

絶滅危惧植物サクラソウにおける遺伝的多様性  
の  
維持機構に関する生殖生物学的研究

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
博士(農学)学位論文

北本 尚子

## 目次

|   |     |
|---|-----|
| 緒論                                      | 1   |
| 第1章 マイクロサテライトマーカーの開発                    | 14  |
| 第2章 空間的遺伝構造の把握                          | 21  |
| 第1節 景観を考慮した空間的遺伝構造の把握                   | 22  |
| 第2節 局所集団内の空間的遺伝構造                       | 39  |
| 第3章 花粉による遺伝子流動の把握                       | 45  |
| 第1節 開花フェノロジーが花粉の散布距離と空間的遺伝構造に及ぼす影響      | 46  |
| 第2節 近傍の異花型ジェネット数が次世代の遺伝的多様性と実生の成長に及ぼす影響 | 65  |
| 第4章 総合考察                                | 80  |
| 摘要                                      | 88  |
| 謝辞                                      | 91  |
| 引用文献                                    | 93  |
| 表                                       | 105 |
| 図                                       | 117 |
| 付録                                      | 143 |

略語表および用語説明表

| 頁  | 略 語         | 正式名称   |
|----|-------------|--|
| 1  | IUCN        | International Union for Conservation of Nature and Natural Resources<br>国際自然保護連合 |
| 1  | FAO         | Food and Agriculture Organization of the United Nations<br>国連食料農業機関              |
| 9  | $N_m$       | Number of migrants<br>有効な集団あたりの 1 世代あたりの移住個体数                                    |
| 15 | CTAB        | Cetyl trimethyl ammonium bromide<br>セチルトリメチルアンモニウムブロミド                           |
| 15 | PCR         | Polymerase Chain Reaction  |
| 17 | $N_a$       | Number of allele 対立遺伝子数  |
| 17 | $N_{ra}$    | Number of rare allele 稀な対立遺伝子数   |
| 17 | $H_o$       | Observed heterozygosity ヘテロ接合度の観察値   |
| 17 | $H_e$       | Expected heterozygosity ヘテロ接合度の期待値   |
| 24 | GPS         | Global Positioning System  |
| 26 | $H_s$       | 遺伝子多様度の不偏推定値   |
| 26 | $P_{gen}$   | あるマルチローカス遺伝子型が観察される確率  |
| 26 | $P_{se}$    | 別々のジェネットに属する遠く離れている 2 つのラメットが、偶然<br>同じ遺伝子型を示す確率                                  |
| 27 | AMOVA       | Analysis of molecular variance   |
| 27 | $F_{ST}$    | 集団間の遺伝的な分化程度を表す指標  |
| 28 | $F_{IS}$    | 近親交配に起因するヘテロ接合度の減少具合   |
| 28 | $f$         | $F_{IS}$ の不偏推定値  |
| 28 | NAC         | The mean number of alleles in common<br>1 遺伝子座あたりの共有対立遺伝子数                       |
| 50 | $\Phi_{jk}$ | 小花 $j$ と花粉親候補 $k$ との交配確率   |
| 50 | $dis_{jk}$  | 小花 $j$ と花粉親 $k$ との物理的な距離 (m)   |
| 50 | $num_{jk}$  | 小花 $j$ の開花期間中に、花粉親 $k$ が咲かせていた日ごとの総開<br>花数の累積値                                   |
| 51 | AIC         | Akaike's Information Criteria 赤池の情報量基準   |

## 緒論

### 1-1 研究の背景

人間活動の直接的・間接的影響により、生物多様性がかつてない速さで消失している。生物多様性とは、生態系、種、種内の遺伝的多様性の 3 つの多様性によって構成される概念である (Frankham *et al.* 2004)。生物多様性は、材木や医薬品、育種素材などの直接的な資源を人間に提供するだけでなく、酸素の供給や水の浄化など人間が生存していくうえで必要不可欠な生態系サービスを提供する。また、豊かな自然は、宗教や美術などの文化の発展を促し、人間の健全な精神を育むうえで欠かせない存在である。そのため、生物多様性の保全は、人類がとりくむべき最重要課題として認識されるようになり、1992 年に、生物多様性保全条約が採択された。

生物多様性のひとつを構成する種内の遺伝的多様性は、種が将来の環境変動に適応し、存続していくうえで必要不可欠なものである (Fisher 1930)。国際自然保護連合 (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources: IUCN) は、今後も地球の環境変動が予測されていること、また、遺伝的多様性の消失が繁殖や生存能力の低下を引き起こす原因になることの理由から、種内の遺伝的多様性を保全する必要性を訴えている (IUCN 1992)。また種内の遺伝的多様性は、育種によって作物を改良し、安定した食糧生産を達成するうえでも欠かせない。作物種には、通常、近縁野生種や在来品種などの幅広い種内変異が存在しており、近代の品種改良はそれらの遺伝的変異をたくみに利用することで達成されてきた。そのため、国連食料農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO) も近縁野生種や在来品種を遺伝資源として保全する必要性を認識し、その方策を推し進めている (FAO 1996)。

種内の遺伝的多様性を保全する方法には、種子や株、花粉などを採取し、自生地外で保存する自生地外(*ex situ*)保全と、自然保護区などを設置し自生地内で保全する自生地内(*in situ*)保全がある。自生地外保全は、遺伝資源を確実に保存できるため、1960年代から現在に至るまで世界中で盛んに取り組まれてきた。しかし、自生地外保全には、種が保有する遺伝的多様性の一部しか保存できないこと、種子の更新時に自然選択や遺伝的浮動が働き、遺伝子組成が従来のもものと異なってしまう可能性があること、維持に膨大な手間と費用がかかることなどの欠点がある(FAO 1996)。そのため、突然変異や自然選択などの進化的プロセスが作用する自然環境条件下で、人間が最低限の管理を行いながら種内の遺伝的多様性を保全する自生地内保全の重要性がしだいに認識されるようになってきた(IUCN 1992; FAO 1996)。自生地内保全には、予期せぬ環境変動により集団そのものが絶滅してしまう危険性があるものの、突然変異によって新たな遺伝的変異が供給される点や、種や生態系レベルの多様性保全に大きく貢献するなどの利点が多数あるため、今後はその必要性が高まっていくものと思われる。

自然集団内の遺伝的多様性を自生地内保全するためには、遺伝的多様性に影響する要因を明らかにする必要がある。特に、固着性である植物は、様々な遺伝子型を持った個体が空間上にどのように分布しているのかを表したものである空間的な遺伝構造の変化を通して環境変動に適応するため、特に空間的遺伝構造に影響する要因を明らかにすることは重要である。

遺伝的多様性に影響する要因のうち、これまでの研究から、集団サイズが急激に縮小した際の影響は比較的良好に分かっている。生息地の破壊などによって集団サイズが急激に縮小し、外からの移住がない場合には、たとえ任意交配をしていたとしても、世代が進むにつれて近親交配が進み、近交弱勢が発現したり、遺伝的浮動の働きによって有害遺伝子が固定したりして、集団の存続が危うくなることが分かっている

(Hauser *et al.* 1994; Frankham *et al.* 2004)。

これらの研究は、保全活動において遺伝的要因を考慮する必要性を明らかにした点で意義深い。が、集団内の遺伝的多様性に影響する要因は、小集団化のみとは限らない。景観の改変や、ポリネーターの消失、気候変動による開花フェノロジーの変化、個体密度の減少など様々な要因が考えられる。これらの変化も集団の遺伝的多様性に影響を及ぼしえると考えられるが、その影響は全く分かっていない。

このような遅れが生じた原因としては、従来の保全遺伝学が集団サイズとそれに依存する遺伝的浮動の効果の研究を重視してきたことが挙げられる。植物の遺伝子は、花粉や種子の散布によって移動するため、受粉から種子散布に至るまでの一連の繁殖過程は、集団内の遺伝的多様性に大きな影響を及ぼす。当然のことながら、自然集団では分布密度や景観が均一であることはなく、開花が揃うこともないため、繁殖過程は複雑にならざるをえない。加えて、刻々と変化する環境に応じてポリネーターの行動も変化するため、虫媒植物の繁殖過程はさらに複雑となる。自然の集団ではこれらの様々な生態的要因が複雑に作用しあいながら、集団内の遺伝的多様性を形づくっている。しかしながら、従来の保全遺伝学では、このような複雑なプロセスを簡略化させ、ヘテロ接合度の減少速度のみに着目し、それを任意交配する集団、すなわち空間構造や開花フェノロジーの変異が全くない非現実的な集団の個体数で表現する例が多い(例えば、Frankham *et al.* 2004)。すなわち、全ての生態的要因の効果をも、集団サイズと遺伝的浮動の効果で説明しようとしてきたのである。このような単純化は、数理的な処理を容易にはするが、生物学的な実態とはかけ離れており、特に植物集団の適応と分化に深く関わる空間的な遺伝構造に対しては何の情報も与えない。そのため、個々の生態的要因が変化した際の遺伝構造の変化に対しては、知見が不足している。

しかし、近年の分子生物学の発展により、分子マーカーを利用することで自然集団

内で遺伝構造が形成される過程を詳細に把握できるようになってきた。分子マーカーは、表現形質と異なりその表現型が環境の影響を受けないため、遺伝的変異を直接観察することができる。そのため、個体の遺伝子型と分布位置の情報を組み合わせれば、空間的遺伝構造を簡単に把握することができる。加えて、多型性の高いマイクロサテライトマーカーを用いて種子と繁殖個体の遺伝子型を決定することにより、高い精度で花粉親を特定できるため、開花フェノロジーや分布密度といった生態的要因が遺伝子流動を介して空間的遺伝構造にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることができる。そこで、本研究では、自生地内保全を進めるための基礎的知見を得ることを目的として、日本の野生生物の中で最も多くの生態学的情報を蓄積しているサクラソウをモデル植物とし、自然集団内における遺伝構造の形成過程の解明を試みた。

本章でははじめに、サクラソウにおいて遺伝構造の形成過程を明らかにする意義について述べる。次に、遺伝構造の形成過程に関する従来知見を概説し、絶滅危惧種の保全において遺伝構造を明らかにすることの重要性について述べる。さらに、遺伝構造への影響力が大きい遺伝子流動に対する研究史とその問題点について論述し、本研究の具体的な目的を述べる。

## 1-2 サクラソウの概要

サクラソウ (*Primula sieboldii* E. Morren) は、北海道から九州までの草原や落葉樹林の林床に生育する多年生草本である。地下茎によるクローン成長を行い、クローン成長で増えた株をラメット、遺伝的に同一なラメットの集まりをジェネットと呼ぶ。ジェネットは毎年新しいラメットを形成しながら、数十年以上生きるといわれている(鳥居 1985)。各ラメットは4月から6月に約15cmの花茎を1本伸ばし、5から10の小花を

散形状につける。異型花柱性の繁殖システムを持ち、柱頭が葯よりも高い位置にある長花柱花をつけるジェネットと、低い位置にある短花柱花をつけるジェネットが、集団内に約 1:1 の割合で存在している。自家花粉に対して不和合性を示すだけでなく、他家花粉であっても同じ花型に由来する花粉に対しては不和合性を示すため、種子生産には異花型ジェネット間での適法受粉が必要である。種子は7月ごろに結実し、種子親のごく近傍に重力散布される (Ishihama *et al.* 2003)。

サクラソウの生活史や生物間相互作用に関しては、これまでの研究によって多くの知見が蓄積されている。自生地における観察や顕微鏡を用いた昆虫の口吻の観察から、トラマルハナバチ (*Bombus diversus* Smith) が主要なポリネーターであること (Washitani *et al.* 1995)、また、ハナムグリハネカクシ属の甲虫が花の中で繁殖し花粉や柱頭を食害すること (Washitani *et al.* 1996)、サクラソウに感染し果実に胞子を生産するクロホ病菌が存在すること (Kakishima *et al.* 1995) などが明らかにされている。また、ポリネーターであるトラマルハナバチがコロニーを形成し、維持するためにはネズミの巣跡や、春から秋にかけて次々と蜜や花粉を供給する多数の植物種を必要とすることが知られている (鷲谷 1998)。これらの事実は、サクラソウが多くの生物と密接に関係を保ちながら、集団を維持していることを示しており、サクラソウ集団が健全な状態で存続しているかどうかは、地域の生態系の健全性を評価するうえで良い指標になることを示している。

しかし、近年、生息地の開発や園芸目的の採集などにより、サクラソウのジェネット数は全国的に減少しており、現在では絶滅危惧Ⅱ類に分類されている (環境庁 2000)。現存する集団においても、一部の集団では種子生産の低下や自殖へのかたよりが報告されており、その原因としては、周辺部の都市化にともなうポリネーターの消失 (Washitani *et al.* 1991, 1994) や、生息地の縮小にともなう異花型ジェネットの集団内からの機会的な消失 (Matsumura & Washitani 2000) が考えられている。サクラソ



ウはクローン成長するため、種子生産が低下しても集団がすぐに絶滅することはないが、異花型ジェネットからの他家受粉が強く制限されている状態が今後も続くようであれば、集団内に保有されている遺伝的多様性が低下し、絶滅する危険性が高まると予測されている(Washitani 1996)。

絶滅危惧植物の中には、レブンアツモリソウやキキョウなど、サクラソウと同じようにクローン成長を行い、昆虫によって花粉を媒介される他殖性植物が少なくない(Ellstrand 1992)。そのため、それらの植物の中には、サクラソウと同じようにポリネーターの消失や交配相手の消失によって種子繁殖に支障をきたし、遺伝的多様性の消失の危機にさらされている植物種が少なからず存在していると考えられる(鷲谷 1997)。従って、サクラソウにおいて繁殖過程の実態を明らかにし、遺伝的多様性が維持される機構を明らかにすることは、他の植物の自生地内保全を進めるうえでも有益であると考えられる。

### 1-3 保全において遺伝構造と遺伝子流動を把握する意義

生物種は、通常、いくつかの地域集団から構成されており、その地域集団はさらに複数の集団から構成されている。このような集団の階層構造に従い、種内の遺伝的多様性も種内の地理的変異、地域内の集団間の変異、集団内の個体間に見られる変異などいくつかの階層に分けることができる。また、連続した集団内においても個体間に見られる遺伝的変異が、しばしば偏って分布しているのが観察される。例えば、アメリカ南東部に分布するマルバアサガオ (*Ipomoea purpurea*) の集団内では、ピンク色の花をつける個体と青色の花をつける個体の分布はランダムではなく、それぞれ 5~10m という比較的狭い範囲内に固まって分布している(Epperson & Clegg 1986)。このように対立遺伝子や遺伝子型の非ランダムな空間分布を、特に空間的遺伝構造

という(Loveless & Hamrick 1984)。

集団内の個体間から地域集団間までの階層のうち、どの階層で大きな遺伝的変異が観察されるかは、遺伝子流動の範囲や、自然選択が働く時空間的なスケール、遺伝的浮動の大きさによって決定される(Wright 1951; Allendorf 1983)。一般に、花粉や種子の散布範囲が広く、集団間の遺伝子流動が頻繁に生じている場合には、集団内の多様性が高くなり、集団間の変異は小さくなる。一方、集団間の遺伝子流動が制限されている場合には、遺伝的浮動の働きにより集団内の遺伝的多様性が減少し、集団間の変異が大きくなる。加えて、それぞれの集団で別々の方向に自然選択が働いている場合には、それぞれの環境に対する適応が進む結果、集団間の変異はさらに大きくなる。このように遺伝構造は、集団の歴史や生息環境、繁殖や種子分散に関わる様々な生活史特性と深く関わっている(Loveless & Hamrick 1984)。そのため遺伝構造は、それぞれの生物種がたえまなく変動する環境に対して、どのようにして適応してきたかを反映しているといえる。

また、遺伝構造は、将来の環境変動に対する集団の反応を大きく規定する(Loveless & Hamrick 1984)。例えば、遺伝子流動が広範に行われており、集団内の遺伝的多様性が高い集団では、劣性の弱有害遺伝子がヘテロ接合の状態で集団内に維持されやすい。そのような集団が、生息地の破壊により他の集団からの遺伝子流動を制限されるようになると、近親交配によって弱有害遺伝子をホモ接合体で保有する個体の頻度が高くなり、集団の適応度が低下して、極端な場合には存続が危なくなる。しかし、もともと遺伝子流動の範囲が狭い生物の場合は、弱有害遺伝子をホモ接合で保有する個体はすみやかに自然淘汰されるため、集団内における弱有害遺伝子の頻度はそれほど高くない。このような集団では、急激な孤立にさらされても適応度がそれほど低下しないと考えられている(Charlesworth & Charlesworth 1987)。このように遺伝構造に関する知見は、環境の変化に対する集団の反応を予

測するうえで必要不可欠な情報を提供する。

遺伝構造に関する知見は、適切な保全管理を行ううえでも欠かせない。サクラソウの場合、種子繁殖に支障をきたしている集団を長期的に保全するためには、人工交配やポリネーターの再導入などによりサクラソウ本来の繁殖を保障する必要がある(鷲谷 1997)。また、集団の存続が緊急に危ぶまれる場合には、他の集団から株や種子を導入したり、新しい集団を復元したりして集団内の遺伝的多様性を維持する必要がある。しかし、前述のように、植物集団の中には連続した集団内においても空間的遺伝構造が観察される場合があり、別々の環境に適応している個体間を人為的に交配させると次世代集団の適応度をかえって低下させてしまうことがある(Ellstrand 1992)。そのため、人為的管理に伴う遺伝的攪乱を最小にし、サクラソウ集団の遺伝的多様性を維持するためには、まず比較的良好な環境が保たれている自生地で、サクラソウ本来の遺伝構造を明らかにし、その遺伝構造の形成過程に深く関わる繁殖過程の実態を把握する必要がある。

#### 1-4 遺伝子流動の研究史とその問題点

植物集団の遺伝子流動は、花粉と種子、クローン成長器官の移動によって生じる。このうち、繁殖過程に深く関わる花粉による遺伝子流動の推定は、これまでに 4 つの方法で行われてきた。第 1 の方法は花粉供給源個体からの花粉の動きを直接測定する方法である。この方法では、個体ごとに色の異なる蛍光パウダーを花粉にまぶして識別可能にしたり(Price & Waser 1979 など)、同種内で花粉の色や大きさが異なっている植物を用いたりして花粉の散布距離を推定する(Webb & Bawa 1983 など)。ポリネーターの飛行距離から花粉の散布距離を間接的に推定する方法(Levin & Kerster 1968 など)もこれに含まれる。第 2 の方法は、それぞれ別々の対立遺伝子に

固定させた個体を実験集団の中央部と周辺部に配置し、中央部からの遺伝子の動きを計測する方法である (Handell & Mishkin 1984 など)。第 3 の方法は、種子と繁殖個体の遺伝子型を比較して、花粉親候補を絞りこんでいく父性解析という方法によって推定する方法である。第 4 の方法は、自然集団の遺伝構造から過去に生じた遺伝子流動を推定する方法で、集団間の遺伝的分化程度を表す Wright (1951) の  $F_{ST}$  や Nei (1987) の  $G_{ST}$  から、1 世代あたりの移住個体数  $Nm$  を推定する方法である。

これらの 4 つの方法には、それぞれ長所と短所がある。第 1、第 2、第 3 の方法は、直接的推定法と呼ばれる方法である (Slatkin 1985) が、この方法は現在行われている遺伝子流動を高い精度で捉えられる一方で、観察期間や場所が限られるという欠点がある。遺伝子流動は、後述するように年や場所によってしばしば大きく変動するため、直接的方法で求めた遺伝子流動の結果を一般化するにはその変動の大きさに注意を払う必要がある。一方、間接的方法と呼ばれる第 4 の方法は、過去に生じた遺伝子流動を推定するものであるが、推定するには利用した遺伝マーカーが自然選択の影響を受けないことや、突然変異率が低いこと、親と子供の世代が重複していないことなど様々な仮定を必要とする。自然集団において、これらの仮定がすべて満たされることは稀であるため、間接的方法によって現在生じている遺伝子流動を正確に推定できる可能性は低い (Whitlock & McCauley 1999)。集団内の遺伝子流動を推定するには、直接的方法と間接的方法の両者の特徴を踏まえて用いることが求められる (Slatkin 1985)。

1990 年代までに花粉による遺伝子流動を推定した研究の大部分は、第 1 と第 2 の方法が主流であったが、90 年代に入って分子マーカーが利用できるようになると、第 4 の方法を用いた研究が多数の植物種で行われるようになってきた (Ellstrand 1992)。さらに、90 年代の後半に、多型性が非常に高いマイクロサテライトマーカーが利用できるようになると、第 3 の方法を用いて花粉親を高い精度で特定した研究が盛んに行

われるようになってきた (Dow & Ashley 1998)。

このような推定方法の変遷にともない、花粉による遺伝子流動に対する見方や遺伝子流動が遺伝構造の形成過程に及ぼす影響についての理解も大きく変化してきた。第1、第2の方法が主に行われていた80年代においては、花粉の散布距離は制限されているという見方が一般的であり、集団間の遺伝子流動は極めて稀であると考えられていた (Levin 1981)。しかし、第3の方法がとられるようになってくると、遺伝子の流動距離から推定した花粉の散布距離は従来考えられてきたよりも長く、また、集団や個体によって、あるいは同一個体が咲かせる個々の花によってさえも大きく変動することが分かってきた。例えば、虫媒のホオノキ *Magnolia obovata* では、極近傍の個体とのみ交配している花がある一方で、同じ個体が咲かせた別の花は70ha以内に花粉親が見つからず、長距離移動した花粉ばかりを受粉していたことが明らかにされている (Isagi *et al.* 2000)。

花粉の散布距離が変動する理由として、開花フェノロジーや昆虫の行動の変化、天気、個体や集団の空間配置、地形の違いなどが考えられる (Ellstrand 1992; Isagi *et al.* 2000)。このような生態的な要因は、遺伝子流動の距離の変動を通じて、遺伝構造にも影響していると考えられるが、大部分の先行研究は花粉の散布距離のみを計測しているため、遺伝子流動の距離を変動させる要因についてはほとんどわかっていない (Ellstrand 1992)。遺伝構造が形成され、維持される機構を理解するためには、遺伝子流動の距離を単に明らかにするだけでなく、流動距離に影響する要因を明らかにする必要がある。簡単なモデルからは毎世代1個体の移住が生じるだけでも遺伝的浮動による集団間の遺伝的分化は抑制され、集団内の遺伝的多様性が維持されることが示されている (Wright 1931)。そのため、集団間などで生じる長距離での遺伝子流動は、たとえ低頻度であっても遺伝構造に及ぼす影響が大きいと考えられる。よって、散布距離を変動させる要因の中でも、特に長距離散布が生じるメカニ

ズムを理解することは、集団内の遺伝的多様性の維持機構の理解に大きく貢献する  
と考えられる。

#### 1-5 サクラソウにおける遺伝子流動の研究史

サクラソウの自然集団内の遺伝子流動は、先に述べた第 1 の方法でのみ行われてきた。Nishihira *et al.* (2000)は、サクラソウの花粉の大きさが長花柱花と短花柱花で異なることを利用し、10m 以内に分布する長花柱花ラメット数が多いほど、短花柱花の柱頭上の適法受粉量が多くなることを明らかにした。また、Watanabe *et al.* (2004)は、半径 5m 以内に分布する異花型ラメット数が少ないラメットほど種子生産量が少ないことを明らかにしている。これらの事実から、サクラソウの花粉の散布距離は比較的短いと考えられてきた。

しかしその一方で、サクラソウの花粉の散布距離が長くなりうることを示した研究もある。Matsumura & Washitani (2003)は、トラマルハナバチの口吻に付着したサクラソウの花粉は、大部分は付着してから 10 番目までに訪花した小花に受粉されるが、中には 50 番目に訪花した小花に受粉される花粉も存在することを明らかにした。このように、比較的大きな花粉の持ち越し量は、花粉の散布距離を長くする方向に作用すると考えられる。

また、Ishihama *et al.* (2003)は第 3 の方法である父性解析を用いて実験集団内における遺伝子流動の把握を試みた。その結果、大部分の花粉流動は 30m 以内に分布するパッチ(付録 1 参照)間で生じていることが明らかになった。これらの知見は、自然集団で生じている花粉流動を推定する際に重要な知見を与えるものであるが、実際のサクラソウ集団においては、実験集団のようにジェネットの分布密度が均一であったり、開花期がそろっていることは稀である。したがって、実験集団で得られた結

果がそのまま自然集団に当てはまるとは限らない。そのため、サクラソウ自然集団を対象として、第 3 の方法である父性解析による推定と、第 4 の方法である遺伝構造からの推定を行い遺伝子流動の実態を把握する必要がある。

#### 1-6 本研究の目的と構成

本研究では、自生地内保全を進めるための基礎的な知見を得ることを目的として、日本の野生生物の中で最も多くの生態学的情報を蓄積しているサクラソウをモデル植物とし、自然集団内における遺伝構造の形成過程の解明を試みた。そのために、比較的良好な自然環境が維持されている筑波大学八ヶ岳演習林内に自生するサクラソウ地域集団を対象として、空間的遺伝構造の把握と父性解析により、空間的遺伝構造の形成過程に大きな影響を及ぼす遺伝子流動の実態を把握することを試みた。

第 1 章は、種子の遺伝子型から花粉親を高い精度で特定するために開発したマイクロサテライトマーカーの有効性について述べる。

第 2 章では、景観が遺伝子流動に及ぼす影響を考慮に入れた。すなわち複数の沢に沿って集団が形成されている八ヶ岳演習林内のサクラソウ地域集団を対象として、種子の動きを反映する葉緑体 DNA 多型と種子と花粉の動きを反映するマイクロサテライトマーカーとで空間的遺伝構造を把握し、空間的遺伝構造から過去に生じた遺伝子流動を推定した。

第 3 章では、マイクロサテライトマーカーを用いて父性解析することにより、現在生じている花粉による遺伝子流動の実態を明らかにした。ジェネット間に見られる開花フェノロジーの違いやジェネット密度といった生態的要因が、花粉の散布距離や近親交配の程度、および近交弱勢の発現頻度を通じて遺伝構造に及ぼす影響を論じ

た。

第4章では、第2章と第3章の結果得られた知見に基づいて、サクラソウの自然集団内で生じている遺伝子流動について総合的に考察する。次に、景観や開花フェノロジー、ジェネット密度といった生態的要因が遺伝子流動を介して遺伝構造に及ぼす影響について論述し、それらの要因が変化した際に予想される遺伝構造の変化について考察する。最後に、サクラソウ集団が保有する遺伝的多様性を保全するための指針について論じる。



## 第 1 章 マイクロサテライトマーカーの開発

### 1-1 はじめに

現存するサクラソウ集団を保全するためには、遺伝的多様性の程度を正確に把握し、自然集団内で生じている花粉流動の実態を明らかにする必要がある。サクラソウ集団内の遺伝的多様性に関しては、これまでにアイソザイムマーカーを用いた解析が行われている(大澤ら 1991, Okayama *et al.* 2003; Watanabe *et al.* 2003)が、アイソザイムマーカーは多型性が乏しいため分断化によるボトルネックの影響が検出されにくいという欠点がある(Hedrick 1999)。一方、花粉流動に関しては、花粉の散布範囲や自殖率、1 ジェネットが交配する花粉親数など、集団内の遺伝的多様性の程度に大きな影響を及ぼしうる基本的なことが未解明なままである。

自然集団内の花粉流動を把握するための手段として、DNA マーカーのひとつであるマイクロサテライトマーカーが用いられる。多型性が高いため、複数の遺伝子座において種子と繁殖個体の遺伝子型を比較することにより、花粉親を高い精度で特定することができる(Dow & Ashley 1998)。これまでにサクラソウのマイクロサテライトマーカーは、Isagi *et al.* (2001)によってすでに 7 組開発されているが、通常のマイクロサテライトマーカーでの対立遺伝子数が 10 数個以上あるのに対して、20 ジェネットを解析して対立遺伝子数が平均 3.9 個と少なかった。対立遺伝子数とヘテロ接合度の期待値から各遺伝子座の対立遺伝子頻度と父性排除率(Weir 1996)を推定したところ(ヘテロ接合度と父性排除率の計算方法については、付録 3~5 参照)、父性排除率は平均 0.30 と低く、7 遺伝子座を組み合わせたとしても 0.93 しかなかった。通常の父性解析が 0.99 以上の父性排除率で行われていることを考えると、Isagi *et al.* (2001)

が開発したマーカーだけでは多型性が不十分であると考えられた。そこで、より多型性の高いマイクロサテライトマーカーの開発を試みた。

## 1-2 材料と方法

### 1-2-1 マイクロサテライトマーカーの開発

北海道集団に由来するサクラソウ約 20 ジェネットから数十枚の葉を採取し、改変 CTAB 法 (Murray & Thompson 1980) を用いて DNA を抽出した後、超遠心で精製した。次に、制限酵素 *Nde* II を用いて、サクラソウの DNA  $10\mu\text{g}$  を消化した。消化した DNA を 0.85% アガロースゲルで電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて 500~1000bp の DNA 断片を回収した。

回収した DNA 断片の両側に Takara LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社) の Sau3AI Cassette を連結し、Cassette Primer C1 を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) を行った。温度サイクルは、95℃で 3 分間の熱変性後、95℃で 1 分、55℃で 1 分、72℃で 2 分を 35 回繰り返した後、72℃で 5 分間の伸張とした。

PCR 産物に対して磁性粒子 (DynaI 社) を用いて、Hamilton *et al.* (1999) の方法に従いマイクロサテライトを含む DNA 断片の濃縮を行った。濃縮に用いるプローブは CT の 15 回反復配列とした。濃縮された DNA 断片を再び Cassette Primer C1 を用いて PCR 増幅した。制限酵素 *Nde* II をもちいて PCR 産物から Sau3AI Cassette を切断した後、0.85% アガロースゲル電気泳動により 500~1000bp の DNA 断片を回収した。pUC118 *Bam*HI/BAP プラスミド (宝酒造社) に Takara DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社) をもちいてライゲーションした後、大腸菌にクローニングした。

894 個の大腸菌クローンをコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。DNA 断片を濃縮する際に CT の反復配列をプローブとしたため、プラスミドに挿入されたサクラソウ DNA の断片中には、GA 配列が多く含まれていると期待される。そこで、コロニーハイブリダイゼーションで用いるプローブも CT の 15 回反復配列とした。121 個の陽性クローンの塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社)を用いて 377 Sequencer (Applied Biosystems 社)で解読したところ、21 個のクローンはマイクロサテライト領域を含んでいなかった。プライマーを作成するためには、マイクロサテライト領域の両脇の部分の塩基配列を最低でも 100 塩基解読する必要があるが、解読した 121 クローンのうち、約半数にわたる 59 個のクローンは、プラスミドに挿入された断片長が短いために、プライマーを設計するための十分な塩基配列が解読できなかった。その他、重複クローンや、波形がきれいに読めなかったクローンなどを除くと、32 クローンの塩基配列が残った。そこで、32 クローンの塩基配列を R 側からも解読したところ、F 側と R 側からの塩基配列が 1 本につながり、20 個のクローンの塩基配列を完全に解読できた。それらの 20 クローンの塩基配列をもとに、ソフトウェア OLIGO (National Biosciences 社)を用いてプライマーを 20 組デザインした。その後、50°C、55°C、60°C のアニーリング温度で PCR を行い、増幅の有無および、バンドパターンの明瞭さによって PCR 条件を決定した。

#### 1-2-2 ハヶ岳に自生するサクラソウ集団の遺伝的多様性の調査

開発したマイクロサテライトマーカーの多型性を評価するために、筑波大学ハヶ岳演習林に自生している長花柱花 27 ジェネット、短花柱花 25 ジェネットからなるサクラソウ 52 ジェネットの遺伝子型を調査した。葉から DNeasy plant mini kit (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した後、開発したプライマーで PCR 増幅した。PCR の溶液組成

(10 $\mu$ L)は、10～15 ng DNA、10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、100  $\mu$ M 各 dNTP、0.02% Triton X-100、0.01% gelatin、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.25 units *Taq* ポリメラーゼ、0.2  $\mu$ M 各プライマーとした。温度サイクルは、94°Cで3分間の熱変性後、94°Cで30秒、50°Cで30秒、72°Cで30秒を30回繰り返した後、72°Cで7分間の伸張とした。

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)を用いて PCR 産物の電気泳動を行い、GeneScan software (Applied Biosystems 社)を用いて解析を行い遺伝子型を決定した。

マイクロサテライトマーカーの性質を明らかにするために、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数 ( $N_a$ )、ヘテロ接合度の観察値 ( $H_o$ )と期待値 ( $H_e$ ) (Nei 1987)そして父性解析の精度をあらわす父性排除率 (Weir 1996)を算出した。ヘテロ接合度と父性排除率の推定は、解析ソフト CERVUS 2.0 (Marshall *et al.* 1998)を用いて行った。

Isagi *et al.* (2001)は、北海道に自生する 20 ジェネットのサクラソウの遺伝子型を 7 組のマーカーを用いて決定し、対立遺伝子数とヘテロ接合度の期待値を算出している。そこで、Isagi *et al.* (2001)が開発したマーカーの中から、観察された対立遺伝子数が3個と中程度の多型性を示す *PS2* マーカーを用いて八ヶ岳集団の 52 ジェネットの遺伝子型を決定し、多型性の程度を新規開発マーカーと比較した。さらに、*PS2* における allelic richness (El Mousadik & Petit 1996)の比較から、北海道と八ヶ岳集団間における多型性の違いを推定した。allelic richness とは、解析ジェネット数の違いによって生じる多型性の違いを補正したもので、ここでは八ヶ岳集団から 20 ジェネット抽出して遺伝子型を特定したときに含まれる対立遺伝子数の期待値に相当する(詳細は、付録 6 参照)。

今回開発したマイクロサテライトマーカーとIsagi *et al.* (2001)が開発した7組のマーカーを組み合わせたときの父性排除率を算出するため、Isagi *et al.* (2001)によって報告されている対立遺伝子数とヘテロ接合度の期待値を用い、*PS2* を除く 6 組のマ-

カーについて準ニュートン法(Kennedy & Gentle 1980)により対立遺伝子頻度を推定した(準ニュートン法については、付録 7 参照)。推定された遺伝子頻度に基づいて、対立遺伝子を 2 つずつランダムに抽出し、52 ジェネット分の遺伝子型を決定した。同様の計算を 10 回試行し、得られた遺伝子型を CERVUS2.0 で解析して、父性排除率とその推定誤差を明らかにした。

### 1-3 結果と考察

設計した 20 組のプライマー組のうち、表 1 に示した 3 組のプライマーが増幅も良く、明瞭なバンドパターンを示した。これら 3 組のプライマーを用いて、八ヶ岳演習林内に自生する 52 ジェネットの遺伝子型を決定したところ、いずれのマーカーも Isagi *et al.* (2001) によって開発された *PS2* より多型性(*Na* や *He*)が高かった(表 2)。1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は 8~12、ヘテロ接合度の観察値は 0.77~0.94 であり、どの遺伝子座においてもハーディ・ワインベルグ平衡を仮定したときの期待値から有意にずれていなかった。また、新しく開発したマーカーと *PS2* とで観察された対立遺伝子頻度の頻度分布を比較したところ(図 1)、新規開発マーカーの方がボトルネックの影響を受けやすい出現頻度の低い対立遺伝子が多数観察された。このことから、生息地の分断化が集団の遺伝的多様性に及ぼす影響を評価するうえで、新規開発マーカーが有効であると考えられた。一方、それぞれのマーカーにおける父性排除率は 0.46~0.65 であり、3 遺伝子座を組み合わせたときの父性排除率は 0.931 だった(表 2)。調査集団が異なるため単純に比較することはできないが、新規に開発した 3 組のプライマーで Isagi *et al.* (2001) の 7 組のプライマーを組み合わせたとき(0.93)と同等の父性排除率が得られた。

また、*PS2* に関しては、Isagi *et al.* (2001) で報告されている値と比べて、観察された対立遺伝子数が 2 つ増え、父性排除率も 0.218 から 0.417 へ増加した。また、解析ジェネット数の影響を補正した allelic richness を比較すると、北海道集団で 3.00 であったのに対して、八ヶ岳集団で 4.99 とやや高い多型性が観察された。今回は、*PS2* マーカーでしか比較していないため、この結果をもって北海道集団よりも八ヶ岳集団のほうが遺伝的多様性が高いと結論づけることはできないが、*PS2* マーカーや本研究によって開発された *Pri0146* マーカーを含む 8 組のマイクロサテライトマーカーを用いて日本全国のサクラソウ集団の遺伝的多様性を調査した本城 (2005) によると、日本のサクラソウ集団は、北に位置する集団ほど遺伝的多様性が低いことが分かっている。そのため、今回の実験において八ヶ岳集団のほうが北海道集団よりも allelic richness が高かったのは、そのような地理的・歴史的な背景を反映しているのかもしれないと考えられた。

今回開発した 3 組のマイクロサテライトマーカーと Isagi *et al.* (2001) によって開発された 7 組のマーカーを組み合わせた計 10 組のマーカーを用いたときの父性排除率の平均値と標準偏差は、 $0.9974 \pm 0.0001$  と推定された。この値は、この集団内の短花柱花ジェネットが結実した種子の花粉親を推定する際に、花粉親候補である長花柱花 27 ジェネットの中から真の花粉親ではない候補を偶然選んでしまう確率が 7% ( $1 - 0.9974^{27} = 0.069$ ) であることを意味しており、Isagi *et al.* (2001) の 7 マーカーのみの場合 (84%) に比べて大幅に改善された。*PS2* 以外の既存マーカー 6 組に関しては 20 ジェネットの遺伝子型に基づいて推定されていること、*PS2* マーカーにおける allelic richness の比較により北海道よりも八ヶ岳集団の多型性が高いことが示唆されたことから、今回 10 組のマーカーで推定された父性排除率は過小評価されている可能性がある。すなわち、実際の父性排除率は、今回推定された値よりもさらに高いことが期待され、これら 10 組のマーカーを用いれば、自然集団内で生じている花粉流動を高い

精度で解析できると考えられる。

以上、本実験によりサクラソウにおいて多型性の高いマイクロサテライトマーカーを開発することができ、サクラソウの花粉流動の把握が可能になった。

## 第 2 章 空間的遺伝構造の把握

長野県にある筑波大学八ヶ岳演習林(北緯 35°57'、東経 138°27'、標高 1400m、面積 79.47 ha)には、南北に約 1.3km、東西に約 0.5km に渡って、ミズナラなどの落葉樹林や、カラマツなどの植林帯、ヌマスゲなどが群生する湿地帯などの多様な景観から構成される豊かな自然が残されている。特に、ミズナラなどの落葉樹林の林床には、サクラソウの大群落が残されている。ここでは、トラマルハナバチのコロニーが維持されていたり、種子生産が十分行われているなど、比較的良好な環境が保たれており、サクラソウ本来の遺伝構造を把握するうえで好ましい特性を多数持つ。しかしその一方で、1970 年代以降、周辺部の森林が次々と畑や牧場に変えられた結果、演習林内のサクラソウ集団はこの地域に残された唯一の大集団となっている(図 2)。演習林内のサクラソウ集団の遺伝的多様性を長期的に保全していくためには、現在の遺伝構造を把握しておく必要がある。

演習林内のサクラソウ地域集団は、多数の小集団から構成されており、それらの小集団は主に 7 つの沢に沿って分布している(図 2; 沢沿い集団 A~G)。この地域集団の空間的遺伝構造を把握するためには、ひとつの小集団内の空間的遺伝構造を詳細に明らかにするとともに、それらの集合体である沢沿い集団間・内にどの程度の遺伝的変異があるのかを明らかにする必要がある。そこで本章では、第 1 節で八ヶ岳演習林を流れる沢沿い集団間・内での遺伝構造の把握を試みる。そして、第 2 節ではひとつの小集団に着目し、より小さいスケールでの空間的遺伝構造の把握を試みた。



## 第1節 景観を考慮した空間的遺伝構造の把握

### 1-1 はじめに

遺伝子流動が遺伝構造に及ぼす影響を検討した多くの理論研究は (Wright 1943, 1951; Kimura & Weiss 1964)、いくつもの分集団からなる集団を想定し、各分集団が均一な環境に分布しており、物理的に遠く離れれば離れるほど遺伝子流動が生じにくいと仮定している。しかし、実際の自然集団は、山や川などの異質な環境の中に分布しているため、遺伝子流動の生じやすさは単なる物理的距離だけでなく、地形や植生といった景観によっても影響されると考えられる (Taylor *et al.* 1993; Wiens 1997; Sork *et al.* 1999)。例えば、Kudoh & Whigham (1997) は、多年生草本であるハイビスカス *Hibiscus moscheutos* を対象として調査を行い、川に隣接する集団間では種子による遺伝子流動が頻繁に生じているのに対して、川に隣接していない集団ではあまり生じていないことを明らかにした。このように、集団間にまたがる景観の質は、遺伝子流動を介して遺伝構造に影響すると考えられる (Kudoh & Whigham 1997; Sork *et al.* 1999; Manel *et al.* 2003) が、これまであまり考慮されてこなかった。人間活動などによる景観の改変が、遺伝子流動、ひいては遺伝構造にどのような影響を及ぼすのかを予測し、集団内の遺伝的多様性を適切に保全するためには、山や川などの景観が遺伝子流動を促進したり制限したりする程度を理解する必要がある (Taylor *et al.* 1993; Sork *et al.* 1999; Manel *et al.* 2003)。

サクラソウ集団は、沢沿いに形成されることが多い。複数の沢が流れているところでは、サクラソウの地域集団は、沢沿いに直線状に分布する複数の集団から構成される。実験集団を用いた先行研究の結果から、サクラソウの種子や花粉の散布距離

は短いことが示されているため (Ishihama *et al.* 2003)、サクラソウの地域集団では、集団間においても、また集団内においても空間的な遺伝構造が発達しやすいと予想される。しかし、沢沿いに成立した集団では、沢の増水時に種子やラメットが下流へと流されている可能性がある。もしそうならば、そのようにして稀に生じる遺伝子の長距離移動は、集団内での空間的な遺伝構造の形成を妨げている可能性がある。

そこで本章では、葉緑体 DNA 多型とマイクロサテライトマーカーを用いて空間的な遺伝構造の把握を試みた。大部分の被子植物では、葉緑体 DNA は母系遺伝するため、その遺伝的な変異の空間分布から、種子の動きを推定することができる。一方、核 DNA であるマイクロサテライトマーカーは両性遺伝するため、遺伝的な変異の空間分布は種子と花粉両方の動きを反映する。マイクロサテライトマーカーと葉緑体 DNA 多型とで空間的な遺伝構造を比較することにより、種子と花粉に担われる遺伝子の動きを区別することができる (Ennos 1994; McCauley 1994; Tarayre *et al.* 1997; Bacles *et al.* 2004)。さらに、多型性が高いマイクロサテライトマーカーを用いれば、遺伝子型からジェネットを識別することができるため (Reusch *et al.* 1999)、ラメットの動きに伴う遺伝子の移動を捉えられる可能性がある。

## 1-2 材料と方法

### 1-2-1 調査地とサンプリング方法

本調査地におけるサクラソウは、主として演習林内を流れる 7 つの沢に沿って分布している (図 2; 沢沿い集団 A~G)。1 つの沢内ではサクラソウは連続的に分布しているわけではなく、複数の株が高密度に固まって分布しているところがある一方で、

まったく観察されないところもある(図 3)。ひと続きの場所に連続して分布しているサクラソウの小集団をここでは局所集団と呼ぶことにする。これらの局所集団同士は、外見上は離れて分布していても、花粉のやりとりを介して遺伝的には緊密に交流を行っているものと考えられる。実験的に線上分布させた小集団間ならびに小集団内の花粉流動を解析した先行研究から、30m 以上離れた小集団間では、全体の 6%しか花粉流動が生じていないことが示されている(Ishihama *et al.* 2003)。そこで、本研究では花粉流動によって緊密に交流していると考えられる局所集団の集合を分集団と定義し、沢沿いに 50m 以上にわたってサクラソウが生育していないところがあれば、そこが分集団の境界であるとした(図 3)。

沢沿いに成立した 7 つの集団以外にも、演習林内には、沢沿いではないところいくつかの集団が観察される。しかし、これらの集団の多くは、ジェネット数が極端に少ないため(<10 ジェネット)統計的な解析が難しいと考えられた。ただひとつだけ H 集団のみに十分なジェネット数(>25 ジェネット)が観察されたため、非沢沿い集団の代表として H 集団からサンプリングを行うことにした(図 2)。

2002 年 5 月下旬、サクラソウの開花終期に DNA 抽出用の葉を採取した。サクラソウはクローン成長器官である地下茎が約 15cm と短いため、同一ジェネットに属するラメットは互いに固まって分布している。予備的に、マイクロサテライトマーカー 9 遺伝子座を用いてジェネットを同定したところ、1 ジェネットのパッチは直径が 3m 以内であることが分かった。そこで、同じジェネットに属するラメットから重複して葉を採取しないように、沢沿いのそれぞれ約 7m 隔った地点において葉を採取した。7 つの沢沿い集団と 1 つの非沢沿い集団(H 集団)からそれぞれ約 50 株ずつ合計 380 株から葉を採取した。葉を採取した株が開花している場合には、花型を記録した。葉を採取した株の位置は、Global Positioning System(GPS, Garmin 社)を用いて記録した(図 2)。

## 1-2-2 DNA 抽出と遺伝子型の特定

改変 CTAB 法 (Murray & Thompson 1980) を用いて葉から DNA 抽出を行った。8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いて 380 サンプルの遺伝子型を特定した。8 組のプライマーのうち、*Pri0126*、*Pri0141*、*Pri0146* の 3 組は北本ら (2005) によって開発されたものであり、残りの *ga0212*、*ga0218*、*ga0235*、*ga0668*、*gal277* は Ueno *et al.* (2003) によって開発されたものである。Ueno *et al.* (2003) が開発したこれらのマーカーは、サクラソウで連鎖地図を作ることを目的として北本ら (2005) よりも後に作成されたものであるが、16 個体を解析して対立遺伝子数が平均 4.6 個観察されたことから、Isagi *et al.* (2001) が開発したマーカーよりも多型性が高いと考え、今回の研究で用いることにした。PCR の溶液組成や温度サイクルは、第 1 章と同じとし、各マーカーのアニーリング温度は表 3 に記した。ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて PCR 産物の電気泳動を行い、GeneScan software (Applied Biosystems 社) を用いて遺伝子型を決定した。

演習林の 32 ジェネットに関しては、Honjo *et al.* (2004) が葉緑体 DNA (cpDNA) の 5 つの非コード領域の塩基配列をすでに解析しており、この地域集団には、少なくとも 3 つのハプロタイプが存在し、それらのハプロタイプは *trnT* (UGU) と *trnL* (UAA) 5' exon 領域の塩基配列を解読すれば区別できることが明らかにされている。そこで 380 サンプルから、調査地全域をまんべんなくカバーするように 222 サンプル抽出し、そのハプロタイプを Honjo *et al.* (2004) のプロトコルに従って決定した。塩基配列の解読は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems 社) を用い、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) にて行った。

### 1-2-3 データ解析

#### 1-2-3-1 遺伝的多様性

各集団の遺伝的多様性を明らかにするために、Nei (1987) の遺伝子多様度の不偏推定値( $H_s$ )を求めた。解析ソフト FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995)を用いて、マイクロサテライトマーカーと葉緑体 DNA 多型の両方で算出した。

#### 1-2-3-2 クローン成長器官の長距離移動の検出

クローン成長器官の移動を検出するために、マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座の遺伝子型がすべて一致するラメットのペアを探索した。そのようなペアが見つかったときには、観察された全集団の遺伝子頻度をもとに、その遺伝子型が得られる確率( $P_{gen}$ )を Parks & Werth (1993)の方法に従って算出した。すなわち

$$P_{gen} = \left( \prod p_i \right) 2^h$$

$p_i$  とは問題となっている遺伝子型で観察された対立遺伝子の頻度である。 $h$  とはヘテロ接合の遺伝子座数である。さらに、別々のジェネットに属する遠く離れている 2 つのラメットが、偶然同じ遺伝子型を示す確率( $P_{se}$ )を次式によって推定した(Parks & Werth 1993)。

$$P_{se} = 1 - (1 - P_{gen})^G$$

$G$  は同じマルチローカス遺伝子型 (付録 2 参照) を示した個体数である。遺伝的多様性が低く、サンプリングされた個体数が多いほど、 $P_{se}$  は高くなる。 $P_{se}$  が 0.0001 以下のときは、別々のジェネットに属するラメットが偶然に全く同じ遺伝子型を示す確率が 0.01% 以下と非常に低いことを表しているので、本研究では  $P_{se}$  が 0.0001 以下のとき 2 つのラメットが同じジェネットに属すると仮定した。

### 1-2-3-3 沢沿い集団内・間の遺伝的分化程度

沢沿い集団内・間の遺伝構造を明らかにするために、analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) を沢沿い集団内の分集団間・沢沿い集団間の 3 つの階層で行った。解析には、ARLEQUIN ver. 2.000 (Schneider *et al.* 2000) を用いた。分集団が 1 サンプルしか含んでいない場合には、分集団間の分散を過大評価しないために、それらの分集団は解析からはずした。結果として、7 つの沢沿い集団の 26 の分集団 (図 4 参照) について、マイクロサテライトマーカーでは 347 サンプル、葉緑体 DNA 多型では 198 サンプルのデータをもとに、遺伝的な分化程度の指標である  $\Phi$ -統計量を推定した。得られた  $\Phi$ -統計量の有意性を検定するために、ジェネットの遺伝子型を集団間で無作為に 16000 回入れ替え、16000 の  $\Phi$ -統計量から帰無仮説分布を作出した。得られた帰無仮説分布と観察値を比較し、地域集団内で遺伝子型がランダムに分布しているとする帰無仮説が成立している場合に  $\Phi$ -統計量の観察値が得られる確率を算出し、その確率が 5% 以下であれば帰無仮説を棄却できるとした (Excoffier *et al.* 1992)。マーカーの多型性が高い場合、期待される遺伝的分化程度の最大値が低くなるため (Hedrick 1999)、マイクロサテライトマーカーの遺伝的な分化程度を以下の式を用いて補正した。

$$\Phi \text{ の補正值} = \text{観察された } \Phi / \Phi_{\max} = \Phi / (1 - H_s).$$

ARLEQUIN ver. 2.000 を用い、マイクロサテライトマーカーと葉緑体 DNA 多型の両方について、2 集団間の遺伝的な分化程度である  $F_{ST}$  を沢内の分集団間と沢沿い集団間からなる 2 つの階層で解析した。物理的な距離が離れるほど、遺伝的な分化程度が大きくなるかを確かめるために、距離と  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  (Rousset 1997) との間のマンテル検定 (Mantel 1967) を行った。沢内の分集団間の距離は、各分集団の中心点を沢の形を反映させながら接続し、接続された直線上の長さとした。沢沿い集団間の距離は、集団間距離の最小値を Rousset (1997) に従い対数変換して用いた。マイク

ロサテライトマーカーの  $F_{ST}$  は、全集団の全遺伝子座にわたる平均  $H_s$  を 1 から引いた値で割ることによって多型性を補正した。観察された相関係数の有意性を検定するために、遺伝子型を 5000 回集団間に入れ替え、その都度算出された遺伝的分化程度と物理的距離との相関係数から相関係数の帰無仮説分布を作出した。検定には、FSTAT 2.9.3 を用いた。

#### 1-2-3-4 沢沿い集団と非沢沿い集団との遺伝構造の比較

沢沿い集団と非沢沿い集団とで、マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座の平均  $F_{IS}$  を比較した。 $F_{IS}$  とは近親交配に起因するヘテロ接合度の減少具合を数値化したもので、ホモ接合頻度が高いほど  $F_{IS}$  も高まる。沢沿い集団内にはいくつかの分集団が存在しているため、分集団内の  $F_{IS}$  は、分集団間のサンプル数の違いを補正した Weir & Cockerham (1984) の不偏  $F_{IS}$  (すなわち、 $f$ ) にて推定した。推定には、解析ソフト GDA ver. 1.1 (Lewis & Zaykin 2001) を用いた。推定された  $f$  の有意性を検定するために、GDA ver. 1.1 を用いブートストラップを 10000 回行った。95% の信頼区間内に 0 が含まれている場合には、ハーディ・ワインベルグ平衡に達しているという帰無仮説  $f=0$  を 5% レベルで棄却できないとした (Weir 1996)。非沢沿い集団の H 集団の  $F_{IS}$  を Wright (1951) の式に従って推定し、無作為化されたデータセットと比較することにより有意性を検定した。無作為化されたデータセットは、各集団内のジェネット間で対立遺伝子を実験的に入れ替えて、 $f$  を 1280 回推定することにより得た。無作為化は FSTAT 2.9.3 を用いて行った。

また、沢沿い集団と非沢沿い集団とで空間的遺伝構造を比較した。マイクロサテライトマーカーに関しては、対象範囲内に分布するラメット間で 1 遺伝子座あたりの共有対立遺伝子数 (the mean number of alleles in common、以下 NAC、Surles *et al.* 1990) を算出することにより、空間的遺伝構造を解析した。先行研究から、サクラソウ

の種子や花粉の散布距離が短いことが示されているため (Ishihama *et al.* 2003)、もしも沢の水による種子の長距離散布がない場合には、比較的狭い範囲内に空間的遺伝構造が形成されるはずである。しかし、解析する対象範囲が小さすぎると、該当するペア数が少なくなるため空間的遺伝構造が検出できにくい。そこで、構造の有無を解析する対象範囲は、各集団で該当するペア数が 40 ペア以上ある 20m 以内とした。

葉緑体 DNA 多型に関しては、join-count 統計量による空間的自己相関解析 (Sokal & Oden 1978) を行った。空間的自己相関解析では、特定の距離内に分布する全ラメットペアを抽出し、ハプロタイプがランダムに分布している際に期待される数よりも、抽出したペアが同じハプロタイプを多く共有しているかを比較する。同じタイプのハプロタイプが固まって分布している際には、この値は近傍のラメット間で正になる。本研究では、核 DNA での結果と対比させるために、マイクロサテライトマーカーで解析したのと同じ 20m 以内に分布するラメットを抽出し、同じハプロタイプを多く共有しているか解析した。帰無仮説が正しい場合、join-count 統計量は平均値が 0 の正規分布に従うため、ハプロタイプの共有数の大小は、平均値からのずれである標準偏差 (SND) で表現される。設定した距離クラス内の該当ペア数が少ない場合には、空間的遺伝構造は検出されにくいため、20m 以内のペア数が 25 ペア以上ある集団のみを対象として空間的遺伝構造を解析した。

対立遺伝子やハプロタイプが、ランダムに分布している際の NAC と SND の期待値は、ジェネットの分布位置を固定したまま、集団内の対立遺伝子やハプロタイプを 1000 回入れ替えることによって算出した。このようにして得られた 1000 の NAC や SND の値と、実際に観察された値とを比較することにより有意性を検定した。



### 1-3 結果

#### 1-3-1 遺伝的多様性

本研究で用いたマイクロサテライトマーカーは、*ga0668* ( $H_s=0.22\sim0.54$ )を除いた7遺伝子座で高い多型性を示し、8遺伝子座合計で102の対立遺伝子が観察され、どの集団においても遺伝子多様度 ( $H_s$ ) は平均  $0.66\sim0.73$  と高い値を示した(表3)。

葉緑体 DNA 多型に関しては、ハプロタイプ N、O、C、Z の4つが検出された(表4)。これらのハプロタイプは、*trnT* (UGG)–*trnL* (UAA) 5'のスペーサー領域における1箇所の塩基置換と2箇所の挿入・欠失箇所によって区別された。4つのハプロタイプのうち、ハプロタイプ NとOについては、Honjo *et al.* (2004)によってすでに八ヶ岳演習林内で報告されているものであったが、ハプロタイプ CとZについては今回の研究によって初めて八ヶ岳地域集団から検出された。一方、Honjo *et al.* (2004)によって八ヶ岳演習林内で報告されているハプロタイプ Mは、今回のサンプルからは検出されなかった。今回の実験は、1領域しか塩基配列を解読していないため、ここでのハプロタイプと5領域の多型サイトにもとづく Honjo *et al.* (2004) のハプロタイプとは必ずしも一致しないかもしれないが、演習林内で観察されたハプロタイプ NとCは演習林外にも広い範囲で分布していたのに対して、ハプロタイプ OとZは演習林に固有のハプロタイプであった(表4)。

演習林内における各ハプロタイプの空間分布を見ると、同じハプロタイプが複数の沢に沿って観察されたが、その出現頻度は一様ではなく(図5)、ハプロタイプ Nは調査集団の北側に多く分布し、ハプロタイプ Oは南側に多く分布していた。各ハプロタイプの出現頻度と遺伝子多様度 ( $H_s$ ) は、集団ごとに大きく異なっていた(図5、表5)。

### 1-3-2 クローン成長器官の長距離移動の検出

380 サンプルのうち、ラメット ID が A045 と A050、F030 と F036 の 2 組のラメットのペアにおいてマイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座すべてで同じ遺伝子型が示された。これらのペアは、それぞれ同じ沢沿いの 57m と 166m 離れたところに分布していた(図 4)。2 つのラメットが全く同じ遺伝子型を偶然持つ確率は、A45-A50 ペアでは  $P_{gen} = 1.73 \times 10^{-10}$ 、 $P_{se} = 6.56 \times 10^{-8}$  であり、F30-F36 ペアでは  $P_{gen} = 9.21 \times 10^{-11}$ 、 $P_{se} = 3.50 \times 10^{-8}$  と 0.0001 よりも小さかった。さらにこれらのペアは、遺伝的に決定される花型においても同じ長花柱花を示し、葉緑体 DNA のハプロタイプも A45-A50 ペアはハプロタイプ N、F30-F36 ペアはハプロタイプ O と一致していた。どちらのペアもヘテロ接合体の遺伝子座数が A45-A50 ペアは  $h = 7$ 、F30-F36 ペアは  $h = 5$  と多いため、どちらかのラメットがもう片方のラメットの自殖によって生産されたとは考えられず、これらのペアは同一ジェネットであると考えられた。従って、ジェネットの重複を避けるために、以下の解析からは、A45 と F36 のデータを含めないことにした。

### 1-3-3 沢沿い集団内・間の遺伝的分化程度

マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座のうち 3 遺伝子座で有意な遺伝的分化が認められたが、沢沿い集団間の遺伝的分化程度を示す  $\Phi$ -統計量は、補正前  $\Phi=0.003$ 、補正後  $\Phi=0.011$  と総じて低かった(表 6)。葉緑体 DNA に関しては、沢沿い集団間の遺伝的分化程度は 0.341 であり、有意であった( $p < 0.0001$ )。一方、沢内の分集団間の遺伝的分化程度は、マイクロサテライトマーカーは補正前  $\Phi=0.007$ 、補正後  $\Phi=0.025$  ( $p < 0.0001$ )、葉緑体 DNA は  $\Phi=0.053$  ( $p < 0.0001$ ) と両マーカーとも低かった。

マンテル検定を行ったところ、沢内の分集団間においても(図 6a)、沢沿い集団間においても(図 6b)、2 集団間の遺伝的な分化程度を表す  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  と、物理的な距離との間に有意な相関は見られなかった。

#### 1-3-4 沢沿い集団と非沢沿い集団との遺伝構造の比較

近親交配に起因するヘテロ接合度の減少具合を数値化したマイクロサテライトマーカー8 遺伝子座の平均  $f$  は、B 集団と D 集団を除く大部分の集団で有意ではなかった(図 7a)。また、非沢沿い集団の H 集団の平均  $F_{IS}$  も 5%水準で有意ではなかった。

20m 以内に分布するジェネット間で対立遺伝子の共有数である平均 NAC と、対立遺伝子がランダムに分布している際の NAC の期待値を比較したところ、5%水準で有意な差は認められず、空間的遺伝構造は検出されなかった。しかし、非沢沿い集団の H 集団では、有意ではないものの、平均 NAC の観察値が期待値よりも少ない傾向が認められた(図 7b)。

葉緑体 DNA に関しては、20m 以内のペア数が 25 以上認められた G 集団と H 集団で空間的自己相関解析を行った。沢沿い集団である G 集団では、すべてのハプロタイプで集中分布しているという証拠は得られなかった。一方、非沢沿い集団の H 集団では、ハプロタイプ N を共有するペアが 20m 以内で有意に多く存在していることが分かり、ハプロタイプ N の集中分布が示された(図 7c)。

## 1-4 考察

### 1-4-1 遺伝的多様性

本研究の結果から、八ヶ岳集団内には高い遺伝的多様性が保有されていることが示された。また葉緑体 DNA では、八ヶ岳演習林内にハプロタイプ C と Z を持つ個体が存在することが新たに分かった。Honjo *et al.* (2004)では、解析サンプル数が 32 ジェネットだったのに対して、本研究ではその約 7 倍の 222 ジェネットを解析している。おそらくこのようにサンプル数が多かったために、新たなハプロタイプが検出されたのだと考えられる。一方、Honjo *et al.* (2004)が報告しているハプロタイプ M は、今回の研究では検出されなかった。ハプロタイプ M は、B 沢の下流域に分布する 1 個体だけに見られたハプロタイプで、ハプロタイプ N に近縁なハプロタイプである。おそらく元々の頻度が低いために、本研究ではサンプリングできなかったものと考えられる。

今回観察されたハプロタイプのうち、ハプロタイプ O と Z は八ヶ岳集団に固有のハプロタイプであった(表 4)。本城(2005)によって、これらのハプロタイプは、ハプロタイプ C から派生したことが示されている。また、今回検出されなかったハプロタイプ M もこれまでに八ヶ岳集団のみで見つかっている。これらのハプロタイプが八ヶ岳地域で生じたのか、それとも他の地域で派生後この地域に侵入してきたのかは不明であるが、他地域に見られない固有のハプロタイプが 3 つも観察されたことから、サクラソウ集団の遺伝的多様性を保全する上で、八ヶ岳演習林のサクラソウ集団を保全していくことが重要であることが示された。

#### 1-4-2 クローン成長器官による遺伝子流動

380 サンプルのうち、同じ沢に沿って分布している2組のラメットのみが8 遺伝子座で同じ遺伝子型を示した(図 4)。このような空間分布は、サクラソウのクローン成長器官が水によって下流へと移動していることを示している。検出されたサンプル数が少なかったことから、クローン成長器官の移動と定着は稀な事象であり、この移動が空間的遺伝構造に及ぼす影響は小さいと推察される。しかし、今回の結果は、沢の増水によるクローン成長器官の移動が、新たな局所集団形成の一因となることを示している。

#### 1-4-3 沢沿い集団内・間の遺伝的分化程度

葉緑体DNA 多型では、同じハプロタイプが複数の沢に沿って分布していたが、その出現頻度は、沢沿い集団間においても沢内の分集団間においても有意に異なっていた(表 6)。ハプロタイプ C と G の繰り返し数のみが異なるハプロタイプ O、Z に関しては(表 4)、それぞれの沢で独立に突然変異が生じて今の分布が形成された可能性も無視できないが、異なるクレードに属するハプロタイプ N と C、O、Z の出現頻度が沢ごとに異なっていた理由としては、少なくとも2つの仮説が考えられる。1つは、それぞれの沢ごとに全くハプロタイプの組成が異なるサクラソウ集団が侵入した後、沢間で種子の移動が行われた結果、現在のような分布が見られたという説と、もう1つは、同じようなハプロタイプの組成を示すサクラソウ集団がそれぞれの沢に分布を拡大後、種子の移動が制限された結果、沢間においても沢内の分集団間においても遺伝的浮動の働きによってそれぞれに遺伝的に分化したというものである。

もしも、1 つ目の仮説が正しいならば、距離が近い沢沿いの集団間ほど種子の移

動が頻繁に起こるため、ハプロタイプの組成が近くなるはずである。しかし実際には、沢間の物理的な距離と遺伝的分化程度との間には有意な相関は見られず(図 6)、E 沢と F 沢のようにすぐ近くを流れているにも関わらずハプロタイプの組成が全く異なっている集団も観察された(図 5)。また、演習林内で観察されたハプロタイプ N や C が、中部日本から北海道まで広範囲にまたがって分布していることを考えると、これらのハプロタイプによる八ヶ岳地域への侵入は古い時代に行われたと考えられる。これらの事実から、ハプロタイプの組成が等しいサクラソウ集団がそれぞれの沢に分布を拡大後、種子による遺伝子流動が、沢間においても沢内においても制限された結果、現在のような遺伝的分化が生じたのだと考えられた。

また、葉緑体 DNA 多型における沢内の分集団間の遺伝的分化程度が、沢間に比べるとはるかに小さかったことから、低頻度ではあるが、種子が沢に沿って移動していると考えられた。この調査地では、梅雨や台風時にしばしば沢が増水する。増水後様子を見に行ってみると、周囲の草がなぎ倒されていて明らかに水をかぶったとわかるサクラソウの局所集団がいくつか観察され、沢の水によって種子が二次散布されている可能性は高いと考えられる。沢沿いの G 集団では、葉緑体 DNA に関して集団内に空間的遺伝構造が観察されなかったのに対し、非沢沿い集団である H 集団で有意な空間的遺伝構造が観察された事実も川沿いの種子の移動を支持する(図 7c)。

葉緑体 DNA とは対照的に、マイクロサテライトマーカーでは沢間、沢内ともに遺伝的な分化程度が低かった(表 6)。このように、葉緑体 DNA とマイクロサテライトマーカーとで分化程度の違いが見られた原因として、3 つの可能性が挙げられる。1 番目として、突然変異率が 2 つのマーカーで大きく異なっていることが挙げられる。マイクロサテライトマーカーは、突然変異率が高いため、同じ断片長を持つ対立遺伝子が別々の集団で偶然生じるサイズホモプラシーという現象が生じている可能性がある(Estoup *et al.* 2002)。サイズホモプラシーがある場合には、遺伝子流動がない集団間

であっても遺伝的な分化程度が過小評価される。2 番目としては、集団の有効サイズの違いが挙げられる。葉緑体 DNA は母系遺伝するため、集団の有効サイズが両性遺伝するマイクロサテライトマーカの 1/2 と小さい(Birky *et al.* 1983)。そのため、葉緑体 DNA では、集団間の遺伝的分化程度が核 DNA よりも大きくなると考えられている(Birky *et al.* 1983; Ennos 1994)。3 番目としては、種子と花粉とでの遺伝子流動頻度の違いが挙げられる。葉緑体 DNA は種子によってのみ移動するが、マイクロサテライトマーカは種子と花粉の両方の動きを反映するからである。

これら 3 つの効果を分離することは難しいが、サイズホモプラシーの効果がないと仮定した場合、種子と花粉散布が遺伝子流動に及ぼす相対的な影響は、集団遺伝学のモデルに基づいて推定することができる。Wright(1951)の島モデルでは、両性遺伝マーカの  $F_{ST}$  は  $F_{ST(b)} = 1 / (4Nm + 1)$  で、母性遺伝マーカの  $F_{ST}$  は  $F_{ST(m)} = 1 / (2Nm + 1)$  で表される。ここで、 $N$  は集団の有効サイズであり、 $m$  は 1 世代あたりの移住率である。従って、花粉による遺伝子流動が全く生じていない場合に、葉緑体 DNA の分化程度から期待される核での分化程度は、

$$F_{ST(b)} \text{の期待値} = F_{ST(m)} / (2 - F_{ST(m)})$$

となる。

本研究での沢沿い集団間における  $F_{ST(b)}$  の期待値は 0.206 であり、実際のマイクロサテライトマーカで観察された  $F_{ST(b)} = 0.011$  よりもはるかに大きかった。この期待値と観察値の違いは、花粉による遺伝子流動が沢間で生じていることを示している。一方、沢内の分集団間の  $F_{ST(b)}$  の期待値と観察値は、それぞれ 0.027 と 0.025 であり両者の差は小さくなった。これらの結果は、花粉と種子の両方による遺伝子流動が沢内で生じていることを示唆していると考えられる。

マルハナバチは巣から 1~2km離れたところにも採餌しに来ることが知られている (Bowers 1985; Kreyer *et al.* 2004)。ハチの行動範囲は必ずしも花粉の散布範囲ではない (Thompson 1986) が、トラマルハナバチの女王によるサクラソウ花粉の持ち越し量が比較的多いこと (Matsumura & Washitani 2003) や、八ヶ岳演習林全体がマルハナバチの一般的な行動範囲である 1km<sup>2</sup> 以内に収まっていることを考慮すると、沢間・内の花粉流動は十分生じうると考えられた。また、マイクロサテライトマーカーにおいて、2 集団間の遺伝的な分化程度と物理的な距離との間に有意な相関は認められなかった (図 6) のも、沢間・沢内ともに花粉による遺伝子流動が十分生じているためと考えられた。

ただし本研究では、沢沿いに 50m 以上離れている局所集団はそれぞれ別の分集団に属すると定義した (図 3)。この定義は、30m 以上離れた小集団間ではほとんど花粉流動が生じていないという先行研究 (Ishihama *et al.* 2003) の結果を受けたものであったが、この定義によっては、本実験における分集団間の遺伝的な分化程度も多少は変化する可能性がある。例えば、2 本の支流が下流域の湿地帯で合流する D 沢では、現在、下流域の大きな分集団と上流域の小さな 2 分集団に分類されている (図 4) が、図 5 から明らかなように、この沢では北側を流れる支流と南側を流れる支流とでハプロタイプの組成が異なっている。このような違いは沢の流れなどの局所地形によって形成されたと考えられるが、今回の分集団の定義方法ではその影響は解析することができなかった。今後は集団の階層性の定義を改善したり、人為的に設定した階層性に依存しない解析方法をとるなどの改善が必要であると考えられる。

#### 1-4-4 沢沿い集団と非沢沿い集団との遺伝構造の比較

沢に面していない H 集団では、葉緑体 DNA でハプロタイプ N の有意な集中分布



が認められた(図 7c)。サクラソウ種子の散布距離は短いため(Ishihama *et al.* 2003)、このようなハプロタイプの集中分布は距離による隔離(Wright 1943)によって生じたと考えられた。一方、マイクロサテライトマーカーに関しては、 $F_{IS}$  の平均値においても NAC においても、H 集団内に有意な遺伝構造は認められなかった(図 7a、b)。このことから、この非沢沿い集団では、集団内においても、また集団外からも広い範囲での花粉流動が十分生じているため、近親交配が回避され、集団内における空間的遺伝構造の形成が妨げられてきたものと考えられた。

## 第 2 節 局所集団内の空間的遺伝構造

### 2-1 はじめに

第 1 節の結果から、八ヶ岳のサクラソウ集団では沢沿い集団間の遺伝的分化程度は低く、比較的広範囲で花粉による遺伝子流動が生じていることが示唆された。しかし、緒論で述べたように、植物集団では連続した局所集団の中であってもしばしば狭い範囲内に遺伝構造が観察されることがある。特に、増水による攪乱がおこりにくい高台に分布するサクラソウ集団では、種子散布距離が制限されることによって遺伝的に近縁なジェネットが集中分布している可能性がある。第 1 節では、地域集団全体の遺伝構造を把握するために広範囲にわたって 7m 間隔で葉を採取したため、小規模で発達する遺伝構造を検出できなかった可能性がある。そこで、本節では G 沢沿いに分布するサクラソウ集団の中でも、やや高台に位置し、増水による攪乱が起こりにくいと考えられた下流部に調査区を設け、局所集団内の遺伝構造の把握を試みた。

### 2-2 材料と方法

#### 2-2-1 調査地

2002 年に、筑波大学八ヶ岳演習林内の G 沢下流域に 30×100m の調査区を設け（図 8）、全開花ラメットの分布位置を記録した。2002 年春にこの調査区内で開花した長花柱花と短花柱花の総開花ラメット数は、それぞれ 176 と 139 であり全部で 315 ラ

メットであった。

## 2-2-2 DNA 抽出と遺伝子型の特定

サクラソウの DNA を改変 CTAB 法 (Murray & Thompson 1980) を用いて抽出し、8 組のマイクロサテライトマーカーを用いて、調査区内で開花した全ジェネットの遺伝子型を特定した。サクラソウは花の色や形がジェネットによって大きく異なるため、目視によってジェネットを簡便に識別できる (Washitani *et al.* 1994)。しかし、複数のジェネットが入り混じっているパッチでは、外見だけでジェネットを識別することは難しい。そこで、外見上 1 ジェネットしか分布していないことが明らかなパッチからは 1 ラメットから葉を、複数ジェネットが分布していると考えられたパッチからは 1 ジェネットあたり複数ラメットから葉を採取し、全部で 148 ラメットの遺伝子型を特定してジェネットを識別した。

解析に用いた 8 組のマイクロサテライトマーカーは、前節と同じ *ga0212*、*ga0218*、*ga0235*、*ga0668*、*ga1277*、*Pri0126*、*Pri0141*、*Pri0146* とし、PCR 条件も前節と同じとした。PCR 産物は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) と GeneScan software (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。

## 2-2-3 空間的遺伝構造の把握

遺伝的に近縁なジェネットが集中分布している規模を把握するために、空間的遺伝構造を解析した。1m 間隔の距離クラスを 10 段階で設定し (0~1m から 9~10m の距離クラスまで)、それぞれの距離クラスに属するペア間で平均共有対立遺伝子数 (NAC; Surles *et al.* 1990) を比較した。この解析では、対立遺伝子が集中分布してい

ると、その範囲内に分布するペア間の NAC が高くなるため、近縁ジェネットが分布する空間的スケールを把握することができる。

また、得られた NAC の有意性を検定するために、ジェネットの分布位置を固定し、遺伝子型を 1000 回ランダムに入れ替え、帰無仮説分布を作出した。近隣に分布するジェネット間で平均 NAC が有意に高い場合は、近隣に分布するジェネットペアはランダムに分布しているジェネット同士よりも遺伝的により近縁であることを示している (Hamrick *et al.* 1993)。

## 2-3 結果

マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座を用いて開花ラメットを、長花柱花 55 ジェネット、短花柱花 42 ジェネットからなる 97 ジェネットに識別した。各開花ジェネットの分布位置は、そのジェネットに属する各ラメットの位置座標の平均とした (図 8)。解析に用いた 8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーに関しては、どの遺伝子座においても、ハーディ・ワインベルグ平衡から有意にずれていなかった (表 7)。

マイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座の平均 NAC は、1m 以内に分布するペア間で  $0.93 \pm 0.01$  (平均  $\pm$  標準誤差) であり、遺伝子型がランダムに分布している場合と比べて有意に高かった ( $p < 0.05$ 、図 9)。しかし、比較するペアが 2m 以上離れると平均 NAC は 0.80 付近で一定の値を示し、遺伝子型がランダムに分布している場合と比べて変わらなかった。

## 2-4 考察

局所集団内の遺伝構造を調べたところ、1m 以内に有意な空間的遺伝構造が検出された。このような空間的遺伝構造が形成された理由としては、1) 種子と花粉の両方の散布距離の制限と 2) 種子の散布距離の制限の 2 つの可能性がある。種子と花粉の両方の散布距離が制限されるならば、近親交配によってホモ接合ジェネットの頻度が高まっているはずである (Wright 1951)。しかし、この局所集団のヘテロ接合度は 0.70 でハーディ・ワインベルグ平衡から有意にずれていなかった (表 7)。そのため、この空間的遺伝構造は、種子の散布距離が短いことによって生じたと考えられた。1m 以内に近縁なジェネットが集中分布しているという今回の結果は、サクラソウ種子の平均散布距離が 10.4cm と短く、最大でも 23.0cm しかないという先行研究 (Ishihama *et al.* 2003) から支持される。調査した局所集団は、沢の増水によるかく乱をうけにくい高台に位置しているため、このような遺伝構造が発達したと考えられた。

## 第 2 章のまとめ

本章では、サクラソウ地域集団の遺伝構造を明らかにすることを目的として、比較的良好な環境が保たれている八ヶ岳演習林内のサクラソウ地域集団を対象として空間的遺伝構造の解析を試みた。

第 1 節では、沢に沿って分布するというサクラソウ集団の性質に注目し、沢沿い集団と沢内の分集団という 2 つの階層に分けて演習林内の遺伝構造を解析した。その結果、種子の動きを反映する葉緑体 DNA 多型のハプロタイプの出現頻度が、別々

の沢に沿って成立する集団間では大きく異なっていることが分かり、沢間で種子の移動が制限されていることが示された。それに対して、同一沢内の分集団間では遺伝的にほとんど分化していなかったことから、沢の増水時などに上流から下流へと種子が移動していることが示唆された。一方、種子と花粉の両方の動きを反映するマイクロサテライトマーカーによれば、沢間、沢内ともに遺伝的にほとんど分化しておらず、大部分の遺伝的変異が分集団内に存在していることが分かった。このことから、花粉による遺伝子流動が沢間・沢内ともに比較的頻繁に生じていることが示唆され、分集団内の高い遺伝的多様性はそのような花粉の長距離散布によって維持されていると推察された。さらに、マイクロサテライトマーカー8 遺伝子座に関して全く同一の遺伝子型を示すラメットが、同じ沢沿いの 59m と 166m 離れたところに 2 組分布しているのが見つかったことから、サクラソウのクローン成長器官が沢に沿って稀に長距離移動することが示された。

サクラソウの遺伝子流動は、これまでに種子散布距離が平均 10cm (Ishihama *et al.* 2003)、クローン成長器官による移動は最大でも数 m、花粉の散布距離は 5~10m 以内 (Nishihiro *et al.* 2000; Watanabe *et al.* 2004) と考えられていた。しかし、今回の結果から、サクラソウの遺伝子流動が百メートル~数百メートルといった従来考えられていたよりも広い範囲で生じていることが示され、そのような長距離の遺伝子流動によって、複数の沢沿い集団から構成されるサクラソウの地域集団は、分集団構造を持たないひとつの大きな繁殖集団として存在していることが分かった。

第 2 節では、より小さなスケールで発達する空間的遺伝構造を把握することを目的として、ひとつの局所集団内の遺伝構造を詳細に解析した。その結果、1m 以内に遺伝的に近縁なジェネットが集中分布していることが分かった。調査した局所集団は、やや高台に位置し、増水による攪乱が生じにくいところに立地していたため、この集中分布は、サクラソウの種子が種子親の極近傍に重力散布されることによって形成さ

れたと考えられた。このように近縁ジェネットが集中分布している条件下では、花粉の散布距離が強く制限されると、近親交配によって局所的な遺伝的分化が起こりやすい。しかし、この局所集団のヘテロ接合度を調べて見るとハーディ・ワインベルグ平衡からの有意なずれは観察されず、近親交配が行われている証拠は得られなかった。おそらく、第 1 節の結果から示唆されているように、花粉の散布距離が従来の 5~10m 以内という範囲よりも広い範囲で生じているために、近親交配が回避され、局所的な分化が妨げられているのではないかと考えられた。従って、サクラソウ地域集団内の遺伝的多様性は、歴史的に見ると長距離で生じる花粉流動によって維持されていると考えられた。

### 第3章 花粉による遺伝子流動の把握

第2章の結果から、サクラソウの種子は、通常は種子親の極近傍に重力散布されるが、沢の増水によって稀に長距離移動することが示唆された。一方、花粉による遺伝子流動の範囲は従来考えられていたよりも広く、50m~100m 離れた沢間でも十分な流動が生じており、そのような長距離の花粉流動によって分集団内の遺伝的多様性が高く維持されていることが示唆された。前章における、遺伝構造から遺伝子流動を推定する方法は、歴史的な遺伝子流動の結果を推定するものであり、この方法によって現在生じている遺伝子流動を正確に推定することはできない(Whitlock & McCauley 1999)。そこで本章では、現在生じている花粉流動を父性解析によって明らかにし、花粉流動の範囲に影響する要因を特定し、遺伝構造が形成される過程を把握することを目的とした。

虫媒植物では、花粉の散布距離は局所的な範囲に制限されているという見方が一般的であったが(Levin 1981)、父性解析によって花粉流動の実態が把握されるにつれて、花粉の散布距離は従来考えられてきたよりも長く、また、集団や個体によって、あるいは同一個体が咲かせる個々の花によってさえも大きく変動することが分かってきた。花粉の散布距離が変動する理由としては、開花フェノロジーや昆虫の行動の変化、天気、個体や集団の空間配置、微地形の違いなどが考えられる(Ellstrand 1992; Isagi *et al.* 2000)。しかし、大部分の先行研究は花粉の散布距離のみを計測しているため、花粉流動の距離を変動させる要因についてはほとんどわかっていない(Ellstrand 1992)。空間的遺伝構造が形成され、維持される機構を理解するためには、遺伝子流動の距離を単に明らかにするだけでなく、散布距離に影響する要因を明らかにする必要がある。そこで、第1節では、サクラソウ集団内のジェ



ネット間に見られる開花フェノロジーの幅広い変異に着目し、開花フェノロジーが花粉の散布距離や空間的遺伝構造に及ぼす影響について解析した。

また、遺伝子流動が空間的遺伝構造に及ぼす影響を理解するためには、花粉や種子の散布範囲を把握するだけでは不十分であり、種子の散布量に影響する種子生産量や散布後の実生の定着も理解する必要がある。そこで、第 2 節では、遺伝子流動を、種子生産量から実生の定着までを含めたより総合的な観点から解析し、交配相手である異花型ジェネットの密度が遺伝子流動を介して、空間的遺伝構造に及ぼす影響を解析した。

## 第 1 節 開花フェノロジーが花粉の散布距離と空間的遺伝構造に及ぼす影響

### 1-1 はじめに

花粉の散布距離は、局所的な適応が生じる空間スケールや集団内の遺伝的多様性の程度に大きな影響を及ぼすため、進化遺伝学や保全遺伝学において常に重要視されてきた (Loveless & Hamrick 1984)。多くの理論研究やシミュレーション研究は、種子と花粉の両方の散布距離が限られている場合、近親交配や遺伝的浮動の働きによってホモ接合個体の集中分布構造が急速に発達すると予想している (Wright 1943; Turner *et al.* 1982; Sokal & Wartenberg 1983; Ohsawa *et al.* 1993)。しかし、これらの研究は、集団内の個体間に開花フェノロジーの変異が全くなく、どの個体も同じ時期に同じ数だけ開花するという、現実とは大きくかけ離れた仮定に基づいて行われている。実際には、同じ集団の中にも、個体間で開花フェノロジーに関して幅広い

変異がしばしば観察される(Pors & Werner 1989; Dieringer 1991; Washitani *et al.* 1991; Okayama *et al.* 2003)。従って、花粉流動の空間的制限の程度も開花フェノロジーによって影響されている可能性がある。例えば、虫媒植物のアメリカン・マホガニー(*Swietenia humilis* Zucc)では、近隣個体間の開花が同調していないため、近距離での花粉流動が制限されているという報告がある(White & Boshier 2000)。

このような開花フェノロジーによる花粉流動距離の変動は、空間的遺伝構造の形成に大きな影響を及ぼしている可能性がある(Schmitt 1983; Loveless & Hamrick 1984)。Schmitt(1983)は、一年生草本の *Linanthus bicolor* Greene を調査し、開花密度の低い集団の開花初期と後期に、昆虫の飛行距離が増加することを観察し、この時期に生じる花粉の長距離散布は、集団内のヘテロ接合度を高く維持して個体の近交度を低くする働きがあると予測した。Schmitt の仮説は、集団内の遺伝的多様性が維持されるメカニズムを理解するうえで重要であると考えられるが、開花フェノロジーが花粉の散布距離、ひいては空間的遺伝構造に及ぼす影響を量的に評価した研究がないため未だに検証されていない。この仮説を検証するためには、開花フェノロジーと花粉の散布距離、および花粉の散布距離の変化によって生じる次世代の近交度の違いとの関係を理解する必要がある。

本節では、マイクロサテライトマーカーを用いて父性解析を行い、局所集団内における花粉流動を明らかにした。さらに、開花フェノロジーの影響を明らかにするために、2 つのモデルに基づいて花粉の散布距離と次世代の近交度を推定し、比較した。2 つのモデルのうち、1 つ目は観察された花粉流動パターンに基づいて構築されたものであり、ジェネット間の交配頻度は物理的な距離と開花フェノロジーによって決定されると仮定している。2 つ目のモデルは、1 つ目のモデルとほぼ同じであるが、開花フェノロジーの効果は取り除かれており、交配頻度はジェネット間の距離のみで決定されると仮定している。この 2 つのモデルから得られた結果を比較することにより、遺伝

構造の形成過程を理解するうえで、開花フェノロジーの効果の重要性を考察する。

## 1-2 材料と方法

### 1-2-1 調査地

調査地は、第 2 章第 2 節で解析した G 沢沿いの高台に位置する局所集団とした (図 10)。この局所集団では、1m 以内に遺伝的に近縁なジェネットが集中分布しているため、花粉の散布距離の変化は次世代の近交度の変化をもたらしやすいと考えられる。また、この調査区では、ジェネット密度に大きなばらつきがあり、半径 20m 以内に分布する異花型ジェネット数に基づいて各ジェネットをグループ分けすると、異花型ジェネット数が 22 ジェネット以上いる高密度地区のジェネットと、7 ジェネット以下しかいない低密度地区のジェネットの 2 グループに明瞭に分けられる。そのため、半径 20m 以内に分布する異花型ジェネット数に基づいて、この調査区を高密度地区と、低密度地区に区別した (図 10)。

### 1-2-2 開花フェノロジー調査

2002 年春に G 沢の下流域に設けた調査地において、各ジェネットの開花フェノロジーを調査した。ラメットごとに、各小花の開花日と、当日咲いていた総開花数を 1 日おきに調査した。この調査区における、長花柱花と短花柱花の総開花ラメット数は、それぞれ 176 と 139 であった。長花柱花と短花柱花の総開花小花数は、それぞれ 1049 と 663 であった。第 2 章第 2 節で行った解析により、これらの開花ラメットは全部

で 97 ジェネットにグループ分けされることが分かっている。

これらの開花ジェネットのうち、長花柱花 9 ジェネット、短花柱花 8 ジェネットからなる 17 ジェネットから種子を採取し、父性解析を行った。これらの種子親は、調査区全域がカバーされるように(図 10)、また、開花時期が偏らないように(図 11)注意しながら選択した。種子親に関しては、開花日に加えて、各小花の開花日も記録した。サクラソウの小花は受精が完了すると、花冠の基部に離層が形成され、手で軽く触れただけで花冠が落ちるようになる。そこで小花の開花日は、手で軽く触れてみて花冠が落ちた日とした。また、小花の開花期間は、小花の開花日から閉花日までの期間とした。閉花日を記録していない種子親以外のジェネットに関しては、種子親の小花の平均開花期間が 14 日間だったことから、開花期間を 14 日と定義した。

### 1-2-3 種子の採取と発芽処理

2002 年 7 月から 8 月にかけて、17 ジェネットから 47 果実を採取した。1 果実あたりの平均種子生産数は、 $45.28 \pm 20.81$  (平均 $\pm$ 標準偏差)であった。DNA を抽出するため、1 果実から約 30 種子をランダムに抽出し、合計 1295 種子を以下の手順で発芽させた。直径 6cm のシャーレにろ紙を 2 枚置き、水で湿らせた後、種子を 30 粒ずつ播種した。5°C 暗条件下で 1 ヶ月間静置した後、1mM のジベレリン(GA<sub>3</sub> 顆粒、協和社)に一晩浸し、休眠を解除した。休眠解除後、ろ紙を入れ替え、種子を播種しなおし、サクラソウ種子の発芽が促進される 24°C の明条件が 12 時間、12°C の暗条件が 12 時間を繰り返すバイオトロン環境下(Washitani & Kabaya 1988)に静置した。静置後、約 1 週間で発根が認められ、2 週間後には  $91.1 \pm 18.1\%$  (平均  $\pm$  標準偏差)の種子が発芽した。発芽してから約 1 週間後、双葉が展開した頃に実生をピートモス・プレート(15×20×3 cm、サカタタネ社)に移植し、発芽時と同じ条件下のバイオトロン

内で養成した。発芽1ヶ月後、本葉が2~3枚展開する頃に、DNA抽出用の葉を採取した。1果実あたり9~10実生、全部で432実生の葉を採取し、父性解析を行った。

#### 1-2-4 DNA抽出と遺伝子型の特定

サクラソウのDNAを改変CTAB法(Murray & Thompson 1980)を用いて抽出し、前節と同じ *ga0212*、*ga0218*、*ga0235*、*ga0668*、*ga1277*、*Pri0126*、*Pri0141*、*Pri0146* の8組のマイクロサテライトマーカーを用いて、432実生の遺伝子型を特定した。PCR産物は、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems 社)と GeneScan software(Applied Biosystems 社)を用いて解析した。

#### 1-2-5 父性解析

父性解析の精度を表す父性排除率は、8遺伝子座のマイクロサテライトマーカーで0.998であった(表7)。実生と種子親、および調査区内で開花した花粉親候補97ジェネットの遺伝子型を比較して、遺伝子型から明らかに花粉親ではないと分かるジェネットを解析ソフトCERVUS 2.0(Marshall *et al.* 1998)を用いて排除した。

集団内に花粉親候補が2ジェネット以上確認された実生については、実生と種子親と花粉親候補の遺伝子型を *ga0653*、*ga0666*、*PS2* の3組のマイクロサテライトマーカーで特定し、花粉親候補を絞り込んだ。3遺伝子座のPCR条件は、Isagi *et al.* (2001)とUeno *et al.* (2003)のプロトコルに従った。追加した3組のマーカーの特徴を表8に示す。

#### 1-2-6 交配過程を再現するモデルの構築

本研究では、花型(長花柱花と短花柱花)とジェネット間距離、開花の重複期間、開花数の4つの要因が2ジェネット間の交配確率に影響すると仮定した。花粉と柱頭の受精能力は、小花の開花期間を通して一定であるとした。花粉親 $k$ と花粉の受け手である小花 $j$ との交配確率( $\Phi_{jk}$ )を、Burczyk *et al.*(1996)の近隣モデル (the neighborhood model) を改良し、以下の式によって表した。

$$\Phi_{jk} = \frac{\exp(\gamma \times \text{dis}_{jk}) \times f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta) \times m_{jk}}{\sum_k \{ \exp(\gamma \times \text{dis}_{jk}) \times f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta) \times m_{jk} \}} \quad \text{式 1}$$

$$\begin{cases} m_{jk} = 0 & k \text{ が } j \text{ と同じ花型のとき} \\ m_{jk} = 1 & k \text{ が } j \text{ と違う花型のとき} \end{cases}$$

ここで、 $\text{dis}_{jk}$ とは花粉親 $k$ と小花 $j$ との物理的な距離(m)であり、 $\text{num}_{jk}$ とは小花 $j$ の開花期間中に、花粉親 $k$ が咲かせていた日ごとの総開花数の累積値である。この $\text{num}_{jk}$ は、花粉親 $k$ の総開花数と、小花 $j$ と花粉親 $k$ との開花期間の重なり具合によって決定される。小花 $j$ と花粉親 $k$ が同じ花型の場合には、両者の交配確率が0となるような変数 $m_{jk}$ をそれぞれ掛けた。花粉親候補ごとに式の分子部分を計算し、全ての花粉親候補の総和で割ることで、小花 $j$ が花粉親候補 $k$ と交配する確率を相対値で表現した。父性解析によって得られた実際の交配組み合わせのデータに、正規分布、指数分布、ガンマ分布などの様々な確率関数を仮定して、 $\text{num}_{jk}$ が交配確率 $\Phi_{jk}$ に及ぼす影響を近似したところ、ガンマ分布が最も当てはまりが良かったため、 $\text{num}_{jk}$ の効果はガンマ分布(式2)に従うと仮定した。

$$f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta) = \frac{1}{\beta \times \Gamma(\alpha)} \times \text{num}_{jk}^{\alpha-1} \times \exp\left(-\frac{\text{num}_{jk}}{\beta}\right) \quad \text{式 2}$$

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^{\infty} \exp(-x) \times x^{\alpha-1} dx$$

式1を父性解析から得られた交配組み合わせのデータに当てはめ、準ニュートン法 (Kennedy & Gentle 1980、付録 7 参照) によって変数の値を収束させながら、観察データが最もあてはまる  $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$  を最尤推定 (Rao 1973) した。統計モデルの選択は、赤池の情報量基準 (Akaike's Information Criteria、AIC; Akaike 1974) に基づいて行った。変数の組み合わせが異なるいくつかの候補モデルから、最も AIC が小さいモデルを最適モデルとした。

#### 1-2-7 開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響のシミュレーション解析

開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響を明らかにするために、調査区内で開花した全 1712 小花の交配確率を 2 つのモデルに基づいて推定した。最初のモデルは、式 1 のモデルで、実際の交配パターンに基づいて構築されたものである。このモデルでは、2 ジェネット間の交配確率は開花フェノロジーとジェネット間距離によって決定される (以後このモデルを“フェノロジー距離モデル”と呼ぶ)。2 つ目のモデルは、式 1 の  $f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta)$  を常に 1 にすることによって、開花フェノロジーが交配確率に及ぼす影響を除いたモデルである。このモデルでは、ジェネット間の開花フェノロジーに全く変異がない仮想的な場合を想定しており、交配確率はジェネット間距離によってのみ影響される (以後このモデルを“距離モデル”と呼ぶ)。この 2 つのモデルで推定された花粉の散布距離を比較することにより、開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響を推定した。

まず、開花フェノロジーが集団全体の花粉の散布パターンに影響を及ぼすかどうかを確かめるために、フェノロジー距離モデルと距離モデルとで花粉の散布距離の

頻度分布の違いをコルモゴロフ・スミルノフ検定により比較した。距離クラス  $x$  における花粉流動の頻度は、式 3 によって推定した。

$$F(x) = \frac{\sum_{j=1} \sum_{k=1} \Phi_{jk} c_{jk}}{n} \quad \text{式 3}$$

$$\begin{cases} c_{jk} = 0 & \text{dis}_{jk} \text{ が距離クラス } x \text{ に入らないとき} \\ c_{jk} = 1 & \text{dis}_{jk} \text{ が距離クラス } x \text{ 内のとき} \end{cases}$$

ここで  $n$  とは、この調査区における総開花数、すなわち 1712 である。距離クラスは、1m 間隔とし、0～1 m から 110～111m までの 111 クラスとした。

さらに、開花フェノロジーが各小花の花粉流動距離に及ぼす影響を明らかにするために、小花  $j$  が受粉する花粉の平均散布距離を 2 つのモデルで比較した。小花  $j$  が受粉する花粉の平均散布距離は、式 4 で定義した。

$$\mu_{dj} = \sum_{k=1} \text{dis}_{jk} \Phi_{jk} \quad \text{式 4}$$

#### 1-2-8 開花フェノロジーが次世代の近交度に及ぼす影響のシミュレーション解析

開花フェノロジーが次世代の近交度に影響するかどうかを明らかにするために、近縁ジェネットとの交配確率と、次世代のヘテロ接合度を 2 つのモデルで比較した。第 2 章第 2 節の結果から、本研究ではあるジェネットを中心としたときに、そのジェネットから半径 1m 以内に分布しているジェネットを近縁ジェネットと定義した。比較の際には、Wilcoxon signed-rank 検定を行った。小花  $j$  が生産した次世代の遺伝子座  $l$  におけるヘテロ接合度 ( $H_{jl}$ ) は、以下の式によって推定した。

$$H_{jl} = \sum_{k=1} \Phi_{jk} H_{jkl} \quad \text{式 5}$$



ここで  $H_{jkl}$  とは、小花  $j$  と花粉親  $k$  が交配した際の、 $l$  番目のマイクロサテライトマーカー遺伝子座におけるヘテロ接合度の期待値である。小花  $j$  の次世代のヘテロ接合度 ( $H_j$ ) は、8 遺伝子座の  $H_{jl}$  の平均値とした。また、あるジェネットが生産した次世代のヘテロ接合度は、そのジェネットが咲かせた全小花の  $H_j$  を平均することによって推定した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 開花フェノロジー

調査区内の開花ジェネットの開花フェノロジーを調査したところ、ジェネット間の開花フェノロジーに幅広い変異が見られた。すなわち、ジェネットの第1花開花日には、5月5日から5月27日まで3週間以上の変異が観察された(表9、図11)。各ジェネットの開花小花数には、1小花から256小花までの大きな変異が認められた(表9)。ほぼ半数にあたる49%のジェネットは1ラメットしか開花しなかったのに対して、少数のジェネットは15ラメット以上開花した。第1花開花日から、最後の小花が落ちるまでの期間であるジェネットの開花期間も11日間から38日間まで観察された(表9)。第1花開花日が早いジェネットほど、ジェネットの開花期間が長い傾向が認められた( $r = -0.57$ ,  $p < 0.0001$ ) が、第1花開花日と開花数との間には相関は見られなかった(図12)。

### 1-3-2 父性解析

父性解析した 432 実生のうち、解析実生数の 79%にあたる 341 実生の花粉親を集団内の 1 ジェネットに特定できた(表 10)。残りの実生のうち 25 ジェネット(6%)は、調査区外からの花粉によって受粉した実生であり、66 ジェネット(15%)は調査区内に 2 ジェネット以上花粉親候補がいる実生であった。花粉親を調査区内の 1 ジェネットに特定できた実生のうち、自殖由来の実生が 36 ジェネット(11%)、同花型のジェネット間交配で生じたと考えられる実生が 2 ジェネット(0.6%)観察された。

自殖由来の実生 36 ジェネットのうち 31 ジェネットは、低密度地区に分布する 3 ジェネット(長花柱花 2、短花柱花 1)に由来していた。残りの 5 ジェネットは、高密度地区で一番早く咲き始めた 2 ジェネット(長花柱花 1、短花柱花 1)に由来していた。また、同花型交配によって生じた実生は、高密度地区に分布する 2 ジェネットに由来していた。

花粉親を調査区内の 1 ジェネットに特定できた実生に関して、両親間の距離から花粉の散布距離の頻度分布を求めたところ、高密度地区に比べて低密度地区に分布する種子親の方が、自殖を除いたときの花粉の散布距離が長かった(コルモゴロフ・スミルノフ検定、 $p<0.001$ 、図 13a)。高密度地区に分布する種子親では、自殖を除いたときの受粉する花粉の散布距離の平均が 5.24m であったのに対して、低密度地区では 13.15m であった。また、観察された花粉の散布距離の最大値は、高密度地区で 46.23m、低密度地区で 47.81m であった。

### 1-3-3 交配過程を記述するモデルの構築

モデルを構築するにあたって、自殖由来の実生と同型ジェネット間の交配に由来

する実生はデータから除くことにした。モデルを構築するために、父性解析した 47 小花に関して、小花  $j$  の開花期間中に花粉親  $k$  が咲かせていた累積総開花数 ( $\text{num}_{jk}$ ) を求めたところ、小花  $j$  と花粉親  $k$  の組み合わせによって 0 から 3115 まで大きくばらつき、平均と標準偏差は  $104.31 \pm 233.15$  だった。この累積総開花数 ( $\text{num}_{jk}$ ) やジェネット間距離 ( $\text{dis}_{jk}$ ) などのパラメーターを加えてモデルを構築したところ、全てのパラメーター ( $\gamma, \alpha, \beta, m, w$ ) を含めたときに最も AIC が小さくなった ( $\log_{10}\text{-likelihood} = -113.75$ 、 $\text{AIC} = 237.50$ 、尤度比検定  $p < 0.0001$ 、 $\gamma = -0.126$ 、 $\alpha = 1.887$ 、 $\beta = 1542.672$ )。

しかしながら、得られたモデルに基づいて、花粉の散布距離の頻度分布を求めたところ(図 13b)、観察された頻度分布(図 13a)と大きく異なっていた。この違いは、短距離で生じている花粉流動と長距離で生じている花粉流動を、たったひとつのパラメーター  $\gamma$  で予測している(式 1)ことから生じていると考えられた。そこで、新たに  $\lambda$  というパラメーターを式 1 に加えることにした。

$$\Phi_{jk} = \frac{\{\exp(\gamma \times \text{dis}_{jk}) + \lambda\} \times f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta) \times m_{jk} \times w_{jk}}{\sum_k [\{\exp(\gamma \times \text{dis}_{jk}) + \lambda\} \times f(\text{num}_{jk}, \alpha, \beta) \times m_{jk} \times w_{jk}]} \quad \text{式 6}$$

その結果、観察されたパターンとよく一致するモデルを構築することができた(図 13c、 $\log_{10}\text{-likelihood} = -109.52$ 、 $\text{AIC} = 231.03$ 、尤度比検定  $p < 0.0001$ 、 $\gamma = -0.283$ 、 $\alpha = 2.015$ 、 $\beta = 1179.096$ 、 $\lambda = 0.005$ )。このモデルでは、2 ジェネット間の交配確率は、ジェネット間の距離が離れるほど低くなり、累積総開花数  $\text{num}_{jk}$  が 1196 のとき最も高くなる。

#### 1-3-4 開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響のシミュレーション解析

花粉の散布距離の頻度分布は、フェノロジー距離モデルと距離モデルとで有意な違いは認められなかった(コルモゴロフ・スミルノフ検定、 $p = 0.79$ )。この結果からは、開花フェノロジーが、集団全体の花粉の散布距離にそれほど大きな影響を与えるわけではないことを示している。

しかしながら、各小花が受粉する花粉の平均散布距離( $\mu_{dj}$ )は、開花フェノロジーを考慮することによって大きく変化した(図 14)。特に、低密度地区に分布するジェネットが咲かせた小花で変化が大きく、開花フェノロジーを考慮することにより、全小花の 4.5%に相当する 77 小花の平均散布距離が 5m 以上長くなり、全小花の 2.8%に相当する 48 小花の平均散布距離が 5m 以上短くなった(図 14)。

開花フェノロジーが、どのような過程を経て花粉の散布距離に影響を及ぼしているのか理解するために、高密度地区で開花した 3 小花に着目し、それぞれの小花が咲いていたときの近隣ジェネットの開花状況と、父性解析の結果、およびジェネット間距離と交配確率の関係を見てみた(図 15)。もしも、この調査区内のジェネット間に開花フェノロジーの変異が全くないならば、図 15a に示すように交配確率はジェネット間の距離が離れるほど単調に減少する。しかし実際には、図 15b～d の上段のグラフが示すように、ジェネット間の開花フェノロジーには幅広い変異が見られる。そのため、5 月 5 日から 13 日までと早い時期に開花した小花は、近隣のジェネットと開花期がずれたため、やや遠く離れたジェネットと交配していた(図 15b)。一方、図 15b と同じジェネットが、5 月 20 日から 31 日までとより遅い時期に咲かせた小花では、近隣ジェネットが開花してきたために、最も近くに分布するジェネットと交配していた(図 15c)。さらに、別のジェネットが 5 月 20 日から 6 月 1 日まで咲かせていた小花では、近隣のジェネットが同調して大量の小花を開花させていたため、近隣ジェネット間での交配確率が高

くなり、花粉の散布距離が短くなっていた(図 15d)。

#### 1-3-5 開花フェノロジーが次世代の近交度に及ぼす影響のシミュレーション解析

調査区内の 97 開花ジェネットのうち、44 ジェネットは 1m 以内に異花型ジェネットが分布していた。1m 以内に分布する異型ジェネットとの交配確率をフェノロジー距離モデルと距離モデルで比較したところ、交配確率が 33%減少したジェネットから 37%増加したジェネットまで認められた(図 16)。44 ジェネットのうち 26 ジェネットは、開花フェノロジーを考慮することによって近縁ジェネットとの交配確率が低くなったが、Wilcoxon signed-rank 検定を行ったところ、フェノロジー距離モデルと距離モデルとで近縁ジェネットとの交配確率に有意な差は認められなかった( $z = -1.284, p = 0.20$ )。

次に、フェノロジー距離モデルと距離モデルとの間で次世代のヘテロ接合度を比較したところ、開花フェノロジーを考慮することによって次世代のヘテロ接合度が 4%減少したジェネットから 7%増加したジェネットまで認められた(図 16)。97 ジェネットのうち 60 ジェネットは、フェノロジー距離モデルの方で次世代のヘテロ接合度が高く、Wilcoxon signed-rank 検定を行ったところ、この違いは有意であることがわかった( $z = 3.554, p < 0.001$ )。しかし、次世代のヘテロ接合度のジェネット平均を比べてみると、フェノロジー距離モデルの 0.699 に対して、距離モデルは 0.691 とその違いはそれほど大きくはなかった。

開花フェノロジーを考慮したことによる、近縁ジェネットとの交配確率の変化量と次世代のヘテロ接合度の変化量の相関を見てみたところ、有意な負の相関が認められ、開花フェノロジーを考慮したことによって近縁ジェネットとの交配確率が低くなったジェネットは、次世代の近交度も低くなることが分かった(図 16、 $r = -0.423, p < 0.01$ )。

## 1-4 考察

### 1-4-1 交配モデル

本研究では、ジェネット間の距離が交配確率に及ぼす影響を2つの変数で記述した。新しく加えられた変数 $\lambda$ は主に、長距離でも一定の割合で花粉流動が生じることとを保障している。この変数を組み込むことにより、短距離で生じた花粉流動に対するモデルの当てはまりも改善された(図 13c)。このことから、サクラソウの集団内では、ある種子親を中心としたときに、種子親から約 20m 以内に分布しているジェネットに関しては、距離が近いジェネットほどその種子親との交配確率が高くなるのだが、20m 以上離れると、物理的な距離の効果が小さくなって、どんなに遠く離れたジェネットであっても一定の交配確率は保障されることが分かった。このように片側に長く尾を引く急尖的な分布は、他の虫媒植物の花粉流動においても多数報告されている(例えば、Levin & Kerster 1968; Meagher 1986)。このような分布が形成される理由としては、花粉の持ち越し量が多いこと(Thomson & Plowright 1980)、飛行距離が異なる複数のポリネーターによって受粉されること(Meagher 1986)、遠くから来た花粉のほうが、近くから来た花粉よりも受粉後の結実率が高いこと(Price & Waser 1979; Levin 1984; Fenster 1991)などが考えられている。Matsumura & Washitani (2002)は、トラマルハナバチをポリネーターとした実験を行い、サクラソウ花粉の持ち越し量が多いことを明らかにした。本研究で、花粉の散布距離の頻度分布が長く尾を引いた理由としては、トラマルハナバチによる花粉の持ち越し量が多いことも影響していると考えられる。

本研究では、自殖を交配モデルに組み込まなかったため、次世代のヘテロ接合度の推定値は過大評価されている可能性が高い。自殖率を将来のサクラソウの交配モデルに組み込むためには、少なくとも、交配確率の総合値と自家不和合性に関わ

る遺伝的変異の2つのことを考慮する必要がある。交配確率の総合値とは、式6の分母で表される値で、集団中のどの花粉親候補個体からも離れたところに分布している場合や、開花期が極端にずれている場合にはこの値が小さくなる。この調査区では、自殖した小花の交配確率の総合値は、 $58.27 \times 10^{-6} \pm 85.64 \times 10^{-6}$  (平均 $\pm$ 標準偏差)であり、自殖していない小花の  $291.13 \times 10^{-6} \pm 269.22 \times 10^{-6}$  と比べて小さかった。したがって、今後データが増えてくれば、自殖率をこの交配確率の総合値の関数として表せられるかもしれない。さらに、人工交配実験の結果から、サクラソウの集団内には自家不和合性程度にジェネット間変異があることが示されている (M. Nagai *et al.* 未公開データ)。そのため、交配確率の総合値に加えて、自家不和合性程度の遺伝的変異が野外の自殖率に及ぼす影響についても明らかにする必要があるだろう。

また、本シミュレーション実験では、閉花日を記録していない小花について、その開花期間を14日間とし、柱頭の受精能力は14日間を通して一定であると仮定している。圃場において5ジェネットの103小花を対象とした受粉実験からは、サクラソウの柱頭は開花後14日目まで受精能力があることが確認されているため (Kitamoto and Ohsawa 未公開データ)、開花期間を14日間としたことは現時点では妥当であると考えられる。しかし、種子生産量を指標とした柱頭の受精能力は開花後7日目をすぎるあたりから明らかに低下し、開花後10日目に受粉された小花は、1日目に受粉された小花よりも平均して79%も種子生産量が低下し、14日後では99%も低下していた (Kitamoto and Ohsawa 未公開データ)。このような圃場実験における結果は、気象条件や受粉量が自然集団とは異なるため、そのまま自然集団に当てはめることはできないが、この種子生産量の急激な低下を考慮すると、14日間を通して柱頭の受精能力が一定であると仮定した今回の研究は、開花フェノロジーの影響をおそらく過小評価していると考えられる。今後は、自然集団において受粉実験などを行い、自然状態における柱頭の受精期間を調査する必要がある。

#### 1-4-2 開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響

本研究の結果から、各小花が受粉する花粉の平均散布距離( $\mu_{dj}$ )は、近傍の異花型ジェネットの開花数やそのジェネットとの開花期の重複具合により、大きく影響されることが分かった(図 14、15)。しかし、各小花が受粉する花粉の散布距離は、開花フェノロジーを考慮することによって長くなったり短くなったりしたため、集団全体での花粉流動距離の頻度分布は、それほど大きく変わらなかった。

また、本研究の結果から開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響は、ジェネット密度によって異なることが分かった(図 14)。低密度地区では、多くの小花で開花フェノロジーを考慮したほうが花粉の平均散布距離が長くなった。低密度地区では、近傍に分布するジェネットが少ないため、近傍の異花型ジェネットと開花期がずれる確率が高い。そのため、より遠くに分布するジェネットとの交配確率が高まり、花粉の散布距離が長くなったと考えられた。一方、高密度地区では、近傍に分布するジェネット数が多いため、近傍の異花型ジェネットのすべてと開花期がずれる確率は低くなり、開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響は小さくなった。今回の調査区において、低密度地区で開花した小花数が少なかったことも、集団全体の平均的な花粉の散布距離がフェノロジー距離モデルと距離モデルで大きく変わらなかったことに影響していると考えられる。

Schmitt(1983)は、一年生草本である *Linanthus bicolor* では、集団の開花初期と後期の開花密度が低い時期にポリネーターの飛行距離が長くなることから、花粉の散布距離もこの時期に長くなると予測した。一方、本調査地の高密度地区で開花した大部分の小花は、集団の開花初期と後期に開花した小花であっても、花粉の平均散布距離はフェノロジー距離モデルと距離モデルでそれほど大きく変わらなかった(図 14)。これらの小花には、3m 以内に異花型ジェネットが分布しているという共通点



が見られた。このことから、花粉の流動距離を決定する要因としては、集団全体の開花密度よりも局所的な開花密度のほうが、重要であることが分かった。

#### 1-4-3 開花フェノロジーが次世代集団全体の近交度に及ぼす影響

次世代のヘテロ接合度をフェノロジーモデルと距離モデルで比較したところ、フェノロジー距離モデルの方が次世代のヘテロ接合度が有意に高かった。他の集団でも同様の結果が得られるかどうかは、今後さらに調査する必要があるが、少なくとも今回の結果は、開花フェノロジーのジェネット間変異の有無が集団全体の遺伝的多様性に影響を及ぼしうることを示唆している。

同一環境下での栽培実験から、サクラソウの自然集団内には、開花期に関して明らかに遺伝的な変異が存在することが分かっている (Y. Yoshida *et al.*, 未公開データ)。環境条件が場所や年によって大きく変動する自然集団内においても、ジェネットの開花順番が毎年ほぼ一定である (Washitani *et al.* 1991; Okayama *et al.* 2003) ことから、サクラソウジェネットの開花の早晩は、遺伝的であると考えられる。通常、開花期のように適応度に深く関与する形質では、遺伝的な変異が集団内に維持されにくいと考えられている (Maynard Smith 1989)。にもかかわらず、多くの植物種で開花期に関する遺伝的な変異が集団内に存在することが報告されており (Pors & Werner 1989; Mazer & Schick 1991)、その維持機構としては同類交配 (Wright 1921、付録 8 参照) や自然選択圧の時空間的変動 (Gross & Werner 1983; Dieringer 1991) が考えられてきた。サクラソウ集団内に見られる開花期に関する遺伝的な変異がどのような機構によって維持されているのかは今のところ不明であるが、今回の結果は、開花期に関する遺伝的な変異が、開花期以外の遺伝子座における遺伝的多様性にも影響すること示している点で、興味深い。

#### 1-4-4 開花フェノロジーが空間的遺伝構造に及ぼす影響

サクラソウは種子の散布距離が短いため、近縁なジェネットが近くに固まって分布しやすい。実際に、本調査区においても 1m 以内に有意な遺伝構造が検出されている。(図 9)。多くの理論研究やシミュレーション研究は、種子と花粉の散布距離が短い場合ホモ接合ジェネットの集中分布が集団内に形成されると予測している (Wright 1943; Turner *et al.* 1982; Sokal & Wartenberg 1983; Ohsawa *et al.* 1993)。Ohsawa *et al.* (1993) は、11 種の虫媒植物で得られた花粉の散布パターンに  $f = k \cdot \exp(-kd)$  という式を当てはめ、花粉流動の空間的な制限の程度を数値化している。ここで、 $f$  とは交配確率を、 $d$  は花粉ソースからの距離を、定数  $k$  は空間的な制限の程度を表わしている。Ohsawa *et al.* (1993) は、定数  $k$  の値が植物によって 0.076 から 0.787 までばらつくことを示した (平均 = 0.408)。同様の式を本研究のサクラソウ集団に当てはめたところ、 $k$  は 0.131 と推定された。この値から、サクラソウ集団における花粉流動の空間的制限の程度は、他の 11 種と比較して中程度以下であることが分かった。

また、Ohsawa *et al.* (1993) は、集団サイズが十分に大きく ( $n = 10\,000$ )、分布密度が均一で、個体間の開花フェノロジーに変異がない場合、 $k = 0.13$  ではホモ接合個体の集中分布は形成されないことを明らかにした。従って、もしも集団内のジェネット間に開花フェノロジーの変異がないならば、サクラソウ集団でホモ接合ジェネットのパッチが形成される可能性は低いと考えられる。しかし、本研究により、花粉流動の空間的制限の程度は、開花フェノロジーによって大きく左右されることがわかった。(図 14、15)。そのため次世代の近交度は、ジェネット間や同一ジェネット内の小花間でさえも異なると考えられる。実際に、大量の花を開花させたジェネットの近傍で開花したジェネットは、花粉流動の空間的制限が強くなり (図 15d)、近縁ジェネットとの交配確率も 25% から 62% へと 37% 増加し、次世代のヘテロ接合度の推定値も 70% から

66%に4%減少した(図16中の黒矢印)。一方、1m以内の異花型ジェネットと3日間しか同時に開花しなかったジェネットは、近縁ジェネットとの交配確率が30%から1%へと29%減少し、次世代のヘテロ接合度の推定値も68%から75%へと7%増加した(図16中の白矢印)。これらの結果から、ホモ接合ジェネットからなるパッチ形成の起こりやすさがジェネットによって大きく異なることが示唆された。

## 第2節 近傍の異花型ジェネット数が次世代の遺伝的多様性と実生の成長に及ぼす影響

### 2-1 はじめに

前節の結果から、サクラソウ局所集団では開花期が近隣ジェネットとずれることによって花粉の長距離散布が生じやすくなることが明らかとなった。しかし、それにも関わらず全体の5割近い花粉流動が3m以内で、また9割以上の花粉流動が20m以内に分布するジェネット間で生じていることも明らかになった。サクラソウは異型花柱性であるため、このように花粉の散布距離が制限されている場合には、近傍の異花型ジェネット数によって種子生産量や自殖率、交配相手の多様性が変化し、ジェネットの適応度や次世代の遺伝的多様性も大きく変わる可能性がある。

近傍に分布する交配相手の密度が個体の種子生産性に影響を及ぼしているという例は、異型花柱性植物(Levin 1975; Barrett 1977)に限らず、雌雄異株植物(Mulcahy 1967)や両性花を持つ自家不和合性植物(Aigner 2004)など多くの他殖性植物で報告されている。例えば、クローン成長を行う自家不和合性植物で、絶滅危惧植物でもある *Dithyrea maritime* では、10 m<sup>2</sup>以内のジェネット数が多いプロットほど種子生産性が高かった(Aigner 2004)。また、サクラソウにおいても、半径5m以内に分布する異花型ジェネット数が少ないジェネットほど種子生産量が少ないことがわかっている(Nishihiro *et al.* 2000; Watanabe *et al.* 2004)。これらの事実は、個体の分布密度が個体群全体の増殖率にも影響を及ぼすことを示唆しており(Aigner 2004)、他殖性植物の保全において特に空間構造に配慮する必要があることを示している。

しかしながら、他殖性植物集団において、交配相手の空間分布が自殖率や花粉

親の多様性に及ぼす影響を調べた研究は、Obayashi et al. (2002)を除いてほとんどない。自殖率や花粉親の多様性は、次世代の近交度に影響し、近交弱勢の発現を通して個体群動態にも影響を及ぼしうる。そのため、絶滅の危機にある他殖性植物集団において、存続可能性を予測し、適切な保全策を構築するためには、空間構造が遺伝的多様性に及ぼす影響を明らかにする必要がある。そこで本節では、前節で明らかになった遺伝子流動を、種子生産から実生の定着までを含めたより総合的な観点から解析し、近傍の異花型ジェネットの密度が遺伝子流動を介して、遺伝構造にどのような影響を及ぼしているのかについて調査した。

## 2-2 材料と方法

### 2-2-1 調査地

調査地は、全節と同じく演習林内の G 沢下流に設けた調査区とした。この調査区内の各ジェネットを、そのジェネットから半径 20m 以内に分布している異花型ジェネット数に基づいてグループ分けすると、異花型ジェネット数が 22 ジェネット以上いる高密度地区のジェネットと、7 ジェネット以下の低密度地区のジェネットの 2 グループに明瞭に分けられる(図 10、17)。そこで、本節では 2 つの密度グループに属するジェネット間で自殖率や花粉親の多様性などを比較した。

### 2-2-2 訪花率

柱頭上に受粉される自家花粉と異花型花粉の割合は、近傍の異花型ジェネット数

だけでなくポリネーターの訪花率によっても左右される。そこで、高密度地区と低密度地区に分布するジェネット間で訪花率が異なるかどうかを比較した。サクラソウは、トラマルハナバチに訪花されると花弁に爪あとが残るため (Washitani *et al.* 1994)、爪あとがついている花の割合からジェネットへの訪花率を推定した。

### 2-2-3 種子生産量

2002 年に開花した 97 ジェネットから 24 ジェネットを任意に選択し、結実した果実数と種子生産量を計測した。24 ジェネットのうち、14 ジェネットは高密度地区に分布し、10 ジェネットは低密度地区に分布している。各ジェネットの結果率は、開花した小花数に対する結実した果実の割合とした。各ジェネットの平均種子生産量は、果実ごとに計測した種子数をすべての果実に関して平均し求めた。結果率と平均種子生産量の積を、各ジェネットの 1 花あたりの平均種子生産量とした。

### 2-2-4 種子の生存能力

前節で、父性解析を行うために発芽処理した 1295 種子を対象として、高密度地区と低密度地区に分布する種子親間で、種子の発芽率や発芽 1 ヶ月後の生存率に違いがあるかどうかを解析した。1 果実あたり約 30 種子を 1 シャーレに播種し、ジベレリン処理後、発根した種子の割合から発芽率を果実ごとに求めた。各果実の発芽率をジェネットごとに平均して、そのジェネットの平均発芽率とした。

大部分のサクラソウの種子は、発芽してから約 1 週間後に双葉を展開した。しかし、一部の実生は、成長の勢いが弱く双葉を展開しないまま死亡した。このような実生の死亡は近交弱勢を反映している可能性があるため、双葉を展開した実生数を計測し、

双葉展開時までの生存率を果実ごとに求めた。

双葉を展開した実生から1果実あたり10実生を任意に選択し、ピートモス・プレート(15×20×3 cm、サカタタネ社)に移植してバイオトロン内で養成した。ピートモス・プレート内の各実生の配置は完全無作為とし、配置によって特定のジェネットの生存率が影響されないようにした。また、プレート内で実生どうしの葉が重ならないように、十分間隔をとって1プレートあたり23実生を移植した。全部で20プレートを明条件24℃、暗条件14℃を12時間ごとに繰り返すバイオトロン内の各棚に配置した。光条件がプレート間で不均一にならないように、3日ごとにプレートの位置を移動した。

発芽1ヶ月後、本葉が2~3枚展開する頃に、生存している実生数を計測した。実生の生存率を果実ごとに求め、それをジェネットごとに平均して発芽1ヶ月後の生存率とした。

#### 2-2-5 次世代の遺伝的多様性

次世代の遺伝的多様性が高密度地区と低密度地区に分布するジェネット間で異なるかどうかを明らかにするために、自殖率と花粉親の多様性を両ジェネット間で比較した。前節の父性解析で明らかになった自殖由来種子の割合を果実ごとに算出し、その平均値をジェネットの自殖率とした。

花粉親の多様性は、Simpson の多様度指数で表した。1ジェネットが交配する花粉親の多様性( $D$ )は、以下の式で求めた。

$$D = 1 - \sum x_k^2$$

ここで  $x_k$  とは、花粉親を1ジェネットに特定できた実生のうち、 $k$  番目のジェネットを花粉親に持つ実生の割合である。

さらに、1ジェネットが交配する花粉親の多様性( $D$ )を、1小花が受粉する花粉親の

多様性 ( $D_{wf}$ ) と小花間に見られる花粉親の多様性 ( $D_{bf}$ ) の 2 つのレベルに分割した。1 小花が多様な相手と交配していて、小花間で交配相手が変わらない場合、 $D_{wf}$  が高くなり  $D_{bf}$  が低くなる。逆に、1 つの小花の交配相手が非常に少なく、それぞれの小花で全く別々の相手と交配している場合、 $D_{wf}$  が低く  $D_{bf}$  が高くなる。1 小花が受粉する花粉親の多様性 ( $D_{wf}$ ) は、以下の式で求めた。

$$D_{ij} = 1 - \sum x_{kj}^2$$

ここで  $x_{kj}$  とは、花粉親を 1 ジェネットに特定できた実生のうち、 $k$  番目のジェネットを花粉親に持つ実生の割合である。推定誤差を小さくするために、この  $D_{wf}$  は、花粉親を 1 ジェネットに特定できた実生が 5 ジェネット以上ある小花に関してのみ推定した。次に、小花間の花粉親の多様性は以下の式によって求めた。

$$D_{bf} = D - D_{wf} \text{ のジェネット平均}$$

#### 2-2-6 近交弱勢

近交弱勢が生じているかを確認するために、同じ種子親が生産した自殖由来の実生と他殖由来の実生とで発芽1ヶ月後の葉面積を比較した。実生の葉面積は、実生を真上からデジタルカメラで撮影し、画像解析ソフト VH Analyzer (キーエンス社) を用いて計測した (図 18)。また、他殖であっても両親どうしが近縁個体である場合、近交弱勢が生じることがある。これを 2 親性近交弱勢 (biparental inbreeding depression) というが、本調査区においても種子散布距離が制限されているために (第 2 章第 2 節)、近くに分布するジェネットどうしが交配した場合には、この 2 親性近交弱勢が生じている可能性がある。そこで、交配ジェネット間の近縁度や物理的な距離と実生の葉面積との関係を検討した。2 ジェネット間の近縁度は、8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカー遺伝子型に基づき Wang (2002) の方法に従って推定した。推定には、解析ソフト



Mark 2.0 (Ritland 2004)を用いた。また、実生の葉面積に関しては、同じ交配組み合わせであっても実生によって葉面積のばらつきが大きかったため、信頼性を高めるために実生が3ジェネット以上ある交配組み合わせについてのみ検討した。

#### 2-2-7 ジェネットの近交度

近傍の異花型ジェネット数が少ないために、低密度地区に分布するジェネットの自殖率が高く、花粉親の多様性が低くなるならば、次世代および次々世代の近交度は高くなっていくと予想される。そのため、もしも現在の分布密度が前の世代から変わらないと仮定すると、現在、低密度地区で繁殖しているジェネットの近交度がすでに高くなっている可能性がある。そこで、8遺伝子座のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型から Lynch & Ritland (1999) による以下の式に従って各ジェネットの近交度を算出し、高密度と低密度地区に分布するジェネット間で比較した。

$$f = \frac{\delta_{ij} - p_i}{1 - p_i}$$

ここでの $\delta_{ij}$ とは、対象とする遺伝子座がホモ接合の場合は1、ヘテロ接合の場合は0となる値である。 $p_i$ とは、対象とする個体がある遺伝座において保有する2つの対立遺伝子のうち、任意に抽出した1個の対立遺伝子 $i$ の集団中の頻度である。個体の近交度 $f$ は、ホモ接合体の遺伝子座が多いほど高くなる。

## 2-3 結果

### 2-3-1 訪花率

トラマルハナバチの爪あとがついた花の割合から各ジェネットへの訪花率を推定したところ、高密度地区では平均  $73 \pm 26\%$  であったのに対して、低密度地区も全く同じ  $73 \pm 26\%$  であった(図 19)。Mann-Whitney の  $U$  検定を行ったところ、2 つのグループ間に有意差は認められなかったことから( $p=0.99$ )、高密度と低密度地区に分布するジェネット間で訪花率はそれほど大きく変わらないと考えられた。

### 2-3-2 種子生産量

高密度地区に分布するジェネットの平均結果率は 48%、低密度地区に分布するジェネットの平均結果率は 28% だった。Mann-Whitney の  $U$ -検定を行ったところ、低密度地区の結果率は、高密度地区と比べて有意に低かった(図 20a、 $p<0.05$ )。1 果実の平均種子生産量も、高密度地区で 38.90 であったのに対して、低密度地区は 25.31 と少ない傾向が認められた(図 20b、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p=0.06$ )。1 花あたりの種子生産量は、高密度地区に分布するジェネットが平均 18.58 であったのに対して、低密度地区に分布するジェネットは平均 7.89 と有意に少なかった(図 20c、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p<0.05$ )。

### 2-3-3 種子の生存能力

47 果実を発芽処理したところ、種子の平均発芽率と標準偏差は、 $91.1 \pm 3.3\%$  であ

り、大部分の種子が発芽した。しかし、低密度地区のジェネット 69 のように種子の発芽率が極端に低いジェネットも存在した(図 21)。ジェネット 69 が生産した種子の発芽率を果実ごとに見てみると、4 つの果実のうち 2 つは 100%種子が発芽したが、残りの 2 つはそれぞれ 17%と 14%しか発芽せず、そのためにこのジェネットが生産した種子は平均発芽率が低くなっていた。高密度と低密度地区に分布するジェネットの種子の平均発芽率は、それぞれ 93.24 %と 88.09 %であり、2 つのグループ間で有意な違いは認められなかった(図 21、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p=0.61$ )。

双葉展開時までの実生の生存率は、 $85.2 \pm 4.8\%$ (平均 $\pm$ 標準偏差)であり、発芽した大部分の実生は双葉展開時まで生き残った。しかし、低密度地区のジェネット 95 のように、双葉展開時までの実生の死亡率が高いジェネットも存在した。このジェネットでは次世代にアルビノを示すジェネットが 2 ジェネット観察された(図 22)ことから、自殖による近交弱勢が発現していると考えられた。双葉展開時までの生存率は、高密度地区で平均 88.97 %、低密度地区で平均 77.15 %だった。5%水準で有意な差は認められなかったが、低密度地区に分布するジェネットの方が双葉展開時までの生存率がやや低い傾向にあった(図 21、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p=0.07$ )。

発芽 1 ヶ月後までの生存率は、高密度地区で 81.39 %、低密度地区で 72.95 %であり、有意差は認められなかった(図 21、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p=0.22$ )。

#### 2-3-4 次世代の遺伝的多様性

父性解析した種子親 17 ジェネットのうち、5 ジェネットが生産した 8 果実から自殖由来の実生が 36 ジェネット観察された。自殖が観察された 8 果実のうち、1 果実は、双葉展開時までの死亡率が高く(図 21)、アルビノの実生が 2 個体観察された(図 22)ジェネット 95 が生産した果実であった。この果実内で生産され発芽した実生の大部

分は、途中で死亡したため、DNA を抽出することができず花粉親を特定できなかったが、同じ果実内で生産された種子が自殖由来だったことを考えると、途中で死亡した実生もおそらく自殖由来であり、近交弱勢の発現によって死亡したと考えられた。

高密度地区に分布するジェネットの平均自殖率が  $1.3 \pm 3.3\%$  であったのに対して、低密度地区に分布するジェネットの平均自殖率は  $36.7 \pm 43.2\%$  であった(図 23)。

Mann-Whitney の  $U$  検定を行ったところ、5%水準で有意差は認められなかったが ( $p=0.09$ )、低密度地区では高い自殖率を示すジェネットが数ジェネット観察された。

1 ジェネットが交配した花粉親の多様性( $D$ )は、高密度地区に分布するジェネットの平均が 0.57 だったのに対して、低密度地区のジェネットの平均は 0.18 と、低密度地区の方が有意に低かった(図 23、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p<0.05$ )。1 小花が受粉した花粉親の多様性( $D_{wf}$ )は、高密度地区に分布するジェネットで平均 0.33、低密度地区に分布するジェネットで平均 0.06 であり、低密度地区の方が有意に低かった(図 23、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p<0.05$ )。一方、小花間に見られる花粉親の多様性は、高密度地区の平均は 0.23、低密度地区の平均は 0.24 であり、両地区間で有意な違いは認められなかった(図 23、Mann-Whitney  $U$  検定、 $p=0.44$ )。

#### 2-3-5 近交弱勢

発芽 1 ヶ月後の実生の葉面積は、ジェネット間、ジェネット内ともに大きくばらついた(図 24)。他殖と自殖の両方が観察されたジェネット 3、5、20、95 を対象として、同一種子親が生産した他殖と自殖由来の実生の葉面積を比較したところ、自殖由来の実生は平均して他殖由来の実生の 3 割から 6 割の大きさしかなかった(図 24)。他殖と自殖の実生がそれぞれ 3 ジェネット以上あるジェネット 3、20、95 を対象として、Mann-Whitney の  $U$  検定を行ったところ、ジェネット 3 はサンプル数が少なかったため

有意ではなかったが( $p=0.09$ )、残りの2ジェネットについては自殖由来の実生の方が他殖由来の実生と比べて有意に葉面積が小さいことが分かった(ジェネット20、 $p<0.05$ ; ジェネット95、 $p<0.05$ )。

図24において、他殖由来の実生の平均値(図中白棒)と、他殖と自殖の両方の実生をあわせたときの平均値(図中横縞棒)を比較してみると、高密度地区のジェネットは自殖率が低いため両者の間にそれほど大きな差はないが、低密度地区のジェネットは自殖率が高いため他殖由来の実生のみを集めた場合と比べて、全実生の葉面積の平均値は大きく減少していた。しかしその一方で、低密度地区のジェネット106が生産した実生のように、自殖由来であるにもかかわらず他のジェネットの他殖由来の実生と同程度の大きさに育っているものも見つかった。そのため、低密度地区のジェネットのほうが高密度地区のジェネットよりも自殖率が高い傾向があるにもかかわらず、高密度地区と低密度地区で実生の葉面積に有意な差は見られなかった(Mann-Whitneyの $U$ 検定、 $p>0.999$ )。

次に、他殖由来の実生を対象として、両親間の近縁度と葉面積に相関が見られるか検討した。両親間の近縁度を8遺伝子座のマイクロサテライトマーカーでWang(2002)の式によって推定したところ、親子間や兄弟間に相当する $r=0.5$ 付近の組み合わせは見つからず、片親を共有する半兄弟どうしや祖父母と孫の関係に相当する $r=0.25$ 以上の組み合わせが2組、いとこどうしの関係に相当する $r=0.125$ 以上の組み合わせが6組見つかった。このうち、実生の葉面積を3ジェネット以上計測できた組み合わせは $r=0.125$ 以上に相当する3組み合わせしかなかった。こうして得られた両親間の近縁度と実生の葉面積との関係を見てみたところ、特に両者の間に相関は認められなかった(図25上)。同様に、両親間の距離と実生の葉面積とも相関は認められず(図25下)、この傾向は種子親ごとに見てみても同じであった。

#### 2-3-6 ジェネットの近交度

現在調査区内で繁殖しているジェネットを対象として、ジェネットの近交度を Lynch & Ritland(1999)の式を用いて推定したところ、平均値と標準偏差は $-0.18 \pm 0.42$ であり、 $-1.061$  から  $0.73$  までとジェネットによって大きくばらついた。Mann-Whitney の  $U$  検定を行ったところ、高密度地区と低密度地区でジェネットの近交度に 5%水準で有意な違いは認められなかった( $p=0.09$ )。しかし、両地区のヒストグラムを見てみると、低密度地区に分布するジェネットの方は、近交度が高い方向にピークがずれており、ジェネットの近交度が高い傾向が認められた(図 26)。

### 2-4 考察

#### 2-4-1 空間構造が受粉される花粉の質に及ぼす影響

低密度地区に分布するジェネットは、種子生産や花粉親の多様性が有意に低かった(図 20、23)。高密度地区と低密度地区に分布するジェネット間で、訪花率に大きな違いが認められなかった(図 19)ことから、この違いは、単に訪花回数による受粉量の違いを反映しているのではなく、受粉される花粉の質を反映していると考えられた。すなわち、高密度地区では、まわりに異花型ジェネットが多数分布しているため、花粉の持ち越しにより 1 回の訪花でも複数の親に由来する花粉を受粉することができる。一方、低密度地区では、近傍の異花型ジェネットが少ないために、マルハナバチによって訪花されても異花型ジェネットからの花粉が受粉されなかったり、受粉されても少数の親に由来する花粉しか受粉されないと考えられた。

このような受粉される花粉の質の違いは、自殖率にも少なからず影響していると考えられる。今回の研究では、5%水準で有意な違いは認められなかったが、低密度地区に分布するジェネットの自殖率が高い傾向にあった(図 23)。低密度地区のジェネット 69 と 95 が生産した種子は、生育の初期段階で死亡率が高く、全体的にも低密度地区のジェネットが生産した種子は、双葉展開時までの生存率が低い傾向にあった(図 21)。今回の実験では、発芽 1 ヶ月後まで生存していた実生のみを対象として花粉親を特定したため、生育の初期に死亡した実生の中に近交弱勢によって死亡したものが含まれていた場合には、実際よりも自殖率を過小評価している可能性が高い。両地区間で自殖率に有意差が認められなかった理由としては、このような近交弱勢による生育初期の高い死亡率が関与している可能性が考えられた。いずれにしても、異型花柱性という繁殖システムを持ち、典型的な他殖性植物であると考えられてきたサクラソウにおいても、実際には全体の 1 割近くも自殖由来の実生が存在しており、その自殖率には近傍の異花型ジェネット密度が影響していることが示唆された。

#### 2-4-2 空間構造がジェネットの適応度に及ぼす影響

自殖由来の実生は、同一種子親が生産した他殖由来の実生と比べて葉面積の平均値が 4 割から 7 割も減少しており、強い近交弱勢の発現が認められた。このように近交弱勢が強いにも関わらず、高密度地区のジェネットは自殖率そのものが低いため、他殖と自殖の両方の実生をあわせたときの葉面積の平均値と、他殖のみの実生の葉面積の平均値との間にそれほど大きな違いは生じなかった(図 24)。その一方で、低密度地区のジェネットは自殖率が高いため、他殖由来の実生のみを集めた場合と比べて、全実生の葉面積の平均値は大きく減少していた(図 24)。このことから、低密度地区に分布するジェネットは近交弱勢の発現によって、ジェネットの適応度が低下

すると考えられた。低密度地区のジェネットは、1 花あたりの種子生産量の平均が高密度地区のジェネットの半分以下であるため、種子生産量も考慮に入れると低密度地区のジェネットの適応度はさらに低くなると考えられた。

また、低密度地区のジェネット 106 が生産した実生のように、自殖由来であるにもかかわらず他のジェネットの他殖由来の実生と同程度の大きさに育っているものも見つかった(図 24)。このようなジェネットが観察された理由としては、初期成長そのものに遺伝的な変異があるという可能性に加えて、種子親の近交度が関わっている可能性が考えられる。なぜなら、自殖したとしても種子親の近交度が低ければ、次世代で同じ祖先に由来する有害な突然変異がホモ接合になる確率が低いからである。そこで、ジェネットの近交度を比較してみたところ、ジェネット 106 では-0.107 と低かったのに対して、強い近交弱勢が認められたジェネット 20 と 95 ではそれぞれ 0.145 と 0.100 と高い傾向にあった。この結果から、ジェネットの近交度が次世代の成長程度に影響していると結論することはできないが、その可能性は否定できないと考えられた。

#### 2-4-3 空間構造が遺伝構造に及ぼす影響

本研究により、ハヶ岳集団では 20m 以内に分布する異花型ジェネット数が少ない場合、自殖率が高くなり、花粉親の多様性が低くなることが示唆された。このような交配パターンは、次世代および次々世代での近交度を高めると考えられる。しかし、通常野外の環境下では、近交弱勢がより強く働く(Levin 1984)。そのため、制御環境下においてさえも近交弱勢が強く発現した自殖由来の実生が、野外で生存する可能性は低い。よって、自殖によって次の繁殖世代の近交度が急激に高まる可能性は低いと考えられる。

一方、花粉親の多様性が低い場合、あるジェネットの次世代集団は全兄弟どうしに



なる確率が高くなる。サクラソウの通常の種子散布距離は短いため、花粉親の多様性が低い場合には次の世代で近親交配が起こりやすくなり、次々世代の近交度が高くなると予想される。残念ながら、交配ジェネット間の近縁度が高い場合の実生の葉面積が十分に計測できなかったため、それほど信頼性が高いデータであるとはいえないが、少なくとも今回の結果からは2親性近交弱勢が存在するという証拠は得られなかった。そのため、花粉親の多様性が低い低密度地区においては、次々世代の適応度がそれほど大きく低下することなく、繁殖ジェネットの近交度が徐々に高まっていくと考えられる。

実際に、現在繁殖しているジェネットの近交度を比較したところ、低密度地区に分布するジェネットは近交度が高い傾向が認められた(図 26)。現在低密度地区で繁殖しているジェネットの親も、同じように低密度な状態で繁殖していたという証拠はないが、この近交度の高まりは前世代の交配パターンを反映していると考えられた。

### 第3章のまとめ

本章では、父性解析を行い、今現在生じている花粉流動を把握するとともに、花粉流動を規定する要因を特定することを目的とした。

第1節では、サクラソウ局所集団内のジェネット間に見られる開花フェノロジーの幅広い変異に着目し、開花フェノロジーが花粉の散布距離や次世代の近交度に及ぼす影響について解析した。その結果、近傍の異花型ジェネットと開花期がずれることによって花粉の長距離散布が生じやすくなることが明らかとなった。このような花粉の散布距離の変動は、近傍に分布する近縁ジェネットとの交配確率にも影響し、予想さ

れた次世代のヘテロ接合度は開花フェノロジーに変異がある場合のほうが高かった。このことから、開花フェノロジーのジェネット間変異があることによって、局所集団内の遺伝的多様性が高く維持されている可能性が示唆された。

第 2 節では、遺伝子流動を、種子生産量から実生の定着までを含めたより総合的な観点から解析し、近傍の異花型ジェネット数が遺伝子流動を介して、遺伝構造にどのような影響を及ぼしているのかについて考察した。その結果、近傍の異花型ジェネットが少ない低密度地区に分布するジェネットは、高密度地区のジェネットと比べて、種子生産量と花粉親の多様性が低く、自殖率が高い傾向が認められた。花粉親の多様性が低く、自殖率が高い場合には、次世代の近交度が高まるため、空間的な遺伝構造が形成されやすいと考えられるが、自殖由来の実生に強い近交弱勢の発現が認められたため、自殖によって急激に近交度が高まるとは考えられず、近縁ジェネット間の交配によってゆるやかに近交度が高まっていくと予想された。

以上の結果から、サクラソウの局所集団内では開花フェノロジーと空間構造によって、花粉による遺伝子流動が大きく規定されており、この 2 つの要因によって遺伝構造の生じやすさが局所的に異なることが分かった。

## 第4章 総合考察

本研究では、自生地内保全を進めるための基礎的な知見を得ることを目的として、日本の野生生物の中で最も多くの生態学的情報を蓄積しているサクラソウをモデル植物とし、自然集団内における遺伝構造の形成過程の解明を試みた。

その結果、核 DNA では、沢間、沢内ともに遺伝的にはほとんど分化しておらず、複数の沢沿い集団から構成されるサクラソウの地域集団は、遺伝的には分集団構造を持たないひとつの大きな繁殖集団として存在していることが分かった。このような遺伝構造が観察された理由としては、沢の増水時に、上流から下流部へと種子やクローン成長器官が稀に長距離移動していたり、花粉による遺伝子流動が沢間・沢内ともに比較的頻繁に生じているなど、サクラソウの遺伝子流動の範囲が従来考えられていたよりも広い範囲で生じているためと考えられた。

次に、花粉による遺伝子流動の実態を把握するために父性解析を行ったところ、サクラソウ集団では開花フェノロジーとジェネットの空間構造によって、花粉による遺伝子流動が大きく規定されており、この 2 つの要因によってジェネット間においても、またジェネット内の小花間においても様々な近交度を持つ次世代が生み出される過程を明らかにすることができた。これにより、サクラソウ集団では開花フェノロジーと空間構造によって、空間的な遺伝構造の生じやすさが局所的に異なることが分かった。

総合考察では、まず遺伝構造から推定された過去に生じた遺伝子流動の姿と父性解析から推定された現在の遺伝子流動の姿とを合わせることによって、遺伝子流動の様相について総合的に考察する。次に、景観や開花フェノロジー、ジェネット密度が遺伝子流動を介して遺伝構造に及ぼす影響について論述し、それらの生態的要因が変化した際に予想される遺伝構造の姿について考察する。最後に、本研究で得られた結

果に基づき、サクラソウ集団を保全するための方策について論議する。

#### 4-1 サクラソウ自然集団内における花粉による遺伝子流動

遺伝構造から過去に生じた遺伝子流動を間接的に推定したところ、花粉は沢間、沢内ともに十分移動していることが推定された。一方、父性解析を行い、現在生じている花粉流動を直接推定したところ、大部分の花粉流動は 20m 以内で生じていることが分かった。演習林内を隣接して流れる沢間の最短距離は 40～270m である。父性解析の結果からは、沢間で花粉流動が頻繁に生じるとはいえないと考えられた。

沢間で生じていると推定された花粉流動の程度は、間接推定の方が直接推定で推定されたよりもはるかに高いものだった。この矛盾が生じた理由としては、少なくとも 3 つの仮説が考えられる。1 つ目は、マイクロサテライトマーカーの自然突然変異率が  $10^{-2}$ ～ $10^{-5}$  と高いために、間接推定された移住個体数が過大評価された可能性が挙げられる (Hedrick 1999)。遺伝構造から遺伝子流動の程度を推定する際には、“突然変異率が無視できるほど小さい”ことを仮定するが、マイクロサテライトマーカーは突然変異率が高いため、遺伝的な分化程度が実際よりも低く見積もられる傾向がある (Hedrick 1999)。その結果、移住個体数が実際よりも過大評価されたのかもしれない。2 つ目の仮説は、世代時間が長いことが影響している可能性が考えられる (Loveless and Hamrick 1984)。サクラソウはクローン成長するため、ジェネットの寿命が長く一生のうちに何度も交配できる。そのため、1 年あたりの花粉による移住率が低くても、1 世代で考えれば相当な量の移住が生じうると考えられる。もしそうならば、遺伝的な分化は生じにくいだろう。3 つ目は、沢沿い集団の有効サイズが大きいことが挙げられる。集団間の遺伝的な分化は、集団の有効サイズが小さいほど、また集団間の移住率が低いほど速く進む。今回の結果から、1 つの沢沿い集団内では、沢にそって種子が移動

したり、開花期が近傍の異花型ジェネットとずれることによって花粉の散布距離が長くなることが示された。このような比較的長距離で生じる遺伝子流動は、沢沿い集団の有効サイズを大きく維持する方向に働き、沢間が遺伝的に分化することを抑制していると考えられる。

#### 4-2 生態的要因が変化した場合の遺伝構造の変化

生物多様性のひとつを構成する集団内の遺伝的多様性を自生地内保全するためには、集団の縮小や、景観の改変、ポリネーターの消失、気候変動に伴う開花フェノロジーの変化、個体密度の減少などが遺伝構造に及ぼす影響を予測する必要がある。しかし、従来の保全遺伝学では、様々な生態的要因によって遺伝構造が形成される複雑なプロセスを簡略化させ、ヘテロ接合度の減少速度のみに着目し、それを任意交配する集団、すなわち空間構造や開花フェノロジーの変異が全くない非現実的な集団の個体数で表現している例が多い(例えば、Frankham *et al.* 2004)。すなわち、全ての生態的要因の効果を、集団サイズと遺伝的浮動の効果で説明しようとしてきたのである。そのため、個々の生態的要因が変化した場合の遺伝構造の変化に対しては、知見が不足している。

本研究は、このような保全遺伝学の問題点を解決するために、サクラソウ集団を対象として景観や開花フェノロジー、ジェネット密度といった生態的要因が遺伝子流動を介して遺伝構造に及ぼす影響を解析した。その結果、サクラソウ集団では沢間での種子の移動は制限されているが、沢の増水時に沢に沿って種子の長距離散布が生じていることが分かり、沢という景観が葉緑体 DNA の空間的遺伝構造の形成に大きく影響していることが分かった(図 5)。さらに、このような種子の長距離移動は、沢沿いに成立する分集団間の遺伝的分化を抑制し、分集団内の遺伝的多様性を維持する働きがあ

と考えられた。つまり、川や沢はサクラソウ集団をつなぐネットワークとして機能していると考えられる。しかし、現存するサクラソウ集団の中には、サクラソウが流されないように水路をコンクリートや木の枠で固定している光景がしばしば見られる。このような管理は、確かに必要な場合もあるが、分集団間のネットワークを破壊し、かえって遺伝的多様性を消失させている可能性がある。サクラソウのように水辺に生息する植物を保全するためには、増水時に沢の氾濫が可能となるような水路づくりが必要である。

次に、サクラソウ集団内のジェネット間に見られる開花フェノロジーの幅広い変異に着目し、開花フェノロジーが花粉の散布距離を介して、遺伝構造に及ぼす影響について解析したところ、特に低密度地区に分布するジェネットでは、近傍のジェネットと開花期がずれることによって花粉の長距離散布が促進されることが分かった。このような花粉の散布距離の変化は、次世代の近交度にも影響し(図 16)、開花フェノロジーに変異がある場合のほうが、予測された次世代のヘテロ接合度が有意に高かった。このことは、開花フェノロジーの変異があることによって、集団内の遺伝的多様性が高く維持されていることを示唆している。よって、温暖化などによって開花フェノロジーのジェネット間変異が小さくなった場合には、花粉の長距離散布が制限されるためにヘテロ接合度が減少すると考えられた。

さらに、本研究の結果から、近傍の異花型ジェネット数が少ないと、花粉親の多様性が減少することが分かり(図 23)、低密度地区に分布するジェネットでは、次の世代で近親交配が促進され、次々世代での近交度が上昇すると予測された。しかし実際には、次の世代での近親交配の生じやすさは、近傍に分布する近縁ジェネットとの開花期の一致具合によって異なり、近縁ジェネットと開花期がずれた場合には近親交配が回避され、次々世代での近交度の上昇も生じないと考えられた。本研究では、特に低密度地区において、開花フェノロジーの変異があることによって受粉する花粉の散布距離が長くなる小花が多く観察された(図 14)ことから、少なくとも調査した局所集団では開

花フェノロジーの変異があることによって、近交度の上昇が抑制され、集団全体のヘテロ接合度が高く維持されていると考えられた。この点からも集団中の開花フェノロジーの変異が保たれることの重要性が支持された。

また、本研究の結果からは、サクラソウの花粉の散布距離が従来考えられていたよりも長いことが示され、行動範囲の広いトラマルハナバチによる訪花がサクラソウ集団の遺伝的多様性を維持するうえで重要であることが示唆された。トラマルハナバチがコロニーを形成・維持するためには、巣穴を提供するネズミなどの小動物や、春から秋にかけて次々と蜜や花粉を提供する多数の植物種を必要とする(鷺谷 1998)。そのため、トラマルハナバチによって訪花される状況を維持するためには、トラマルハナバチだけを保全するのではなく、ネズミなどの小動物や他の植物種をも保全していく必要がある。つまり、サクラソウ集団の遺伝的多様性を自生地内保全していくためには、地域の生態系全体を保全していくことが極めて重要であるといえる。

#### 4-3 保全への指針

##### 4-3-1 現存するサクラソウ集団を自生地内保全するための指針

本研究によって、サクラソウの遺伝子流動の範囲が従来考えられていたよりも広い範囲で生じており、それによりサクラソウの地域集団は、遺伝的には分集団構造を持たないひとつの大きな繁殖集団として存在していることが分かった。このように、分集団内の遺伝的多様性が高い集団では、ヘテロ接合度が高いために個体の生存率を低下させる弱有害遺伝子が蓄積しやすい(Frankham *et al.* 2004)。実際に、本研究においても生育の初期段階にかなり強い近交弱勢が発現することが示された。このように、弱有害遺伝子を多く蓄積する集団では、集団が急激に縮小したり、分集団間の遺伝子流動

が制限された場合には、遺伝的要因によって衰退する危険性がある。

本城(2005)が調査した全国に分布する 63 のサクラソウ集団のうち、八ヶ岳集団のように 100 ジェネット以上からなる集団はわずかに 18 しか存在しておらず、10~100 ジェネット存在する集団が全体の 35%、10 ジェネット以下の集団が 37% も占めていた。以前から、異型花柱性のサクラソウでは、ジェネット数が 10 ジェネット以下と極端に減少した場合、花型比が偏ることによって繁殖に支障が出ることが指摘されている(Matsumura & Washitani 2000)。しかし、本研究によって明らかになったサクラソウ本来の遺伝構造を考慮すると、たとえ 30 以上のジェネットが存在し、花型比にも顕著な偏りが見られない集団であっても、外からの遺伝子流動が完全に制限されている場合には、近交弱勢の発現によって集団の存続が危うくなる危険性があると考えられた。

また、本研究の結果から、近傍の異花型ジェネット数が少ないジェネットは、種子生産量の低下や近交弱勢によって適応度が低下することが分かった。調査した局所集団では、低密度地区に分布するジェネット数が少ないため、観察された適応度の低下が局所集団全体の増殖率に大きな影響を及ぼすとは考えられなかったが、集団全体の個体密度が低い場合には空間構造の影響によって、集団全体の増殖率が左右される可能性がある。

従って、サクラソウのような他殖性植物を自生地内保全するためには、集団内のジェネット数だけに注意を払うのでは不十分であり、ジェネット密度、特に花粉流動が頻繁に生じる範囲内に分布する交配相手数が減らないようにすべきである。具体的にどの範囲内の交配相手数に注意すべきなのかについては、今後さらに検討する必要があるが、本研究の結果からは、八ヶ岳のサクラソウ集団においては 20m 以内に分布する異花型ジェネット数が 10 ジェネット以下になるとジェネットの適応度が減少することが示された。

以上に述べた遺伝的要因による集団の衰退が、残存するサクラソウ集団においてど



の程度顕在化しているのかについては、今後確かめる必要があるが、そのような証拠が得られた際には、遺伝的多様性を高めるような管理を行う必要がある。サクラソウの遺伝構造から推察すると、土壤中で発芽しないまま生存し続ける種子集団、すなわち土壌シードバンクには、かつてその集団が広範囲で交配を行っていたころの遺伝的多様性が保存されている可能性が高い。特に、通常の花粉の散布範囲が半径約 20m 以内であることを考慮すると(図 13)、40m おきに土壌シードバンクを掘り起こして種子を発芽させれば、異なる花粉プールに属する遺伝的変異に富んだ次世代集団を得ることができると期待される。そのため、シードバンクからの新規ジェネットの導入は、積極的にすすめるべきである(鷲谷・矢原 1996)。サクラソウ種子の休眠性の程度や休眠する際の条件等については、現在研究が進められているところであるが、おそらく数十年間は休眠すると考えられているため、このようなシードバンクの利用はサクラソウ集団の保全において非常に有効であろう。また、サクラソウ集団は沢沿いに形成されることが多いため、保全の対象となる集団も沢沿いに分布していることが多い。もしもそのような集団の上流部に他の集団が存在している場合には、現在は遺伝的な交流はなくても、かつては種子やクローン成長器官の移動によって遺伝的な交流が行われていた可能性が高い。そのためそのような集団が存在している場合には、相互に種子や株の移動を行ったとしても遺伝的攪乱が生じる可能性は少ないと考えられる。

#### 4-3-2 ハヶ岳演習林内に自生するサクラソウ地域集団を保全していくための指針

本研究の結果から、ハヶ岳演習林に自生するサクラソウ集団には、十分な数のジェネットが分布しており、高い遺伝的多様性が維持されていることが分かった。そのため、本調査集団において、遺伝的要因により個体群が急速に衰退する危険性は低いと考えられる。しかし、図 2 から明らかなように、演習林周辺の景観はこの数十年で、連続し

た森林から畑や牧場へと急激に変化しており、それに伴い、沢の流量や土壌水分なども少なからず変化していると考えられる。特に、上流部にあたる演習林西側に沿って設置された U 字溝は、演習林内を乾燥化させる方向に働くのではないかと推察される。実際に、沢に沿って歩いてみると、沢の水が涸れている箇所が多数観察され、そのような箇所は大雨が降ったときだけかろうじて水が流れるという状況であった。このような沢の流量の変化は、湿った土壌を好むサクラソウの生育に負の影響を及ぼすだけでなく、長期的には種子の長距離散布を制限することによってサクラソウの遺伝構造になんらかの影響を及ぼす可能性がある。ハヶ岳演習林内のサクラソウを保全していくためには、トラマルハナバチのコロニーが維持されるように注意するとともに、冠水頻度を記録するなど、沢の流量や増水頻度などにも注意する必要があるだろう。

#### 4-4 結論

以上、本研究では、サクラソウの遺伝構造を把握するとともに、遺伝子流動を規定する様々な生態的要因についても明らかにした。その結果、サクラソウ集団の遺伝的多様性を維持するためには、沢の増水によって生じる種子の長距離散布や花粉の長距離散布が生じる必要があることが示された。このような長距離での遺伝子流動が生じる環境を保障するためには、沢が稀に増水する自然環境や、行動範囲の広いトラマルハナバチによる受粉、および花粉の長距離散布を促進するジェネット間の開花フェノロジーの幅広い変異を維持する必要があるといえる。つまり、サクラソウ集団をその遺伝的多様性も含めて保全していくためには、サクラソウ集団だけを維持・管理するだけでは不十分であり、多様な植生や景観から構成される生態系全体を保全することが重要であるといえる。

## 摘要

生物多様性のひとつを構成する個体群内の遺伝的多様性を自生地内保全するためには、個体群の縮小や、景観の改変、ポリネーターの消失、気候変動に伴う開花フェノロジーの変化、個体密度の減少などが遺伝構造に及ぼす影響を予測する必要がある。このうち、個体群の縮小については研究が進んでいるが、それ以外の影響についてはほとんどわかっていない。その原因として、従来の保全遺伝学が、遺伝構造が形成される複雑なプロセスには目を向けずに、様々な生態的要因の効果を有効な個体群サイズと遺伝的浮動の効果のみで説明しようとしてきたことにある。このような単純化は、生物学的な実態に乏しく、特に植物個体群の適応に深く関わる遺伝子型の空間分布に対しては何の情報も与えない。そのため、個々の生態的要因が変化した際の遺伝構造の変化に対しては、知見が不足している。

サクラソウ (*Primula sieboldii* E. Morren) は、北海道から九州までの草原や落葉樹林の林床に生育する多年生草本である。柱頭が葯より高い位置にある長花柱花と低い位置にある短花柱花を咲かせる個体が存在し、お互いの花粉が送粉されないと受精しない典型的な虫媒他殖性の植物である。また近年、生息地の開発や園芸目的の採集などにより個体数が減少し、絶滅危惧Ⅱ類に分類されている。残存する個体群でも一部で、ポリネーターや異花型個体の消失が原因と考えられる種子生産の低下や自殖率の増加が報告されている。サクラソウはクローン成長するため、種子生産が低下しても個体群がすぐに絶滅することはないが、異花型個体からの他家受粉が強く制限され続ければ、個体群内の遺伝的多様性が低下し、絶滅する危険性が高まると予測されている。そこで、本研究では、自生地内保全を進めるための基礎的な知見を得ることを目的として、サクラソウ自然個体群内における遺伝構造の形成過程の解明を試みた。

まず、ハヶ岳演習林内のサクラソウ地域集団の遺伝構造を明らかにしたところ、種子の動きを反映する葉緑体 DNA 多型のハプロタイプの出現頻度が、沢沿いの集団間で大きく異なっていることが分かった(図 5、表 6)。一方、種子と花粉の両方の動きを反映するマイクロサテライトマーカーでは、沢間で遺伝的にほとんど分化しておらず(表 6)、複数の沢沿い集団から構成されるサクラソウの地域集団は、遺伝的には分集団構造を持たないひとつの大きな繁殖集団として存在していることが分かった。このような遺伝構造が観察された理由としては、従来考えられていたよりもかなり広い範囲で遺伝子流動が生じているためと考えられた。すなわち、沢の増水時に種子やクローン成長器官が稀に長距離移動することや、花粉による遺伝子流動が沢間で比較的頻繁に生じていることが、遺伝的な分化を抑制し、沢沿い集団内の遺伝的多様性を高く維持していると考えられた。

次に、父性解析を行い、開花フェノロジーが花粉の散布距離や次世代の近交度に及ぼす影響を調査した。その結果、近傍の異花型個体と開花期がずれることによって花粉の長距離散布が生じやすくなることが明らかとなった(図 14、15)。このような花粉の散布距離の変動は、近傍に分布する近縁個体との交配確率にも影響し、予想された次世代のヘテロ接合度は開花フェノロジーに変異がある場合のほうが高かった。このことから、開花フェノロジーの個体間変異があることによって、個体群内の遺伝的多様性が高く維持されている可能性が示唆された。

さらに、遺伝子流動を、種子生産量から実生の定着までを含めたより総合的な観点から解析したところ、20m 以内に異花型個体が少ないジェネットは、多いジェネットと比べて、種子生産量と交配相手数が少なく、自殖率が高い傾向が認められた(図 20、23)。このような交配は、次世代の近交度を高め、空間的な遺伝構造の形成を促進すると考えられる。しかしながら、自殖由来の実生には、強い近交弱勢が認められたため(図 24)、自殖によって急激に近交度が高まるとは考えられず、近縁個体間の

交配によってゆるやかに近交度が高まっていくと予想された。

本研究の結果から、サクラソウ個体群の遺伝的多様性を維持するためには、沢が稀に増水する自然環境や、行動範囲の広いトラマルハナバチによる受粉、および開花フェノロジーの幅広い個体間変異を維持し、長距離での遺伝子流動が生じる環境を保障することが重要であることが示された。このように遺伝構造が形成される過程を理解することにより、具体的な保全策を構築することができる。

## 謝辞

本研究の計画、遂行および取りまとめにあたり、筑波大学大学院生命環境科学研究科助教授 大澤 良博士には、終始懇切な指導と多大な助言を頂きました。ここに深堪なる謝意を表します。本研究および本論文の取りまとめに関しまして、ご指導いただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 西村繁夫博士に深く感謝いたします。また、本研究の計画、遂行および取りまとめにあたり、森林総研研究所ゲノム解析室長 津村義彦博士、東京大学大学院農学生命科学研究科教授 鷲谷 いくみ博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科講師 半田 高博士には、多大なご助言をいただきました。心よりお礼申し上げます。元筑波大学教授 生井兵治博士には、多くの有益なご助言を頂きました。ここに謹んで感謝の意を表します。

遺伝的多様性の解析や論文の取りまとめに関しましては、森林総研研究所 上野 真義博士に、また交配過程を記述するモデルの構築に関しては、国立環境科学研究所 竹中明夫博士に終始丁寧なご指導と多大なご助言を頂きました。心よりお礼申し上げます。

八ヶ岳演習林における研究遂行に際して、元筑波大学大学院生命環境科学研究科助教授 内田煌二博士、ならびに筑波大学大学院生命環境科学研究科講師 黒田吉雄博士には、ご助言をいただくとともに測量用具や実験器具を提供して頂きました。ここに心からの感謝の意を表します。八ヶ岳演習林における調査区の設定と開花フェノロジーの調査時には、筑波大学植物育種学研究室の古賀 篤氏に多大なご協力を頂きました。また、葉のサンプリング時には、筑波大学植物育種学研究室の本城 正憲博士、坂田清華氏、井門健太氏、中谷智恵氏、吉岡洋輔氏、小林喜和氏、石内 美沙紀氏、岩田麻氏、吉田康子氏、李春花氏の皆様に多大なご協力を頂きました。

特に本城正憲博士には、様々な場面におけるご協力とご助言、そして常に暖かい励ましを頂きました。この場をお借りして心よりお礼申し上げます。

東京大学保全生態学研究室の西廣 淳博士、安島美穂博士、掃部(松村)千鶴博士、永井(川上)美穂子氏、国立環境科学研究所 石濱史子博士からは、サクラソウの生態について大変有益な情報を提供していただきました。

また、筑波大学生命環境科学等支援室 白井靖子技術専門職員ならびに植物育種学研究室の皆様、森林総合研究所ゲノム解析室および生態遺伝研究室の皆様、中央農業総合研究センターの岩田洋佳博士、統計数理学研究所の島谷健一博士には、研究を遂行する上で多くのご協力とご助言、あたたかい励ましを頂きました。謹んで感謝の意を表します。この全ての皆様のご協力、ご助言なくしては、本研究は決して遂行することができませんでした。この場をお借りして、改めて厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Aigner, P. A. (2004) Ecological and genetic effects on demographic processes: pollination, colonality and seed production in *Dithyrea maritima*. *Biological Conservation*, **116**, 27-34.
- Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, **19**, 716-723.
- Allendorf, F. W. (1983) Isolation, gene flow, and genetic differentiation among populations. In: *Genetics and Conservation* (Eds, Christine, M. S. C., Steven, M. C., Bruce, M. and Lawrence, W. T.), pp. 51-65, The Benjamin/Cummings publishing company, Inc., California.
- Bacles, C. F. E., Lowe, A. J. and Ennos, R. A. (2004) Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Molecular Ecology*, **13**, 573-584.
- Barrett, S. C. H. (1977) The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist*, **78**, 209-220.
- Birky, C. W. J., Maruyama, T. and Fuerst, P. (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513-527.
- Burczyk, J., Adams, W. T. and Shimizu, J. Y. (1996) Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon.) stand. *Heredity*, **77**, 251-260.
- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**,



237-268.

- Dieringer, G. (1991) Variation in individual flowering time and reproductive success of *Agalinis strictifolia* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, **78**, 497-503.
- 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.
- El Mousadik A. and Petit, R. J. (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**, 832-839.
- Ellstrand, N. C. (1992) Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *OIKOS*, **63**, 77-86.
- Ennos, R. A. (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- Epperson, B. K., and Clegg, M. T. (1986) Spatial-autocorrelation analysis of flower color polymorphisms within substructured populations of morning glory (*Ipomoea purpurea*). *The American Naturalist*, **128**, 840-858.
- Estoup, A., Jarne, P. and Cornuet, J. M. (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **11**, 1591-1604.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. and Quattro, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- FAO (1996) *Report on the state of the world's plant genetic resources*. Commission on genetic resources for food and agriculture, CGRFA-EX-2/96/2, p. 511.

- Fenster, C. B. (1991) Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) II. Gene establishment. *Evolution*, **45**, 410-422.
- Fisher, R. A. (1930) *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford, p. 291.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. (2004) *A primer of conservation genetics*. Cambridge university press, Cambridge, p. 234.
- Goudet J (1995) FSTAT version 1.2: A computer program to calculate *F*-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486.
- Hamilton, M. B., Pincus, E. L., Di Fiore, A. and Fleischer, R. C. (1999) Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, **27**, 500-507.
- 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.
- Handell, S. N. and Mishkin, J. L. V. (1984) Temporal shifts in gene flow and seed set: evidence from an experimental population of *Cucumis Sativus*. *Evolution*, **38**, 1350-1357.
- Hauser, T. P., Damgaard, C. and Loeschcke, V. (1994) Effects of inbreeding in small plant populations: Expectations and implications for conservation. In: *Conservation genetics* (Eds, Loeschcke, V., Tomiuk, J. and Jain, S. K.), pp. 115-129, Birkhauser Verlag, Germany.
- Hedrick, P. W. (1999) Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53**, 313-318.

- 本城正憲 (2005) サクラソウ集団における遺伝的多様性の保全に関する分子生態遺伝学的研究. 筑波大学大学院生命環境科学研究科 博士論文, p. 154.
- Honjo, M., Ueno, S., Tsumura, Y., Washitani, I. and Ohsawa, R. (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation*, **120**, 215-224.
- Isagi, Y., Honjo, M. and Washitani, I. (2001) Development of microsatellite markers for *Primula sieboldii* using degenerate oligonucleotide-primed PCR-amplified DNA. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 22-24.
- Isagi, Y., Kanazashi, T., Suzuki, W., Tanaka, H. and Abe, T. (2000) Microsatellite analysis of the regeneration process of *Magnolia obovata*. *Heredity*, **84**, 143-151.
- Ishihama, F., Nakano, C., Ueno, S., Ajima, M., Tsumura, Y. and Washitani, I. (2003) Seed set and gene flow patterns in an experimental population of an endangered heterostylous herb with controlled local opposite-morph density. *Functional Ecology*, **17**, 680-689.
- IUCN (1992) Conservation on Biological Diversity and Agenda 21, *Programme of Action for Sustainable Development*, Chapters 14 and 15.
- Kakishima, M., Yamazaki, Y., Okayama, Y. and Washitani, I. (1995) *Urocystis tranzscheliana*, a newly recorded smut fungus on *Primula sieboldii* from Japan. *Mycoscience*, **36**, 239-241.
- 環境庁 (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—植物 (維管束植物) . 環境庁, 東京, p. 660.
- Kennedy, W. J. J. and Gentle, J. E. (1980) *Statistical Computing*. Marcel Dekker Inc.,

New York, p. 591.

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

Kitamoto, N., Honjo, M., Ueno, S., Takenaka, A., Tsumura, Y., Washitani, I. and Ohsawa, R. (2005) Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing beside separate streams. *Molecular Ecology*, **14**, 149-157.

北本尚子, 上野真義, 津村義彦, 鷺谷いづみ, 大澤良 (2005) 絶滅危惧植物サクラソウ (*Primula sieboldii*) におけるマイクロサテライトマーカーの開発. 保全生態学研究, **10**, 47-51.

Kudoh, H. and Whigham, D. F. (1997) Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. *American Journal of Botany*, **84**, 1285-1293.

Levin, D. A. (1975) Spatial segregation of pins and thrums in populations of *Hedyotis nigricans*. *Evolution*, **28**, 648-655.

Levin, D. A. (1981) Dispersal versus gene flow in plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **68**, 233-253.

Levin, D. A. (1984) Inbreeding depression and proximity-dependent crossing success in *Phlox drummondii*. *Evolution*, **38**, 116-127.

Levin, D. A. and Kerster, H. W. (1968) Local gene dispersal in *Phlox*. *Evolution*, **22**, 130-139.

Lewis, P. O. and Zaykin, D. (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. Free program distributed by the authors over the Internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>.

- Loveless, M. D. and Hamrick, J. L. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65-95.
- Lynch, M. and Ritland, K. (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular makers. *Genetics*, **152**, 1753-1766.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. and Taberlet, P. (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 189-197.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220.
- 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.
- Matsumura, C. and Washitani, I. (2000) Effects of population size and pollinator limitation on seed-set of *Primula sieboldii* populations in a fragmented landscape. *Ecological Research*, **15**, 307-322.
- Matsumura, C. and Washitani, I. (2002) Heterostylous morph differences in pollen transfer and deposition patterns in *Primula sieboldii* on a visitation by a queen bumblebee, measured with a semi-natural experimental system. *Plant Species Biology*, **17**, 1-12.
- Maynard, S. (1989) *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press, Oxford, p. 354.
- McCauley, D. E. (1994) Contrasting the distribution of chloroplast DNA and allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: Implications for studies of gene flow in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 8127-8131.

- Meagher, T. R. (1986) Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum* I. Identification of most-likely male parents. *The American Naturalist*, **128**, 199-215.
- Mulcahy, D. L. (1967) Optimal sex ratio in *Silene alba*. *Heredity*, **22**, 411-423.
- Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**, 4321-4325.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, p. 512.
- Nishihiro, J., Washitani, I., Thomson, J. D. and Thomson, B. A. (2000) Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Functional Ecology*, **14**, 502-512.
- Obayashi, K., Tsumura, Y., Ihara-Ujino, T., Niiyama, K., Tanouchi, H., Suyama, Y., Washitani, I., Lee, C. T., Lee, S. L. and Muhammad, N. (2002) Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. *International Journal of Plant Sciences*, **163**, 151-158.
- Ohsawa, R., Furuya, N. and Ukai, Y. (1993) Effect of spatially restricted pollen flow on spatial genetic structure of an animal-pollinated allogamous plant population. *Heredity*, **71**, 64-73.
- Okayama, Y., Nagai, M. and Washitani, I. (2003) Testing the 'assortative mating' hypothesis on a variation maintenance mechanism for flowering time within a forest-floor population of *Primula sieboldii*. *Plant Species Biology*, **18**, 1-11.
- 大澤良、津村義彦、生井兵治、鷺谷いづみ (1991) 田島ヶ原サクラソウ野生集団のアイソザイム変異. 育種学雑誌, **41**, 331-339.

- Parks, J. C. and Werth, C. R. (1993) A study of spatial features of clones in a population of bracken fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany*, **80**, 537-544.
- Pors, B. and Werner, P. A. (1989) Individual flowering time in a goldenrod (*Solidago canadensis*): field experiment shows genotype more important than environment. *American Journal of Botany*, **76**, 1681-1688.
- Price, M. V. and Waser, N. M. (1979) Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, **277**, 294-297.
- Rao, C. R. (1973) *Linear statistical inference and its applications*, 2nd edn. John Wiley and Sons, New York, p. 625.
- Reusch, T. B. H., Hukriede, W., Stam, W. T. and Olsen, J. L. (1999) Differentiating between clonal growth and limited gene flow using spatial autocorrelation of microsatellites. *Heredity*, **83**, 120-126.
- Ritland, K. and Travis, S. (2004) Inferences involving individual coefficients of relatedness and inbreeding in natural populations of *Abies*. *Forest Ecology and Management*, **197**, 171-180.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, **145**, 1219-1228.
- Schmitt, J. (1983) Density-dependent pollinator foraging, flowering phenology, and temporal pollen dispersal patterns in *Linanthus bicolor*. *Evolution*, **37**, 1247-1257.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000) Arlequin, Version 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva Switzerland.

- Slatkin, M. (1985) Gene flow in natural population. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 393-430.
- Sokal, R. R. and Oden, N. L. (1978) Spatial autocorrelation in biology 1. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**, 199-228.
- Sokal, R. R. and Wartenberg, D. E. (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics*, **105**, 219-237.
- 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.
- Surles, S. E., Arnold, J., Schnabel, A., Hamrick, J. L. and Bongarten, B. C. (1990) Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **80**, 49-56.
- Tarayre, M., Laprade, P. S., Cuguen, J., Couvet, D. and Thompson, J. D. (1997) The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *American Journal of Botany*, **84**, 1675-1684.
- Taylor, P. D., Fahrig, L., Henein, K. and Merriam, G. (1993) Connectivity is a vital element of landscape structure. *OIKOS*, **68**, 571-573.
- Thomson, J. D. and Plowright, R. C. (1980) Pollen carryover, nectar rewards, and pollinator behavior with special reference to *Diervilla lonicera*. *Oecologia*, **46**, 68-74.
- 鳥居 恒夫 (1985) さくらそう. 日本テレビ放送網, 東京, p.151.
- 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 USA*, **79**, 203-207.
- Ueno, S., Tsumura, Y. and Washitani, I. (2003) Development of microsatellite markers in *Primula sieboldii* E. Morren, a threatened Japanese perennial herb. *Conservation Genetics*, **4**, 809-811.
- Wang, J. (2002) An estimator for pairwise relatedness using molecular makers. *Genetics*, **160**, 1203-1215.
- Washitani, I. (1996) Predicted genetic consequences of strong fertility selection due to pollinator loss in an isolated population of *Primula sieboldii*. *Conservation Biology*, **10**, 59-64.
- 鷲谷いづみ (1998) サクラソウの目－保全生態学とは何か－. 地人書館, 東京, p. 229.
- 鷲谷いづみ (1997) サクラソウとトラマルハナバチ－植物の種の保全のためのポリネーターセラピーに向けて－. ミツバチ科学, **18**, 129-136.
- Washitani, I. and Kabaya, H. (1988) Germination responses to temperature responsible for the seedling emergence seasonality of *Primula sieboldii* E. Morren in its natural habitat. *Ecological Research*, **3**, 9-20.
- Washitani, I., Kato, M., Nishihiro, J. and Suzuki, K. (1995) Importance of queen bumble bees as pollinators facilitating inter-morph crossing in *Primula sieboldii*. *Plant Species Biology*, **9**, 169-176.
- Washitani, I., Namai, H. and Osawa, R. (1991) Species biology of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat population: I. Inter-clonal variations in the flowering phenology, pollen load and female fertility components. *Plant Species Biology*, **6**, 27-37.

- Washitani, I., Okayama, Y., Sato, K., Takahashi, H. and Ohgushi, T. (1996) Spatial variation in female fertility related to interactions with flower consumers and pathogens in a forest metapopulation of *Primula sieboldii*. *Researches on Population Ecology*, **38**, 249-256.
- Washitani, I., Osawa, R., Namai, H. and Niwa, M. (1994) Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology*, **82**, 571-579.
- 鷺谷いづみ・矢原徹一 (1996) 保全生態学入門－遺伝子から景観まで－. 文一総合出版, 東京, p. 270.
- Watanabe, A., Goka, K. and Washitani, I. (2004) Effects of population spatial structure on the quantity and quality of seeds set by *Primula sieboldii* (Primulaceae). *Plant Species Biology*, **18**, 107-121.
- Webb, C. J. and Bawa, K. S. (1983) Pollen dispersal by hummingbirds and butterflies: A comparative study of two lowland tropical plants. *Evolution*, **37**, 1258-1270.
- Weir, B. S. (1996) *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, p. 445.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- White, G. M. and Boshier, D. H. (2000) Fragmentation in Central American dry forests: genetic impacts on *Swietenia humilis* (Meliaceae) In: *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations* (Eds, Young, A. G. and Clarke, G. M.), pp. 293-311, Cambridge University Press, Cambridge.
- Whitlock, M. C. and McCauley, D. E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal  $1/(4Nm+1)$ . *Heredity*, **82**, 117-125.

- Wiens, J. A. (1997) Metapopulation dynamics and landscape ecology. In:  
*Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution* (Eds, Hanski, I. and  
Gilpin, M. E.), pp. 43-62, Academic press, California.
- Wright, S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.
- Wright, S. (1943) Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114-138.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**,  
323-354.

表 1. 本研究で新たに開発した 3 組のマイクロサテライトマーカースの特徴

| 遺伝子座           | マイクロサテライト<br>領域のモチーフと<br>繰り返し数*        | プライマー配列 (5' → 3') <sup>†</sup>                        | DDBJ**   |
|----------------|--|---|----------|
| <i>Pri0126</i> | (CT) <sub>11</sub> (CA) <sub>16</sub>  | For: CGGTGTTTGGTTATTCA<br>Rev: GATGGGTAACCTTATGCTTCT  | AB210285 |
| <i>Pri0141</i> | (GA) <sub>17</sub>                     | For: CCAGGTCTTCCTACAGTCA<br>Rev: ACCAGCTTGGATTATTCTTT | AB189733 |
| <i>Pri0146</i> | (GA) <sub>13</sub> TT(GA) <sub>5</sub> | For: TACCGTTCGTACATTATTCA<br>Rev: CTCGACAGCCAGCAG     | AB189732 |

\*塩基配列を解読したサンプルでの繰り返し数

\*\*DDBJ アクセッション・ナンバー

<sup>†</sup>For; Forward 側、Rev; Reverse 側

表 2. マイクロサテライトマーカー4 遺伝子座に基づくハヶ岳演習林に自生する  
サクラソウ集団の遺伝的多様性

| 遺伝子座           | 増幅断片長<br>(bp) | $N_a$ | $H_o$ | $H_e$ | Excl | HW |
|----------------|---------------|-------|-------|-------|------|----|
| <i>Pri0126</i> | 245-281       | 10    | 0.79  | 0.82  | 0.65 | NS |
| <i>Pri0141</i> | 153-202       | 12    | 0.94  | 0.82  | 0.64 | NS |
| <i>Pri0146</i> | 190-211       | 8     | 0.77  | 0.70  | 0.46 | NS |
| <i>PS2</i>     | 194-216       | 5     | 0.65  | 0.68  | 0.42 | NS |

$N_a$ , 遺伝子座あたりの対立遺伝子数

$H_o$ , ヘテロ接合度の観察値

$H_e$ , ヘテロ接合度の期待値

Excl, 片親が既知の場合の平均父性排除率

HW,  $H_o$  と  $H_e$  を比較した際のカイ 2 乗検定の結果

表 3. ハヶ岳演習林に自生するサクラソウ 8 集団のマイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座における対立遺伝子数と遺伝子多様度 ( $H_s$ )

| 遺伝子座           | アニーリング<br>温度(°C) | 対立<br>遺伝子数 | 遺伝子多様度( <i>Hs</i> ) |      |      |      |      |      |      |      | 集団<br>平均 |
|----------------|------------------|------------|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|----------|
|                |                  |            | 集団                  |      |      |      |      |      |      |      |          |
|                |                  |            | A                   | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    |          |
|                |                  |            | n = 33              | 72   | 91   | 24   | 42   | 40   | 53   | 25   | 380      |
| <i>ga0212</i>  | 50               | 14         | 0.80                | 0.78 | 0.78 | 0.80 | 0.79 | 0.84 | 0.77 | 0.72 | 0.79     |
| <i>ga0218</i>  | 65               | 11         | 0.67                | 0.75 | 0.76 | 0.77 | 0.74 | 0.79 | 0.74 | 0.73 | 0.74     |
| <i>ga0235</i>  | 60               | 7          | 0.69                | 0.62 | 0.64 | 0.66 | 0.62 | 0.50 | 0.62 | 0.46 | 0.60     |
| <i>ga0668</i>  | 50               | 5          | 0.22                | 0.39 | 0.38 | 0.42 | 0.32 | 0.52 | 0.54 | 0.22 | 0.38     |
| <i>ga1277</i>  | 60               | 19         | 0.79                | 0.79 | 0.80 | 0.81 | 0.76 | 0.75 | 0.77 | 0.79 | 0.78     |
| <i>Pri0126</i> | 50               | 14         | 0.85                | 0.84 | 0.84 | 0.83 | 0.81 | 0.81 | 0.81 | 0.79 | 0.82     |
| <i>Pri0141</i> | 50               | 21         | 0.80                | 0.83 | 0.83 | 0.76 | 0.81 | 0.82 | 0.79 | 0.84 | 0.81     |
| <i>Pri0146</i> | 50               | 11         | 0.77                | 0.70 | 0.72 | 0.74 | 0.68 | 0.65 | 0.78 | 0.70 | 0.72     |
| 遺伝子座<br>平均     |                  | 12.8       | 0.70                | 0.71 | 0.72 | 0.72 | 0.69 | 0.71 | 0.73 | 0.66 | 0.71     |

**表 4. ハケ岳演習林内で観察された各ハプロタイプの塩基配列の違い**

葉緑体 DNA の *trnT-trnL* の非コード領域の塩基配列を調査したところ、1 箇所の塩基置換と2 箇所の挿入・欠失箇所によって区別された4 つのハプロタイプが観察された。

| ハプロ<br>タイプ | 多型が観察されたサイトの塩基配列 |   |     |   |     |      |     | クレード <sup>†</sup> | 他地域 <sup>†</sup> |
|------------|------------------|---|-----|---|-----|------|-----|-------------------|------------------|
| N          | ...              | - | ... | A | ... | G*9  | ... | I                 | 上尾、諏訪            |
| Z          | ...              | T | ... | C | ... | G*9  | ... | III               | ハケ岳のみで観察される      |
| C          | ...              | T | ... | C | ... | G*10 | ... |                   | 中部～北海道までの広範囲     |
| O          | ...              | T | ... | C | ... | G*11 | ... |                   | ハケ岳のみで観察される      |

<sup>†</sup>Honjo *et al.* (2003) によって分類されたクレード名とそのハプロタイプが観察された他地域の名前。Honjo *et al.* (2003) によると、クレード I に属するハプロタイプは、主に九州と関東地方に分布しており、クレード III に属するハプロタイプは、中部地方から北海道まで広範囲に分布している。また、本城(2005)によると、ハプロタイプ Z と O はハプロタイプ C から派生したハプロタイプであることが示されている。

表 5. 葉緑体 DNA ハプロタイプの出現頻度と遺伝子多様度 ( $H_s$ )

| ハプロ<br>タイプ | 集団     |      |      |      |      |      |      |      | 全体   |
|------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|            | A      | B    | C    | D    | E    | F    | G    | H    |      |
|            | n = 30 | 30   | 30   | 24   | 30   | 30   | 32   | 16   | 222  |
| N          | 0.97   | 0.93 | 0.60 | 0.25 | 0.87 | 0.20 | 0.31 | 0.50 | 0.59 |
| Z          | 0.00   | 0.00 | 0.23 | 0.00 | 0.00 | 0.07 | 0.00 | 0.00 | 0.04 |
| C          | 0.00   | 0.00 | 0.10 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.31 | 0.00 | 0.07 |
| O          | 0.03   | 0.07 | 0.07 | 0.71 | 0.10 | 0.70 | 0.38 | 0.50 | 0.30 |
| $H_s$      | 0.07   | 0.13 | 0.59 | 0.45 | 0.25 | 0.48 | 0.69 | 0.53 |      |



表 6. 沢内分集団間と沢沿い集団間の遺伝的な分化程度

| 遺伝子座           | 分集団内<br>ジェネット間 | 沢内分集団間 |                  |     | 沢沿い集団間 |                  |
|----------------|----------------|--------|------------------|-----|--------|------------------|
|                |                | 補正前    | 補正後 <sup>†</sup> |     | 補正前    | 補正後 <sup>†</sup> |
| <i>ga0218</i>  | -0.010         | 0.015  | 0.056            | *   | -0.002 | -0.008           |
| <i>ga0235</i>  | -0.043         | 0.031  | 0.078            | **  | -0.013 | -0.033           |
| <i>gal277</i>  | -0.069 *       | 0.007  | 0.033            |     | -0.005 | -0.021           |
| <i>ga0212</i>  | -0.009         | 0.015  | 0.071            | *   | 0.006  | 0.029            |
| <i>ga0668</i>  | -0.007         | -0.017 | -0.027           |     | 0.023  | 0.037 **         |
| <i>Pri0126</i> | -0.029         | -0.004 | -0.019           |     | 0.014  | 0.077 **         |
| <i>Pri0141</i> | 0.015          | 0.005  | 0.028            |     | 0.000  | 0.000            |
| <i>Pri0146</i> | -0.012         | -0.001 | -0.003           |     | 0.008  | 0.029            |
| 遺伝子座<br>平均     | -0.021 *       | 0.007  | 0.025            | *** | 0.003  | 0.011            |
| 葉緑体<br>DNA     | 0.376          | 0.053  |                  | *** | 0.341  | ***              |

表中の数字は、マイクロサテライトマーカー8 遺伝子座の遺伝子型に基づいて、Analysis of molecular variance (AMOVA: Excoffier et al. 1992)によって推定された階層的な  $\Phi$ -統計量とその有意確率(\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ )を示す。

<sup>†</sup>マーカーの多型性が高い場合、遺伝的な分化程度が過小評価される傾向にあるため(Hedrick 1999)、遺伝的な分化程度である  $\Phi$  を  $(1 - H_s)$  で割ることにより補正した。ここでの  $H_s$  は、表 3 中に示した各遺伝子座における  $H_s$  の集団平均を用いた。

表 7. 父性解析に用いた親世代 97 ジェネットのマイクロサテライトマーカー8 遺伝子座に基づく遺伝的多様性

| 遺伝子座           | $A^*$ | $H_o^\dagger$ | $H_e^\ddagger$ | Null <sup>¶</sup> | Exc <sup>**</sup>   | 引用                        |
|----------------|-------|---------------|----------------|-------------------|---------------------|---------------------------|
| <i>ga0212</i>  | 12    | 0.753         | 0.789          | 0.023             | 0.613               | Ueno <i>et al.</i> (2003) |
| <i>ga0218</i>  | 8     | 0.680         | 0.699          | 0.008             | 0.467               | Ueno <i>et al.</i> (2003) |
| <i>ga0235</i>  | 5     | 0.629         | 0.579          | -0.052            | 0.364               | Ueno <i>et al.</i> (2003) |
| <i>ga0668</i>  | 3     | 0.392         | 0.369          | -0.030            | 0.179               | Ueno <i>et al.</i> (2003) |
| <i>ga1277</i>  | 10    | 0.732         | 0.823          | 0.060             | 0.647               | Ueno <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Pri0126</i> | 13    | 0.792         | 0.807          | 0.009             | 0.635               | 北本ら(2005)                 |
| <i>Pri0141</i> | 16    | 0.866         | 0.825          | -0.031            | 0.654               | 北本ら(2005)                 |
| <i>Pri0146</i> | 9     | 0.701         | 0.714          | 0.007             | 0.486               | 北本ら(2005)                 |
| 平均             | 8.9   | 0.685         | 0.705          | 0.009             | 0.998 <sup>††</sup> |                           |

\*対立遺伝子数

†ヘテロ接合度の観察値

‡ヘテロ接合度の期待値

¶解析ソフト CERVUS 2.0 software (Marshall *et al.* 1998) を用いて推定したヌル対立遺伝子頻度。

\*\*片親が既知の場合の父性排除率。

††8 遺伝子座を組み合わせたときの父性排除率

表 8. 父性解析で花粉親を 1 ジェネットに特定できなかったために、追加的に 3 遺伝子座の遺伝子型を特定した親世代 60 ジェネットの遺伝的多様性

| 遺伝子座          | $A^*$ | $H_o^\dagger$ | $H_e^\ddagger$ | Null <sup>¶</sup> | Exc <sup>**</sup> | 引用                         |
|---------------|-------|---------------|----------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| <i>ga0653</i> | 6     | 0.700         | 0.760          | 0.039             | 0.522             | Ueno <i>et al.</i> (2003)  |
| <i>ga0666</i> | 10    | 0.627         | 0.713          | 0.062             | 0.479             | Ueno <i>et al.</i> (2003)  |
| <i>PS-2</i>   | 6     | 0.667         | 0.674          | 0.001             | 0.407             | Isagi <i>et al.</i> (2001) |
| 平均            | 8.9   | 0.685         | 0.705          | 0.009             |                   |                            |

\*対立遺伝子数

†ヘテロ接合度の観察値

‡ヘテロ接合度の期待値

¶解析ソフト CERVUS 2.0 software (Marshall *et al.* 1998)を用いて推定したヌル対立遺伝子頻度。

\*\*片親が既知の場合の父性排除率

表 9. G 沢下流域の局所集団内で開花した 97 ジェネットの開花数と開花期

| ジェ<br>ネット<br>名 | 花<br>型 <sup>¶</sup> | 開花<br>ラメット<br>数 | 開花<br>小花数 | ラメット<br>あたりの<br>開花数 | 第1花<br>開花日 <sup>†</sup> | 平均<br>開花日 <sup>†</sup> | 閉花日 <sup>†</sup> | 開花<br>期間 |
|----------------|---------------------|-----------------|-----------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------|----------|
| 1              | T                   | 2               | 12        | 6.0                 | 12                      | 18.50                  | 38               | 27       |
| 2              | T                   | 3               | 21        | 7.0                 | 8                       | 12.67                  | 38               | 31       |
| 3              | P                   | 5               | 29        | 5.8                 | 5                       | 13.21                  | 39               | 35       |
| 5              | T                   | 7               | 37        | 5.3                 | 5                       | 12.30                  | 42               | 38       |
| 6              | T                   | 7               | 30        | 4.3                 | 12                      | 15.77                  | 38               | 27       |
| 8              | T                   | 3               | 24        | 8.0                 | 11                      | 18.21                  | 42               | 32       |
| 9              | P                   | 3               | 24        | 8.0                 | 11                      | 19.08                  | 44               | 34       |
| 10             | P                   | 1               | 7         | 7.0                 | 13                      | 17.00                  | 38               | 26       |
| 13             | T                   | 1               | 2         | 2.0                 | 13                      | 13.50                  | 26               | 14       |
| 14             | P                   | 8               | 49        | 6.1                 | 9                       | 17.86                  | 42               | 34       |
| 16             | K                   | 2               | 6         | 3.0                 | 11                      | 15.83                  | 38               | 28       |
| 17             | K                   | 3               | 14        | 4.7                 | 13                      | 17.29                  | 38               | 26       |
| 19             | P                   | 1               | 6         | 6.0                 | 9                       | 11.50                  | 32               | 24       |
| 20             | P                   | 31              | 256       | 8.3                 | 10                      | 21.09                  | 45               | 36       |
| 21             | T                   | 1               | 9         | 9.0                 | 6                       | 13.89                  | 39               | 34       |
| 22             | P                   | 1               | 6         | 6.0                 | 10                      | 16.67                  | 38               | 29       |
| 23             | P                   | 4               | 14        | 3.5                 | 10                      | 14.71                  | 32               | 23       |
| 27             | T                   | 1               | 10        | 10.0                | 11                      | 18.30                  | 41               | 31       |
| 28             | T                   | 1               | 7         | 7.0                 | 13                      | 19.29                  | 38               | 26       |
| 30             | T                   | 20              | 118       | 5.9                 | 13                      | 18.50                  | 42               | 30       |
| 31             | P                   | 1               | 7         | 7.0                 | 10                      | 13.43                  | 24               | 15       |
| 32             | T                   | 11              | 54        | 4.9                 | 11                      | 20.00                  | 44               | 34       |
| 33             | P                   | 2               | 4         | 2.0                 | 15                      | 16.75                  | 33               | 19       |
| 34             | T                   | 2               | 11        | 5.5                 | 15                      | 20.75                  | 41               | 27       |
| 35             | T                   | 6               | 37        | 6.2                 | 11                      | 15.89                  | 38               | 28       |
| 36             | T                   | 3               | 22        | 7.3                 | 12                      | 17.27                  | 38               | 27       |
| 37             | T                   | 1               | 6         | 6.0                 | 27                      | 27.67                  | 39               | 13       |
| 39             | T                   | 3               | 26        | 8.7                 | 14                      | 20.12                  | 42               | 29       |
| 42             | P                   | 5               | 30        | 6.0                 | 12                      | 20.17                  | 42               | 31       |
| 45             | P                   | 1               | 6         | 6.0                 | 15                      | 20.67                  | 40               | 26       |
| 46             | T                   | 3               | 6         | 2.0                 | 12                      | 13.17                  | 28               | 17       |
| 49             | P                   | 15              | 118       | 7.9                 | 13                      | 20.58                  | 44               | 32       |
| 51             | T                   | 1               | 5         | 5.0                 | 22                      | 25.20                  | 38               | 17       |
| 53             | T                   | 6               | 22        | 3.7                 | 11                      | 17.27                  | 38               | 28       |
| 54             | P                   | 8               | 28        | 3.5                 | 12                      | 19.61                  | 39               | 28       |
| 57             | P                   | 4               | 24        | 6.0                 | 13                      | 22.83                  | 42               | 30       |
| 58             | T                   | 2               | 12        | 6.0                 | 14                      | 19.75                  | 43               | 30       |

<sup>¶</sup>P;長花柱花、T;短花柱花、K;クロホ菌に感染しているため花型が不明なジェネット。  
クロホ菌に感染したジェネットは繁殖能力がないため、この 2 ジェネットは解析から除いた。

<sup>†</sup>2002 年 5 月 1 日からの日数。平均開花日とは、各小花の開花日の平均値を意味する。

表 9. 続き

| ジェ<br>ネット<br>名 | 花<br>型<br>『 | 開花<br>ラメット<br>数 | 開花<br>小花数 | ラメット<br>あたりの<br>開花数 | 第1花<br>開花日 <sup>†</sup> | 平均<br>開花日 <sup>†</sup> | 閉花日 <sup>†</sup> | 開花<br>期間 |
|----------------|-------------|-----------------|-----------|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------|----------|
| 60             | P           | 2               | 9         | 4.5                 | 21                      | 25.22                  | 41               | 21       |
| 61             | T           | 1               | 8         | 8.0                 | 18                      | 22.88                  | 42               | 25       |
| 65             | T           | 5               | 27        | 5.4                 | 10                      | 14.67                  | 41               | 32       |
| 68             | P           | 6               | 43        | 7.2                 | 17                      | 22.42                  | 42               | 26       |
| 69             | P           | 15              | 96        | 6.4                 | 9                       | 16.97                  | 42               | 34       |
| 88             | T           | 3               | 18        | 6.0                 | 12                      | 18.00                  | 40               | 29       |
| 89             | T           | 2               | 12        | 6.0                 | 16                      | 20.08                  | 39               | 24       |
| 91             | T           | 1               | 6         | 6.0                 | 14                      | 17.00                  | 36               | 23       |
| 94             | T           | 2               | 5         | 2.5                 | 19                      | 21.00                  | 38               | 20       |
| 95             | T           | 5               | 25        | 5.0                 | 22                      | 30.16                  | 44               | 23       |
| 97             | T           | 9               | 52        | 5.8                 | 13                      | 20.02                  | 39               | 27       |
| 99             | T           | 1               | 5         | 5.0                 | 25                      | 27.00                  | 38               | 14       |
| 101            | P           | 1               | 1         | 1.0                 | 20                      | 20.00                  | 32               | 13       |
| 103            | P           | 5               | 39        | 7.8                 | 17                      | 24.72                  | 44               | 28       |
| 106            | P           | 1               | 6         | 6.0                 | 24                      | 28.50                  | 42               | 19       |
| 107            | P           | 2               | 8         | 4.0                 | 13                      | 18.38                  | 38               | 26       |
| 111            | P           | 2               | 13        | 6.5                 | 8                       | 16.15                  | 40               | 33       |
| 112            | P           | 1               | 6         | 6.0                 | 11                      | 16.67                  | 31               | 21       |
| 113            | P           | 1               | 5         | 5.0                 | 12                      | 15.20                  | 31               | 20       |
| 114            | P           | 1               | 8         | 8.0                 | 12                      | 19.00                  | 39               | 28       |
| 115            | T           | 1               | 5         | 5.0                 | 12                      | 19.00                  | 38               | 27       |
| 116            | P           | 3               | 13        | 4.3                 | 12                      | 17.77                  | 38               | 27       |
| 117            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 12                      | 13.00                  | 22               | 11       |
| 119            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 13                      | 13.00                  | 26               | 14       |
| 120            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 13                      | 14.33                  | 28               | 16       |
| 121            | P           | 1               | 5         | 5.0                 | 13                      | 15.80                  | 31               | 19       |
| 122            | P           | 3               | 15        | 5.0                 | 15                      | 18.93                  | 39               | 25       |
| 123            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 13                      | 13.67                  | 23               | 11       |
| 124            | T           | 1               | 3         | 3.0                 | 14                      | 15.00                  | 31               | 18       |
| 125            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 12                      | 14.00                  | 26               | 15       |
| 126            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 14                      | 15.33                  | 31               | 18       |
| 127            | T           | 1               | 5         | 5.0                 | 14                      | 16.00                  | 31               | 18       |
| 128            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 14                      | 15.33                  | 31               | 18       |
| 129            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 14                      | 14.50                  | 26               | 13       |
| 130            | P           | 1               | 7         | 7.0                 | 14                      | 19.86                  | 39               | 26       |
| 131            | P           | 2               | 10        | 5.0                 | 14                      | 19.10                  | 40               | 27       |
| 132            | P           | 1               | 4         | 4.0                 | 14                      | 16.50                  | 32               | 19       |

『P;長花柱花、T;短花柱花

<sup>†</sup>2002年5月1日からの日数。平均開花日とは、各小花の開花日の平均値を意味する。

表 9. 続き

| ジェ<br>ネット<br>名 | 花<br>型<br>† | 開花<br>ラメット<br>数 | 開花<br>小花数 | ラメット<br>あたりの<br>開花数 | 第1花<br>開花日 † | 平均<br>開花日 † | 閉花日 † | 開花<br>期間 |
|----------------|-------------|-----------------|-----------|---------------------|--------------|-------------|-------|----------|
| 133            | T           | 4               | 21        | 5.3                 | 15           | 20.67       | 41    | 27       |
| 134            | P           | 1               | 6         | 6.0                 | 15           | 20.50       | 36    | 22       |
| 135            | T           | 1               | 3         | 3.0                 | 15           | 15.67       | 25    | 11       |
| 136            | P           | 3               | 18        | 6.0                 | 15           | 21.39       | 44    | 30       |
| 137            | P           | 1               | 4         | 4.0                 | 17           | 22.00       | 36    | 20       |
| 138            | T           | 2               | 13        | 6.5                 | 18           | 25.38       | 44    | 27       |
| 139            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 18           | 18.50       | 36    | 19       |
| 140            | T           | 3               | 12        | 4.0                 | 18           | 23.17       | 36    | 19       |
| 141            | P           | 1               | 6         | 6.0                 | 18           | 21.67       | 36    | 19       |
| 142            | P           | 1               | 8         | 8.0                 | 18           | 23.00       | 39    | 22       |
| 143            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 19           | 19.00       | 29    | 11       |
| 144            | P           | 1               | 3         | 3.0                 | 20           | 21.67       | 36    | 17       |
| 145            | P           | 1               | 7         | 7.0                 | 20           | 25.14       | 39    | 20       |
| 146            | P           | 1               | 6         | 6.0                 | 13           | 18.33       | 41    | 29       |
| 153            | T           | 2               | 10        | 5.0                 | 22           | 25.20       | 42    | 21       |
| 154            | T           | 1               | 6         | 6.0                 | 22           | 26.50       | 41    | 20       |
| 155            | T           | 3               | 10        | 3.3                 | 21           | 21.50       | 38    | 18       |
| 156            | P           | 1               | 2         | 2.0                 | 23           | 23.50       | 34    | 12       |
| 158            | P           | 1               | 4         | 4.0                 | 24           | 24.00       | 44    | 21       |
| 159            | P           | 3               | 24        | 8.0                 | 14           | 19.58       | 44    | 31       |

†P;長花柱花、T;短花柱花

†2002 年 5 月 1 日からの日数。平均開花日とは、各小花の開花日の平均値を意味する。

表 10. G 沢の下流域に位置する局所集団においてマイクロサテライトマーカー  
11 遺伝子座を用いて行った父性解析の結果

| 父性解析の結果   | 解析<br>実生数 | 割合   |
|---|-----------|------|
| 局所集団内の 1 ジェネットに花粉親が特定された                          | 341       | 79%  |
| 異花型のジェネット間交配に由来                                   | 303       |      |
| 同花型のジェネット間交配に由来                                   | 2         |      |
| 自殖由来  | 36        |      |
| 局所集団外からの花粉によって受粉していた                              | 25        | 6%   |
| 局所集団内に花粉親候補が 2 ジェネット以上おり、花粉親を<br>1 ジェネットに特定できなかった | 66        | 15%  |
| 合計  | 432       | 100% |

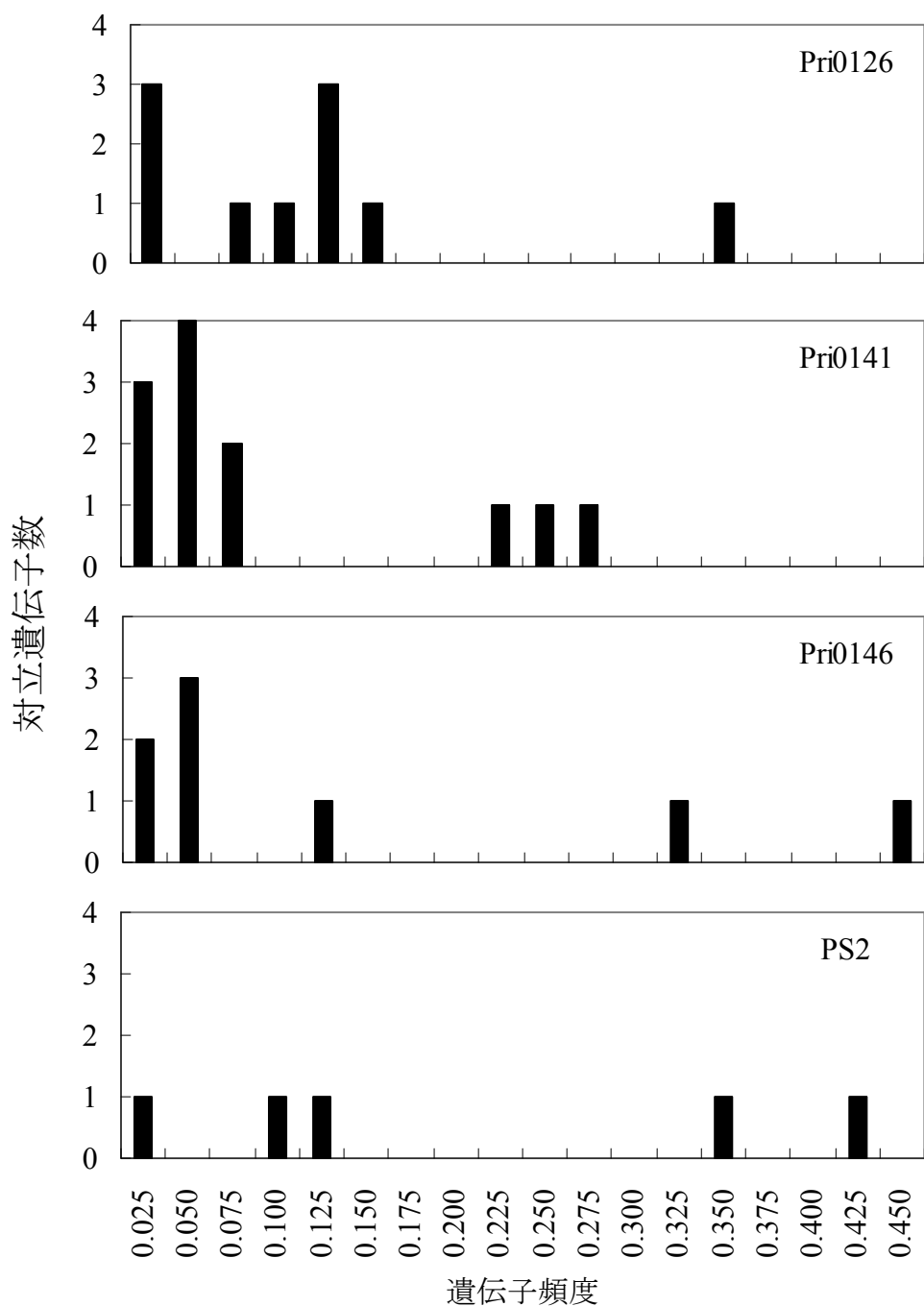


図 1. 新規開発マーカーと既存マーカー(PS2)との対立遺伝子頻度の比較

新しく開発したマーカーと既存マーカーである PS2 とで観察された対立遺伝子頻度の頻度分布を比較したところ、新規開発マーカーでは、ボトルネックの影響を受けやすい遺伝子頻度の低い対立遺伝子が多数観察された。



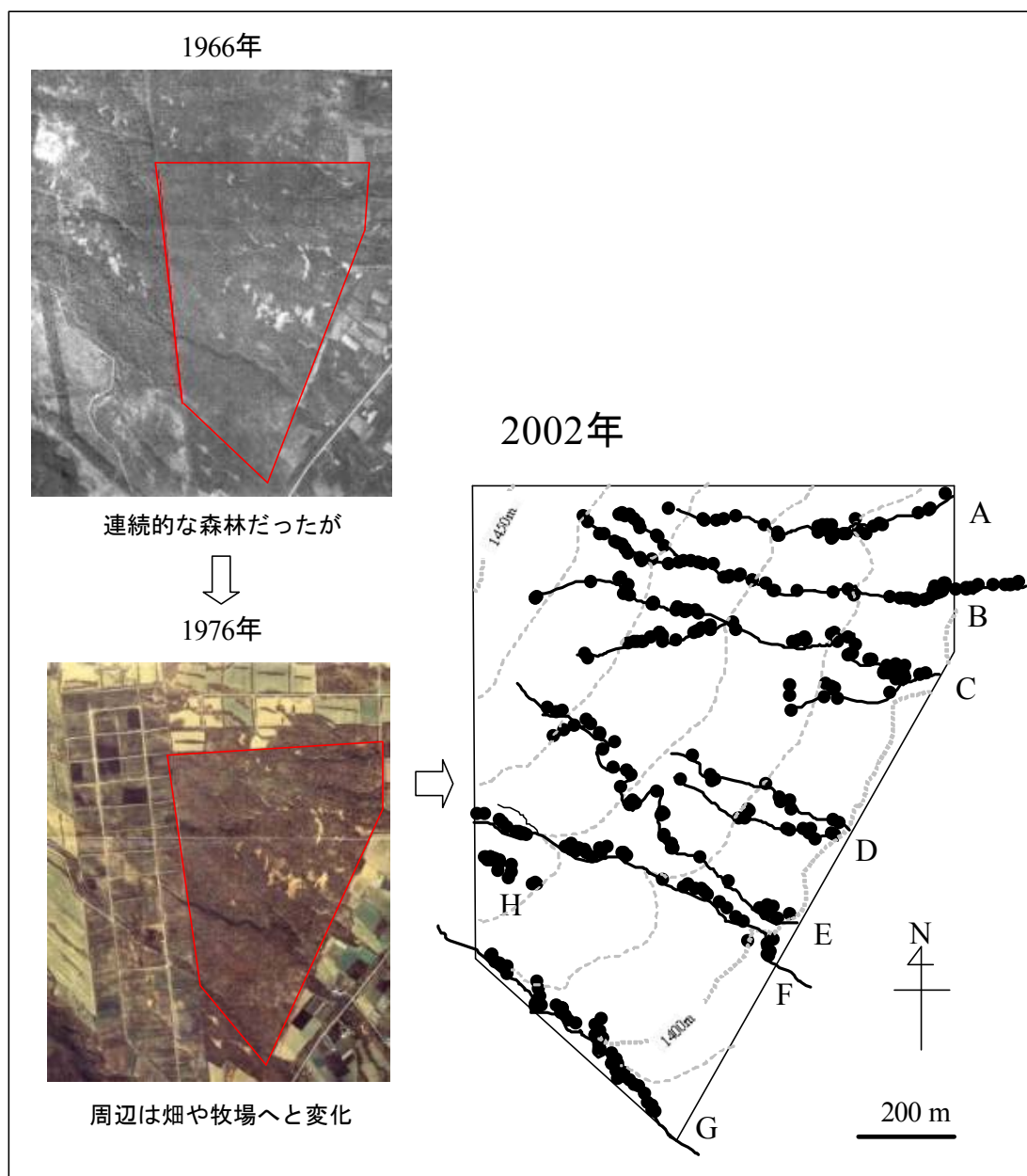
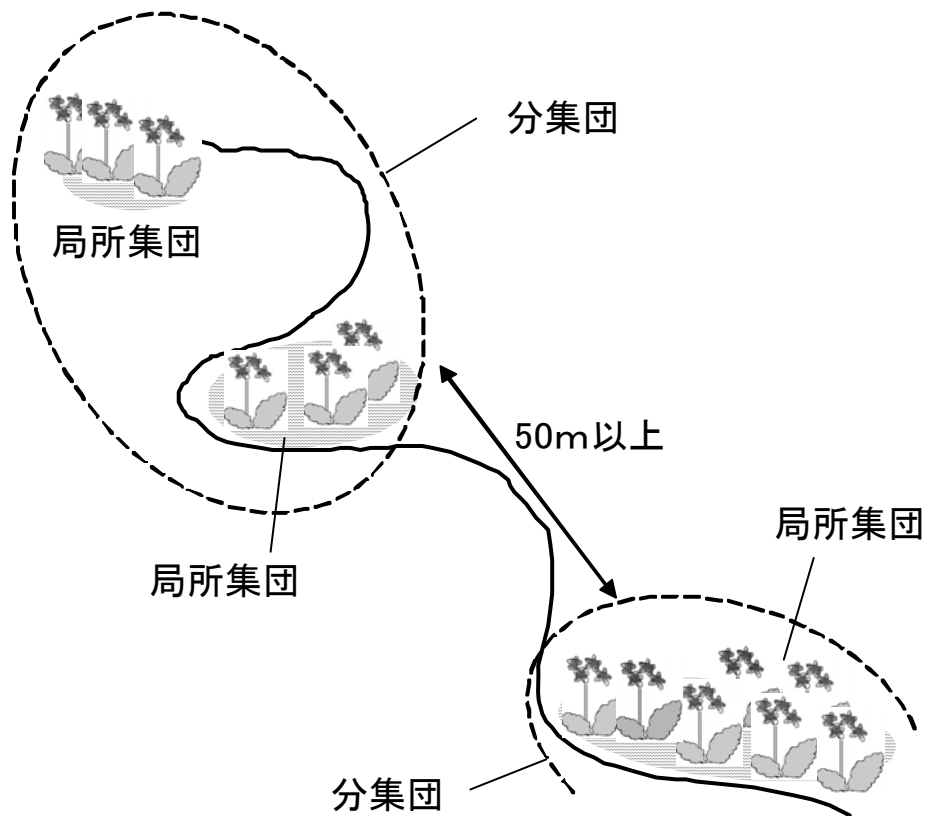


図 2. ハヶ岳演習林周辺の景観の変化と演習林内におけるサクラソウの分布

演習林内には 7 つの沢が流れており、サクラソウジェネット(図中の黒丸)はそれぞれの沢に沿って分布している。写真提供;筑波大学ハヶ岳演習林



**図 3. 沢内におけるサクラソウの分布**

ひと続きの場所に連続して分布しているサクラソウの集合を局所集団、花粉流動によって緊密に交流していると考えられる局所集団の集合を分集団と定義した。最も近い局所集団から 50m 以上離れると別々の分集団に属するとした。

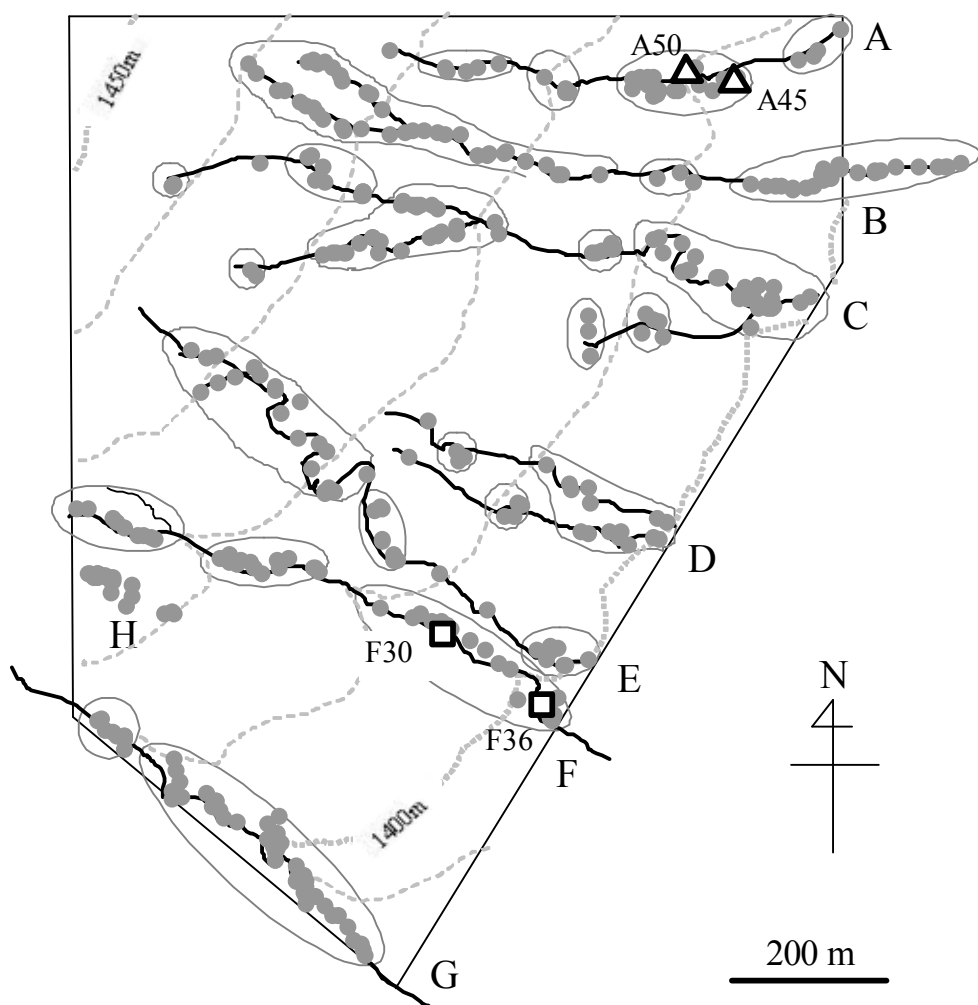


図 4. サンプルしたラメットの分布位置と、8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーすべてで同じ遺伝子型を示した 2 組のラメットの分布位置(△:A45-A50 ペア、□:F30-F36 ペア)

図中の各点はサンプルしたラメットを表し、円は AMOVA の際に用いられた分集団を表す。各実線は沢を、各点線は 10m 間隔の等高線を表す。全部で 8 集団(A~H)から葉をサンプルした。このうち、H 集団のみが沢沿いではない所に成立している。

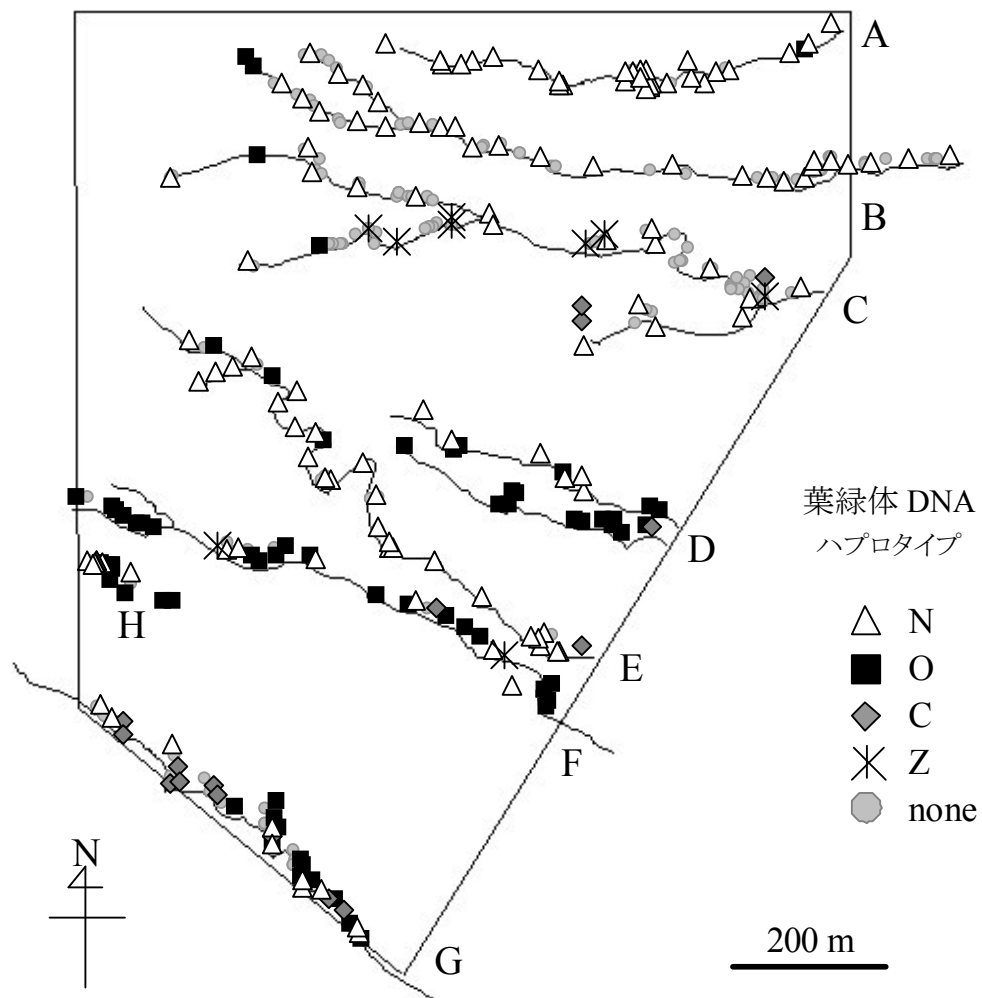
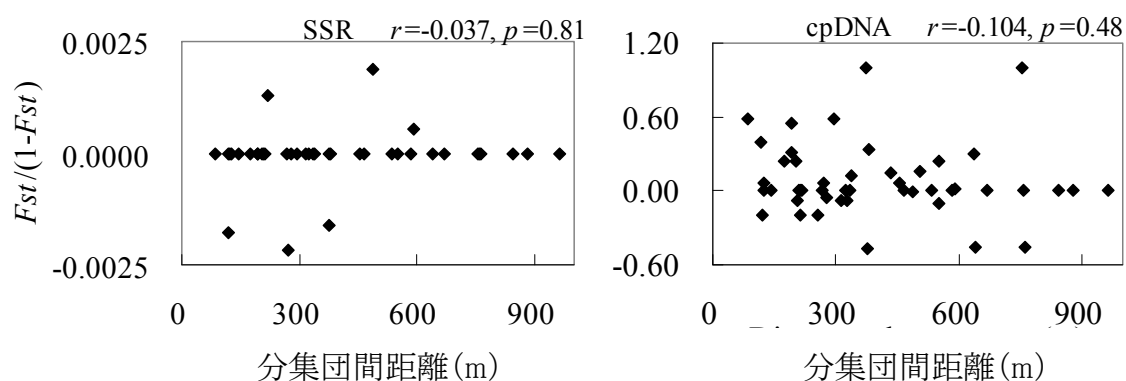


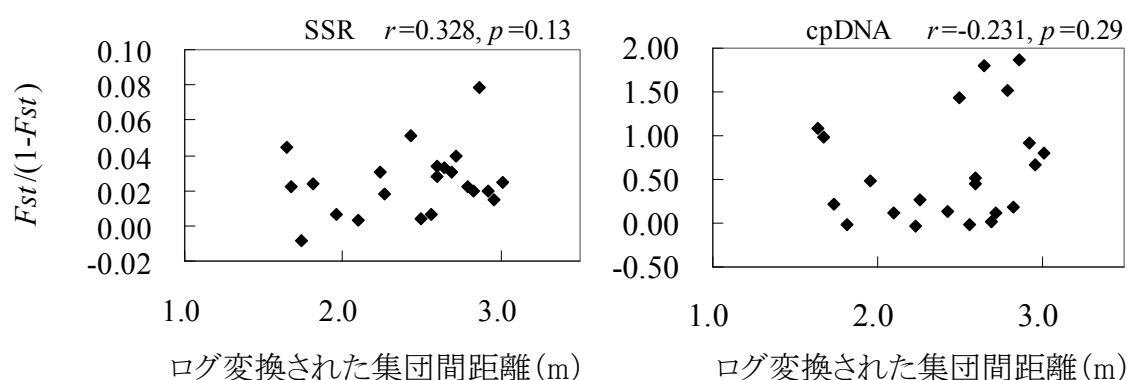
図 5. 葉緑体 DNA における 4 つのハプロタイプの空間分布

凡例中の none はハプロタイプを決定していないラメットを意味する。

**a)** 沢内の分集団間レベル



**b)** 沢沿い集団間レベル

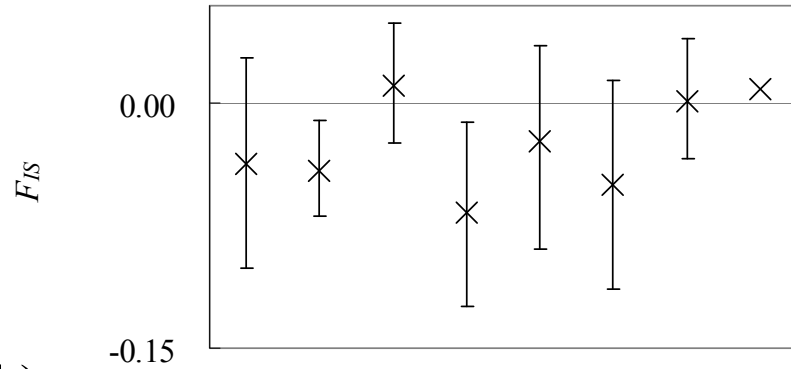


**図 6.** (a) 沢内の 2 分集団間における遺伝的な分化程度と物理的距離との関係、

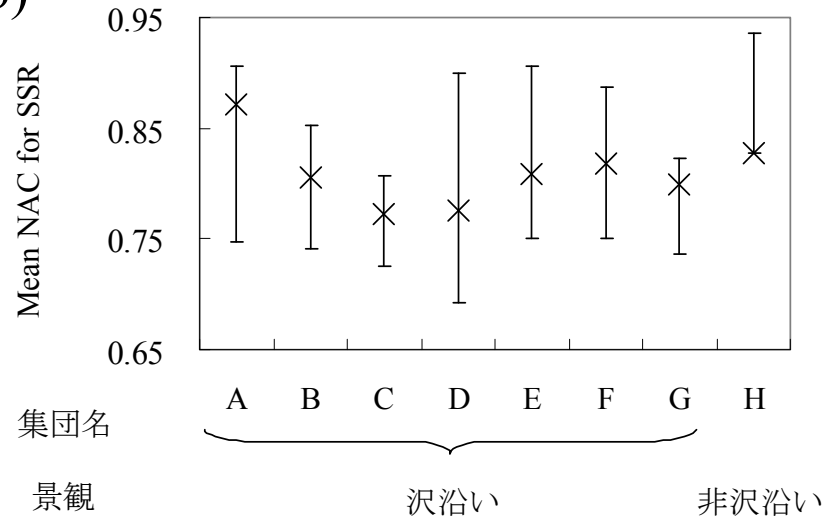
(b) 沢沿いに成立する 2 集団間の遺伝的な分化程度と物理的距離との関係

沢内・沢間ともに遺伝的な分化程度と物理的な距離との間に有意な相関は見られなかった。

a)



b)



c)

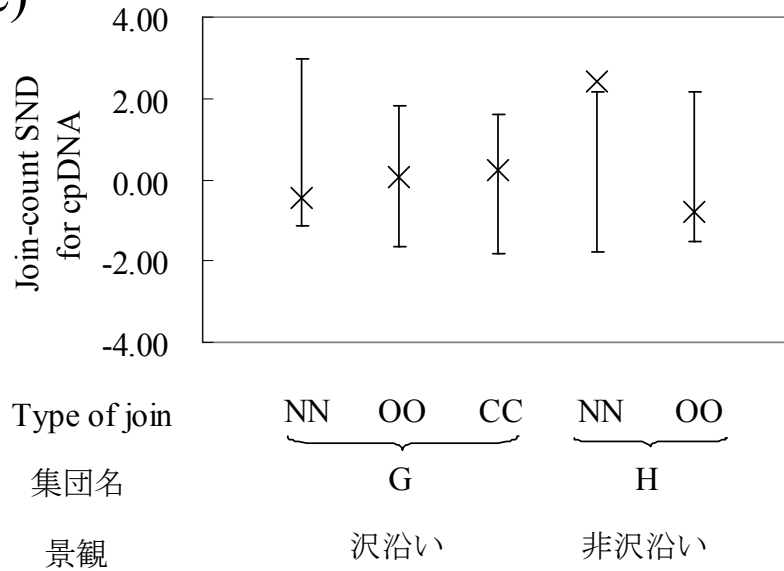


図 7. 沢沿い集団と非沢沿い集団における近交係数( $F_{IS}$ )と共有対立遺伝子数(NAC)、および葉緑体 DNA における空間的遺伝構造(SND)の比較

図中の実線は、対立遺伝子やハプロタイプをランダムに 1000 回入れ替えて得られた帰無仮説分布における 95%の信頼区間を表す。

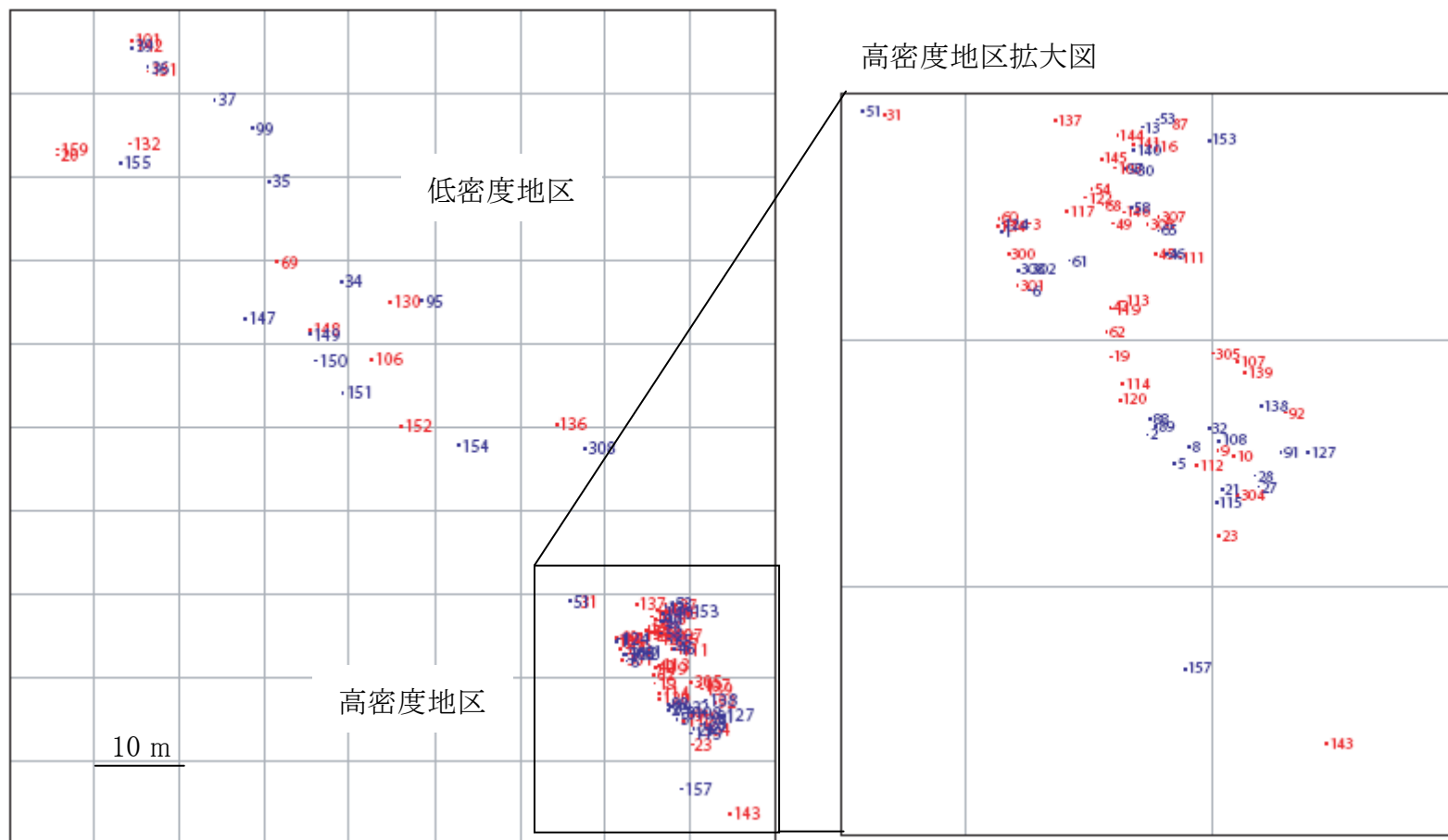
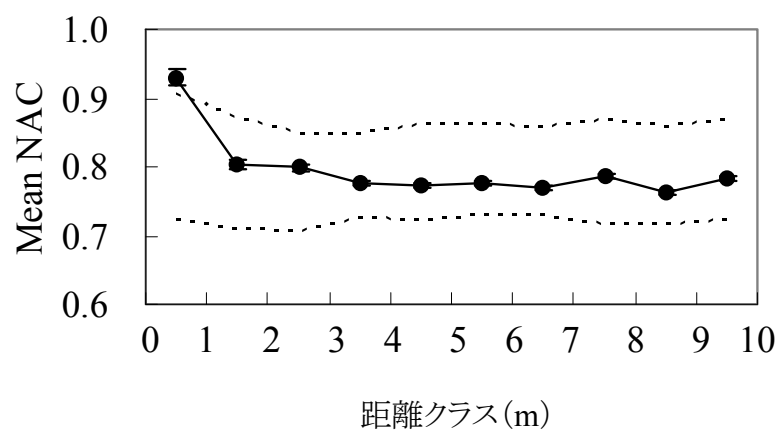


図 8. G 沢下流域の局所集団内における開花ジェネットの空間分布

それぞれの数字はジェネットの番号を表し、赤は長花柱花、青は短花柱花を表している。



**図 9. G 沢下流域の局所集団内における空間的遺伝構造**

図中の黒点は共有対立遺伝子数 (NAC) のマイクロサテライトマーカー 8 遺伝子座における平均値を表し、エラーバーは標準誤差を表している。上下の点線は、個体のマルチローカス遺伝子型をランダムに 1000 回入れ替えることによって得た、帰無仮説分布における 95% の信頼区間を表す。



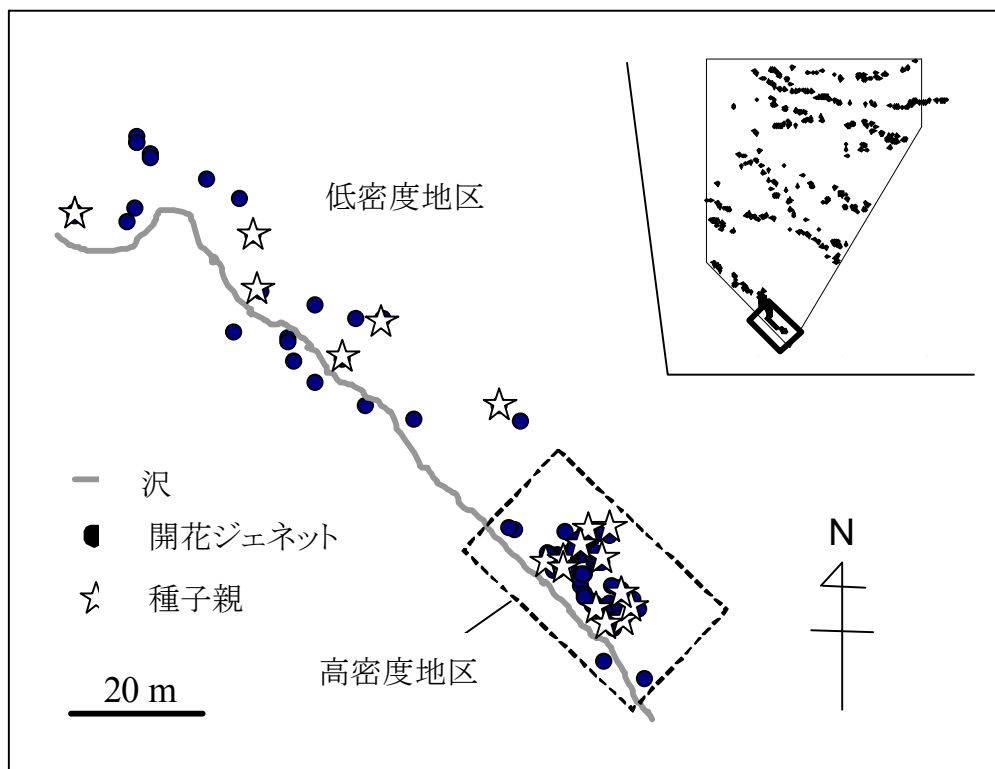
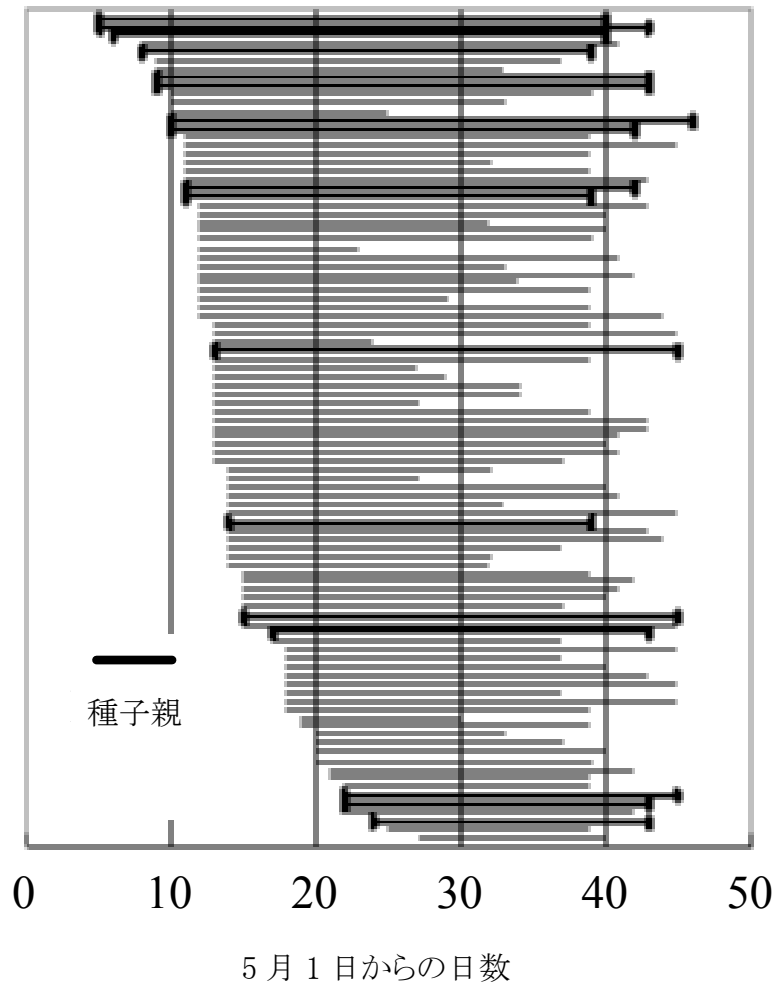


図 10. G 沢下流域の局所集団内における開花ジェネットの空間分布

黒の点はこの調査区内で開花した全 97 ジェネットを、星印は父性解析を行うために種子親として選ばれた 17 ジェネットの分布位置を表している。挿入: 調査した局所集団の八ヶ岳演習林内における分布位置



**図 11. G 沢下流域の局所集団内における各ジェネットの開花期間**

図中の太線は父性解析に用いた種子親の開花期間を、細線はその他のジェネットの開花期間を表している( $n=97$ )。

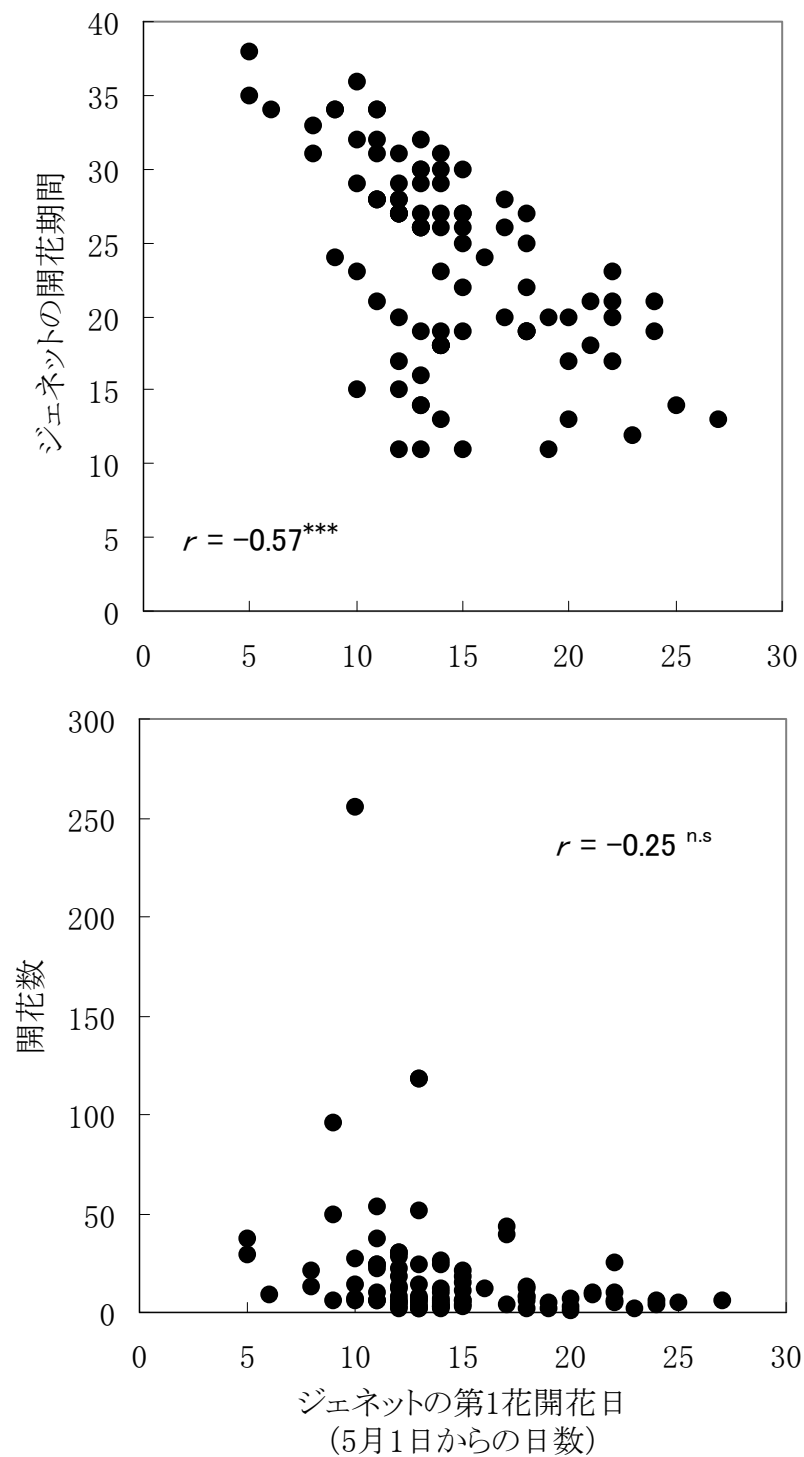


図 12. 第 1 花開花日とジェネットの開花期間、開花数との相関関係

遅く咲き始めたジェネットほど開花期間が短い傾向が認められたが、第 1 花開花日と開花数との間には相関は見られなかった。

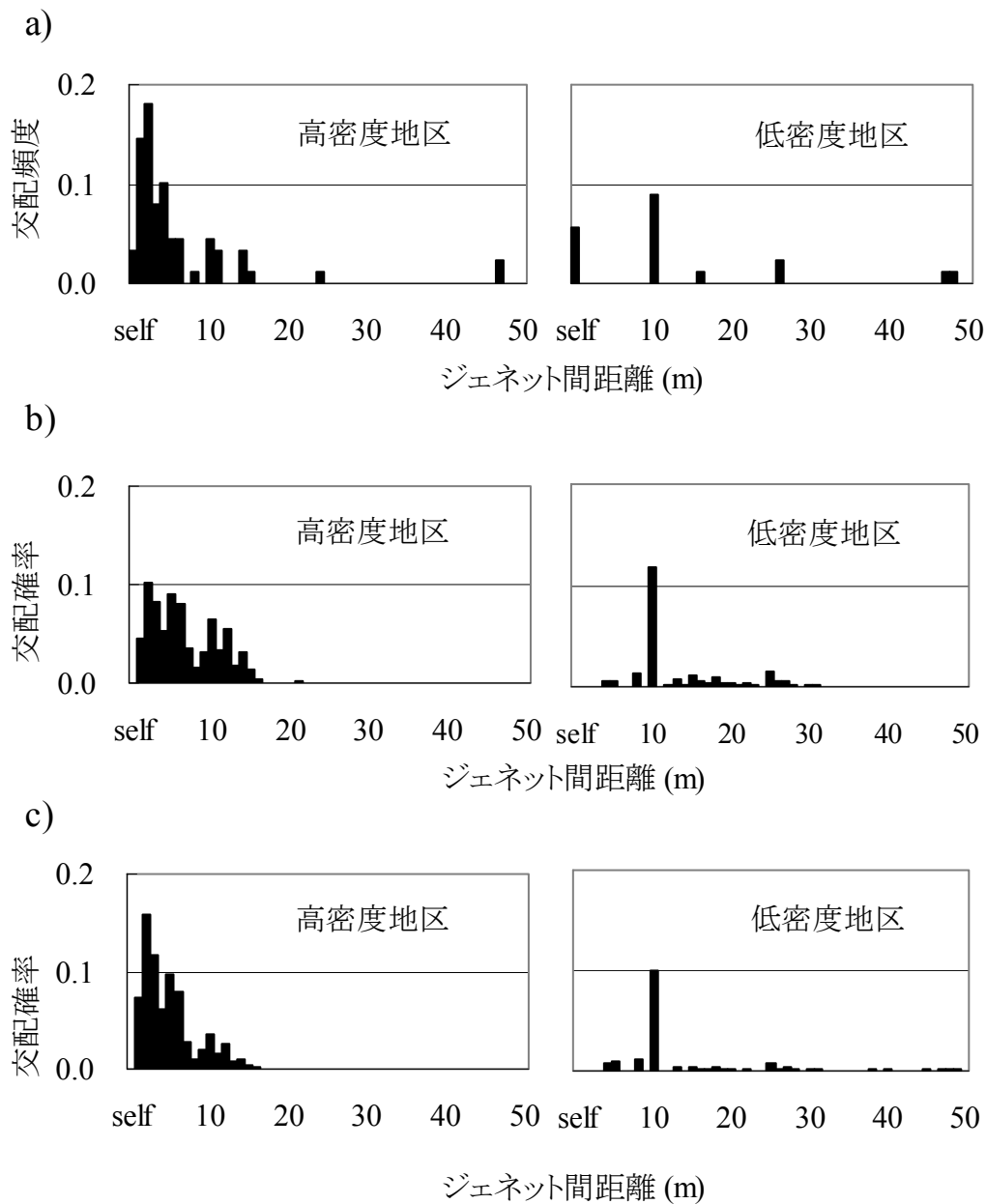


図 13. 花粉の散布距離の頻度分布 (a) 父性解析によって明らかになった花粉の散布距離の頻度分布 (b) 最初に構築した交配モデルによって推定された花粉の流動距離 (c) 改良した交配モデルによって推定した花粉の流動距離

最初に構築した交配モデルでは、個体間距離が交配確率に及ぼす効果は 1 つのパラメーターで記述されたが、改良した交配モデルでは  $\gamma$  と  $\lambda$  の 2 つのパラメーターで記述された。

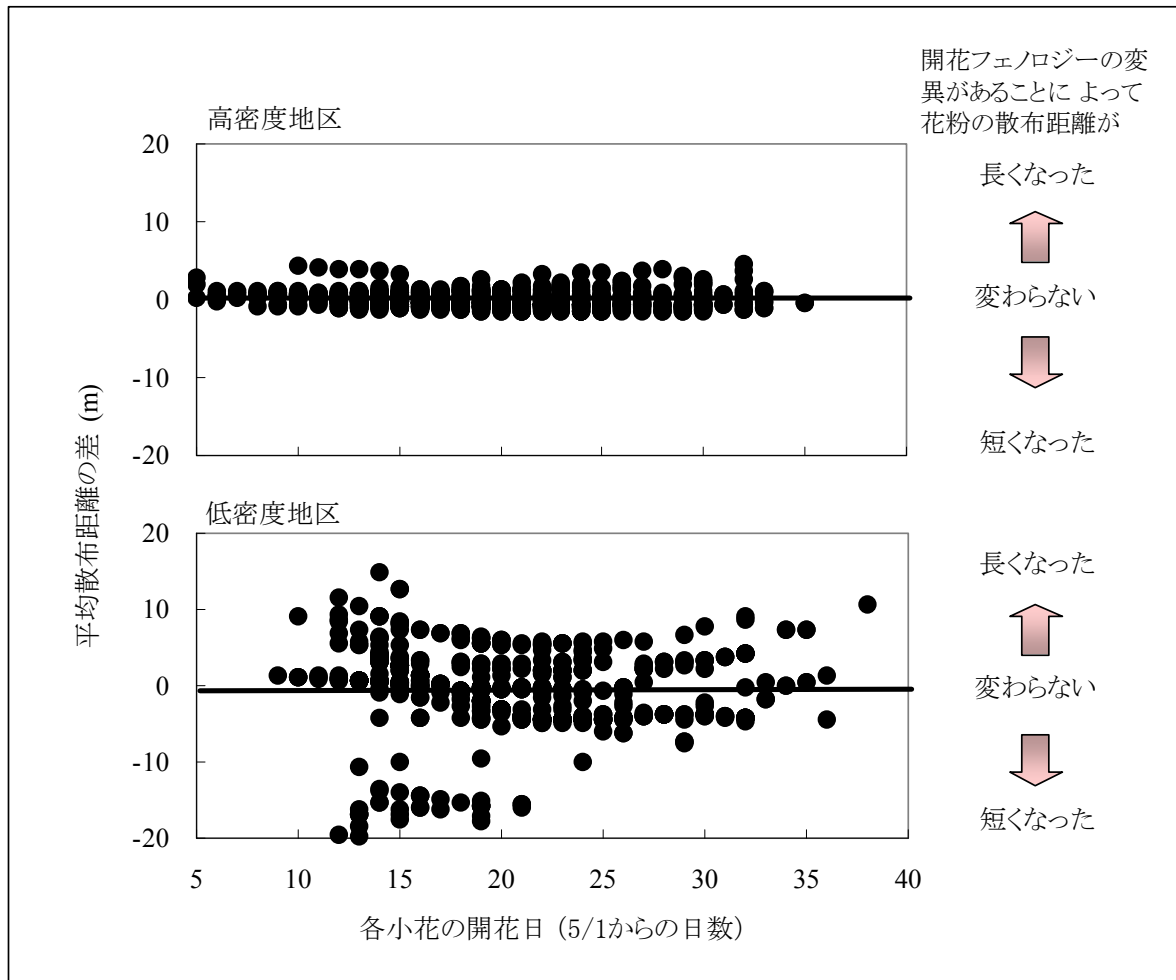


図 14. 開花フェノロジーによって生じる各小花が受粉する花粉の平均散布距離の違い

縦軸の平均散布距離の差は、フェノロジー距離モデルによって推定された平均散布距離から、距離モデルで推定された平均散布距離を引いた値である。この値がプラスの場合は、花粉の平均散布距離が開花フェノロジーの変異があることで長くなったことを意味し、マイナスの場合は短くなったことを意味する。

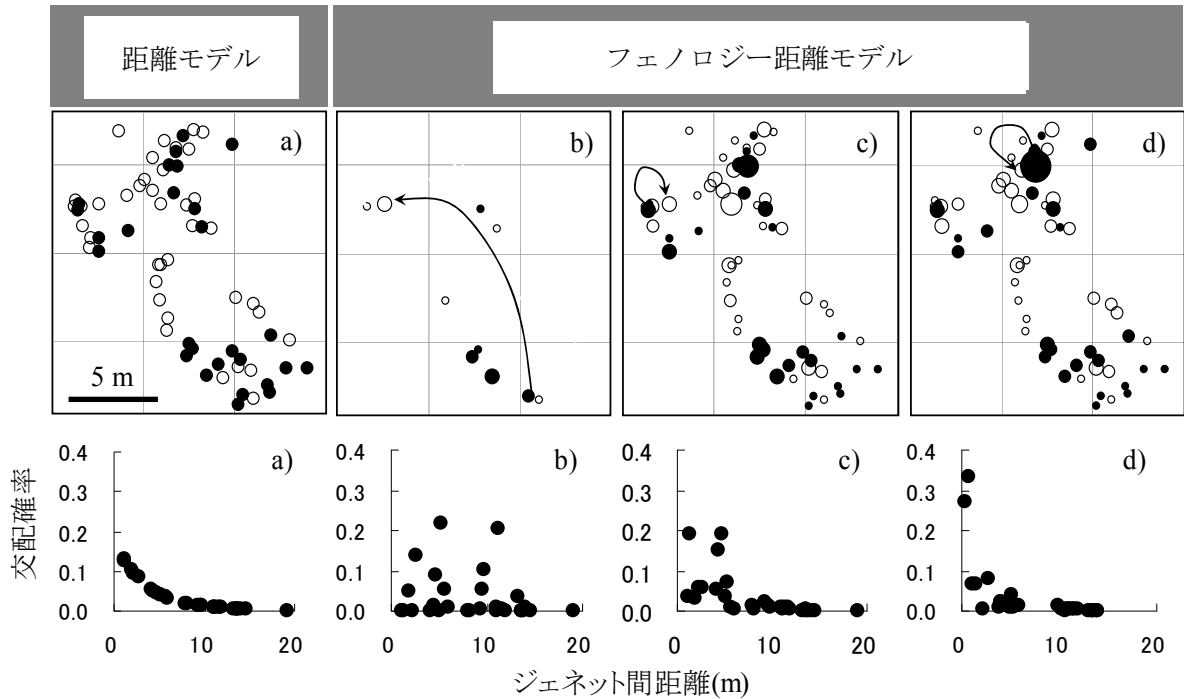
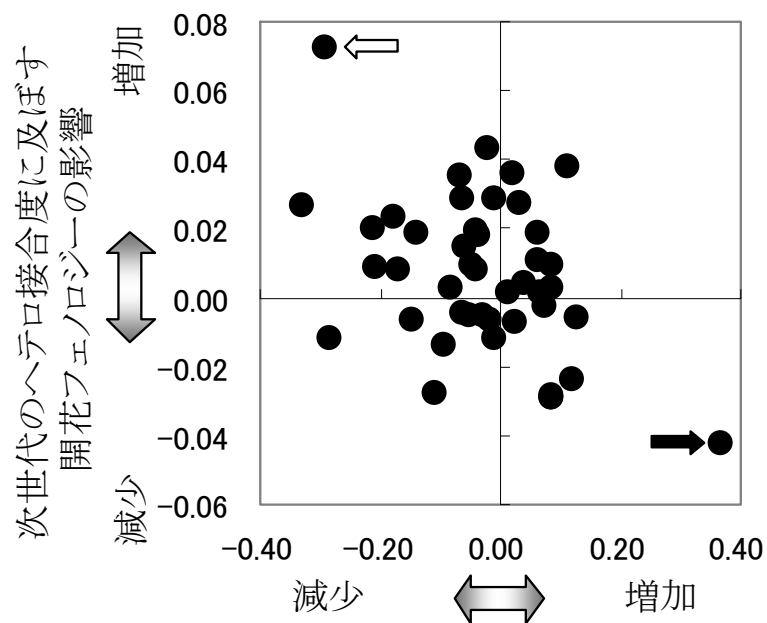


図 15. 開花フェノロジーが花粉の散布距離に及ぼす影響 (a)距離モデルに基づく、開花ジェネットの空間分布と交配確率 (b～d)フェノロジー距離モデルに基づく、開花ジェネットの空間分布と交配確率

上図は、各開花ジェネットの分布位置を表しており(○長花柱花、●短花柱花、丸の大きさはその日の開花数を反映している)、図中矢印は父性解析の結果明らかになった花粉の流れを表している。開花フェノロジーの変異がない仮想的な状況では、全個体が常に同じ数だけ花を咲かせており(上左図)、個体間の交配確率も距離に応じてのみ変動する(下左図)。しかし、実際には日によって各個体の開花数は大きく変動しており(上右 3 枚)、それにともなって花粉流動の空間的制限の程度が強くなったり、緩くなったりする(下右 3 枚)。



近縁個体との交配確率に及ぼす  
開花フェノロジーの影響

**図 16. 開花フェノロジーが近縁個体間の交配確率と次世代のヘテロ接合度に及ぼす影響**

開花フェノロジーの影響は、フェノロジーモデルと距離モデルで交配確率と次世代のヘテロ接合度を比較することにより推定した。開花フェノロジーを考慮することにより、近縁個体との交配確率が低くなったジェネットほど、次世代のヘテロ接合度が高くなっていった( $r = -0.504, p < 0.001$ )。図中の黒矢印は、近傍に大量の花を同調して咲かせたジェネットが分布していたために、花粉の散布距離が短くなったジェネットを指し(図 10d と同じジェネット)、白矢印は近隣個体と開花が同調していなかったジェネットを示す。

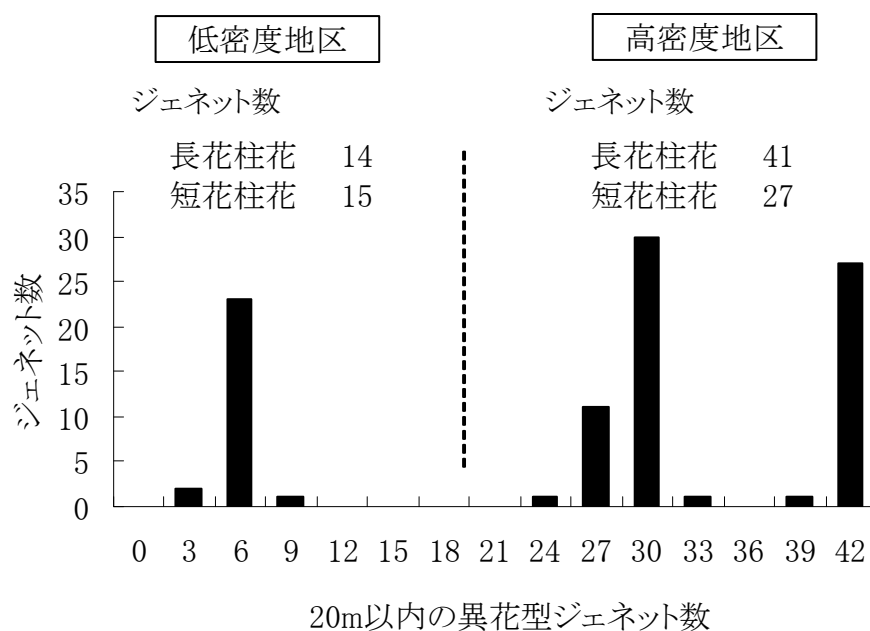


図 17. 高密度地区と低密度地区のグループわけ

調査区内の各ジェネットを、そのジェネットから半径 20m 以内に分布している異花型  
 個体数でグループ分けすると、異花型個体数が 22 個体以上いる高密度地区のジェ  
 ネットと、7 個体以下の低密度地区のジェネットの 2 グループに明瞭に分けられる。





**図 18. 発芽 1 ヶ月後の実生の様子**

実生を真上からデジタルカメラで撮影し、中央のサイズマーカー(9×9mm)をもとに、各実生の葉面積を画像解析ソフト VH Analyzer(キーエンス社)を用いて計測した。

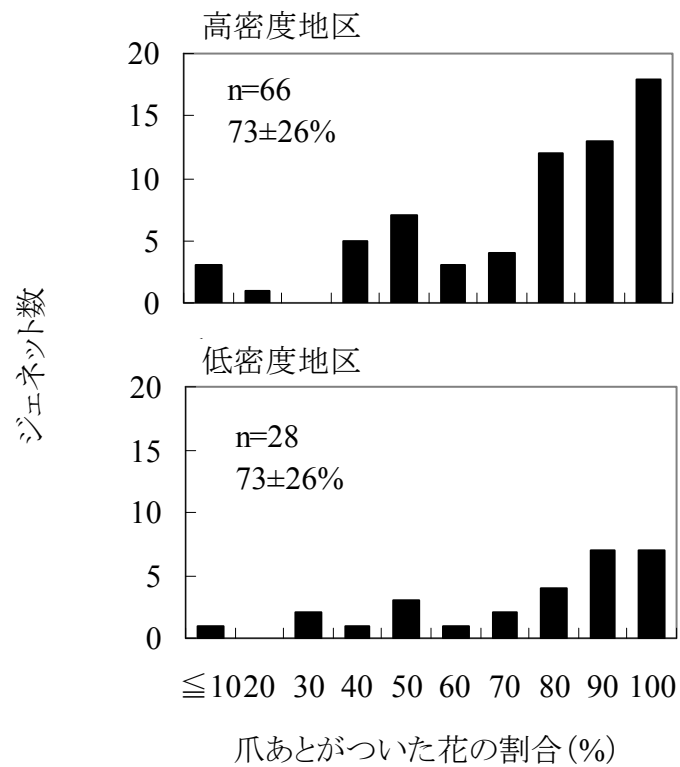


図 19. トラマルハナバチによる訪花率の高密度地区と低密度地区との比較

トラマルハナバチが訪花した際にサクラソウの花弁に残る爪あとを指標として、高密度地区と低密度地区の訪花率を比較したところ、両地区で有意な違いは認められなかった。

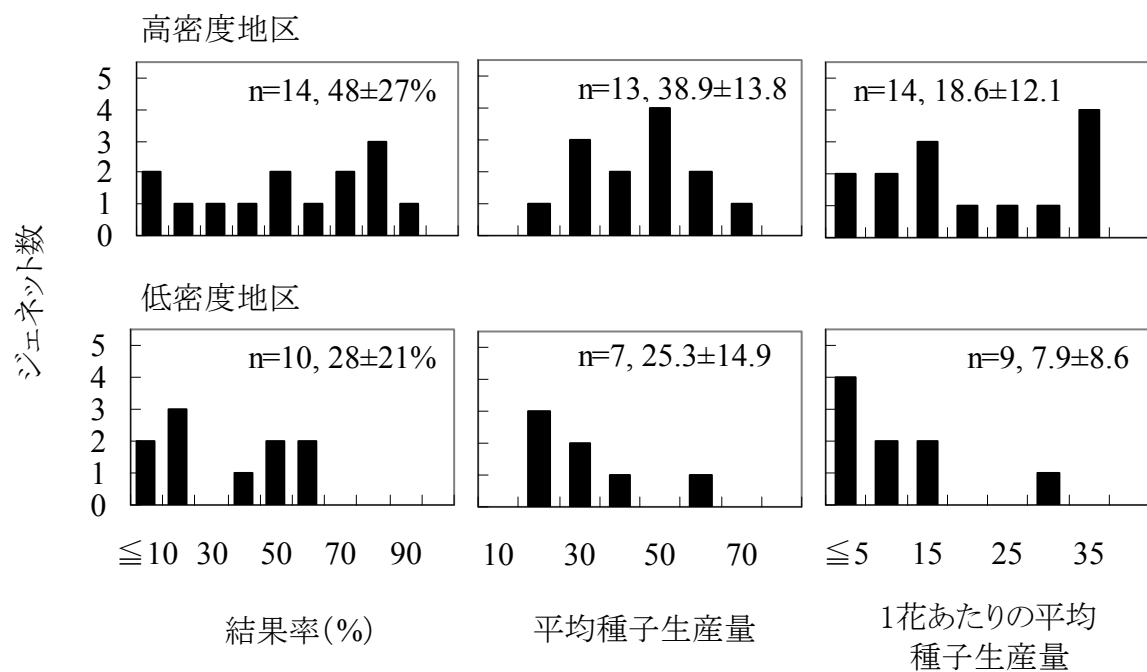
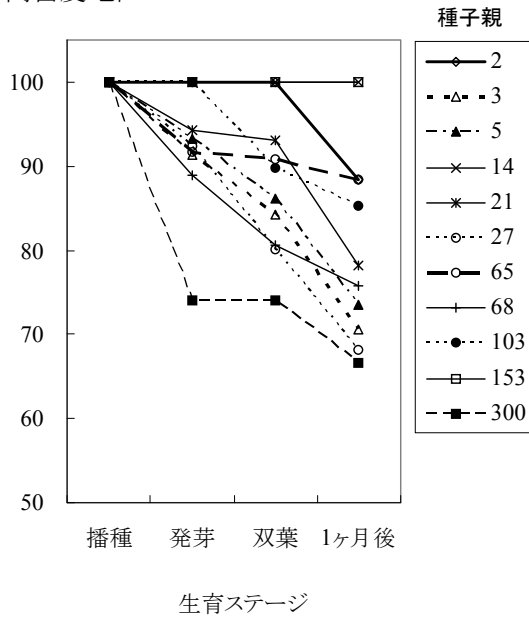


図 20. 種子生産性の高密度地区と低密度地区との比較

低密度地区に分布するジェネットは、高密度地区に分布するジェネットよりも種子生産性が低かった。

a) 高密度地区



b) 低密度地区

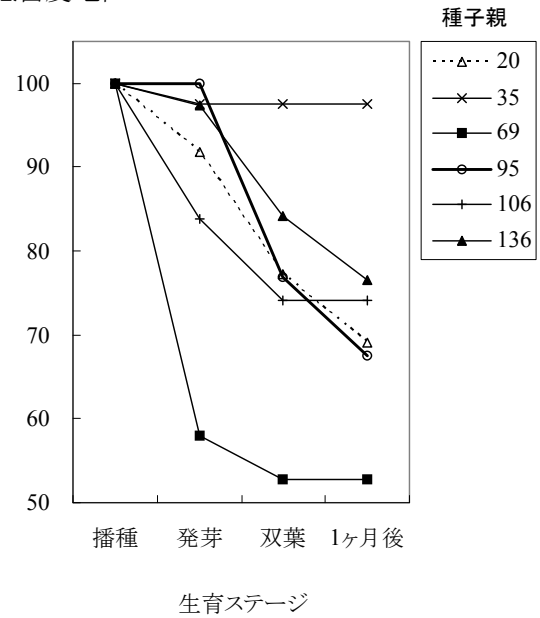


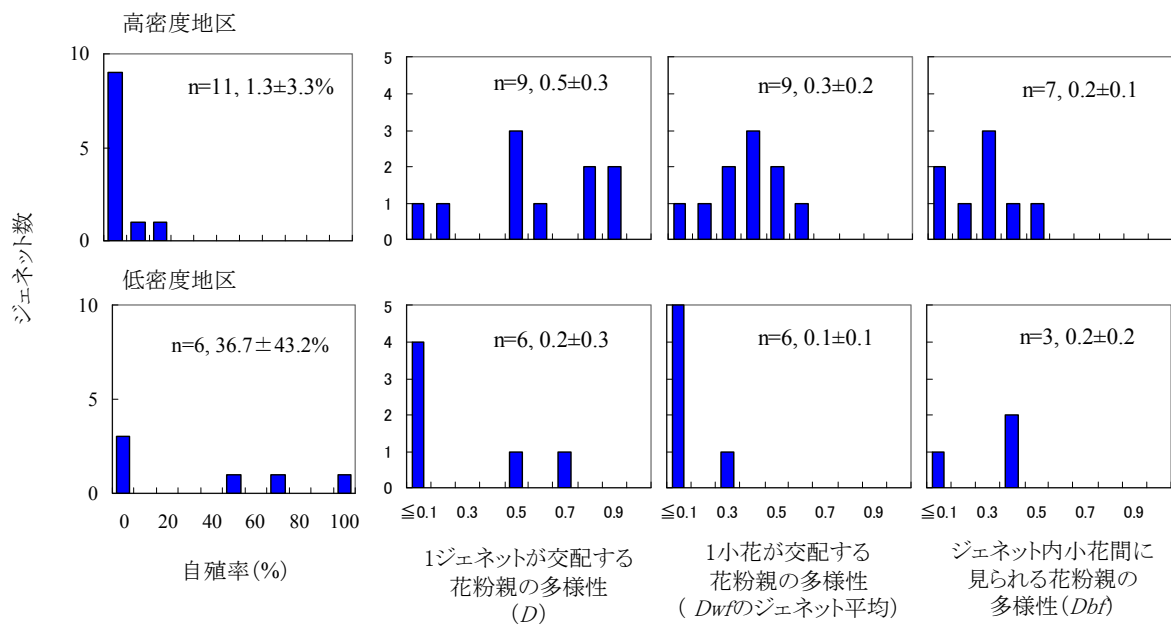
図 21. 実生の生存能力の高密度地区と低密度地区との比較

各生育ステージにおける実生の生存率を果実ごとに求め、それをジェネットごとに平均した値を示す。



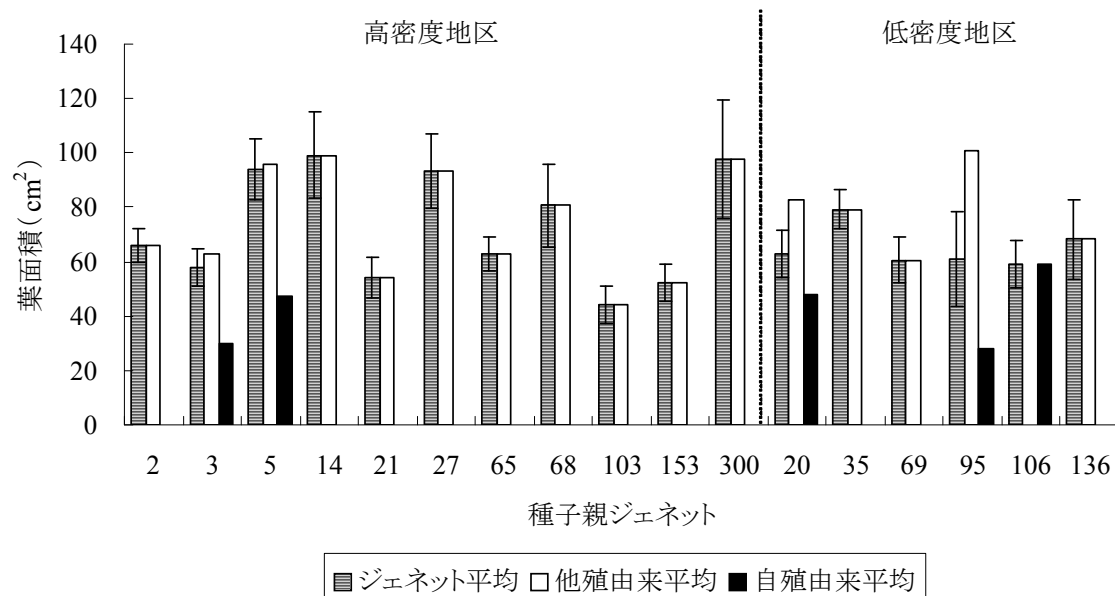
**図 22. 双葉展開時までの実生の生存率が高かった果実(上)と低かった果実(下)**

低密度地区のジェネット95に結実した1果実由来の実生は、双葉展開時までの死亡率が高く、アルビノの個体が2個体観察されたことから、自殖による近交弱勢が発現していると考えられた。



**図 23. 高密度地区と低密度地区における自殖率と花粉親の多様性の比較**

低密度地区に分布するジェネットのほうが、高密度地区と比べて自殖率が高く、花粉親の多様性が低い傾向が認められた。



**図 24. 発芽 1 ヶ月後の実生の葉面積の高密度地区と低密度地区との比較**

各ジェネットが生産した実生の葉面積の平均値を示す。横縞の棒とバーは各ジェネットが生産した全実生の平均値と標準誤差を表し、白色の棒は生産した実生のうち他殖由来の実生のみを集めたときの平均値を、黒色の棒は自殖由来の実生を集めたときの平均値を表している。

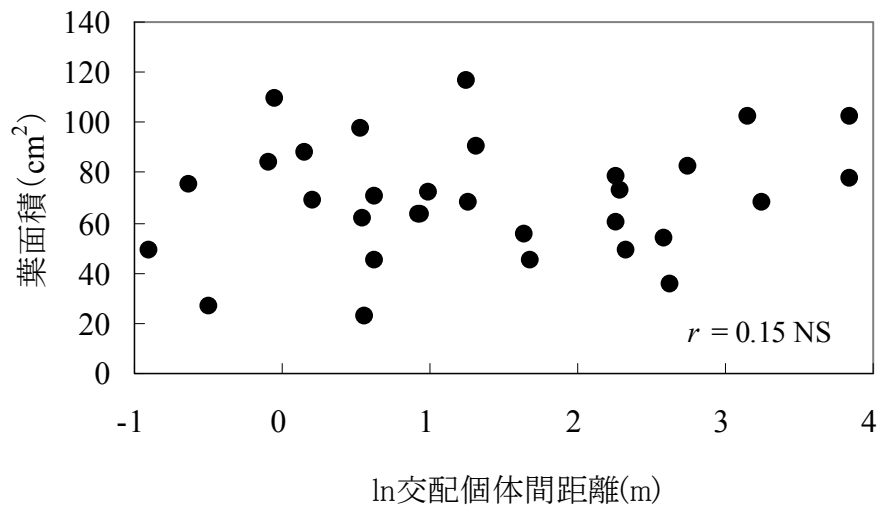
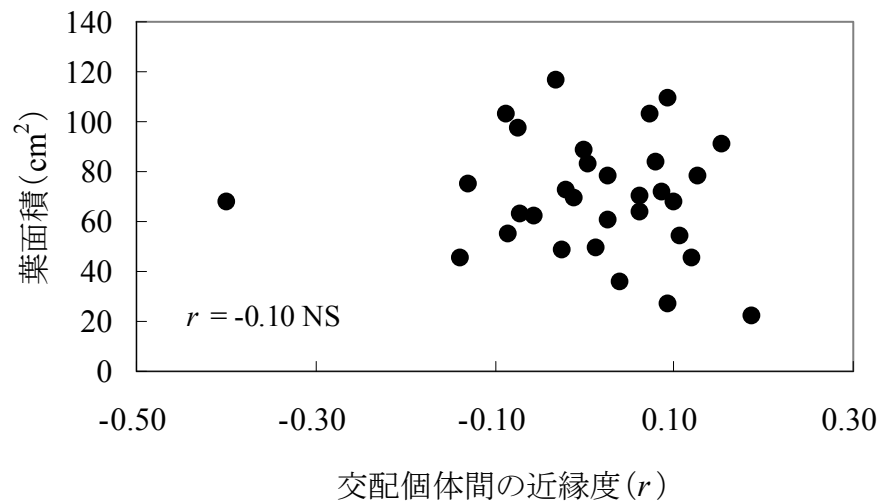
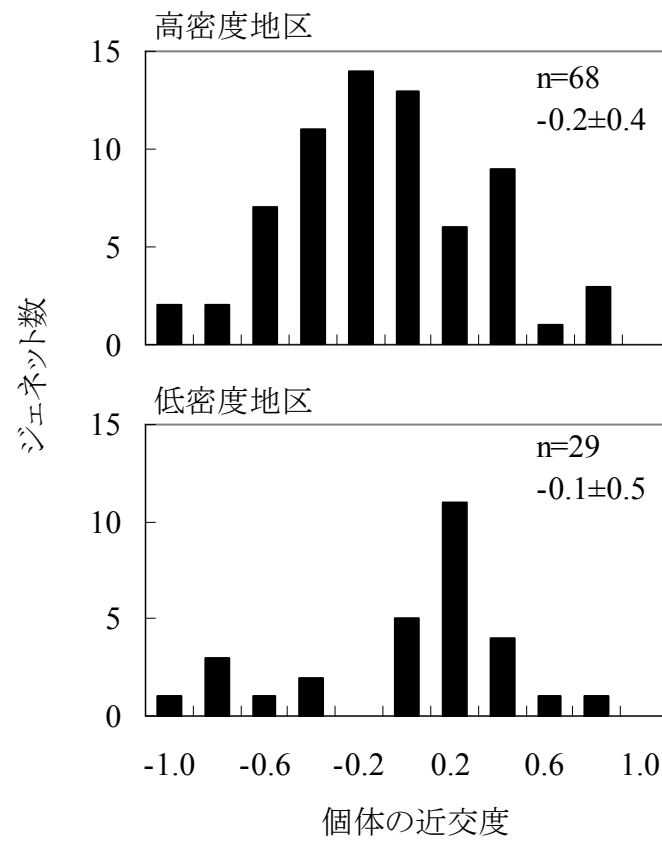


図 25. 交配個体間の近縁度と実生の葉面積との関係(上)、および交配個体間距離と実生の葉面積の関係(下)  
 実生の葉面積は、交配個体間の近縁度とも個体間距離を対数変換した値とも有意な相関を示さなかった。





**図 26. 高密度地区と低密度地区におけるジェネットの近交度の比較**

低密度地区に分布するジェネットのほうが、個体の近交度が高いほうにピークがずれていた。

## 付録:用語説明

### 1. パッチ patch

生物の群集あるいは種が分布しているときに、局所的に形成される相対的に高密度な集団のこと。

溪畔林研究会, 2001, 水辺林管理の手引き-基礎と指針と提言-, 日本林業調査会, 213pp, p.193

### 2. マルチローカス遺伝子型 Multi locus genotype (P.24)

各遺伝子座における遺伝子型を複数の遺伝子座にわたって組み合わせたときの遺伝子型。例えば、以下の例では個体 1 と 2 は遺伝子座 A では同じ AA という遺伝子型を示すが他の遺伝子座での遺伝子型が異なるので、異なるマルチローカス遺伝子型を持つと考える。

| 個体 | 遺伝子座 A | 遺伝子座 B | 遺伝子座 C |
|----|--------|--------|--------|
| 1  | AA     | BB     | CC     |
| 2  | AA     | Bb     | Cc     |

### 3. ヘテロ接合度の観察値 Observed heterozygosity ( $H_o$ ) (P.14)

ある遺伝子座において、対立遺伝子をヘテロ接合の状態で保有する個体の割合。集団内の個体間が近親交配を行っていたり、遺伝的浮動が強く働く場合には、ホモ接合の個体が多くなるためこの値が小さくなる。

$$H_o = \frac{\text{ヘテロ接合を示す個体数}}{\text{全個体数}}$$

### 4. ヘテロ接合度の期待値 Expected heterozygosity ( $H_e$ ) (P.16)

集団内の個体間が任意交配しているときに、対立遺伝子頻度から期待されるヘテロ接合頻度。集団内で観察された対立遺伝子数やその出現頻度に依存するため、集団が保有する遺伝的多様性の指標値としても用いられる。

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^l x_i^2$$

$x_i$  は対立遺伝子  $i$  の出現頻度であり、 $l$  は対象とする遺伝子座において観察された対立遺伝子数。

### 5. 父性排除率 Paternity exclusion probability (P.15)

任意に選択した 1 個体が真の父親ではない場合に、遺伝子型のデータからその個体を「父親ではない」として排除する平均的な確率。母親の遺伝子型が分かっている場合と分かっていない場合とで式が異なる。母親の遺伝子型が既知で、 $k$  個の対立遺

伝子が観察された遺伝子座  $l$  における父性排除率 ( $P_l$ ) は、以下の式によって求められる。

$$P_l = a_1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

$$a_n = \sum_{i=1}^k p_i^n$$

ここで、 $p_i$  は対立遺伝子  $i$  の出現頻度であり、 $a_1=1$  である。

## 6. Allelic richness (P.17)

通常、解析サンプル数 ( $N$ ) が多くなるほど、稀な対立遺伝子がサンプリングされる確率が高くなるため、集団内で観察される対立遺伝子数は多くなる。そのため、異なる集団間で対立遺伝子数を比較する際には、解析サンプル数による違いを補正する必要がある。Allelic richness とは、そのような解析サンプル数による違いを補正したもので、全ての集団中から  $n$  個体サンプリングしたときに出現が期待される対立遺伝子数のことである。

$$Allelic\ richness = \sum_{i=1} \left( 1 - \frac{2n}{2N - N_i} \right)$$

ここで、 $N$  とはある集団における解析個体数を、 $N_i$  はその集団における対立遺伝子  $i$  の観察数を、 $n$  は  $N$  個体中のサブサンプル数 ( $n < N$ ) を表す。したがって、この式は  $N$  個体中から  $n$  個体だけ抽出したときに対立遺伝子  $i$  が少なくとも 1 つ含まれる確率を意味しており、その確率を全ての対立遺伝子について総和したものである。

## 7. 準ニュートン法 The quasi-Newton method (P.17)

最適化問題を解くための方法のひとつ。適当な初期点  $x_0$  から出発して、 $x_{k+1} = x_k - a_k H_k d_k$  によって次の点を生成し、最適解に収束する反復法の一つである。ここでの  $a_k$  はステップ幅(歩幅)、 $d_k$  は探索方向(歩く方向)に相当し、 $H_k$  はヘッセ行列の逆行列の近似行列である。具体的には、以下の手順を踏む。

|                    |  |
|--------------------|--|
| Step1<br>[初期化]     | 初期点 $x_0 \in \mathbb{R}^m$ を選ぶ。<br>$H_0 = I, k = 0$ 。                              |
| Step2<br>[探索方向の計算] | 探索方向ベクトル $d_k = -H_k \nabla f(x_k)$ を計算する。<br>$\nabla f(x_k) = 0$ なら終了。            |
| Step3              | $f(x_k + a_k d_k) < f(x_k) + \beta a_k \nabla f(x_k)' d_k$ を満たすようなステップ幅 $a_k$ を求め、 |

|             |                            |
|-------------|----------------------------|
| [直線探索]      | $x_{k+1}=x_k+a_k d_k$ とする。 |
| Step4       | BFGS 公式などで $H_{k+1}$ を求める。 |
| $[H_k$ の更新] | $k=k+1$ として、step2 に戻る。     |

ここでの  $I$  は単位行列、 $H_k$  はヘッセ行列の逆行列の近似行列、 $\nabla f(x_k)$  は勾配ベクトルである。BFGS 公式による  $H_{k+1}$  の求め方は、以下の式による。

$$H_{k+1} = \left( I - \frac{s_k y_k^t}{s_k^t y_k} \right) H_k \left( I - \frac{y_k s_k^t}{s_k^t y_k} \right) + \frac{s_k s_k^t}{s_k^t y_k}$$

ここで、 $s_k = x_{k+1} - x_k$ 、 $y_k = g_{k+1} - g_k$  である。ニュートン法では、最適解に収束していく際のステップ幅である  $a_k$  が常に 1 であるのに対し、準ニュートン法ではステップ幅 ( $a_k$ ) が最初は控えめになるように設定されているため、最適値を飛び越えることが避けられる。準ニュートン法では、初期値の設定によっては、うまく値が収束しない場合があるが、ニュートン法のようにヘッセ行列を反復ごとに計算する必要がないため、計算効率が良いという利点がある。詳細は、竹内哲ほか編(1989)、統計学辞典、東洋経済新報、pp521-522, p.1004, 東京.参照。

## 8. 同類交配 Assortative mating (P.60)

表現型が似ている個体どうしで交配が行われること。同類交配が行われている集団では、交配にあずかる 2 個体の表現型値に相関があるため、それら 2 個体の遺伝子型値の間にも正の相関が生じ、遺伝子頻度の変化しないにもかかわらず次世代における遺伝分散が増大する。

本研究は環境省環境技術開発等推進費(基礎研究開発課題)による下記の課題名の支援により行われました。ここに記し感謝いたします。

課題名:

**遺伝子地図と個体ベースモデルにもとづく野生植物保全戦略の研究  
—サクラソウをモデル植物として—**

研究課題代表者: 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 鷺谷いづみ

共同研究機関:

独立行政法人 森林総合研究所森林遺伝研究領域ゲノム解析研究室

津村義彦

独立行政法人 国立環境研究所生物多様性研究プロジェクト群集動態研究チーム

竹中明夫

(委託先) 東京大学農学生命科学研究科保全生態学研究室

鷺谷いづみ

(委託先) 東京大学農学生命科学研究科生物測定学研究室

岸野洋久

(委託先) 榊星野リゾート

南 正人

(委託先) 筑波大学農林学系

大澤 良

研究期間: 平成 12 年度～平成 14 年度