1
	D134*	0	1	1	0	0	1	4
	D136	0	7	6	0	0	10	0
	D137*	0	7	6	0	0	9	11
2	D6*	0	1	0	0	0	1	2
	D7*	2	0	0	0	0	2	2
	D10	0	1	3	1	0	3	0
	D14**	—	—	—	—	—	1	3
3	A2	0	14	25	5	0	25	125
	A6	0	2	2	0	0	2	1
	A7	3	5	2	0	0	5	5
	A12	0	0	2	1	0	3	0
	A16	1	1	0	0	0	1	3
	A27	1	0	0	0	0	1	6
	A32	0	5	14	5	0	14	2
	C1	0	14	23	0	0	24	16

* One fruit each from plants D6, D7 and D137 and two fruits from D134 were collected for paternity analysis. ** Data are missing for flowering time of D14.

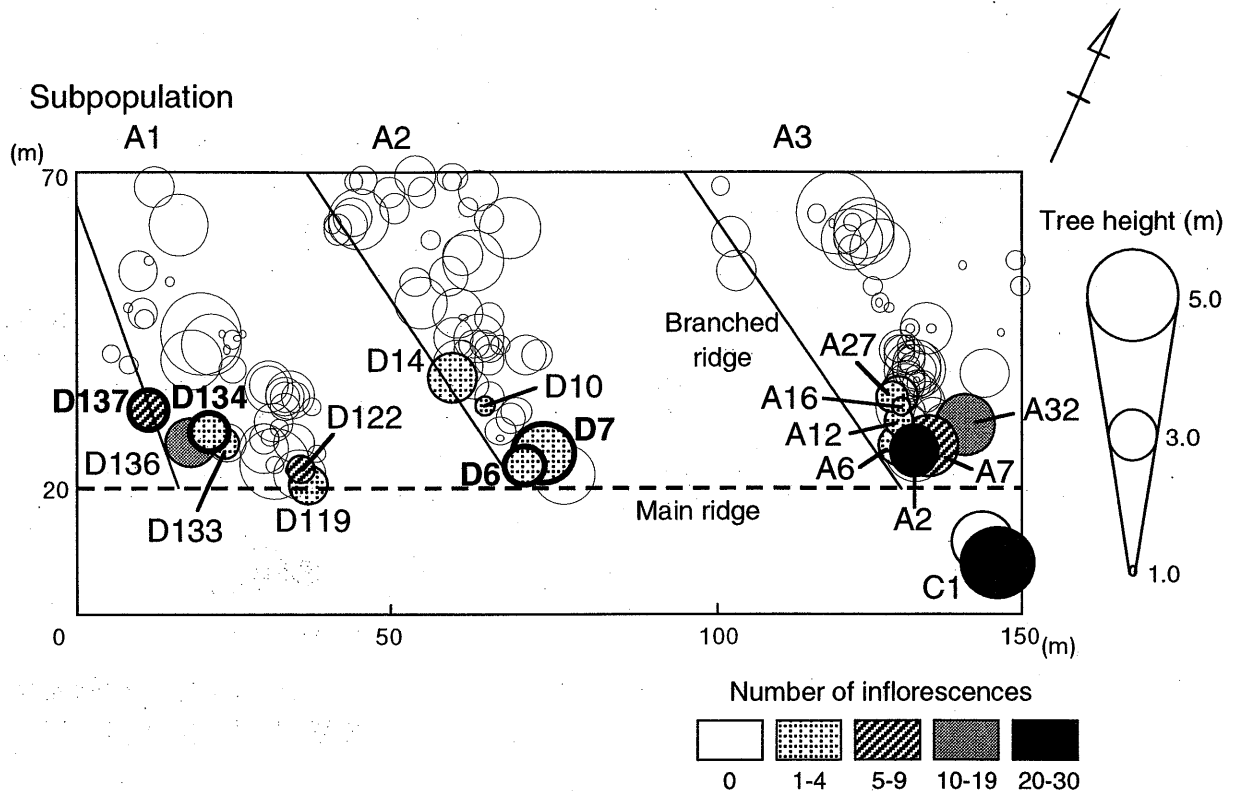


Fig. III-1. Map of study site. Three stripe-shaped subpopulations of *R. metternichii* grew along the northern slope of branch ridges off the main ridge. In May 1998, 18 individuals were in bloom at the site. I collected one fruit each from plants D6 (code name of individual), D7, and D137, and two fruits from D134. Paternity of germinated seedlings (29–65 per fruit, 216 in total) were analyzed.

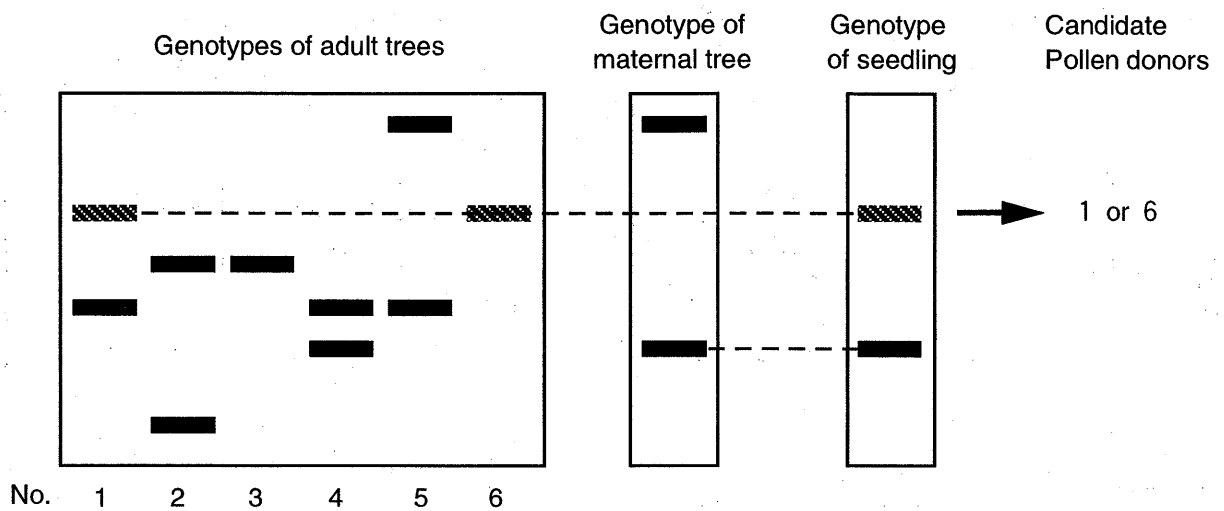


Fig. III-2. Concept of exclusion analysis. Seedling alleles which are not observed in maternal trees must be derived from paternal tree or pollen donor. In the present case, No. 1 and 6 are the candidate pollen donors of the seedling. While there are two candidates, true parent would be identified by repeating this analysis at other loci. In the actual analysis, likelihood-based paternity assignment with the estimation of confidence level is conducted by using computer program CERVUS 1.0 (Marshall *et al.* 1998) (see Materials and methods).

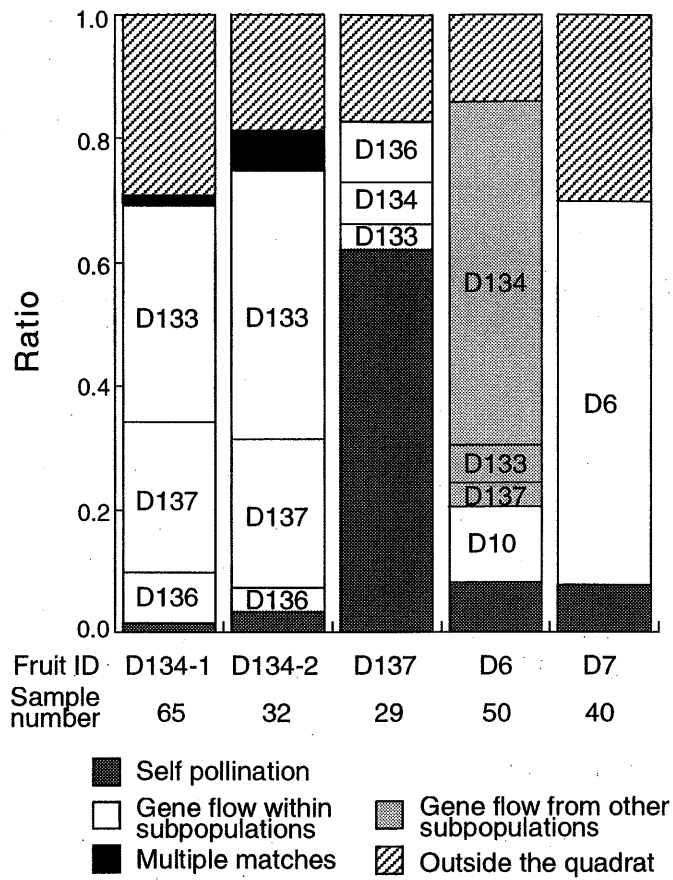


Fig. III-3. Pollen donors of each fruit. Paternity analyses are conducted for 216 seedlings germinated from five fruits. Multiple matches mean that the paternity of the seeds could not be identified at the 95% confidence level.

第 IV 章 実生バンクへの遺伝子流動

IV - 1 はじめに

ホンシャクナゲの花粉がどのように散布され、種子が形成されているのかについては、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析によって明らかにできた (第 III 章)。また、散布された種子の発芽、定着に適したサイトについては第 II 章で検証した通りである。しかし、花粉が散布され、種子になったとしても、その種子が実際の遺伝子流動にどのくらい貢献しているのかは分からない。例えば、近交弱勢の影響によって、長距離散布された花粉に由来する種子の方が隣接個体との交配で生じた種子よりも優れている場合、花粉の散布パターンと実際の遺伝子流動とは大きく異なることが予想される。本章では、ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動をより詳細に明らかにするため、林床に定着した実生の両親を特定 (親子分析) し、実生バンクへの総合的な遺伝子の流れを把握すると共に、各成木が種子・花粉の両方を介して残した子孫 (遺伝子) の数、即ち繁殖成功度の推定をおこなった。

マイクロサテライト遺伝マーカーは極めて多型に富み、個体レベルでの遺伝解析には特に有効なマーカーである。しかし、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた研究例が限られている上に、これまでおこなわれてきた研究のほとんどは、特定の母樹から採取した種子の花粉親を推定したもの (父性分析: Chase *et al.* 1996; Dawson *et al.* 1997; Dow & Ashley 1998; Streiff *et al.* 1999; Konuma *et al.* 2000; Miyazaki & Isagi 2000) であり、林床に定着した実生の両親を推定した研究 (親子分析: Dow & Ashley 1996; Isagi *et al.* 2000) は極めて少ない。実生の両親を推定する親子分析では、母樹が既に分かっている父性分析と比べてより多くの遺伝情報が要求されるため、必然的に多数のマーカーを開発し、遺伝子型を特定する必要がある。また、父性分析では種子を採取した年に開花した個体だけが花粉親の候補となるが、親子分析では対象とす

る実生が一年生である場合を除いて、過去何年かに開花した全ての個体が親候補となる。そのため、超多型を示すマイクロサテライト遺伝マーカーであっても、解析に十分な遺伝情報を得ることは容易ではなく、このことが世界的にも親子分析が進んでいない原因と言えるだろう。

植物個体群を対象としてマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析を初めておこなったのは、Dow & Ashley (1996) である。彼らは 200 m×250 m の方形区内に生育する 62 個体の *Quercus macrocarpa* 成木と 100 個体の稚樹を対象に、4 つのマイクロサテライト遺伝マーカーを用いて親子分析をおこなった。その結果、わずか 4 個体の成木が大部分の稚樹を生産していること、二次散布によって母樹の樹冠外に運ばれた種子がおよそ 50% もあり、従来考えられていたよりも長距離の種子散布が起きていること、極めて長距離の花粉散布が起きており、方形区内の花粉親は母樹周辺にランダムに分布していること、などが明らかになった (Dow & Ashley 1996)。Dow & Ashley (1996) の研究は、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析の有効性を証明し、それまで解析することが困難だった遺伝子流動のパターンを初めて明らかにした例として注目される。

その後しばらくマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析の例は無く、4 年後の 2000 年に、虫媒・鳥散布のホオノキ (*Magnolia obovata*) を対象とした Isagi ら (2000) の研究が発表された。彼らは 69 ha の集水域に点在するホオノキの成木 83 個体と、その中心に設置された 6 ha の方形区に生育する 91 個体の稚樹を対象に、8 つのマイクロサテライト遺伝マーカーを用いて親子分析をおこない、57% もの遺伝子が集水域の外から供給されていること、2 個体間の距離から推定された集水域内部での花粉散布距離は $131.1 \text{ m} \pm 121.1 \text{ m}$ (平均±SD) に達すること、などを明らかにした (Isagi *et al.* 2000)。

本章では、ホンシャクナゲ個体群の林床に定着した実生の両親を特定することにより、種子・花粉を介した遺伝子流動のパターンを明らかにするとと

もに、どのような個体がより多くの子孫を残しているのか、それを変化させる要因は何なのかといった疑問を明らかにする。虫媒花、風散布種子、サブ個体群の形成、実生バンクの維持といったホンシャクナゲの生態学的特性は、上述の2つの研究対象種とは全く異なるもので、その研究意義は大きいと考えられる。

IV - 2 方法

IV - 2 - 1 野外調査

調査はこれまでと同様に、鎌倉寺山の山頂付近に設置した 150 m×70 m の方形区内でおこなった (Fig. IV-1)。第 I 章, I-5-2 で述べたとおり、方形区内のホンシャクナゲは支尾根の北側斜面に帯状に分布しており、サブ個体群 A1, A2, A3 を形成している。各サブ個体群は方形区の北側にも、支尾根に沿って不連続に分布しており、方形区の東側 20 m には別のサブ個体群がある。方形区の西側および南側には、数百メートルに渡ってホンシャクナゲは生育していない。

調査をおこなった 1998 年時点で、方形区内には 174 個体の成木が生育しており、サブ個体群 A1, A2, A3 にはそれぞれ 49 個体, 50 個体, 75 個体が分布していた。実生バンクへの遺伝子流動を明らかにするため、各サブ個体群の林床に 10 m×10 m のプロット S1, S2, S3 を設置し (Fig. IV-1), 70 個体ずつ、計 210 個体の実生をランダムに採取した。

IV - 2 - 2 実験

DNA の抽出, PCR, 電気泳動の方法などは、第 III 章, III-2-2 実験方法で述べたとおりである。DNA は方形区内に生育する全成木 174 個体と、サンプリングをおこなった実生 210 個体の葉から抽出した。

遺伝子型の特定は 12 のマイクロサテライト遺伝マーカーを用いておこなっ

た。そのうち6つは、Naito ら (1998) によって開発されたもので、第 III 章で使用したのと同じ RM2D2, RM3D1, RM3D2, RM3D4, RM9D1, RM9D6 である (Table III-1)。残りの6つは、内藤和明氏、飯山直樹氏、井鷲裕司氏によって単離されたマイクロサテライトを含むクローンから、本研究のために新たに設計した RM1D1, RM1D5, RM1D9, RM1D12, RM2D6, RM7D9 で、アニーリング温度や反復構造については Table IV-1 にまとめた通りである。

IV - 2 - 3 親子分析

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析の考え方は、父性分析と同様に、極めて単純かつ明瞭である。親子分析では、父性分析のように母樹の遺伝子型が分からないため、実生と同じ対立遺伝子を持つ全ての成木が親候補となり、実生と異なる対立遺伝子しか持たない成木が親候補から除かれることになる (Fig. IV-2)。複数の遺伝子座で対立遺伝子の比較をおこない、親候補を絞り込んでいくこの方法は、除去分析と呼ばれている。しかし、III-2-3 父性分析でも述べたとおり、この方法では推定された親の信頼度を算出することができない。さらに、親子分析では母樹に関する情報が無いため、前章で用いた Marshall ら (1998) の方法による親の推定と信頼度の算出を行うこともできない。

遺伝子流動の推定で問題になるのは、本来は方形区外から供給された遺伝子であるにも関わらず、方形区内の個体を親として認識してしまう事である。これは隠れた遺伝子流動 (cryptic gene flow) と呼ばれており、cryptic gene flow の値を推定できれば、個々の親子関係の信頼度は分からなくても、全体としてどれくらいの誤りがあるのかを明らかにできる。本研究では、各遺伝子座における親候補の除去確率を算出し、その値に基づいて cryptic gene flow の値を計算した。除去確率とは、その遺伝子座を比較することによってどのくらいの確率で親候補を除去できるかを示したもので、両親ともに分かっている

い場合に親候補を除去できる確率は1番目の親 (first parents) の除去確率, 1番目の親が推定された後, 2番目の親を推定する際に親候補を除去できる確率は2番目の親 (second parents) の除去確率と呼ばれる。

本研究で用いた 12 のマイクロサテライト遺伝マーカーの除去確率は CERVUS 1.0 (Marshall *et al.* 1998) を用いて算出した (Table IV-2)。12 のマイクロサテライト遺伝マーカー全てを用いた場合の 1 番目の親 (first parents) の除去確率は 0.999817, 2 番目の親の除去確率は 0.999999 であった。本研究では 174 個体の親候補が存在するため, 1 番目, 2 番目の親候補を全て除去できる確率は, それぞれ $0.999817^{174} = 0.968598$, $0.999999^{174} = 0.999762$ となる。従って, 仮にこれら 12 のマーカーを用いて 100 個体の実生を分析したとすると, 1 番目, 2 番目の親を推定する際に親候補を除去できない確率, 即ち cryptic gene flow は, それぞれ $100 \times (1 - 0.968598) = 3.140$, $100 \times (1 - 0.999762) = 0.024$ となる。

第 III 章, III-2-3 父性分析でも述べたとおり, 見えないバンドであるヌル対立遺伝子の存在は, 親子分析にも大きな誤差をもたらす。例えば, ヌル対立遺伝子を N, 他の対立遺伝子を A, B とし, 実生が NA, 2 つの親候補が NA と NB の遺伝子型を持つとすると, どちらの親候補も実生と共通の対立遺伝子 N を持つため, 除去するのは誤りである。しかし, ヌル対立遺伝子が全くないと仮定すれば, NB (見かけ上は BB) の個体は親候補から除去されることになる。本研究では, Summers & Amos (1997) のアルゴリズムに基づいて設計されたプログラム CERVUS 1.0 (Marshall *et al.* 1998) を用いて各遺伝子座におけるヌル対立遺伝子の頻度を推定した (Table IV-2)。この推定結果に基づき, ヌル対立遺伝子の頻度が 1.5%以上ある 7 つの遺伝子座 RM1D9, RM2D2, RM2D6, RM3D1, RM3D2, RM3D4, RM7D9 のホモ接合は, 全てヌル対立遺伝子を持つヘテロ接合であるとして除去分析をおこなった。この方法では, 親候補の除去確率は低下するものの, 真の親を除去する可能性は

全く無くない。また、他の5つの遺伝子座 RM1D1, RM1D5, RM1D12, RM9D1, RM9D6 におけるヌル対立遺伝子の頻度は平均 0.00398 となり、本来は親である個体をヌル対立遺伝子のために誤って除去する可能性は極めて低いといえる。

IV - 3 結果

IV - 3 - 1 サブ個体群間の遺伝子流動

150 m×70 m の方形区内に生育する 174 個体のホンシャクナゲ成木を分析した結果、12 のマイクロサテライト遺伝マーカーは超多型を示し、ヘテロ接合度の観測値は 0.452–0.942, 平均 0.737, 対立遺伝子数は遺伝子座あたり 6–33 個, 平均 13.7 個であった (Table IV-2)。

実生の親子分析は、方形区内のサブ個体群 A1, A2, A3 の林床に設置した 10 m×10 m のプロット S1, S2, S3 から 70 個体ずつ実生を採取し、12 のマイクロサテライト遺伝マーカーを用いておこなった。その結果、複数の親候補が存在するために両親を特定できなかったのは、プロット S1 で 6 個体 (8.6%), プロット S2 で 3 個体 (4.3%), プロット S3 で 4 個体 (5.7%), 合計 13 個体 (6.2%) であった。これら 13 個体の実生については、後述の分析から除外したため、解析した実生数はプロット S1 で 64 個体, プロット S2 で 67 個体, プロット S3 で 66 個体となった。

プロット S1 の 64 個体の実生のうち、両親ともに方形区内に生育していたのは 15 個体 (23.4%), 片親のみが方形区内に生育していたのは 34 個体 (53.1%), 両親ともに方形区外に生育していたのは 15 個体 (23.4%) であった (Table IV-3a)。この結果は、128 のハプロタイプのうち、 $34 + (15 \times 2) = 64$ (50.0%) は方形区外の個体に由来していることを示している。しかし、IV-2-3 親子分析で述べた方法によって、除去確率から算出した cryptic gene flow の値を考慮すると、方形区外からの実際の遺伝子流動は $[(34.02 + 17.02 + 17.02)/128] \times 100$

= 53.17%となる (Table IV-3a, 但し Total の部分に括弧付きで記しているのが cryptic gene flow を考慮した値). 同様に, 方形区内におけるサブ個体群 A2, A3 からプロット S1 への遺伝子流動は, 見かけ上はそれぞれ $(1/128) \times 100 = 0.78\%$, $(2/128) \times 100 = 1.56\%$ であるが, 実際にはサブ個体群 A2 から $\{[31.21 \times (1/34)]/128\} \times 100 = 0.72\%$, サブ個体群 A3 から $\{[31.21 \times (2/34)]/128\} \times 100 = 1.43\%$ である (Table IV-3a).

遺伝子流動を正確に推定するためには cryptic gene flow を考慮する必要があるが, これらの計算を各々の個体群, 更に各個体レベルでおこなうことは, 結果の説明を煩雑にし, 解釈を複雑にすることになる. 加えて, 本研究における cryptic gene flow の値は比較的小さく, 特に個体レベルの解析ではほとんど問題にならないと言える. 従って, これ以後は cryptic gene flow の値を考慮せず, 除去分析によって推定された値に基づいて結果の比較検討をおこなうこととする.

プロット S2 の 67 個体の実生のうち, 両親ともに方形区内に生育していたのは 31 個体 (46.3%), 片親のみが方形区内に生育していたのは 28 個体 (41.8%), 両親ともに方形区外に生育していたのは 8 個体 (11.9%) であった (Table IV-3b). 方形区外からプロット S2 への遺伝子流動は $[(28 + 8 + 8)/134] \times 100 = 32.8\%$ である. また, サブ個体群 A1, A3 からの遺伝子流動はそれぞれ $(2/134) \times 100 = 1.49\%$, $(1/134) \times 100 = 0.75\%$ であった.

プロット S3 では, 66 個体の実生のうち, 両親ともに方形区内に生育していたのは 37 個体 (56.1%), 片親のみが方形区内に生育していたのは 22 個体 (33.3%), 両親ともに方形区外に生育していたのは 7 個体 (10.6%) であった (Table IV-3c). 方形区外からプロット S3 への遺伝子流動は $[(22 + 7 + 7)/132] \times 100 = 27.3\%$ である. サブ個体群 A1, A2 からプロット S3 への遺伝子流動は確認されなかった.

自殖由来の実生は, プロット S1 で 2 個体 (3.1%), プロット S2 で 4 個体

(6.0%), プロット S3 では 4 個体 (6.1%), 計 10 個体 (5.1%) であった。

IV - 3 - 2 サブ個体群内部における遺伝子流動：距離・樹高の影響

本節ではサブ個体群内部における遺伝子流動に着目し、実生バンクからの距離と樹高の違いによって、各成木が実生バンクに残した子孫の数（繁殖成功度）に違いが見られるかどうかを検討した。解析対象としたのは、サブ個体群内部に両親が生育している実生の親個体で、サブ個体群 A1 の 15 ペア (30 個体)、サブ個体群 A2 の 29 ペア (58 個体)、サブ個体群 A3 の 37 ペア (74 個体) である (Table IV-2 参照)。

各サブ個体群 A1, A2, A3 において、実生バンク (プロット S1, S2, S3) の中心から成木までの距離を算出し、5 m ごとの各距離階における成木個体数と、それらの成木が生産した実生数を比較した (Fig. IV-3)。いずれのサブ個体群においても、成木個体数の頻度分布とそれらが生産した実生数の頻度分布とは有意に異なっており (Mann-Whitney U -test: $P < 0.0001$)、実生バンクから 5-10 m 以内の成木が非常に多くの実生を残していた。さらに、各距離階の成木が生産した実生数は、サブ個体群間で異なったパターンを示していた (one-way factorial ANOVA; $F_{2,159} = 8.876$, $P = 0.0002$)。これは、サブ個体群 A2 において他の 2 つのサブ個体群 A1, A3 よりも長距離の遺伝子流動が起きていたため (Sheffé's test: A1 vs. A2, $P = 0.0055$; A2 vs. A3, $P = 0.0010$)、サブ個体群 A1 と A3 の頻度分布に有意差は認められなかった (Sheffé's test: $P = 0.9512$)。

成木の樹高についても実生バンクからの距離と同様の解析をおこなった (Fig. IV-4)。サブ個体群 A1 では、成木の樹高階分布と各樹高階の成木が残した実生数とに有意差は認められなかった (Mann-Whitney U -test: $P = 0.1345$) のに対し、サブ個体群 A2, A3 では、樹高の高い少数の成木によってより多くの実生が生産されていた (Mann-Whitney U -test: $P < 0.0001$)。各樹高階の成

木によって生産された実生数の頻度分布は、サブ個体群間で大きく異なっていた (one-way factorial ANOVA; $F_{2,159} = 23.966, P < 0.0001$) が、サブ個体群 A1 と A2 との差は小さく (Sheffé's test: $P = 0.0644$)、サブ個体群 A1 と A3、A2 と A3 との間に著しい差異が認められた (Sheffé's test: $P < 0.0001$)。

成木の樹高および実生バンクからの距離という 2 つの要因によって、各個体が実生バンクに残した子孫の数 (繁殖成功度) がどのように変化するかを検討した (Fig. IV-5)。サブ個体群 A1 では、9 個体の成木が実生バンクに子孫を残していた (Fig. IV-5a)。これらの個体は実生バンクから 5.6 m 以内の比較的近い距離に生育しており、各個体の繁殖成功度に大きな違いはみられない。一方、サブ個体群 A2 では、13 個体の成木が実生バンクに子孫を残しており、最大で 21.3 m 離れた個体も実生バンクに遺伝子を供給していた (Fig. IV-5b)。しかし、成木の繁殖成功度は個体ごとに大きく異なっており、実生バンクに近く、樹高も高い 3 個体がより多くの遺伝子を供給し、15 m 以上離れた個体は 1-2 個体の実生を生産しているだけだった。サブ個体群 A3 では、実生バンクから 10.6 m 以内の 13 個体が実生バンクに遺伝子を供給していた (Fig. IV-5c)。これらの成木のうち、樹高およそ 3 m 以上の 4 個体が 10 個体以上の実生を生産しており、樹高の低い、他の 9 個体の成木が残した子孫の数は 5 個体以下と少なかった。

樹高および実生バンクからの距離と、成木の繁殖成功度との関係をより詳細に検討するため、重回帰分析をおこなった (Table IV-4)。独立変数は成木の樹高と、実生バンクからの距離の自然対数、従属変数は各個体の繁殖成功度の相対値 (%) である。サブ個体群 A1 では、成木の樹高、実生バンクからの距離 (自然対数値) とともに成木の繁殖成功度 (相対値, %) と有意な関係は認められなかった (multiple regression analysis: R^2 (adjusted) = 0.213, $P = 0.487$; tree height, $P = 0.472$; \ln (distance from S1), $P = 0.450$)。サブ個体群 A2 では、成木の繁殖成功度と樹高の間に有意な関係は認められなかったが、実生

バンクからの距離は成木の繁殖成功度に負の影響を及ぼしており、全体の分散の 70.9%を説明することができた (multiple regression analysis: R^2 (adjusted) = 0.709, $P = 0.002$; tree height, $P = 0.920$; \ln (distance from S2), $P = 0.001$). 一方、サブ個体群 A3 では、これと全く逆のパターンを示し、実生バンクからの距離と成木の繁殖成功度との相関は比較的小さく、繁殖成功度の大部分は成木の樹高によって決定され、全体の分散の 72.6%が説明された (multiple regression analysis: R^2 (adjusted) = 0.726, $P = 0.002$; tree height, $P = 0.002$; \ln (distance from S2), $P = 0.091$). サブ個体群全体でみると、成木の繁殖成功度は樹高と正の相関を持ち、実生バンクからの距離とは負の相関関係を示していたが、説明できたのは全体の分散の 40.6%であった (multiple regression analysis: R^2 (adjusted) = 0.406, $P < 0.0001$; tree height, $P = 0.004$; \ln (distance from S2), $P = 0.0039$).

IV - 3 - 3 サブ個体群内部における花粉フロー

実生の両親を特定する親子分析では、種子親と花粉親を区別することはできない。しかし、両親が特定できた場合、成木間の距離から花粉散布距離を推定することは可能である。本節では IV-3-2 サブ個体群内部における遺伝子流動と同様に、両親が特定できたサブ個体群 A1 の 15 ペア (30 個体)、サブ個体群 A2 の 29 ペア (58 個体)、サブ個体群 A3 の 37 ペア (74 個体) を対象として、ホンシャクナゲの花粉散布パターンについて検討する。

最隣接個体間で花粉散布が起きた場合、およびランダムに花粉散布が起きた場合の 2 つの頻度分布を、成木間の距離から推定された実際の花粉散布パターンと比較した (Fig. IV-6)。全てのサブ個体群において、推定された花粉散布距離は最隣接個体間の距離よりも有意に長く (Mann-Whitney U -test: $P = 0.0416$ in subpopulation A1; $P < 0.0001$ in A2 and A3), ランダム散布よりは著しく短かった (Mann-Whitney U -test: $P < 0.0001$ in subpopulation A1, A2, and A3)。また、花粉散布距離の頻度分布は、サブ個体群間で異なったパターンを示し

ていた (one-way factorial ANOVA; $F_{2,78} = 5.697, P = 0.0049$). これは, サブ個体群 A2 において, 他の 2 つのサブ個体群 A1, A3 よりも長距離の花粉散布が起きていたため (Sheffé's test: A1 vs. A2, $P = 0.0105$; A2 vs. A3, $P = 0.0447$), サブ個体群 A1 と A3 の頻度分布に有意差は認められなかった (Sheffé's test: $P = 0.5083$). 各サブ個体群における花粉散布距離の最大値は, サブ個体群 A1 で 5.27 m, サブ個体群 A2 で 20.73 m, サブ個体群 A3 で 10.12 m であった.

IV - 4 考察

IV - 4 - 1 サブ個体群内部における遺伝子流動

本研究では, 特にサブ個体群内部における遺伝子流動に着目して解析をおこなった. いずれのサブ個体群 A1, A2, A3 においても, 実生バンクから 5 m 以内の成木が特に多くの実生を残し, 21 m 以上離れた個体は全く子孫を残していなかった (Fig. IV-3). しかし, 遺伝子流動のパターンはサブ個体群間で有意に異なり, サブ個体群 A2 では他のサブ個体群よりも遠くの個体が実生バンクへ遺伝子を供給していた. 成木の樹高階分布と, 各樹高階の成木が残した実生数との関係は, サブ個体群 A1 では有意差が無く, サブ個体群 A2 と A3 では樹高の高い少数の成木によって多くの実生が生産されていた (Fig. IV-4).

樹高および実生バンクからの距離という 2 つの要因によって, 成木の残した実生数 (繁殖成功度) がどのように変化するのかを検討した結果, サブ個体群 A1 では実生バンクから 5.6 m 以内の成木が親として貢献しており, 成木の樹高, 実生バンクからの距離ともに, 残した実生数との関係は認められなかった (Fig. IV-5a, Table IV-4). サブ個体群 A2 では, 最大 21.3 m と, 実生バンクから比較的離れた個体も含め, 13 個体が親として貢献しており, 成木の繁殖成功度は実生バンクからの距離によって決定されていた (Fig. IV-5b, Table IV-4). 一方, サブ個体群 A3 では, 実生バンクから 10.6 m 以内の 13 個体が

親として貢献しており，成木の繁殖成功度は主として樹高によって決定されていた (Fig. IV-5c, Table IV-4).

サブ個体群間で成木の繁殖成功度と，実生バンクからの距離，樹高との関係が大きく異なっているのは，実生バンク周辺の個体群構造の違いによるものと推察される．各サブ個体群を1つにまとめて重回帰分析をおこなうと，成木の繁殖成功度は実生バンクからの距離と負の相関関係を示し，樹高とは正の相関を持っていた (Fig. IV-5, Table IV-4)．これを一般的な関係として捉えた上で，ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動が，第一義的には実生バンクからの距離によって決定されると仮定する．このとき，サブ個体群 A1 ではおよそ 3 m 以下の比較的樹高の低い個体が実生バンク周辺に集まって生育しているため (Fig. IV-5)，成木の繁殖成功度と距離，樹高との関係はみられず，どの個体も同程度の実生を生産することになる．サブ個体群 A2 では，実生バンク周辺には樹高の高い，少数の成木しか生育していないため (Fig. IV-5)，それらが多くの実生を残す一方で，比較的遠くの個体も遺伝子を供給することができる．さらにサブ個体群 A3 では，実生バンク周辺に樹高の低い個体から高い個体までが数多く生育しているため (Fig. IV-5)，樹高の高い個体ほどより多くの実生を生産することになる．このように，実生バンクからおよそ 10 m 以内の成木個体数と樹高構成によって各個体の繁殖成功度が決定されていると考えれば，本研究で観察されたホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動のパターンを矛盾無く説明することができる．

本研究のように，親子分析によって実生の両親を推定し，距離や個体サイズが成熟個体の繁殖成功度にどのような影響を及ぼすのかを明らかにした例はほとんどない．Meagher & Thompson (1987) は，雌雄異株の多年草 *Chamaelirium luteum* を対象として，20 m×40 m の方形区から 283 個体の実生を採取し，11 の酵素多型マーカーを用いて実生の両親を推定した．その結果，ロゼットサイズおよび花序サイズで表された個体の繁殖努力と，各個体が残

した実生数（繁殖成功度）との間には負の相間関係が認められた（Meagher & Thompson 1987）。この結果は、サイズの大きな個体ほど、より多くの、健康な種子を生産するという一般的傾向（Harper & White 1974; Solbrig 1981; Cook & Lyons 1983）と矛盾している。この原因の一つとして、酵素多型の情報量が少ないことが挙げられる。Meagher & Thompson（1987）が解析した酵素は、11のマーカ―全てを合わせても、33個の対立遺伝子しかなく、通常のマイクロサテライト遺伝マーカ―1から数個分の情報量である。これを補うため、彼らは、まず尤度比が最も大きな雄株20個体と雌株20個体を選んだ上で、400ペア全ての尤度比を計算し、その中から尤度比の最も大きなペア1つを両親とするという間接的な方法を取っている。しかし、例えば1977年の方形区には3728ペアもの候補（開花個体）が存在しており、その中から片親の尤度比に基づいて20個体ずつ選び、計400ペアの尤度比を算出した上で、他より少しでも尤度比が高ければ特定の1ペアを両親とする方法は、かなりの誤差が生じると考えられる。もちろん、彼らが述べているように開花した個体、即ち個体群の中でも比較的大きな個体（Meagher & Thompson 1982）のみを親候補としたために、サイズと繁殖成功度との関係が認められなかった（Meagher & Thompson 1987）という可能性もある。その場合、*Chamaelirium luteum*の開花はサイズ依存であるが、開花した個体はロゼットサイズや花序サイズに関わらず同程度の繁殖成功度を持っているということになる。

Schnabel & Hamrick（1995）はマメ科で雌雄異株の木本植物 *Gleditsia triacanthos*（アメリカサイカチ）を対象として、林床に定着した幼木の親子分析をおこない、雄株の胸高直径（DBH）、母樹との距離の2つの要因によって雄株の繁殖成功度がどのように変化するかを検証した。繁殖成功度の推定方法は先述したMeagher & Thompson（1987）と類似している。Schnabel & Hamrick（1995）は、酵素多型に基づいて雌株の尤度比を算出し、母樹である確率が10%以下の雌株を除去することによって種子親候補を1から11個体に絞り込

み、それらの個体と花粉親候補のペアについて尤度比を算出することによって最も確率の高い花粉親を推定した。その結果、アメリカの東カンザスに設置された調査区 Nelson Area Site (NAS) では、雄株の繁殖成功度は胸高直径と正 ($P=0.0164$), 雌株との距離と負 ($P<0.0001$) の相関関係を示した (Schnabel & Hamrick 1995)。また、もう一つの調査区 Robinson Tract Site (RBT) においても、雄株の繁殖成功度は胸高直径と正 ($P=0.0048$), 雌株との距離と負 ($P=0.0023$) の相関関係がみられた (Schnabel & Hamrick 1995)。しかし、いずれの調査区でも R^2 の値は極めて小さく (NAS: $R^2 = 0.159$, RBT: $R^2 = 0.048$), サイズと距離という2つの要因では雄株の繁殖成功度の分散の5–16%しか説明できなかった (Schnabel & Hamrick 1995)。

上述の Meagher & Thompson (1987) と Schnabel & Hamrick (1995) の研究は酵素多型を用いたものであるが、情報量の多いマイクロサテライト遺伝マーカーを使用すれば、より高い精度で両親を推定できると考えられる。しかし、本章の最初に述べたとおり、マイクロサテライト遺伝マーカーを親子分析に用いた例は、風媒、重力・動物散布の高木樹種 *Quercus macrocarpa* を対象とした Dow & Ashley (1996) と、虫媒、鳥散布の高木樹種ホオノキ (*Magnolia obovata*) を対象とした Isagi ら (2000) の2つしかない。いずれの研究も極めて高い精度で両親を推定し、遺伝子流動が従来考えられていたよりも広範囲で起きていることを明らかにしているが、Dow & Ashley (1996) の研究は主としてマイクロサテライト遺伝マーカーの有効性を論じており、個体サイズや距離、個体群構造との関係は十分に解析されていない。Isagi ら (2000) は調査区内の遺伝子流動がランダムよりは近距離で起きていること、サイズの大きな個体ほどより多くの子孫を残していることを示しているが、いずれも集団レベルで明らかとなった傾向であり、各個体の繁殖成功度の違いまでは比較していない。さらに、これら2つの研究で扱われた樹木の種特性は本研究で扱った虫媒、重力散布の低木樹種ホンシャクナゲとは大きく異なってい

る。また、いずれも連続した一つの個体群を対象にしているため、遺伝子流動のパターンが集団内の個体群構造の違いによってどう変化するのは明らかにできなかった。

遺伝子流動の量およびパターンについては、3つの異なる説がある (Ellstrand 1992)。第一の説は、遺伝子流動は極めて限られているとするもの (Levin 1981) で、進化生物学者にこれを支持するものが多い (Ellstrand 1992)。第二の説では、遺伝子流動は極めて広範囲で起きていると考える (Muona 1990)。第3の説では、遺伝子流動はそれぞれに特異的 (idiosyncratic) なものであり、種、個体群、個体あるいは季節によって変化すると考える (Ellstrand & Marshall 1985; Hamrick 1987; Slatkin 1987)。本研究では、ホンシャクナゲ個体群を対象にした親子分析によって、成木の繁殖成功度が樹高に強く依存する場合、距離によって決定されている場合、樹高と距離のいずれも関与していない場合の3つのパターンが確認された。これらのパターンは実生バンク周辺の個体群構造の違い、即ち実生バンクから 10 m 以内の範囲にどのようなサイズの個体が、どのくらいの密度で生育しているかによって決定されており、この点では遺伝子流動に関する第3の説を支持するものである。しかし、各サブ個体群内部における遺伝子流動が最大でも 21.3 m と限られていること、一方で 40 m 以上離れた方形区外からの遺伝子流動が 27.3–50.0% に達していることは、それぞれ第一の説、第二の説を支持するものである。即ち、先述の3つの説どれか一つが正しいのではなく、注目する時間、空間スケールによって遺伝子流動の捉え方は異なってくる。ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動は、およそ 20 m 程度の範囲内に限られ、かつ個体群構造の違いを反映して大きく変化する idiosyncratic (特異的) なパターンと、40 m 以上におよぶ長距離散布の両方が起きているものと考えられる。数十メートルを越える長距離の遺伝子流動のパターンについては IV-4-3 長距離の遺伝子流動で改めて考察する。

IV - 4 - 2. サブ個体群内部における花粉散布パターン

花粉のやりとりが最隣接個体間で最も頻繁に起こり、leptokurtic な頻度分布を示すことはいくつかの研究で示されている (Levin & Kerster 1974; Willson 1983; Hamrick 1987). ホンシャクナゲの花粉散布距離は最隣接個体間の距離よりは有意に長かったが、ランダム散布よりは著しく短く、ほとんどの花粉散布は 5-10 m 以内の個体間で起きていた (Fig. IV-6).

本研究と同様の結果は Isagi ら (2000) によって示されている. Isagi ら (2000) は集水域に点々と生育し、成木の個体群密度がヘクタール当たり 1 本程度と極めて低いホオノキ (虫媒, 高木樹種) を対象としているため、花粉の平均散布距離は 131.1 ± 121.1 m (平均 \pm SD) とホンシャクナゲよりも著しく長いものの、ランダム散布が起きた場合の距離 561.5 ± 352.6 m (平均 \pm SD) よりも極めて短く、最隣接個体間の距離 44.1 ± 37.5 m (平均 \pm SD) よりも有意に長いという点では本研究の結果と一致する.

本研究では、実生バンク周辺 of 個体群密度が低く、樹高の高い成木が少数で生育しているサブ個体群 A2 において、他のサブ個体群よりも長距離の花粉散布が起きていることが示された (Fig. IV-6). 多くの花はより多くの花粉媒介者を誘引する一方で、媒介者の探索行動範囲を狭め、隣接個体間の交配や自家受粉を増加させること、これによって凶作年の遺伝子の散布距離は豊作年よりも長くなることが報告されている (Handel 1983; Fenster 1991; Godt & Hamrick 1993; Schnabel & Hamrick 1995). 本章の結果は、これらの研究と一致するものであり、サブ個体群 A2 では個体群密度が低いことによって、花粉散布距離が長くなったものと推察される.

特定の母樹から種子を採取し、花粉親の推定をおこなう父性分析では、ある特定の花や個体に対する花粉フローを明らかにし、開花時期や開花数といった要因と花粉散布パターンとの関係を知ることができる. これは第 III 章で

用いた方法であるが、本章のように林床に定着した実生の両親を推定し、両親間の距離から花粉散布距離を推定することによって、より長い時間スケールでの花粉の散布特性を把握できる。父性分析を用いた第 III 章では、開花数や開花パターンによって花粉の散布距離、方向、量などが大きく変化することを述べた。親子分析に基づく本章の解析結果は、第 III 章と同様に、個体群密度の違いによって花粉の散布距離が変化することを示すとともに、より一般的な傾向として、花粉散布は最隣接個体間よりは長く、ランダムよりは著しく短い距離で起きていること、各サブ個体群内部における花粉散布距離は最大で 5–20 m であることを明らかにした。

IV - 4 - 3 長距離の遺伝子流動

ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動を説明するには、2つの重要な疑問に答える必要がある。第一に、サブ個体群内部における遺伝子流動が最大で 5.6–10.6 m と極めて限られているにも関わらず、40 m 以上離れた方形区外からの遺伝子流動が 27.3–50.0% に達しているのはなぜかという点である。第二の疑問としては、このような方形区外からの長距離の遺伝子流動にも関わらず、30–50 m しか離れていないサブ個体群間の遺伝子流動が 0.0–1.56% と極めて少ないのはなぜかという点が挙げられる。

第一の疑問、即ちサブ個体群内部における限られた遺伝子流動と、方形区外からの多量の遺伝子流動という、一見矛盾するパターンについては、花粉散布の影響が考えられる。本章の結果から推定された方形区外からの遺伝子流動は、サブ個体群 A1 で $(64/128) \times 100 = 50\%$ 、サブ個体群 A2 で $(44/134) \times 100 = 32.8\%$ 、サブ個体群 A3 で $(36/132) \times 100 = 27.3\%$ に達していた (Table IV-3)。

第 III 章の父性分析によって明らかになった通り、ホンシャクナゲ個体群では大部分の花粉散布が隣接個体間で起きている一方で、40 m 以上離れた方形区外からの花粉フローが 20–30% に達していた。このようなパターンは、1)

leptokurtic な花粉散布曲線は通常の正規分布よりも長い裾を持ち、少量の長距離散布でも累積するとかなりの量になること、2) 個体群に遺伝的構造が存在し、隣接個体間で近交弱勢が働いた場合、より遠くから供給された花粉の方が受粉に有利になること、によるものと推察された(第 III 章, III-3-2 花粉の散布パターン)。いくつかの研究によって、花粉散布距離が従来考えられていたよりも長距離で起きていること (Chase 1996; Dow & Ashley 1998; Isagi *et al.* 2000)、花粉散布は近距離の指数関数的散布と長距離散布との二山型を示していること (Hamrick & Murawski 1990; Streiff *et al.* 1999) などが明らかになっており、本章の結果もこれを支持するものといえる。さらに、第 III 章で述べたように、ホンシャクナゲの花粉散布パターンは開花数や開花時期の違いによって大きく変化する。仮に個体群を形成する成木全てが開花したとしても、各個体の開花時期が異なれば、実際に花粉をやりとりできる個体数は少なくなる。特に集団の開花時期からはずれた個体では、周辺の開花個体数が少なくなるために、長距離の花粉散布が起きる可能性が高くなる。方形区外からの長距離の遺伝子流動に、花粉散布が大きく関わっていることは間違いないであろう。

林床に定着した実生の両親を特定する親子分析では、種子親と花粉親とを区別することができない。従って、花粉散布が長距離の遺伝子流動にどの程度貢献しているのか、種子の長距離散布は起きているのか、といった疑問については答えることができない。しかし、仮に方形区外からの遺伝子流動の大部分が花粉散布によって説明できるとしても、両親ともに方形区の外に生育している実生については、当然のことであるが、種子親も方形区外に存在することになる。従って、方形区外からの種子による遺伝子流動は過小に評価しても、サブ個体群 A1 で $(15/128) \times 100 = 11.7\%$ 、サブ個体群 A2 で $(8/134) \times 100 = 6.0\%$ 、サブ個体群 A3 で $(7/132) \times 100 = 5.3\%$ に達している (Table IV-3)。ホンシャクナゲの種子は特別な散布器官は持っていないが、1.0–2.0 mm

程度の長さしかない。本研究の結果は、少なくとも数パーセントの種子が風に乗って数十メートル以上散布されていることを示唆している。

次に第二の疑問、即ち 40 m 以上離れた方形区外から 20–30%もの遺伝子流動があるにも関わらず、それよりも近い距離にあるサブ個体群間の遺伝子流動が 0.0–1.56%と極めて少ないのはなぜかという点を考察する。調査をおこなった 150 m×70 m の方形区において、各サブ個体群は支尾根の北側に帯状に分布し、各々 30–50 m 離れている (Fig. IV-1)。また、各サブ個体群は方形区の外側にも、支尾根に沿って不連続に分布している。方形区外から多量の遺伝子が供給されている反面、サブ個体群間の遺伝子流動が著しく低いということから、1) サブ個体群間に遺伝子流動を妨げる何らかの障壁が存在し、2) 方形区外からの遺伝子は支尾根に沿った、方形区外の同じサブ個体群から供給されているのではないかと推察できる。

ホンシャクナゲは樹木に覆われた場所では生育できない反面、乾燥に弱いという面もあり、溪谷の岩盤や尾根の北側斜面、湿地周辺のマント群落といった開放的で水分条件の良い場所に個体群を形成する。本研究の調査区においても、サブ個体群が成立しているサイトは支尾根の北側斜面であり、個体群の西側には岩盤の露出した急傾斜の尾根、東側には樹高 10 m を越える樹木からなる発達した森林がみられる。これらの尾根や森林は種子散布や花粉媒介者の行動を妨げ、支尾根に沿った遺伝子流動を促進する働きがあると考えられる。

地形や環境条件のわずかな違いによって花粉媒介者の行動が大きく影響されることは、いくつかの研究で示されている (Handel 1983)。例えば、Eisikowitch & Woodell (1975) は *Armeria maritima* を対象に調査をおこない、砂丘や小石の転がる浜辺の個体群には花粉媒介者であるマルハナバチが訪れたが、隣接する湿原の個体群ではマルハナバチの訪花はみられなかったと報告している。この理由の一つに、マルハナバチが水に濡れることを嫌って湿原の水面近く

に咲く花を訪花しなかったことが考えられる (Handel 1983). また, Beattie (1971) は, カリフォルニアの海岸林の林床で調査をおこない, 木漏れ日に照らされると花の温度が急激に上がり, 花を訪れる花粉媒介者の数がゼロから 20 へと増加したことを報告している. この結果, 花粉媒介者は植物個体群の境界や密度の違いとは無関係に, 木漏れ日を追いかけるよう行動した (Beattie 1971).

ホンシャクナゲの花粉は主としてトラマルハナバチやコマルハナバチによって媒介される. 調査区においてこれらの花粉媒介者がどのような行動を取っているのかは分からないが, サブ個体群間に成立している発達した森林が媒介者の移動を妨げていることは十分に考えられる. また, 風によって散布される種子についても, 東西の尾根や森林がサブ個体群間の遺伝子流動を抑制し, 支尾根に沿ったサブ個体群内部での遺伝子流動を促進している可能性が高い.

最後に, 本章の結果を要約しておく. ホンシャクナゲ個体群における近距離の遺伝子流動は, 個体群構造の違いを反映して大きく変化する *idiosyncratic* (特異的) なパターンを示し, 成木の繁殖成功度が樹高に強く依存する場合, 距離によって決定されている場合, 樹高と距離のいずれも関与していない場合の 3 つのパターンが確認された. 一方で, 少量の長距離散布でも累積するとかなりの量になること, 隣接個体間で近交弱勢が働いた場合, より遠くから供給された遺伝子の方が受粉に有利になることなどを反映して, 40 m を越える長距離の遺伝子流動も 20-30% の頻度で起きていた. さらに, これらの長距離散布にも関わらず, サブ個体群間に成立した発達した森林や急峻な尾根の存在によって, 30-50 m しか離れていないサブ個体群間の遺伝子流動は 0.0-1.56% と極めて限られていた.

Table IV-1. Microsatellite primers of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* designed for the clones containing microsatellite loci isolated by Naito *et al.* (unpublished data). Ta is optimal annealing temperature.

Locus	Ta (°C)	Repeat structure	Size (bps)	No. of alleles	PCR primer sequences
RM1D1	51.5	(CT) ₁₇	276	10	F: ATCTGGAGGCCATTGGTAGT R: TATTGGGTCCGATGACAGAC
RM1D5	47.2	(CT) ₁₃ (CCT) ₄ (CT) ₆	121	16	F: CAAATACTCCTCTCAGTTAC R: TTAAACATGGTGATTGTGTC
RM1D9	45.8	(CA) ₃ (CT) ₁₈	143	9	F: CCACAGCAATCACTCTTT R: AATTGAACACTGCGTAAT
RM1D12	53.8	Compound of (ct) ₉ , (CT) ₁₄ , (CT) ₁₉ and (CT) ₁₅	299	33	F: GCACAAGCCCGAGTAGAAAG R: GGTGGTAACCCCTGAAATAG
RM2D6	52.6	(CA) ₈ (CT) ₃₀ (TG) ₂	292	16	F: CAAATCGAAGAGAAAGAACA R: TCGTGGAGCATAGTGGAGTA
RM7D9	46.6	(CT) ₁₁	108	13	F: TTTACTGGCTGAAAATACAC R: TAAGGTGATGAAATATGAGA

Table IV-2. Numbers of alleles, observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E), estimated exclusion probabilities, and null allele frequencies at 12 microsatellite loci in 174 adult trees of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense*.

Locus	Number of alleles	H_O	H_E	Exclusion probability		Null allele frequency
				first parents	second parents	
RM1D1	10	0.759	0.781	0.402	0.581	0.0128
RM1D5	16	0.839	0.859	0.555	0.716	0.0116
RM1D9	9	0.452	0.740	0.333	0.509	0.2447
RM1D12	33	0.942	0.932	0.753	0.859	-0.0076
RM2D2	10	0.810	0.840	0.508	0.677	0.0168
RM2D6	16	0.750	0.894	0.646	0.785	0.0831
RM3D1	11	0.614	0.767	0.385	0.566	0.1097
RM3D2	21	0.648	0.899	0.654	0.791	0.1605
RM3D4	7	0.713	0.741	0.344	0.524	0.0171
RM7D9	13	0.775	0.848	0.530	0.695	0.0460
RM9D1	12	0.770	0.775	0.401	0.580	0.0010
RM9D6	6	0.776	0.784	0.389	0.568	0.0021

Exclusion probabilities and null allele frequencies were calculated with Cervus 1.0 (Marshall *et al.* 1998).

Table IV-3a Gene flow into plot S1

		Source of gene flow				Total
		A1	A2	A3	outside the quadrat	
Seedlings having parent pairs within the quadrat	first	15 (2)	0	0	–	15 (13.77)
	second	15 (2)	0	0	–	15 (14.97)
Seedlings having first parents within the quadrat	first	31	1	2	–	34 (31.21)
	second	–	–	–	34	34 (34.02)
Seedlings having no parents within the quadrat	first	–	–	–	15	15 (17.02)
	second	–	–	–	15	15 (17.02)
Total		61	1	2	64	128

Table IV-3b Gene flow into plot S2

		Source of gene flow				Total
		A1	A2	A3	outside the quadrat	
Seedlings having parent pairs within the quadrat	first	0	31 (4)	0	–	31 (28.79)
	second	1	29 (4)	1	–	31 (30.97)
Seedlings having first parents within the quadrat	first	1	27	0	–	28 (26.00)
	second	–	–	–	28	28 (28.02)
Seedlings having no parents within the quadrat	first	–	–	–	8	8 (10.11)
	second	–	–	–	8	8 (10.11)
Total		2	87	1	44	134

Table IV-3c Gene flow into plot S3

		Source of gene flow				Total
		A1	A2	A3	outside the quadrat	
Seedlings having parent pairs within the quadrat	first	0	0	37 (4)	–	37 (34.40)
	second	0	0	37 (4)	–	37 (36.97)
Seedlings having first parents within the quadrat	first	0	0	22	–	22 (20.45)
	second	–	–	–	22	22 (22.02)
Seedlings having no parents within the quadrat	first	–	–	–	7	7 (9.08)
	second	–	–	–	7	7 (9.08)
Total		0	0	96	36	132

The number in parentheses under "Source of gene flow" is the number of seedlings that could be explained by the genome of one parent (self-pollination). The number in parentheses under "Total gene flow" is the number of seedlings corrected for the value of cryptic gene flow. Because the numbers of seedlings whose parents were unambiguously identified were 64 in plot S1, 67 in plot S2, and 66 in plot S3, the totals sum up to 128 in plot S1, 134 in plot S2, and 132 in plot S3.

Table IV-4. Results of multiple regression analysis, in which the dependent variable is the relative fertility of the adult trees (%) that contributed as parents of the seedlings, and the independent variables are adult tree height and the natural logarithm of the distance from the center of the seedling bank.

Dependent variables	R^2 (adjusted)	F	P	Independent variables	Standardized coefficient	T	P
Relative fertility of adults within A1	0.213	0.814	0.4867	Constant	18.053	3.207	0.0184
				Tree height	-0.286	-0.767	0.4721
				ln (distance from S1)	-0.301	-0.809	0.4495
Relative fertility of adults within A2	0.709	12.173	0.0021	Constant	26.614	3.389	0.0069
				Tree height	-0.020	-0.103	0.9201
				ln (distance from S2)	-0.851	-4.446	0.0012
Relative fertility of adults within A3	0.726	13.223	0.0016	Constant	-5.278	-0.966	0.3570
				Tree height	0.732	4.333	0.0015
				ln (distance from S3)	-0.317	-1.875	0.0902
Relative fertility of adults within A1, A2, and A3	0.406	12.617	<0.0001	Constant	1.608	0.975	0.3368
				Tree height	0.422	3.100	0.0040
				ln (distance from seedling bank)	-0.423	-3.113	0.0039

F , F statistic = (mean square of regression)/(mean square of residual); P , P value (or significant level);

T , T statistic = (standardized coefficient)/(standard error).

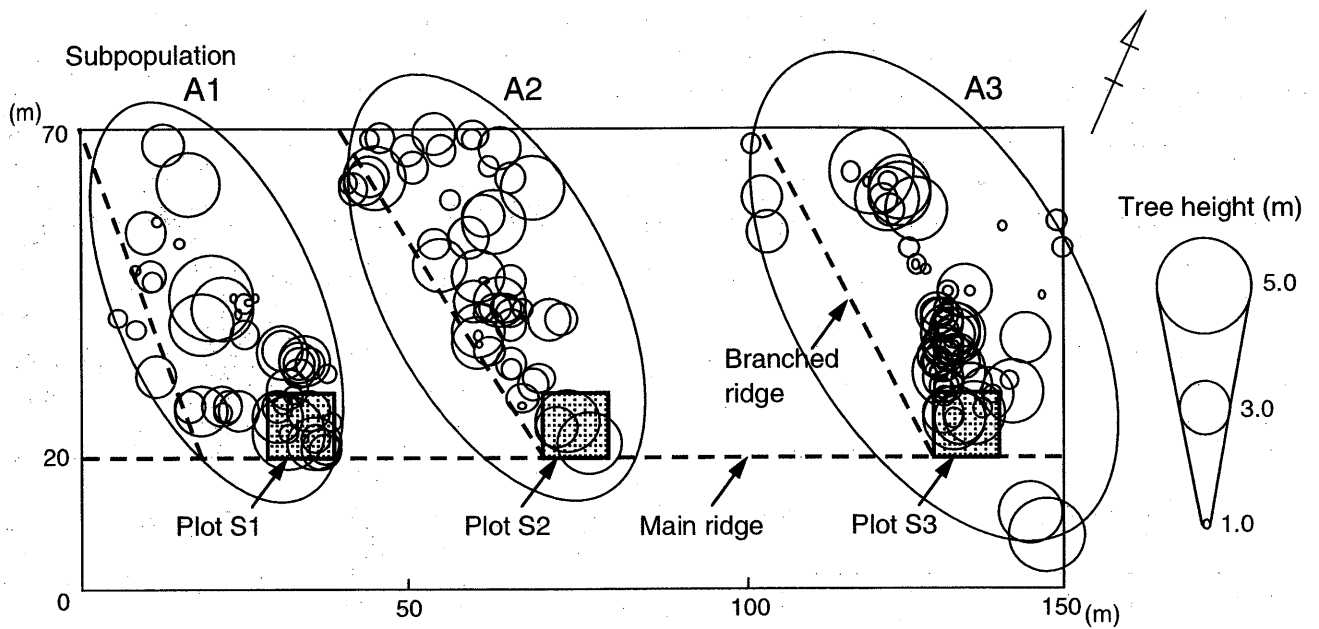


Fig. IV-1. Map of study site. Three stripe-shaped subpopulations of *Rhododendron metternichii* (A1, A2, A3) grew along the northern slopes of branch ridges off the main ridge. Seventy seedlings were randomly collected from small plots (S1, S2, S3) within each subpopulation for parentage analysis.

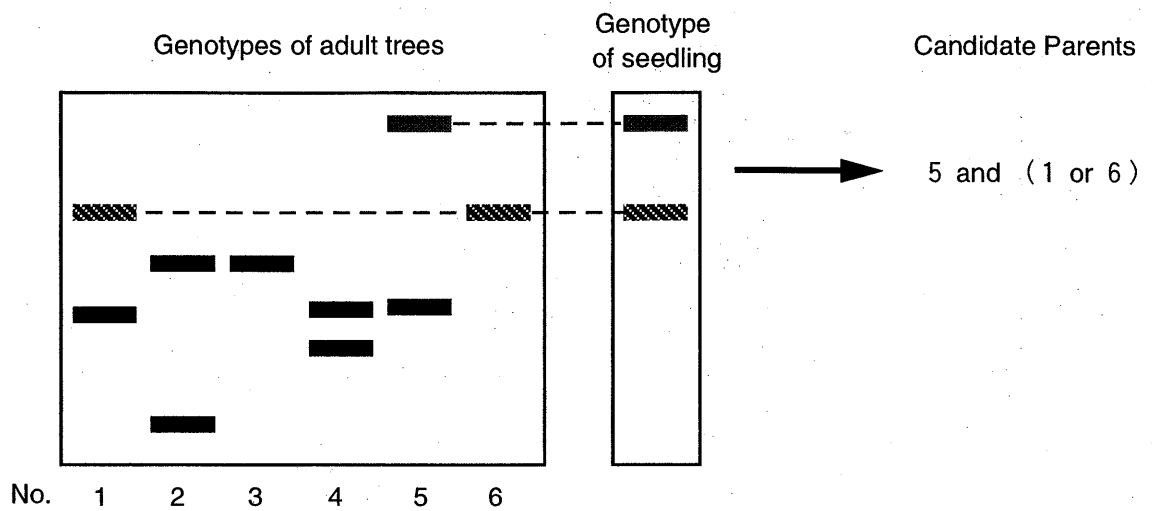


Fig. IV-2. Concept of parentage analysis. The adults which do not have any matching haplotypes with seedlings are excluded. In the present case, one parent (pollen donor or seed parent) of target seedling are No. 5. While there are two candidates for the other parent, true parent would be identified by repeating this analysis at other loci.

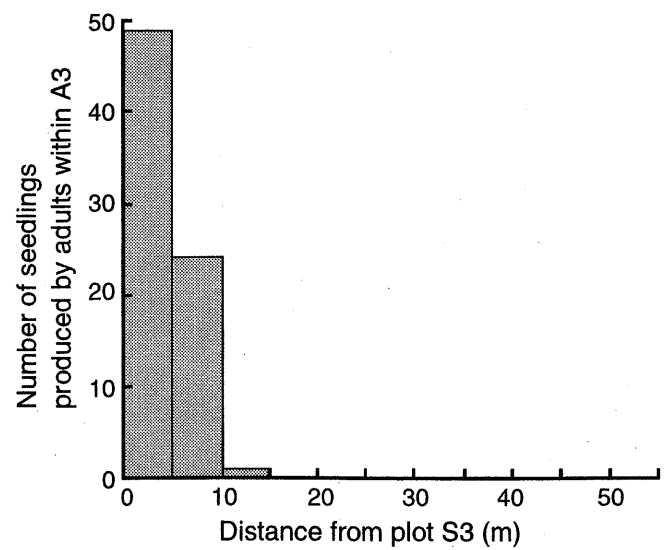
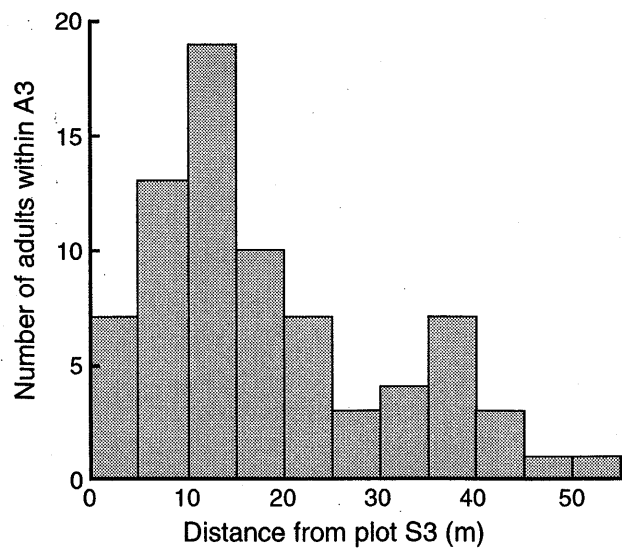
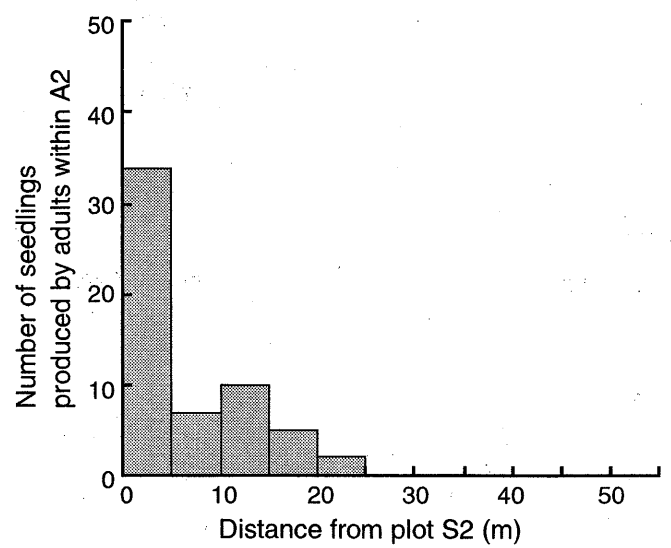
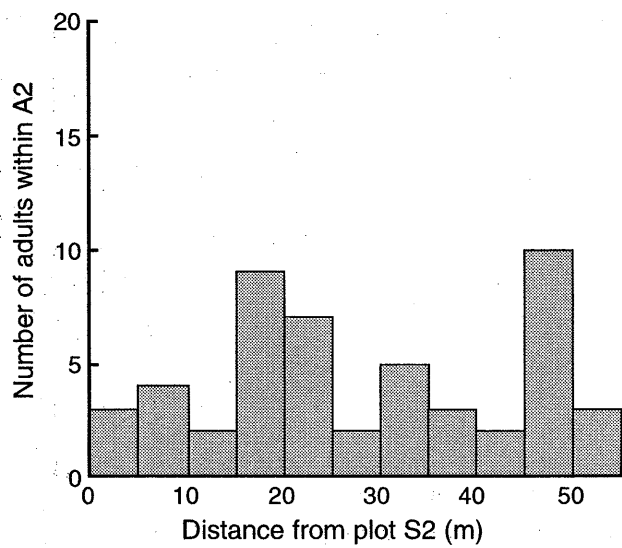
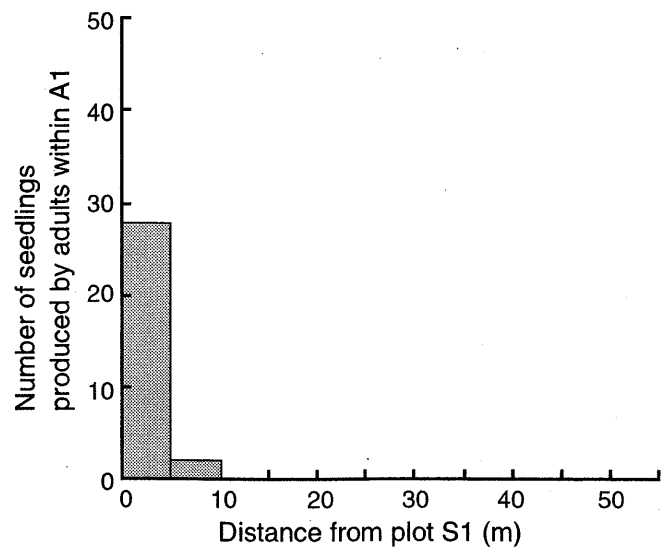
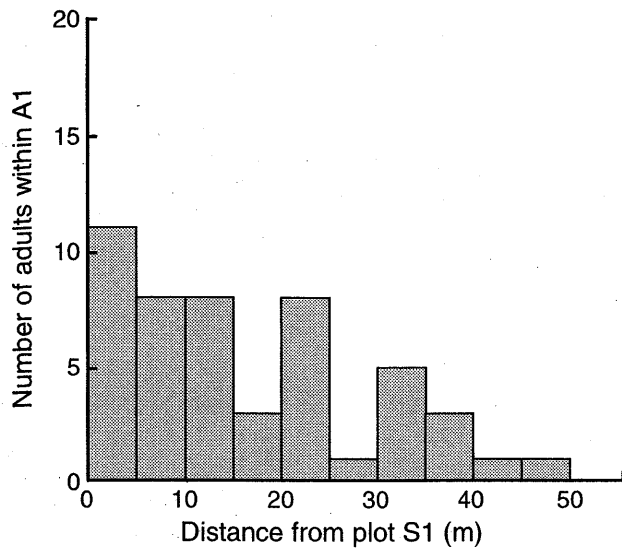


Fig. IV-3. Numbers of adult trees of each distance class from the center of the seedling bank (left) and numbers of seedlings produced by adults of each distance class (right) in subpopulations A1 (upper), A2 (middle), and A3 (lower).

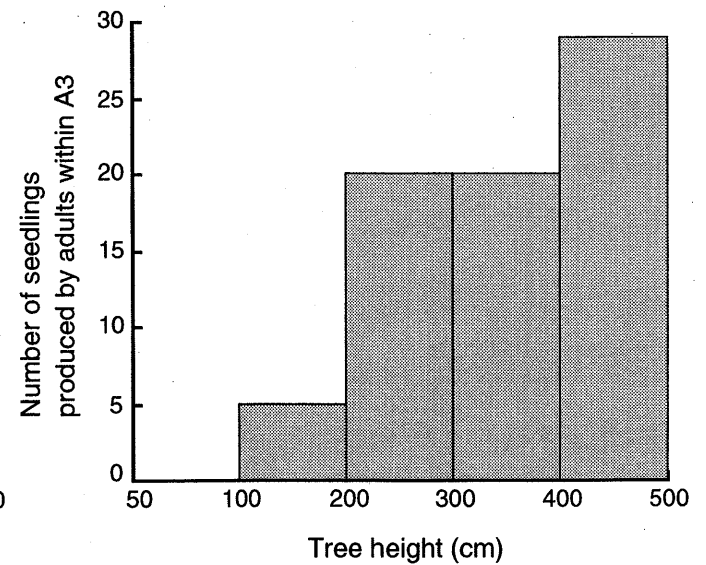
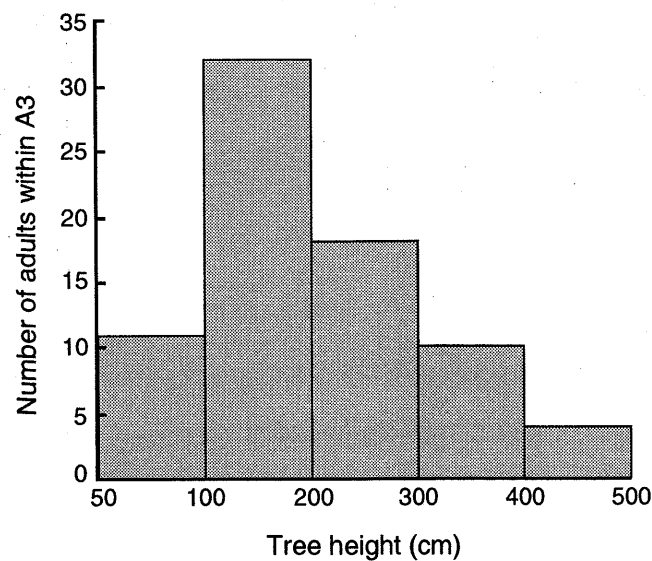
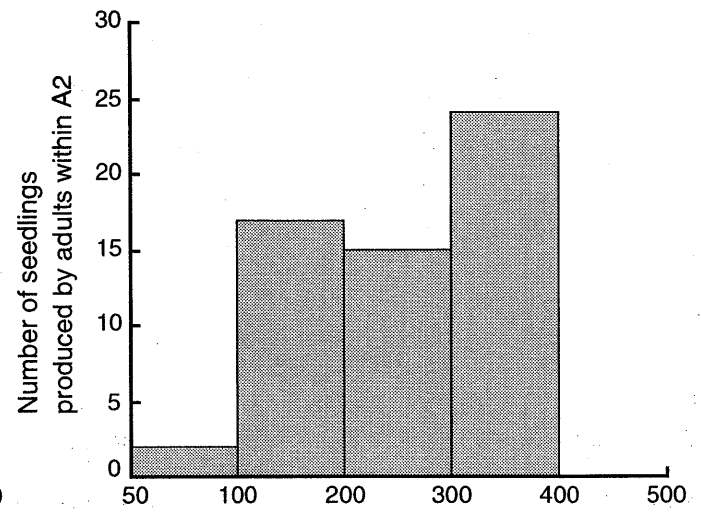
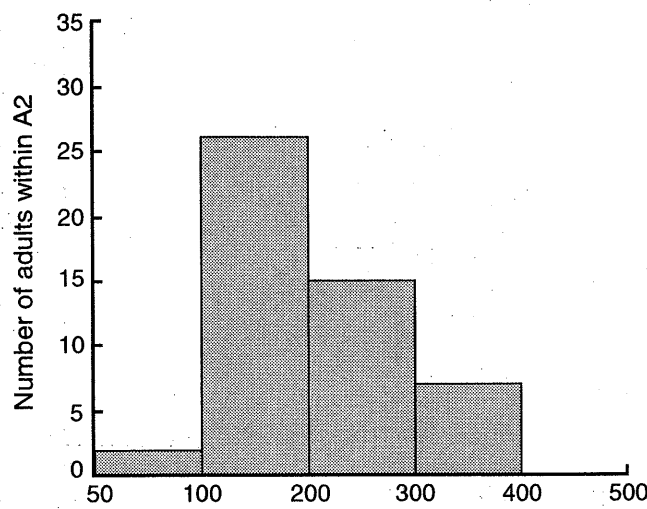
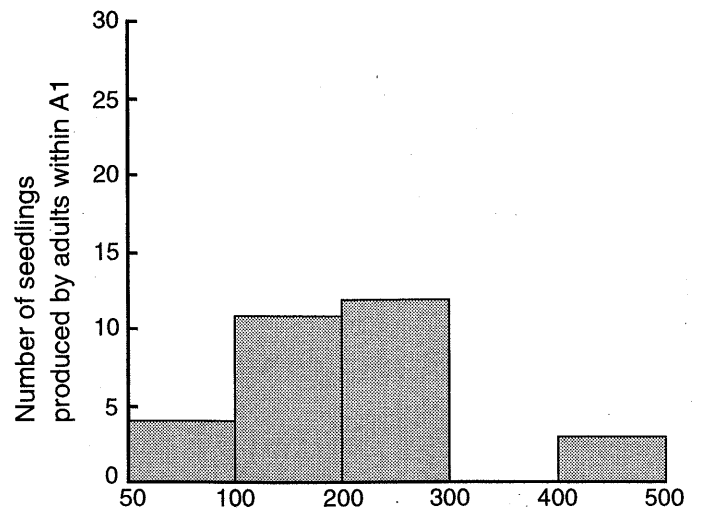
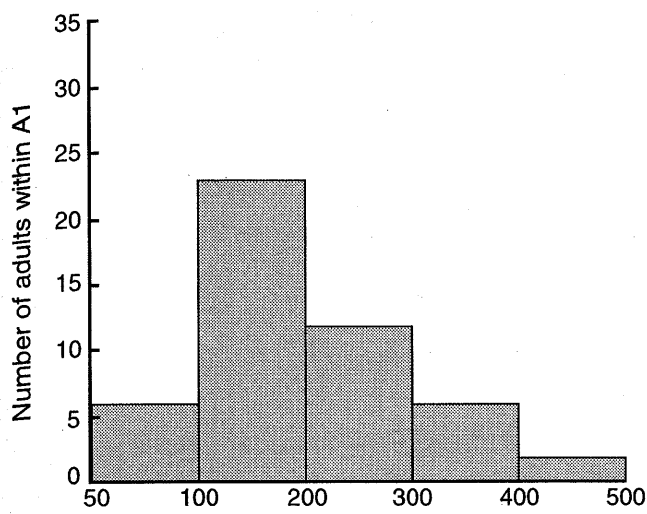


Fig. IV-4. Height class distribution (left) and numbers of seedlings produced by adults of each height class (right) in subpopulations A1 (upper), A2 (middle), and A3 (lower).

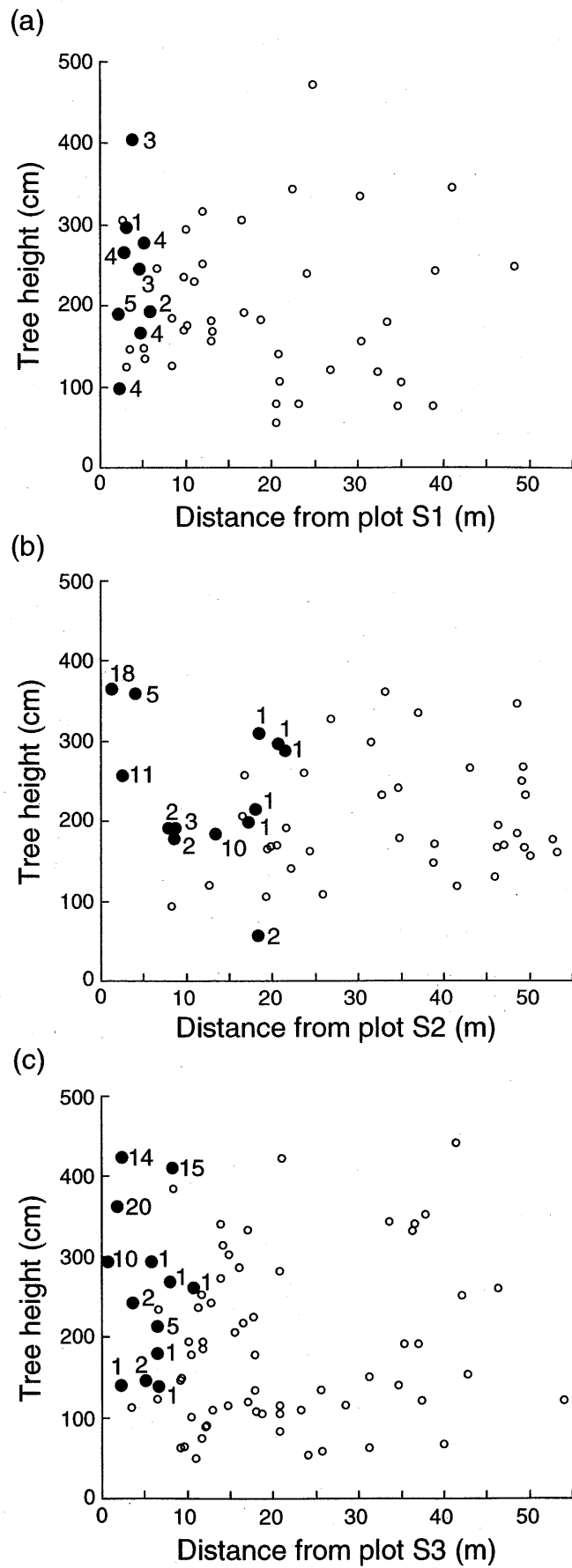


Fig. IV-5. Fertilities of adult trees in relation to distance from seedling bank and tree height: (a) within A1, (b) A2, (c) A3. Adult trees that produced seedlings are shown by closed circles. Figures beside the circles show the numbers of seedlings produced by each adult.

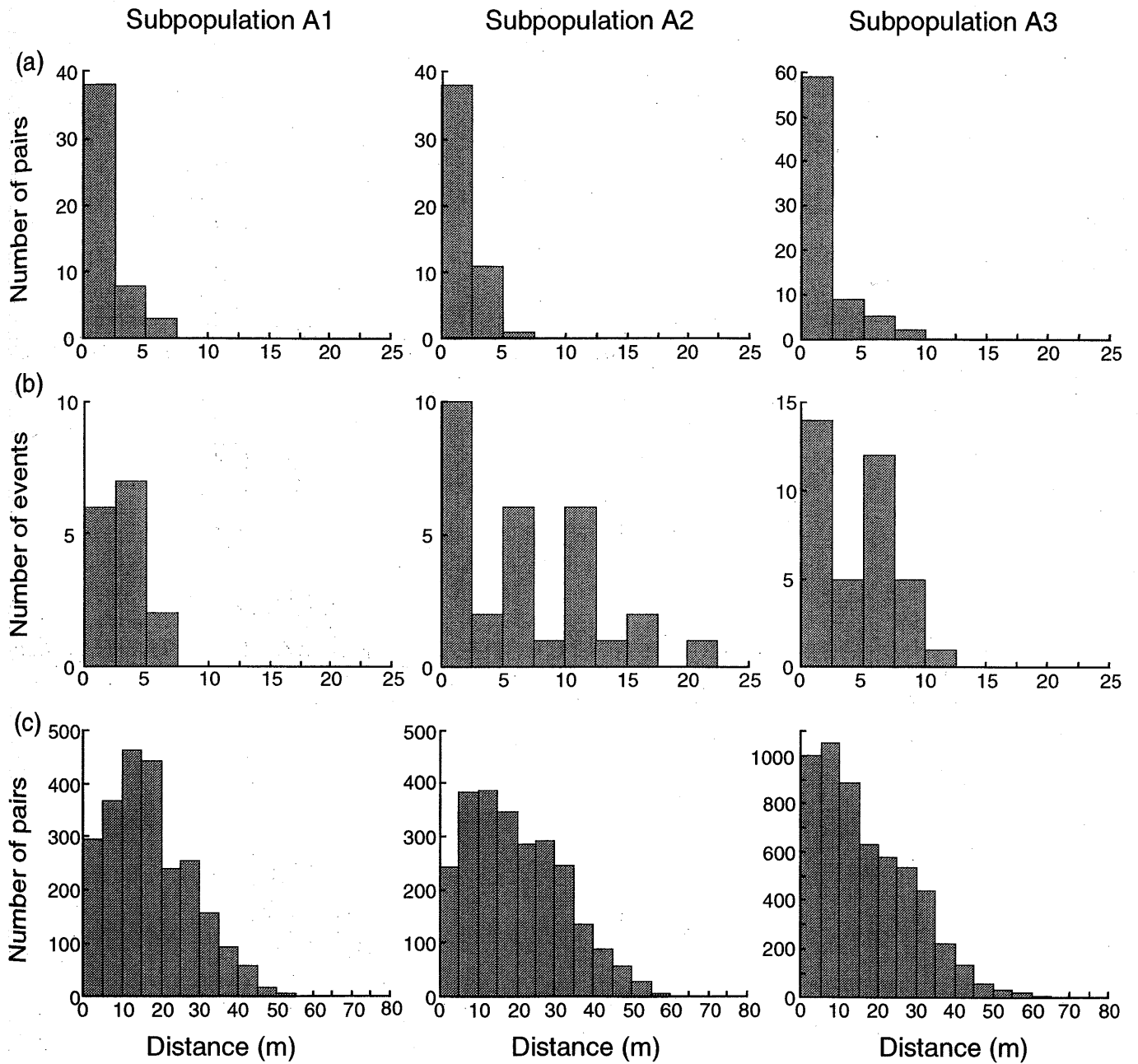


Fig. IV-6. (a) Distance class distributions within each subpopulation of nearest neighbors for each adult, (b) pollen movement inferred from parentage analysis, and (c) random pairs of adult trees.

第 V 章 血縁構造の形成と維持

V-1 はじめに

ホンシャクナゲ個体群における実生の定着サイト (第 II 章), 花粉の散布パターン (第 III 章), 実生バンクへの遺伝子流動 (第 IV 章) について, ここまでの各章で明らかにしてきた. 本章では, これら遺伝子の散布および定着の過程がホンシャクナゲ個体群にどのような血縁構造をもたらしているのか, 血縁構造の有無や強弱を決定する要因は何なのかといった問題を明らかにする.

植物個体群はランダムに分布するのではなく, 時間的, 空間的な構造を持っている. 同様に, 個体群の構成要素である個体, その個体が示す遺伝子型や対立遺伝子といったものも一様に分布するのではなく, 何らかの構造を持っていることが多い. 限られた遺伝子流動や遺伝的浮動, 自然選択, 植物の生活史特性, 個体群を取り巻く環境要因の違いといった要因によって, 植物個体群には様々な遺伝的構造が形成され, その構造は個体群内部, 個体群間, あるいは各個体の子孫集団といった多様なスケールに及んでいる.

植物個体群を対象に遺伝的構造の有無を調査し, 個体群の内部において距離的に近い個体ほど遺伝的にも類似していることを明らかにした例は数多くある. 例えば, カエデ属の落葉高木 *Acer saccharum* (サトウカエデ) (Perry & Knowles 1991), 2 種の落葉樹, クワ科ハリグワ属の *Maclura pomifera* とマメ科サイカチ属の *Gleditsia triacanthos* (Schnabel *et al.* 1991), 熱帯雨林に生育する 3 種の樹木 *Platypodium elegans*, *Swartzia simplex* var. *ochanacea*, *Alseis blackiana* (Hamrick *et al.* 1993), コナラ属の高木 *Quercus laevis* (トルコカシ) (Berg & Hamrick 1995), 温帯多雨林に生育する高木樹種 *Atherosperma moschatum* (Shapcott 1995), ユリ科ジョウジョウバカマ属の *Heloniopsis orientalis* (ジョウジョウバカマ) (Miyazaki & Isagi 2000), ツバキ科ツバキ属

の常緑高木 *Camellia japonica* (ヤブツバキ) (Ueno *et al.* 2000) などでは、程度の違いはあるものの近距離の個体ほど遺伝的類似性が高いという傾向が認められた。これらの研究では、種子や花粉の散布が限られていることや、無性生殖によるクローン個体の存在によって、個体群内部に遺伝的構造が形成されたと説明している。

一方で、遺伝的構造が確認されなかった植物個体群も存在する。例えば、マツ属の高木 *Pinus contorta* (Epperson & Allard 1989), コナラ属の高木 *Quercus macrocarpa* (Geburek & Tripp-Knowles 1994), トウヒ属の高木 *Picea abies* (ノルウェイトウヒ) (Leonardi *et al.* 1996), ブナ属の高木 *Fagus sylvatica* (Leonardi & Menozzi 1996) では、遺伝的にほぼランダムな分布を示していた。これは種子や花粉の長距離散布によるもので、種の生活史特性の違いを反映したものと考えられている。

このように、種子・花粉の散布能力の違い、クローン繁殖の有無といった生活史特性の違いによって、個体群内部の遺伝的構造の有無や強弱が変化することは容易に推察できる。しかし、同一の種であっても、ハビタットへの定着や更新のプロセスが異なると、集団の遺伝的構造が変化することが知られている。Knowles ら (1992) は、侵入の歴史が異なっている2つの個体群を対象として、カラマツ属の高木樹種 *Larix laricina* の遺伝的構造を調査した。彼らが調査したのは、20年ほど前に皆伐され、現在は *Picea mariana* と *Betula papyrifera* の混交林になっている 2.02 ha の場所 (以下、原著に従い Cutover 個体群と呼ぶ) と、放棄された牧草地で、現在は *Larix laricina* とともに *Pinus mariana* や *Populus balsamifera* が生育している 0.22 ha の広さの場所 (以下、Field 個体群) である。どちらの *Larix laricina* 個体群も、著しい人為的攪乱の後に成立したもので、林齢もほぼ同じである。しかし、Cutover 個体群では明瞭な遺伝的構造が認められたのに対し、Field 個体群にはそのような構造は存在しなかった (Knowles *et al.* 1992)。Field 個体群は面積的にも 0.22 ha と小さく、

数十年にわたって牧草地として維持され、放棄された後に、隣接する *L. laticina* 個体群の種子散布によって一斉に成立したのに対し、Cutover 個体群は 2.02 ha と広く、伐採を免れた *L. laticina* の実生あるいは種子によって再生したものと推察される (Knowles *et al.* 1992). 即ち、周辺個体群から供給された多様な種子によって更新した Field 個体群では遺伝的構造が見られないのに対し、Cutover 個体群ではいくつかの創始者 (founder) が種子の集中的な供給源として働き、近隣に多くの子孫を残すとともに、創始者自身が過去の遺伝的構造を反映しているために、個体群内部の遺伝的構造が強化されたと考えられる (Knowles *et al.* 1992). 同じ種であっても、定着や更新プロセスの違いによって集団の遺伝的構造が変化することを示したもう一つの例として、Boyle ら (1990) の研究がある。彼らはトウヒ属の高木樹種 *Picea mariana* を対象に調査をおこない、低地の個体群では遺伝的構造が認められるが、より高密度で生育している高地の個体群にはそのような構造が存在しないことを示した (Boyle *et al.* 1990). これは、低地の個体群が大きな攪乱を受けずに更新しているのに対し、高地の個体群は火事が起きた後の一斉更新によって成立したためと推察された (Boyle *et al.* 1990).

以上のように、複数の研究によって植物の生活史特性の違いや、個体群の成立および更新プロセスの違いによって集団内の遺伝的構造に差が生じることが明らかにされている。しかし、個体の分布様式や個体群の構造、遺伝子流動のパターンの違いによって、同一種の遺伝的構造がどのように変化するかについては、ほとんど研究されていない。遺伝子流動とは、成木集団の遺伝子が次世代に引き継がれていく過程であり、個体の分布や個体群の構造と相互に影響を及ぼし合っている。第 IV 章で述べたとおり、いくつかの研究によって遺伝子流動が idiosyncratic (特異的) なパターンを示し、種、個体群、個体、季節によって大きく変化することが分かっている (Ellstrand & Marshall 1985; Hamrick 1987; Slatkin 1987). 従って、同一の種であっても、個体の分布

や個体群の構造，遺伝子流動のパターンの違いといった生態学的要因によって，異なった遺伝的構造が生じる可能性がある。

本章では，ホンシャクナゲ個体群を対象として，1) 個体間の地理的な距離と血縁度との関係，2) サブ個体群間およびサブ個体群内部における血縁度の大きさ，3) 血縁構造の有無や強弱と遺伝子流動との関係，を明らかにする。

V - 2 方法

V - 2 - 1 野外調査および実験方法

調査はこれまでと同様に，鎌倉寺山の山頂付近に設置した 150 m×70 m の方形区内でおこなった (Fig. V-1)。解析対象としたのは，方形区内に生育している 174 個体の全成木である。第 IV 章，IV-2-2 の遺伝解析によって，12 遺伝子座における全成木の遺伝子型が既に決定されている。ただし，本章ではヌル対立遺伝子の存在によって血縁度の推定値に誤差が生じるのを防ぐため，5%以上の頻度でヌル対立遺伝子が存在すると思われる 4 つの遺伝子座 RM1D9，RM2D6，RM3D1，RM3D2 は解析から除外し，残り 8 つの遺伝子座 RM1D1，RM1D5，RM1D12，RM2D2，RM3D4，RM7D9，RM9D1，RM9D6 の遺伝子型にもとづいて血縁度を推定した。ヌル対立遺伝子頻度の推定方法については第 IV 章，IV-2-3 親子分析の後半部で述べたとおりであり，推定されたヌル対立遺伝子頻度，対立遺伝子の数，ヘテロ接合度などは Table IV-2 にまとめている。本章で用いた 8 つの遺伝子座におけるヌル対立遺伝子頻度は平均 0.0125 と小さいため，血縁度の推定にはほとんど問題にならないと考えられる。

V - 2 - 2 血縁度の推定

個体 I の個体 J への血縁度 R_{IJ} は， J の遺伝子のうち I に存在する遺伝子と

同祖的 (identical by descent, IBD), すなわち少し前の共通祖先が持つ一つの遺伝子のコピーであるものの割合として定義される (Smith 1995). 二倍体の種では $R_{IJ} = R_{JI}$ であり, 母親も父親も同じ全兄弟 (full-sib) では $R = 0.5$, 片親だけが同じ半兄弟 (half-sib) では $R = 0.25$ となる.

血縁度を推定する最も一般的な方法は, 系図の経路分析を行うことであり (Cannings & Thompson 1981), この場合の血縁度は次式で定義される (Smith 1995).

$$R_{IJ} = 2 \sum (1/2)^{n+1}$$

ここで, n は I からいったん共通祖先に遡り, そこから J に帰るような経路に含まれるステップ数であり, 和はそのような経路の全てについて計算する.

例えば, 両親が共通の全兄弟 A と B がいたとすると, A から母親に遡り, B へ帰るまでのステップ数が 2, 父親に遡って B へと帰るステップ数も 2 であるから, A と B の血縁度 $R_{AB} = R_{BA} = 2[(1/2)^{2+1} + (1/2)^{2+1}] = 2[(1/8) + (1/8)] = 1/2$ となる. 同様に, 母親だけが同じ半兄弟 A, B の場合には, 父親を経由したルートは存在しないため, A と B の血縁度 $R_{AB} = R_{BA} = 2[(1/2)^{2+1}] = 2(1/8) = 1/4$ である. しかし, 野外集団において正確な系図を得ることは極めて困難であり, 通常は不可能と言っても良い.

近年, 遺伝マーカーの発達によって系図の情報なしに個体間の血縁度を推定することが可能になり, 今日までに様々な統計的手法が開発されている (Ritland 2000). 遺伝マーカーを用いた血縁度の推定には, 初めは DNA 指紋法 (DNA fingerprinting) のデータが用いられていた (Lynch 1988). しかし, DNA 指紋法はマイクロサテライト遺伝マーカーや酵素多型のような共優性マーカーではないため, たまたま一致したバンドが対立遺伝子の一致によるものなのか, 偶然によるものなのか, さらにそのバンドがヘテロ接合なのか, ホモ接合なのかを区別することができない. そのため現在では, 共優性マーカーによって推定された遺伝子型に基づき, 最尤法かモーメント法のいずれ

かの方法を用いて血縁度を推定するのが一般的である (Ritland 2000)。最尤法は、解析対象の集団を全兄弟と半兄弟に区分するといった、前提条件を含んだ解析に最も有効であり、Thompson (1975) がこの方法のパイオニア的存在である (Ritland 2000)。一方、モーメント法は対象とする個体が持つ遺伝子が他の個体の持つ遺伝子と同祖的である確率、即ち血縁度の推定に最も適しており (Ritland 2000)、本章で使用した Queller & Goodnight (1989) の推定法もモーメント法を用いている。

Queller & Goodnight (1989) による血縁度の推定方法を説明する前に、植物個体群の研究に頻繁に使われているもう一つの指数、Moran's I について述べておく。Moran's I は個体間の血縁度に類似した指数であり、空間的自己相関 (Spatial autocorrelation) を用いて個体群内部の遺伝的変異を定量的に把握するために用いられる (Barbujani 1987; Epperson & Li 1996)。しかし、空間的自己相関分析は個々の対立遺伝子の分布パターンを解析する方法であり、その遺伝子が同祖的かどうか、即ち個体間の血縁度に着目したものではない (Ritland 2000)。また、いくつかの研究によって、複数の対立遺伝子 (Epperson *et al.* 1999) や、複数の変数 (Smoue & Peakall 1999) に対しても適用可能な手法が開発されつつあるものの、通常の数学的手法によって Moran's I による空間的自己相関分析を複数の対立遺伝子や遺伝子座に拡張することは困難である (Ritland 2000)。

本研究の目的は、ホンシャクナゲ個体群における血縁構造の有無や強弱を推定し、それをもたらしている要因を明らかにすることであり、Queller & Goodnight (1989) によって開発された推定方法を用いるのが最適であると考えられる。Queller & Goodnight (1989) では、個体 X と Y の血縁度 R_{XY} を下記の数式から推定する。

$$R_{XY} = \{ \sum_X \sum_K \sum_L (P_Y - P^*) \} / \{ \sum_X \sum_K \sum_L (P_X - P^*) \}$$

ここで、 K は遺伝子座、 L は対立遺伝子の位置で、2倍体であれば1か2、

半数体ならば常に1である。また、 P_x は個体 X の遺伝子座 K, 対立遺伝子の位置 L に見られる対立遺伝子の、個体 X における頻度で、2倍体であれば0.5か1の値をとる。 P_y は個体 X と同じ対立遺伝子が個体 Y に存在する頻度、 P^* は集団全体におけるその対立遺伝子の頻度である。この式から推定される血縁度 R は、-1.0 から 1.0 の値をとり、集団全体ではゼロになる。マイナスの値は、両個体に共通している対立遺伝子の頻度が集団全体の平均値よりも少ないことを示している。本研究では、8つのマイクロサテライト遺伝マーカーを用いて各個体の遺伝子型を特定し、Queller & Goodnight (1989) によって開発されたプログラム Relatedness 5.0.7 を使用して個体間の血縁度を推定した。

血縁度の推定は多くの遺伝情報を用いるほど正確になり、解析する遺伝子座を増やしたとき、それによって増加する情報量はその遺伝子座における対立遺伝子の数にほぼ比例する (Ritland 2000)。例えば、ある遺伝子座において対立遺伝子が1つ増加することは、2つしか対立遺伝子がない遺伝子座を全ての個体についてもう1つ解析するのと同様の効果を持つ (Ritland 2000)。さらに、稀な対立遺伝子が多いほど血縁度に関する情報量は増加する。これは稀な対立遺伝子を共有する個体は、より普遍的な対立遺伝子を共有している個体よりも血縁度が高いと考えられるからである (Ritland 2000)。

これらのことから、超多型を示すマイクロサテライト遺伝マーカーは、血縁度の推定に最も適したマーカーといえる。また、先述したとおり、植物個体群の遺伝的構造の解析に頻繁に用いられている Moran's I は、個々の対立遺伝子の分布パターンを解析するための指数であり、複数の対立遺伝子の情報を総合的に判断することは困難である (Ritland 2000)。酵素多型のように、対立遺伝子の数が少ない場合にはこのことは余り問題にならなかったが、遺伝子座あたり数十の対立遺伝子を持つマイクロサテライト遺伝マーカーを使用する場合、個々の対立遺伝子について Moran's I を算出し、その平均値から総合的なパターンを把握するといった方法には問題があるだろう。植物個体群

における遺伝的構造の有無や強弱を解析した研究は多数あるが、本章の第一節で紹介した研究例の多くが酵素多型と Moran's I 、あるいはそれに類似した指数と、空間的自己相関分析を用いたものである。超多型を示すマイクロサテライト遺伝マーカーの登場により、統計的な解析手法も様々に変化しており、マイクロサテライト遺伝マーカーによって個体の遺伝子型を特定し、血縁度を推定する本研究のやり方は、集団の遺伝的構造を正確に把握する上で優れた方法と言えるだろう。

V - 2 - 3 マンテルテスト

Relatedness 5.0.7 (Queller & Goodnight 1989) によって血縁度を推定した後、地理的な距離と血縁度との関係を定量的に把握するため、R Package 4.0 (Casgrain & Legendre 1999) を用いてマンテルテストをおこなった。マンテルテストは二つの異なった目的で使用される (Legendre & Legendre 1998)。一つ目は通常マンテルテスト (simple Mantel test; Mantel 1967) で、2つの距離行列、即ち本研究の場合には個体間の血縁度と地理的距離との相関係数 Mantel's r を算出する。もう一つはモデル行列への適合度を解析するもので、単純な距離行列に留まらず、様々な仮定に基づいてモデル行列を構築し、推定値 (本研究の場合は個体間の血縁度) がそのモデルに適合するかどうかを判断する。本研究では Oden & Sokal (1986) の方法に従ってモデル行列への適合度を解析した。具体的には、全体が k 通りの小集団に区分されたモデル行列の場合、各小集団において 0 と 1 の二項のみで構成される行列を作成し、マンテルの相関係数 (Mantel's r) を計算する。例えば、3番目の小集団では $k = 3$ 以外の全ての数字をゼロとし、 $k = 3$ を $k = 1$ に変換した上で、相関係数 (Mantel's r) を算出する。それぞれの小集団について同様の解析を繰り返し、 k 通りの相関係数を得る。つまり、ある仮定上の小集団 ($k = 1$) の持つ推定値、本研究では血縁度、が他の全集団 ($k = 0$) の持つ推定値と比較してどれくら

いプラス或いはマイナスに片寄っているのかを相関係数によって定量化することができる。推定された相関係数 (Mantel's r) がゼロから有意に異なっているかどうかは、片方の行列の値をランダムに入れ替え、多数回に渡って同様の解析 (permutation) をおこなって、実際の値と比較することで検証できる。例えば、999 回のパーミュテーションをおこない、実際の相関係数ほど高い値が一度も得られなかったとすると、その相関関係は危険率 $[1 / (1 + 999)] \times 100 = 0.1\%$ で有意にプラスであると判断できる。本研究では 0.1% の精度で危険率を判定するため、R Package 4.0 (Casgrain & Legendre 1999) を用いて 999 回のパーミュテーションをおこなった。ただし、一つの母集団を複数の小集団に分けてモデル行列への適合性を検証する場合には、3 群以上を対象とした通常の検定と同様に、そのうち一つの組み合わせがたまたま有意と判断される可能性が増加する。そのため、R Package 4.0 (Casgrain & Legendre 1999) では区分した小集団の数に応じて Bonferroni 補正をおこない、有意差を判定している。

個体間の地理的距離と血縁度との全体的な傾向を把握するため、地理的距離を 10 m ごとに 15 に区分し、各距離階を 1 つの小集団と考えてマンテルテストをおこなった。これにより、各距離階に属する個体間の血縁度が、他と比較してどの程度異なっているのかを判断できる。さらに、地理的分布から判断された 3 つのサブ個体群 (A1, A2, A3) と遺伝的な血縁度との関係を明らかにするため、150 m × 70 m の方形区内に生育する個体を、サブ個体群内部 (A1-A1, A2-A2, A3-A3)、隣接するサブ個体群間 (A1-A2, A2-A3)、離れたサブ個体群間 (A1-A3) の 3 つに区分してマンテルテストをおこなった。同様に、A1-A1, A2-A2, A3-A3, A1-A2, A2-A3, A1-A3 の 6 つに区分した場合でもマンテルテストをおこなった。また、各サブ個体群において通常のマンテルテスト (simple Mantel test) をおこない、相関係数 (Mantel's r) および P 値の違いから地理的距離と血縁度との関係の強さを比較した。

樹高の違いによる遺伝構造の有無，強弱を明らかにするため，これら全ての解析は，1) 全個体，2) 樹高 2.0 m 以上，3) 樹高 2.0 m 未満のそれぞれについておこなった。樹高 2 m というサイズは個体数をほぼ等しくするために定めた基準である。

V - 3 結果

鎌倉寺山山頂付近に設置した 150 m×70 m の方形区内には 174 個体の成木が生育しており，サブ個体群 A1, A2, A3 に分布しているのは，それぞれ 49 個体，50 個体，75 個体である (Fig. V-1)。このうち樹高 2.0 m 以上の個体と樹高 2.0 m 未満の個体の数は，サブ個体群 A1 でそれぞれ 20 個体と 29 個体，サブ個体群 A2 で 22 個体と 28 個体，サブ個体群 A3 では 32 個体と 43 個体であった。第 IV 章で示したとおり，血縁度の推定に使用した 8 つのマイクロサテライト遺伝マーカー RM1D1, RM1D5, RM1D12, RM2D2, RM3D4, RM7D9, RM9D1, RM9D6 は超多型を示し，遺伝子座あたり 6–33 個，平均 13.4 個の対立遺伝子を持っていた (Table IV-2)。

本研究では，個体間の血縁度 (R) の行列を Relatedness 5.0.7 (Queller & Goodnight 1989) によって作成し，地理的な距離行列あるいはモデル行列との相間関係を R Package 4.0 (Casgrain & Legendre 1999) を用いたマンテルテスト (Mantel's r) によって定量化した。

V - 3 - 1 血縁構造の全体像

個体間の地理的距離によって血縁度 (R) に差があるかどうかを検証するため，個体間距離を 10 m ごとに 15 に区分し，マンテルテストをおこなった (Fig. V-2)。Fig. V-2 の横軸は 10 m ごとの距離階，縦軸は各距離階における相関係数 Mantel's r である。距離階 1 には，距離 10 m 未満に生育している自個体を除いた全個体，距離階 2 には距離 10 m 以上，20 m 未満の全個体が含まれて

おり、距離 140 m 以上 150 m 未満の個体を含む距離階 15 まで以下同様となっている。相関係数 Mantel's r が高いほど、その距離階における個体間の血縁度 (R) が他の個体同士の血縁度よりも高いことを示しており、黒丸は $P < 0.05$ で有意にゼロから異なっていることを意味する。

方形区内に生育する全 174 個体を対象として解析をおこなった結果 (Fig. IV-2a), 相関係数 Mantel's r は比較的近距离の第 1 番目 (0–10 m) と第 3 番目 (20–30 m) の距離階で有意に正の値を示した後、第 4 番目から第 9 番目 (30–90 m) の範囲ではゼロ、第 10 番目から第 12 番目 (90–120 m) で有意に負の値を示した。同様の傾向は、樹高 2.0 m 以上 (Fig. V-2b) の個体および 2.0 m 未満 (Fig. V-2c) の個体についても認められ、いずれの場合も距離 10 m 以内に生育する個体の血縁度が有意に高かった。遠く離れた個体が負の血縁度を示すポイントには若干のばらつきがあり、樹高 2.0 m 以上の個体では 11 番目の距離階 (100–110 m) のみで負の関係が認められたのに対し (Fig. V-2b), 樹高 2.0 m 未満の個体では第 7 番目 (60–70 m), 第 10 番目 (90–100 m), 第 14 番目 (130–140 m) において負の値を示していた (Fig. V-2c)。いずれの個体サイズにおいても、第 2 番目から第 6 番目 (10–60 m) の距離階ではゼロからの有意な差異は認められなかった。

V - 3 - 2 血縁度の階層構造

本節では、個体間の単純な距離ではなく、地理的分布から認められる 3 つのサブ個体群 A1, A2, A3 の間にどのような血縁構造があるのかを検証した。モデル行列として個体間距離をサブ個体群内部 (A1–A1, A2–A2, A3–A3), 隣接するサブ個体群間 (A1–A2, A2–A3), 離れたサブ個体群間 (A1–A3) の 3 グループに区分し、マンテルテストによってモデルへの適合性を検証した (Table V-1)。Table V-1 には、方形区内の全個体、樹高 2.0 m 以上の個体、樹高 2.0 m 未満の個体それぞれについて、サブ個体群内部、隣接するサブ個体

群間，離れたサブ個体群間における個体間血縁度の平均値と標準誤差，相関係数 Mantel's r の値と有意水準が示してある。

全個体を対象とした解析の結果，個体間の血縁度（平均±SE）は，サブ個体群内部で 0.015 ± 0.002 ，隣接したサブ個体群間で -0.002 ± 0.002 ，離れたサブ個体群間では -0.029 ± 0.003 であった（Table V-1）。相関係数 Mantel's r は，サブ個体群内部で 0.078 ，隣接したサブ個体群間で 0.004 ，離れたサブ個体群間で -0.091 であり，得られた値はサブ個体群内部で有意に正（ $P < 0.005$ ），離れたサブ個体群間では有意に負（ $P < 0.005$ ），隣接するサブ個体群間での有意差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。この傾向は樹高には関係なく，樹高 2.0 m 以上の個体および樹高 2.0 m 未満の個体のいずれにおいても，サブ個体群内部の血縁度は有意に高く（ $P < 0.005$ ），隣接するサブ個体群間では有意差が無く（ $P > 0.05$ ），離れたサブ個体群間の血縁度は有意に低い（ $P < 0.005$ ）という関係が認められた（Table V-1）。

モデル行列として方形区内の集団を，A1-A1, A2-A2, A3-A3, A1-A2, A2-A3, A1-A3 の6つに細分し，同様の解析をおこなった（Table V-2）。その結果，樹高の違いに関わらず，離れたサブ個体群間（A1-A3）では負の相間関係（ $P < 0.01$ ）が認められ，隣接するサブ個体群間（A1-A2, A2-A3）ではゼロからの有意差は無かった（ $P > 0.05$ ）。しかし，サブ個体群内部の血縁度は，樹高および各サブ個体群によって大きく異なっていた。方形区内の全個体を対象とした解析では，サブ個体群内部の血縁度（平均±SE）はサブ個体群 A1 で 0.030 ± 0.005 ，サブ個体群 A2 で 0.020 ± 0.005 ，サブ個体群 A3 で 0.006 ± 0.003 であり，相関係数 Mantel's r はサブ個体群 A1 で 0.059 （ $P < 0.01$ で有意），サブ個体群 A2 で 0.042 （ $P < 0.05$ で有意），サブ個体群 A3 で 0.026 （ $P > 0.05$ で有意差無し）であった。樹高 2.0 m 以上の個体を対象とした解析では，サブ個体群内部の血縁度（平均±SE）はサブ個体群 A1 で 0.019 ± 0.012 ，サブ個体群 A2 で 0.034 ± 0.012 ，サブ個体群 A3 で 0.026 ± 0.007 であった。相関係数 Mantel's r

はサブ個体群 A1 で 0.032, サブ個体群 A2 で 0.063, サブ個体群 A3 で 0.075 であり, どの個体群でもゼロからの有意差は認められなかった ($P > 0.05$). 樹高 2.0 m 未満の個体では, サブ個体群内部の血縁度 (平均±SE) はサブ個体群 A1 で 0.039 ± 0.008 , サブ個体群 A2 で 0.020 ± 0.009 , サブ個体群 A3 で -0.003 ± 0.006 であった. 相関係数 Mantel's r はサブ個体群 A1 で 0.083 と有意にゼロより大きな値を示していた ($P < 0.01$) が, サブ個体群 A2, A3 ではそれぞれ 0.047, 0.008 でゼロからの有意差は認められなかった ($P > 0.05$).

V - 3 - 3 サブ個体群内部における血縁構造

各サブ個体群において通常のマンテルテスト (simple Mantel test) をおこなない, Mantel's r の大きさと P 値によって地理的距離と血縁度の相関関係の有無および強弱を判断した (Table V-3). 方形区内に生育する全個体を対象にした解析では, 相関係数 Mantel's r は -0.103 ($P < 0.001$) で, 明瞭な負の相関関係が認められた. この関係は樹高に関わらず有意で, 樹高 2.0 m 以上の個体では Mantel's $r = -0.142$ ($P < 0.001$), 樹高 2.0 m 未満の個体では Mantel's $r = -0.093$ ($P < 0.001$) であった. 即ち, 方形区全体でみると, 樹高に関わらず地理的に近い個体ほど血縁度が高く, 遠く離れた個体間の血縁度は低いという一般的な傾向が認められた.

しかし, 各サブ個体群内部における地理的距離と血縁度との関係は, サブ個体群および樹高の違いによって大きく異なっていた (Table V-3). サブ個体群内部の全個体を対象とした解析では, 相関係数 Mantel's r はサブ個体群 A1 で -0.052 , サブ個体群 A2 で -0.058 , サブ個体群 A3 で -0.073 であり, サブ個体群 A1 ではゼロからの有意差は無く ($P = 0.090$), サブ個体群 A2 では有意 ($P = 0.047$), サブ個体群 A3 では著しく有意 ($P = 0.006$) であった. 一方, サブ個体群内部の樹高 2.0 m 以上の個体では, 相関係数 Mantel's r はサブ個体群 A1 で -0.092 , サブ個体群 A2 で -0.061 , サブ個体群 A3 で -0.047 であり, いずれも

ゼロからの有意差は認められなかった ($P > 0.05$). 樹高 2.0 m 未満の個体では、相関係数 Mantel's r はサブ個体群 A1 で -0.071, サブ個体群 A2 で -0.101, サブ個体群 A3 で -0.059 であった. これらの負の相間関係は, サブ個体群 A1 ではゼロからの有意差は認められなかった ($P = 0.103$) のに対し, サブ個体群 A2 ではゼロから有意に異なっており ($P = 0.046$), サブ個体群 A3 でも $P = 0.055$ と, 極めて有意に近い関係が認められた.

V - 4 考察

隣接個体が交配することによって, 個体群の内部に遺伝的構造が形成されることは, 理論的なモデルでも示されている (Turner *et al.* 1982; Sokal & Wartenberg 1983). 本章の第一節「はじめに」で述べたとおり, 個体群内部に遺伝的構造が確認された種の多くが, 虫媒や重力散布の植物であり, 遺伝的構造が確認されなかったものの多くは, 風媒, 風散といった遺伝子の散布能力に優れた種であった. このように, 遺伝子流動の量やパターンは植物個体群の遺伝的構造を決定する重要な要因の一つであるが, 遺伝子流動を正確に測定することは近年まで極めて困難であり (Adams 1992; Ellstrand 1992), 野外集団を対象にして遺伝的な構造と遺伝子流動との関係を明らかにした研究はほとんどない.

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた本章までの解析によって, ホンシクナゲ個体群における遺伝子流動, 即ち種子・花粉の散布, 定着の過程については, かなりの部分が明らかにされている. 第 III 章では 4 個体の母樹から 5 つの果実を採取し, 発芽してきた 216 個体の実生の花粉親を特定することによって, 1) 4 つの果実については, 大部分の花粉が少数の隣接個体によって供給されていること, 2) 残り 1 つの果実については 64% もの花粉が隣接する別のサブ個体群の個体によって供給されていること, などを明らかにした. さらに第 IV 章では, 各サブ個体群の林床に設置した 10 m × 10 m

の方形区から 210 個体の実生を採取し、その両親を推定することによって、1) 大部分の実生は、実生バンクから 5–10m 以内の個体によって生産されていること、2) 3.1–6.1%の実生が自家受粉に由来していること、3) サブ個体群間の遺伝的交流は 0–1.6%と極めて限られていること、などを明らかにした。

本章では第 III 章、第 IV 章と同じ方形区において、ホンシャクナゲ個体群における血縁構造を明らかにした。方形区内での全体的傾向として、個体間の血縁度は距離 10 m 以内で著しく高く、この傾向は樹高とは無関係であった (Fig. V-2)。このことは、大部分の種子が隣接する少数の個体によって結実していること (第 III 章)、実生バンクから 5–10m 以内の個体が非常に多くの子孫を残していること (第 IV 章) と一致する。150 m×70 m の方形区内で見ると、各果実はわずか 2–5 個体の花粉親によって結実しており、最も顕著な場合には、果実内の 63%もの種子がわずか 1 個体の花粉親に由来していた (第 III 章)。さらに、ホンシャクナゲ実生のセーフサイトである蘚苔類は、ホンシャクナゲ個体群の林床にパッチ上に点在しており、蘚苔類の存在しない土壌上での定着は困難である (第 II 章)。成木が生産した種子同士の血縁度が高く、定着できる場所が限られているほど、個体間の血縁度は上昇すると考えられており (Hamrick & Nason 1996)、本研究の結果もこれを支持するものといえる。

樹高によって若干の違いはあるものの、およそ 90–100 m 以上離れると、個体間の血縁度はゼロよりも有意に低くなった (Fig. V-2)。90–100 m という距離はサブ個体群 A1 と A3 の距離にほぼ一致しており (Fig. V-1)、これら 2 つのサブ個体群が遺伝的にも異なっていることを示唆している。マンテルテストによってサブ個体群レベルでの血縁関係を解析した結果、サブ個体群内部 (A1–A1, A2–A2, A3–A3) における個体間の血縁度はゼロより有意に高いこと、隣接するサブ個体群間 (A1–A2, A2–A3) ではゼロからの有意差が無

く、離れたサブ個体群 (A1-A3) での血縁度はゼロより有意に低いことが明らかになった (Table V-1). このことは、各サブ個体群の遺伝的な差異が距離に依存すること (isolation-by-distance, IBD) を示唆しており、種子・花粉の散布量が距離に強く依存していることを考えると、この結果は極めて常識的なものといえる. しかし、実生の親子分析によって得られたサブ個体群間の遺伝子流動の値は 0-1.6% と非常に小さい (第 IV 章) ため、サブ個体群間の血縁度と遺伝子流動との関係を直接検証することはできなかった.

次に、各サブ個体群内部における血縁構造の有無および強弱について考察をおこなう. サブ個体群内部の全個体を対象とした解析結果は Table V-2, Table V-3 に示した通りであるが、説明を分かりやすくするために、結果を要約した新たな表 Table V-4 を作成した. 各サブ個体群内部における個体間の血縁度は、サブ個体群 A1 で極めて高く、サブ個体群 A2 でも有意に正、サブ個体群 A3 ではゼロからの有意差は認められなかった (Table V-2, Table V-4). これらの血縁関係は、サブ個体群内部における距離と血縁度の相間関係の強さとは逆の関係にあった (Table V-3, Table V-4). 即ち、個体群内部で極めて高い血縁関係を示していたサブ個体群 A1 では、個体間の距離と血縁度との相間関係は認められず、個体間の血縁度が高かったサブ個体群 A2 では距離と血縁度との間に負の相間関係が認められ、個体間の血縁度にゼロからの有意差が認められなかったサブ個体群 A3 では、距離と血縁度との間に著しい負の相間関係があった (Table V-4). 距離と血縁度との間に強い負の相間関係が認められたサブ個体群 A3 では、サブ個体群内部に遺伝的なまとまりを持つ小さなパッチが形成されており、それによって全体の血縁度が低下したと考えられる. 逆にサブ個体群 A1 では、サブ個体群内部にそのような遺伝的構造は見られず、地理的分布から区分されたサブ個体群が遺伝的にも一つのまとまりを持っているものと推察される. サブ個体群 A2 は両者の中間的な位置にあった.

植物の生活史レベルでみると、鳥や動物によって遠くに種子が散布される種ほど個体群内部の遺伝的構造は弱くなり、重力散布や風散布のように多くの種子が母樹周辺に散布されるもの、さらに実生の定着が特殊なハビタットに依存しているものほど遺伝的構造が強くなると考えられる。また、低密度で生育している植物は、散布された種子同士の重複が少なくなるために、個体群内部の遺伝的構造が強くなると考えられている (Hamrick & Nason 1996)。Hamrick ら (1993) は熱帯雨林に生育する 3 種の樹木 *Platypodium elegans*, *Swartzia simplex* var. *ochracea*, *Alseis blackiana* を調査し、種子の散布様式と個体群密度の違いによって遺伝的構造の強さがどのように変化するのかを検討した。その結果、低密度で生育し、種子が風によって散布される *Platypodium elegans* の実生および幼木で遺伝的構造が最も強く、高密度で生育している鳥散布植物 *Swartzia simplex* var. *ochracea* の遺伝的構造は最も弱く、高密度で生育する風散布植物 *Alseis blackiana* ではその中間的な構造が認められた (Hamrick et al. 1993)。個体群密度が低いほど散布された種子の重複が少なくなり、遺伝的構造が強くなるという結果は、風媒花を持ち、風と虫によって種子が散布される樹木 *Acer saccharum* でも示されている (Young & Merriam 1994)。

しかし、虫媒花を持つ植物では、多くの花をつけるほど花粉媒介者の探索行動範囲が狭くなり、結果的に隣接個体間での交配や自家受粉が促進されることが知られている (Handel 1983; Fenster 1991; Godt & Hamrick 1993; Schnabel & Hamrick 1995)。本論文でも、花数の少ないときに長距離の花粉散布が起きていること (第 III 章)、実生バンク周辺の個体群密度が低いと、より遠くから遺伝子が供給され、花粉散布距離も長くなっていること (第 IV 章) を明らかにした。このことは、虫媒花に限っていえば、個体群密度あるいは開花密度が高いことによって遺伝子の散布距離が短くなり、個体群内部の遺伝的構造が強められる可能性を示唆している。これは、個体群密度が高いほど遺伝

的構造が弱くなるという、散布種子の重複度から予想される結果とは全く逆である。

それでは、本章で明らかになったホンシャクナゲ個体群における遺伝構造の有無および強弱は、どのような要因によって決定されているのだろうか。各サブ個体群における個体数は、サブ個体群 A1 で 49 個体、サブ個体群 A2 で 50 個体、サブ個体群 A3 で 75 個体であり、個体群密度はサブ個体群 A3 で大きくなっている (Fig. V-1)。散布された種子の重複度によって遺伝的構造が決定されているとすれば、個体群密度の大きなサブ個体群 A3 で遺伝的構造が最も弱くなり、サブ個体群 A1 とサブ個体群 A2 では遺伝的構造が比較的強く、かつ両者に差は認められないはずである。しかし、血縁構造が最も強かったのはサブ個体群 A3 であり、続いてサブ個体群 A2、サブ個体群 A1 の順になっていた (Table V-4)。即ち、散布された種子の重複度からでは、ホンシャクナゲ個体群における血縁構造の有無、強弱を説明することはできない。

次に、各サブ個体群における開花パターンを比較し、花粉散布パターンと血縁構造の関係について検討した。本論文の第 IV 章において、ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動の量とパターンは、実生バンクから 10 m 以内の個体群構造の違いによって大きく変化すること、サブ個体群内部での遺伝子の散布距離は最大 21.3 m であることが示されている。この結果に基づき、各サブ個体群における 1998 年と 1999 年の開花データを用いて、開花個体から 10 m 未満 (自個体を除く) および 10 m 以上 20 m 未満における開花個体数の平均値を算出し、両者を比較した (Table V-4)。その結果、1998 年、1999 年ともに、サブ個体群 A1 では距離 10–20 m における開花個体数よりも距離 10 m 未満の開花個体数の方が少なく、両者の平均値の比率は 0.4–0.6 であった。サブ個体群 A2 では、1999 年には 1998 年の 2 倍以上の個体が開花したが、距離 10–20 m における開花個体数と距離 10 m 未満の開花個体数との間に違いは無く、平均値の比率は 1.0 であった。サブ個体群 A3 では、距離 10–20 m におけ

る開花個体数よりも距離 10 m 未満の開花個体数の方が多く、平均値の比率は 1.3–3.1 であった。さらに、サブ個体群 A3 では距離 10 m 未満の平均開花個体数が 1998 年には 4.0 個体、1999 年には 7.5 個体で、他のサブ個体群の 2–3 倍もあることが分かる。

このような開花パターンの違いは、サブ個体群内部における血縁構造の有無および強弱と明瞭な対応関係を見せていた (Table V-4)。即ち、距離 10 m 未満の平均開花個体数の方が距離 10–20 m の範囲での平均開花個体数よりも少なかったサブ個体群 A1 では、地理的な距離と血縁度との間に負の相間関係は認められず、サブ個体群全体としての血縁度は著しく高かった。反対に、距離 10 m 未満の平均開花個体数が距離 10–20 m における平均開花個体数よりも多かったサブ個体群 A3 では、地理的な距離と血縁度との間に強い負の相間関係があり、サブ個体群全体としての血縁度にゼロからの有意差は認められなかった。さらに、距離 10 m 未満、10–20 m の 2 つの距離階において平均開花個体数に差がみられなかったサブ個体群 A2 では、地理的な距離と血縁度との間には負の相間関係が認められ、サブ個体群全体としての血縁度はゼロよりも有意に高く、サブ個体群 A1 とサブ個体群 A3 の中間的な傾向を示していた。

これらの結果から、個体群密度の違いが遺伝的構造に及ぼす影響を考える場合、散布種子の重複度のみならず、花粉散布パターンの変化まで考慮する必要があるといえる。少なくともホンシャクナゲ個体群では、従来考えられていたように個体群密度が高くなるほど散布種子の重複が大きくなり、遺伝的構造が弱くなるという予測は成り立たず、個体群（開花）密度の増加は花粉媒介者の探索行動範囲を抑制し、隣接個体間の交配や自家受粉を増加させることによって、遺伝的構造を強めているものと推察された。

遺伝子流動と血縁構造の有無および強弱が密接に関わっていることは明らかであるが、樹高 2.0 m 以上の個体と樹高 2.0 m 以下の個体の間に血縁構造の

違いはあるのだろうか。樹高 2.0 m 以下の個体についてサブ個体群内部における個体間の血縁度の強さを比較すると、サブ個体群 A1 における血縁度は平均 0.039、相関係数 Mantel's r は 0.083 ($P < 0.01$) と有意にゼロより大きな値を示し、サブ個体群 A2 では平均血縁度 0.020, Mantel's $r = 0.047$ ($P > 0.10$), サブ個体群 A3 では平均血縁度 -0.003, Mantel's $r = 0.008$ ($P > 0.10$) とゼロからの有意差は認められなかった (Table V-2)。一方、樹高 2.0 m 以上の個体では、いずれのサブ個体群においても平均血縁度は 0.019–0.034, Mantel's r は 0.032–0.075 で、ゼロからの有意差はみられなかった (Table V-2)。樹高 2.0 m 以下の個体について各サブ個体群内部における地理的距離と血縁度との相関関係の強さを比較すると、サブ個体群 A1 では有意差が無く ($P = 0.103$), サブ個体群 A2 で有意 ($P = 0.046$), サブ個体群 A3 でも極めて有意に近い値を示していた ($P = 0.055$) (Table V-3)。一方、樹高 2.0 m 以上の個体はサブ個体群 A1 ($P = 0.129$), サブ個体群 A2 ($P = 0.233$), サブ個体群 A3 ($P = 0.211$) のいずれにおいても、地理的距離と血縁度の間有意な相関関係は認められなかった (Table V-3)。

個体群内部の遺伝的構造は、定着初期の小さな個体ほど強く、大きくなるほど低下する。これは、定着初期の段階では母樹周辺に散布された種子や特定のサイトに定着した実生の遺伝的類似度が高いものの、その後の密度効果や種間競争、自然選択といった要因によって少数の個体だけが生き残り、個体間の遺伝的類似度が低下するためと考えられている (Hamrick *et al.* 1993; Hamrick & Nason 1996; Epperson & Alvarez-Buylla 1997)。本章においても、ホンシャクナゲの各サブ個体群内部における地理的距離と血縁度との関係は樹高の低い個体ほど高い傾向にあり、これらの結果を支持している。

個体の分布様式や個体群（開花）密度といった生態学的要因によって、ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動の量とパターンは大きく変化する。これらの特異的 (idiosyncratic) な遺伝子流動のパターンは、サブ個体群内部

における血縁構造の有無や強弱にも大きな影響を及ぼし、近距離の開花個体数が多いほど花粉の散布距離が短くなり、サブ個体群の遺伝的構造（地理的距離と血縁度との相関関係）は強くなる。これは、遺伝的に類似した個体が集まることによって、サブ個体群内部に小さなパッチが形成されるため、これらの構造は個体の生長とともに次第に消失する。サブ個体群内部の遺伝的構造が弱いほど、サブ個体群内部に生育している個体同士の血縁度は高くなり、全体としてのまとまりは強くなる。地理的に区分された見かけ上のサブ個体群は、その中に様々な遺伝的構造を含んでおり、その構造の有無や強弱は個体の分布様式や開花パターンといった生態学的要因によって大きく変化するものと結論できる。

Table V-1. Average pairwise relatedness (Mean R) with standard error and Mantel's r values for all individuals, large individuals (≥ 2.0 m in height), and small individuals (< 2.0 m in height), calculated in each combination of subpopulations.

Combination of Subpopulations	All individuals		Large individuals (≥ 2.0 m)		Small individuals (< 2.0 m)	
	Mean R (SE)	Mantel's r	Mean R (SE)	Mantel's r	Mean R (SE)	Mantel's r
A1-A1	0.015	0.078***	0.027	0.116***	0.012	0.081***
A2-A2	(0.002)		(0.005)		(0.004)	
A3-A3						
A1-A2	-0.002	0.004	0.004	0.020	-0.010	-0.020
A2-A3	(0.002)		(0.005)		(0.004)	
A1-A3	-0.029	-0.091***	-0.045	-0.153***	-0.024	-0.065***
	(0.003)		(0.006)		(0.004)	

Significance of Mantel's r statistics were tested with 999 permutations and Bonferroni correction using R Package (Casgrain & Legendre 1999); *** $P < 0.005$.

Table V-2. Average pairwise relatedness (Mean R) with standard error and Mantel's r values for all individuals, large individuals (≥ 2.0 m in height), and small individuals (< 2.0 m in height), calculated in each combination of subpopulations.

Combination of Subpopulations	All individuals		Large individuals (≥ 2.0 m)		Small individuals (< 2.0 m)	
	Mean R (SE)	Mantel's r	Mean R (SE)	Mantel's r	Mean R (SE)	Mantel's r
A1-A1	0.030 (0.005)	0.059**	0.019 (0.012)	0.032	0.039 (0.008)	0.083**
A2-A2	0.020 (0.005)	0.042*	0.034 (0.012)	0.063	0.020 (0.009)	0.047
A3-A3	0.006 (0.003)	0.026	0.026 (0.007)	0.075	-0.003 (0.006)	0.008
A1-A2	-0.002 (0.003)	0.001	0.001 (0.007)	0.002	-0.007 (0.006)	-0.003
A2-A3	-0.002 (0.003)	0.004	0.006 (0.006)	0.021	-0.012 (0.005)	-0.021
A1-A3	-0.029 (0.003)	-0.091**	-0.045 (0.006)	-0.153**	-0.024 (0.004)	-0.065**

Significance of Mantel's r statistics were tested with 999 permutations and Bonferroni correction using R Package (Casgrain & Legendre 1999); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table V-3. Correlation between relatedness and geographical distance within subpopulations for all individuals, large individuals (≥ 2.0 m in height), and small individuals (< 2.0 m in height).

Subpopulation	All individuals		Large individuals (≥ 2.0 m)		Small individuals (< 2.0 m)	
	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>	Mantel's <i>r</i>	<i>P</i>
whole	-0.103	<0.001	-0.142	<0.001	-0.093	<0.001
A1	-0.052	0.090	-0.092	0.129	-0.071	0.103
A2	-0.058	0.047	-0.061	0.233	-0.101	0.046
A3	-0.073	0.006	-0.047	0.211	-0.059	0.055

Significance of Mantel's *r* statistics were tested with 999 permutations using R Package (Casgrain & Legendre 1999).

Table V-4. Summary of relatedness structure of all individuals within each subpopulation and its comparison with flowering patterns in two years.

Subpopulation	Mean relatedness	Correlation between distance and relatedness	Mean number of flowering trees in each distance					
			year 1998			year 1999		
			0-10 m (A)	10-20 m (B)	ratio (A/B)	0-10 m (A)	10-20 m (B)	ratio (A/B)
A1	strongly positive	NS	1.7	2.7	0.6	2.0	5.1	0.4
A2	positive	negative	1.5	1.5	1.0	3.2	3.2	1.0
A3	NS	strongly negative	4.0	1.3	3.1	7.5	5.6	1.3

NS: not significant

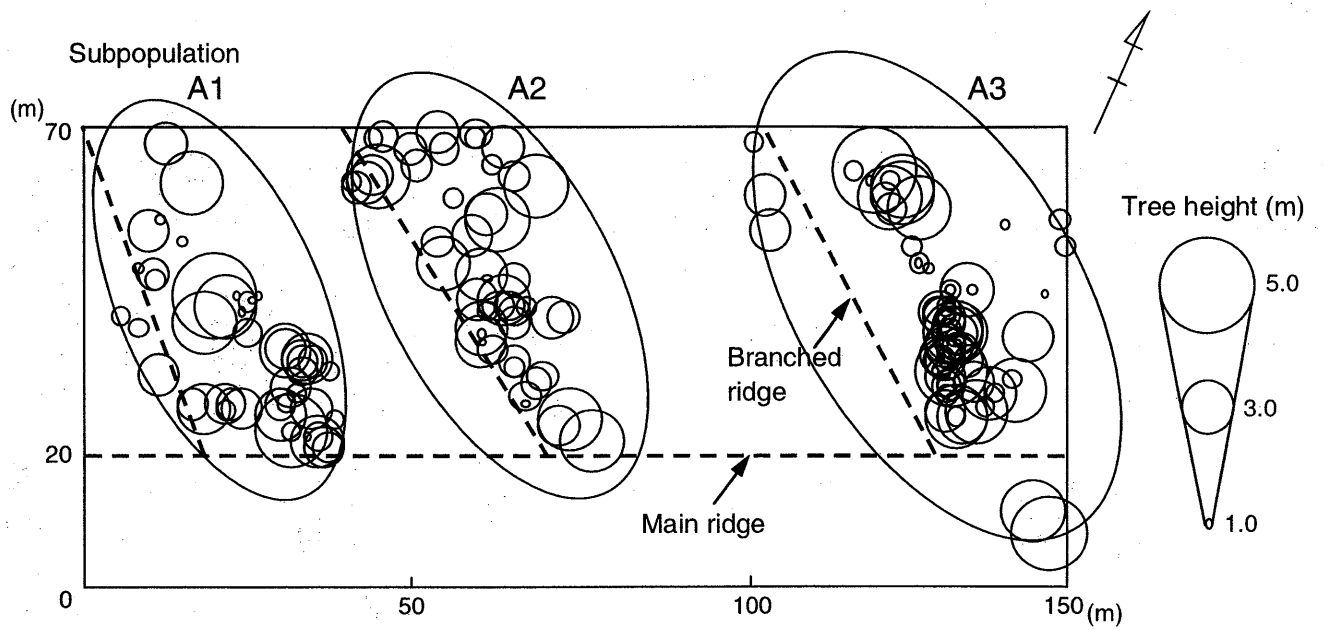


Fig. V-1. Map of the study site. Three stripe-shaped subpopulations of *Rhododendron metternichii* (A1, A2, A3) grew along the northern slopes of branch ridges off the main ridge.

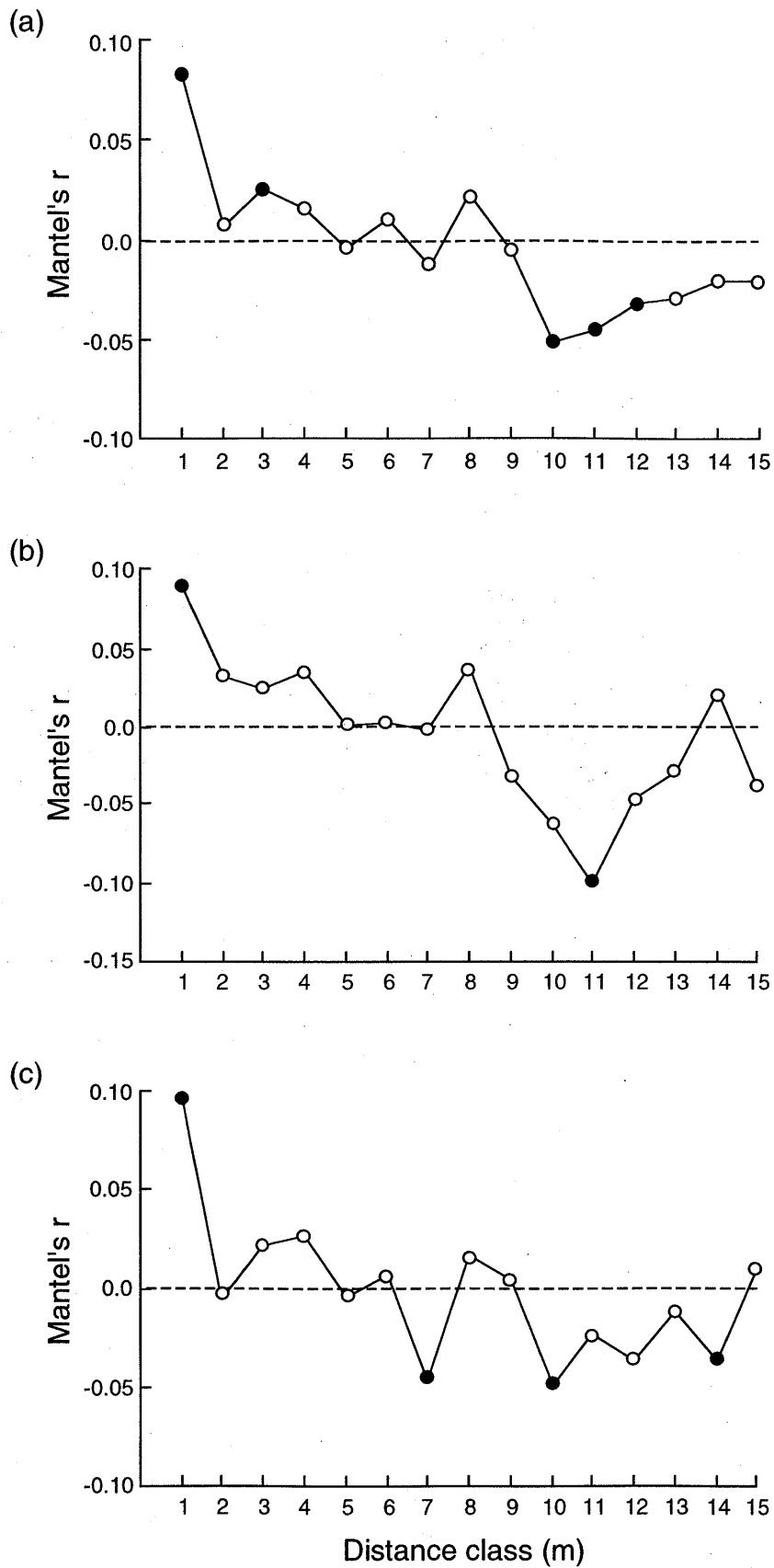


Fig. V-2. Correlograms of Mantel's r per 10 m distance class within the quadrat: (a) all individuals, (b) large individuals ≥ 2.0 m in height, (c) small individuals < 2.0 m in height. Filled circles indicate Mantel's r that are significantly different from zero at $P = 0.05$ level after the Bonferroni correction.

第 VI 章 無性生殖と有性生殖 —湿地個体群との比較—

VI - 1 はじめに

前章までは、鎌倉寺山に設置した 150 m×70 m の方形区内において、ホンシャクナゲの種子や花粉がどのように散布され、定着しているのか、それによって個体群内部および個体群間の血縁構造がどう変化するのかを議論してきた。しかしながら、同じ植物であっても生育環境が異なれば個体群構造や更新様式、さらには個体の表現型や生理的、生化学的な特性までもが大きく変化する (Silvertown & Doust 1993; Via 1994)。例えば、Kadereit & Briggs (1985) はノボロギク *Senecio vulgaris* を対象に調査をおこない、間引き処理がされている個体群では未処理個体群よりも非常に早く生長し、開花時期も早くなることを明らかにした。また、Law ら (1977) は比較的安定な環境と攪乱環境の2つのタイプの環境に生育するスズメノカタビラ (*Poa annua*) 個体群から種子を採取し、同一条件下で育てることによって、月別の生存率と繁殖率を比較した。その結果、攪乱環境に由来する個体群は繁殖開始時期が早く、個体の死亡も早まったのに対し、安定な環境に由来する個体群ではその逆の結果になった (Law *et al.* 1977)。このような変化は異なった環境に対する遺伝的な適応として捉えることができる。一方、遺伝的な変化を伴わず、表現型レベルでの可塑性を示す例も多数知られている (Via 1994)。例えば、樹木の樹冠の形状は種の特長であると同時に、個体のおかれた光環境によって大きく変化する (Canham 1988; Popma & Bongers 1988; O'Connell & Kelty 1994)。樹冠形の可塑性は、個体の生長、生存率、繁殖の変化を通して、個体群の構造や機能にも変化をもたらすと考えられている (Sorrensen-Cothorn *et al.* 1993)。また、耐陰性の低木樹種 *Acer pensylvanicum* は林冠が閉鎖している環境では頻繁に匍匐枝を形成するが、林冠が開けるとともに伸長生長を開始し、有性生殖をおこなう (Hibbs & Fischer 1979)。これらは、光環境の変化に対する個体

レベルでの変化といえるだろう。

本研究の対象種であるホンシャクナゲは山地のみならず、谷部の流路沿いや湿地周辺のマント群落にも生育している。本章では、前章までで扱ってきた鎌倉寺山の山地個体群とは全く異なる湿地周辺のマント群落において、ホンシャクナゲ個体群がどのように維持されているのかを明らかにする。

VI - 2 方法

VI - 2 - 1 調査地

急峻な尾根を持つ鎌倉寺山の南東には、準平原化したなだらかな山塊があり、ホンシャクナゲは小さな谷や湿原の周りに点在している。特に、鎌倉寺山山頂から南東に 1.5 km ほど離れた広島県福富町のクロボヤ峡 (Fig. I-1) には、湿原を取り囲むように大規模なホンシャクナゲ群落が形成されており、その規模の大きさと湿地周辺という比較的珍しい生育環境から、昭和 26 年に広島県の天然記念物に指定されている。湿地周辺に生育するホンシャクナゲの個体群構造を調べるため、クロボヤに 10 m×10 m の方形区を設置した (Fig. VI-1)。さらに、前章まで調査をおこなっていた鎌倉寺山の方形区から東へおよそ 200 m ほど離れた場所に 10 m×10 m の方形区を設置し、山地個体群の調査をおこなった (Fig. VI-2)。鎌倉寺山に新たな方形区を設置したのは、2 つの調査地に生育するホンシャクナゲの個体数 (実際には幹数) を同程度にするためである。

VI - 2 - 2 野外調査

ホンシャクナゲは強い栄養繁殖能力を持ち、しばしば幹の基部からの萌芽や、地上茎の接地による発根がみられる。栄養繁殖をおこなう植物では生理的独立性と遺伝的同一性のどちらを重視するかによって、個体の定義が異ってくる。生理的独立性を重視する場合の個体はラメット (ramet) と呼ばれ、

生活を営む生理的、生態的単位である。一方、遺伝的に同一な集団、即ち1種子に由来するクローン全てを個体として定義する場合には、ジェネット (genet) と呼ばれ、自然淘汰や進化を考える上での基本単位である。なお、前章までの議論は全てジェネットを基本単位としている。ただし、話が前後してしまうが、本章の結果でも示される通り、有性生殖が優占している鎌倉寺山ではジェネットとラメットは多くの場合一致しており、生態的単位=遺伝的単位と考えることができる。

本章では、まず、生態的な単位であるラメットに着目し、ホンシャクナゲの個体を次のように定義した。

- 1) 個体とは、地上茎、地下茎によって連結している幹の集合体である。
- 2) 各個体は一本の主幹を持ち、その他の幹（発根しているもの）は全て栄養繁殖によって形成されたものである。
- 3) 主幹とは、個体中で最大の根際直径を持つ幹とする。
- 4) 栄養繁殖によって形成される幹には、萌芽によるものと伏条によるものがある。萌芽幹 (sprouting stem) とは、主幹と地下茎でつながっているもの、伏条幹 (layering stem) とは、地上の茎や枝が接地して発根したもので、主幹と地上でつながっているものである。

クローン幹（萌芽幹、伏条幹）のつながりは、地面を掘り返すか、約 20 cm の竹串を突き刺していくことによって判別した。さらに、ホンシャクナゲの各幹を対象に幹高と地図上の位置を測定した。ただし、第 II 章と同様に、根際直径 0.5 mm 以下の実生については調査対象から除外している。方形区内の等高線は、1 m 間隔で設置した格子点（計 121 地点）を対象にレベル測量をおこない、SYSTAT 5.2 を用いて決定した。また、各樹種の優占度を把握するため、樹高 1.3 m 以上の全樹木を対象に胸高直径を測定し、個体数をカウントした。これらの調査は全て 1996 年の秋におこなった。

野外調査によって判別したラメットは生理的、生態的な単位であるが、そ

れらが遺伝的に異なっているのか、それとも遺伝的には同一のクローンなのかを判断するには遺伝マーカーを用いる必要がある。マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた個体識別と遺伝的多様性の算出については、内藤和明氏ら (Naito *et al.* 1999) によっておこなわれており、その結果については本章の考察で触れることにしたい。

VI - 3 結果

VI - 3 - 1 林分構造

クロボヤに設置したプロットの高低差は約 2 m、平均傾斜は 10 度程度で、南側の山腹から北側の湿地に向かって緩やかに傾斜していた (Fig. VI-1)。ホンシャクナゲは比較的高密度で生育しており、萌芽幹とともに多数の伏条幹がみられる。一方、鎌倉寺山に設置したプロットの高低差は約 8 m、平均傾斜は 30 度ほどで、北西に向かって傾斜している (Fig. VI-2)。一見して、クロボヤよりもクローン幹が少なく、伏条幹は全く形成されていないこと、多数の実生が定着していることなどが分かる。

樹高 1.3 m 以上の木本を対象に毎木調査をおこなった結果、クロボヤで高い個体群密度を示していたのはホンシャクナゲ (*Rhododendron metternichii* var. *hondoense*)、ソヨゴ (*Ilex pedunculosa*)、バイカツツジ (*Rhododendron semibarbatum*) の 3 種で、これらだけで全個体数の 6 割近くを占めていた (Table VI-1)。基底面積で見るとアカマツが全体の半分近くを占め、2 番目のソヨゴ、3 番目のホンシャクナゲを加えると全体の 85% 程度に達していた (Table VI-1)。個体数と基底面積それぞれが全体に占める割合 (%) を平均することによって積算優占度 (SDR2) を算出し、種順位を求めた。その結果、最も順位が高かったのはアカマツ (Pd) で、以下ホンシャクナゲ (Rm)、ソヨゴ (Ip) の順になっていた (Fig. VI-3)。クロボヤではこれら 3 種が著しく高い優占度を示し、4 番目のバイカツツジ (Rs) 以下の優占度は極めて小さくなってい

た。

鎌倉寺山ではホンシャクナゲの個体群密度が特に高く、ついでクロソヨゴ (*Symplocos myrtacea*), タムシバ (*Magnolia salicifolia*), ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) の順になっていた (Table VI-2). 基底面積ではホオノキが最も優占しており, ホンシャクナゲ, クロソヨゴの3種で全体の6割以上を占めていた (Table VI-2). 積算優占度 (SDR2) でみるとホンシャクナゲが最も優占していたが, タムシバ (Ms), クロソヨゴ (Sm), ヒノキ (Co), ソヨゴ (Ip) の優占度も比較的高く (Fig. VI-4), クロボヤのように特定の樹種が優占しているわけではなかった。

VI-3-2 ホンシャクナゲ個体群の構造

クロボヤと鎌倉寺山では, 生育しているホンシャクナゲの幹数はそれぞれ108本と112本でほとんど差は認められないが, 幹高の頻度分布と幹の形態(主幹, 萌芽幹, 伏条幹)には著しい違いがみられた。クロボヤでは幹高の分布は緩やかな二山型で, 萌芽幹, 伏条幹がかなりの割合を占めていた (Fig. VI-5). また, 同じクローン幹であっても, 小さな幹ほど伏条由来, 大きな幹ほど萌芽由来のものが多くなる傾向が認められ, 高さ50 cm以下の幹に萌芽由来のものは全くなく, 逆に, 高さ200 cm以上の幹で伏条に由来するものはみられなかった。クロボヤに生育する108本の幹のうち, 42本(38.9%)が萌芽由来, 27本(25.0%)が伏条由来で, 独立した主幹は39本(36.1%)しかなかった (Table VI-3). また, 幹高が低いほどクローン幹の割合が高くなる傾向があり, 高さ50 cm以下の幹の73.1%は伏条によって形成されたもので, 種子由来と思われる実生はわずか7個体(26.9%)であった (Table VI-3).

一方, 鎌倉寺山では高さ50 cm以下の主幹, 即ち種子由来の実生が81個体と極めて多く, 全ての幹において伏条由来の幹は全くみられず, 萌芽由来のものも比較的少なかった (Fig. VI-6). クローン幹の割合に着目すると, 鎌倉

寺山に生育する 112 本の幹のうち萌芽由来のものはわずか 8 本 (7.1%) であった (Table VI-4). クロボヤと比較すると、林床の実生数が著しく多く、クローン繁殖の割合が極めて少ないことが分かる。

クロボヤにおいて、伏条幹、萌芽幹と主幹との距離を算出したところ、萌芽幹は主幹から 1.2 m 以内にあり、そのほとんどが 60 cm 以内に分布していた (Fig. VI-7). また、伏条幹は萌芽幹よりも遠くに分布しており、主幹から 3 m 近く離れているものもあった。

クロボヤに生育する 108 本の幹を対象にして、第 II 章と同様に花柄の有無から過去の開花経験を判断した (Fig. VI-8). その結果、高さ 50 cm 以上の幹から開花が認められ、高さ 2 m 以上の幹のほとんどに開花経験があった。第 II 章で実生と定義した高さ 50 cm 未満の個体 (幹) には開花経験は認められなかった。

VI - 4 考察

鎌倉寺山の個体群、クロボヤの湿地周辺の個体群ともにホンシャクナゲの優占度は極めて高く、個体数と基底面積から求めた種順位は鎌倉寺山で一位、クロボヤではアカマツに次いで二位であった。しかし、ホンシャクナゲの優占形態には著しい差異が認められ、湿地周辺のホンシャクナゲ個体群では萌芽や伏条によって形成されたクローン幹の割合が著しく多く、実生の定着がほとんどみられなかったのに対し、鎌倉寺山のホンシャクナゲ個体群の林床には非常に多くの実生が定着しており、伏条幹は全くなく、萌芽幹も少なかった。湿地周辺のホンシャクナゲでも、鎌倉寺山と同様に高さ 50 cm 以上の幹から開花が認められ、高さ 2 m 以上の幹のほとんどに開花経験があったことから、2つのホンシャクナゲ個体群における実生数の差が、開花数の違いによるものとは考えにくい。第 II 章で明らかにした通り、ホンシャクナゲの実生が発芽、定着するには蘚苔類の存在が不可欠である。湿地周辺のクロボ

ヤでは、蘚苔類のオオミズゴケ (*Sphagnum palustre*) が比較的広範囲に分布しているにも関わらず、ホンシャクナゲの実生はほとんどみられなかった。これには、鎌倉寺山に生育するナガヒツジゴケ (*Brachythecium buchananii*), カモジゴケ (*Dicranum scoparium*), ムチゴケ (*Bazzania pompeana*) といった蘚苔類と、クロボヤに生育するオオミズゴケとの生活形の違いが大きく関わっていると考えられる。

Nakamura (1992) は、富士山に複数のプロットを設置し、林床条件および蘚苔類の種類の違いによってシラベ (*Abies veitchii*) とコメツガ (*Tsuga diversifolia*) の実生の生存率がどのように変化するかを2年間に渡って追跡した。その結果、ササの葉が堆積した林床での生存率は両種共に0%, 裸地での生存率はシラベで0.14%, コメツガで0%と著しく低かった。シラベの実生はカラマツ (*Larix kaempferi*) の落葉が堆積した林床、および全てのタイプの蘚苔類上で高い生存率を示していたが、コメツガの実生は背丈の低い蘚苔類上 (*Scapania community* と *Heterophyllum community*) でのみ生存しており、背丈の高い蘚苔類上 (*Hylocomium-Pleurozium community*) での生存率は著しく低かった (Nakamura 1992)。根返りなどによって生じた裸地はしばしば実生の定着に適したマイクロサイトを提供する (Nakashizuka 1989; Peterson *et al.* 1990) が、厳しい水ストレスによって種子の発芽や実生の定着が阻害される例も報告されており (Johnson & Thomas 1978; Cross 1981), 裸地上でのシラベやコメツガの生存率が著しく低かったのはこのためと思われる (Nakamura 1992)。また、ササの葉が堆積した林床でシラベ、コメツガの実生が全く生存できなかったのは、乾燥した環境に加えて、実生の幼根が土壤に達するのをササの葉が妨げていることが原因と考えられた (Nakamura 1992)。また、背丈の高い蘚苔類上でコメツガが定着できなかったのは、コメツガの実生サイズがシラベよりも小さいために、厚い蘚苔類の層に阻まれて幼根が土壤に達することができず、乾燥によって枯死したためと考えられた (Nakamura 1992)。

Cross (1981) によると, *Rhododendron ponticum* の実生の定着は高さ 1 cm 以下の蘚苔類に強く依存しており, 蘚苔類が存在しない場合, 高さ 1 cm を越える蘚苔類が存在する場合のいずれも, 実生の定着は著しく妨げられた. 落葉が堆積した林床や裸地に実生が少ないのは, 実生が乾燥に曝されやすいこと, 基盤が不安定で, 林冠からの雨滴によって実生の根が浮き上がったり, 土壤に埋没したりするためと考えられた (Cross 1981). また, 背丈の高い蘚苔類上で実生が定着できないのは, 蘚苔類の厚い層によって幼根が土壤に達することができず, 乾燥によって死亡するためと推察された (Cross 1981).

湿地周辺に分布するオオミズゴケの高さは 2 cm 以上に達する. クロボヤのホンシャクナゲ個体群に実生がほとんどみられなかったのは, 蘚苔類であるオオミズゴケのサイズが大きく, 実生の発芽, 定着を阻害しているためと考えられる. また, クロボヤに設置したプロットの高低差は約 2 m, 平均傾斜は 10 度程度で, 鎌倉寺山のプロット (高低差 8 m, 平均傾斜 30 度) と比較すると非常に緩やかである. このような立地環境の違いから, クロボヤのホンシャクナゲ個体群の林床には落葉が厚く堆積しており, 実生の定着を阻害する大きな要因になっているものと推察される.

アパラチア山脈の標高 1000 m 以下の川岸や湿った林床に生育する *Rhododendron maximum* は, 高さ 10 m ほどの常緑高木で, ホンシャクナゲと同じシャクナゲ亜属の植物である. Plocher & Carvell (1987) は, 谷間と山腹という生育環境の違いによって *R. maximum* の個体群構造がどのように変化するかを調査した. その結果, 林冠が開放しており, 草本層が少なく, 蘚苔類が多いほど, より多くの実生が確認された (Plocher & Carvell 1987). 逆に, 林冠が閉鎖して湿潤な環境にあり, 草本層が密であるほど, 蘚苔類は少なくなって, 実生数も減少し, 代わりに多数の伏条幹が観察された. これらの結果は本章で確認されたホンシャクナゲの個体群構造と非常によく一致しており, クロボヤの湿地周辺で実生がみられず, クローン幹が多かったのは, 実

生のセーフサイトである背の低い蘚苔類が存在しないことに加えて、林冠が閉鎖していること、湿潤な環境下にあることが大きな原因と言えるだろう。

Porton ら (2000) は、フランスの亜高山帯に位置する Mourtis と Bethmale の 2 地域に調査区を設置し、AFLP 遺伝マーカーを用いて *Rhododendron ferrugineum* のクローン構造を解析した。*R. ferrugineum* は樹高 70–80 cm のシクナゲ亜属の低木で、アルプス山脈からピレネー山脈にかけて、標高 1600–2200 m の範囲に分布している。解析の結果、*R. ferrugineum* が Mourtis の草地に初めて侵入してきたのは 110 年前で、その後 40 年間は新規加入個体が見られたが、70 年前から実生の定着は起きていないことが明らかになった (Porton *et al.* 2000)。また、Bethmale では 130 年前に最初の個体が侵入した後、100 年間に渡って新規加入個体が見られたが、30 年前から実生の定着は起きていなかった。*R. ferrugineum* の分布の拡大とともに実生の定着がみられなくなるのは、シクナゲの実生は発芽に強い光を要求し (Bianco & Bulard 1974)、種子中の養分の貯蔵量も少ない (Escaravage *et al.* 1997; Pornon *et al.* 1997) ために、閉鎖林冠下では生存できないことが原因と考えられた (Porton *et al.* 2000)。また、AFLP による個体識別の結果、*R. ferrugineum* のクローンは最大 25 m² に達していた。しかし、調査区外に広がっているクローンもあるため、*R. ferrugineum* の無性繁殖能力はさらに強いことが予想される (Porton *et al.* 2000)。

湿地周辺のホンシクナゲ個体群における主幹とクローン幹との距離は最大でも 3 m 程度で、10 m×10 m の方形区内には複数の独立した主幹が生育していた。しかし、本章の研究は生態学的な単位であるラメットを基準にしているため、萌芽や伏条によって形成された新たな幹が、その後主幹から独立してしまえば、遺伝的には同一のジェネットであるにも関わらず、野外調査では別の個体として認識されることになる。シクナゲ亜属のクローン繁殖能力を考えると、方形区内で確認された 39 本の主幹の大部分が一つのジェネ

ットである可能性も否定できない。この問題を解決するため、内藤和明氏らによって6つのマイクロサテライト遺伝マーカーを用いた個体識別がおこなわれた (Naito *et al.* 1999)。その結果、野外で同一個体とされたものが異なる遺伝子型を示すなど、土を掘り起こすという調査方法の限界が示された一方で、方形区内には 1999 年時点で 38 個体のホンシャクナゲが生育しており、単一のジェネットによって構成されているわけでは無いことが明確に示された (Naito *et al.* 1999)。

Naito ら (1999) による遺伝解析によって、クロボヤの湿地周辺の個体群が少なくともかつては有性生殖によって維持されていたことが明らかになった。それでは、現在のホンシャクナゲ個体群が無性繁殖に強く依存しているのはなぜなのだろうか？また、かつて有性生殖が行われていたとすると、当時の環境はどのようなものだったのだろうか？これらの疑問について考察してみたい。

地元の人の話では、クロボヤの湿地周辺に生育するアカマツはパルプ材、他の樹木も炭や薪にするなどして、昭和 20 年代後半まで広く利用されており、山のあちこちで炭を焼く煙が上がっていたという。当時は林床に堆積する落葉も重要な資源として利用されていた。これを裏付けるように、本章の調査地周辺には多くの炭焼き釜の跡が残っている。しかし、昭和 30 年頃から山に入る人間が少なくなり、昭和 40 年には完全に放棄された。現在見られるクロボヤの森林は、このような人為的な作用によって成立したものである。山林の利用がおこなわれていた昭和 20 年代には、林冠は開け、林床に堆積する落葉も少なく、ホンシャクナゲの実生の定着に有利な環境にあったと考えられる。しかし、山に入る人間が少なくなるにつれて、林冠は閉鎖し、林床に堆積する落葉が増え、それを利用する人もいなくなった。先に述べたとおり、シャクナゲ亜属の *Rhododendron maximum* の伏条幹の形成は、湿潤環境下でより頻繁に起こる (Plocher & Carvell 1987)。また、耐陰性の低木樹種 *Acer*

pensylvanicum は林冠が閉鎖している環境では頻繁に匍匐枝を形成するが、林冠が開けるとともに伸長生長を開始し、有性生殖をおこなうことが報告されている (Hibbs & Fischer 1979)。湿潤環境下での林冠の閉鎖によって、ホンシヤクナゲは頻繁に伏条幹を形成するようになり、林床の落葉の増加は実生の定着を極めて困難にしたと考えられる。クロボヤのホンシヤクナゲ個体群は、規模が大きいことに加えて、湿地周辺という比較的珍しい生育環境に成立していることから昭和 26 年に広島県の天然記念物に指定された。しかし、大規模なホンシヤクナゲ個体群は人間の里山利用によって維持されていたものであり、現在の状態が継続すれば新たな実生の定着がさらに困難となり、遺伝的多様性の低下をもたらすことも考えられる。クローン個体の分布の拡大と遺伝的多様性との関係については、鎌倉寺山の結果も含めて、次の総合考察でまとめている。

Table VI-1. Density and basal area of each tree in Kuroboya (trees over 1.3 m in height were investigated). Summed dominance ratio (SDR2) based on relative density and relative basal area is shown in Figure 1-3.

	Abbreviation of species name	Density (trees/100m ²)	Relative density (%)	Basal area (cm ² /100m ²)	Relative basal area (%)
<i>Pinus densiflora</i>	Pd	3	3.4	1699.1	45.9
<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	Rm	24	27.0	569.2	15.4
<i>Ilex pedunculosa</i>	Ip	17	19.1	848.9	22.9
<i>Rhododendron semibarbatum</i>	Rs	11	12.4	18.6	0.5
<i>Lyonia ovalifolia</i> var. <i>elliptica</i>	Lo	5	5.6	122.8	3.3
<i>Menziesia ciliicalyx</i>	Mc	6	6.7	14.2	0.4
<i>Magnolia salicifolia</i>	Ms	2	2.2	157.2	4.2
<i>Pieris japonica</i>	Pj	4	4.5	32.7	0.9
<i>Stewartia pseudo-camellia</i>	Sp	2	2.2	115.5	3.1
<i>Pourthiaea villosa</i> var. <i>laevis</i>	Pv	3	3.4	12.2	0.3
<i>Clethra barbinervis</i>	Cb	2	2.2	21.1	0.6
<i>Ilex macropoda</i>	Im	2	2.2	9.0	0.2
<i>Symplocos myrtacea</i>	Sm	2	2.2	8.6	0.2
<i>Abelia serrata</i>	As	2	2.2	1.4	0.0
<i>Camellia japonica</i>	Cj	1	1.1	37.6	1.0
<i>Illicium religiosum</i>	Ir	1	1.1	19.3	0.5
<i>Rhododendron reticulatum</i>	Rr	1	1.1	15.1	0.4
<i>Vaccinium smallii</i> var. <i>glabrum</i>	Vs	1	1.1	0.8	0.0
Total		89.0	100.0	3703.4	100.0

Table VI-2. Density and basal area of each tree in Mt. Kamakuraji (trees over 1.3 m in height were investigated). Summed dominance ratio (SDR2) based on relative density and relative basal area is shown in Figure 1-4.

	Abbreviation of species name	Density (trees/100m ²)	Relative density (%)	Basal area (cm ² /100m ²)	Relative basal area (%)
<i>Rhododendron metternichii</i> var. <i>hondoense</i>	Rm	23	24.5	696.7	20.2
<i>Magnolia salicifolia</i>	Ms	11	11.7	827.9	24.1
<i>Symplocos myrtaea</i>	Sm	12	12.8	590.9	17.2
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Co	10	10.6	352.6	10.2
<i>Ilex pedunculosa</i>	Ip	7	7.4	402.8	11.7
<i>Lyonia ovalifolia</i> var. <i>elliptica</i>	Lo	5	5.3	175.9	5.1
<i>Clethra barbinervis</i>	Cb	5	5.3	48.7	1.4
<i>Pieris japonica</i>	Pj	2	2.1	132.9	3.9
<i>Eurya japonica</i>	Ej	3	3.2	68.4	2.0
<i>Sorbus japonica</i>	Sj	3	3.2	57.7	1.7
<i>Evodiopanax innovans</i>	Ei	3	3.2	39.1	1.1
<i>Illicium religiosum</i>	Ir	4	4.3	2.8	0.1
<i>Acanthopanax sciadophylloides</i>	ACs	2	2.1	7.6	0.2
<i>Amelanchier asiatica</i>	Aa	1	1.1	24.6	0.7
<i>Viburnum wrightii</i>	Vw	1	1.1	5.4	0.2
<i>Carpinus laxiflora</i>	Cl	1	1.1	4.1	0.1
<i>Vaccinium smallii</i> var. <i>glabrum</i>	Vs	1	1.1	1.8	0.1
<i>Abelia serrata</i>	ABs	1	1.1	1.1	0.0
<i>Rhododendron lagopus</i>	Rl	1	1.1	1.1	0.0
Total		96	100.0	3442.1	100.0

Table VI-3. Height class distribution of main, sprouting, and layering stems of *Rhododendrom metternichii* var. *hondoense* in Kuroboya.

	Stem height (cm)					Total
	< 50	50–200	200–350	350–500	500 ≤	
Main stem	7	10	7	11	4	39
Sprouting stem	0	16	17	7	2	42
Layering stem	19	8	0	0	0	27
Total	26	34	24	18	6	108
Ratio of clonal stems	73.1	70.6	70.8	38.9	33.3	63.9

Table VI-4. Height class distribution of main, sprouting, and layering stems of *Rhododendrom metternichii* var. *hondoense* in Mt. Kamakuraji.

	Stem height (cm)					Total
	< 50	50–200	200–350	350–500	500 ≤	
Main stem	81	3	5	14	1	104
Sprouting stem	0	1	3	3	1	8
Layering stem	0	0	0	0	0	0
Total	81	4	8	17	2	112
Ratio of clonal stems	0.0	25.0	37.5	17.6	50.0	7.1

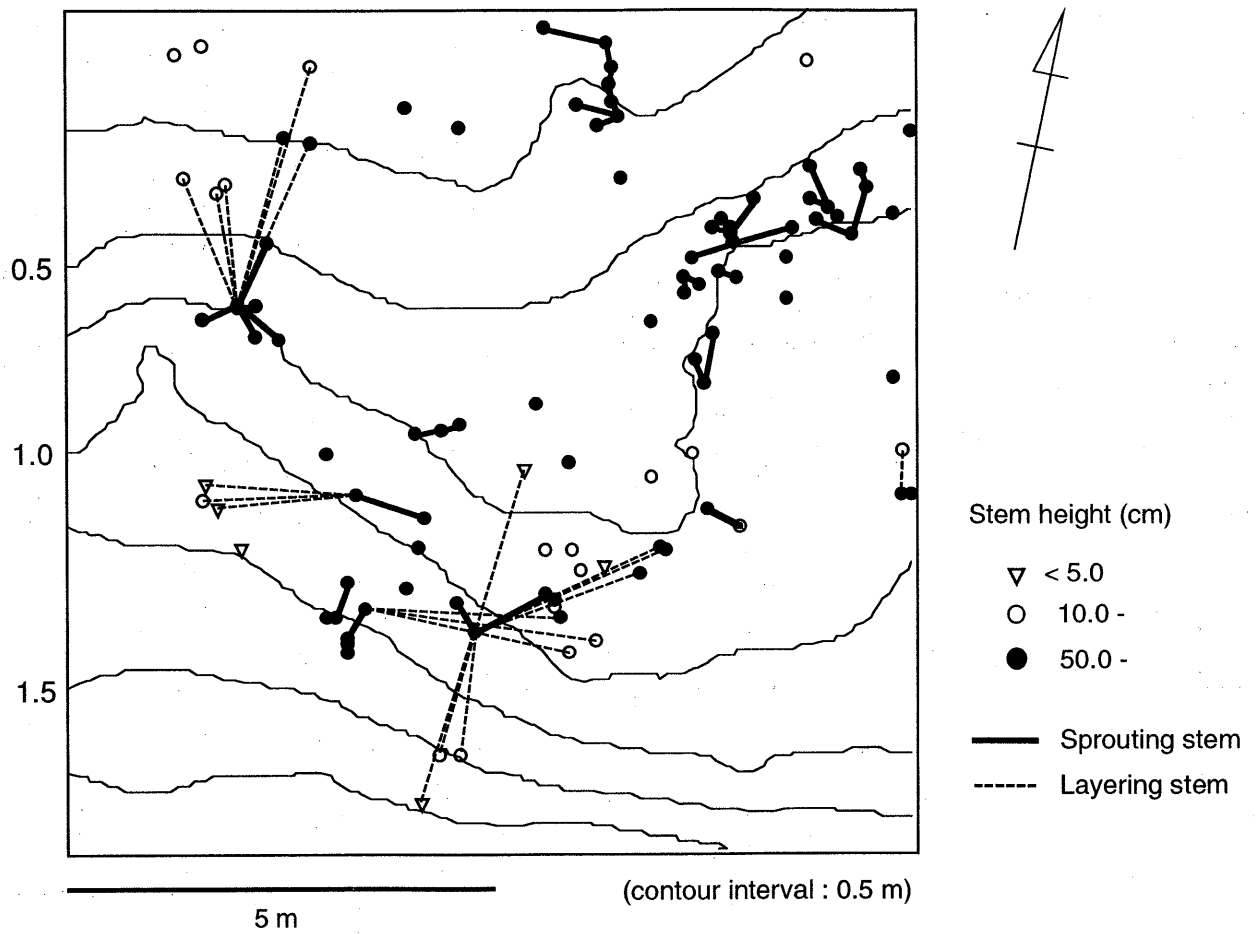


Fig. VI-1. Detail map of study site in Kuroboya. All stems of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* over 0.5mm in diameter at ground surface are shown.

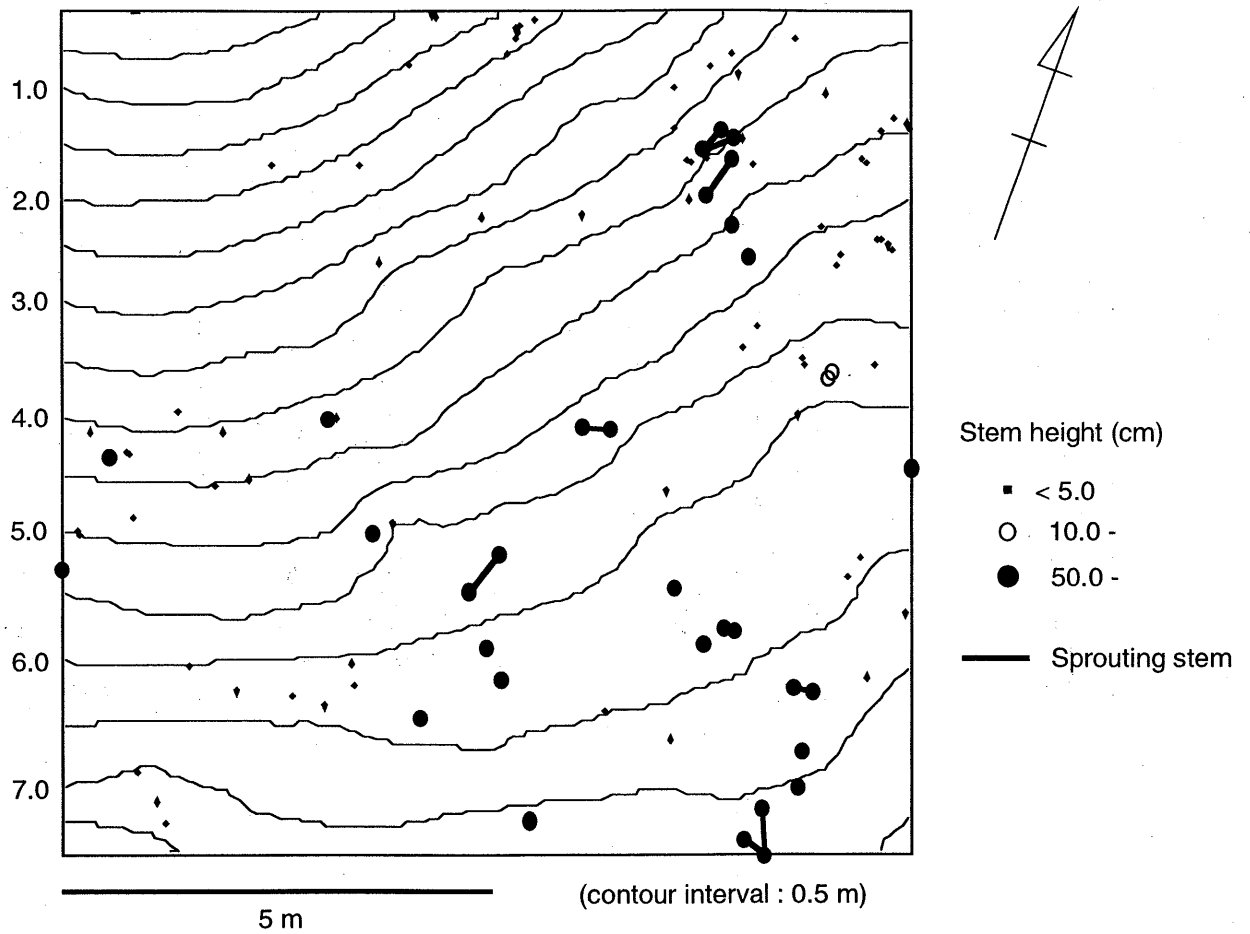


Fig. VI-2. Detail map of study site near the top of Mt. Kamakuraji. All stems of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* over 0.5mm in diameter at ground surface are shown.

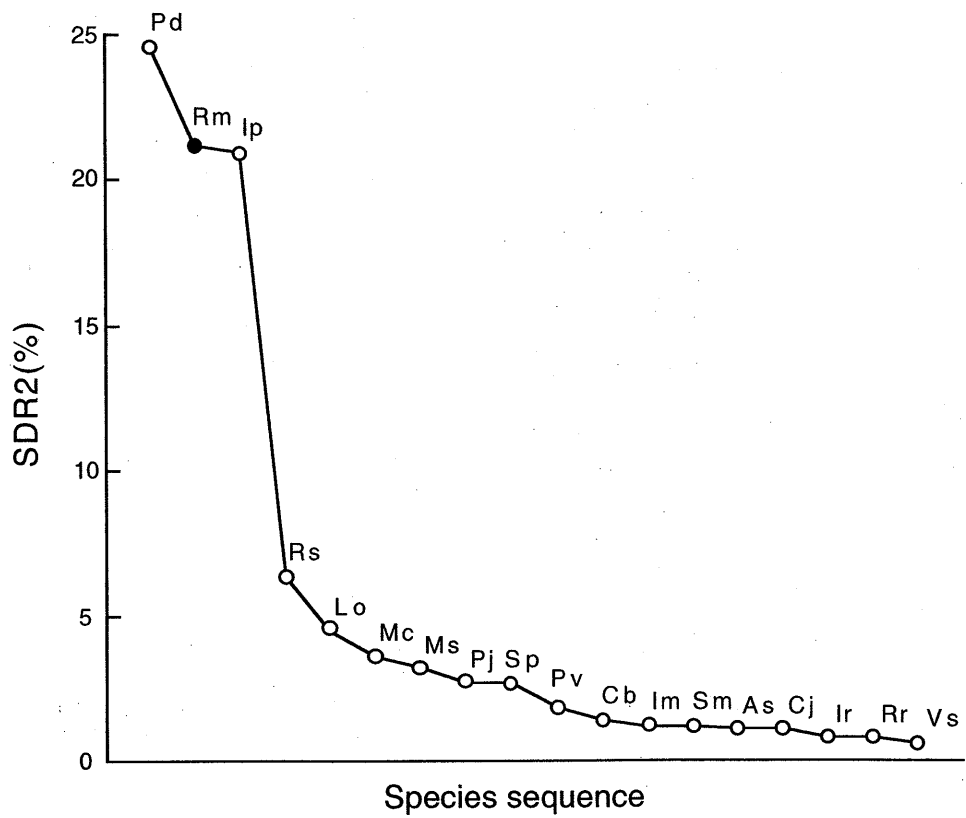


Fig. VI-3. Summed dominance ratio (SDR2) based on relative density and relative basal area of individuals over 1.3 m in height at Kuroboya. Rm means *Rhododendrom metternichii* var. *hondoense*. Abbreviations of other species are shown in TableVI-1.

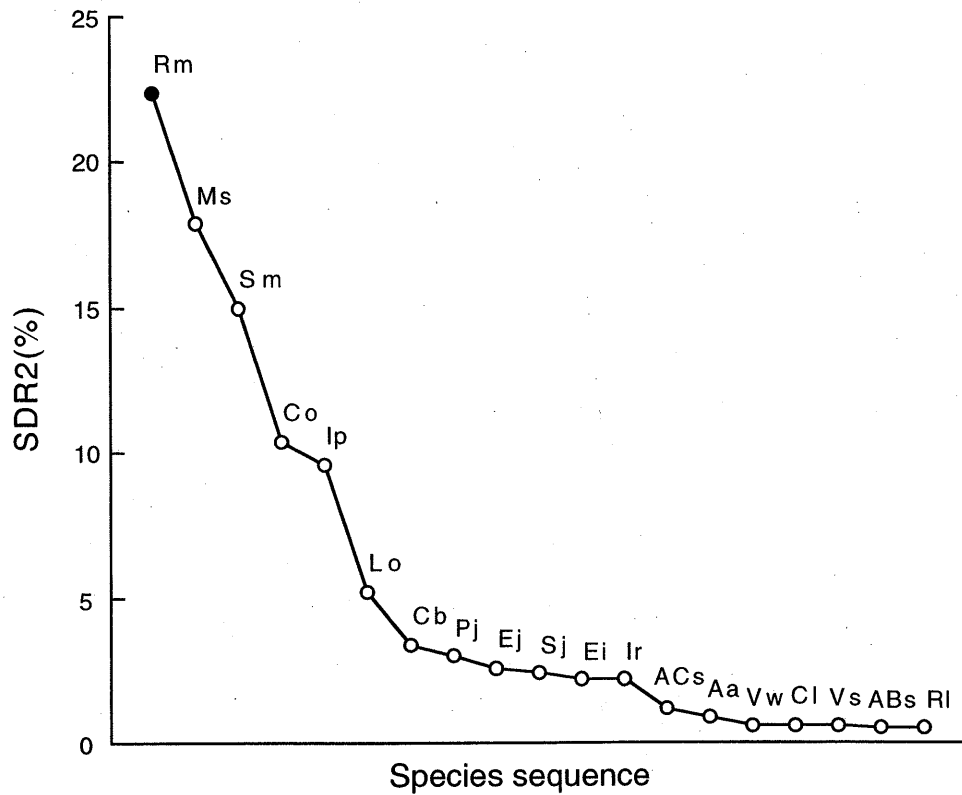


Fig. VI-4. Summed dominance ratio (SDR2) based on relative density and relative basal area of individuals over 1.3 m in height at Mt. Kamakuraji. Rm means *Rhododendrom metternichii* var. *hondoense*. Abbreviations of other species are shown in TableVI-2.

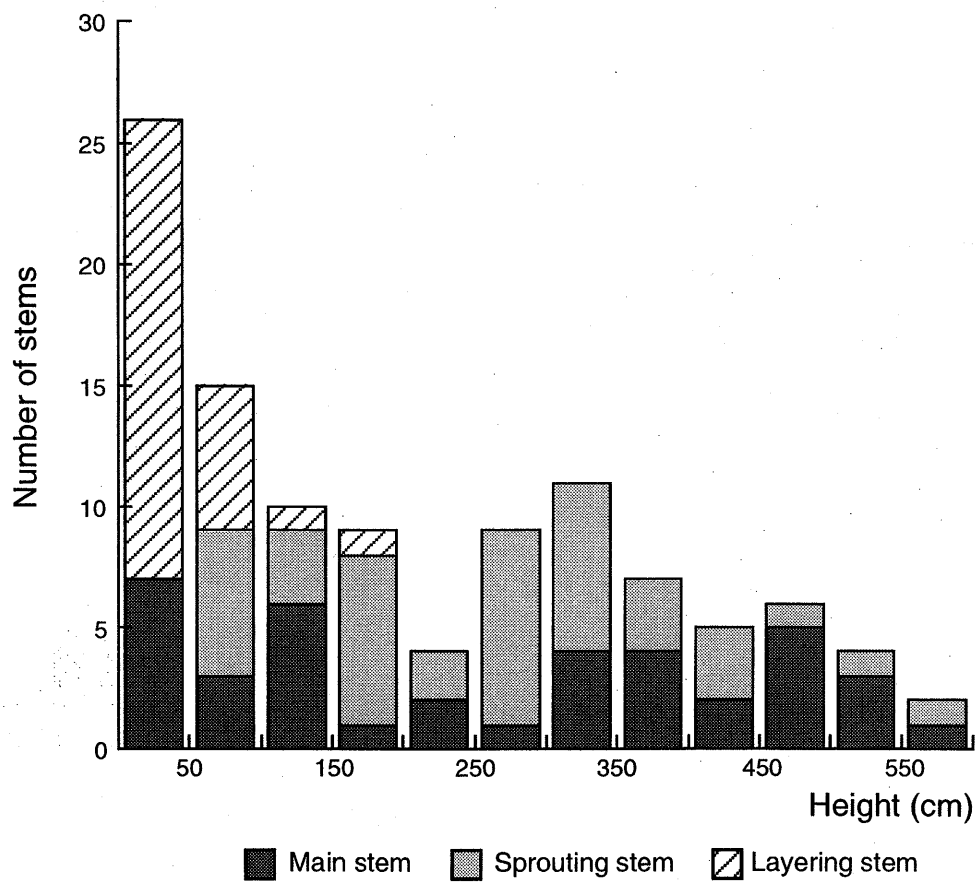


Fig. VI-5. Height distribution of main, sprouting, and layering stems of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* in Kuroboya.

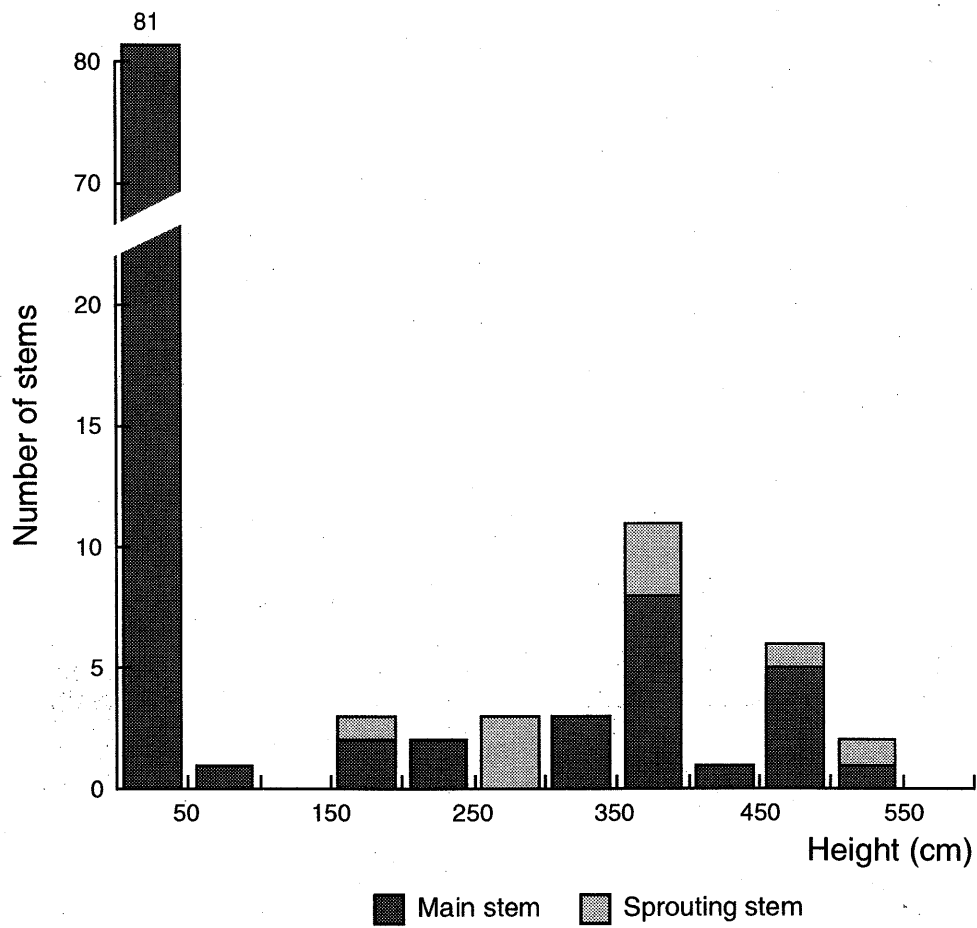


Fig. VI-6. Height distribution of main and sprouting stems of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* in Mt. Kamakuraji.

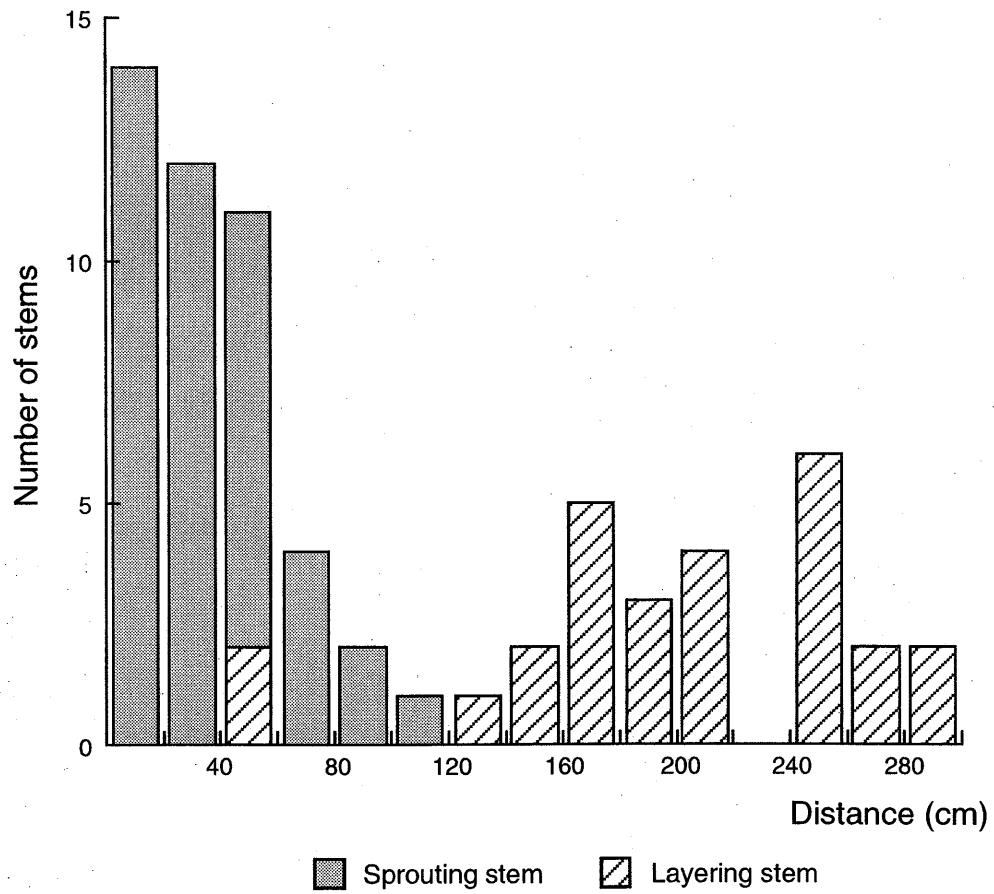


Fig. VI-7. Distance between main stem and clonal stems of each individual of *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* in Kuroboya.

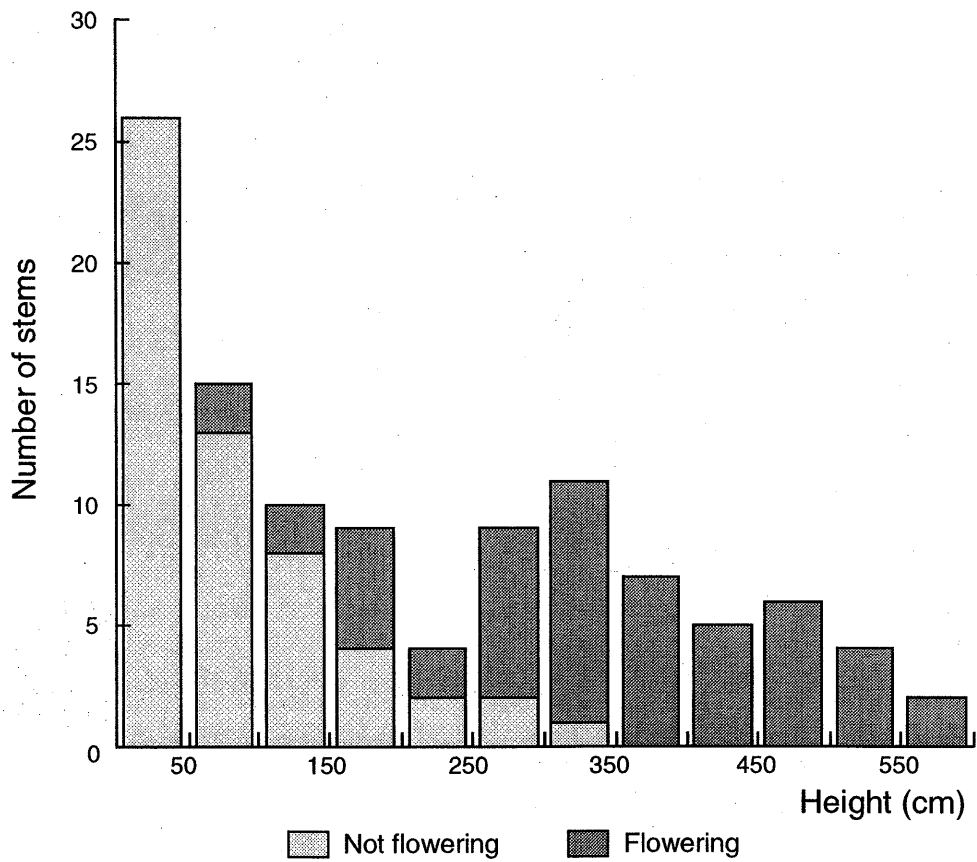


Fig. VI-8. Minimum stem size for flowering in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* in Kuroboya. Flowering experiences were judged from the existence of inflorescences which were kept on trees several years after flowering.

第 VII 章 総合考察

VII - 1 はじめに

植物個体群の維持機構を明らかにする上で、種子・花粉がどのように散布され、定着しているのか、それによって集団の遺伝的構造がどのように変化するのかを解明することは極めて重要である。しかし、第 I 章で述べたとおり、従来の遺伝子流動の推定方法には様々な問題があった。本章では、まずはじめに最新のマーカーであるマイクロサテライト遺伝マーカーを用いることの利点を整理しておきたい。

野外データから推定された花粉散布パターンや種子の散布距離は、花粉媒介者の行動と実際の花粉散布量との相違、受粉後の花粉間競争や近交弱勢、種子散布後の発芽サイトの有無や被食による死亡など、様々な生態学的、遺伝学的な要因によって実際の花粉の散布パターンとは大きく異なることが知られている (Levin 1981; Hamrick & Schnabel 1985; Ellstrand 1992)。

遺伝マーカーを用いたとしても、ライトの島モデル (Wright 1969) や isolation-by-distance モデル (Wright 1969)、ステッピングストーンモデル (Kimura & Weiss 1964) といった理論モデルは、非常に長い時間をかけて遺伝的浮動による集団分化を促進する力と、遺伝子流動によるそれを妨げる力とが平衡状態に達していることを前提にしている。そのため、モデルから推定される遺伝子流動の値は、現存集団における今現在の遺伝子流動の量やパターンを直接反映するものではなく、地理的にも非常に大きなスケールに適用される方法といえる。従って、これらの方法では植物の生活史特性や個体群構造、周辺環境の違いによって遺伝子流動がどのように変化するのかを解明することはできない。

現存集団を構成している各個体の遺伝子型を比較し、実生の両親や花粉親、個体間の血縁度を推定できれば、遺伝子流動のパターンと現存の個体群構造、

周辺環境との関係を直接検証することができる。このような観点からタンパク質多型を用いて親子分析 (Meagher & Thompson 1987; Schnabel & Hamrick 1995) や父性分析 (Godt & Hamrick 1993; Broyles *et al.* 1994; Schnabel & Hamrick 1995) をおこない、遺伝子流動を推定した例はいくつかあるが、その数は非常に少ない。さらに、タンパク質多型は利用できる遺伝子座および各遺伝子座あたりの対立遺伝子数が少ないため、情報量の不足を統計的手法によって補う必要があり、結果の信頼性に問題があった (Ouborg *et al.* 1999)。

1990年代に入り、遺伝子座あたりの対立遺伝子数が非常に多く、互いに共優性で、バンドパターンの違いを明確に区別できるなど、多くの利点を持つマイクロサテライト遺伝マーカーが開発された。現在では、動物、植物に関わらず、親子分析や父性分析、血縁度の推定や遺伝的構造の把握など、様々な分野でマイクロサテライト遺伝マーカーの有効性が認識されているが、野外集団、特に植物個体群を対象にしてこのような研究をおこなった例は極めて少ない。

本論文は、超多型を示すマイクロサテライト遺伝マーカーを用いてホンシャクナゲ個体群における種子・花粉の散布および定着の過程を正確に把握するとともに、野外集団で採取したデータに基づいてそれらのパターンを変化させる要因を推定し、植物個体群の更新過程や遺伝的構造の形成プロセスを明らかにしたものである。

VII - 2 種子、花粉を介した遺伝子流動

本研究では、ホンシャクナゲ個体群における遺伝子の散布および定着の過程について、開花個体から花粉として散布され、種子になるまでの遺伝子流動 (第 III 章)、散布された種子が発芽し、林床に定着するまでの生態学的プロセス (第 II 章)、これら2つの過程を反映した、開花個体から実生バンクへの総合的な遺伝子流動 (第 IV 章)、各世代の遺伝子流動の結果として集団内

および集団間に形成される血縁構造（第 V 章），の 4 つに分けて解析をおこなった．さらに第 VI 章では湿地周辺の個体群でも調査をおこない，山地個体群とは対照的に，萌芽幹や伏条幹の形成が頻繁に起きていることを明らかにした．本節では，山地個体群における種子，花粉を介した遺伝子流動に着目し，成木の開花→花粉散布→種子散布→種子の発芽，定着という一連のプロセスについて総合的に議論する．

VII - 2 - 1 成木の開花から種子形成まで

花粉の散布過程を正確に把握することは，種子散布と比較すると極めて難しく，遺伝マーカーの利用が特に有効な分野である．本論文では，第 III 章および第 IV 章においてホンシャクナゲ個体群における花粉散布パターンを検証した．ともにマイクロサテライト遺伝マーカーを用いているが，第 III 章では各果実に含まれる種子の花粉親を父性分析によって推定したのに対し，第 IV 章では林床に定着した実生の両親を親子分析によって推定し，成木の個体間距離から花粉散布距離を算出している．そのため，特定の年における，個体あるいは花レベルでの開花パターンと花粉散布との関係については第 III 章，数年から数十年という比較的長い時間スケールでの花粉を介した遺伝子流動については第 IV 章で扱っている．以下，各章の結果を踏まえて，ホンシャクナゲが開花し，花粉が散布され，種子ができるまでの過程について考察を進めていく．

ホンシャクナゲは樹高 50 cm を越えると開花能力を持ち，これは山地個体群でも，湿地周辺の個体群でも変わらない特徴である（第 II 章，第 VI 章）．しかし，他の多くの木本植物と同様に，ホンシャクナゲの開花数は個体や年によって大きく変化し，特定の個体が常に同程度の花を咲かせるわけではない．鎌倉寺山に設置した 150 m×70 m の方形区においても，1998 年の開花個体数は 18 個体，開花花序数は 111 個だったのに対し，翌 1999 年には 2 倍以

上の 39 個体が開花し、3 倍以上の 359 個の花序が確認された。開花数や開花密度の違いは花粉媒介者の行動を変化させ、必然的に植物の花粉散布パターンにも影響を及ぼしている。例えば、多くの花はより多くの花粉媒介者を誘引する一方で、探索行動の範囲を狭め、隣接個体間の交配や自家受粉を増加させると考えられている (Handel 1983; Fenster 1991; Godt & Hamrick 1993; Schnabel & Hamrick 1995)。本研究でも、1~2 個しか花を咲かせなかった個体の自殖率は 1.5-8.0% だったのに対し、9 つの花を咲かせた個体の自殖率は 62.1% と著しく高かった (第 III 章)。また、周辺の開花密度が低い個体では、64% もの花粉が 50 m 以上離れた別のサブ個体群から供給されていた。さらに、林床に定着した実生の親子分析によって、成木の個体群密度が低いほど花粉散布距離が長くなることが明らかになった (第 IV 章)。これらの結果は、開花密度が大きくなるほど花粉散布距離が短くなるという従来の説を、特定の年の開花パターン (第 III 章)、および個体群構造の違いという比較的長い時間スケール (第 IV 章) の両方から支持するものである。

ホンシャクナゲでは開花数や開花密度のみならず、開花順序も花粉散布パターンを決定する大きな要因である。ホンシャクナゲの葯は開花前に成熟しており、開花直後に裂開した葯から花粉が放出され、マルハナバチによって散布される。一方、雌しべが成熟して柱頭が花粉を受け取る準備ができるのは、開花後数日たってからであり、後に咲いた花から先に咲いた花への一方向的な花粉散布が起きる可能性がある。第 III 章では、隣接する個体間でこのような一方向的な花粉散布が確認され、開花順序の違いによって花粉散布パターンが変化していることが示唆された。しかし、一方向的な花粉散布が、個体群の維持というより長い時間スケールにおいてどのような意味を持っているのかについては、サンプル数を増やし、長期間に渡って解析をおこなう必要がある。

ホンシャクナゲの各個体、あるいは果実レベルでの花粉散布パターンは、

周辺の開花密度や開花順序によって大きく変化している。一方で、大部分の花は隣接する開花個体からより多くの花粉を受け取っており、62%以上の花粉が1.7 mしか離れていない最隣接個体から供給されているものもあった(第III章)。林床に定着した実生の両親を特定し、個体間の距離から花粉散布距離を推定した場合でも、ホンシャクナゲの花粉散布距離は最隣接個体間の距離よりは有意に長い、ランダム散布よりは著しく短く、ほとんどの花粉散布は5–10 m以内の個体間で起きていることが示された(第IV章)。これらの結果は、花粉散布は極めて限られた距離で起きている、leptokurticな分布を示しているとする他の多くの研究(Levin & Kerster 1974; Willson 1983; Hamrick 1987)を支持するものといえる。しかし、特定の母樹から採取した果実の20–30%は40–50 m以上離れた方形区外の個体によって結実していた(第III章)。また、実生の親子分析の結果でも、片親のみが方形区内に生育しているもの、両親ともに方形区外に生育しているものが数十パーセントに達しており、長距離の花粉散布が起きていることが示唆された(第IV章)。

近年、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた遺伝子流動の研究が進むにつれて、花粉散布が従来考えられていたよりも長距離で起きていること、散布曲線も単純な指数関数では説明できないことが示されつつある。例えば、熱帯の低地帯に分布するスズメガ媒花の高木樹種 *Pithecellobium elegans* の花粉散布距離は平均142 m、最大で350 mに達していた(Chase 1996)。また、69 haの調査区内に点在する虫媒・鳥散布のホオノキの花粉散布距離も131.1 m \pm 121.1 m (平均 \pm SD) と非常に大きな値を示していた(Isagi *et al.* 2000)。さらに、風媒のブナ科植物 *Quercus robur* と *Q. petraea* では、5.76 haの調査区内の花粉散布距離は平均20–60 mであり、 $R^2 > 0.90$ という高い決定係数を持つ指数関数的な減少曲線によって説明されたが、その一方で調査区外からの花粉フローが極めて多く、65–70%にも達していた(Streiff *et al.* 1999)。調査区内の花粉散布パターンから推定された指数関数ではこれだけの量の花粉フロ

一を説明できなかったことから、Streiffら(1999)は *Quercus robur* と *Q. petraea* の花粉散布距離は数百メートルに及び、近距離の負の指数関数的散布と長距離散布の二山型の分布を示していると結論している。また、アロザイムマーカを用いた研究でも、熱帯に分布する昆虫媒花の高木樹種 *Tachigali versicolor* と *Platypodium elegans* の花粉散布は、30-50%の割合を占める近距離散布と、20%を越える 750 m 以上の長距離散布の二山型を示すことが明らかになっている (Hamrick & Murawski 1990)。

ホンシャクナゲ個体群における 5-10 m 程度の近距離の花粉散布、および 40-50 m を越える方形区外からの長距離の花粉フローの存在は、なんらかの原因によって花粉の散布曲線が二山型あるいはさらに複雑な分布を示していることを示唆している。個体群に遺伝的構造が存在し、隣接個体間で近交弱勢が働いた場合、より遠くから供給された花粉の方が受粉に有利になるため (Waser 1993)、このような二山型の散布パターンが形成され得る。第 V 章で述べたとおり、ホンシャクナゲ個体群には遺伝的な血縁構造が認められ、距離的に近いものほど血縁度も高くなっている。近交弱勢がどの程度働いているのかが分からないために断定はできないが、遺伝的要因によってホンシャクナゲの花粉散布パターンが変化していることは十分に考えられる。

VII - 2 - 2 種子の散布および定着の過程

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析では種子親と花粉親とを区別できないため、種子の散布パターンを正確に推定することは困難である。しかし、種子散布距離が個体群構造や周辺環境の違いによって大きく変わらないとすれば、複数のサブ個体群で観察された実生バンクへの遺伝子流動を比較することによって、種子がどの程度散布されているのかを推察することは可能である。マルハナバチによって散布される花粉とは異なり、特別な散布器官を持たず、風によって散布されるホンシャクナゲの種子散布パタ

ーンがサブ個体群ごとに大きく異なっているとは考えにくく、この比較には意味があると思われる。

第 IV 章において、実生の親子分析から推定された遺伝子流動の距離は、サブ個体群 A1, A2, A3 それぞれで最大 5.6 m, 21.3 m, 10.6 m であった。また、推定された両親のうち、距離的に近いものを種子親と仮定した場合、散布距離の最大値はサブ個体群 A1, A2, A3 でそれぞれ 4.9 m, 13.2 m, 6.3 m であった。これらのことから、ホンシャクナゲの種子散布は大部分が 5 m 程度の近距離で起きており、サブ個体群 A2 で認められた 15–20 m 程度の遺伝子流動の多くは花粉散布によるものと推察される。これは個体群（開花）密度が低いことによってサブ個体群 A2 の花粉散布距離が長くなったとする第 IV 章の結論を支持するものである。

個体群内部における種子の散布距離が極めて限られている一方で、40 m 以上離れた方形区外からの種子散布は少なくとも 5.3–11.7% に達していた（第 IV 章）。これは、先に議論した花粉散布パターンと同様に、種子散布曲線も遺伝的構造や近交弱勢の影響によって二山型を示しているか、あるいは少数の長距離散布が累積されたためと考えられる。

第 II 章および第 VI 章で示した通り、ホンシャクナゲの実生は落葉が堆積した林床や裸地、高さ 1 cm を越える蘚苔類上ではほとんど見られず、高さ 1 cm 以下の蘚苔類上に特異的に分布していた。シャクナゲ亜属の種子は貯蔵養分が少なく（Escaravage *et al.* 1997; Pornon *et al.* 1997）、乾燥にも弱い（Cross 1981）ことが知られている。背丈の高い蘚苔類は幼根が土壤に達するのを妨げ、種子サイズが小さな植物の定着を阻害する（Cross 1981; Nakamura 1992）。また、落葉が堆積した林床や裸地は、地表面の状態が不安定で、種子や実生が埋没しやすく、土壤水分の蒸発による乾燥の影響を受けやすくなる（Johnson & Thomas 1978; Cross 1981; Nakamura 1992）。一方、背丈の低い蘚苔類は土壤水分の消失（Van Tooren *et al.* 1985）や土壤温度の変動（Richardson 1958）を

抑制することが知られており、しばしば実生のセーフサイトとして機能する (St. Clair *et al.* 1984; Nakamura 1987; During & Van Tooren 1990). ホンシャクナゲ実生の蘚苔類上での個体群密度は土壤上の 10 倍以上あり、特に落葉樹の樹冠下や林冠の欠失したサイトで大きな値を示していた (第 II 章). 一方、土壤上あるいは岩盤上の実生の個体群密度は林冠の欠失したサイトで最も小さく、林冠下で比較的大きな値を示していた. これらのことから、ホンシャクナゲの実生の定着は蘚苔類の存在に強く依存しており、「蘚苔類—落葉樹」, 「蘚苔類—上部開放」のサイトでは、蘚苔類による土壤水分の保持と林冠からの光によって、ホンシャクナゲの種子の発芽・定着に最適な条件が揃っているものと推察された.

しかし、ホンシャクナゲは全ての生育段階において蘚苔類に依存しているわけではなく、樹高 10 cm 以上の実生の 80%以上は土壤上に生育していた (第 II 章). 2 年間の追跡調査の結果、有意差は認められなかったものの、蘚苔類上に生育する実生は土壤上の個体よりも死亡率が低い傾向を示していた. また、生長量に関しては、基盤の違いによる差異は認められなかった. 一方、2 年間の調査期間中に生育サイトが蘚苔類から土壤へと変化した実生は、逆の変化が起きた実生の 5 倍もあり、統計的にも有意差が認められた. これらの結果から、ホンシャクナゲの実生は、1) 種子の発芽・定着といった生育段階の初期には、土壤の物理的安定性を高め、水分条件や温度条件を良好に保つ背丈の低い蘚苔類に依存しているが、2) 生長と共に根茎や葉群を発達させ、環境の変動に対する耐性を獲得すると同時に、光をめぐる一方向的な競争によって蘚苔類を消失させていることが明らかになった.

花粉散布は開花した個体間で行われるため、現存集団の分布様式や開花フェノロジーによって大きく変化するのに対し、種子の散布パターンは風の強さや動物の行動様式といった媒介者の特徴に加えて、種子の発芽、定着に適したセーフサイトがどのように分布しているかに強く依存している. また、

新たな個体群を形成できるのは種子だけであり、植物個体群の分布を決定しているのは種子の散布範囲と、その範囲内にあるセーフサイトの分布様式である。

鎌倉寺山のホンシャクナゲ個体群は支尾根の北側に帯状に分布しており、各サブ個体群はおよそ 30-50 m 離れている。ホンシャクナゲの種子は大部分が 5 m 程度の近距離に散布されるが、40 m 以上の長距離散布も 5-10% 程度あること、各サブ個体群の林床には多くの実生が生育していることから、帯状の分布様式が種子供給の限界によるものとは考えにくい。ホンシャクナゲのサブ個体群の間には発達した森林が成立しており、林床には落葉が堆積している。このような条件下ではホンシャクナゲの種子が発芽、定着することは極めて困難であり、実際、森林内を歩いてみても実生の定着は全く認められない。これらの事から、鎌倉寺山のホンシャクナゲの分布様式を決定しているのは種子の散布距離ではなく、種子の発芽、定着に適したセーフサイト、即ち背丈の低い蘚苔類の有無であると結論できる。

VII - 2 - 3 実生バンクへの遺伝子流動

実生バンクへの遺伝子流動は、林床に定着した実生の両親を特定することによって推定できる。この方法で推定された遺伝子流動の値は、開花個体間の花粉による遺伝的交流に加えて、結実した種子が周辺に散布され、それらが発芽し、林床に定着するまでの全ての過程を含んでおり、ある成木が特定の範囲に残した子孫あるいは遺伝子の量（繁殖成功度）として捉えることができる。花粉や種子の散布パターンがどのような曲線を描いているのかについては依然として議論が続いているが、地理的な距離に強く依存していることは間違いない。また、個体サイズについては、一般に大きな個体ほどより多くの健康な種子を生産すると考えられている (Harper & White 1974; Solbrig 1981; Cook & Lyons 1983)。これらのことから、実生バンクに近く、サイズの

大きな個体ほどより多くの遺伝子を実生バンクに供給している事が予想される。

本論文の第 IV 章では、ホンシャクナゲの 3 つのサブ個体群の林床から実生を採取し、その両親を特定することによって実生バンクへの遺伝子流動を推定した。全体的な傾向として、方形区内における成木の繁殖成功度は実生バンクからの距離と負の相間関係を示し、樹高とは正の相関を持っていた。しかし、各サブ個体群内部での遺伝子流動を比較すると、成木の繁殖成功度が樹高に強く依存する場合、距離によって決定されている場合、樹高と距離のいずれも関与していない場合の 3 つのパターンが認められた。これは、実生バンクからおおよそ 10 m 以内の成木個体数と樹高構成の違いによって、各個体の繁殖成功度が変化するためと推察された。即ち、実生バンク周辺に比較的樹高の低い個体ばかり生育している場合、どの個体も同程度の実生を残すために、成木の繁殖成功度と樹高、距離との関係は認められない。しかし、実生バンク周辺に樹高の高い、少数の成木しか生育していなければ、それらがより多くの実生を残す一方、花粉散布距離が長くなることによって、比較的遠くの個体も遺伝子を供給することができる。さらに、実生バンク周辺に樹高の高い個体から低い個体まで数多く生育している場合、樹高の高い個体ほどより多くの実生を生産することになる。

このように、実生バンクへの遺伝子流動は周辺の個体群構造の違いによって大きく変化するが、40 m 以上離れた方形区外からの遺伝子流動が 20-30% に達すること、サブ個体群間の遺伝子流動が 0.0-1.6% と極めて限られていることは、全てのサブ個体群に共通する特徴である (第 IV 章)。先に議論したとおり、ホンシャクナゲ個体群における種子、花粉を介した長距離の遺伝子流動は、1) leptokurtic な散布曲線は通常の曲線よりも長い裾を持ち、少量の長距離散布でも累積するとかなりの量になること、2) 個体群に遺伝的構造が存在し、隣接個体間で近交弱勢が働いた場合、遠くから散布された遺伝子

の方が受粉や生存に有利であること、が原因と考えられる。また、各サブ個体群間の発達した森林や急峻な尾根は、花粉媒介者であるマルハナバチの移動や、風による種子散布を妨げ、支尾根に沿った遺伝子流動を促進する働きがあるものと推察された (第 IV 章)。

遺伝子流動の量やパターンについては、現在でも複数の意見があり、議論が続いている。当初、ネオダーウィニズムの多くは遺伝子流動が広範囲で起きており、種の遺伝的同一性は保たれていると考えていた (Dobzhansky 1970; Mayr 1970)。これに異論を唱えたのは Ehrlich & Raven (1969) で、多くの経験的データは遺伝子流動が限られており、自然選択によって遺伝的な差異が生じうることを示していると述べ、Levin & Kerster (1974) や Levin (1981) がこれを支持した。近年、遺伝マーカーを用いた遺伝子流動の推定が行われるようになり、花粉媒介者の追跡やシードトラップなど、従来の方法から予想されていたよりも長距離で遺伝子流動が起きていることが明らかになった (Adams 1992; Ellstrand 1992)。また、いくつかの研究によって、遺伝子流動のパターンはそれぞれに特異的 (idiosyncratic) であり、種や個体群、個体、季節によって大きく変動することが示されている (Ellstrand & Marshall 1985; Hamrick 1987; Slatkin 1987)。

本論文の第 III 章、第 IV 章では、ホンシャクナゲの種子、花粉の散布パターンが、個体群構造や開花フェノロジーの違いによって大きく変化することを明らかにした。しかし、遺伝子流動の捉え方は注目する時間、空間スケールによって異なってくる。例えば、ホンシャクナゲの年毎の花粉散布パターンは個体レベルでの開花量や開花順序によって著しく変動するが (第 III 章)、実生バンクへの遺伝子流動というより長い時間スケールで考えると、個体レベルでの影響の大部分は相殺され、花粉の散布距離は個体群密度によって決定されている (第 IV 章)。また、花粉散布の多くが隣接個体間でおこなわれていること (第 III 章)、実生バンクへの遺伝子流動の大部分が 10–20 m 程度

の範囲内で起きていること（第 IV 章）に着目すると、遺伝子の散布範囲は極めて限られているということもできる。さらに、集団の遺伝的分化というレベルで考えると、遺伝的浮動の効果は世代当たりわずか 1 個体の遺伝子移入によって相殺されるため（Wright 1931; Kimura & Weiss 1964; Weiss & Kimura 1965）、本論文で示された 1% 程度のサブ個体群間の遺伝子流動は、集団の分化を妨げるには十分な量といえる。

このように、遺伝子の散布距離だけを議論しても余り意味はなく、様々な時間、空間スケールにおいて、どのような要因が遺伝子流動を決定しているのか、それによって集団の遺伝的構造がどのように変化し、個体群が維持されているのかといった問題の方が重要である。次節では集団の遺伝的構造の有無および強弱が、遺伝子流動によってどのように変化しているのかを検討する。

VII - 3 遺伝子流動のパターンと血縁構造の形成

コンピュータシミュレーションによって、遺伝子流動が限られており、隣接個体間での交配が頻繁に行われた場合、近親交配とホモ接合の増加によって遺伝的なパッチ構造が急速に形成されることが示されている（Turner *et al.* 1982; Sokal & Wartenberg 1983; Sokal *et al.* 1989）。しかし、現存集団における遺伝子流動を正確に測定することは近年まで極めて困難であり、集団の遺伝的構造と遺伝子流動との関係を明らかにした例はほとんどない。

第 V 章で明らかにした通り、ホンシャクナゲの血縁度は距離 10 m 以内の個体間で著しく高かった。これは、大部分の種子が隣接する少数の個体によって結実していること（第 III 章）、実生バンクから 5-10 m 以内の個体が非常に多くの子孫を残していること（第 IV 章）と一致する。また、成木が生産した種子同士の血縁度が高く、定着できる場所が限られているほど、個体間の血縁度は上昇すると考えられており（Hamrick & Nason 1996）、本研究の結果

もこれを支持するものである。

鎌倉寺山のホンシャクナゲ個体群は、地理的な分布から3つのサブ個体群に分けることができる。全体的な傾向として、サブ個体群内部における個体間の血縁度はゼロより有意に高いこと、隣接するサブ個体群間ではゼロからの有意差が無く、離れたサブ個体群での血縁度はゼロより有意に低いことが明らかになった(第 V 章)。種子・花粉の散布量が距離に強く依存していることを考えると、この結果は極めて常識的なものといえる。しかし、実生の親子分析によって得られたサブ個体群間の遺伝的交流の頻度はわずか0-1.6%であり(第 IV 章)、サブ個体群間の血縁度と遺伝子流動との関係を実際のデータに基づいて検証することはできなかった。

各サブ個体群の遺伝的なまとまりは、サブ個体群内部における遺伝的構造の有無および強弱によって決定されていた(第 V 章)。即ち、個体間の血縁度が極めて高いサブ個体群 A1 では、個体間距離と血縁度との相間関係が認められなかったのに対し、個体間の血縁度にゼロからの有意差が認められなかったサブ個体群 A3 では、距離と血縁度との間に著しい負の相間関係が存在していた。この結果は、サブ個体群 A3 の内部には遺伝的なまとまりを持つ小さなパッチが形成されており、それによってサブ個体群全体の血縁度が低下していることを示唆している。反対に、サブ個体群 A1 のように遺伝的構造が認められない場合、サブ個体群の遺伝的同一性が保たれ、地理的な分布と遺伝的なまとまりが一致するものと推察された。

従来、低密度で生育している種あるいは個体群では散布種子の重複が少なくなるため、個体群内部の遺伝的構造が強くなると考えられていた(Hamrick *et al.* 1993; Young & Merriam 1994; Hamrick & Nason 1996)。しかし、ホンシャクナゲ個体群の遺伝的構造の強さは個体群密度ではなく、開花パターンの違いによって決定されていた。即ち、各開花木から距離 10 m 未満の開花個体数の平均値が、距離 10 m 以上 20 m 未満の開花個体数の平均値よりも多い個体群

ほど、個体群内部の遺伝的構造が強くなっていた（第 V 章）。虫媒花を持つ植物では、多くの花をつけるほど花粉媒介者の探索行動範囲が狭くなり、隣接個体間での交配や自家受粉が促進されることが示されている（Handel 1983; Fenster 1991; Godt & Hamrick 1993; Schnabel & Hamrick 1995）。ホンシャクナゲにおいても、特定の母樹から採取した果実の父性分析（第 III 章）、実生バンクへの花粉を介した遺伝子流動の推定（第 IV 章）のいずれの結果も、開花密度あるいは個体群密度が増加するほど花粉散布距離が短くなり、自家受粉が促進されていることを示していた。これらの結果から、少なくともホンシャクナゲ個体群では、個体群密度が高くなるほど散布種子の重複が大きくなり、遺伝的構造が弱くなるという予測は成り立たず、個体群（開花）密度の増加は花粉媒介者の探索行動範囲を抑制し、隣接個体間の交配や自家受粉を増加させることによって、遺伝的構造を強めているものと推察された。

個体群内部の遺伝的構造は、個体群の樹高構成にも影響を受けている。これは、母樹周辺に散布された種子や特定のサイトに定着した実生の遺伝的類似性は一般に高く、集団内に著しい遺伝的構造を形成するものの、その後の密度効果や種間競争、自然選択といった要因によって少数の個体だけが生き残り、個体間の遺伝的類似性が低下するためである（Hamrick *et al.* 1993; Hamrick & Nason 1996; Epperson & Alvarez-Buylla 1997）。ホンシャクナゲにおいても、地理的距離と血縁度との関係は樹高の低い個体ほど高い傾向にあり、この考えを支持していた（第 V 章）。しかし、各サブ個体群の樹高構成はほとんど同じであり（第 IV 章）、サブ個体群内部における遺伝的構造の有無および強弱が樹高構成の違いに起因しているとは考えにくい。

ホンシャクナゲ個体群における遺伝子流動の量やパターンは、個体の分布様式や個体群（開花）密度の違いによって大きく変化する。サブ個体群内部における遺伝的構造は、このような遺伝子流動のパターンに大きく影響され、近距離の開花個体数が多いほど花粉の散布距離が短くなり、遺伝的構造は強

くなる。遺伝的構造が強くなるとは、サブ個体群内部に遺伝的なまとまりを持つ小さなパッチが形成されることを意味しており、これらの構造は個体の生長とともに次第に消失する。遺伝的構造の消失に伴い、サブ個体群内部に生育する個体同士の血縁度は高くなり、サブ個体群全体としてのまとまりは強くなる。地理的に区分された見かけ上のサブ個体群は、内部に様々な遺伝的構造を含んでおり、その構造の有無および強弱は個体の分布様式や開花パターンといった生態学的要因によって大きく変化するものと結論できる。

VII - 4 無性繁殖による個体群の維持

種子や花粉による遺伝子流動で維持されている鎌倉寺山の個体群とは異なり、クロボヤの湿地周辺のホンシャクナゲ個体群では萌芽幹や伏条幹といったクローン幹が優占しており、実生の定着もほとんど認められなかった（第VI章）。ホンシャクナゲの実生の発芽、定着は高さ1 cm以下の蘚苔類の存在に強く依存しているため（第II章）、林床に落葉が厚く堆積し、オオミズゴケのように背丈の高い蘚苔類しか生育していない湿地周辺では、実生の定着は極めて困難である。しかし、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた個体識別の結果、湿地周辺の10 m×10 mの方形区内には38個体もの成木が生育しており、少なくともかつては有性生殖が行われていたことが明らかになった（Naito *et al.* 1999）。

クロボヤ周辺の山林は、薪炭林や里山として昭和20年代後半まで広く利用されており、林床に堆積する落ち葉も重要な資源として利用されていた。このような里山利用が行われていた時代には、林冠は開け、林床に堆積する落ち葉も少なく、ホンシャクナゲの実生の定着に有利に働いていたと推察される。しかし、山林の放棄に伴って、林冠は閉鎖し、林床に堆積する落ち葉が増え、それを利用する人もいなくなった。シャクナゲ亜属の *Rhododendron maximum* の伏条幹の形成は、湿潤環境下で頻繁に起こることが知られている

(Plocher & Carvell 1987). また、耐陰性の低木樹種 *Acer pensylvanicum* は林冠が閉鎖している環境では頻繁に匍匐枝を形成するが、林冠が開けると共に伸長生長を開始し、有性生殖を行うようになる (Hibbs & Fischer 1979). 林床に実生がほとんど無く、多数のクローン幹によって形成されている現在のホンシャクナゲ個体群の構造は、湿地周辺という湿潤な環境条件に加えて、山林放棄による林冠の閉鎖、落葉の堆積といった複数の要因によって形成されたものと推察された (第 VI 章).

実生による更新パターンに着目すると、植物個体群の発達は次の3つに区分することができる (Eriksson 1989; Jelinski & Cheliak 1992). 一つ目は、実生の定着が個体群の発達段階のごく初期にだけ起きている場合である. 二つ目は、実生による更新が繰り返し起きている個体群で、鎌倉寺山のホンシャクナゲ個体群はこのパターンに相当する. 三つ目は、数十年あるいは数百年に一度という頻度で個体群が更新される場合で、竹の一斉開花枯死はこれに当てはまる. 二つ目、三つ目の個体群では、遺伝的多様性は維持されるが、実生の定着が初期にしか行われないうつ目の個体群では、時間と共に遺伝的多様性が失われ、環境変動に適応する能力が減少していくと考えられている.

クロボヤのホンシャクナゲ個体群は、実生由来の複数の個体から形成されているものの、現在は実生の定着がほとんど起きておらず、一つ目の個体群の発達過程に類似している. マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた遺伝解析の結果、クロボヤのホンシャクナゲ個体群は鎌倉寺山の個体群と同等の遺伝的多様性を保持していた (Naito *et al.* 1999). しかし、山林が放棄され、実生のセーフサイトが消失したと思われるのは僅か数十年前のことであり、今後も同等の遺伝的多様性が維持されていくとは限らない.

それでは、仮に実生の更新が全く行われず、無性繁殖によって維持され続けた場合、クロボヤのホンシャクナゲ個体群にどのような変化が起きるのであろうか. 無性生殖に依存した個体群では、ジェネットおよびラメット間の

種内競争によって、ごく少数のジェネットが優占するようになる (Soane & Watkinson 1979). また、クローン植物は一般に長い寿命を持っているため (Garcia & Antor 1995; Steinger *et al.* 1996; Escaravage *et al.* 1998), 新たな実生の定着が困難になる. これらのことから、無性生殖に依存した個体群では遺伝的多様性が低下すると考えられている (Harper 1977). 一方、クローン植物においても、1) ミクロサイトの不均質性によって、様々な環境に適応したクローンが共存可能になること (Antonovics & Ellstrand 1984; Ellstrand & Roose 1987), 2) ごくまれに実生による更新が行われること (Soane & Watkinson 1979), 3) クローン同士の力関係にバランスが生じ、複数のクローンが共存可能になること (Hartnett & Bazzaz 1985), によって、遺伝的多様性が維持され得るとする意見もある.

このように、無性生殖と有性生殖が遺伝的多様性の維持にどう関わっているのか、それによって個体群の維持機構がどう変化するのかについては、依然として議論が続いている. 今後、クロボヤのホンシャクナゲ個体群がどのように変化していくのかを予想するのは極めて困難であるが、山林利用あるいはそれに相当する間伐作業等をおこない、林床の落葉を除去することによって、有性生殖を促進させ、遺伝的多様性の保全を計ることは可能であろう. クロボヤの個体群が人為的な環境下で成立していたこと、県の天然記念物に指定され、国のレッドリストにも登録されていることなどを考慮すると、この地域のホンシャクナゲ個体群に対しては積極的な保全策を検討すべきである.

謝辞

本研究を進めるにあたり、数多くの方に一方ならぬご協力とご援助をいただいた。

特に、広島大学の中越信和教授、井鷲裕司助教授には本論文を取りまとめるにあたって有益なご助言をいただいた。また、2年前に広島大学を退官された根平邦人教授には、公私ともに大変お世話になり、多くのご指導を賜った。広島大学の石橋昇教授、堀越孝雄教授、櫻井直樹教授、富樫一巳教授には数々のご教示を賜った。

マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた実験手法、解析方法については、当時森林総合研究所におられた井鷲裕司氏（現広島大学助教授）、同小谷圭司氏、姫路工業大学の内藤和明氏をはじめ、多くの方々のご指導とご協力をいただいた。特に、全くの初心者であった私を辛抱強く指導して下さった井鷲裕司氏と、開発したマーカーの使用を快く認めて下さった内藤和明氏には、心からお礼申し上げたい。

広島県の希少植物であるホンシャクナゲを調査するにあたっては、広島県教育委員会、福富町教育委員会、福富町竹仁財産区および白木町牛岩地区の方々に多大なご理解とご協力をいただいた。

研究室の先輩、同期、後輩には、多方面に渡って終始お世話になった。ここに改めて感謝の意を表したい。

最後に、私的なことではあるが、常に私を見守り続けてくれた両親と、研究室の同期であり、今は妻となった順子に対して、心から感謝の言葉を述べておきたい。

摘要

第 I 章 序論

植物個体群は、ある世代から次の世代へと遺伝子が引き継がれる事によって維持されている。種子植物の場合、遺伝子の移動媒体は種子と花粉であり、それらの散布及び定着の過程、即ち遺伝子流動を明らかにすることは植物個体群の維持機構を考える上で極めて重要である。従来の遺伝子流動の推定方法には様々な問題点があったが、近年急速に利用が進んでいるマイクロサテライト遺伝マーカーは遺伝子座あたりの対立遺伝子数が非常に多く、互いに共優性で、バンドパターンの違いを明確に区別できるなど、多くの利点を持っている。現在では親子分析や父性分析、血縁度の推定や遺伝的構造の把握など、様々な分野でマイクロサテライト遺伝マーカーの有効性が認識されているが、野外集団、特に植物個体群を対象にしてこのような研究をおこなった例は極めて少ない。

本研究の目的は、マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた遺伝分析と野外でのデータ採取の両面から、植物個体群の維持機構を明らかにすることである。対象種としては、サブ個体群を形成すること、実生バンクをつくること、虫媒花であることなどから、ツツジ科ツツジ属のホンシャクナゲを選定した。第 II 章から第 V 章までは広島県中部の鎌倉寺山に設置した 150 m×70 m の方形区で調査をおこない、成木の開花→花粉散布→種子の発芽・定着→血縁構造の形成という一連のプロセスを明らかにした。また、第 VI 章では湿地周辺の個体群でも調査をおこない、鎌倉寺山の山地個体群との共通点と相違点、それらをもたらす要因について検討した。

第 II 章 実生のセーフサイト

種子の発芽、定着に適したセーフサイトを明らかにするため、成木個体群

の林床に 10 m×10 m の方形区を設置し、実生の位置とサイズを測定した。さらに地表面の状態を岩盤，土壤，蘚苔類の 3 つ，林冠条件をホンシャクナゲ，常緑樹，落葉樹，上部開放の 4 つに区分し，コンピュータ上でオーバーレイすることによって，各サイトにおける実生の個体群密度とサイズ構造を明らかにした。また，2 年間に渡って実生の生存，枯死，生長量，地表面の状態の変化などを追跡した。その結果，1) ホンシャクナゲの実生は，土壤の物理的安定性を高め，水分条件や温度条件を良好に保つ蘚苔類の存在に強く依存していること，2) 実生の生長と共に根茎や葉群を発達させ，環境の変動に対する耐性を獲得すると同時に，光をめぐる一方向的な競争によって蘚苔類を消失させていることなどが明らかになった。

第 III 章 花粉の散布パターン

本章では，マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた父性分析によって，各果実の花粉親組成，花粉散布距離，自殖率の推定をおこない，開花フェノロジーとの関係を論じた。鎌倉寺山に設置した 150 m×70 m の方形区において，1998 年に開花した 18 個体の開花フェノロジーを調査し，開花時期，開花数の違いに着目して 4 個体の母樹から 5 つの果実（216 個体の種子）を採取した。父性分析によってそれらの花粉親を推定した結果，1) 各果実はごく少数の花粉親によって結実していること，2) 花粉フローの多くは 20 m 以内の隣接する個体間で起きていること，3) 50 m 以上におよぶ長距離の花粉散布も 20–30% の頻度で起きていること，4) 自殖率や花粉親の構成は個体ごとに大きく異なっており，開花数の多い個体での自殖率が著しく高いこと，5) ホンシャクナゲの雌雄異熟性に起因すると思われる，遅く咲いた花から早く咲いた花への一方向的な花粉フローが起きていること，などが明らかになった。

第 IV 章 実生バンクへの遺伝子流動

実生バンクへの遺伝子流動を明らかにするため、150 m×70 m の方形区内に成立している3つのサブ個体群の林床に10 m×10 mのプロットを1つずつ設置し、70 個体ずつ実生を採取した。マイクロサテライト遺伝マーカーを用いた親子分析の結果、1) 実生バンクから5 m 以内の成木が非常に多くの実生を残していること、2) 3つのサブ個体群間の遺伝的交流は2%以下であること、3) 30-50%もの遺伝子が40-50 m 離れた方形区外の個体から供給されていること、などが明らかになった。また、個体群内部における成木の繁殖成功率(残した実生数)と樹高、実生バンクからの距離との関係は各サブ個体群で大きく異なっており、成木の繁殖成功率が樹高に強く依存する場合、距離によって決定されている場合、樹高と距離のいずれも関与していない場合の3つのパターンが認められた。これは、実生バンク周辺の個体群構造(成木の個体数とサイズ構成)の違いによるものと推察された。

第 V 章 血縁構造の形成と維持

遺伝子の散布および定着の過程がホンシャクナゲ個体群にどのような血縁構造をもたらしているのか、血縁構造の有無や強弱を決定する要因は何なのかといった問題を明らかにするため、150 m×70 m の方形区内に生育する各個体の遺伝子型から個体間の血縁度を推定した。その結果、1) 距離10 m 以内の個体間の血縁度が著しく高いこと、2) およそ90-100 m 以上離れると、個体間の血縁度はゼロよりも有意に低くなること、3) サブ個体群レベルでの血縁度は、サブ個体群内部でプラス、隣接するサブ個体群間ではゼロ、離れたサブ個体群間ではマイナスの値を示すこと、などが明らかになった。従来、低密度で生育している種あるいは個体群では種子散布の重複が少なくなるため、個体群内部の遺伝的構造、即ち個体間距離と血縁度との負の相関関係は強くなると考えられていた。しかし、ホンシャクナゲ個体群の遺伝的構

造の強さは個体群密度ではなく、開花パターンの違いによって決定されており、各開花木から距離 10 m 未満の開花個体数が多いほど、個体群内部の遺伝的構造が強くなっていた。これは、多くの花をつけるほど花粉媒介者の探索行動範囲が狭くなり、隣接個体間での交配や自家受粉が促進されるためと考えられ、種子の重複度から予想される傾向とは全く逆の結論となった。

第 VI 章 無性生殖と有性生殖 —湿地周辺の個体群との比較—

種子や花粉によって維持されている鎌倉寺山の山地個体群とは異なり、湿地周辺のホンシャクナゲ個体群では萌芽幹や伏条幹といったクローン幹が優占しており、実生の定着もほとんど認められなかった。調査をおこなった山林は、薪炭林や里山として昭和 20 年代後半まで強度に利用されており、林床に堆積する落ち葉も資源として利用されていた。このような利用がされていた時代には、林冠は開け、林床に堆積する落ち葉も少なく、ホンシャクナゲの実生の定着に有利に働いていたと考えられる。しかし、山林の放棄に伴って、林冠は閉鎖し、林床に堆積する落ち葉が増え、それを利用する人もいなくなった。林床に実生がほとんど無く、多数のクローン幹によって維持されている湿地周辺のホンシャクナゲ個体群の構造は、湿潤な環境に加えて、山林放棄による林冠の閉鎖、落ち葉の堆積といった複数の要因によって形成されたものと推察された。

第 VII 章 総合討論

本研究では、ホンシャクナゲ個体群における遺伝子の散布および定着の過程について、1) 開花個体から花粉として散布され、種子になるまでの遺伝子流動、2) 散布された種子が発芽し、林床に定着するまでの生態学的プロセス、3) これら 2 つの過程を反映した、開花個体から実生バンクへの総合的な遺伝子流動、4) 各世代の遺伝子流動の結果として集団内および集団間

に形成される血縁構造について、各章で明らかにした。さらに第 VI 章では湿地周辺の個体群でも調査をおこない、山地個体群とは対照的に、萌芽幹や伏条幹によって維持されていることを明らかにした。本章では、各章の結果を踏まえ、植物個体群の維持機構と遺伝子流動について、総合的に議論をおこなった。

引用文献

- Adams, W. T. (1992) Gene dispersal within forest tree populations. *New Forests* 6, 217-240.
- Antonovics, J. and Ellstrand, N. C. (1984) Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. I. A test of the frequency-dependent selection hypothesis. *Evolution* 38, 103-115.
- Ashley, M. V. and Dow, B. D. (1994) The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. In: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications* (eds. Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and DeSalle, R.) pp. 185-201. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Barbujani, G. (1987) Autocorrelation of gene frequencies under isolation by distance. *Genetics* 117, 777-782.
- Beattie, A. J. (1971) Itinerant pollinators in a forest. *Mandroño* 21, 120-124.
- Berg, E. E. and Hamrick, J. L. (1995) Fine-scale genetic structure of a turkey oak forest. *Evolution* 49, 110-120.
- Bianco, J. and Bulard, C. (1974) Etude de la germination des graines de *Rhododendron ferrugineum* L. et de *Tofieldia calyculata* L. *Wahlb. Travaux Scientifiques Parc Naturel de la Vanoise* 5, 121-130.
- Bos, M., Harmens, H. and Vrieling, K. (1986) Gene flow in *Plantago*. I. Gene flow and neighborhood size in *P. lanceolata*. *Heredity* 56, 43-54.
- Boyle, T., Liengsiri, C. and Piewluang, C. (1990) Genetic structure of black spruce on two contrasting sites. *Heredity* 65, 393-399.
- Broyles, S. B., Schnabel, A. and Wyatt, R. (1994) Evidence for long-distance pollen dispersal in milkweeds (*Asclepias exaltata*). *Evolution* 48, 1032-1040.
- Bruford, M. W., Cheesman, D. J., Coote, T., Green, H. A. A., Haines, S. A., O'ryan, C.

- and Williams, T. R. (1996) Microsatellites and their application to conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (eds. Smith, T. B. and Wayne, R. K.) pp. 278-297. Oxford University Press, New York.
- Bruford, M. W. and Wayne, R. K. (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3, 939-943.
- Campbell, D. R. and Waser, N. W. (1989) Variation in pollen flow within and among populations of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 43, 1444-1455.
- Canham, C. D. (1988) Growth and canopy architecture of shade-tolerant trees: response to canopy gaps. *Ecology* 69, 786-795.
- Cannings, C. and Thompson, E. A. (1981) *Genealogical and genetic structure*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Casgrain, P. and Legendre, P. (1999) *The R Package for Multivariate and Spatial Analysis, Version 4.0. User's Manual*. Department of Biological Sciences, University of Montreal, Montreal, Canada.
- Chase, M. R., Moller, C., Kessel, R. and Bawa, K. S. (1996) Distant gene flow in tropical trees. *Nature* 383, 398-399.
- Christy, E. J. and Mack, R. N. (1984) Variation in demography of juvenile *Tsuga heterophylla* across the substratum mosaic. *Journal of Ecology* 72, 75-91.
- Clement, B. and Touffet, J. (1981) Vegetation dynamics in Brittany heathlands after fire. *Vegetatio* 46, 157-166.
- Cook, R. E. and Lyons, E. E. (1983) The biology of *Viola fimbriatula* in a natural disturbance. *Ecology* 64, 654-660.
- Cross, J. R. (1981) The establishment of *Rhododendron ponticum* in the Killarney oakwoods, S. W. Ireland. *Journal of Ecology* 69, 807-824.
- Dawson, I. K., Waugh, R., Simons, A. J. and Powell, W. (1997) Simple sequence

- repeats provide a direct estimate of pollen-mediated gene dispersal in the tropical tree *Gliricidia sepium*. *Molecular Ecology* 6, 179-183.
- Dib, C. S., Faure, C., Fizames, C., Samon, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. and Weissenbach, J. (1996) A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 380, 152-154.
- Dobzhansky, T. (1970) *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.
- Dow, B. D. and Ashley, M. V. (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5, 615-627.
- Dow, B. D. and Ashley, M. V. (1998) High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *Journal of Heredity* 89, 62-70.
- During, H. J. and Van Tooren, B. F. (1990) Bryophyte interactions with other plants. *Botanical Journal of Linnean Society* 104, 79-98.
- Ehrlich, P. R. and Raven, P. H. (1969) Differentiation of populations. *Science* 165, 1228-1232.
- Eisikowitch, D. and Woodell, S. R. J. (1975) Some aspects of pollination ecology of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. in Britain. *New Phytology* 74, 307-322.
- Ellstrand, N. C. and Marshall, D. L. (1985) Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* 126, 606-616.
- Ellstrand, N. C. (1992) Gene flow among seed plant populations. *New Forests* 6, 241-256.
- Ellstrand, N. C. and Roose, M. L. (1987) Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74, 123-131.
- Epperson, B. K. and Allard, R. W. (1989) Spatial autocorrelation analysis of the

- distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics* 121, 369-377.
- Epperson, B. K. and Alvarez-Buylla, E. R. (1997) Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution* 51, 275-282.
- Epperson, B. K., Huang, Z. and Li, T. Q. (1999) Measures of spatial structure in sample of genotypes for multiallelic loci. *Genetical Research* 73, 251-261.
- Epperson, B. K. and Li, T. (1996) Measurement of genetic structure within populations using moran's autocorrelation statistics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10528-10532.
- Eriksson, O. (1989) Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos* 55, 231-238.
- Escaravage, N., Pornon, A., Doche, B. and Till-Bottraud, I. (1997) Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian Journal of Botany* 75, 736-743.
- Escaravage, N., Questiau, S., Pornon, A., Doche, B. and Taberlet, P. (1998) Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology* 7, 975-982.
- Facelli, J. M. (1994) Multiple indirect effects of plant litter affect the establishment of woody seedlings in old fields. *Ecology* 75, 1727-1735.
- Facelli, J. M. and Pickett, S. T. A. (1991) Plant litter: its dynamics and effects on plant community structure. *The Botanical Review* 57, 1-32.
- Fenster, C. B. (1991) Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. *Evolution* 45, 398-409.
- Garcia, M. B. and Antor, R. (1995) Age and size structure in populations of long-lived dioecious geophyte: *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *International Journal of Plant Science* 156, 236-243.

- Geburek, T. and Tripp-Knowles, P. (1994) Genetic architecture in bur oak, *Quercus macrocarpa* (Fagaceae), inferred by means of spatial autocorrelation analysis. *Plant Systematics and Evolution* 189, 63-74.
- Godt, M. J. W. and Hamrick, J. L. (1993) Patterns and levels of pollen-mediated gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* 47, 98-110.
- Hamrick, J. L. (1987) Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: *Differentiation Patterns in Higher Plants* (ed. Urbanska, K. M.) pp. 53-67. Academic Press, London.
- Hamrick, J. L. and Lee, J. M. (1987) Effect of soil surface topography and litter cover on the germination, survival, and growth of musk thistle (*Carduus nutans*). *American Journal of Botany* 74, 451-457.
- Hamrick, J. L. and Murawski, D. A. (1990) The breeding structure of tropical tree populations. *Plant Species Biology* 5, 157-165.
- Hamrick, J. L., Murawski, D. A. and Nason, J. D. (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* 107/108, 281-297.
- Hamrick, J. L. and Nason, J. D. (1996) Consequences of dispersal in plants. In: *Population Dynamics in Ecological Space and Time* (eds. Rhodes, O. E. J., Chesser, R. K. and Smith, M. H.) pp. 203-236. University of Chicago Press, Chicago.
- Hamrick, J. L. and Schnabel, A. (1985) Understanding the genetic structure of plant populations: some old problems and a new approach. In: *Population Genetics in Forestry. Lecture Notes in Biomathematics 60* (ed. Gregorius, H.-R.) pp. 50-70. Springer-Verlag, New York.
- Handel, S. N. (1983) Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In: *Pollination Biology* (ed. Real, L.) pp. 163-211. Academic Press, New York.

- Hanski, I. A. and Simberloff, D. (1997) The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. In: *Metapopulation Biology: ecology, genetics, and evolution* (eds. Hanski, I. A. and Gilpin, M. E.) pp. 5-26. Academic Press, San Diego.
- Harmon, M. E. and Franklin, J. F. (1989) Tree seedlings on logs in *Picea-Tsuga* forests of Oregon and Washington. *Ecology* 70, 48-59.
- Harper, J. L. (1977) *Population Biology of Plants*. Academic Press, London.
- Harper, J. L. and White, J. (1974) The demography of plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5, 420-463.
- Harper, J. L., Williams, J. T. and Sager, G. R. (1965) The behavior of seed in soil. I. The heterogeneity of soil surfaces and its role in determining the establishment of plants from seed. *Journal of Ecology* 53, 273-286.
- Hartnett, D. C. and Bazzaz, F. A. (1985) The regulation of leaf, ramet and genet densities in experimental populations of the rhizomatous perennial *Solidago canadensis*. *Journal of Ecology* 73, 429-443.
- Herben, T. (1994) The role of reproduction for persistence of bryophyte populations in transient and stable habitats. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* 76, 115-126.
- Hibbs, D. E. and Fischer, B. C. (1979) Sexual and vegetative reproduction of striped maple. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 106, 222-227.
- 堀田 満 (1995) シラクナゲ「植物の世界」(大場 秀章, 能城 修一 編), 130-134. 朝日新聞社, 東京.
- Isagi, Y., Kanazashi, T., Suzuki, W., Tanaka, H. and Abe, T. (2000) Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata* Thunb. *Heredity* 84, 143-151.
- 井鷲 裕司 (2001) マイクロサテライト遺伝マーカーで探る樹木の更新過程「森

の分子生態学」(種生物学会 編) 59-84. 文一総合出版, 東京.

Jarne, P. and Lagoda, P. J. L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 424-429.

Jelinski, D. E. and Cheliak, W. M. (1992) Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (Salicaceae) in a heterogeneous landscape. *American Journal of Botany* 79, 728-736.

Johnson, C. D. and Thomas, A. G. (1978) Recruitment and survival of seedlings of a perennial *Hieracium* species in a patchy environment. *Canadian Journal of Botany* 56, 572-580.

Jonsson, B. G. and Esseen, P.-A. (1990) Treefall disturbance maintains high bryophyte diversity in a boreal spruce forest. *Journal of Ecology* 78, 924-936.

Kadereit, J. W. and Briggs, D. (1985) Speed of development of radiate and non-radiate plants of *Senecio vulgaris* L. from habitats subject to different degrees of weeding pressure. *New Phytology* 99, 155-169.

Keizer, P. J., Van Tooren, B. F. and During, H. J. (1985) Effects of bryophytes on seedling emergence and establishment of short-lived forbs in chalk grassland. *Journal of Ecology* 73, 493-504.

Kimmerer, R. W. and Allen, T. F. H. (1982) The role of disturbance in the pattern of a riparian bryophyte community. *American Midland Naturalist* 107, 370-383.

Kimura, M. and Weiss, G. (1964) The stepping-stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49, 561-576.

Knowles, P., Perry, D. L. and Foster, H. A. (1992) Spatial genetic structure in two tamarack (*Larix laricina* (du Roi) K. Koch) populations with differing establishment histories. *Evolution* 46, 572-576.

Konuma, A., Tsumura, Y., Lee, C. T., Lee, S. L. and Okuda, T. (2000) Estimation of gene flow in the tropical-rainforest tree *Neobalanocarpus haimii*

- (Dipterocarpaceae), inferred from paternity analysis. *Molecular Ecology* 9, 1843-1852.
- Law, R., Bradshaw, A. D. and Putwain, P. D. (1977) Life history variation in *Poa annua*. *Evolution* 31, 233-246.
- Legendre, P. and Legendre, L. (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Leonardi, S. and Menozzi, P. (1996) Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech) in Italy. *Heredity* 77, 359-368.
- Leonardi, S., Raddi, S. and Borghetti, M. (1996) Spatial autocorrelation of allozyme traits in a Norway spruce (*Picea abies*) population. *Canadian Journal of Forest Research* 26, 63-71.
- Levin, D. A. (1981) Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68, 233-253.
- Levin, D. A. and Kerster, H. W. (1968) Local gene dispersal in *Phlox*. *Evolution* 22, 130-139.
- Levin, D. A. and Kerster, H. W. (1974) Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology* 7, 139-220.
- Lloret, F. (1991) Population dynamics of the coprophilous moss *Tayloria tenuis* in an Pyrenean forest. *Holarctic ecology* 14, 1-8.
- Lynch, M. (1988) Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* 5, 584-599.
- Mallik, A. U., Hobbs, R. J. and Legg, C. J. (1984) Seed dynamics in *Calluna-Arctostaphylos* heath in North-Eastern Scotland. *Journal of Ecology* 72, 855-871.
- Markert, C. L. and Møller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45, 753-763.
- Marshall, D. L. (1988) Effective mate choice in wild radish: evidence for selective

- seed abortion and its mechanism. *American Naturalist* 131, 739-756.
- Marshall, D. L. and Ellstrand, N. C. (1985) Proximal causes of multiple paternity in wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* 126, 596-605.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
- Mayer, E. (1970) *Populations, Species, and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- Meagher, T. R. (1986) Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. *American Naturalist* 128, 199-215.
- Meagher, T. R. and Antonovics, J. (1982) The population biology of *Chamaelirium luteum*, a dioecious member of the lily family. III. Life history studies. *Ecology* 63, 1690-1700.
- Meagher, T. R. and Thompson, E. (1987) Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). *Ecology* 68, 803-812.
- Miyazaki, Y. and Isagi, Y. (2000) Pollen flow and the intrapopulation genetic structure of *Heloniopsis orientalis* on the forest floor as determined using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 718-723.
- Muona, O. (1990) Population genetics in forestry. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resources* (eds. Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. and Weir, B. S.) pp. 282-298. Sinauer Associates, Sunderland.
- Naito, K., Isagi, Y., Kameyama, Y. and Nakagoshi, N. (1999) Population structure in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* assessed with microsatellites and their implication for conservation. *Journal of Plant Research* 112, 405-412.
- Naito, K., Isagi, Y. and Nakagoshi, N. (1998) Isolation and characterization of

- microsatellites of *Rhododendron metternichii* Sieb. et Zucc. var. *hondoense* Nakai. *Molecular Ecology* 7, 927-928.
- Nakamura, T. (1987) Bryophyte and lichen succession on fallen logs and seedling establishment in *Tsuga-Abies* forests of central Japan. *Symposia Biologica Hungarica* 35, 485-495.
- Nakamura, T. (1992) Effect of bryophytes on survival of conifer seedlings in subalpine forests of central Japan. *Ecological Research* 7, 155-162.
- Nakashizuka, T. (1989) Role of uprooting in composition and dynamics of an old-growth forest in Japan. *Ecology* 70, 1273-1278.
- O'Connell, B. M. and Kelty, M. J. (1994) Crown architecture of understory and open-grown white pine (*Pinus strobus* L.) saplings. *Tree Physiology* 14, 89-102.
- Oden, N. L. and Sokal, R. F. (1986) Directional autocorrelation: an extension of spatial correlograms to two dimensions. *Systematic Zoology* 35, 608-617.
- Ouborg, N. J., Piquot, Y. and Van Groenendael, J. M. (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87, 551-568.
- Perry, D. J. and Knowles, P. (1991) Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) stands. *Heredity* 66, 137-142.
- Perttula, U. (1941) Untersuchungen über die generative und vegetative Vermehrung der Blütenpflanzen in den Wald-, Hainwiesen- und Hainfelsen-Vegetation. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae Series A* 58, 1-388.
- Peterson, C. J., Carson, W. P., McCarthy, B. C. and Pickett, S. T. A. (1990) Microsite variation and soil dynamics within newly created treefall pits and mounds. *Oikos* 58, 39-46.
- Plocher, A. E. and Carvell, K. L. (1987) Population dynamics of rosebay rhododendron thickets in the southern Appalachians. *Bulletin of the Torrey*

Botanical Club 114, 121-126.

Popma, J. and Bongers, F. (1988) The effect of canopy gaps on growth and morphology of seedlings of rain forest species. *Oecologia* 75, 625-632.

Pornon, A., Escaravage, N., Thomas, P. and Taberlet, P. (2000) Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) populations. *Molecular Ecology* 9, 1099-1111.

Pornon, A., Escaravage, N., Till-Bottraud, I. and Doche, B. (1997) Variation of reproductive traits in *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) populations along a successional gradient. *Plant Ecology* 130, 1-11.

Queller, D. C. and Goodnight, K. F. (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43, 258-275.

Queller, D. C., Strassmann, J. E. and Hughes, C. R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 285-288.

Richardson, J. A. (1958) The effect of temperature on the growth of plants on pit heaps. *Journal of Ecology* 46, 537-546.

Ritland, K. (2000) Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Molecular Ecology* 9, 1195-1204.

Runkle, J. R. (1981) Gap regeneration in some old-growth forests of the eastern United States. *Ecology* 62, 1041-1051.

Schaal, B. A. (1980) Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. *Nature* 284, 450-451.

Schmitt, J. (1980) Pollinator foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). *Evolution* 34, 934-943.

Schnabel, A. and Hamrick, J. L. (1995) Understanding the population genetic structure of *Gleditsia triacanthos* L.: the scale and pattern of pollen gene flow. *Evolution* 49, 921-931.

- Schnabel, A., Laushman, R. H. and Hamrick, J. L. (1991) Comparative genetic structure of two co-occurring tree species, *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). *Heredity* 67, 357-364.
- Shapcott, A. (1995) The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). *Heredity* 74, 28-38.
- Silvertown, J. W. and Doust, J. L. (1993) *Introduction to Plant Population Biology*. Blackwell Science, Oxford.
- Slatkin, M. (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787-792.
- Smith, J. M. (巖佐 庸・原田 祐子 訳) *Evolutionary Genetics*. 産業図書, 東京.
- Smouse, P. E. and Peatkall, R. (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82, 561-573.
- Soane, I. D. and Watkinson, A. R. (1979) Clonal variation in populations of *Ranunculus repens*. *New Phytologist* 82, 557-573.
- Sohlberg, E. H. and Bliss, L. C. (1987) Responses of *Ranunculus sabinei* and *Papaver radicum* to removal of the moss layer in a high-arktic meadow. *Canadian Journal of Botany* 65, 1224-1228.
- Sokal, R. R., Jacquez, G. M. and Wooten, M. C. (1989) Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. *Genetics* 121, 845-855.
- Sokal, R. R. and Wartenberg, D. E. (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics* 105, 219-237.
- Solbrig, O. T. (1981) Studies on the population biology of the genus *Viola*. II. The effect of plant size on fitness in *Viola sororia*. *Evolution* 35, 1080-1093.
- Sork, V. L., Nason, J., Campbell, D. R. and Fernandez, J. F. (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in*

- Ecology and Evolution 14, 219-224.
- Sorrensen-Cothorn, K. A., Ford, E. D. and Sprugel, D. G. (1993) A model of competition incorporating plasticity through modular foliage and crown development. *Ecological Monographs* 63, 277-304.
- St. Clair, L. L., Webb, B. L., Johansen, J. R. and Nebeker, G. T. (1984) Cryptogamic soil crusts: enhancement of seedling establishment in disturbed and undisturbed areas. *Reclamation and Revegetation Research* 3, 129-136.
- Steinger, T. S., Körner, C. and Schmid, B. (1996) Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine *Carex curvula*. *Oecologia* 105, 94-99.
- Stewart, C. N. J. and Via, L. E. (1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14, 748-750.
- Streiff, R., Ducousso, A., Lexer, C., Steinkellner, H., Gloessl, J. and Kremer, A. (1999) Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. *Molecular Ecology* 8, 831-841.
- Summers, K. and Amos, W. (1997) Behavioral, ecological, and molecular genetic analysis of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. *Behavioral Ecology* 8, 260-267.
- Thompson, E. A. (1975) The estimation of pairwise relationships. *Annals of Human Genetics* 39, 173-188.
- Thomson, J. D. and Plowright, R. C. (1980) Pollen carryover, nectar rewards, and pollinator behavior with special reference to *Diervilla lonicera*. *Oecologia* (Berl.) 46, 68-74.
- Thomson, J. D., Price, M. V., Waser, N. M. and Stratton, D. A. (1986) Comparative studies of pollen and fluorescent dye carryover by natural pollinators of

Erythronium grandiflorum. *Oecologia* 69, 561-566.

Turner, M. E., Stephens, J. C. and Anderson, W. W. (1982) Homozygosity and patch structure in plant populations as a result of nearest-neighbor pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 203-207.

Ueno, S., Tomaru, N., Yoshimaru, H., Manabe, T. and Yamamoto, S. (2000) Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. *Molecular Ecology* 9, 647-656.

Van Tooren, B. F. (1988) The fate of seeds after dispersal in chalk grassland: the role of the bryophyte layer. *Oikos* 53, 41-48.

Van Tooren, B. F., During, H. J. and Lensink, M. J. G. (1985) The influence of the bryophyte layer on the microclimate in chalk grasslands. *Abstracta Botanica*, 9, Supplementum 2 219-230.

Via, S. (1994) The evolution of phenotypic plasticity: what do we really know? In: *Ecological Genetics* (ed. Real, L. A.) pp. 35-57. Princeton University Press, Princeton.

我が国における保護上重要な植物種および植物群落研究委員会植物群落分科会 (1996) 植物群落レッドデータ・ブック. 日本自然保護協会, 世界自然保護基金日本委員会, 東京.

Waser, N. M. (1988) Comparative pollen and dye transfer by pollinators of *Delphinium nelsonii*. *Functional Ecology* 2, 41-48.

Waser, N. M. (1989) Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: seed set and offspring fitness. *Evolution* 43, 1097-1109.

Waser, N. M. (1993) Population structure, optimal outbreeding, and assortative mating in angiosperms. In: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding* (ed. Thornhill, N. W.) pp. 173-199. The University of Chicago Press, Chicago.

- 渡辺 泰邦 (1976) 鎌倉寺山周辺地域の森林植生. 広島基町高等学校研究紀要, 1, 155-175.
- Weiss, G. and Kimura, M. (1965) A mathematical analysis of the stepping stone model of genetic correlation. *J. Appl. Prob.* 2, 129-149.
- Willson, M. F. (1983) *Plant Reproductive Ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97-159.
- Wright, S. (1969) *Evolution and the Genetics of Populations, The Theory of Gene Frequencies*. University of Chicago Press,
- Yamamoto, S. (1996) Gap regeneration of major tree species in different forest types of Japan. *Vegetatio* 127, 203-213.
- Young, A. G. and Merriam, H. G. (1994) Effects of forest fragmentation on the spatial genetic structure of *Acer saccharum Marsh.* *Heredity* 72, 201-208.
- Young, H. J. and Stanton, M. L. (1989) Influence of environmental quality on pollen competitive ability in wild radish. *Science* 258, 1631-1633.