

クローンを形成する雌雄異株低木ヒメモチにおける
クローン多様性と遺伝的変異

Clonal diversity and genetic variation in *Ilex leucoclada*,
a clone-forming dioecious shrub

鳥丸 猛

Takeshi TORIMARU

目 次

第1章 序 論	47	6-2-2. 実験方法	67
1-1. 植物のクローン成長	47	6-2-3. データ解析	67
1-2. クローン植物集団の遺伝的変異に関する研究	47	6-3. 結 果	68
1-3. 研究対象のヒメモチ	48	6-3-1. ジェネットの識別と マイクロサテライトマーカーの特徴	68
1-4. 研究の目的	48	6-3-2. クローン多様性	70
第2章 調査地の概要	49	6-3-3. ジェネットの空間分布	70
第3章 ヒメモチの集団内におけるパッチの クローン多様性と遺伝的分化	50	6-3-4. ジェネットの遺伝的構造	70
3-1. はじめに	50	6-4. 考 察	71
3-2. 材料および方法	50	6-4-1. クローン多様性とクローン構造	72
3-2-1. 調査プロットの概要	50	6-4-2. 遺伝的変異と固定指数	73
3-2-2. 野外調査および植物材料	50	6-4-3. 遺伝的構造	73
3-2-3. 実験方法	50	第7章 総合考察	74
3-2-4. データ解析	51	7-1. クローン植物集団への遺伝マーカーの適用	74
3-3. 結 果	52	7-2. ヒメモチ集団の形成と維持機構	74
3-3-1. パッチの空間分布	52	7-2-1. ヒメモチ集団内における個体の空間分布の形成	74
3-3-2. クローン多様性	52	7-2-2. ヒメモチ集団内におけるクローン多様性の創出と維持	75
3-3-3. パッチ内とパッチ間の遺伝的変異	53	7-2-3. ヒメモチ集団内における遺伝的構造の形成と発達	75
3-4. 考 察	55	謝 辞	76
3-4-1. RAPD 解析	55	引用文献	76
3-4-2. クローン多様性の維持	56	摘 要	80
3-4-3. パッチ間の遺伝的分化	56	Summary	81
第4章 ヒメモチのパッチ内における クローン多様性とクローン構造	57	写 真	84
4-1. はじめに	57		
4-2. 材料および方法	57		
4-2-1. 野外調査および植物材料	57		
4-2-2. 実験方法	58		
4-2-3. データ解析	58		
4-3. 結 果	60		
4-3-1. RAPD 表現型によるジェネットの識別	60		
4-3-2. パッチ内のクローン多様性	60		
4-3-3. パッチ内のクローン構造	60		
4-4. 考 察	63		
4-4-1. ジェネットの識別とクローン多様性の推定	63		
4-4-2. パッチ内のクローン多様性	63		
4-4-3. パッチ内のクローン構造	63		
第5章 ヒメモチのマイクロサテライトマーカーの開発と多型性	64		
5-1. はじめに	64		
5-2. 材料および方法	64		
5-2-1. 植物材料	64		
5-2-2. 実験方法	64		
5-2-3. データ解析	66		
5-3. 結果および考察	66		
第6章 異なるヒメモチ集団における遺伝的構成パターン	66		
6-1. はじめに	66		
6-2. 材料および方法	67		
6-2-1. 野外調査および植物材料	67		

第1章 序論

1-1. 植物のクローン成長

「無性生殖」とは、広義には、母親の遺伝子の組換えが起こらず、生じる子供が母親と遺伝的に同一であるような繁殖様式の総称であり、アポミクシス、無配偶子生殖、栄養生殖などの様式を含む。狭義には、配偶子が関係しない生殖方法の総称であり、広義の無性生殖からアポミクシスを除いたものをいう。有性生殖と無性生殖の最も大きな違いは、無性生殖においては受精が起こらないという点である(鈴木 2003)。

「栄養生殖」とは、特に植物において分裂組織が体細胞分裂により娘個体を形成することをいう(鈴木 2003)。植物では、栄養生殖は非常に一般的な生殖方法である。栄養生殖とほぼ同義であるが、生殖による個体数の増加という面に重点がおかれている場合、「栄養繁殖」ということがある。また、多くの植物は、たとえばイチゴの走出枝の先端やワラビの地下茎にある芽のように、親個体の周囲の空間に娘個体を作り出す分裂組織をもっている。このような分裂組織からの栄養生殖によって作り出された娘個体は、その親個体にうりふたつであるばかりでなく、しばしば実際に体制の上でも、生理的にも親個体と結びついている。したがって、このような場合「生殖」という用語を用いることはふさわしくないと考え、かわりに「クローン成長」という用語を用いようとする見解がある(Silvertown 1998)。本研究では、このような見解を踏まえて、栄養生殖ではなく、クローン成長あるいは栄養繁殖という用語を使うことにする。ただし、栄養繁殖を使用する場合は、娘個体が親個体から明らかに離れている場合を想定している。

植物は分節構造でできているため、自由度の高い成長パターンを示す。一本の樹木は、その枝に分節を付け加えることによって垂直方向に伸びる。また、クローン成長をする植物は、その基部から娘個体を分節として付け加えることによって水平方向に広がる。すなわち、クローン成長とは、それぞれの部分に根(不定根)をそなえた分節が付け加わることによる植物の水平方向の伸長成長である、と定義することができる(Silvertown 1998)。このような分節を作り出す分裂組織には、走出枝、匍匐枝、伏条枝、地下茎などの芽や萌芽、根萌芽などが知られている。また、これらは、植物の成長過程においてあらかじめ遺伝的に決定されているものではない(Jeník 1994)。これらの分裂組織は、若枝、大枝、幹、茎、主根、側根など植物体の様々な一次、二次組織から発達する。すなわち、これらの分裂組織は地上部と地下部の両方に見られる。萌芽、根萌芽、不定根は内鞘、形成層、コルク形成層、コルク皮層、根の癒傷組織の中で形成を開始する(Peterson 1975)。幹折れ、枝折れ、茎折れ、地面への接触など外部からの刺激を受けた後、副芽や潜伏芽、不定根は再び発達を開始する。

以上のようにして形成される分節自体は、親個体から分離した時にその各々が独立に存在できる潜在能力をもつ場合がある。通常、このような生理的独立性を重視した個体の単位をラメートと呼ぶ(Harper 1977; Eriksson 1993; Silvertown and Charlesworth 2001)。他方、同一の親個体から作り出されたすべてのラメート

の集合は、一つのクローンを作り上げている。すなわち、その全ての部分はみな同じ遺伝子群を共有している。通常、このような遺伝的に同一である個体の単位はジェネットと呼ばれている(Harper 1977; Eriksson 1993; Silvertown and Charlesworth 2001)。

樹木のクローン成長は主に萌芽、根萌芽、伏条枝や匍匐枝の芽などによる。広葉樹における主要なクローン成長は、萌芽や根萌芽である(例えばヤマナラシ属、サクラ属)(Jeník 1994)。ここで、萌芽とは、木本種において根株の休眠芽や形成層から新たに生じた芽に由来するクローン成長である。また、木本種の根茎から生じた萌芽を特に根萌芽という(鈴木 2003)。地中海周辺、あるいはヨーロッパや北アメリカの乾燥地帯では、老齢である樹木や林業目的のために伐採された樹木において、樹体からの萌芽形成がしばしば認められる(例えば、カバノキ属、クマシデ属、コナラ属、シナノキ属)(Jeník 1994)。日本でも、コナラ属、ブナ属、シイ属などにおいて萌芽形成が認められている(Ohkubo *et al.* 1996; Miura and Yamamoto 2003)。一方、針葉樹には、萌芽を形成する能力はあまりない。それらの針葉樹は、伏条した若枝や匍匐枝の発根によってクローン成長を行うことが認められている(Jeník 1994)。これらのクローン成長では、若枝や大枝が傾斜し、あるいは匍匐することによって地面と接触し、そこから不定根を発達させることによってラメートを作り出す。東シベリアでは、森林限界の低木林を構成するハイマツにおいて伏条によるクローン成長が認められている(Jeník 1994)。日本でも、スギやサワラにおいて、伏条によるクローン成長が認められている(Moriguchi *et al.* 2001; Hayakawa *et al.* 2004)。これらの針葉樹は多雪地帯に生育するため、雪の重みによって枝が接地することによってクローン成長が行われている。

1-2. クローン植物集団の遺伝的変異に関する研究

クローンを形成する植物種に関する集団生物学は、ラメートとジェネットという異なるモジュールレベルで研究されてきた(Harper 1977; de Kroon and van Groenendael 1997; Silvertown and Charlesworth 2001)。集団の大きさ、新規加入、枯死、遺伝的変異、ハーディ・ワインバーグ平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度などの集団の特性は全てジェネット次第で決まってくる。さらに、集団内の進化的変化における潜在的な可能性はジェネットの保有する遺伝的変異に支配される。したがって、ジェネットの識別やその数の決定、ジェネットの空間分布の把握、そしてジェネットの保有する遺伝的変異の定量化(Montalvo *et al.* 1997; Escaravage *et al.* 1998; Pornon *et al.* 2000; Suyama *et al.* 2000)は、クローンを形成する植物集団の個体群動態や小進化の研究にとって不可欠である。

しかし、クローン植物集団に関する従来の生態学的研究は、野外調査においてジェネットの識別が比較的容易な植物に限定されていた。すなわち、掘り取りの労力が少なく、ラメート間の地下部の結合を容易に確認できる草本種(Edward 1984; Reinartz and Popp 1987)、萌芽や根萌芽などによる株立ちが認められるため異なるジェネットの境界が明瞭であるような木本種(Sakai and Burris 1985; Lovett Doust and Lovett Doust 1988;

Cipollini and Whigham 1994; Obeso *et al.* 1998) について研究が行われてきた。

植物集団には、通常、種内において形態形質の表現型に変異が存在し、それらの表現形質の多くは遺伝することが示されている (例えば, Burdon 1980)。しかし、形態形質の表現型はしばしば環境条件によって影響を受ける。したがって、クローン植物集団において、形態形質はジェネットの識別には利用できない場合がある (Widén *et al.* 1994)。環境条件に影響を受けない形質によってクローンは識別される必要が考えられるが、アイソザイムはこれまで最も一般的に利用されてきた遺伝マーカーである。このアイソザイムを用いたジェネットの識別によってクローン植物の集団内に高い遺伝的変異が存在することが認められるようになった (Ellstrand and Roose 1987; Hamrick *et al.* 1992; Widén *et al.* 1994)。しかし、アイソザイムの遺伝的変異の程度は低く、分析可能な遺伝子座に限りがあるためジェネットの識別には不十分な場合がある (例えば, Tani *et al.* 1998; Sydes and Peakall 1998)。

近年、個体識別の指標としてゲノム DNA の塩基配列の違いを検出する遺伝マーカーが開発されている。RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.* 1990), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.* 1995), マイクロサテライト (Tautz 1989) は自然淘汰に対して中立な遺伝マーカーであると考えられている (Wolff and Morgan-Richard 1999)。これらの遺伝マーカーは、PCR (polymerase chain reaction) によって DNA 領域を増幅するため、少量の DNA を用いることで分析が可能である。さらに、RAPD や AFLP は、対象とする種のゲノム情報を必要としないため、簡便に多数の遺伝子座を利用することが可能である。その結果、RAPD や AFLP を用いたクローンの識別が多数報告されている (Hsiao and Rieseberg 1994; Escaravage *et al.* 1998; Sydes and Peakall 1998; Tani *et al.* 1998; Esselman *et al.* 1999; Kreher *et al.* 2000; Pornon *et al.* 2000; Moriguchi *et al.* 2001; Persson and Gustavsson 2001)。一方、マイクロサテライトマーカーは開発のために時間と労力、費用を要するため (Zane *et al.* 2002; Squirrell *et al.* 2003)、自然集団への応用は遅れていた。しかし、マイクロサテライトマーカーは共優性であり、遺伝子座あたりの対立遺伝子が非常に多い。したがって、近年の研究によってマイクロサテライトマーカーがクローンの識別に非常に有効であることが報告されている (Reusch *et al.* 2000; Miwa *et al.* 2001; Van der Velde *et al.* 2001; Nagamitsu *et al.* 2004)。

1-3. 研究対象のヒメモチ

ヒメモチ (*Ilex leucoclada*) はモチノキ科モチノキ属の雌雄異株の常緑低木である。樹高は 1 から 2 m である。北海道南西部と本州の日本海側に分布し、積雪の多い山地のブナ林の林床に生育する。

ヒメモチの繁殖に関わる特性として雌雄異株であることが挙げられる。雄花序は 10 から 20 個の花が束生し、雌花序は 2 から 4 個の花が束生している。花弁は雄花では約 3 mm、雌花では約 4 mm である (写真 1-1, 1-2)。果実は直径約 1 cm の球状の

石果で秋に赤く熟し、4 個の種子をもつ (山崎 1989) (写真 1-3)。ヒメモチの花粉と種子の散布様式に関しては、はっきりとした報告はない。しかし、一般にモチノキ属は花粉が虫媒、種子が鳥散布であるといわれている (渡辺 1994)。また、ヒメモチはこのような種子による繁殖とともに伏条によるクローン成長も行い (写真 1-4)、しばしば、パッチ (集中班) をつくることが認められる (写真 1-5)。しかし、ヒメモチのパッチの形成においてクローン成長と種子による繁殖がどのように影響しているかに関しては知られていない。したがって、このような空間的特性 (パッチ形成) と繁殖特性 (雌雄異株、クローン成長) をもつヒメモチは、クローン植物集団の個体群動態や遺伝的組成の変化 (すなわち、小進化) の素過程を理解する上で興味深い研究対象の一つであると考えられる。

1-4. 研究の目的

1980 年代になって PCR 法が工夫されると、DNA の扱いは飛躍的に簡便になった。それに伴い、RAPD, AFLP, マイクロサテライトなどを検出するために、PCR を用いた様々な多型分析法が工夫されてきた。その結果、クローン植物集団を扱う研究においても、(1) クローン成長によって水平方向に拡大してジェネットが混ざり合ったり、接触したりするために、野外調査においてジェネットの識別が困難であった植物においても、直接的にジェネットを識別できるようになった (例えば, Tani *et al.* 1998; Pornon *et al.* 2000; Suyama *et al.* 2000)。(2) クローン植物集団の構成要素をラメートではなくジェネット、さらに対立遺伝子の組み合わせとして捉えることによって、クローン植物集団の個体群動態や遺伝的組成の変化を明らかにし、集団の形成と維持に関する機構を検討することが可能になった (例えば, Pornon *et al.* 2000; Auge *et al.* 2001; Van der Velde *et al.* 2001; Nagamitsu *et al.* 2004)。

本研究では、RAPD とマイクロサテライトを遺伝マーカーとして用いてクローンを形成するヒメモチのジェネットを識別し、ヒメモチ集団内のクローン多様性と遺伝的変異を明らかにし、その結果をもとにヒメモチの集団の形成と維持機構について検討することを目的とする。

本論文の内容は以下の通りである。第 1 章では、これまで述べてきたように、本研究の背景、研究対象のヒメモチ、研究の目的について述べた。第 2 章では、調査地のある鳥取県大山の立地の概要を述べる。続く第 3 章から第 6 章までの各章では、本研究を構成する 4 つの研究の内容をそれぞれ述べる。第 3 章の研究では、ブナ老齢林内に設置したプロット内のヒメモチ集団全体を対象として、RAPD マーカーを用いてジェネットを識別し、パッチ内のクローン多様性を推定し、パッチ内とパッチ間の遺伝的変異を推定する。続く第 4 章の研究では、前章の研究と同様にヒメモチのジェネットを RAPD マーカーによって識別し、パッチという限られた空間内のクローン構造 (パッチを構成するジェネット数、ジェネットあたりの幹数、各ジェネットの空間分布) を明らかにするとともに、パッチ内のクローン多様性を明らかにする。そして、パッチ内のクローン構造とクローン多様性に影響を及ぼす生態的要因について考察する。第

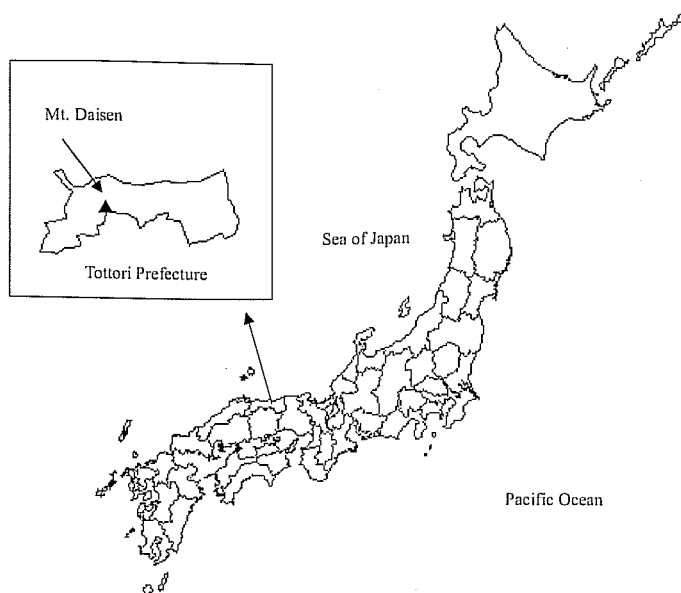


図 2-1. 調査地のある大山の位置
Location of Mt. Daisen where the study site is located

5章の研究では、ヒメモチのマイクロサテライトマーカーを開発し、得られたマーカーの多型性を明らかにする。第6章の研究では、前章の研究で開発されたマイクロサテライトマーカーを用いて、異なる2つのヒメモチ集団において、クローン多様性、遺伝的変異、ハーディ・ワインバーク平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度、遺伝的構造を明らかにし、集団内の遺伝的構成 (genetic architecture) が異なる原因を考察する。最後の第7章では、4つの研究の研究成果をもとにヒメモチ集団の形成と維持に関する機構についての総合的な考察を行う。

第2章 調査地の概要

本研究の調査地は、鳥取県西部に位置し、弥山 (北緯 $35^{\circ} 21' 77''$, 東経 $133^{\circ} 33' 23''$, 標高 1709 m) と剣ヶ峰 (北緯 $35^{\circ} 22' 16''$, 東経 $133^{\circ} 32' 46''$, 標高 1729 m) を主峰とする大山のブナ林である (図 2-1)。大山は大山隠岐国立公園や大山森林生態系保護地域に含まれる。大山北斜面中腹に位置する大山寺 (765 m) において、年平均気温は 10.5 度、月平均気温が 0 度以下を示す月は 1 月 (-1.6 度) と 2 月 (-1.5 度) であり、平均気温が 20 度を越える月は 7 月 (22.4 度) と 8 月 (22.7 度) である。年間降水量は 3400-3500 mm である。降雪期間は約 160 日 (11 月 - 4 月)、積雪は 200-350 cm である (松田 1973)。また、大山を構成する主要な基岩は、古生層と花崗岩類および鮮新世花崗岩類である。大山には標高 650 m から 1350 m にブナ林が存在しているが、現在、800 m 以下の標高では、これまでの土地利用によりブナ林がまれになっている。ブナの老齢林は標高 800 m から 1200 m に成立し、ブナの二次林も

同じ標高域に局所的に分布している (Yamamoto *et al.* 1995)。また、おおよそ標高 800 m 以上のブナ林は、植生学において、チシマザサ、クロモジ、コバノフユイチゴによって特徴付けられるクロモジブナ群集として位置付けられている (宮脇ら 1973)。

日本の冷温帯の気候的極相種はブナ (*Fagus crenata*) であり、そのブナが優占するブナ林が、冬の積雪量の違いに対応して、日本海型と太平洋型とに分けられることはよく知られている。太平洋型のブナ林と日本海型のブナ林は相観的にも組成的にも異なっている。低木層における日本海型と太平洋型のブナ林の大きな違いは、日本海型ではササより低い第二低木層 (ササ幹高以下約 0.3 m まで) が存在することである (鈴木 1949)。第二低木層に乏しく、少雪地である太平洋型のブナ林の林床は、スズクケ、アマギザサ節のササでほぼ 100% 被覆されることが多い。一方、第二低木層が豊富に存在する日本海型の多雪地のブナ林に存在するチシマザサとチマキザサは、林床を 100% 被覆することは少ない。太平洋型でも、ササが林床を完全に被覆しきらないブナ林では多少とも第二低木層が存在する。つまり、第二低木層の有無はササのあり方 (被度) によって決められているといえる (藤田 1986)。さらに、落葉性の低木種に加えて、ユキツバキ (*Camellia japonica*)、エゾユズリハ (*Daphniphyllum macropodium* var. *humile*)、本研究の対象種であるヒメモチ (*Ilex leucoclada*) などの常緑性の低木種が第二低木層に出現することが日本海型のブナ林の特徴である (山崎 1959)。この日本海型ブナ林要素である常緑低木種の存在は、多雪による冬の寒さからの保護という条件以外に、日本海型ブナ林ではササの被覆による直接的な生育阻害が欠けていることによって可能になって

いると考えられる(藤田1986)。本研究の調査地には、このような日本海型ブナ林が広がっている。

第3章 ヒメモチの集団内におけるパッチのクローン多様性と遺伝的分化

3-1. はじめに

クローンを形成する植物集団は、一般的に、局所的に適応した数個のジェネットに占有されていると推測されていた(Loveless and Hamrick 1984)。しかし、主にアイソザイムを用いたジェネットの識別によって、クローン植物集団内に多数のジェネットが存在し、高いクローン多様性(遺伝子型レベルの変異)が存在することが認められるようになった(Ellstrand and Roose 1987; Hamrick *et al.* 1992; Widén *et al.* 1994)。これまで、このクローン植物集団内のクローン多様性がどのような機構によって維持されるかについて議論が行われてきた。Eriksson (1989, 1993) は、実生加入の観点からクローン植物集団のクローン多様性を維持する3種類のモデルを提唱した。(1) 集団の形成初期段階に実生加入が起こり、その後は旺盛なクローン成長のみが起こる [initial seedling recruitment (ISR)]。(2) 集団の発達過程で実生加入が繰り返し起こる [repeated seedling recruitment (RSR)]。(3) 数十年、数百年の間隔で起こるような偶発的な攪乱に乗じて実生加入が起こる [recruitment in windows of opportunity (RWO)]。実際には、実生加入の様式は連続的である。したがって、ISRとRSRは実生加入パターンに関する仮想的なモデルの両極端にある(Eriksson 1993)。一方、生育微環境の不均一性もまたクローン多様性の維持機構の一つとして考えられる。これは、多様化淘汰によりそれぞれの環境に適応した異なる遺伝子型の実生の加入が生じ、生育微環境の不均一な空間に複数のジェネットが共存するというものである(Antonovics and Ellstrand 1984; Ellstrand and Roose 1987)。

遺伝的構造は、ゲーム(分集団)間における遺伝的変異の非ランダム分布として定義できる。遺伝子流動のパターンは遺伝的構造に影響を及ぼす要因の一つである。通常、植物における遺伝子流動は花粉(半数体)と種子(倍数体)によって生じる。遺伝子流動がどのように遺伝的構造化に影響するかは、いつ遺伝子流動が生じるかの時期によって二つの様式に区別できる。

(1) 集団の形成から長期間にわたり遺伝子流動が継続し、かつ遺伝子流動の程度がゲーム間の地理的距離に依存する場合、ゲーム間の遺伝子流動とゲーム内の遺伝的浮動のバランスによって遺伝的分化が生じうる(距離による隔離)。この場合、遺伝的分化は集団の創始イベント(founding events)と関連はなく、集団が形成された後の進化的要因(遺伝子流動と遺伝的浮動)に影響される。(2) ゲームの創始者が遺伝的に異なり、かつその後ゲーム間の遺伝子流動が起こらない場合、ゲーム間に遺伝的分化が生じうる。この場合、集団の形成初期段階にゲーム間の遺伝的分化が生じるかどうか決定される。すなわち、遺伝的分化は集団の創始イベントと関連がある。

本章の研究では、ヒメモチ集団内において、RAPDマーカーを用いてヒメモチのジェネットを識別し、パッチ内のクローン多様性を推定し、パッチ内とパッチ間の遺伝的変異を推定した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 調査プロットの概要

1987-1988年、ブナ老齢林の構造と動態を明らかにすることを目的として、大山の南斜面、標高約1100mの位置に200×200mの4haプロットが設置された(Yamamoto *et al.* 1995)。4haプロットの斜面方位は南東方向で、平均傾斜は約15度である。基岩は安山岩で、土壌は褐色森林土である。林冠高は20から30mに達する。胸高直径4cm以上の幹の毎木調査が、1988年、1990年、1992年、1997年、2002年に実施された。また、林冠ギャップ、ササ、土壌表面のメッシュ調査は、1989年、1998年、2003年に実施された。4haプロット西側は地すべりによる堆積物(主として岩石)で覆われており、未成熟土壌となっている。1988年の時点では、プロット内に3749本の生立幹が認められた(Yamamoto *et al.* 1995)。幹密度において優占する樹種は、ブナ(*Fagus crenata*) (200本ha⁻¹)、ハウチワカエデ(*Acer japonicum*) (168本ha⁻¹)、コシアブラ(*Acanthopanax sciadophylloides*) (88本ha⁻¹)である(Yamamoto *et al.* 1995)。また、その南東部の林床はササに覆われており、その面積はプロットの50%以上を占める。またササ地のほとんどが土壌の発達している場所に存在している(Yamamoto *et al.* 1995)。ササの平均的な自然高は200cm程度である。このブナ老齢林の森林群集は、自然攪乱(ギャップの形成)と林床の不均一な環境(土壌状態の差異とササの有無)の影響を強く受けている(Yamamoto *et al.* 1995)。

3-2-2. 野外調査および植物材料

2000年6月、4haプロットの上部4分の1、すなわち1ha(50×200m)をヒメモチパッチの調査プロットとして設定した。この1haプロット内でヒメモチの幹のパッチを目視で認識し、ナンバーテープを付けて記録した。それぞれのパッチについて、その中心位置、長径と短径を測定した。また、パッチの中心を含むように1×1mのコドラートを設置した。コドラートの中の幹数を記録し、パッチの幹密度を推定した。さらに、幹をランダムに選び、それらの幹から葉を採取した。その際、各パッチのサンプルサイズはパッチを構成する幹の数を反映するようにした。試料はビニール袋に密封し、低温条件下で実験室に搬送後、分析に使用するまで-30℃の冷凍庫内で保存した。

3-2-3. 実験方法

DNAの抽出はMurry and Tompson (1980)のCTAB法を若干改変した方法で行った。また、RAPDプライマーを用いたPCRによるDNAの増幅はWilliams *et al.* (1990)の方法を若干改変して行った。実験に用いた溶液の組成を表3-1に示した。

(1) DNAの抽出

ヒメモチの葉を抽出に用いた。液体窒素を用いて粉末化した試料(50-100mg)を0.9mlの2×CTAB溶液に溶解し、室温で約30分間静置した。クロロフォルム溶液(クロロフォルム:イソアミルアルコール=24:1)を0.9ml加えて、約15分間ゆっくり振倒した後、2380G、室温で15分間遠心分離を行った。上

層だけを回収し、イソプロパノールのみで沈殿を行い DNA の糸状沈殿を確認した後、2380 G, 4 °C で 10 分間遠心分離を行った。上清を捨て、TE 緩衝液 (RNAase 1% を含む) を 0.9 ml 加えて一晩ゆっくと振倒し、RNA の消化と DNA の溶解を行った。核酸抽出用フェノール溶液あるいはフェノールクロロフォルム溶液 (核酸抽出用フェノール溶液: クロロフォルム: イソアミルアルコール = 25: 24: 1) を 0.9 ml 加えて 15 分間振倒し、室温、2380 G で 15 分間遠心分離を行い、上層だけを回収してタンパク質を除去した。0.9 ml のイソプロパノールと 0.09 ml の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え、再び DNA を沈殿させた。そして、70% エタノールで DNA の糸状沈殿を洗浄後、回収した。DNA を 30 分間吸引乾燥させ、TE 緩衝液 1 ml に溶解した。DNA を 0.85% のアガロースゲルと TAE 緩衝液を用いて泳動した。泳動後、紫外線照射下で DNA の濃度を確認し、TE 緩衝液で 1-100 ng/μl に調整した。

(2) RAPD 解析

RAPD プライマーを用いて、DNA 断片の増幅を行った。PCR には、PTC-100TM サーマルサイクラー (MJ RESEARCH) と PTC-100 サーマルサイクラー (MJ RESEARCH) を用いた。

RCR 反応液 (20 μl) の組成を表 3-1 に示した。PCR の反応条件は最初の熱変性を 94°C で 3 分間行った後、熱変性を 94°C で 1 分間、アニーリングを 36°C で 1 分間、伸長反応を 72°C で 2

表 3-1. DNA の抽出と RAPD 解析に用いた溶液の組成
Composition of solutions used for DNA extraction and RAPD analysis

Solution	Composition
2×CTAB buffer	2%(w/v) CTAB
	100 mM Tris-HCl, pH 8.0
	20 mM EDTA
	1.4 M NaCl
	0.4%(w/v) β-mercaptoethanol
TE buffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5
	0.1 mM EDTA
2.0%(0.8%)Agarose gel with TAE buffer	2.0%(0.8%) Agarose
	0.5 μg/ml EtBr
TAE buffer	2 mM Tris-acetate, pH 8.0
	0.05 M EDTA
PCR reaction mixture	0.05-5 μg/l Template DNA
	0.2 mM dATP
	0.2 mM dCTP
	0.2 mM dGTP
	0.2 mM dTTP
	0.5 U <i>Taq</i> polymerase
	20 mM Tris-HCl, pH 8.4
	50 mM KCl
	2 mM MgCl ₂
0.25 μM RAPD primer	

CTAB, Cetyltrimethylammonium bromide; EDTA, Ethylenediaminetetraacet acid; and EtBr, Ethidium bromide.

分間行うサイクルを 50 回行い、最後に伸長反応を 72°C で 5 分間行った。2.0% のアガロースゲルと TAE 緩衝液を用いて、得られた PCR 産物を 50 V の定電圧で約 90 分間電気泳動をした。その後、紫外線照射下で増幅した DNA 産物を確認し、写真に記録した。8 個の DNA サンプルと Operon 10 mer Kit A-E (Operon Technologies, Inc.) の 100 プライマーを用いて、再現性があり多型を示すバンドをあらかじめスクリーニングした。20 種類のプライマーにおいて再現性があり多型を示すバンドが得られたため、これらのプライマーをその後の RAPD 解析に使用した。この解析では、1 ha プロット内に含まれる 27 個のパッチの幹のみを対象とした。

3-2-4. データ解析

(1) ジェネットの識別

RAPD 解析により、各遺伝子座においてバンドが出現する場合を 1、バンドが出現しない場合を 0 として記録した。ここで、遺伝子座とは鮮明で再現性のあるバンドが生じるプライマーの介在領域をいう。バンドが出現する表現型は、二本の相同染色体にあるこの相同な介在領域が両方とも増幅する場合 (優性ホモ接合体) と片方だけが増幅する場合 (ヘテロ接合体) があり、バンドが出現しない表現型は両方とも増幅しない場合 (劣性ホモ接合体) である。バンドの有無を組み合わせた表現型、すなわち多数遺伝子座表現型を決定した。同じ多数遺伝子座表現型をもつ幹を同一ジェネットとして識別した。RAPD マーカーを用いたジェネットの識別能力は、任意交配を仮定した場合に、ある多数遺伝子座表現型が n 回抽出される確率 (P_r) として表すことができる (Sydes and Peakall 1998)。以下にその式を示す。

$$P_r = \left(\prod p_i \right)^{n-1}$$

ここで、 p_i は集団における遺伝子座 i のバンドの有無の頻度である。検出された多数遺伝子座表現型に対して、Dunn-Sidak の方法を用いたボンフェローニの連続補正で算出される確率と P_r を比較した後、全体の有意性について評価した (Sokal and Rohlf 1995)。

(2) クローン多様性の推定

集団全体とパッチ内のクローン多様性を二種類の指数を用いて評価した。まず、これまでよく使用されてきた指数である「識別割合」(proportion distinguishable, G/N) (Ellstrand and Roose 1987) を使用した。この指数は、採取された幹数 (N) に対するジェネット数 (G) の割合として求められる。この値は、0 から 1 までの範囲をもち、採取された幹がすべて異なるジェネットの場合は 1 となる。

もう一つの指数として Simpson の D を使用した (Pielou 1969)。この指数は採取された N 個の幹から任意に 2 幹を取り出したとき、それらが異なるジェネットに属する確率を示す。以下にその式を示す。

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

ここで、 n_i はパッチ内で*i*番目のジェネットの幹数である。この値は、採取された幹がすべて同じジェネットで構成されている場合は0、すべて異なるジェネットで構成されている場合は1となる。

(3) パッチ内とパッチ間の遺伝的変異性

パッチ内とパッチ間のジェネットの遺伝的変異を推定するため、プログラム ARLEQUIN ver. 2.000 を使用して、分子分散分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992; Schneider *et al.* 2000) を行い、RAPD 表現型の変異を解析した。分子分散分析は、ジェネット (RAPD 表現型) 間におけるユークリッド距離に基づく。RAPD バンドの状態は0または1である。したがって、ジェネット間のユークリッド距離は、RAPD 表現型間におけるバンドの不一致数と同じになる。パッチ内のジェネット間におけるバンドの不一致数と異なるパッチのジェネット間におけるバンドの不一致数を Mann-Whitney の *U* 検定で比較することができる。分散分析 (analysis of variance, ANOVA) における平方和は、バンドの不一致数として表すことができる。つまり、分子分散分析は一般的な分散分析と類似している。パッチ内のジェネット間の遺伝的変異を推定するため各パッチの分子分散を推定した。パッチ内の分子分散は、分子分散分析の平方和を $N-1$ で除することで推定できる (Fischer and Matthies 1998)。さらに、分子分散分析によって、パッチ内とパッチ間の分散成分を算出できる。これらの分散成分から、集団遺伝学においてゲーム間の遺伝的分化の程度を示す統計量 F_{ST} と類似した統計量である ϕ_{ST} を算出できる。 ϕ_{ST} の有意性の検定は無作為化検定で行った (Excoffier *et al.* 1992)。また、パッチ間の遺伝距離 (ϕ_{ST}) を分子分散分析から算出した。有意性の検定は無作為化検定で行い、その際ボンフェローニの連続補正を行った (Rice 1989)。パッチ間の遺伝距離行列からプログラム MEGA2 (Kumer *et al.* 2001) を用いてパッチ間の類似度関数図を作成した。類似度関数図は平均距離法 (Sneath and Sokal 1973) を用いて作成した。また、パッチ間の遺伝距離と地理的

距離の相関関係を Mantel 検定によって検定した (Mantel 1967)。この際、パッチ間の地理的距離は、パッチの重心間の距離とした。

3-3. 結果

3-3-1. パッチの空間分布

1 ha プロットには全体で 38 個のパッチが分布していることが認められた (図 3-1)。パッチの平均面積、幹密度はそれぞれ 30.8 ± 28.2 (S.D.) m^2 ($4.3 - 128.0 m^2$)、 18.0 ± 12.0 幹 m^{-2} ($3.0 - 54.0$ 幹 m^{-2}) であった (表 3-2)。大部分のパッチは 1 ha プロットの中央付近に分布していることが認められた。すなわち、パッチの分布は集中的であることが認められた (図 3-1)。

3-3-2. クローン多様性

遺伝解析は、1 ha プロット内に完全に含まれる 27 個のパッチ、合計 215 幹について行った。20 種類の RAPD プライマーを用いることにより、鮮明で再現性のある多型を示す 31 種類のバンドが得られた。31 種類の多型では、潜在的に 2^{31} の RAPD 表現型が得られる。これらの表現型のうち、解析した 215 幹には 166 個の RAPD 表現型が検出された。これらの中で、38 個の RAPD 表現型は複数の幹に認められた。この集団において任意交配を仮定した場合、ある RAPD 表現型が偶然 n 回抽出される確率 (P_r) は、 $1.69 \times 10^{-29} - 2.41 \times 10^{-5}$ であった。38 個の全ての RAPD 表現型において、 P_r はボンフェローニの連続補正による値未満であった。すなわち、RAPD 表現型に基づいたジェネットの識別は集団全体で有意であることが認められた ($P < 0.001$)。二つの RAPD 表現型が異なるパッチで検出された。一つはパッチ 14 と 15 であり、もう一つはパッチ 14 と 16 であった。ジェネットはある一つのパッチに限定して分布すると仮定した場合、27 個のパッチでは合計 168 個のジェネットが存在することになった。27 個のパッチ中 7 個のパッチでは、採取された全ての幹は異なるジェネットであった。その他の 20 個のパッチでは、複数の幹を保有するジェネットが 2 から 16 個認め

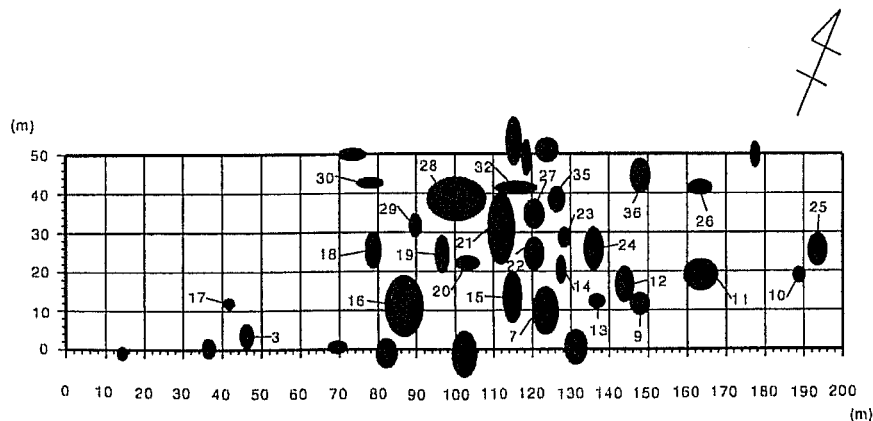


図 3-1. 1 ha プロットで観察されたヒメモチのパッチの分布。図中の番号は、表 3-2 のパッチ番号と対応する Distribution of *Ilex leucoclada* patches observed in the 1-ha plot. The patch forms were approximated to ellipses. The patches with numbers indicate 27 patches that were completely included in the 1-ha plot and were subjected to RAPD analysis; the numbers correspond to the patch numbers in Table 3-2.

表 3-2. ヒメモチの 27 パッチにおいて観察されたジェネット数, 識別割合 (G/N), Simpson の D , 分子分散
The number of genets observed, G/N ratio, Simpson's D , and molecular variance in 27 patches* of *Ilex leucoclada*

Patch	Patch area (m ²)	Stem density (stems/m ²)	Number of sampled stems	Number of genets	G/N †	Simpson's D	Molecular variance
3	15.3	10	6	4	0.67	0.87	3.75
7	61.2	20	4	4	1.00	1.00	3.58
9	19.5	4	5	5	1.00	1.00	3.90
10	8.7	11	5	5	1.00	1.00	4.60
11	52.7	19	9	5	0.56	0.72	3.20
12	30.7	17	7	6	0.86	0.95	3.63
13	9.8	23	5	5	1.00	1.00	4.40
14	11.0	30	9	7	0.78	0.92	4.38
15	45.2	3	13	10	0.77	0.95	4.56
16	116.1	5	11	10	0.91	0.98	4.29
17	4.3	20	5	4	0.80	0.90	1.42
18	26.8	29	8	6	0.75	0.93	4.63
19	23.8	21	7	6	0.86	0.95	5.47
20	16.0	4	6	3	0.50	0.73	3.67
21	93.3	5	13	7	0.54	0.83	4.14
22	30.5	15	9	9	1.00	1.00	3.53
23	10.4	7	3	3	1.00	1.00	4.67
24	38.3	15	9	5	0.56	0.72	1.10
25	29.9	26	8	5	0.63	0.86	3.40
26	16.4	17	6	4	0.67	0.87	6.17
27	28.7	6	10	9	0.90	0.98	3.19
28	128.0	8	18	16	0.89	0.98	3.66
29	12.7	13	5	5	1.00	1.00	3.10
30	12.4	15	9	6	0.67	0.83	3.53
32	24.7	23	15	14	0.93	0.99	3.98
35	19.5	22	5	3	0.60	0.80	1.00
36	31.4	15	5	2	0.40	0.40	0.50
Mean ± S.D.	34.0 ± 31.7 (30.8 ± 28.2)‡	15.0 ± 8.0 (18.0 ± 12.0)‡	8.0 ± 3.6	6.2 ± 3.6	0.79 ± 0.19	0.89 ± 0.13	3.61 ± 1.31
Over 27 patches			215	166	0.77	0.99	5.51

* The 27 patches were completely included in the plot.

† The number of genets (G) relative to that of sampled stems (N).

‡ Mean ± S.D. among all 38 patches are in parentheses.

られた。

27 個のパッチ全体におけるクローン多様性を算出した。識別割合 (G/N), Simpson の D はそれぞれ 0.77, 0.99 であった。次に, 各パッチにおけるクローン多様性を算出した。平均の識別割合と平均の Simpson の D はそれぞれ 0.79 ± 0.19 (S.D.) (0.40 – 1.00), 0.89 ± 0.13 (0.40 – 1.00) であった (表 3-2)。

パッチ内で観察されたジェネットの数はパッチの面積と有意な相関関係にあることが認められた (Spearman の順位相関係数, $r_s = 0.42$, $P < 0.05$)。しかし, 識別割合と Simpson の D はパッチの面積と有意な相関関係が認められなかった。

3-3-3. パッチ内とパッチ間の遺伝的変異

パッチ内とパッチ間におけるジェネット間のバンドの不一致数の平均値は, それぞれ 7.7 ± 3.8 (S.D.) (1.0 – 18.0) と 11.2 ± 2.9 (1.0 – 23.0) であった。パッチ内のジェネット間におけるバンドの不一致数は, 異なるパッチ間のジェネット間におけるバンドの不一致数よりも有意に小さいことが認められた (Mann-Whitney の $U = 1.97 \times 10^6$, $P < 0.001$)。パッチ間の RAPD 表現型の変異もまた有意であり ($\theta_{ST} = 0.316$, $P < 0.001$), パッチ間に遺伝的分化が存在することが認められた (表 3-3)。

パッチ内のジェネット間における分子分散の平均値は 3.61

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Φ_{ST}	P
Among patches	26	379.69	1.75	31.56	0.316	< 0.001
Within Patches	141	536.23	3.80	68.44		

表 3-3.

ヒメモチの27パッチにおける分子分散分析の結果
 Summary of the analysis of molecular variance (AMOVA) on 27 patches of *Ilex leuococlada*. The analysis was based on RAPD phenotypes consisting of 31 band states. The significance test of Φ_{ST} was based on the procedure of 10000 permutations.

	3	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3	0.000											
7	0.162	0.000										
9	0.374	0.238	0.000									
10	0.061	0.153	0.195	0.000								
11	0.253	0.300	0.338	0.174	0.000							
12	0.325	0.048	0.142	0.200	0.278	0.000						
13	0.271	0.131	0.070	0.164	0.185	-0.013	0.000					
14	0.038	0.092	0.255	0.080	0.065	0.141	0.132	0.000				
15	0.035	0.085	0.232	0.066	0.094	0.149	0.084	0.057	0.000			
16	0.124	0.059	0.165	0.046	0.091	0.065	0.036	0.046	0.002	0.000		
17	0.650	0.636	0.576	0.580	0.675	0.580	0.570	0.531	0.509	0.516	0.000	
18	0.191	0.263	0.246	0.103	0.092	0.291	0.244	0.176	0.128	0.126	0.597	0.000
19	0.163	0.163	0.280	0.153	0.111	0.205	0.125	0.112	0.129	0.118	0.410	0.177
20	0.238	0.231	0.354	0.267	0.300	0.320	0.283	0.127	0.197	0.127	0.714	0.196
21	0.224	0.129	0.167	0.101	0.137	0.132	0.101	0.133	0.080	0.050	0.532	0.092
22	0.287	0.228	0.411	0.320	0.277	0.314	0.320	0.228	0.191	0.211	0.552	0.303
23	0.262	0.181	0.235	0.169	0.296	0.225	0.195	0.174	0.180	0.161	0.595	0.151
24	0.549	0.577	0.589	0.464	0.516	0.513	0.434	0.417	0.290	0.331	0.838	0.504
25	0.298	0.352	0.440	0.338	0.360	0.353	0.334	0.257	0.286	0.320	0.605	0.291
26	0.237	0.204	0.202	0.187	0.168	0.174	0.083	0.111	0.191	0.124	0.399	0.167
27	0.408	0.410	0.450	0.316	0.249	0.398	0.330	0.271	0.232	0.281	0.629	0.292
28	0.366	0.337	0.333	0.251	0.206	0.329	0.261	0.252	0.209	0.203	0.537	0.303
29	0.356	0.521	0.435	0.308	0.482	0.496	0.393	0.392	0.380	0.382	0.718	0.291
30	0.404	0.453	0.455	0.392	0.437	0.432	0.368	0.392	0.366	0.391	0.635	0.430
32	0.095	0.201	0.359	0.165	0.299	0.316	0.259	0.181	0.113	0.140	0.514	0.304
35	0.559	0.598	0.607	0.536	0.663	0.561	0.533	0.461	0.470	0.470	0.791	0.561
36	0.337	0.524	0.477	0.385	0.539	0.453	0.356	0.320	0.306	0.324	0.805	0.400

表 3-4.

ヒメモチの27パッチにおける
 パッチ間遺伝距離 (Φ_{ST})
 Pairwise genetic distance (Φ_{ST} , low left triangle of matrix) among 27 patches of *Ilex leuococlada*. Levels of significance were given in the upper right triangle of the matrix: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. The significant tests of Φ_{ST} were based on the procedure of 10000 permutations with the sequential Bonferroni correction.

	3	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3												
7												
9								**			*	
10												
11												
12								**		**	*	
13												
14												
15								**		**		**
16									*			**
17								**			**	
18			**					*			**	**
19	0.000									**		
20	0.268	0.000	**						**			
21	0.156	0.191	0.000	**								**
22	0.152	0.388	0.312	0.000				*		**	**	**
23	0.082	0.219	0.097	0.333	0.000	**				**	**	**
24	0.362	0.647	0.440	0.466	0.617	0.000		**		*	**	**
25	0.180	0.461	0.321	0.302	0.369	0.646	0.000			*	**	**
26	0.081	0.121	0.082	0.185	0.174	0.392	0.233	0.000				
27	0.176	0.448	0.272	0.376	0.302	0.513	0.465	0.296	0.000	**	**	**
28	0.217	0.400	0.266	0.278	0.414	0.457	0.338	0.224	0.225	0.000	**	**
29	0.368	0.529	0.402	0.560	0.453	0.719	0.479	0.376	0.602	0.520	0.000	
30	0.382	0.444	0.370	0.525	0.516	0.651	0.373	0.326	0.571	0.462	0.517	0.000
32	0.209	0.263	0.218	0.290	0.310	0.425	0.333	0.225	0.389	0.272	0.395	0.406
35	0.385	0.664	0.533	0.481	0.638	0.778	0.514	0.298	0.632	0.517	0.697	0.627
36	0.369	0.519	0.361	0.513	0.552	0.792	0.496	0.178	0.652	0.555	0.528	0.374

表 3-5. ヒメモチの 27 パッチにおける有意なパッチ間遺伝距離 (Φ_{ST}) の数

The number of significant pairwise genetic distances (Φ_{ST}) in 27 patches of *Ilex leucoclada*. The significant test of Φ_{ST} were based on the procedure of 10000 permutations with the sequential Bonferroni correction.

Patch	Number of significant Φ_{ST}	Percentage
3	0	0.0
7	0	0.0
9	2	7.7
10	0	0.0
11	0	0.0
12	3	11.5
13	0	0.0
14	0	0.0
15	3	11.5
16	2	7.7
17	2	7.7
18	4	15.4
19	1	3.8
20	2	7.7
21	2	7.7
22	7	26.9
23	3	11.5
24	4	15.4
25	2	7.7
26	0	0.0
27	4	15.4
28	12	46.2
29	3	11.5
30	7	26.9
32	12	46.2
35	6	23.1
36	5	19.2

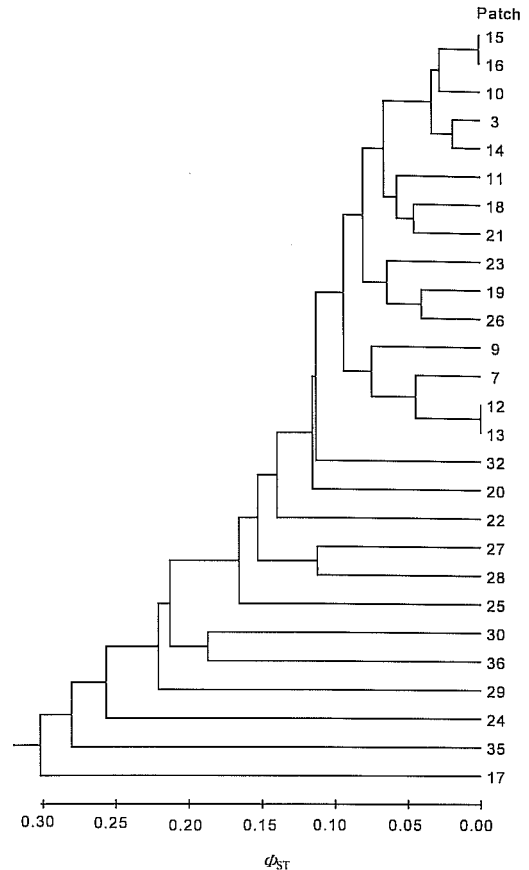


図 3-2. ヒメモチの 27 パッチにおけるパッチ間遺伝距離 (Φ_{ST}) に基づく UPGMA 類似度関係図

UPGMA phenogram based on pairwise genetic distances (Φ_{ST}) among 27 patches of *Ilex leucoclada*

± 1.31 (S.D.) (0.50 – 6.17) であった (表 3-2)。パッチ内のジェネット間における分子分散は、パッチの面積 ($r_s = 0.19$)、識別割合 ($r_s = 0.29$)、Simpson の D ($r_s = 0.38$) と有意な相関関係が認められなかった。

27 個のパッチ間の 351 組における遺伝距離 (Φ_{ST}) において、43 組の遺伝距離は有意な値を示した ($P < 0.05$) (表 3-4)。7 個のパッチはどのパッチとも遺伝距離が有意でなく、9 個のパッチは 4 個以上のパッチと遺伝距離が有意であることが認められた (表 3-5)。地理的距離は遺伝距離を説明できなかった。すなわち、27 個のパッチ間の 351 組における遺伝距離行列は、パッチ間の地理的距離行列と有意な相関関係が認められなかった ($r_s = 0.11$)。パッチ間の遺伝距離を用いて平均距離法によるクラスター解析を行った。類似度関係図においてパッチ 7, 9, 12, 13 はクラスターを形成したが、これだけがパッチの空間位置と関連していた (図 3-2)。

3-4. 考 察

3-4-1. RAPD 解析

本研究では観察された RAPD 表現型が偶然に 2 つ以上の幹に生じる確率は低いことが明らかになった。したがって、パッチ内において同一の RAPD 表現型を示した幹は同じジェネット由来のものであると考えられる。一方、パッチ内には複数の RAPD 表現型が検出された。したがって、本研究の RAPD 解析はパッチ内の異なるジェネットの識別に有効な解析方法であると考えられる。

RAPD マーカーには様々な問題があることが指摘されている。技術上の問題の一つとして、再現性の程度が挙げられる (William *et al.* 1993)。また、解析上の問題として、遺伝子多様度や近交係数はハーディ・ワインバーグ平衡を仮定しないと推定できないことが挙げられる。これらは、RAPD マーカーが優性マーカーであることに起因する (Lynch and Milligan 1994)。しかし、これらの問題があるにもかかわらず、RAPD 解析は実験が簡便であること、多型マーカーが大量に検出可能であることから、生態学や遺伝学の分野で頻りに利用されてきた。

本章の研究では、20個のプライマーを用いて31多型を検出できた。27種のクローン植物のクローン多様性を取りまとめた総説によると、サンプル数を増やすよりも新しいマーカーを解析に加えた方がクローン多様性の検出感度は向上することが報告されている (Ellstrand and Roose 1987)。また、多型を示す30個以上の遺伝子座を用いてRAPD解析を行った場合、集団遺伝学で使用される統計量の推定値の分散は実質上減少しないことが示唆されている (Aagaard *et al.* 1998)。さらに、マーカーについてブーツストラップしたときの統計量の分散は、サンプルについてブーツストラップしたときの統計量の分散よりも約5倍大きいことが示されている (Aagaard *et al.* 1998)。このことは、少ないサンプル数に起因する統計量の分散は、マーカー数を増やすことによって補われることを示唆する (Aagaard *et al.* 1998)。したがって、本研究におけるパッチあたりの少ないサンプル数に起因する統計量の分散は、31個の多型マーカーを用いることによって補われるだろう。ゆえに、本研究では、集団遺伝学の統計量を推定するには比較的サンプル数が少なかったが、集団内の遺伝的変異を検出するのに許容しうだけのRAPD解析であったと考えられる。

3-4-2. クローン多様性の維持

サンプリング計画 (例えば、対象とする空間スケール) がクローン多様性の推定に影響を及ぼす可能性が報告されているため厳密な比較はできないが (Widén *et al.* 1994)、調査したヒメモチ集団のクローン多様性の値 ($G/N = 0.77$, Simpson の $D = 0.99$) は、多数のクローン植物のクローン多様性を取りまとめた総説において算出された Simpson の D などの平均値よりも高い ($G/N = 0.17$, Simpson の $D = 0.62$; Ellstrand and Roose 1987)。したがって、調査したヒメモチ集団は高いクローン多様性を保持していることが考えられる。

パッチ内で同一のRAPD表現型を示した幹が検出された。このことは、ヒメモチのパッチ内にクローン構造が存在することを示す。このようにパッチ内には明らかなクローン成長が認められたが、同時にすべてのパッチは複数のジェネットから構成されていることも認められた。特に、26%のパッチにおいて、採取されたすべての幹は異なるジェネットであった。本研究と同様に、*Pteridium aquilinum* (ワラビ) (Park and Werth 1993)、*Pinus pumila* (ハイマツ) (Tani *et al.* 1998)、*Cryptomeria japonica* (スギ) (Moriguchi *et al.* 2001) などの植物種においても複数のジェネットによってパッチが形成されているという報告がなされている。

本研究で観察された高いクローン多様性の理由として、まず体細胞突然変異が考えられる。なぜならば、*Yushania nihakayamensis* (タケ亜科) (Hisao and Riesenber 1994)、*P. pumila* (ハイマツ) (Tani *et al.* 1998)、*Butomus umbellatus* (ハナイ科) (Fernando and Cass 1996) において、体細胞突然変異がクローン多様性に寄与している可能性が指摘されているからである。そこで、各パッチ内におけるジェネットの合計579個の組み合わせについて調査した結果、7.8%の組み合わせにおいてRAPD表現型の差異は1遺伝子座に起因することが明らかになった。

これらのマーカーの突然変異率は明らかではないが、本研究においても高いクローン多様性の一つの理由として体細胞突然変異が考えられる。

次に、より確からしい理由として、実生によるジェネットの加入が考えられる。実生加入の時期から2つのパターンが推察される。まず第一に、本研究では、果実の生産が認められたことから、現在の集団においても有性生殖が生じていることが考えられる。したがって、ヒメモチの集団の発達途上において実生加入が起こってきたため、現在の集団のクローン多様性が高いことが考えられる。理論的研究によって、定着した集団内において実生加入率は低い場合でさえ高いクローン多様性は維持されることが予測されている (Soane and Watkinson 1979; Watkinson and Powell 1993)。この予測の検証例として *Trifolium repens* (シロツメクサ) の研究がある。おそらく、Burdon (1980) の研究によって明らかになった *T. repens* 集団内の高いクローン多様性は、Barrett and Silander (1992) によって観察されたこの種の連続的な実生加入によって説明されるだろう。第二に、もし、調査したヒメモチ集団が遺伝的に異なる複数の創始者によって形成され、それらの創始者の多くが生き残っているのであれば、それによって現在の高いクローン多様性が説明されるであろう (Eriksson 1993)。例えば、*Populus tremuloides* (ヤマナラシ属) の研究では、現在の実生加入は停止しているにもかかわらず、集団内に高いクローン多様性が検出された (Jelinski and Cheliak 1992)。実際、*P. tremuloides* のいくつかの集団は氷河の後退後の短期間に定着し、その後の後氷期の気候はこの種の実生定着には乾燥しすぎていたことが推察されている (Jelinski and Cheliak 1992)。Eriksson (1993) の説明に従えば、連続的な実生加入の必要はなく、複数の創始者がもし長期間生き残ることができれば、局所集団内のクローン多様性が維持されるだろう。本章の研究では、いくつかのジェネットは集団の創始者であり、それ以外はそれらの子孫であるのかもしれない。

3-4-3. パッチ間の遺伝的分化

本研究では、パッチ間に有意な遺伝的分化が認められた ($\Phi_{ST} = 0.32$)。Nybom and Bartish (2000) の総説では、植物種における集団間の Φ_{ST} の平均値は他殖種で0.28、鳥類の体内通過型種子散布種で0.29であった。したがって、ヒメモチのパッチ間における遺伝的分化の程度は、類似した繁殖システムをもつ植物種の集団分化の程度よりも大きいことが明らかになった。しかし、パッチ間の遺伝距離と地理的距離に有意な相関関係が認められなかった。また、パッチの分布と類似度関係図の間には明確な関連性は認められなかった。したがって、パッチ間に階層的な遺伝的構造は認められないことが示された。

遺伝的浮動の効果を相殺する遺伝子流動が地理的距離の関数である場合、ゲーム間の地理的距離と遺伝距離の間に関連性が認められる (距離による隔離) (Fisher *et al.* 2000)。この場合、近傍のパッチは遺伝的に近縁であり、その結果、パッチ間に階層的な遺伝的構造が認められることが予想される。本研究では、パッチ間の地理的距離と遺伝距離の間に相関関係は認められなかった。また、類似度関係図はパッチの分布を反映していな

かった。以上の結果から、本研究で認められたパッチ間の遺伝的分化は距離による隔離効果に起因する可能性は低いと考えられる。その代わりに、パッチ間に遺伝的分化をもたらす要因の一つとして創始イベント (founding events) が考えられる。パッチの創始者にすでに遺伝的差異が認められる場合、創始イベントはゲーム間の遺伝的分化を引き起こす要因になりうる。したがって、遺伝的に異なる創始者による別々のパッチの創始イベントがパッチ間の遺伝的分化を生じさせたのかもしれない。

ゲーム内の血縁構造化もまたゲーム間の遺伝的分化に寄与する。理論的研究では、血縁構造化はゲーム間の遺伝分散を増大させることが予測されている (Whitlock and McCauley 1990)。この予測は、パッチを形成する草本種である *Silene dioica* (マンテム属) におけるアイソザイムを用いた研究で実証された。S. *dioica* のパッチ内の個体間には、平均して半兄弟以上の血縁関係があることが示され (Ingvarsson and Giles 1999)、それらの S. *dioica* のパッチ間は、遺伝的に有意に分化していることが認められた (Ingvarsson and Giles 1999)。ヒメモチでは、バンドの不一致数はパッチ間よりもパッチ内のジェネット間において有意に小さく、パッチ内のジェネットは近縁関係にあることが示唆される。さらに、パッチの遺伝的組成とパッチ間の遺伝的分化の関連性をより直接的に調べるため、ヒメモチのパッチを遺伝的に「ユニークなパッチ」と「共通パッチ」に分類した。ここで、「ユニークなパッチ」とは、4個以上のパッチと有意な遺伝的分化が認められたパッチとし、「共通パッチ」はそれ以外のパッチとした。「ユニークなパッチ」の分子分散の平均値 (パッチ数 = 9, 平均 = 2.79, S.D. = 1.51) は「共通パッチ」の平均値 (パッチ数 = 18, 平均 = 4.02, S.D. = 1.01) よりも有意に小さいことが認められた (二標本 *t* 検定, $t = 2.52$, $P < 0.05$)。したがって、パッチの血縁構造化によってパッチ間の遺伝分散は増大してきたことが考えられる。

第4章 ヒメモチのパッチ内におけるクローン多様性とクローン構造

4-1. はじめに

生活形、交配様式、種子散布様式などの様々な生活史特性は、植物集団の保有している遺伝的変異とその空間分布に影響を及ぼし (Heywood 1991)、集団内の遺伝的組成は時間的に変化する (Gillespie 1998)。また、遺伝的組換えは有性生殖で起こり、無性生殖では起こらない。したがって、生殖様式 (有性 vs. 無性) も集団内の遺伝的変異とその空間分布に影響を及ぼす重要な要因の一つである (Harada and Iwasa 1996; Winkler and Stöcklin 2002)。有性生殖を行う植物集団では、遺伝的組換えによって新しい遺伝子型が連続的に集団内に供給されるため、遺伝子型レベルの変異が失われることがない。一方、地下茎、匍匐枝、むかご、萌芽、根萌芽などによる栄養繁殖・クローン成長を行う植物集団では、集団内に同じ遺伝子型をもつラメートがパッチ (集中斑) を形成する。しかし、パッチは、有性生殖を行う植物集団においても、種子散布の制限、生育微環境の不均一性、ギャップに依存した加入などによっても形成されうる (例えば、Berg and Hamrick 1994)。このようなジェネットの空間配置は

次に交配パターンに影響を及ぼすことがある (Handel 1985)。例えば、花粉散布が限られている自家不和合性の種において、同じ遺伝子型をもつ個体が集中分布した場合、交配相手が制限される (Eckert and Barrett 1993)。したがって、クローン植物集団においては、集団内の局所スケールにおけるクローン構造に関する知見は小進化の素過程を理解する上で不可欠であろう。

多くの多年生植物は、種子形成を伴う有性生殖と栄養繁殖あるいはクローン成長を行う (Richards 1986)。しかし、生態的、遺伝的要因によって、有性生殖と栄養繁殖・クローン成長を通じて加入してくる個体の割合は変化に富んでいる (Eckert 2002)。これは、集団内のクローン多様性 (遺伝子型レベルの変異) に直接影響を及ぼすことが予想される。栄養繁殖・クローン成長によって生産される子孫は親個体と同じ遺伝子型を示す。したがって、旺盛な栄養繁殖・クローン成長によって形成されたパッチでは、クローン多様性は認められないことが予想される。一方、パッチへの実生加入はクローン多様性を高める効果がある。

第3章の研究によって、ヒメモチのパッチが複数のジェネットから構成されていることだけでなく、クローン成長により幹 (ラメート) が増加し、それによりクローン構造が形成されていることが示唆される。しかし、実際にヒメモチのパッチはどれくらいの数のジェネットから構成されているのか、また、どの程度クローン成長をしているのか (ジェネットを構成する幹数や空間的な広がり) などは不明のままである。そこで、本章の研究では、第3章の研究と同様に RAPD マーカーを用いてヒメモチのジェネットを識別することにより、パッチという限られた空間内のクローン構造 (パッチを構成するジェネット数、ジェネットあたりの幹数、各ジェネットの空間分布) を詳細に明らかにするとともに、パッチ内のクローン多様性を明らかにし、パッチ内のクローン構造とクローン多様性に影響を及ぼす生態的要因について考察した。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 野外調査および植物材料

調査の対象としたヒメモチのパッチは、第3章の研究で使用した 1 ha 調査プロット内において、閉鎖林冠下で、ササの被覆がなく、成熟土壌上に生育するパッチの中から以下に述べるような属性をもつパッチの中からそれぞれランダムに選定した (図3-1)。2001年6月、雄花をもつ幹の優占するパッチ (以下、雄パッチ) を二つ (パッチ 18, 35)、雄花をもつ幹と雌花をもつ幹が混在しているパッチ (以下、雌雄混在パッチ) を一つ (パッチ 15) 選定した。同様に、2002年5月、雌花をもつ幹が優占するパッチ (以下、雌パッチ) を二つ (パッチ 12, 36)、雌雄混在パッチを一つ (パッチ 26) 選定した。そして、各パッチにおいて、パッチを完全に含むようにコドラートを設置し、コドラート内の幹の位置、樹幹長、花の有無、性を記録した。なお、幹の性の判別は、調査時に開花しているものだけで行った。さらに、すべての幹から葉を採取した。試料はビニール袋に密封し、低温条件下で実験室に搬送後、 -30°C の冷凍庫内で分析に使用するまで保存した。2002年10月、これらのパッチ

表 4-1. ヒメモチの 6 パッチにおいて再現性があり多型性を示す断片が得られた 18 種類の RAPD プライマー
Eighteen RAPD primers that yielded reproducible and unambiguous polymorphic fragments in the six patches of *Ilex leucoclada*

Primer	Sequence (5'-3')	No. of polymorphic loci	Patches where polymorphism was detected
OPA-4	AATCGGGCTG	2	Male 1, Male 2, Mixed 1
OPA-7	GAAACGGGTG	2	Female 1
OPA-15	TTCCGAACCC	1	Female 1
OPA-16	AGCCAGCGAA	1	Male 2
OPA-18	AGGTGACCGT	1	Male 1
OPA-19	CAAACGTCGG	2	Male 2, Mixed 2
OPB-1	GTTTCGCTCC	1	Male 2, Female 2, Mixed 1
OPB-5	TGCGCCCTTC	1	Male 2
OPB-6	TGCTCTGCCC	1	Male 1
OPB-7	GGTGACGCAG	1	Female 2, Mixed 1
OPB-10	CTGCTGGGAC	2	Male 2, Female 1
OPB-12	CCTTGACGCA	1	Male 2, Female 2, Mixed 1, Mixed 2
OPB-18	CCACAGCAGT	1	Female 1
OPC-4	CCGCATCTAC	1	Male 1
OPC-6	GAACGGACTC	2	Male 1, Male 2, Female 2, Mixed 1, Mixed 2
OPD-3	GTCGCCGTCA	1	Female 2, Mixed 1, Mixed 2
OPE-9	CTTCACCCGA	1	Male 1
OPE-17	CTACTGCCGT	2	Male 2, Mixed 1, Mixed 2

チについて地形測量を行った。コドラートを 1×1 m の格子に区切り、隣接する格子点間の標高差を記録した。

4-2-2. 実験方法

DNA の抽出と RAPD 解析は第 3 章で述べた実験方法に従った。Operon 10 mer Kit A-E (Operon Technologies, Inc.) の 100 プライマーを用いて、それぞれのパッチにおいて、再現性があり多型を示すバンドが得られるプライマーのスクリーニングをあらかじめ行った。18 種類のプライマーにおいて再現性があり多型を示すバンドが得られたため (表 4-1)、これらのプライマーをその後の RAPD 解析に使用した。

4-2-3. データ解析

(1) ジェネットの識別

RAPD マーカーを用いたジェネットの識別能力を以下の方法で評価した。すべての幹の RAPD 表現型が独立に遺伝的組換えを受けて決定されているときに、パッチ内の N 個の幹のうち少なくとも n 個の幹が偶然に同一の RAPD 表現型になる確率 (P_{ax}) を Park and Werth (1993) の式を改変して求めた。以下にその式を示す。

$$P_{ax} = \sum_{x=n}^N \frac{N!}{x!(N-x)!} (P_{dgen})^x (1 - P_{dgen})^{N-x},$$

ここで、

$$P_{dgen} = \prod_{i=1}^L p_i,$$

p_i は集団における遺伝子座 i のバンドの有無の頻度である。集団における頻度は、第 3 章のサンプルを用いて算出した。また、 L は各パッチで使用した遺伝子座の数である。

(2) クローン多様性の推定と検定

パッチ内のクローン多様性を三種類の指数を用いて評価した。まず、これまでよく使用されてきた指数である「識別割合」(proportion distinguishable, G/N) (Ellstrand and Roose 1987) を使用した。この指数は、パッチ内で採取された幹数 (N) に対するパッチ内のジェネット数 (G) の割合として求められる。この値は、0 から 1 までの範囲をもち、パッチ内で採取された幹が全て異なるジェネットの場合は 1 となる。

二つ目の指数として Simpson の D を使用した (Pielou 1996)。この指数は N 個の幹から構成されるパッチから任意に 2 幹を取り出したとき、それらが異なるジェネットに属する確率を示す。以下にその式を示す。

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

表 4-2. ヒメモチの 6 パッチにおける雄, 雌, 性不明幹の数
The number of male, female, and sexually undetermined stems of the six patches of *Ilex leucoclada*

Patch	Patch area (m ²) ^a	Stem density (stems m ⁻²)	Total no. of stems	No. of stems		
				Male	Female	UD ^b
Male 1	26.8	12.7	341	205 (0.60)	1 (<0.01)	135 (0.40)
Male 2	19.5	9.1	178	41 (0.23)	1 (<0.01)	136 (0.76)
Female 1	30.7	8.1	248	0 (0.00)	79 (0.32)	169 (0.68)
Female 2	31.4	21.4	671	0 (0.00)	208 (0.31)	463 (0.69)
Mixed 1	45.2	8.7	391	54 (0.14)	32 (0.08)	305 (0.78)
Mixed 2	16.4	11.2	184	17 (0.09)	63 (0.34)	104 (0.57)
Overall patches			2013	317 (0.16)	384 (0.19)	1312 (0.65)

^aEstimated on the basis that each patch shape approximated to an ellipse.

^bSexes of stems undetermined since no flowers were recorded.

The proportions of stems in each patch and overall patches are shown in parentheses.

表 4-3. ヒメモチの 6 パッチにおける雄, 雌, 性不明ジェネットの数
The number of male, female, and sexually undetermined genets of the six patches of *Ilex leucoclada*

Patch	No. of stems analyzed	No. of used loci	Total no. of genets	No. of genets		
				Male	Female	UD ^a
Male 1	328	8	15	7 (0.47)	1 (0.07)	7 (0.47)
Male 2	170	10	18	6 (0.33)	1 (0.06)	11 (0.61)
Female 1	248	6	16	0 (0.00)	7 (0.44)	9 (0.56)
Female 2	617	6	31	0 (0.00)	17 (0.55)	14 (0.45)
Mixed 1	381	8	30	7 (0.23)	6 (0.20)	17 (0.57)
Mixed 2	184	9	46	7 (0.15)	21 (0.46)	18 (0.39)
Overall patches	1928		156	27 (0.17)	53 (0.34)	76 (0.49)

^aSexes of genets undetermined since no flowers were recorded.

The proportions of genets in each patch and overall patches are shown in parentheses.

n_i はパッチ内で i 番目のジェネットの幹数である。この値は、パッチが全て同じジェネットで構成されている場合は 0, すべて異なるジェネットで構成されている場合は 1 となる。

Simpson の D はサンプル数や RAPD 表現型の数に影響を受ける。したがって、異なるパッチ間のクローン多様性をより直接的に比較するために、均等性指数 (E) を算出した (Fager 1972)。

$$E = \frac{D_{obs} - D_{min}}{D_{max} - D_{min}},$$

ここで、

$$D_{min} = \frac{(G - 1)(2N - G)}{N(N - 1)},$$

$$D_{max} = \frac{N(G - 1)}{G(N - 1)}.$$

Fager の E は全ての幹が同じ RAPD 表現型をもつときに 0 となり、全ての RAPD 表現型が採取された幹に均等に出現した場合に 1 になる。

これらのクローン多様性の指数は、ハーディ・ワインバーグ平衡や連鎖平衡からの偏りに影響される。したがって、観察されたクローン多様性の程度を任意交配下で期待される程度と比較することによって、栄養繁殖・クローン成長がクローン多様性に及ぼす影響を調べることができる (Hoffmann 1986)。任意交配を仮定した場合に得られるクローン多様性を推定するために、モンテカルロシミュレーションを行った (Hoffmann 1986; McFadden 1997; Ceplitis 2001)。各パッチのサンプル数と同じ数の RAPD 表現型を集団におけるバンドの有無の頻度分布からランダムに作成し、この過程を 1000 回繰り返してクローン多様性の指数を算出した。このシミュレーションによって作成されたクローン多様性の頻度分布とパッチの観察値を比較した。

表 4-5. ヒメモチの 6 パッチにおけるクローン多様性の測定値
Clonal diversity measures for the six *Ilex leucoclada* patches

Patch	G/N^a		Simpson's D		Fager's E	
	Observed	Expected ^b	Observed	Expected ^b	Observed	Expected ^b
Male 1	0.035	0.313 (0.292-0.334)	0.193	0.980 (0.977-0.982)	0.149	0.971 (0.964-0.978)
Male 2	0.096	0.703 (0.660-0.747)	0.628	0.994 (0.993-0.996)	0.584	0.963 (0.948-0.979)
Female 1	0.065	0.144 (0.131-0.158)	0.785	0.934 (0.928-0.939)	0.810	0.941 (0.930-0.952)
Female 2	0.005	0.082 (0.075-0.089)	0.633	0.936 (0.931-0.940)	0.629	0.944 (0.938-0.951)
Mixed 1	0.074	0.287 (0.270-0.305)	0.825	0.980 (0.977-0.982)	0.826	0.973 (0.967-0.979)
Mixed 2	0.245	0.561 (0.523-0.599)	0.937	0.989 (0.987-0.992)	0.915	0.966 (0.952-0.973)

^aThe ratio of number of genets (G) to analyzed stems (N).

^bExpected average values and their 95% confidence intervals (in parentheses) were determined by Monte Carlo simulations, assuming free recombination of each RAPD locus (see text).

パッチの観察値がシミュレーションによって得られた 95% 信頼区間より小さい場合、観察されたクローン多様性はランダムな遺伝的組換えによるものではないことを示す。

(3) ジェネットの幹の空間分布

各パッチにおいて、ジェネットを構成する幹の空間分布を調べた。複数の幹をもつジェネットについて、ジェネットを構成する幹の間の平均距離を算出した。さらに、最も近傍にある幹が同じジェネットに属する確率 (P_N) を算出した。この指数は、異なるジェネットの空間的な混ざり具合を表す。 P_N が小さい値である場合、異なるジェネットは空間的に混ざり合っていることを示す。

4-3. 結果

4-3-1. RAPD 表現型によるジェネットの識別

6 個のパッチには、全部で 2013 個の幹が認められた (表 4-2)。パッチあたりの幹数の平均値は 335.5 ± 188.0 (S.D.) (178 - 671) であった。パッチあたり 6 から 10 個の多型的な遺伝子座を用いてジェネットを識別した。その結果、解析した 1928 個の幹から合計 156 個の RAPD 表現型が検出された (表 4-3)。パッチあたりに検出された RAPD 表現型の平均値は 26.0 ± 12.0 (15 - 46) であった。パッチで使用した遺伝子座数は、検出された RAPD 表現型の数と有意な相関関係はなく ($r_s = 0.147$, $P > 0.05$)、パッチで使用した遺伝子座数によってジェネットの識別能力は影響を受けないことが明らかになった。

検出された 156 個の RAPD 表現型のうち、84 個は複数の幹に認められた。一方、72 個の RAPD 表現型は一つの幹のみに認められた (表 4-4)。複数の幹で検出された RAPD 表現型 (84 個) についてジェネット識別の有効性 (P_{scr}) を検討した。53 個 (63.1%) の RAPD 表現型では、 P_{scr} 値は 0.05 未満であった。一

方、31 個 (36.9%) の RAPD 表現型は 0.05 より大きな P_{scr} 値を示した。また、性に特異的な遺伝子座は認められなかった。

4-3-2. パッチ内のクローン多様性

6 個のパッチは、それぞれ様々な数のジェネットによって構成されていた (表 4-3)。クローン多様性の観察値は、パッチ間に変異が認められた。パッチのクローン多様性を表す識別割合 (G/N), Simpson の D , Fager の E の値は、それぞれ 0.005 - 0.245, 0.193 - 0.937, 0.149 - 0.915 であった (表 4-5)。パッチで検出されたジェネット数や識別割合には、雄パッチ、雌パッチ、雌雄混在パッチの間に傾向は認められなかった。サンプリングされたパッチの数は少ない (各カテゴリーは 2 個ずつのパッチ) ため、統計処理を行うことはできない。しかし、Simpson の D と Fager の E について、雌パッチと雌雄混在パッチは雄パッチよりも大きい値を示す傾向が認められた (表 4-5)。

4-3-3. パッチ内のクローン構造

ジェネットを構成する幹数の平均値は 12.6 ± 3.3 (S.D.) (最大値 = 353) であった (表 4-4)。どのパッチも大きいジェネットが少数と小さいジェネットが多数存在していた (図 4-1, 表 4-4)。雄パッチにおけるジェネットの性比 (雄:雌) は、7:1 と 6:1 であった (表 4-3)。雄パッチで認められた雌ジェネットは、全て小さいジェネットであった。雌パッチには雄ジェネットは認められなかった。雌雄混在パッチにおけるジェネットの性比は、1.17:1 と 0.33:1 であった (表 4-3)。雄ジェネット、雌ジェネット、性不明ジェネットを構成する幹数の平均 \pm S.D. は、それぞれ 22.4 ± 11.4 , 22.7 ± 7.3 , 1.9 ± 0.2 であった。性不明ジェネットは、パッチを構成するジェネットの 39% から 61% を占めていた。

ジェネットを構成する幹は、斜面に沿って分布することが認

表 4-4. ヒメモチの 6 パッチにおける各 RAPD 表現型の幹数と P_{scr} 値

The number of stems and P_{scr} for each RAPD phenotype in the six patches of *Ilex leucoclada*. P_{scr} is the probability of observing at least n stems of each RAPD phenotype by chance in a sample of N stems within patches, if all stems resulted from independent recombination. The proportions of stems in each patch are shown in parentheses.

Patch	Phenotype no.	No. of stems	P_{scr}	Patch	Phenotype no.	No. of stems	P_{scr}
Male 1	1	293 (0.89)	<10 ⁻³⁰⁰	Mixed 1	22	2 (<0.01)	>0.999
	2	20 (0.06)	1.581×10 ⁻¹⁹		23	1 (<0.01)	>0.999
	3	3 (0.01)	7.240×10 ⁻⁴		24	1 (<0.01)	0.999
	4	2 (0.01)	5.453×10 ⁻⁴		25	1 (<0.01)	>0.999
	5	1 (<0.01)	0.217		26	1 (<0.01)	>0.999
	6	1 (<0.01)	0.330		27	1 (<0.01)	>0.999
	7	1 (<0.01)	0.144		28	1 (<0.01)	0.940
	8	1 (<0.01)	0.265		29	1 (<0.01)	0.999
	9	1 (<0.01)	0.113		30	1 (<0.01)	>0.999
	10	1 (<0.01)	0.076		31	1 (<0.01)	0.92
	11	1 (<0.01)	0.369		1	118 (0.31)	1.110×10 ⁻¹⁷⁶
	12	1 (<0.01)	0.023		2	92 (0.24)	3.810×10 ⁻¹⁴⁵
	13	1 (<0.01)	0.581		3	38 (0.10)	2.459×10 ⁻³⁰
	14	1 (<0.01)	0.265		4	35 (0.09)	9.772×10 ⁻²⁸
	15	1 (<0.01)	0.113		5	27 (0.07)	3.638×10 ⁻²⁷
Male 2	1	91 (0.28)	2.537×10 ⁻²⁹⁸	6	14 (0.04)	8.751×10 ⁻⁹	
	2	44 (0.13)	6.372×10 ⁻⁷⁷	7	14 (0.04)	3.294×10 ⁻⁸	
	3	4 (0.01)	7.472×10 ⁻¹⁴	8	13 (0.03)	6.636×10 ⁻⁶	
	4	4 (0.01)	2.630×10 ⁻¹²	9	4 (0.01)	0.773	
	5	4 (0.01)	2.070×10 ⁻⁷	10	3 (0.01)	0.033	
	6	3 (0.01)	1.950×10 ⁻⁷	11	3 (0.01)	0.352	
	7	3 (0.01)	2.660×10 ⁻⁶	12	2 (0.01)	0.244	
	8	3 (0.01)	1.068×10 ⁻⁵	13	2 (0.01)	0.476	
	9	3 (0.01)	1.376×10 ⁻⁵	14	1 (<0.01)	0.172	
	10	3 (0.01)	2.677×10 ⁻¹	15	1 (<0.01)	0.833	
	11	1 (<0.01)	0.011	16	1 (<0.01)	0.959	
	12	1 (<0.01)	0.012	17	1 (<0.01)	0.464	
	13	1 (<0.01)	0.332	18	1 (<0.01)	0.312	
	14	1 (<0.01)	0.049	19	1 (<0.01)	0.662	
	15	1 (<0.01)	0.050	20	1 (<0.01)	0.480	
	16	1 (<0.01)	0.017	21	1 (<0.01)	0.307	
	17	1 (<0.01)	0.019	22	1 (<0.01)	0.991	
	18	1 (<0.01)	0.001	23	1 (<0.01)	0.789	
Female 1	1	89 (0.36)	7.337×10 ⁻¹⁴⁷	24	1 (<0.01)	0.437	
	2	59 (0.24)	2.780×10 ⁻⁶⁶	25	1 (<0.01)	0.884	
	3	37 (0.15)	3.234×10 ⁻²³	26	1 (<0.01)	0.299	
	4	21 (0.08)	9.556×10 ⁻²²	27	1 (<0.01)	0.532	
	5	8 (0.03)	0.003	28	1 (<0.01)	0.331	
	6	7 (0.03)	2.754×10 ⁻⁵	29	1 (<0.01)	0.648	
	7	6 (0.02)	0.378	30	1 (<0.01)	0.814	
	8	5 (0.02)	0.985	1	38 (0.21)	4.115×10 ⁻³⁵	
	9	5 (0.02)	>0.999	2	12 (0.06)	3.038×10 ⁻¹⁷	
	10	3 (0.01)	0.334	3	11 (0.06)	4.503×10 ⁻²⁷	
	11	2 (0.01)	0.058	4	11 (0.06)	4.615×10 ⁻⁶	
	12	2 (0.01)	0.677	5	10 (0.05)	1.253×10 ⁻¹¹	
	13	1 (<0.01)	0.994	6	8 (0.04)	5.866×10 ⁻¹¹	
	14	1 (<0.01)	>0.999	7	8 (0.04)	5.866×10 ⁻¹¹	
	15	1 (<0.01)	0.878	8	7 (0.04)	6.409×10 ⁻¹³	
16	1 (<0.01)	0.989	9	7 (0.04)	6.899×10 ⁻¹¹		
Female 2	1	353 (0.57)	<10 ⁻³⁰⁰	10	7 (0.04)	0.011	
	2	119 (0.19)	6.860×10 ⁻⁹⁴	11	6 (0.03)	1.044×10 ⁻⁹	
	3	23 (0.04)	2.704×10 ⁻¹⁰	12	6 (0.03)	5.644×10 ⁻⁵	
	4	21 (0.03)	1.979×10 ⁻⁷	13	4 (0.02)	1.340×10 ⁻⁵	
	5	20 (0.03)	0.221	14	4 (0.02)	0.040	
	6	14 (0.02)	0.939	15	4 (0.02)	0.057	
	7	8 (0.01)	>0.999	16	4 (0.02)	0.577	
	8	6 (0.01)	0.837	17	3 (0.02)	0.001	
	9	6 (0.01)	>0.999	18	2 (0.01)	7.291×10 ⁻⁵	
	10	5 (0.01)	>0.999	19	2 (0.01)	9.043×10 ⁻⁵	
	11	4 (0.01)	0.064	20	2 (0.01)	9.043×10 ⁻⁵	
	12	4 (0.01)	>0.999	21	2 (0.01)	8.879×10 ⁻⁴	
	13	4 (0.01)	>0.999	22	2 (0.01)	0.074	
	14	3 (<0.01)	0.985	23	2 (0.01)	0.270	
	15	1 (<0.01)	0.878	24	1 (0.01)	0.011	
	16	1 (<0.01)	0.989	25	1 (0.01)	0.083	
	1	353 (0.57)	<10 ⁻³⁰⁰	26	1 (0.01)	0.118	
	2	119 (0.19)	6.860×10 ⁻⁹⁴	27	1 (0.01)	0.136	
	3	23 (0.04)	2.704×10 ⁻¹⁰	28	1 (0.01)	0.004	
	4	21 (0.03)	1.979×10 ⁻⁷	29	1 (0.01)	0.296	
	5	20 (0.03)	0.221	30	1 (0.01)	0.001	
6	14 (0.02)	0.939	31	1 (0.01)	0.013		
7	8 (0.01)	>0.999	32	1 (0.01)	0.697		
8	6 (0.01)	0.837	33	1 (0.01)	0.468		
9	6 (0.01)	>0.999	34	1 (0.01)	0.974		
10	5 (0.01)	>0.999	35	1 (0.01)	0.025		
11	4 (0.01)	0.064	36	1 (0.01)	0.026		
12	4 (0.01)	>0.999	37	1 (0.01)	0.069		
13	4 (0.01)	>0.999	38	1 (0.01)	0.040		
14	3 (<0.01)	0.985	39	1 (0.01)	0.028		
15	3 (<0.01)	0.996	40	1 (0.01)	0.103		
16	3 (<0.01)	0.998	41	1 (0.01)	0.505		
17	2 (<0.01)	0.541	42	1 (0.01)	0.505		
18	2 (<0.01)	0.812	43	1 (0.01)	0.233		
19	2 (<0.01)	0.995	44	1 (0.01)	0.884		
20	2 (<0.01)	0.998	45	1 (0.01)	0.884		
21	2 (<0.01)	>0.999	46	1 (0.01)	0.679		

表 4-6. ヒメモチの 6 パッチにおける複数幹をもつジェネットの数, 同一ジェネット内の平均幹距離および P_{IN} 値
The number of multi-stemmed genets, average distances between stems of the same genet, and P_{IN} for the six patches of *Ilex leucoclada*

Patch	No. of multi-stemmed genets	Average distance between stems of the same genet	P_{IN}^a
Male 1	4	174.0 (40.7)	0.909
Male 2	10	107.5 (66.4)	0.735
Female 1	12	146.3 (66.9)	0.621
Female 2	22	201.0 (97.4)	0.385
Mixed 1	13	165.2 (86.4)	0.641
Mixed 2	23	123.3 (43.9)	0.179

^aThe probability of the nearest neighbor being of the same genet.
Standard errors are shown in parentheses.

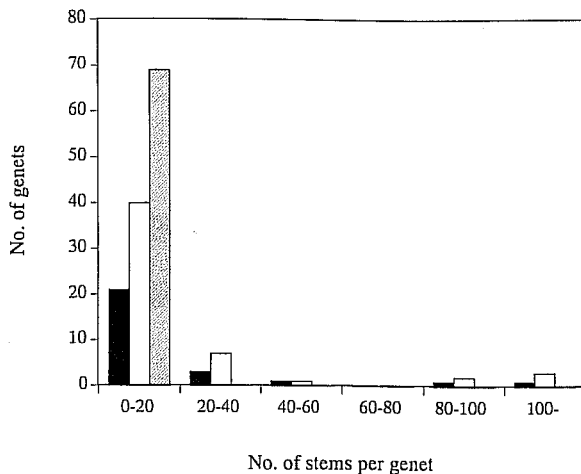


図 4-1. ジェネットあたりの幹数の頻度分布

Frequency distribution of the number of stems per genet. Black bars, male genets; white bars, female genets; and hatched bars, sexually undetermined genets

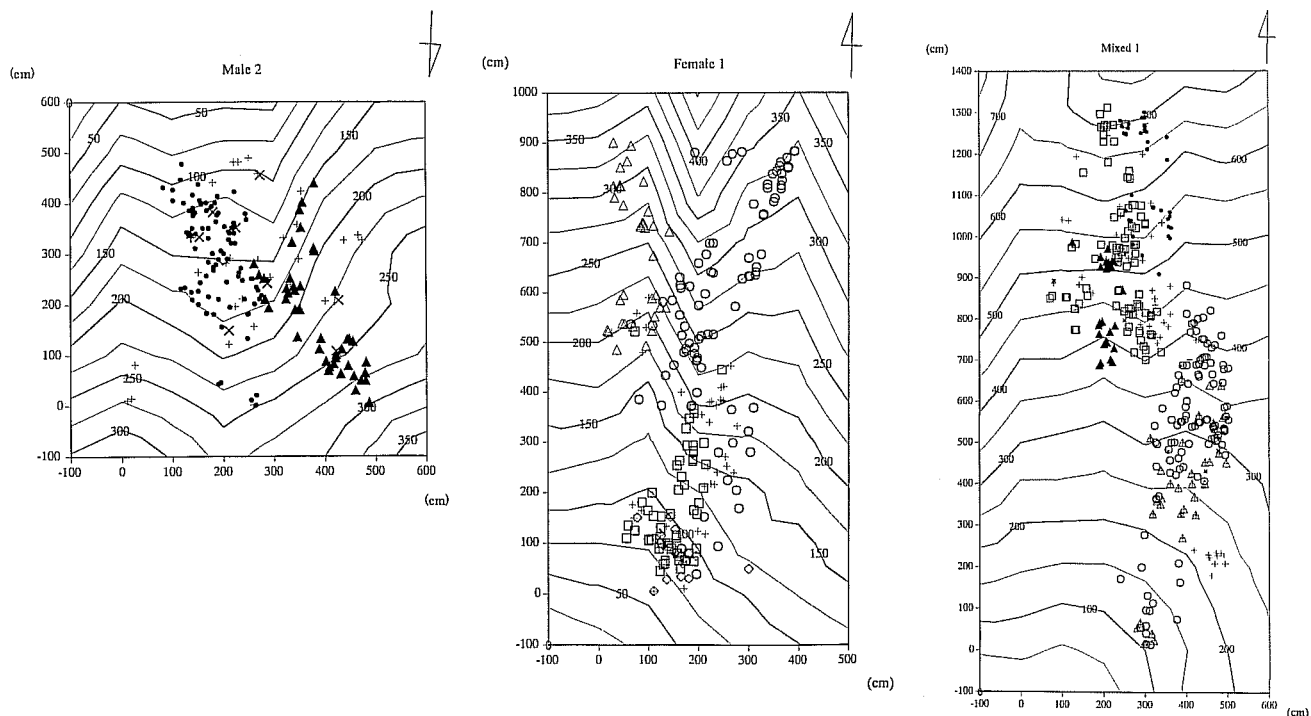


図 4-2. ヒメモチの雄, 雌, 雌雄混合パッチにおけるジェネットと幹の空間分布

Spatial distribution of genets and stems in male, female, and mixed patches (male 2, female 1, and mixed 1, respectively) of *Ilex leucoclada*. Different large genets are represented by different symbols (circles, triangles, squares, and diamonds). Filled and open symbols represent male and female genets, respectively. Plus signs represent small genets and crosses represent stems for which RAPD phenotypes could not be determined due to the low quality of the template DNA.

められた (図 4-2)。雄パッチは高い P_N 値を示し、雄パッチでは、最寄りの幹が同じジェネットに属する確率が高いことが明らかになった (表 4-6)。このことは、分布図においてジェネットを構成する幹が集中して分布することからも支持された (図 4-2)。対照的に、雌パッチと雌雄混在パッチでは、 P_N は中間的あるいは小さな値を示し、異なるジェネットの幹がある程度混ざり合って分布していることが明らかになった (図 4-2, 表 4-6)。

ジェネットを構成する幹の最大距離は、ジェネットの保有する幹数と有意な相関関係が認められた ($r_s = 0.837, P < 0.001$)。さらに、パッチで最も大きなジェネットを構成する幹の最大距離は、パッチの幹数 ($r_s = 0.829, P < 0.05$)、パッチの面積 ($r_s = 0.943, P < 0.01$) と有意な相関関係が認められた。しかし、パッチの幹密度や検出されたジェネットの数は、パッチの面積との相関関係が認められなかった。

4-4. 考察

4-4-1. ジェネットの識別とクローン多様性の推定

ユニークな RAPD 表現型をもつ単一の幹は、明らかにジェネットとして考えられる。複数の幹で検出された RAPD 表現型については、 P_{scr} 値で評価した。この値は、すべての幹の RAPD 表現型が独立に遺伝的組換えを受けて決定されているときに、パッチ内の N 個の幹のうち少なくとも n 個の幹が同一の RAPD 表現型になる確率である。 P_{scr} 値が 0.05 未満である RAPD 表現型をもつ幹もまた、明らかに同一のジェネットとして考えられる。しかし、 P_{scr} 値が 0.05 を越える RAPD 表現型も認められた。このような RAPD 表現型は、複数のジェネットに分割される可能性がある。したがって、6 個のパッチは、実際には 156 個以上のジェネットで構成されていて、クローン多様性は過少に推定された可能性が考えられる。 P_{scr} 値が 0.05 を越える RAPD 表現型は、特に雌パッチ 2 において多い。このことは、このパッチのクローン多様性は最も過少に推定されたことを示唆している。しかし、このような RAPD 表現型を構成する幹数の頻度は極めて小さい (< 0.05)。Simpson の D は、多数の幹を保有する RAPD 表現型に影響を受ける傾向がある (Peet 1974)。Fager の E も同様の傾向を示す。したがって、少数の幹にしか検出されない RAPD 表現型が複数のジェネットに分割されても、Simpson の D と Fager の E の値はあまり変化しないと考えられる。したがって、この研究において算出されたクローン多様性の推定値は、異なるパッチを比較するのに有効であると考えられる。

4-4-2. パッチ内のクローン多様性

パッチ内にかなりの量のクローン多様性が認められた。20 種類以上のクローン植物種のクローン多様性を取りまとめた総説において算出された Simpson の D などの平均値 (Ellstrand and Roose 1987; $G/N = 0.17$, Simpson の $D = 0.62$, Fager の $E = 0.68$, Hangelbroke *et al.* 2002; $G/N = 0.44$, Simpson の $D = 0.74$) と比較した。その結果、クローン多様性は、雌雄混在パッチでは高い、雌パッチでは高いあるいは中間的、雄パッチでは

中間的あるいは低いという傾向が認められた。しかしながら、本研究でサンプルされたパッチ数は少ない (各カテゴリーは 2 個ずつ) ため、この傾向を検証するためには、さらにパッチ数を増やす必要が考えられる。第 3 章の考察と同様に、ヒメモチのパッチの高いクローン多様性は、複数の創始者、実生加入、体細胞突然変異によって説明されると考えられる。同様に、*Anemone nemorosa* (ヤブイチゴ) (Holderegger *et al.* 1998; Stehlik and Holderegger 2000), *Uvularia perfoliata* (ユリ科) (Kudoh *et al.* 1999), *Viola riviniana* (スミレ科) (Auge *et al.* 2001) などの林床に生育する草本種においても局所的に高いクローン多様性が認められている。

しかしながら、モンテカルロシミュレーションによって、ヒメモチのパッチのクローン多様性は、ランダムな遺伝的組換えを仮定したときに期待されるクローン多様性よりも有意に低いことが認められた。シミュレーションの値からの偏りは、一部、第 3 章の研究で明らかになったパッチ間の遺伝的分化に起因する可能性がある。しかし、クローン多様性の減少の大部分は、パッチ内のクローン成長に起因すると考えられる。

クローン多様性は、雄パッチよりも雌パッチと雌雄混在パッチで高い傾向が認められた。第 3 章では、種子散布による実生加入がクローン多様性の程度に影響を及ぼすことを考察した。鳥散布種子をもつ植物種では、散布者である鳥類の行動パターンが種子や実生の生存に影響を及ぼす可能性が報告されている (Herrera *et al.* 1994; Jordano and Herrera 1995)。鳥散布種子をもつ雌雄異株では、性依存的な種子散布パターンを示すという報告がなされている (Herrera *et al.* 1994; Verdú and García-Fayos 2003)。雌雄異株植物では、雌のみが果実を生産するため、鳥類の採餌行動は雌木に集中する。したがって、雄木よりも雌木の下に鳥は糞を排出しやすい。本章の研究では、雌パッチと雌雄混在パッチにおいて果実の生産が観察されたことから、雌を含むパッチで実生加入の頻度が高いことが予想される。雌パッチと雌雄混在パッチが雄パッチよりもクローン多様性が高いことは、この予想と矛盾しないと考えられる。

4-4-3. パッチ内のクローン構造

本章の研究では、ヒメモチのジェネットを構成する幹は、斜面に沿って分布していることが認められた。積雪によって幹が接地し、湿気を含むリター層に不定根を張ることでクローン成長する。このような伏条によるクローン成長によって、ジェネットを構成する幹はそのような特徴的な空間分布を示すと考えられる。同様に伏条によるクローン成長を行う *P. pumila* (ハイマツ) でも、匍匐した幹の伏条によって斜面下方へ拡大していくことが報告されている (Kajimoto 1992)。その結果、斜面に沿った直線的な幹の分布が認められている (Kajimoto 1992)。

クローン植物の成長様式として、密集成長 (phalanx growth) とゲリラ成長 (guerrilla growth) が両極端にある (Lovett Doust 1981)。密集成長を行う植物は一般的に、周囲を同じジェネットに属するラメートに囲まれる (例えば、Berg and Hamrick 1994; Pornon *et al.* 1997)。一方、ゲリラ成長を行う植物は、異なるジェネットが空間的に交じり合う (例えば、Park and Werth

1993; Chung *et al.* 2000)。本章の研究では、雄パッチにおいて大きいジェネットの幹は集中分布することが認められた(例えば、雄パッチ 1)。一方、雌パッチと雌雄混在パッチでは異なるジェネットが重なって分布していることが認められた(例えば、雌パッチ 2, 雌雄混在パッチ 2)。このことから、ヒメモチは緩やかな密集成長を行う種であると考えられる。一旦、好適なサイトに定着した場合、密集成長はその場所に長期間存続するために有利である (Herben and Hara 1997)。第 3 章において、ヒメモチのパッチは 1 ha プロットの中央付近に集中して分布することが認められた。1 ha プロットの中央付近は、土壌が成熟したササの生育していない場所である (Yamamoto *et al.* 1995)。したがって、このような場所はヒメモチの生育に適していることが考えられる。ゆえに、密集成長は、ヒメモチが好適な環境に長期的に存続するための重要な成長様式であることが考えられる。

ヒメモチのジェネットは空間的に拡大していることが認められた。クローンを形成しない植物では、根やシュートを伸ばさせることによって三次元空間を占有し、光資源や地下資源を獲得している。同様に、クローン植物でも栄養繁殖・クローン成長には二次元的に空間を広く占有するという意義が考えられている (Slade and Hutchings 1987a, b; de Kroon and Hutchings 1995)。ヒメモチに認められる伏条にも空間の占有を促進する意義が考えられる。

どのパッチもジェネットサイズ (ジェネットを構成する幹の数) の頻度分布は類似していることが認められた。パッチには大きいジェネットが少数と小さいジェネットが多数存在し、パッチにおけるジェネットサイズの頻度分布は歪んでいることが明らかになった。さらに、パッチの面積は最も大きいジェネットを構成する幹の間の最大距離と関連性が認められた。しかし、パッチ面積とパッチを構成するジェネットの数には関連性は認められなかった。このことは、クローン成長が実生の加入よりもパッチの拡大に大きく寄与していることを示唆している。同様に、*Polygonum viviparum* (タデ科) (Diggle *et al.* 1998), *Quercus havardii* (ブナ科) (Mayes *et al.* 1998), *Uvularia perfoliata* (ユリ科) (Kudoh *et al.* 1999) においても、集団内におけるジェネットサイズの頻度分布は歪んでいることが報告されている。

ヒメモチのパッチにおけるジェネットサイズの歪んだ頻度分布はジェネットの定着時期によって説明されるかもしれない。早期に定着したジェネットは、後から加入してきたジェネットと比べてクローン成長するための十分な資源を獲得できることはありそうなことである (Ross and Harper 1972; Firbank and Watkinson 1987)。パッチ内のジェネットサイズの歪んだ分布に対するもう一つの可能な説明はジェネット間の競争である。この仮説を支持する研究として *Rhododendron ferrugineum* (ツツジ科) の研究 (Pornon *et al.* 2000) がある。その研究では、ジェネットの占有面積とシュート成長率の間に有意な正の相関関係が認められ、このことはシュート成長率の良いジェネットが集団の主要な構成者になることを示唆している (Pornon *et al.* 2000)。この仮説を検証するためには、今後ヒメモチについて種内競争の程度を明らかにする必要がある。

第 5 章 ヒメモチのマイクロサテライトマーカーの開発と多型性

5-1. はじめに

マイクロサテライトは核ゲノム中に存在する 2 から 6 個の塩基の繰り返し配列である。個体間でその繰り返し数が異なるため、一つの遺伝子座あたりに多くの対立遺伝子が出現する。したがって、極めて多型性の高い遺伝マーカーであるマイクロサテライトマーカーは、自然淘汰に対して中立な遺伝的変異に影響を及ぼす進化的素過程を調査するための最も有効なマーカーである。近年、木本種においてもマイクロサテライトマーカーが開発されている。その結果、木本種において、種内全体の遺伝的変異に関する研究 (Kikuchi and Isagi 2002; Heuertz *et al.* 2004)、集団内の遺伝的構造に関する研究 (Ueno *et al.* 2000; Asuka *et al.* 2004)、繁殖生態 (花粉・種子の散布、交配様式など) に関する研究 (Dow and Ashley 1996; Dick *et al.* 2003) などが行われてきた。

本章の研究では、ヒメモチにおいて、集団内の遺伝的構造解析や親子鑑定などの集団レベルの解析を行うために、マイクロサテライトマーカーの開発を行い、得られたマーカーの多型性の評価を行った。

5-2. 材料および方法

5-2-1. 植物材料

マイクロサテライト濃縮ゲノムライブラリーの作成とマイクロサテライト領域の増幅に関する調査では、第 3 章の研究で使用したヒメモチの DNA サンプルから任意に選んだ DNA サンプルを用いた。また、マイクロサテライトマーカーの多型性に関する解析では、ヒメモチの分布域全体から選定された 12 集団から各集団あたり 3 個体、合計 36 個体の DNA サンプルを用いた。これらの DNA サンプルは、平岡 (2001) で使用された DNA サンプルから選定されたものである。

5-2-2. 実験方法

(1) マイクロサテライト濃縮ゲノムライブラリーの作成と濃縮断片のシークエンス

濃縮ゲノムライブラリーの作成は Hamilton *et al.* (1999) の方法を若干改変した方法で行った。ゲノム DNA を制限酵素 *Nde*II で消化して得られた DNA 断片を 2% アガロースゲルで電気泳動した後、300 から 1000 bp のサイズをもつ DNA 断片をゲルから切り出した。回収した DNA 断片約 500 ng を *Sau*3AI カセット (宝酒造) にライゲーションした。ライゲーション後、ニックを修復した。この DNA 断片を 200 μ l のバインディングバッファー (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) に溶解させ、一本鎖に変性させた後、5' 末端をビオチンで標識されたオリゴヌクレオチドプローブ [5'-biotin (CT)₁₅-3'] にハイブリダイゼーションさせた。このビオチンで標識されたプローブに結合した DNA 断片をストレプタービジン (M-280) と結合している磁性粒子 (Dynabeads®, Dynal Biotech) に結合させることによって回収した。磁性粒子を二種類のバッファー [2 × saline sodium citrate (SSC), 0.1% sodium dodecyl sulfate

表 5-1. マイクロサテライト解析に用いた PCR 反応液の組成
Composition of PCR reaction mixture used for microsatellite analysis

0.25 µg/l	Template DNA
0.2 mM	dATP
0.2 mM	dCTP
0.2 mM	dGTP
0.2 mM	dTTP
0.25 U	<i>Taq</i> polymerase
20 mM	Tris-HCl, pH8.4
50 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
0.25 µM	Microsatellite primer

表 5-2. ヒメモチで開発された 13 個のマイクロサテライトマーカーの特徴

Characteristics of thirteen microsatellite loci in *Ilex leucoclada*. Thirty-six individuals were genotyped. EMBL accession numbers are listed under the respective loci. T_a , annealing temperature; A , number of alleles detected; H_o , observed heterozygosity; and H_e , expected heterozygosity

Locus	Repeat motif	Fluorescent label	PCR Primer sequence (5'-3')	T_a (°C)	Size range (bp)	A	H_o	H_e
<i>ILE01-47</i> (AJ704397)	(CT) ₉	HEX	F: GCGTCGGATTCTCTTACTCCA R: GCGGGTATCTTTGAACCAAT	56	186-279	24	0.833	0.871
<i>ILE03-01</i> (AJ704398)	(CT) ₁₅	FAM	F: GGGGACACATCAAACATCATCA R: ACCTGTTGTTATTTATGCCTG	56	197-223	11	0.833	0.828
<i>ILE03-38</i> (AJ704399)	(AG) ₂₂	FAM	F: TGGCATAATGTGTCAATGTCA R: GTTCTTCGGCTGGTCTCATCATCTATT	56	268-328	27	0.917	0.971
<i>ILE03-53</i> (AJ704400)	(GA) ₁₂	HEX	F: TTTGGTGTACCGTGTTAGGCT R: ACACACATAAATACGCACATA	56	150-182	10	0.806	0.793
<i>ILE03-65</i> (AJ704401)	(TC) ₁₅	HEX	F: AAGAGTTTCAATTTAGCATTCC R: GTTCTTTTCTGAGATTGTGCGCCATTC	56	188-215	15	0.694**	0.896
<i>ILE04-02</i> (AJ704402)	(TC) ₁₁ A(CA) ₁₀	FAM	F: TTGCTGCTAGAGAAAGTGTTTC R: ACGGTTAAGAAATGTGCGTGTC	56	72-142	17	0.833	0.858
<i>ILE04-04</i> (AJ704403)	(GA) ₁₂	FAM	F: ATGAGAGCCAAAGATGTAGTG R: CCACGACAGTTGTGTATATGT	56	171-202	13	0.778	0.858
<i>ILE04-06</i> (AJ704404)	(CT) ₂₄	HEX	F: CCCACCCCATCTGTCTAAGAA R: GCCAAAGCAAGAACTGTAAAG	56	175-224	20	0.833	0.939
<i>ILE04-10</i> (AJ704405)	(GA) ₂₂	HEX	F: CCCATAAACTTCAGTTCCGTT R: CTTGATACCTGCCGAGATAAAA	56	222-275	16	0.528**	0.917
<i>ILE04-17</i> (AJ704406)	(CA) ₁₇	FAM	F: AACCCAATAACAACACTACTCAG R: GTTCTTTTCAGAGACCCACAAAAGTTCGT	56	199-241	15	0.778	0.901
<i>ILE04-18</i> (AJ704407)	(GA) ₆ GG(GA) ₁₁	HEX	F: CGCCTACACCATAACATTGCC R: GGGGAAACATTTGTCTACAGA	56	233-288	18	0.750*	0.841
<i>ILE04-28</i> (AJ704408)	(TC) ₇	HEX	F: TAGGTA AAAACCGACAAAACCGA R: GTTCTTTCCACTACACAGAGACCAAAA	56	230-236	3	0.139	0.133
<i>ILE05-83</i> (AJ704409)	(AG) ₁₆	FAM	F: TCTCGCTCTAAAACCTACAGA R: GTTCTTGAAGACCAATAAATATCCGTA	56	107-142	13	1.000	0.881

Asterisks denote significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

(SDS) と $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS] で洗い流した後、標的 DNA を熱湯中で一本鎖に変性させた。カセットプライマー C1 (宝酒造) を用いた PCR によって、一本鎖 DNA を二本鎖 DNA に再構成させた。そして、制限酵素 *Nde*II によって DNA に付着しているカセットを外した。以上の処理によって得られた濃縮 DNA 断片をプラスミドベクター pUC118 (制限酵素 *Bam*HI で処理) (宝酒造) に挿入させた。大腸菌 (*Escherichia coli* DH5 α) のコンピテント細胞に移入し、増殖させた。その後、大腸菌からプラスミド DNA を抽出した (Wizard® SV96 system, Promega)。BigDye Terminator キット (Applied Biosystems) でシーケンズ反応を行い、ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) によって塩基配列を決定した。

(2) プライマーの設計と PCR によるマイクロサテライト部位の増幅

マイクロサテライト部位を含む塩基配列から PCR プライマーを設計した。設計にはソフトウェア OLIGO (Molecular Biosciences) を用いた。ヒメモチ 4 個体の DNA サンプルを用いて、設計したプライマーによるマイクロサテライトの増幅程度を調べた。プライマーの 5' 末端には蛍光標識をつけた。PCR には 9700 サーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応液 (10 μ l) の組成を表 5-1 に示す。PCR の反応は以下の条件で行った。最初の熱変性を 94 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間行った後、熱変性を 94 $^{\circ}\text{C}$ で 45 秒間、アニーリングを 56 $^{\circ}\text{C}$ で 45 秒間、伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 45 秒間行うサイクルを 30 回行い、最後に伸長反応を 72 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間行った。

(3) マイクロサテライト遺伝子型の決定

ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて PCR 増幅産物を検出した。ソフトウェア GeneScan (Applied Biosystems) を用いてマイクロサテライトの遺伝子型を決定した。

5-2-3. データ解析

ヒメモチの分布域全体から選定された 12 集団から各集団あたり 3 個体、合計 36 個体の DNA サンプルを用いて、各マイクロサテライト遺伝子座の多型性を調べた。各マイクロサテライト遺伝子座について、遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (A)、ヘテロ接合度の観察値 (H_0) と期待値 (H_E) (Nei 1987) を算出した。ハーディ・ワインバーグ平衡のもとで期待される遺伝子型頻度からの偏りをマルコフ連鎖法によって検定した (Gao and Thompson 1992)。さらに、遺伝子座間の連鎖不平衡の有意性を検定した (Gao and Thompson 1992)。以上の解析には、ソフトウェア GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) を用いた。

5-3. 結果および考察

塩基配列を決定した結果、432 個のクローン中、189 個にマイクロサテライト部位が認められた。これらの DNA 断片の塩基配列から 92 組のプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて PCR 増幅を試みた結果、13 組のプライマーで単一のマイクロサテライト部位に由来すると考えられる DNA 断片の

増幅が認められた。

次に、これら 13 個のマイクロサテライトマーカーの多型性を調べた。その結果、各マーカーあたり 3 から 27 個の対立遺伝子が検出された (表 5-2)。遺伝的多様性を表すヘテロ接合度の期待値は、各マーカーあたり 0.133 から 0.971 までの値を示した (表 5-2)。3 個のマイクロサテライトマーカー (*ILE03-65*, *ILE04-10*, *ILE04-18*) において、ヘテロ接合度の観察値が期待値よりも有意に小さいことが認められた (表 5-2)。このヘテロ接合体頻度の減少は、ヌル対立遺伝子の存在や集団の細分化が原因であると考えられる。二種類の遺伝子座の組み合わせ (*ILE03-38* と *ILE04-04*, *ILE04-04* と *ILE04-10*) において、統計的に有意な連鎖不平衡が認められた ($P < 0.001$)。したがって、これらの遺伝子座は、連鎖している可能性が考えられる。

第 6 章 異なるヒメモチ集団における遺伝的構成パターン

6-1. はじめに

クローン植物にはラメートとジェネットからなるモジュール構造があるため、それら集団内の遺伝的組成の変化を調べるときには、遺伝的な多様性を二つのレベルで評価する必要がある。(1) 遺伝子型レベルの変異。クローン植物の場合、これをクローン多様性 (あるいは遺伝子型多様性) という。クローン多様性はラメートを単位として評価され、本研究でも使用している Simpson の D などの統計量がある。(2) 対立遺伝子レベルの変異。対立遺伝子レベルの変異は、通常ジェネットを単位として評価され、ヘテロ接合度などの統計量がある。以後、対立遺伝子レベルの変異を単に「遺伝的変異」ということにする。クローン植物集団では、実生の加入率が低い場合でもクローン多様性は高い水準に保たれることが理論的に予測されている (Soane and Watkinson 1979; Watkinson and Powell 1993)。一方、遺伝的浮動や自然淘汰などの要因によって対立遺伝子が失われるため、実生加入の頻度が低い集団では、遺伝的変異が維持できない場合がある (McLellan *et al.* 1997)。

第 3 章の「はじめに」で述べたように、Eriksson (1989, 1993) は、実生加入の観点からクローン集団のクローン多様性を維持する 3 種類のモデルを提唱した。(1) 集団の形成初期段階に実生加入が起こり、その後は旺盛なクローン成長のみが起こる [initial seedling recruitment (ISR)]。(2) 集団の発達過程で実生加入が繰り返し起こる [repeated seedling recruitment (RSR)]。(3) 数十年、数百年の間隔で起こるような偶発的な撓乱に乗じて実生加入が起こる [recruitment in windows of opportunity (RWO)]。これらのモデルでは個体群動態によってクローン多様性の維持を説明しようとしているが、稀な実生加入、長命なジェネットの生活史、分散するジェネットの境界、増加するラメートの分散、ジェネットの齢推定の困難性により、クローン植物集団の動態に関する知見は十分でない。

遺伝子分散 (gene dispersal) のパターンは集団内の遺伝的構成に影響を及ぼす主要な要因である。既存の多くの研究では、遺伝的構成は種子と花粉による遺伝子分散の結果として説明されている (Perry and Knowles 1991; Schnable *et al.* 1991; Hamrick

et al. 1993; Shapcott 1995; Tani *et al.* 1998; Ueno *et al.* 2000; Asuka *et al.* 2004)。花粉と種子では散布率や散布距離が異なるため、花粉と種子による遺伝子流動を区別できれば、遺伝的構造化における遺伝子分散の影響をより詳細に理解できることが期待される (Ennos 1994; McCauley 1997)。種子のみが新しいサイトに遺伝子を移住させることができる。したがって、創始イベントから間もない集団の遺伝的構造を調べることによって、遺伝的構造化における種子による遺伝子分散の影響を抽出できるかもしれない。一方、創始イベント後の集団内では、有性生殖による実生加入や局所的な自然淘汰による個体の枯死が起こる。したがって、成熟した集団における遺伝的構造は、花粉と種子による遺伝子分散や局所的な自然淘汰などの効果が複合的に作用した結果として捉えられる。

第3章と第4章の研究では、集団の創始イベントから十分に時間が経過していると考えられるヒメモチ集団を対象にした。その結果、ヒメモチ集団の形成と維持には有性生殖による実生加入とクローン成長がそれぞれ貢献していることが明らかになった。

本章の研究では、第5章で開発されたマイクロサテライトマーカーを用いて、異なる2つのヒメモチ集団における遺伝的構成 (genetic architecture) パターンを、クローン多様性、遺伝的変異、ハーディ・ワインバグ平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度、遺伝的構造を調べることにより明らかにした。また、その2集団間において、明らかとなった遺伝的構成パターンの差異を明らかにし、その原因を考察した。

6-2. 材料および方法

6-2-1. 野外調査および植物材料

調査を行った2つのプロットは、ブナ老齢林の4 ha プロットとブナ二次林の1 ha プロットである。前者のプロットは、第3章と第4章の研究で使用したプロットであり、その概要は第3章で述べたとおりである。一方、後者のプロットは、2003年にブナ二次林の構造と動態を明らかにすることを目的として、大山の南斜面、標高約950 mの位置に設置された1 ha プロット (100 × 100 m) である。そのプロットでは、4 ha プロットと同様に胸高直径4 cm以上の幹の毎木調査が行われた。両プロットとも最も優占している樹種はブナであり、幹密度、平均胸高直径 ± S.D., 胸高断面積合計は、老齢林のプロットでそれぞれ200本 ha⁻¹, 32 cm ± 26, 26.9 cm² ha⁻¹ であり (Yamamoto *et al.* 1995)、二次林プロットでそれぞれ786本 ha⁻¹, 18 cm ± 4, 25.1 cm² ha⁻¹ であった (西村ら 未発表)。

2003年6月、4 ha プロット内で土壌が未成熟であるサイトに30 × 30 m (0.09 ha) のプロットを設置した (以後、未成熟プロットと呼ぶ)。土壌が未成熟であるサイトでは、地すべりや地表流によって砂礫が移動し、地表が物理的に不安定である (Yamamoto *et al.* 1995)。そのため、ヒメモチは幹密度が低く、散在していることが観察された (第3章)。一方、2003年11月にブナ二次林の1 ha プロット内にも30 × 30 m (0.09 ha) のプロットを設置した (以後、二次林プロットと呼ぶ)。二次林では、未成熟プロットで観察されるような地表面の攪乱はなく、

土壌はより成熟しており、ヒメモチはより密閉した集団を形成していることが観察された。両方のプロットにおいて、幹の位置、樹幹長、花の有無、性を記録した。幹の性の判別は、ヒメモチの開花時期である5-6月に開花しているものだけで行った。さらに、すべての幹から葉を採取し、ビニール袋に密封し、低温条件下で実験室に搬送後、-30℃の冷凍庫内で分析に使用するまで保存した。

6-2-2. 実験方法

DNAの抽出は第3章で述べた実験方法に従った。また、PCRによるマイクロサテライト増幅は第5章で述べた実験方法に従った。本章では、第5章の研究で開発されたマイクロサテライトマーカーのうち8個のマーカーを使用した (ILE03-01, ILE03-38, ILE03-65, ILE04-04, ILE 04-06, ILE04-17, ILE04-18, ILE05-83)。

6-2-3. データ解析

(1) ジェネットの識別

マイクロサテライトマーカーを用いたジェネットの識別能力を以下の方法で評価した。すべての幹のマイクロサテライト遺伝子型が独立に遺伝的組換えを受けて決定されているときに、プロット内の N 個の幹のうち少なくとも n 個の幹が偶然に同一の遺伝子型になる確率 (P_{sex}) を求めた (Park and Werth 1993)。以下にその式を示す。

$$P_{\text{sex}} = \sum_{x=n}^N \frac{N!}{x!(N-x)!} (P_{\text{gen}})^x (1 - P_{\text{gen}})^{N-x},$$

ここで、

$$P_{\text{gen}} = \left(\prod_{i=1}^L p_i q_i \right) 2^h,$$

p_i, q_i は、各プロットにおける遺伝子座 i の二つの対立遺伝子の頻度である。 h はヘテロ接合である遺伝子座の数であり、 L は使用した遺伝子座の数である。

(2) クローン多様性の推定

プロット内のクローン多様性を二種類の指数を用いて評価した。まず、これまでよく使用されてきた指数である「識別割合」 (proportion distinguishable, G/N) (Ellstrand and Roose 1987) を使用した。この指数は、プロット内で採取された幹数 (N) に対するジェネット数 (G) として求められる。この値は、0から1までの範囲をもち、プロット内で採取された幹が全て異なるジェネットの場合は1となる。

二つ目の指数として Simpson の D を使用した (Pielou 1996)。この指数はプロット内の N 個の幹から任意に2幹を取り出したとき、それらが異なるジェネットに属する確率を示す。以下にその式を示す。

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

n_i はプロット内における i 番目のジェネットの幹数である。この値は、プロットがすべて同じジェネットで構成されている場合は0、すべて異なるジェネットで構成されている場合は1と

なる。また、1000回のブートストラップ法によって、Simpsonの D の95%信頼区間(両側)を求めた。

(3) 遺伝的変異

各遺伝子座において、対立遺伝子頻度とヘテロ接合度の観察値(H_o)を算出し、ヘテロ接合度の期待値(H_e)、固定指数 [$F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$]を推定した(Nei 1987)。ハーディ・ワインバグ平衡のもとで期待される遺伝子型頻度からの偏りをマルコフ連鎖法によって検定した(Gao and Thompson 1992)。以上の解析には、ソフトウェアGENEPOP (Raymond and Rousset 1995)を用いた。

(4) ジェネットの空間分布

ヒメモチのジェネットの空間分布をRipleyの K 関数によって評価した(Ripley 1976)。この方法では、あるジェネットから半径 t m以内に分布するジェネット数を考慮する。 K 関数の推定値は以下の式によって求められる。

$$K(t) = n^{-2} A \sum_{i \neq j} w_{ij}^{-1} I(u_{ij}),$$

ここで、 n はプロット内で識別されたジェネット数、 A はプロットの面積(m^2)、 I_i はカウント変数、 u_{ij} はジェネット i と j の間の距離、 w_{ij} はエッジ効果を修正するための定数であり、プロットのすぐ外側はすぐ内側と同じようなジェネットの分布になっていることを仮定している(Haase 1995)。本研究では、ジェネットの位置はジェネットの重心とした。1m間隔で15mまでの距離階級(t)において $K(t)$ を算出した後、以下の式で標準化した(L 関数)(Besag 1977)。

$$L(t) = \sqrt{K(t)/\pi} - t,$$

半径 t mでのジェネットの分布は $L(t) = 0$ の場合にランダム、 $L(t) > 0$ の場合に集中分布、 $L(t) < 0$ の場合に規則分布を示す。ランダム分布からの有意な偏りを検定するため、ジェネットの位置を無作為化させたモンテカルロシミュレーションを1000回行い、 K 関数の95%信頼区間を求めた。また、この解析では、集中斑の程度と大きさはRebertus *et al.* (1989)の定義に従った。すなわち、集中斑の程度とは、ランダム分布からの偏りの程度とした。一方、集中斑の大きさとは、各ジェネットを中心とする半径 t mの円内におけるジェネットの空間分布パターンであり、最も大きい $L(t)$ を示すときの距離 t を集中斑のサイズとした。以上の解析には、ソフトウェアSPATIAL POINT PATTERN ANALYSIS (Haase 1995)を使用した。

(5) ジェネットの遺伝的構造

同祖係数(coancestry)を用いた対立遺伝子の空間自己相関解析によって、ジェネットの遺伝的構造を評価した(Cockerham 1969)。同祖係数を推定するため、ジェネットの対立遺伝子頻度を以下の方法で数量化した。ある特定の対立遺伝子に着目したとき、ジェネットがその対立遺伝子をそれぞれ二個、一個持つあるいはその対立遺伝子を持たない場合、そのジェネットの対立遺伝子頻度をそれぞれ1.0, 0.5, 0.0とした(Heywood

1991)。以下の式で同祖係数(f_{ij})を推定した。

$$f_{ij} = \frac{\sum_{i \neq j} (p_i - \bar{p})(p_j - \bar{p})}{k\bar{p}(1 - \bar{p})} + \frac{1}{2(N - 1)},$$

ここで、 p_i , p_j はジェネット i と j における対立遺伝子頻度、 \bar{p} は平均対立遺伝子頻度、 k は各距離階級におけるジェネットの組み合わせ数、 N はプロットに存在するジェネット数である(Loiselle *et al.* 1995)。この式の第二項は、サンプル数が有限であることに起因する偏りを補正する項である。距離階級は2m間隔とし、14-16mまで f_{ij} を算出した。遺伝的構造の有無を検定するため、ジェネットの位置を固定したまま遺伝子型のみをランダムに置換し(1000回)、同祖係数を算出して、95%信頼区間(両側)を求めた。以上の解析には、ソフトウェアSPAGeDi 1.1 (Hardy and Vekemans 2002)を使用した。

ヒメモチの果実はたいてい4個の種子をもつ(山崎 1989)。したがって、鳥に果実が食べられると血縁関係にある種子が一緒に散布されるため、集団内に遺伝的構造が形成されるのかもしれない。そこで、実際に観察された遺伝的構造がこの仮説によって説明されるかどうかを検証するため以下の方法でシミュレーションを行った。基準とする集団で観測された対立遺伝子頻度の分布から個体の遺伝子型を割り当てることによって、4個体の半兄弟あるいは全兄弟をもつ家系をそれぞれ発生させた(未成熟プロット: 20家系×4個体 = 80個体、二次林プロット: 22家系×4個体 = 88個体)。ここでは、第3章の研究で対象とした27個のバッチからなる集団を基準とする集団とし、このシミュレーションのために対立遺伝子頻度を推定した。次に、各プロットの実際のジェネット数と同じ数に補正するため、各標本からそれぞれ2, 3個体をランダムに除いた。30×30mの平面内において任意の半径2mの円内にランダムに各家系の兄弟を散布した。半径が2mであるのは、本章の結果で述べるように、Ripleyの K 関数によってジェネットの集中斑のサイズが半径2mの円であることが明らかになったためである。その後、各距離階級について同祖係数を推定した。以上の手順を1000回行い、実際のデータから計算した同祖係数をこのシミュレーションで発生させた値の95%信頼区間(両側)と比較した。

6-3. 結果

6-3-1. ジェネットの識別とマイクロサテライトマーカーの特徴

未成熟プロットと二次林プロットにおいて、それぞれ146個と546個の幹が認められた。8個のマイクロサテライトマーカー(ILE03-01, ILE03-38, ILE03-65, ILE04-04, ILE04-06, ILE04-17, ILE04-18, and ILE05-83)を用いてジェネットを識別した。遺伝子座あたりの出現対立遺伝子数は、未成熟プロットで8から20個(平均 = 14個)、二次林プロットで7から23個(平均 = 13個)であった(表6-1)。未成熟プロットと二次林プロットでそれぞれ145個と510個の幹を対象にジェネットの識別を行った。その結果、未成熟プロットと二次林プロットでそれぞれ78個と85個のジェネットが識別された(表6-2)。そのうち、未成熟プロットでは17個(21.8%)、二次林プロットでは37個

表 6-1. 未成熟プロットと二次林プロットのヒメモチジェネットにおけるマイクロサテライト 8 遺伝子座の遺伝的変異
Genetic variation at eight microsatellite loci in *Ilex leucoxclada* genets in the immature and secondary plots

Locus	Immature plot				Secondary plot			
	A	H _O	H _E	F _{IS}	A	H _O	H _E	F _{IS}
ILE03-01	8	0.808	0.693	-0.167	7	0.741	0.690	-0.074*
ILE03-38	20	0.821	0.907	0.096*	23	0.953	0.922	-0.034*
ILE03-65	10	0.846	0.787	-0.076*	11	0.847	0.746	-0.135*
ILE04-04	15	0.808	0.898	0.101	15	0.894	0.880	-0.016*
ILE04-06	19	0.808	0.891	0.094*	18	0.812	0.885	0.083*
ILE04-17	10	0.859	0.846	-0.015*	10	0.906	0.818	-0.108*
ILE04-18	14	0.564	0.606	0.070*	11	0.365	0.575	0.366*
ILE05-83	13	0.756	0.802	0.057	9	0.918	0.860	-0.066*
Mean/all loci (excluding ILE04-06 and 04-18)	14	0.784	0.804	0.025*	13	0.804	0.797	-0.009*
				0.007*				-0.024*

A, number of alleles detected; H_O, observed heterozygosity; H_E, expected heterozygosity; and F_{IS}, fixation index in each plot. Tests for departure from Hardy-Weinberg genotypic proportion were assessed by the Markov-chain method. *, P < 0.05.

表 6-2. 未成熟プロットと二次林プロットにおけるクローン多様性の推定値
Clonal diversity estimates for *Ilex leucoxclada* in the immature and secondary plots

	Immature plot	Secondary plot
No. of ramets	145	510
No. of genets	78	85
G/N	0.538	0.167
Simpson's D	0.976	0.952
	(0.967 - 0.987)	(0.941 - 0.963)

The 95% confidence limits generated by bootstrapping are shown in parentheses.

(43.5%) のジェネットが複数の幹から構成されていることが明らかになった (図 6-1)。一方, 単一の幹から構成されているジェネットは, 未成熟プロットでは 61 個 (78.2%), 二次林プロットでは 48 個 (56.5%) であった (図 6-1)。複数の幹から構成されている合計 54 個のジェネットについて, ジェネット識別の有効性を表す P_{scr} 値を算出した。これらすべての遺伝子型において P_{scr} 値は 0.05 より有意に低かった。

8 個のマイクロサテライトマーカーの遺伝的変異は, 未成熟プロットと二次林プロットで識別された 78 個と 85 個のジェネットを用いて推定した。ヘテロ接合度 (期待値) の平均値は, 未成熟プロットでは 0.804 (0.606 - 0.907) であり, 二次林プロットでは 0.797 (0.575 - 0.922) であった (表 6-1)。ヘテロ接合度 (期待値) は, プロット間に有意な差が認められなかった (Wilcoxon 検定, $P > 0.05$)。16 個の固定指数のうち 13 個において, ハーディ・ワインバーグ平衡からの有意な偏りが認められた (表 6-1)。ヌル対立遺伝子の有無を検討するため, ハーディ・ワインバーグ平衡の下で期待される遺伝子型頻度からの

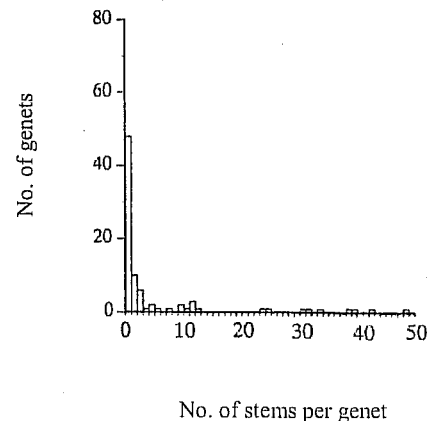
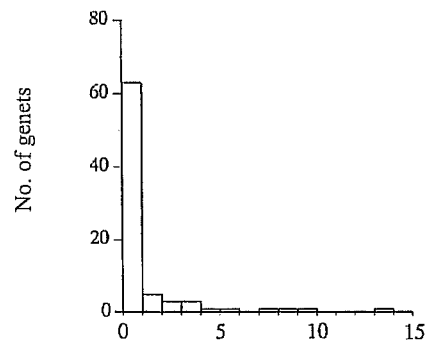


図 6-1. ジェネットあたりの幹数の頻度分布
Frequency distribution of the number of stems per genet. Upper, immature plot; lower, secondary plot

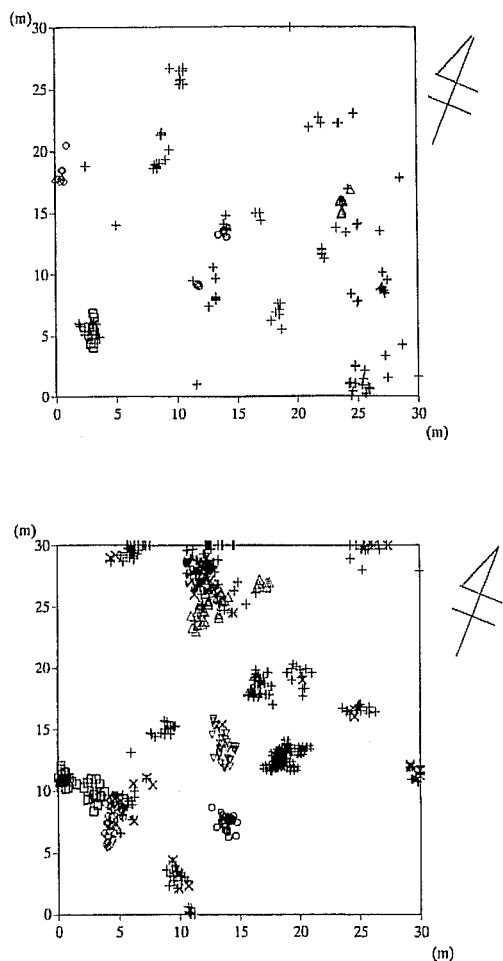


図 6-2. 未成熟プロット (上, 78 ジェネット) と二次林プロット (下, 85 ジェネット) におけるヒメモチのジェネットと幹の空間分布

Spatial distribution of genets and stems of *Ilex leucoclada* in the immature plot (upper, 78 genets) and secondary plot (lower, 85 genets). Different genets whose stem account for 3-5.0 percent of the total number of stems within each plot are represented by different symbols. Plus signs represent genets whose stems accounted for < 5.0 percent of the total number of stems within each plot and crosses represent stems for which multilocus genotypes could not be determined due to the low quality of the template DNA.

偏りをプロット間で比較した。これらの遺伝子座でヌル対立遺伝子が存在する場合、両プロットでヘテロ接合体頻度の有意な減少が認められることが期待される。*ILE03-38* では、ヘテロ接合体頻度の有意な減少は未成熟プロットでのみ認められた (表 6-1)。一方、*ILE04-06* と *ILE04-18* では、ヘテロ接合体の有意な減少が両プロットで認められた (表 6-1)。したがって、これら 2 遺伝子座ではヌル対立遺伝子が存在する可能性が考えられる。よって、これら 2 遺伝子座は、ジェネットの識別には用いたが、以後の空間自己相関解析からは除いた。

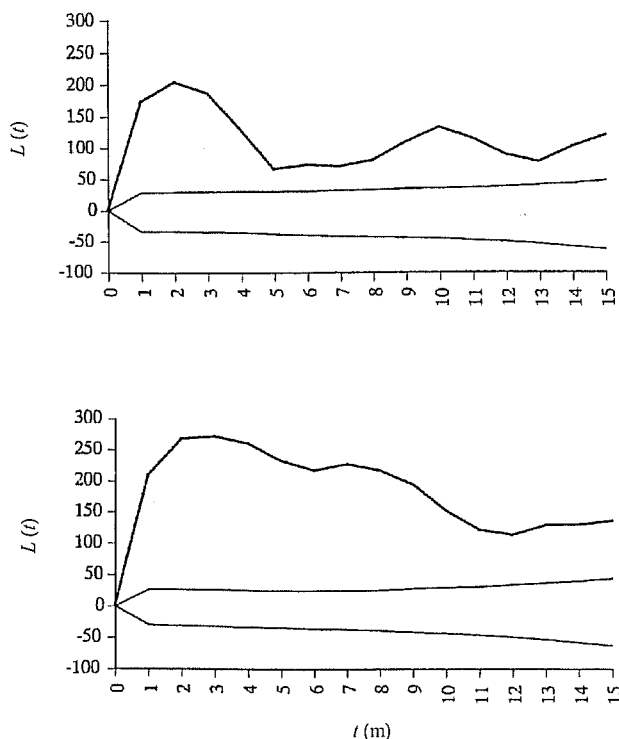


図 6-3. 未成熟プロット (上) と二次林プロット (下) における Ripley の K 関数を用いたヒメモチのジェネットの空間分布パターン解析

Spatial distribution pattern analysis of *Ilex leucoclada* genets using Ripley's K for each diameter-class (t) in the immature plot (upper) and secondary plot (lower). Thick lines represent the sample statistics $L(t)$ and thin lines represent 95% confidence envelope under the null hypothesis of random distribution of genets, obtained after 1000 Monte Carlo simulations.

6-3-2. クローン多様性

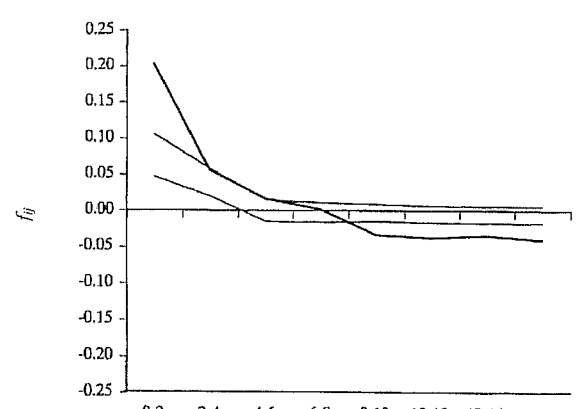
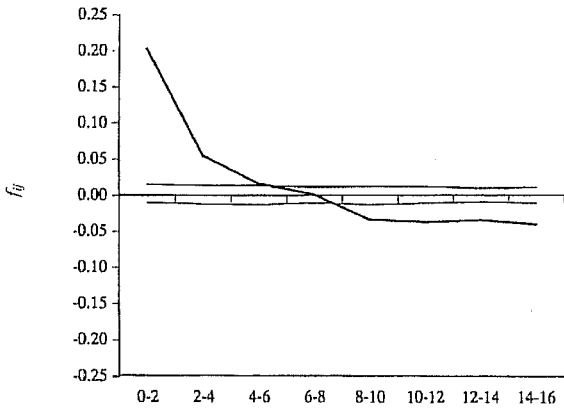
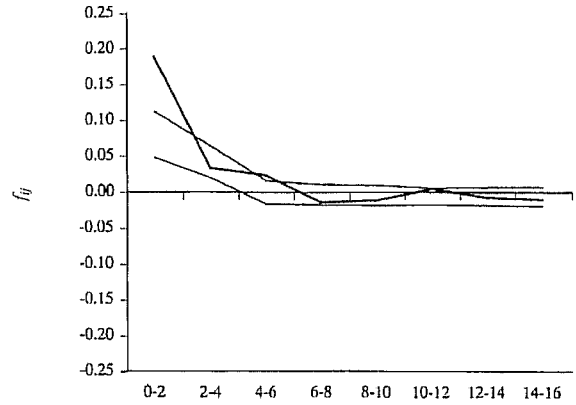
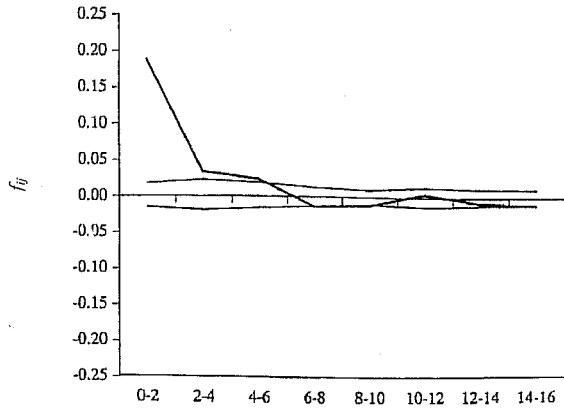
プロットのクローン多様性を表す識別割合 (G/N) と Simpson の D は、未成熟プロットではそれぞれ 0.538 と 0.976 であった。一方、二次林プロットでは 0.167 と 0.952 であった (表 6-2)。

6-3-3. ジェネットの空間分布

ヒメモチの識別されたジェネットと幹の空間分布を図 6-2 に示した。両プロットにおいて、ジェネットは 1 から 15 m のすべての距離階級において有意に集中分布していることが認められた ($P < 0.05$) (図 6-3)。未成熟プロットでは、ジェネットは半径 2 m の集中斑を形成していることが認められた。一方、二次林プロットでは、ジェネットは、半径 2-3 m の集中斑を形成していることが認められた (図 6-3)。

6-3-4. ジェネットの遺伝的構造

両プロットにおいて、小さな距離階級で有意な正の同祖係数が認められた (図 6-4)。未成熟プロットでは、同祖係数は大きな距離階級で正や負の値にランダムに変動していることが認め



Distance class (m)

Distance (m)

図 6-4. 未成熟プロット (上) と二次林プロット (下) におけるヒメモチジェネットの同祖係数のコレログラム

Correlograms of the estimated values of coancestry for *Ilex leucoclada* genets in the immature plot (upper) and secondary plot (lower). Distance classes were defined at 2-m intervals from 0-2 m to 14-16 m. Thick lines represent the sample statistics f_{ij} and thin lines represent the 95 % (two-tailed) confidence interval under the null hypothesis of no spatial autocorrelation, obtained after 1000 permutation of the multilocus genotypes.

図 6-5. 未成熟プロット (上) と二次林プロット (下) のヒメモチジェネットにおける実際のデータから推定された同祖係数のコレログラムと半兄弟の種子を一緒に散布させたシミュレーションから推定された同祖係数の 95% 信頼区間との比較

Comparisons of the coancestry values estimated from the actual data sets (thick lines) with the 95% confidence interval (thin lines) generated by simulations assuming group dispersal of half-sib seeds for *Ilex leucoclada* genets in the immature plot (upper) and secondary plot (lower)

られた (図 6-4)。二次林プロットでは、同祖係数は大きな距離階級で有意に負の値を示し、遠距離のジェネット間に遺伝的分化が認められた (図 6-4)。実際の遺伝的構造を血縁関係のある種子と一緒に散布された場合に予測される遺伝的構造と比較した。その結果、両プロットで最も小さな距離階級の同祖係数は、半兄弟の種子と一緒に散布された場合の同祖係数の信頼区間よりも有意に大きな値を示した (図 6-5)。次に、全兄弟の種子と一緒に散布された場合では、未成熟プロットでは、最も小さな距離階級の同祖係数はシミュレーションで発生させた信頼区間の内側に位置した (図 6-6)。未成熟プロットでは、実際の

値のうちのいくつかのものはシミュレーションで発生させた信頼区間の外側に位置したが、信頼区間から規則的に外れている傾向は認められなかった。一方、二次林プロットでは、最も小さな距離階級の同祖係数は依然として信頼区間よりも有意に大きな値を示し、複数の大きな距離階級では、信頼区間よりも有意に小さな値を示すことが認められた (図 6-6)。

6-4. 考察

本章の研究では、マイクロサテライトマーカーを用いてジェネットを識別した。その結果、ジェネット識別の有効性を示す

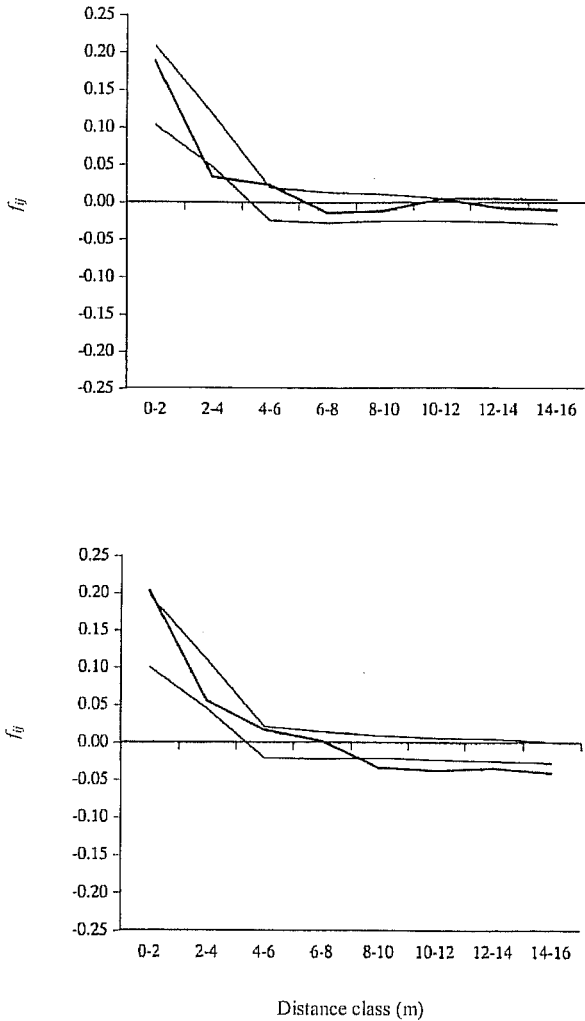


図 6-6. 未成熟プロット（上）と二次林プロット（下）のヒメモチジェネットにおける実際のデータから推定された同祖係数のコロログラムと全兄弟の種子を一緒に散布させたシミュレーションから推定された同祖係数の 95% 信頼区間との比較

Comparisons of the coancestry values estimated from the actual data sets (thick lines) with the 95% confidence interval (thin line) generated by simulations assuming the group dispersal of full-sib seeds for *Ilex leucoclada* genets in the immature plot (upper) and secondary plot (lower)

指数である P_{sex} 値は、有意に低いことが認められた。したがって、マイクロサテライトマーカーは異なるジェネットの識別に有効な遺伝マーカーであると考えられる。また、2つの集団を対象に解析を行った結果、両プロットにおいて遺伝的変異は同程度であったが、クローン多様性（遺伝子型多様性）やハーディ・ワインバーグ平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度、遺伝的構造は異なっていた。したがって、異なる集団間にヒメモチの遺伝的構成（genetic architecture）の差異が検出された。

6-4-1. クローン多様性とクローン構造

多数のクローン植物のクローン多様性を取りまとめた総説において算出された Simpson の D などの平均値 ($G/N = 0.17$, Simpson's $D = 0.62$, Ellstrand and Roose 1987; $G/N = 0.44$, Simpson's $D = 0.74$; Hangelbroke *et al.* 2002) と比較した結果、両プロットにおいてクローン多様性は高いことが明らかになった。複数の幹から構成されるジェネットの数は、二次林プロット (37 個) が未成熟プロット (17 個) の約 2 倍であった。また、ジェネットあたりの幹数においても、二次林プロット (6.0 個) が未成熟プロット (1.9 個) の約 3 倍であった。このように、二次林プロットは、未成熟プロットよりもクローン構造が発達していることが明らかになった。未成熟プロットでは、地すべりや地表流によって砂礫が頻繁に移動し、地表が物理的に不安定であることが認められた (Yamamoto *et al.* 1995)。したがって、未成熟プロットでは、ヒメモチの実生は定着するものの、クローン成長によりパッチを形成するまでに再び地表面の攪乱によってラメートやジェネットが枯死するため、集団の発達が妨げられて集団は発達初期段階にとどまっていると考えられる。一方、二次林プロットでは、地表面の攪乱による枯死がないため、定着したジェネットはクローン成長を行い、集団は発達することができると考えられる。このように、二次林プロットは、未成熟プロットよりも集団の発達段階が進んでいると考えられる。

しかしながら、二次林プロットは、未成熟プロットよりもジェネット数が 7 個しか多くない。集団の発達過程における実生加入の頻度を検討するため、二次林プロットよりも発達の進んだ集団のジェネット数を推定し、両プロットと比較した。この集団は、第 3 章と第 4 章で扱った成熟土壌上でかつササのないサイトに生育するヒメモチ集団である。この集団における 0.09 ha あたりのジェネット数と幹数はそれぞれ 108 個と 1329 個、複数の幹をもつジェネットの数は 58 個、ジェネットあたりの幹数は 12.3 個と推定された。したがって、この集団は二次林プロットよりもさらにクローン構造が発達し、発達段階のより進んだ集団であることがわかった。よって、実際にジェネットは増加するが、その増加はクローン成長による幹の増加よりも極めてゆっくりしたものであることが考えられる。ジェネット数の増減は、ジェネットの加入と死亡のバランスによって決まってくる。二次林プロットでは健全にクローン成長が行われているため、たとえラメートが枯死してもジェネットとしての枯死は回避されるのでジェネットの死亡の程度は低いと考えられる。したがって、ゆっくりとしたジェネット数の増加は、低い実生の加入率とさらに低い死亡率によるものと考えられる。

クローン多様性の指数である Simpson の D をプロット間で比較すると、未成熟プロット (0.975, 95% 信頼区間: 0.967 - 0.987) よりも二次林プロット (0.953, 95% 信頼区間: 0.941 - 0.963) や老齢林の成熟土壌でかつササのないサイト (0.902, 95% 信頼区間: 0.841 - 0.954) で有意に低いことが判明した。二次林プロットや老齢林の成熟土壌上でササのないサイトでは、多数の幹から構成されているジェネットが多く認められ、これらのジェネットは集団の創始イベント、あるいは集団の発達初

期段階で定着し、クローン成長を行いながら現在まで生き残ったものであることが考えられる。ヒメモチ集団では、クローン成長によりクローン構造が発達する過程でクローン多様性が減少する傾向があることがわかった。しかしながら、集団内には、実際に実生の加入があるため、このクローン多様性の減少程度は抑えられていると考えられる。

6-4-2. 遺伝的変異と固定指数

マイクロサテライトマーカーを用いた研究において算出されたヘテロ接合度(期待値)の平均値は、長命な多年生種で0.68、他種種で0.65、鳥類の体内通過型種子散布種で0.73であった(Nyblom 2004)。したがって、両プロットのヒメモチの遺伝的変異は、類似した生活史特性をもつ植物種よりも高いことが明らかになった。本章の研究では、13個の固定指数において、ハーディ・ワインバーグ平衡から期待される遺伝子型頻度よりも有意に偏っていることが認められた。特に、*ILE04-06*と*ILE04-18*では、両プロットでヘテロ接合体頻度の観察値に有意な減少が認められた。したがって、この2個の遺伝子座にはヌル対立遺伝子が存在することが示唆される。

全体の遺伝子座の固定指数は、それぞれ未成熟プロットで正の値、二次林プロットで負の値を示した。固定指数が正や負の値に有意に偏ることは、ヘテロ接合体頻度の観察値がそれぞれハーディ・ワインバーグ平衡の下で期待される期待値から減少していることや過剰であることを表す(Hartl and Clark 1997)。したがって、本章の研究では、ヒメモチでは集団の発達に伴いジェネットの遺伝子型の組成が変化することが示唆される。クローンを形成する *Quercus chrysolepis* (ブナ科) では、ジェネットサイズ(ジェネットあたりの幹数や胸高断面積合計)とヘテロ接合である遺伝子座数の間に有意な正の相関関係が認められ、クローン成長を行うことに対してヘテロ接合体であることが適応的に有利であることが示唆された(Montalvo *et al.* 1997)。本章の研究では、複数の幹を保有するジェネットの数は、二次林プロットが未成熟プロットの約2倍であった。この二次林プロットでは、複数の幹を保有するジェネットにおけるヘテロ接合の遺伝子座数($n = 37$, 平均 = 5.2, S.D. = 0.8)は、一つの幹のみで構成されるジェネットにおけるヘテロ接合の遺伝子座数($n = 48$, 平均 = 5.3, S.D. = 0.8)と有意な差が認められなかった(Mann-Whitney's $U = 822$, $P > 0.05$)。したがって、ヒメモチではクローン成長においてヘテロ接合体のジェネットが適応的に有利である可能性は低いと考えられる。他方、ヒメモチの開花特性の観点からヘテロ接合体頻度の過剰が推察される。二次林プロット内で開花している雄と雌のジェネットの割合は、それぞれ40%と13%であった。第4章の研究においても、開花している雄と雌のジェネットの割合はそれぞれ17%と34%であった。このように、ヒメモチの集団では、有性生殖に参加するジェネット数は限られていることが認められた。交配者の数が小さい場合、雄親と雌親の対立遺伝子頻度は一致せず、その結果、雌雄を区別せずに推定される遺伝的変異の値は、雌雄を区別した場合に推定される値よりも過少になる(Robertson 1965; Rasmussen 1979; Falconer 1981)。この遺伝

的変異が過少に推定されることは、自殖によって子孫が生産されないことを前提とする(Balloux 2004)。したがって、この理論的予測は、二次林プロットで認められた開花特性と過剰なヘテロ接合体頻度を説明するかもしれない。

6-4-3. 遺伝的構造

同祖係数を用いたコロログラムによって、ジェネットの遺伝的構造を調べた。その結果、両プロットにおいて、遺伝的構造が存在することが明らかになった。両プロットにおいて、小さな距離階級で有意な正の空間自己相関が認められた。これは、一般的には栄養繁殖や血縁構造の存在を示唆する(Sokal and Oden 1978; Epperson 1989)。本研究では、ヒメモチのジェネットにおいて同祖係数を算出したので、クローン成長の影響は排除されている。したがって、種子の集中散布による血縁構造が遺伝的構造を形成する要因として考えられる。

シミュレーションの結果から、未成熟プロットの遺伝的構造は、半兄弟の種子と一緒に散布された場合の遺伝的構造とは適合せず、全兄弟の種子と一緒に散布された場合の遺伝的構造と適合した。ヒメモチの果実はたいてい4個の種子を形成するため(山崎 1989)、これらの種子が全兄弟である可能性が高い。したがって、ヒメモチの果実を鳥類が食べると全兄弟にある種子と一緒に持ち去られて散布されることが考えられる。このように、果実の形態によって遺伝的構造が形成されることが考えられる。同様に、Hamrick and Loveless (1986) は、遺伝的構造の程度が果実の形態や種子散布者である動物の行動パターンに依存する可能性を指摘している。例えば、*Neolitsea sericea* (シロダモ)(Chung *et al.* 2000)や*Cinnamomum insularimontanaum* (ニッケイ属)(Chung *et al.* 2003)の研究では、遺伝的構造は認められなかったが、これらの果実の中には大きな種子(約12 mm)を一つもち、鳥は一度に数個しか食べないため、近縁種子はランダムに散布されることが推察されている(Chung *et al.* 2003)。一方、*Pinus albicaulis* (アメリカシロゴヨウ)(Furnier *et al.* 1987)、*Swartzia simplex* var. *ochracea* (マメ科)(Hamrick *et al.* 1993)、*Cecropia obtusifolia* (イラクサ科)(Epperson and Alvarez-Buylla 1997)の研究では、鳥が一度に複数の血縁関係にある種子を持ち去り散布することがすでに明らかになっているが、集団内の実生に遺伝的構造が存在することが認められている。

異なるコロログラムの間の差異を統計的に評価できる方法は開発されていない(Sokal and Wartenberg 1983)。しかし、遺伝的変異の空間分布は明らかに両プロット間で異なることが認められた。二次林プロットでは、小さな距離階級で同祖係数が有意な正の値を示したばかりでなく、大きな距離階級で同祖係数が有意な負の値を示した。これは、遠距離のジェネット間に遺伝的分化が認められることを示す。第3章の研究では、同じパッチ内に生育するジェネット間に遺伝的類似性が認められた。一方、異なるパッチに生育するジェネット間に遺伝的分化が認められた。したがって、本章の研究で認められた明瞭な遺伝的構造は、第3章の研究の結果を支持するものと考えられる。*Rhus trichocarpa* (ヤマウルシ)(Chung *et al.* 1999)や*Rhus javanica* (ヌルデ)(Chung *et al.* 2000)でも、老齢な集団におい

て遺伝的構造がより顕著であることが報告されている。

二次林プロットの遺伝的構造は、全兄弟の種子と一緒に散布されることだけでは説明できなかった。これは、果実の形態の他にも遺伝子分散パターンに偏りがあることを示唆する。このシミュレーションでは家系の散布パターンをランダムに設定した。したがって、実際には家系間の散布パターンに偏りがあることが考えられる。果実食の鳥類に行動パターンや種子散布に偏りが認められたという報告がある (Herrera and Jordano 1981; Hoppes 1988)。Hoppes (1988) は、鳥類による種子の散布量は母樹からの距離が離れるほど小さくなることを明らかにした。また、鳥類が果実の豊富なサイトに集中することも明らかにした (Hoppes 1988)。Godoy and Jordano (2001) は、*Prunus mahaleb* (サクラ属)の果皮から抽出したDNAからマイクロサテライト遺伝子型を決定して、母樹を推定した。その結果、鳥類による種子散布距離の中央値は6.1 mで、種子の散布距離の頻度分布は小さな距離階級に偏っていることを示した (Godoy and Jordano 2001)。二次林プロットのヒメモチ集団は密閉し、ヒメモチは果実を生産していることが認められている。二次林プロットで認められた明瞭な遺伝的構造は、鳥類の偏った行動パターンによって種子が母樹からの距離に依存して散布されることで形成されたのかもしれない。

第7章 総合考察

7-1. クローン植物集団への遺伝マーカーの適用

本研究では、RAPDとマイクロサテライトという二種類の遺伝マーカーを用いてヒメモチのジェネットを識別した。その結果、異なる幹において同じRAPD表現型あるいはマイクロサテライト遺伝子型が検出された。また、このような現象が偶然起こる確率は、ほとんどの場合、統計的に有意に低いことが明らかになった。従来、研究対象とされてきたクローン植物は、野外調査においてジェネットの識別が比較的容易な植物に限定されてきた。しかし、ヒメモチのように野外においてジェネットの識別が困難である場合にも、遺伝マーカーを用いればそれが可能である。このように、本研究では、遺伝マーカーがクローン植物集団のジェネットの識別に有効なツールであることが示された。

AFLPや第3章と第4章の研究で用いたRAPDマーカーは、対象とする種のゲノム情報を必要としないため、簡便に多数の遺伝子座を利用することが可能である。それゆえ、クローン植物集団におけるジェネットの識別がAFLPやRAPDを用いて簡単かつ正確に行われるようになった (Hsiao and Rieseberg 1994; Kreher *et al.* 2000; Suyama *et al.* 2000; Moriguchi *et al.* 2001; Douhovnikoff *et al.* 2004)。しかし、これらは優性マーカーであるため、対立遺伝子レベルの変異を正確に推定できないという欠点がある (Wolff and Morgan-Richard 1999)。花粉や種子を媒介とする植物の遺伝子分散 (gene dispersal) パターンは、集団内の対立遺伝子レベルの変異をもたらす一つの要因である。したがって、対立遺伝子レベルの変異の解析は、自然集団の繁殖システムの解明に不可欠である (Heywood 1991)。従来の研究

では、共優性マーカーであるアイソザイムを用いてクローン植物集団内の対立遺伝子レベルの変異が調査されてきたが、アイソザイムの遺伝的変異の程度は低く (Tani *et al.* 1998; Sydes and Peakall 1998)、集団内の対立遺伝子レベルの変異は十分に把握されていなかった。本研究では、ヒメモチのマイクロサテライトマーカーを開発し、ヒメモチ集団に適用することによって、対立遺伝子レベルの変異を調査した。その結果、発達段階の異なる集団間において、遺伝的変異は同程度であったが、クローン多様性は異なっていることが明らかになった。したがって、McLellan *et al.* (1997) によって指摘されてきたように、本研究ではヒメモチにおいて、遺伝子型レベルの変異 (クローン多様性) と対立遺伝子レベルの変異は必ずしも同じ傾向を示さないことが明らかになった。

7-2. ヒメモチ集団の形成と維持機構

以上のように、遺伝マーカーを用いることによって、ヒメモチ集団の構成をラメート、ジェネット、さらに対立遺伝子という異なるレベルで捉えることができた。そこで、次に、ヒメモチの集団の形成と維持に関する機構について、ラメート、ジェネット、対立遺伝子という異なるレベルから考察を試みた。具体的には、(1) 個体の空間分布の形成、(2) クローン多様性の創出と維持 (3) 遺伝的構造の形成と発達についてそれぞれ考察を試みた。

7-2-1. ヒメモチ集団内における個体の空間分布の形成

第3章の研究では、ヒメモチはパッチを形成することが認められ、これらのパッチは、1 ha プロットの中央付近に集中分布することが明らかになった。さらに、第4章の研究では、ヒメモチのパッチは複数のジェネットから構成され、それぞれのジェネットがクローン成長して幹数を増加させることによって形成されたものであることが明らかになった。このように、ヒメモチ集団内には、パッチ、ジェネット、ラメートという三つの階層からなる空間構造が存在していることが明らかとなった。

通常、植物の自然集団内における個体の分布はランダム分布か集中分布であり、一様分布である場合は極めて少ない (例えば、Hubble 1979; Armesto *et al.* 1986)。森林群集における不均一な個体の分布パターンは、立地微環境の不均一性 (例えば、Yamamoto *et al.* 1995)、種間関係 (例えば、Frellich *et al.* 1998)、限られた種子散布 (例えば、Manabe *et al.* 2000)、クローン成長 (例えば、Chung *et al.* 2000) などの要因によって形成される。そして、これらの要因は様々な空間スケールにおいて作用する (Petraitis and Latham 1999)。クローン成長によって、親個体の周囲の空間に娘個体 (ラメート) を作り出すことで生じるパッチ構造は、多くの植物で認められている (Silvertown 1998)。ヒメモチのジェネットも伏条によるクローン成長によって、その周囲に新たなラメートを作り出してパッチ構造を発達させていることが明らかになった (第4章)。しかし、ヒメモチのパッチでは、一つのジェネットがクローン成長によって一つのパッチを作り出しているのではなく、複数のジェネットが各々

クローン成長を行うことによって一つのパッチを作り出していることが明らかになった(第4章)。このようなパッチという限られた空間内の複数ジェネットの分布は、集団の発達初期段階であると考えられる未成熟プロットでも認められた(第6章)。このことは、集団の創始イベントですでに一つ一つの種子の散布がランダムではなく偏っていたことを示唆する。偏った種子散布をもたらす要因として二つが考えられる。まず、一つ目の要因として、ヒメモチの果実の形態が考えられる。ヒメモチは果実内にたいてい4個の種子を保有するため(山崎 1989)、鳥類が果実を食べると、体内に同時に複数の種子を取り込むことになる。このために、鳥類が糞を排出する際には複数の種子が糞の中に含まれ、一カ所に複数種子が散布されることになる。その結果として、限られた範囲に実生の加入が生じ、それら複数のジェネットのクローン成長によって一つのパッチが形成されるかもしれない。第4章の研究では、一つのパッチは少なくとも15個のジェネットで構成されていることが明らかになった。一つの果実は多くとも4個の種子をもつだけなので、同一果実の種子と一緒に散布されることに起因するジェネットの偏りのみではパッチで認められたジェネットの数を説明できない。そこで、次に二つ目の要因として、鳥類の行動パターンによる偏った種子散布が考えられる。鳥散布型種子をもつ植物では、種子散布量が母樹から離れるほど少なくなる場合(Godoy and Jodano 2001)や特定の止まり木の下に集中する場合(Hoppes 1988)が報告されている。鳥類の採餌行動は果実をつける雌ジェネットが生育するパッチで行われているため、そのようなパッチは他の場所と比べて種子散布の頻度が高くなり、実生の加入が生じて、ジェネット数が増加するのかもしれない。

一方、クローン成長や限られた種子散布によって形成されたパッチもまた集中分布することが認められた(第3章)。これらのパッチの生育する場所は、1 ha プロット内のササの生育しない土壌の成熟したサイトであった(Yamamoto *et al.* 1995)。したがって、このようなサイトは、ヒメモチの生育に適した環境であることが考えられる。以上のように、小さな空間スケールではクローン成長と種子散布、そしてより大きな空間スケールでは不均一な微環境による効果が作用することによって、ヒメモチ集団内の個体の空間構造は階層的に形成されていると考えられる。

7-2-2 ヒメモチ集団内におけるクローン多様性の創出と維持

第3章と第4章の研究では、集団の創始イベントからの時間経過が長いと考えられるヒメモチ集団を対象に研究を進めた。その結果、集団全体に高いクローン多様性が認められた。一方、パッチでは、様々な程度のクローン多様性が認められた。第6章の研究では、異なる発達段階にあると考えられる集団間のクローン多様性を比較した。その結果、集団の発達に伴いクローン多様性は減少することが明らかになった。

植物種におけるクローン多様性は、有性生殖によるジェネットの加入とクローン成長によるラメートの加入の相対的な程度で決定される。この有性生殖とクローン成長を通じて加入してくるジェネットとラメートの割合は様々な生態的、遺伝的要因

によって影響を受ける(Eckert 2002)。第4章の研究では、ヒメモチのパッチに着目してクローン多様性を創出・維持する要因を調査した。その結果、雌花をもつ幹を含むパッチでクローン多様性が高いが、雄花をもつ幹が優占するパッチでクローン多様性が低い傾向が認められた。鳥散布型種子をもつ植物では、鳥類の採餌行動が雌木に偏るため、種子散布も偏ることが報告されている(Herrera *et al.* 1994; Verdú and García-Fayos 2003)。本研究でも、鳥類の行動パターンに依存した種子散布の程度によってパッチ内のクローン多様性の程度が変化していることが考えられる。

このように、ヒメモチ集団のクローン多様性の創出・維持には有性生殖による実生の加入が重要であることが明らかになった(第4章)。次に、第6章の研究では、異なる集団(未成熟プロットと二次林プロット)のクローン多様性とクローン構造を調査した。その結果、集団の発達に伴ってジェネットの数は増加するが、その程度はラメートの増加程度に比べてずっと低いことが推測された。二次林プロットでは健全にクローン成長が行われているため、たとえラメートが枯死してもジェネットとしての枯死は回避されるのでジェネットの死亡の程度は低いと考えられる。したがって、ゆっくりとしたジェネット数の増加は、低い実生の加入率とさらに低い死亡率によるものと考えられる。また、クローン成長によりクローン構造が発達する過程でクローン多様性が減少する傾向があることがわかった。理論的研究では、定着した集団内において実生の加入率が低い場合でさえ高いクローン多様性は維持されることが予測されている(Soane and Watkinson 1979; Watkinson and Powell 1993)。したがって、本研究でも、集団内には実際に実生の加入があるため、このクローン多様性の減少程度は抑えられていると考えられる。

7-2-3 ヒメモチ集団内における遺伝的構造の形成と発達

第3章の研究では、ヒメモチのパッチ間に遺伝的分化が存在することが認められた。第6章の研究では、マイクロサテライトマーカーを用いて対立遺伝子の空間分布を調査した。その結果、集団の発達初期段階においてすでに遺伝的構造が存在すること、より発達した集団では遺伝的構造が強まることが明らかになった。

遺伝的構造は、遺伝子流動、遺伝的浮動、自然淘汰の結果として形成され、さらにこれらの要因は、交配様式、花粉や種子の限られた散布、成熟個体の密度、生育微環境の不均一性、分布移動の歴史などの生態的要因の影響を受ける(Epperson 1993; Hamrick *et al.* 1993; Hamrick and Nason 1996; Kalisz *et al.* 2001)。これらの生態的要因の中で、限られた種子散布は遺伝的構造の有無とその強弱の両方に影響を及ぼす要因であり、その他の要因は遺伝的構造の強弱にのみ影響を及ぼす要因である。種子散布の重要な生態的意義の一つに集団の形成という役割が考えられる。風あるいは鳥類や他の動物によるランダムな種子散布によって新しい生育地に定着した場合、集団の初期における遺伝的変異の空間分布はほぼランダムであることが予想される。しかし、第6章の研究では、集団の発達初期段階と考

えられる未成熟プロットにおいて遺伝的構造が認められた。シミュレーションの結果から、鳥の行動パターンがランダムな場合でも、血縁関係にある種子が一緒に散布されることによって遺伝的構造が形成されることが示された。ヒメモチの一つの果実はたいてい4個の種子を含むため(山崎1989)、一度鳥類が果実を食べると体内に複数の全兄弟の種子を取り込むことになり、排泄物にはこのような種子が含まれることになると考えられる。

第6章の研究では、集団の発達に伴い遺伝的構造が強まることが明らかになった。シミュレーションの結果から、血縁関係にある種子が一緒に散布された場合よりも実際に観察された遺伝的構造は強いことが明らかになった。シミュレーションでは、家系間の散布パターンはランダムであることを仮定している。したがって、観察された強い遺伝的構造は、鳥による種子散布が偏っていることを示唆している。理論的研究では、発達段階の進んだ集団内では局所的な種子散布や更新が繰り返されることによって距離による隔離の効果が促進されるため、遺伝的構造が強まることが予測されている(Epperson 1993)。果実食の鳥類の行動パターンや種子散布に関する研究では、鳥の行動パターンは必ずしもランダムではなく、例えばある特定の止まり木に偏るため、種子散布もランダムでないことが報告されている(Herrera and Jordano 1981; Hoppes 1988)。集団の発達に伴って植生は密閉し、鳥の行動パターンに偏りが生じるため、種子散布は母樹の周囲に集中し、遺伝的構造は強められるのかもしれない。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、そのきっかけからまともに至るまで終始適切なご指導と励ましのお言葉をいただいた名古屋大学大学院生命農学研究科(森林生態生理学研究室)戸丸信弘教授に心より感謝の意を表します。

また、名古屋大学山本進一理事(副総長)[同大学大学院生命農学研究科(森林生態生理学研究分野)前教授]、同大学大学院生命農学研究科(森林保護学研究分野)柴田敬之教授、首都大学東京大学院理学研究科鈴木準一郎助教授、名古屋大学大学院生命農学研究科(森林生態生理学研究分野)小川一治教員には、ご専門の立場から有益なご助言をいただきました。

名古屋産業大学環境情報ビジネス学部西村尚之教授には、調査プロットの毎木データを提供していただいただけでなく、本研究の調査において数多くのご助言や貴重な労力を提供していただきました。

名古屋大学大学院生命農学研究科院生平岡宏一氏、鈴木節子氏、高林香織氏、中森由美子氏、山中 香氏、および修了生の星野大介氏、山下飛鳥氏、中尾有里氏、早川武宏氏、宗原慶恵氏、鳥取大学農学部森林生態系管理学研究室の学生・院生の方々には野外調査において貴重な労力を提供していただきました。また、鳥取大学蒜山演習林谷田真人氏はじめ技官の方々には、野外調査の宿泊において数多くのご便宜を図っていただきました。

第3章の研究においては、名古屋大学大学院生命農学研究科(森林生態生理学研究分野)修了生加藤京子氏、生川淑子氏、奥山 慶氏から貴重なご助言をいただきました。第5章のマイクロサテライトマーカーの開発では、森林総合研究所森林遺伝研究領域津村義彦氏、谷 尚樹氏、上野真義氏、森口喜成氏、新潟大学大学院自然科学研究科院生高橋友和氏、東京農業大学大学院農学研究科修了生菅谷貴志氏にご協力いただきました。また、第6章の研究では、森

総合研究所森林遺伝研究領域津村義彦氏、谷 尚樹氏に専門的立場からご助言をいただきました。

名古屋大学大学院生命農学研究科元技官鈴木道代氏や院生、学生の方々には数々のご協力や励ましのお言葉をいただきました。

以上の各位に対して、心から感謝の意を表します。

引用文献

- Aagaard J.E., Krutovskii K.V., Strauss S.H. (1998) RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas fir. *Heredity* **81**, 69-78.
- Antonovics J., Ellstrand N.C. (1984) Experimental studies of the evolutionary significance of sexual reproduction. I. A test of the frequency-dependent selection hypothesis. *Evolution* **38**, 103-115.
- Armesto, J.-J., Mitchell, J.D., Villagran C. (1986) A comparison of spatial patterns of trees in some tropical and temperate forests. *Biotropica* **18**, 1-11.
- Asuka Y., Tomaru N., Nishimura N., Tsumura Y., Yamamoto S. (2004) Heterogeneous genetic structure in a *Fagus crenata* population in an old-growth beech forest revealed by microsatellite markers. *Molecular Ecology* **13**, 1241-1250.
- Auge H., Neuffer B., Erlinghagen F., Gruppe R., Brandl R. (2001) Demographic and random amplified polymorphic DNA analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. *Molecular Ecology* **10**, 1811-1819.
- Balloux F. (2004) Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* **58**, 1891-1900.
- Barrett J.P., Silander J.A. (1992) Seedling recruitment limitation in white clover (*Trifolium repens*; Leguminosae). *American Journal of Botany* **79**, 643-649.
- Berg E.E., Hamrick J.L. (1994) Spatial and genetic structure of two sandhill oaks: *Quercus laevis* and *Quercus margaretta* Fagaceae. *American Journal of Botany* **81**, 7-14.
- Besag J. (1977) Contribution to the discussion on Dr Ripley's paper. *Journal of the Royal Statistical Society B*, **39**, 193-195.
- Burdon J.J. (1980) Intra-specific diversity in a natural population of *Trifolium repens*. *Journal of Ecology* **68**, 717-735.
- Ceplitis A. (2001) The importance of sexual and asexual reproduction in the recent evolution of *Allium vineale*. *Evolution* **55**, 1581-1591.
- Chung M.G., Chung J.M., Epperson B.K. (1999) Spatial genetic structure of allozyme polymorphism within population of *Rhus trichocarpa* (Anacardiaceae). *Silvae genetica* **48**, 223-227.
- Chung M.G., Chung J.M., Chung M.Y., Epperson B.K. (2000) Spatial distribution of allozyme polymorphisms following clonal and sexual reproduction in populations of *Rhus javanica* (Anacardiaceae). *Heredity* **84**, 178-185.
- Chung M.G., Chung M.Y., Oh G.S., Epperson B.K. (2000) Spatial genetic structure in a *Neolitsea sericea* population (Lauraceae). *Heredity* **85**, 490-497.
- Chung M.Y., Nason J.D., Epperson B.K., Chung M.G. (2003) Temporal aspects of the fine-scale genetic structure in a population of *Cinnamomum insularimontanum* (Lauraceae). *Heredity* **90**, 98-106.
- Cipollini M.L., Whigham D.F. (1994) Sexual dimorphism and cost of reproduction in the dioecious shrub *Lindera benzoin* (Lauraceae). *American Journal of Botany* **81**, 65-75.
- Cockerham C.C. (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* **23**, 72-84.
- Dick C.W., Etchelecu G., Austerlitz F. (2003) Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology* **12**, 753-764.

- Diggle P.K., Lower S., Ranker T.A. (1998) Clonal diversity in alpine populations of *Polygonum viviparum* Polygonaceae. *International Journal of Plant Sciences* **159**, 606-615.
- Douhovnikoff V, Cheng A.M., Dodd R.S. (2004) Incidence, size and spatial structure of clones in second-growth stands of coast redwood, *Sequoia sempervirens* (Cupressaceae). *American Journal of Botany* **91**, 1140-1146.
- Dow B.D., Ashley M.V. (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* **5**, 615-627.
- Eckert C.G., Barrett S.C.H. (1993) Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *American Journal of Botany* **80**, 1175-1182.
- Eckert C.G. (2002) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology* **15**, 501-520.
- Edwards J. (1984) Spatial pattern and clone structure of the perennial herb, *Aralia nudicaulis* L. (Araliaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **111**, 28-33.
- Ellstrand N.C., Roose M.L. (1987) Pattern of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**, 123-131.
- Ennos R.A. (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* **72**, 250-259.
- Epperson B.K. (1989) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* (eds Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S.), pp.229-253. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Epperson B.K. (1990) Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics* **124**, 757-771.
- Epperson B.K. (1993) Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evolutionary Biology* **27**, 95-155.
- Epperson B.K., Alvarez-Buylla E.R. (1997) Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. *Evolution* **51**, 275-282.
- Eriksson O. (1989) Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos* **55**, 231-238.
- Eriksson O. (1993) Dynamics of genet in clonal plants. *Trends in Ecology and Evolution* **8**, 313-316.
- Escaravage N., Questiau S., Pornon A., Douche B., Taberlet P. (1998) Clonal diversity in *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Molecular Ecology* **7**, 975-982.
- Esselman E.J., Jianqiang L., Crawford D.J., Winduss J.L., Wolfe A.D. (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *Insuperata* (Poaceae) : comparative results for allozyme and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* **8**, 443-451.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotype, application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Fager E.W. (1972) Diversity: a sampling study. *American Naturalist* **106**, 293-310.
- Falconer D.S. (1981) An introduction to quantitative genetics. Longman, London.
- Fernando D.D., Cass D.D. (1996) Genotypic differentiation in *Butomus umbellatus* (Butomaceae) using isozymes and random amplified polymorphic DNAs. *Canadian Journal of Botany* **74**, 647-652.
- Firbank L.G., Watkinson A.R. (1987) On the analysis of competition at the level of the individual plant. *Oecologia* **71**, 308-317.
- Fischer M., Matthies D. (1998) RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *gentianella Germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* **85**, 811-819.
- Fischer M., Husi R., Prati D. et al. (2000). RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* **87**, 1128-1137.
- Freligh L.E., Sugita S., Reich P.B., Davis M.B., Friedman S.K. (1998) Neighbourhood effects in forests: implication for within-stand patch structure. *Journal of Ecology* **86**, 149-161.
- 藤田 昇 (1986) 日本海型のブナ林と太平洋側のブナ林の構造と組成. 種生物学研究 **10**, 1-13.
- Furnier G.R., Knowles P., Clyde M.A., Danick B.P. (1987) Effects of avian seed dispersal on the genetic structure of whitebark pine populations. *Evolution* **41**, 607-612.
- Gao S., Thompson E. (1992) Performing the exact test of Hardy-Wienberg proportion from multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.
- Gillespie J.H. (1998) Population genetics: a concise guide. The Johns Hopkins Press Ltd., London.
- Godoy J.A., Jordano P. (2001) Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *Molecular Ecology* **10**, 2275-2283.
- Haase P. (1995) Spatial pattern analysis in ecology based on Ripley's K-function: introduction and methods of edge correction. *Journal of Vegetation Science* **6**, 575-582.
- Hamilton M.B., Pincus E.L., DiFiore A., Fleischer R.C. (1999) A universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **27** (3), 500-507.
- Hamrick J.L., Godt M.J.W., Sherman-Broyers S.L. (1992) Factor influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* **6**, 95-124.
- Hamrick J.L., Murawski D.A., Nason J.D. (1993) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetatio* **107/108**, 281-297.
- Hamrick J.L., Loveless M.D. (1986) The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: *Frugivores and seed dispersal* (eds Estrada A, Fleming TH), pp. 211-223. Dr Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hamrick J.L., Nason J.D. (1996) Consequences of dispersal in plants. In: *Population Dynamics in Ecological Space and Time* (eds Rhodes OE, Chesser RK, Smith MH), pp. 203-236. University of Chicago Press, Chicago.
- Handel S.N. (1985) The intrusion of clonal patterns on plant breeding systems. *American Naturalist* **125**, 367-384.
- Hangelbroke H.H., Ouborg N.G., Santamaría L., Schwenk K. (2002) Clonal diversity and structure within a population of the pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's swans. *Molecular Ecology* **11**, 2137-2150.
- Harada Y., Iwasa Y. (1996) Analyses of spatial patterns and population processes of clonal plants. *Researches on Population Ecology* **38**, 153-164.
- Hardy O.J., Vekemans X. (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analysis spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618.
- Harper J.L. (1977) Population Biology of Plants. Academic Press, London.
- Hartl D.L., Clark A.G. (1997) Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hayakawa T., Tomaru N., Yamamoto S. (2004) Stem distribution and clonal structure of *Chamaecyparis pisifera* growing in an old-growth beech-conifer forest. *Ecological Research* **19**, 411-420.
- Herben T., Hara T. (1997) Competition and spatial dynamics of clonal plants. In: de Kroon H, van Groenendael J, eds. *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Leiden: Backhuys Publisher, 331-357.
- Herben T., Hara T. (1997) Competition and spatial dynamics of clonal plants. In: *The Ecology and Evolution of Clonal Plants* (eds H. de Kroon, J. van Groenendael), pp. 331-357. Backhuys Publisher, Leiden, the Netherlands.

- Herrera C.M., Jordano P. (1981) *Prunus mahaleb* and bird: the high-efficiency seed dispersal system of a temperate fruiting tree. *Ecological Monograph* **51**, 203-218.
- Herrera C.M., Jordano P., López-Soria L., Amat J. (1994) Recruitment of a mast fruiting, bird dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monograph* **64**, 315-344.
- Heuertz M., Hausman J-F., Hardy O., Vendramin G.V., Frascaria-Lacoste N., Vekemans X. (2004) Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution* **58**, 976-988.
- Heywood J.S. (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* **22**, 335-355.
- Hoffmann R.J. (1986) Variation in contributions of asexual reproduction to genetic structure of populations of the sea anemone *Metridium senile*. *Evolution* **40**, 357-365.
- Holderegger R., Stehlik I., Scheller J.J. (1998) Estimation of the relative importance of sexual and vegetative reproduction in the clonal woodland herb *Anemone nemorosa*. *Oecologia* **117**, 105-107.
- Hoppes W.G. (1988) Seedfall pattern of several species of bird-dispersal plants in an Illinois woodland. *Ecology* **69**, 320-329.
- Hsiao L-H., Rieseberg L.H. (1994) Population genetic structure of *Yushania nitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* **3**, 201-208.
- Hubble, S.P. (1979) Tree dispersion, abundance, and diversity in a tropical dry forest. *Science* **203**, 1299-1306.
- Ingvarsson P.K., Giles B.E. (1999) Kin-structured colonization and small-scale genetic differentiation in *Silene dioica*. *Evolution* **53**, 605-611.
- Jelinski D.E., Cheliak W.M. (1992) Genetic diversity and spatial subdivision of *Populus tremuloides* (Salicaceae) in a heterogeneous landscape. *American Journal of Botany* **79**, 728-736.
- Jenik J. (1994) Clonal Growth in Woody Plant: A Review. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **29**, 291-306.
- Jordano P., Herrera C.M. (1995) Shuffling the offspring: Uncoupling and spatial discordance of multiple stages in vertebrate seed dispersal. *Ecoscience* **2**, 230-237.
- Kajimoto T. (1992) Dynamics and dry matter production of belowground woody organs of *Pinus pumila* trees growing on the Kiso mountain range in central Japan. *Ecological Research* **7**, 333-339.
- Kalisz S., Nason J.D., Hanzawa F.A., Tonsor S.J. (2001) Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history and selection. *Evolution* **55**, 1560-1568.
- Kikuchi S., Isagi Y. (2002) Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. *Japonica*. *Heredity* **88**, 313-321.
- Kreher S.A., Fore S.A., Collins B.S. (2000) Genetic variation within and among patches of the clonal species, *Vaccinium stamineum* L. *Molecular Ecology* **9**, 1247-1252.
- de Kroon H., Hutchings M.J. (1995) Morphological plasticity in clonal plants: the foraging concept reconsidered. *Journal of Ecology* **83**, 143-152.
- de Kroon H., van Groenendael J. (1997) The Ecology and Evolution of Clonal Plants. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Kudoh H., Shibaike H., Takasu H., Whigham D.E., Kawando S. (1999) Genetic structure and determinants of clonal structure in a temperate deciduous woodland herb, *Uvularia perfoliata*. *Journal of Ecology* **87**, 244-257.
- Kumer S., Tamura K., Jakobsen I., Nei M. (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis, version 2.0. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Loiselle B.A., Sork V.L., Nason J.D., Graham C. (1995) Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* **82**, 1420-1425.
- Loveless M.D., Hamrick J.L. (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**, 65-95.
- Lovett Doust L. (1981) Population dynamics and local specialization in a clonal perennial *Ranunculus repens* L. The dynamics of ramets in contrasting habitats. *Journal of Ecology* **69**, 743-755.
- Lovett Doust J., Lovett Doust L. (1988) Modules of production and reproduction in a dioecious clonal shrub, *Rhus typhina*. *Ecology* **69**, 741-750.
- Lynch M., Milligan B.G. (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-99.
- MaCauley D.E. (1997) The relative contributions of seed and pollen movement to the local genetic structure of *Silene alba*. *Journal of Heredity* **88**, 257-263.
- Manabe T., Nishimura N., Miura M., Yamamoto S. (2000) Population structure and spatial patterns for trees in a temperate old-growth evergreen broad-leaved forest in Japan. *Plant Ecology* **151**, 181-197.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- 松田昭美 (1973) 大山の気候. 大山隠岐国立公園大山地区学術調査報告, 財団法人自然保護協会調査報告第 45 号.
- Mayes S.G., McGinley M.A., Werth C.R. (1998) Clonal population structure and genetic variation in sand-shimery oak, *Quercus havardii* Fagaceae. *American Journal of Botany* **86**, 1609-1617.
- McFadden C.S. (1997) Contributions of sexual and asexual reproduction to population structure in the clonal soft coral, *Alcyonium rudyi*. *Evolution* **51**, 112-126.
- McLellan A.J., Prati D., Kaltz D., Schmid B. (1997) Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. In: *The Ecology and Evolution of clonal Plants* (eds H.de Kroon & J.van Groenendael), pp. 185-210. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands.
- Miwa M., Tanaka R., Yamanoshita T., Norisada M., Kojima K., Hogetsu T. (2001) Analysis of clonal structure of *Melaleuca cajuputi* (Myrtaceae) at a barren sandy site in Thailand using microsatellite polymorphism. *Trees* **15**, 242-248.
- Miura M., Yamamoto S. (2003) Structure and dynamics of a *Castanopsis cuspidate* var. *sieboldii* population in an old-growth, evergreen, broad-leaved forest: the importance of sprout regeneration. *Ecological Research* **18**, 115-129.
- 宮脇 昭, 大野啓一, 奥田重俊 (1973) 大山の植生. 大山隠岐国立公園大山地区学術調査報告, 財団法人自然保護協会調査報告第 45 号.
- Montalvo A.M., Conard S.G., Conkle M.T., Hodgskiss P.D. (1997) Population structure genetic diversity, and clonal formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae). *American Journal of Botany* **84**, 1553-1564.
- Moriguchi Y., Matsumoto A., Saito M., Tsumura Y., Taira H. (2001) DNA analysis of clonal structure of an old growth, isolated forest of *Cryptomeria japonica* in a snowy region. *Canadian Journal of Forest Research* **31**, 377-383.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* **8**, 4321-4325.
- Nagamitsu T., Ogawa M., Ishida K., Tanouchi H. (2004) Clonal diversity, genetic structure, and mode of recruitment in a *Prunus ssiroi* population established after volcanic eruptions. *Plant Ecology* **174**, 1-10.
- Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nyblom H., Bartish I.V. (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD

- markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3, 93-114.
- Nyblom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143-1155.
- Obeso J.R., Alvarez-Santullano M., Retuerto R. (1998) Sex ratios, size distributions, and sexual dimorphism in the dioecious tree *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae). *American Journal of Botany* 85, 1602-1608.
- Ohkubo T., Tanimoto T., Peters R. (1996) Response of Japanese beech (*Fagus japonica* Maxim.) sprouts to canopy gaps. *Vegetatio* 124, 1-8.
- Park J.C., 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.
- Peet K.P. (1974) The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 5, 285-307.
- Perry D.J., Knowles P. (1991) Spatial genetic structure within three sugar maple (*Acer saccharinum* Marsh.) stands. *Heredity* 66, 137-142.
- Persson H.A., Gustavsson B.A. (2001) The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Molecular Ecology* 10, 1397.
- Peterson R.L. (1975) The initiation and development of root buds. In: *The development and function of roots* (eds Torrey J.G., Clarkson D.T.), pp 125-161. Academic Press, London.
- Petratis P.S., Latham R.E. (1999) The importance of scale in testing the origin of alternative community states. *Ecology* 80, 429-442.
- Pielou E.C. (1969) An introduction to mathematical ecology. New York, Wiley.
- Pornon A., Escaravage N., Till-Bottraud I., Doche B. (1997) Variation of reproductive trait in *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) population along a successional gradient. *Plant Ecology* 130, 1-11.
- Pornon A., Escaravage N., Thomas P., Taberlet P. (2000) Dynamics of genotypic structure in clonal *Rhododendron ferrugineum* Ericaceae populations. *Molecular Ecology* 9, 1099-1111.
- Rasmussen D.I. (1979) Sibling clusters and gene frequencies. *American Naturalist* 113, 948-951.
- Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.
- Rebertus A.J., Williamson G.B., Moser E.B. (1989) Fire-induced changes in *Quercus laevis* spatial pattern in Florida sandhills. *Journal of Ecology* 77, 638-650.
- Reinartz J.A., Popp J.W. (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. *American Journal of Botany* 75, 1732-1741.
- Reusch T.B.H., Stam W.T., Olsen J.L. (2000) Amicrosatellite-based estimation of clonal diversity and population subdivision in *Zostera marina*, a marine flowering plant. *Molecular Ecology* 9, 127-140.
- Rice W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Richards A.J. (1986) Plant Breeding Systems: London: George Allen & Unwin.
- Ripley B.D. (1976) The second-order analysis of stationary processes. *Journal of Applied Probability* 13, 255-266.
- Robertson A. (1965) The interpretation of genotypic ratios in domestic animal populations. *Animal Production* 7, 319-324.
- Ross M.A., Harper J.L. (1972) Occupation of biological space during seedling establishment. *Journal of Ecology* 60, 77-88.
- Sakai A.K., Burris T.A. (1985) Growth in male and female aspen clones: a twenty-five-year longitudinal study. *Ecology* 66, 1921-1927.
- Schnabel A., Laushman R.H., Hamrick J.L. (1991) Comparative genetic structure of two co-occurring tree species, *Maclura pomifera* (Moraceae) and *Gleditsia triacanthos* (Leguminosae). *Heredity* 67, 357-364.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000) ARLEQUIN, vers 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shapcott A. (1995) The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). *Heredity* 74, 28-38.
- Silvertown J.W. (1998) Introduction to Plant Population Ecology. 2nd edn. Longman, London, UK.
- Silvertown J.W., Charlesworth D. (2001) Introduction to plant population biology. 4th edn. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Slade A.J., Hutching M.J. (1987a) The effects of nutrient availability on foraging in the clonal herb *Glechoma hederacea*. *Journal of Ecology* 75, 95-112.
- Slade A.J., Hutching M.J. (1987b) The effects of light intensity on foraging in the clonal herb *Glechoma hederacea*. *Journal of Ecology* 75, 639-650.
- Sneath P.H., Sokal R.R. (1973) Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Soane I.D., Watkinson A.R. (1979) Clonal variation in populations of *Ranunculus repens*. *New Phytologist* 82, 557-573.
- Sokal R.R., Oden N.L. (1978) Spatial autocorrelation in biology. I. Metodology. *Biological Journal of the Linnean Society* 10, 199-228.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995) Biometry, 3rd edn. WH Freeman and Co., New York.
- Sokal R.R., Wartenberg D. (1983) A test of spatial autocorrelation analysis using an isolation-by-distance model. *Genetics* 105, 219-237.
- Squirrell J., Hollingsworth P.M., Woodhead M., et al. (2003) How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12, 1339-1348.
- Stehlik I., Holderegger R. (2000) Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemorosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe. *Journal of Ecology* 88, 424-435.
- Suyama Y., Obayashi K., Hayashi I. (2000) Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. *Molecular Ecology* 9, 901-906.
- 鈴木準一郎 (2003) 無性生殖. 生態学事典 (巖波, 松本, 菊沢編) pp. 529-530. 共立出版. 東京.
- 鈴木時夫 (1949) 北海道檜山地方のブナ林に就いて. 日林誌 31, 18-25.
- Sydes M.A., Peakall R. (1998) Extensive clonality in the endangered shrub *Haloragodendron lucasii* (Haloragaceae) revealed by allozymes and RAPDs. *Molecular Ecology* 7, 87-93.
- Tani N., Tomaru N., Tsumura Y., Araki M., Ohba K. (1998) Genetic structure within a Japanese stone pine (*Pinus pumila* Regal) population on Mt. Aino-Dake in Central Honshu, Japan. *Journal of Plant Research* 111, 7-15.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17, 6463-6471.
- Ueno S., Tomaru N., Yoshimaru H., Manabe T., Yamamoto S. (2000) Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. *Molecular Ecology* 9, 647-656.
- Van der Velde M., Doring H.J., Zande L.V., Bijlsma R. (2001) The reproductive biology of *Poytrichum formosum*: clonal structure and paternity revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 10, 2423-2434.
- Verdú M., García-Fayos P. (2003) Frugivorous birds mediate sex-biased facilitation in a dioecious nurse plant. *Journal of Vegetation Science* 14, 35-42.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M. et al. (1995) AFLP: a new technique for

- DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- 渡辺定元 (1994) 樹木社会学. 東京大学出版会. 東京.
- Watkinson A.R., Powell J.C. (1993) Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant population - a computer simulation of *Ranunculus repens*. *Journal of Ecology* **81**, 707-717.
- Whitlock M.C., McCauley D.E. (1990) Some population genetic consequences of colony formation and extinction: genetic correlations within founding groups. *Evolution* **44**, 1717-1724.
- Widén B., Cronberg N., Widén M. (1994) Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plant, a literature survey. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* **29**, 245-263.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Williams J.G.K., Hanafey M.K., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* **218**, 704-740.
- Winkler E., Stöcklin J. (2002) Sexual and vegetative reproduction of *Hieracium pilosella* L. under competition and disturbance: a grid-based simulation model. *Annals of Botany* **89**, 525-536.
- Wolff K., Morgan-Richards M. (1999) The use of RAPD data in the analysis of population genetic structure: case studies of *Alkanna* (Boraginaceae) and *Plantago* (Plantaginaceae). In: *Molecular Systematics and Plant Evolution* (eds Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ), pp. 51-73. Taylor & Francis, London.
- Yamamoto S., Nishimura N., Matsui K. (1995) Natural disturbance and tree species coexistence in old-growth beech-dwarf bamboo forest, southwestern Japan. *Journal of Vegetation Science* **6**, 875-886.
- 山崎 敬 (1959) 日本列島の植物分布. 自然科学と博物館 **31**, 1-19.
- 山崎 敬 (1989) モチノキ科. 日本の野生植物 (佐竹, 原, 亘理, 富成編) pp. 29-30. 平凡社. 東京.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.

摘 要

クローン植物の個体の定義には、生理的独立性を重視した「ラメート」と遺伝的に同一性を重視した「ジェネット」という二種類がある。クローン植物に関する集団生物学は、このラメートとジェネットという異なるモジュールレベルで研究されてきた。集団の大きさ、新規加入、枯死、遺伝的変異、ハーディ・ワインバーク平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度などの集団の特性は全てジェネット次第で決まってくる。さらに、集団内の進化的変化における潜在的な可能性はジェネットの保有する遺伝的変異に支配される。したがって、ジェネットの識別やその数の決定、ジェネットの空間分布の把握、そしてジェネットの保有する遺伝的変異の定量化は、クローン植物集団の個体群動態や小進化の素過程に関する研究にとって不可欠であると考えられる。

ヒメモチはモチノキ科モチノキ属の雌雄異株の常緑低木である。北海道西部や本州の日本海側に分布し、積雪の多い山地のブナ林の林床に生育する。一般にモチノキ属は花粉が虫媒、種子が鳥散布であるといわれている。ヒメモチはこのような種子による繁殖とともに伏条によるクローン成長も行い、パッチを形成していることが認められている。したがって、このような空間特性 (パッチ形成) と繁殖特性 (雌雄異株, クローン成

長) をもつヒメモチは、クローン植物集団の個体群動態や小進化の素過程を理解する上で興味深い研究対象の一つであると考えられる。本研究では、鳥取県大山ブナ老齢林のヒメモチ集団を研究対象とし、RAPDとマイクロサテライトを遺伝マーカーとして用いてジェネットを識別し、クローン多様性と遺伝的変異を明らかにし、その結果をもとにヒメモチ集団の形成と維持機構を検討することを目的とした。

まず、ブナ老齢林内に設置した1 haプロット (50 × 200 m) 全体のヒメモチのパッチを対象として、31個のRAPDマーカーを用いてジェネットを識別し、パッチ内のクローン多様性、パッチ内とパッチ間の遺伝的変異を調べた。1 haプロットには、38個のパッチが存在し、それらはプロットの中央付近に集中分布していた。1 haプロット内に完全に含まれる27個のパッチの合計215幹は168個のジェネットに識別された。各パッチでは高いクローン多様性が認められた (平均の $G/N = 0.79$, 平均の Simpson の $D = 0.89$)。また、パッチ間のRAPD表現型の変異性は有意となり (分子分散分析の $\phi_{ST} = 0.316$)、パッチ間の遺伝的分化が明らかになった。しかし、パッチ間の遺伝的距離と地理的距離には相関が認められず、遺伝距離に基づくクラスター分析によって得られた類似度関係図もパッチの分布と明瞭な関連性が認められなかった。このことは、パッチ間に階層的な遺伝的構造がないことを示す。調査した集団とパッチにおいて認められた高いクローン多様性は、複数の創始者やパッチ形成途上での実生の加入、体細胞突然変異によって説明されると考えられる。また、パッチ間の有意な遺伝的分化は別々の創始イベントや血縁構造化に起因すると考えられる。

次に、パッチという限られた空間内のクローン構造 (パッチを構成するジェネット数, ジェネットあたりの幹数, 各ジェネットの空間分布) とクローン多様性を調べた。前述の研究の1 haプロット内から、雄花をもつ幹の優占するパッチ (雄パッチ), 雌花をもつ幹の優占するパッチ (雌パッチ), 雄花をもつ幹と雌花をもつ幹が混在しているパッチ (雌雄混在パッチ) をそれぞれ2個ずつ選定した。ジェネットの識別には6~10個のRAPDマーカーを用いた。6パッチの合計1928個の幹は156個のジェネットに識別された。クローン多様性は、雄パッチで最も低く、雌雄混在パッチで最も高い傾向が認められた。空間分布図からジェネットは斜面に沿って拡大したことが認められ、これは幹が雪の重みで接地した際に起こった伏条によるクローン成長によるものと考えられる。どのパッチでも、多数の幹をもつ大きいジェネットが少数と少数の幹をもつジェネットが多数存在していることが認められた。パッチ間のクローン多様性の差異は、実生の加入頻度が異なることに起因すると考えられる。また、パッチにおけるジェネットサイズ (ジェネットあたりの幹数) の歪んだ頻度分布は、発芽のタイミングや齢 (早期に定着したジェネットの資源獲得における有利性), 種内競争の両方または一方によって説明されると考えられる。

植物集団を対象とした親子鑑定, 花粉・種子の散布, 交配様式, 遺伝的構造などに関する研究において、マイクロサテライトマーカーは最も有効なマーカーであると考えられている。そこで、ヒメモチのマイクロサテライトマーカーの開発を行っ

た。432 個のクローン中、189 個にマイクロサテライト部位が認められた。これらの DNA 断片の塩基配列から 92 組のプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて PCR 増幅を試みた結果、13 組のプライマーで明瞭な DNA 断片の増幅がみられた。ヒメモチの分布域全体に渡る 12 集団から各集団 3 サンプルずつ合計 36 サンプルを用いて、開発された 13 個のマイクロサテライトマーカーの多型性を調べた。その結果、マーカーあたり 3 から 27 個の対立遺伝子が検出され、ヘテロ接合度の期待値は各マーカーあたり 0.133 から 0.971 までの値を示した。これら 13 個のマイクロサテライトマーカーはヒメモチの集団遺伝や生態遺伝を研究する有効なツールであることが示された。

次に、開発した 8 個のマイクロサテライトマーカーを用いて異なるヒメモチ集団（未成熟プロットと二次林プロット）の遺伝的構成 (genetic architecture) パターンを、クローン多様性、遺伝的変異、ハーディ・ワインバーグ平衡からの遺伝子型頻度の偏りの程度、遺伝的構造を調べることにより明らかにした。未成熟プロットと二次林プロットのそれぞれ 145 個と 510 個の幹の遺伝子型を決定した結果、78 個と 85 個のジェネットに識別された。複数の幹から構成されるジェネットの数やジェネットあたりの幹数は、二次林プロットが未成熟プロットよりもそれぞれ約 2 倍と約 3 倍多く、二次林プロットはクローン構造の発達した集団であることが明らかになった。クローン多様性は、未成熟プロットが二次林プロットよりも有意に高かった。しかし、遺伝的変異を表すヘテロ接合体の期待値は、プロット間に有意な差が認められなかった。両プロットでは、ハーディ・ワインバーグ平衡から期待される遺伝子型頻度からの有意な偏りが認められた。両プロットでは、小さな距離階級において同祖係数が有意な正の値を示し、遺伝的構造の存在が示唆された。さらに、二次林プロットでは大きな距離階級において同祖係数が有意な負の値を示し、遠距離のジェネット間における遺伝的分化の存在が示唆された。

以上の研究を通して、ヒメモチの集団内にはラメート、ジェネット、パッチという 3 つの階層からなる構造があることが明らかとなった。小さな空間スケールではクローン成長と種子散布、そしてより大きな空間スケールでは不均一な微環境による効果が作用することによって、この階層構造が形成されていると考えられる。また、ヒメモチ集団では、鳥類の行動パターンに依存した種子散布の程度によってパッチ内のクローン多様性の程度が変化していることが考えられる。そして、集団の発達に伴いクローン多様性は減少する傾向が認められるが、集団内には実際に実生の加入があるため、クローン多様性の減少程度は抑えられていると考えられる。遺伝的構造は、全兄弟にある種子と一緒に散布されることによって形成され、さらに母樹の周囲に種子散布が集中されることによって促進されるものと考えられる。

ヒメモチのように野外においてジェネットの境界が識別困難である場合にも、遺伝マーカーを用いればジェネットの識別が可能である。本研究では他の研究と同様に遺伝マーカーがクローン植物集団のジェネットの識別に有効なツールであることが示された。さらに、多型性の極めて高いマイクロサテライト

マーカーを用いることによって、調査したヒメモチ集団ではジェネットレベルと対立遺伝子レベルの変異は必ずしも同じ傾向を示さないことがわかった。そして、ヒメモチ集団の形成と維持機構をラメート、ジェネット、対立遺伝子レベルという異なるレベルで捉えることができた。しかし、時間経過に伴うジェネットの増加がどれぐらいの枯死と加入の程度によって決まっているのかは明らかでなく、今後、設置されたプロットで個体群動態を追跡することによってクローン多様性の維持機構についてより理解が深められると考えられる。また、花粉流動が遺伝的構造に及ぼす程度については明らかでなく、今後、開発されたマイクロサテライトマーカーを用いて父性解析を行うことで花粉流動パターンを定量的に把握することができると考えられる。

キーワード：ラメート、ジェネット、遺伝マーカー、クローン構造、クローン多様性、遺伝的変異

Clonal diversity and genetic variation in *Ilex leucoclada*, a clone-forming dioecious shrub

Takeshi TORIMARU

In clone-forming plants, individuals can be identified on the basis of either physiological or genetic identity (as 'ramets' or 'genets'), respectively. The population biology of clonal plants has been studied at both of these module levels. Determinations of population characteristics such as population size, recruitment, mortality, levels of polymorphism and conformance to Hardy-Weinberg equilibrium are all contingent on genets being identified. Moreover, the potential for evolutionary change within a population is governed by the available genetic variation among genets. Therefore, discrimination of genets, determination of genet numbers, visualization of the spatial patterns of genets and detection of genetic variation among genets are essential for elucidating the dynamics and evolution of clone-forming plant populations.

Ilex leucoclada (Aquifoliaceae, *Ilex* L.) is an evergreen dioecious shrub that is distributed in mountainous regions where there is heavy snowfall in Honshu and the southern part of Hokkaido, Japan. This species is a common shrub of the deciduous broad-leaved forests in the cool temperate zone along the Sea of Japan, which are dominated by Japanese beech, *Fagus crenata*. Avian seed dispersal and insect-mediated pollination are typical of the Aquifoliaceae, including *I. leucoclada*. Field observations of *I. leucoclada* indicate that the species grows clonally by layering, forming distinct patches as well as reproducing by seeds. Therefore, the spatial (patch formation) and reproductive (dioecy) characteristics of *I. leucoclada* make the species an attractive

subject for studying the dynamics and evolution of clone-forming plant populations. In this study, the clonal diversity and genetic variation of *I. leucocolada* growing in beech forests in the Forest Reserve on Mt. Daisen in Tottori Prefecture were investigated by distinguishing genets using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) and microsatellite genetic markers. The implications of the findings for the mechanisms involved in the creation and maintenance of *I. leucoclada* populations are discussed.

In the first stage of the investigation, clonal diversity within patches and genetic variation within and among patches were investigated, using 31 RAPD markers, in a 1-ha plot (50 × 200 m) within an old-growth beech forest. Thirty-eight patches that exhibited a clumped distribution in the middle of the plot were found. A total of 166 RAPD phenotypes were identified among the 215 stems sampled from 27 patches that were completely within the plot. The population showed high clonal diversity within patches (mean number of genets relative to number of stems = 0.79; mean Simpson's $D = 0.89$). Variation in RAPD phenotypes among patches was highly significant (Φ_{ST} in the molecular variance analysis = 0.316, $P < 0.001$), indicating genetic differentiation among patches. Pairwise genetic distances, Φ_{ST} , between the patches did not correlate with the geographic distances between them. Cluster analysis based on the genetic distances detected few clear clusters of patches, indicating that there was no spatial genetic structure among them. High levels of clonal diversity both within patches and within the population may be explained by multiple founders, seedling recruitment during patch-formation, and somatic mutation. The significant genetic differentiation observed among patches have been due to separate founding events and/or kin structuring within patches.

Secondly, an investigation was undertaken of fine-scale clonal structure (the number of genets per patch, the number of stems per genet, and the spatial distribution of each genet) and diversity within patches. Six patches in the 1-ha plot described above were selected for this purpose. Two of the selected patches were composed predominantly of stems with male flowers (male patches), two contained stems with predominantly female flowers (female patches), and the other two contained stems with male flowers and stems with female flowers in more or less equal proportions (mixed patches). Different genets were distinguished using 6 - 8 RAPD markers for each patch. One hundred and fifty-six genets with different RAPD phenotypes were identified among 1928 stems from the six patches. Among the six patches, the male patches had the lowest clonal diversity, and the mixed patches the highest. Distribution maps of the genets showed that they extended downhill, reflecting natural layering that occurred when stems were pressed to the ground by heavy snow. In every patch, there were a few large genets with many stems and many small genets with a few stems. The differences in clonal diversity among patches may be due to differences in seedling recruitment

frequencies. The skewed distribution of genet size (defined as the number of stems per genet) within patches may be due to differences in the timing of germination, or age (with early-establishing genets having clear advantages for acquiring resources) and/or intraspecific competition.

Microsatellite markers have been considered to be the most effective tools for studying the parentage analysis, pollen and seed dispersal, mating system, and genetic structure in plant populations. Therefore, I also developed microsatellite markers for *I. leucoclada*. One hundred and eighty-nine out of 432 clones were found to contain microsatellite repeats. Primer pairs were designed for 92 of these clones according to their sequence data. Thirteen of these primer pairs yielded polymorphic, single-locus polymerase chain reaction amplification products. Using these primer pairs, three individuals from each of twelve populations (36 individuals in total) of *I. leucoclada* scattered throughout its entire distribution were genotyped and the levels of polymorphism were estimated. Three to twenty-seven alleles per locus were detected, and the expected heterozygosity ranged from 0.133 to 0.971. Since these thirteen microsatellite markers showed high degrees of genetic variation, they should be useful tools for studying population and ecological genetics of *I. leucoclada*.

Finally, I examined the patterns of within-population genetic architecture in two plots with different types of *I. leucoclada* populations (one immature and one secondary) by estimating their clonal diversity, genetic variation, and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium using the eight of the 13 microsatellite markers mentioned above. I identified 78 and 85 genets among 145 and 510 stems analyzed in the immature and secondary plots, respectively. The number of genets with multiple stems and the number of stems per genet were approximately two and three times larger in the immature plot than in the secondary plot, respectively, indicating that the clonal structure was more developed in the secondary plot than in the immature plot. The clonal diversity was significantly higher in the immature plot than in the secondary plot. However, there was no significant difference in expected heterozygosity between the plots, and significant departures from Hardy-Weinberg genotypic proportions for both plots. The correlogram of coancestry for genets in both plots exhibited significant positive values in the shortest distance class, indicating the presence of genetic structure. Moreover, the correlogram of the secondary plot exhibited significant negative values in long distance classes, indicating genetic differentiation among distant genets.

The results of these studies show that there was hierarchical structure at three levels (ramets, genets, and patches) within the populations of *I. leucoclada*. The hierarchical structure may have been generated by the effects of clonal growth and seed dispersal at relatively small spatial scales and environmental heterogeneity at larger spatial scales. Moreover, the extent of clonal diversity

within patches in *I. leucoclada* populations may be affected by variations in the amount of seeds dispersed by birds caused by variations in bird abundance and behavior. Although the extent of clonal diversity decreased with development of the populations, there were seedling recruitments in the populations so that the loss of the clonal diversity may be retarded. The genetic structure may be generated by the group dispersal of full-sib seeds within fruits and promoted by frequent seed dispersal around the mother trees.

Determining genets of plants such as *I. leucoclada* may not be easy in the field, but can be done using genetic markers. This study demonstrated that genetic markers are useful tools for distinguishing genets in clonal plant populations. Furthermore, using microsatellite markers with very high levels of polymorphism, it was found that the level of allelic variation was not necessarily consistent with that of genotypic (genet) variation

in the studied populations. The mechanisms involving in the creation and maintenance of *I. leucoclada* populations could be investigated and elucidated at three different levels (ramets, genets, and alleles). However, a number of aspects of the population biology of *I. leucocolada* remain to be elucidated. For instance, further studies of population dynamics in the plots are required to clarify aspects such as the relative frequencies of mortality, recruitment and net changes in genet numbers during population development, and thus enhance our understanding of the mechanisms that maintain clonal diversity in the species. In addition, the degree to which pollen flow influences the genetic structure is not clear, so patterns of pollen flow need to be quantified through paternity analysis with microsatellite markers.

Keywords: ramet, genet, genetic marker, clonal structure, clonal diversity, genetic variation



写真 1-1. ヒメモチの雄花
Male flowers of *Ilex leucoclada*



写真 1-4. 伏条によって生じたラメート
A ramet produced through layering



写真 1-2. ヒメモチの雌花
Female flowers of *Ilex leucoclada*



写真 1-5. ヒメモチのパッチ (集中斑)
A patch of *Ilex leucoclada*



写真 1-3. ヒメモチの果実
Fruits of *Ilex leucoclada*