

南西諸島におけるメヒルギおよびオヒルギ 集団間の遺伝的分化

武内俊一*・菅谷貴志**・吉丸博志***・勝田 柁*

(平成 14 年 5 月 31 日受付/平成 14 年 9 月 25 日受理)

要約: 南西諸島におけるメヒルギ, オヒルギ集団間の遺伝的分化を調査した。南西諸島はこの 2 種の分布域の周縁部に位置し, 集団は比較的小さい。メヒルギでは 3 遺伝子座, オヒルギでは 6 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝分析から 2 種ともに高い遺伝的変異が示された。メヒルギの対立遺伝子の有効数は 2.152, ヘテロ接合度は 0.409 であった。一方, オヒルギの対立遺伝子の有効数は 1.593, ヘテロ接合度は 0.318 であった。集団間の遺伝子分化係数は高く, メヒルギで 0.316, オヒルギで 0.380 であった。メヒルギの遺伝的多様性は, 沖縄本島, 奄美大島が西表島よりも大きかった。また, オヒルギの遺伝的多様性は, 西表島が沖縄本島, 奄美大島よりも大きかった。2 種の遺伝的多様性の水準は, 集団の規模と地域性に関連すると考えられる。

キーワード: オヒルギ, 遺伝的分化, メヒルギ, マングローブ, マイクロサテライトマーカー

はじめに

TAKEUCHI ら (2001) は, 南西諸島の *Kandelia candel* (L.) Druce (メヒルギ) 7 集団と *Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lam (オヒルギ) 6 集団についてアイソザイムを用いて解析を行い, 保有する遺伝的多様性がきわめて低いことを示した。しかしながら, あまりにも遺伝的変異が少ないために集団間の関係についてはほとんど解析することができなかった。その後, SUGAYA ら (2001) によりメヒルギの, また SUGAYA ら (投稿中) によりオヒルギのマイクロサテライトマーカーの開発が報告された。マイクロサテライトマーカーは一般に多型性が非常に高い遺伝マーカーであることが知られている。そこで, 本研究では, これらのマイクロサテライトマーカーを用いて, メヒルギおよびオヒルギについて集団間の遺伝的距離などの解析を試みた。

材料と方法

1. 試料採取および DNA 抽出

メヒルギの供試材料は 3 地域 6 集団より 177 個体を集めた。採集場所は西表島 (浦内川, 仲間川), 沖縄本島 (瀧原川, 億首川, 慶佐次川) および奄美大島 (住用川) で, 各河川に沿った集団からサンプリングを行った。オヒルギは 3 地域 4 集団より 95 個体を集めた。採集場所は西表島 (浦内川, 仲間川), 沖縄本島 (慶佐次川), 奄美大島 (住用川) である。図 1 にそれぞれの集団の位置を示すが, TAKEUCHI ら (2001) が解析したものと同一集団である。

DNA の抽出は改変 CTAB 法 (MURRAY and THOMPSON,

1980) を用いた。各個体からの頂芽 100 mg を液体窒素で粉碎し, 400 μ l の 2 \times CTAB 溶液 (2% CTAB, 1.4M NaCl, 0.1M Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA₂Na pH 8.0, 0.4% 2-メルカプトエタノール, 0.8% PVP) と粉碎した頂芽を 1.5 ml エッペンドルフチューブに入れてよく攪拌し 60 $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。その後, 試料溶液と等量のクロロホルム・イソアミルアルコール溶液 (クロロホルム: イソアミルアルコール=24:1) を加え, 穏やかに 15 分間攪拌させ, 20 $^{\circ}$ C

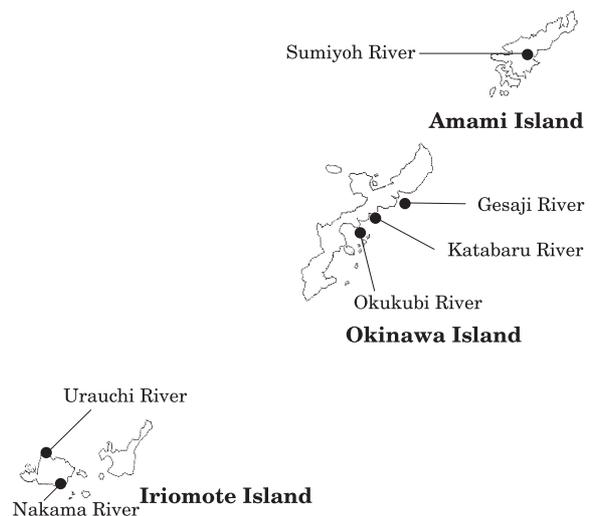


Fig. 1. Location of surveyed six natural populations of *K. candel* and four natural populations of *B. gymnorrhiza* in Southwest Island, Japan.

* 東京農業大学地域環境科学部森林総合科学科

** 東京農業大学大学院農学研究科林学専攻

*** 独立行政法人森林総合研究所森林遺伝研究領域

15,000 rpm で 10 分間遠心した。上澄み液を新しいチューブに移し、2/3 容量の 2-プロパノールを加え攪拌し、20°C 12,000 rpm で 10 分間遠心した。上澄み液を捨て、800 μ l の 70% エタノールを加えて洗浄した。エタノールを捨てて残った沈殿を減圧乾燥機でよく乾燥させた後、100~400 μ l の TE 溶液 (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA₂Na) を加えて溶解した。DNA 溶液は解析の時まで -30°C で冷凍庫に保管した。

2. マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型解析

メヒルギでは、SUGAYA ら (2002) により 5 遺伝子座 (Kcan004, Kcan005, Kcan009, Kcan011, Kcan034) のマイクロサテライトマーカーが開発されている。これらの遺伝子座は、対立遺伝子数の平均が 5.2, ヘテロ接合度 (He) の平均が 0.631 であり、アイソザイムにおけるそれぞれの平均値 1.04 および 0.012 (TAKEUCHI ら, 2001) に比べて非常に高い多型性を示す遺伝マーカーである。また、オヒルギでは、SUGAYA ら (投稿中) により 9 遺伝子座 (Bgy024, Bgy025, Bgy027, Bgy030, Bgy031, Bgy124, Bgy157, Bgy188, Bgy212) が開発されている。これらの遺伝子座は、対立遺伝子数の平均が 3.7, ヘテロ接合度 (He) の平均が 0.445 であり、アイソザイムにおけるそれぞれの平均値 1.10 および 0.035 に比べて非常に高い。本研究では、これらの遺伝子座のうち、メヒルギについては Kcan005, Kcan009, Kcan034 の 3 遺伝子座、オヒルギについては Bgy024, Bgy025, Bgy027, Bgy030, Bgy031, Bgy157 の 6 遺伝子座を解析に用いた。

メヒルギとオヒルギの各個体についてマイクロサテライト遺伝子座の遺伝子型を決定するために、以下のように PCR (polymerase chain reaction) 反応および電気泳動を行った。PCR 反応液は全体で 10 μ l とし、20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM の各 dNTP, 0.3 μ M の各合成プライマー、0.3 U *Taq* DNA ポリメラーゼ、2~5 ng の鋳型 DNA (各個体の DNA) から成る。合成プライマーの塩基配列は、SUGAYA ら (2001) および SUGAYA ら (投稿中) に従った。PCR はサーマルサイクラー PE 9600 (PerkinElmer 社) を用いて、最初の解離条件を 94°C 3 分とし、各サイクルは 94°C 30 秒、50~58°C 30 秒、72°C 30 秒の条件で、これを 35 回繰り返した。最終伸長反応は 72°C 5 分間とした。反応生成物は ABI 310 Gene Scan (PerkinElmer 社) を用いて電気泳動を行い、PCR 反応生成物の長さにもとづいて遺伝子型を決定した。

3. データの統計遺伝学的解析

遺伝的多様性のレベルは、遺伝子座あたりの対立遺伝子数 (Na), 遺伝子座あたりの対立遺伝子の有効数 (Ne; KIMURA and CROW, 1964), ヘテロ接合度の観察値 (Ho), ハーディワインベルグ平衡を仮定したヘテロ接合度の期待値 (He; NEI, 1978; NEI and ROYCHOUDHURY, 1974) を用いて表した。集団内および集団間の遺伝的分化については、全集団の遺伝子多様度 (HT), 集団内の遺伝子多様度の平均値 (HS), 集団間の遺伝的分化の相対的指標 (G_{ST} ; NEI,

1973; NEI and CHESSEY, 1983) を用いた。NEI の標準遺伝距離 (NEI, 1972; NEI and ROYCHOUDHURY, 1974) を全ての集団のペアに対して算出し、近隣結合法 (NJ 法; SAITO and NEI, 1987) および平均距離法 (UPGMA 法; SNEATH and SOKAL, 1973) を用いてクラスター分析を行った。系統樹の信頼性の評価は、1,000 回のリサンプルによるブーツストラップ確率を用いた。以上の計算には、コンピュータソフトウェア GENESTRUT (CONSTANTINE ら, 1994), DISPAN (OTA, 1993) および NJBAFD (TAKEZAKI, 1999) を利用した。

結 果

1. メヒルギにおける遺伝的多様性と集団間分化

対立遺伝子数は、Kcan005, Kcan009 および Kcan034 のそれぞれについて、4 個、6 個、10 個であった。それぞれの対立遺伝子の頻度を集団別に示したものが Table 1 である。Kcan005 については、浦内と仲間で 354 に固定し、渦原、億首、住用で 356 が、慶佐次では 354 が最も多かった。Kcan009 については、浦内と仲間で 292 に固定し、渦原と住用で 292 が、億首では 290 が最も多かった。慶佐次では 290 と 292 が同様に高頻度であった。Kcan034 については、浦内では 248 が最も多く、仲間では 268 に固定しており、渦原と億首では 264 が、慶佐次と住用では 262 が最も高頻度であった。

各集団の保有する遺伝的多様性についてまとめたものが Table 2 である。仲間は全ての遺伝子座が 1 個の対立遺伝子に固定しており、集団内に遺伝的多様性がない。浦内も Kcan034 のみに複数の対立遺伝子が観察され、対立遺伝子の有効数が 1.383, ヘテロ接合度の観察値は 0.215, 期待値が 0.179 と、沖縄本島や奄美大島の集団にくらべてかなり低い。このように、西表島の 2 集団の遺伝的多様性は非常に低いことが明らかとなった。沖縄本島の 3 集団について平均を算出すると、Na が 3.667, Ne が 2.792, Ho が 0.499, He が 0.580 となり、奄美大島住用の集団にくらべて遺伝的多様性が若干高いようである。

集団間の分化の程度を Table 3 に示す。集団間分化のパラメータ (G_{ST}) は Kcan005 で 0.420, Kcan009 で 0.271, Kcan034 で 0.282, 平均は 0.316 であった。

集団間の遺伝距離 (NEI の標準遺伝距離) を Table 4 に、また近隣結合法と平均距離法によるクラスター分析の結果をそれぞれ Fig. 2 と Fig. 3 に示す。枝の上の数字はブーツストラップ確率であり、系統樹の形の信頼性の評価に用いられる。西表島の仲間と浦内という 2 集団が互いに非常に近い関係として 1 つに結びつけられること、すなわちこの 2 集団が他の集団とは遠い関係にあることを示唆する確率は 100% であった。これに対して、沖縄本島および奄美大島の 4 集団については、億首と渦原、および慶佐次と住用が、互いに近い関係にあることが示唆されたが、それぞれの確率はいずれも 70% 前後であった。

2. オヒルギにおける遺伝的多様性と集団間分化

対立遺伝子数は、Bgy024, Bgy025, Bgy027, Bgy030,

Table 1 Allele frequency of *K. candel* and *B. gymnorrhiza*

| Locus | Allele | Urauchi (IR) | Nakama (IR) | Katabaru (OK) | Okukubi (OK) | Gesashi (OK) | Sumiyoh (AM) |
|-----------------------|--------|-----------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>K. candel</i> | | | | | | | |
| Kcan005 | 350 | 0.000 | 0.000 | 0.019 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 354 | 1.000 | 1.000 | 0.269 | 0.217 | 0.672 | 0.350 |
| | 356 | 0.000 | 0.000 | 0.712 | 0.783 | 0.328 | 0.625 |
| | 360 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.025 |
| Kcan009 | 286 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.013 |
| | 288 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.025 |
| | 290 | 0.000 | 0.000 | 0.385 | 0.583 | 0.362 | 0.000 |
| | 292 | 1.000 | 1.000 | 0.519 | 0.400 | 0.362 | 0.524 |
| | 294 | 0.000 | 0.000 | 0.096 | 0.017 | 0.276 | 0.425 |
| | 296 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.013 |
| Kcan034 | 248 | 0.516 | 0.000 | 0.192 | 0.167 | 0.000 | 0.000 |
| | 250 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.017 | 0.025 |
| | 258 | 0.000 | 0.000 | 0.038 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 260 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.050 |
| | 262 | 0.000 | 0.000 | 0.212 | 0.117 | 0.397 | 0.636 |
| | 264 | 0.000 | 0.000 | 0.424 | 0.283 | 0.345 | 0.188 |
| | 266 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.200 | 0.034 | 0.088 |
| | 268 | 0.452 | 1.000 | 0.115 | 0.233 | 0.138 | 0.000 |
| | 270 | 0.032 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.069 | 0.013 |
| | 272 | 0.000 | 0.000 | 0.019 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| <i>B. gymnorrhiza</i> | | | | | | | |
| Bgy024 | 238 | 0.133 | 0.262 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 242 | 0.033 | 0.000 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 246 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.288 | 0.545 |
| | 252 | 0.834 | 0.738 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 256 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.635 | 0.455 |
| | 258 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.077 | 0.000 |
| Bgy025 | 242 | 0.000 | 0.024 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 244 | 0.000 | 0.024 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 246 | 0.000 | 0.333 | — | — | 0.000 | 0.106 |
| | 250 | 0.533 | 0.000 | — | — | 0.038 | 0.000 |
| | 252 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.962 | 0.818 |
| | 254 | 0.000 | 0.024 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 256 | 0.000 | 0.595 | — | — | 0.000 | 0.076 |
| | 260 | 0.467 | 0.000 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| Bgy027 | 392 | 0.133 | 0.167 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 396 | 0.033 | 0.000 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 404 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.058 | 0.000 |
| | 406 | 0.834 | 0.833 | — | — | 0.942 | 1.000 |
| Bgy030 | 181 | 0.000 | 0.048 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 185 | 0.167 | 0.119 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| | 193 | 0.666 | 0.619 | — | — | 0.231 | 1.000 |
| | 205 | 0.167 | 0.214 | — | — | 0.634 | 0.000 |
| | 207 | 0.000 | 0.000 | — | — | 0.135 | 0.000 |
| Bgy031 | 173 | 0.833 | 0.762 | — | — | 0.423 | 1.000 |
| | 175 | 0.167 | 0.190 | — | — | 0.577 | 0.000 |
| | 177 | 0.000 | 0.048 | — | — | 0.000 | 0.000 |
| Bgy157 | 109 | 0.133 | 0.143 | — | — | 0.942 | 0.970 |
| | 115 | 0.133 | 0.071 | — | — | 0.000 | 0.030 |
| | 117 | 0.734 | 0.786 | — | — | 0.058 | 0.000 |

IR, Iriomote Island; OK, Okinawa Island; AM, Amami Island

Table 2 Genetic variation in the population of *K. candel* and *B. gymnorrhiza*

| Population | Sample size | N_a | N_e | H_o | H_e |
|----------------------|-------------|-------|-------|-------|---------------|
| <i>K.candel</i> | | | | | |
| Urauchi (IR) | 31 | 1.667 | 1.383 | 0.215 | 0.179(±0.179) |
| Nakama (IR) | 21 | 1.000 | 1.000 | 0.000 | 0.000(±0.000) |
| Katabaru (OK) | 26 | 4.000 | 2.694 | 0.513 | 0.584(±0.089) |
| Okukubi (OK) | 30 | 3.333 | 2.852 | 0.500 | 0.550(±0.132) |
| Gesashi (OK) | 29 | 3.667 | 2.831 | 0.483 | 0.607(±0.086) |
| Sumiyoh (AM) | 40 | 4.667 | 2.149 | 0.458 | 0.534(±0.018) |
| Mean | 29.5 | 3.056 | 2.152 | 0.362 | 0.409(±0.084) |
| <i>B.gymnorrhiza</i> | | | | | |
| Urauchi (IR) | 15 | 2.667 | 1.705 | 0.322 | 0.392(±0.046) |
| Nakama (IR) | 21 | 3.167 | 1.809 | 0.310 | 0.425(±0.045) |
| Gesashi(OK) | 26 | 2.333 | 1.599 | 0.224 | 0.308(±0.094) |
| Sumiyoh (AM) | 33 | 1.667 | 1.259 | 0.106 | 0.147(±0.087) |
| Mean | 23.75 | 2.459 | 1.593 | 0.241 | 0.318(±0.068) |

N_a , number of alleles per locus ; N_e , effective number of alleles per locus ;

H_o , average observed heterozygosity ; H_e , average expected heterozygosity

Table 3 Level of genetic differentiation of *K. candel* and *B. gymnorrhiza*

| Species | Locus | H_T | H_S | G_{ST} |
|----------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| <i>K.candel</i> | Kcan005 | 0.491 | 0.285 | 0.420 |
| | Kcan009 | 0.531 | 0.387 | 0.271 |
| | Kcan034 | 0.779 | 0.559 | 0.282 |
| | Mean | 0.600 | 0.410 | 0.316 |
| <i>B.gymnorrhiza</i> | Bgy024 | 0.721 | 0.430 | 0.404 |
| | Bgy025 | 0.731 | 0.367 | 0.498 |
| | Bgy027 | 0.181 | 0.172 | 0.050 |
| | Bgy030 | 0.536 | 0.406 | 0.243 |
| | Bgy031 | 0.379 | 0.298 | 0.214 |
| | Bgy157 | 0.543 | 0.244 | 0.551 |
| | Mean | 0.515 | 0.320 | 0.380 |

Bgy031, Bgy157 のそれぞれについて、6 個、8 個、4 個、5 個、3 個、3 個であった。Table 1 に集団別の対立遺伝子頻度が示されている。Bgy024 については、浦内と仲間で 252 が最も多く、慶佐次では 256 が、住用では 246 が最も高頻度であった。Bgy025 については、浦内では 250 が、仲間では 256 が、また慶佐次と住用では 252 が最も多かった。Bgy027 については、浦内と仲間および慶佐次では 406 が最も多く、住用では 406 に固定していた。Bgy030 については、浦内と仲間では 193 が最も多く、慶佐次では 205 が多く、住用では 193 に固定していた。Bgy031 については、浦内と仲間では 173 が最も多く、慶佐次では 175 が高頻度で、住用では 173 に固定していた。Bgy157 については、浦内と仲間では 117 が最も多く、慶佐次と住用では 109 が最も高頻度であった。

各集団の保有する遺伝的多様性についてまとめたものが Table 2 である。西表島の 2 集団について平均を算出すると、 N_a が 2.917、 N_e が 1.757、 H_o が 0.316、 H_e が 0.408 となり、西表島で最も高く、沖縄本島、奄美大島の順で低く

なる。ヘテロ接合度でみると、西表島の集団は奄美大島の集団の 2 倍以上の遺伝的多様性を保有している。

集団間の分化の程度を Table 3 に示す。集団間分化のパラメータ (G_{ST}) は 6 個の遺伝子座の平均で 0.380 であった。

集団間の遺伝的距離を Table 4 に、また近隣結合法と平均距離法によるクラスター分析の結果を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。西表島の仲間と浦内の 2 集団、および沖縄本島の慶佐次と奄美大島の住用の 2 集団が、互いに近い関係として結びつけられることを示唆するブーツストラップ確率は 98% であった。

考 察

アロザイム分析の結果では、アロザイムマーカによる遺伝的多様性がきわめて低いため、繁殖個体数の大小による集団間のちがいはみとめられたが、系統的な地域間のちがいは全く明らかにされなかった。

DNA 分析の結果では、マイクロサテライトマーカによる遺伝的多様性が高いため、地域間のちがいが明らかにされた。

すなわち、遺伝的多様性は、メヒルギでは北限域に近い奄美大島、沖縄本島の集団が西表島の集団よりも大きく、オヒルギでは西表島の集団が奄美大島、沖縄本島の集団よりも大きいという種によって相反する遺伝的構造が明らかにされた。

遺伝的多様性は、増殖様式と深く関わっている。

Kandelia 属の受粉機構は自殖 (自花受粉)、腋生の 2 又分岐する集散花序で着花数は 8 花内外を有し、繁殖個体当たりの胎生種子量は多産であり、*Rhizophora* 属の繁殖様式と類似する。

北限域においてメヒルギはオヒルギとの種間競合が緩和されるため、繁殖個体の増加とともに突然変異率も増加し、さらに、環境圧により開花期が短縮され、他殖の受粉

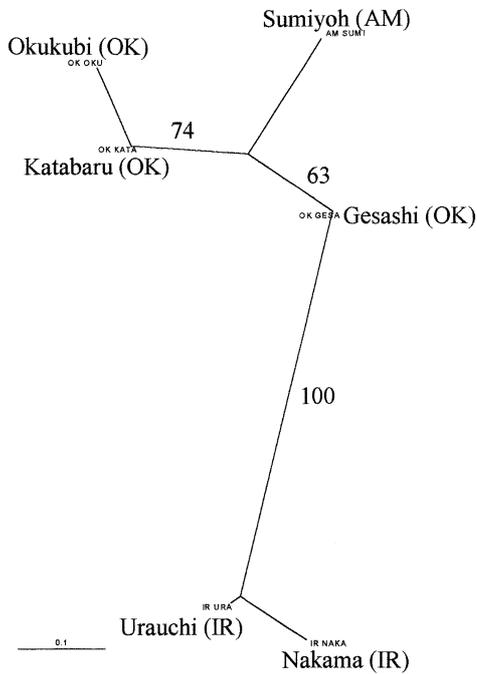
Table 4 Genetic distance between local population of *K. candel* and *B. gymnorrhiza*

| <i>K. candel</i> population | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 2 | 0.1049(0.2270) | | | | |
| 3 | 0.7745(0.3138) | 0.6385(0.3493) | | | |
| 4 | 0.8718(0.2374) | 0.8255(0.2089) | 0.0587(0.2565) | | |
| 5 | 0.4770(0.4392) | 0.4453(0.3602) | 0.1997(0.1764) | 0.2972(0.2893) | |
| 6 | 0.7619(1.3621) | 0.8593(+NAN) | 0.2362(0.2313) | 0.4118(0.3402) | 0.2066(0.1230) |

| <i>B. gymnorrhiza</i> population | 1 | 2 | 5 |
|-------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 2 | 0.1518(0.2243) | | |
| 5 | 0.8533(0.4933) | 0.8271(0.4933) | |
| 6 | 0.5723(0.4944) | 0.5554(0.3855) | 0.2139(0.1891) |

1, Urauchi (IR); 2, Nakama (IR); 3, Katabaru (OK); 4, Okukubi (OK); 5, Gesashi (OK); 6, Sumiyoh (AM). The figures in parentheses present SD.

K. candel



B. gymnorrhiza

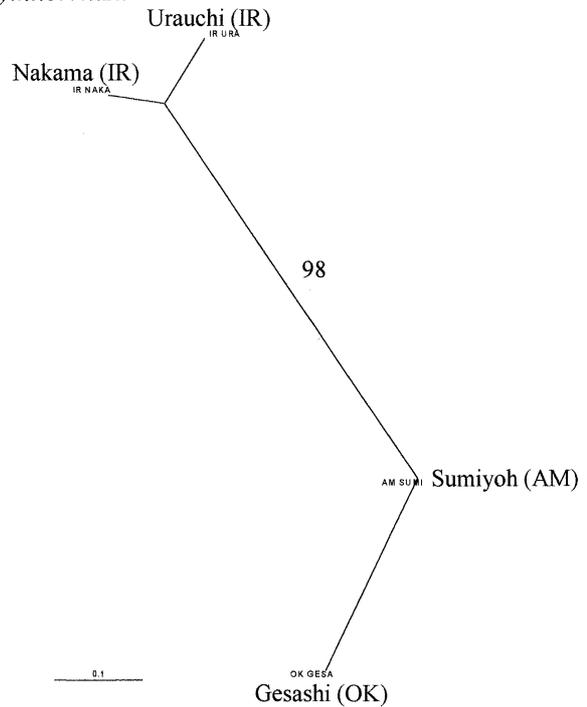


Fig. 2. Dendrogram from NJ analysis based on Nei's standard genetic distance in *K. candel* and *B. gymnorrhiza*.

機構も出現するため、遺伝的多様性が増加することが考えられる。

Kandelia 属と類似して受粉機構が自殖、腋生の集散花序で着花数が3-9花と多く、繁殖個体当たりの胎生種子量が多産である *Rhizophora* 属においては興味深い研究がなされている。

フロリダの *Rhizophora mangel* における葉緑体欠乏突然変異体の研究から、集団が優勢に自家受粉することが明らかにされた。胎生種子の95%以上が自殖の結果に出現し、その結果として集団が低い遺伝的多様性をもつことが明らかにされた。しかし、自家受粉の高い率と低い遺伝的多様性は一般的ではなかった。

ブエルトリコの同一種の研究から、自家受粉は比較的低い率であることが明らかにされた。したがって、受粉機構

は固定された種固有の特性というよりもむしろ地域の状況に適応するといえる。

最も頻繁な自家受粉による集団は、より高い突然変異率をもち、近親交配の結果としての低い遺伝的多様性を相殺するために進化した増加された突然変異率をもつと考えられる。この実証として、メヒルギでは外部形態から突然変異体と推定される葉緑体欠乏の胎生種子、輪生葉序(3葉)の稚樹が沖縄本島(慶佐次川)の集団から観察されている。

さらに、*Kandelia* 属は他のヒルギ亜科3属が広域に分布し、種分化するのに相反し、1属1種で局地的な分布をするため、特異な遺伝的構造をもつ種とも考えられる。

Bruguiera 属の受粉機構は他殖、腋生の単生あるいは対生する萼筒内に花器を有し、雄性先熟で雌性単性花の期間が長く、繁殖個体当たりの胎生種子量は少なく、*Kandelia*,

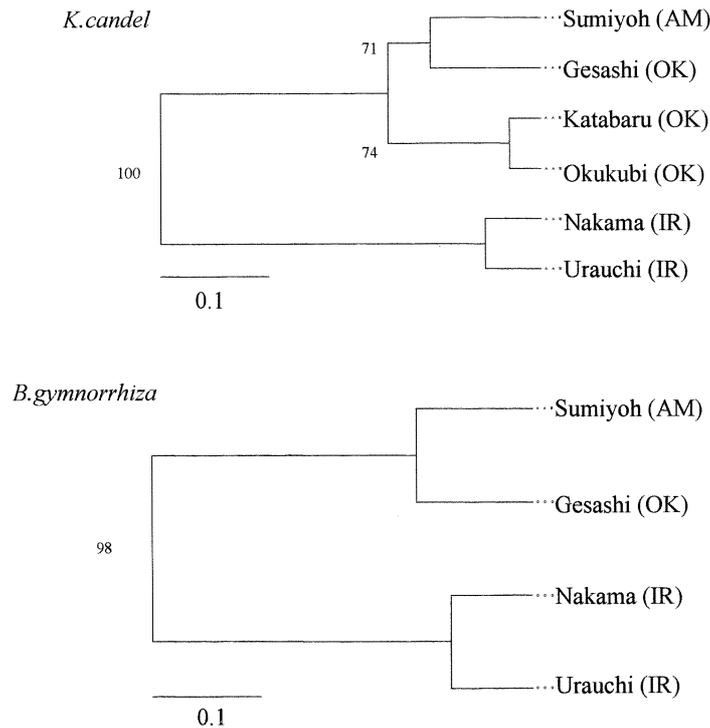


Fig. 3. Dendrogram from UPGMA analysis based on Nei's standard genetic distance in *K. candel* and *B. gymnorhiza*.

Rhizophora 属と相反する繁殖様式をもつ。オヒルギはメヒルギとの種間競争において優占種であるため、一定の繁殖個体が生育する適地においては遺伝子流動が持続し、遺伝的多様性が保持されるが、環境圧が増加する北限域においては繁殖個体の減少にともない遺伝的浮動が生じ、遺伝的多様性が消失するものと考えられる。

さらに、2種ともに西表島の集団と沖縄本島、奄美大島の集団との間に遺伝的構造のちがいが明らかにされた。これは、南西諸島の基盤である琉球弧の地質年代的な形成に起因するものと考えられる。すなわち、琉球弧は琉球諸島の慶良間列島の北の深海により、南部の先島諸島と北部の琉球諸島、奄美諸島に二分される。この分離は第三紀中新世に形成されたといわれ、島弧南部には琉球海溝、北部には沖縄舟状海盆（沖縄トラフ）があり、2地域間は最短で約400 km 以上も隔絶した地理的隔離がある。黒潮という潮流による集団間の胎生種子の移住も想定されるが、移住率は低く、地理的隔離による集団の分化が促進されたことが考えられる。

これは遺伝子分化係数 (G_{ST}) が高く、集団間で遺伝的分化が進んでいることから明らかである。つまり、温暖化にともなう海面上昇により、集団間の距離の拡大とともに生息地である潮間帯が縮小することにより、集団間で花粉あるいは胎生種子の散布による遺伝子流動（移住）が抑制されているためと考えられる。

本研究の調査地となった天然生集団は、国、県指定天然記念物ならびに国定公園特別保護地域に指定されている。今回の結果から、集団としての規模は小さいながらも、遺伝的多様性も高く、遺伝的分化も進んでいるため、今後さ

らに実施されるであろう保護管理行政の基礎資料として活用されることを期待したい。

謝辞：本研究の実施に際し、東京農業大学地域環境科学部森林総合科学科 河原輝彦教授、琉球大学農学部生産環境学科 馬場繁幸助教授、独立行政法人森林総合研究所森林遺伝研究領域 津村義彦室長、同 北海道支所 河原孝行室長に御指導をいただいた。

天然記念物採取許可に関して、文部科学省文化庁文化財保護部 蒔田明史博士、沖縄県教育庁文化課 泊清氏、東村教育委員会 中村保氏、竹富町教育委員会 仲盛敦氏、鹿児島県大島支庁 眞畑氏、住用村役場 弓削氏に御協力をいただいた。ここに心から感謝の意を表します

参考文献

- 1) TAKEUCHI, T., SUGAYA, T., KANAZASHI, A., YOSHIMARU, H. and KATSUTA, M., 2001. Genetic diversity of *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza* in the Southwest Islands, Japan. *Journal of Forest Research*, **6**, 157-162.
- 2) MURRAY, M.G. and THOMPSON, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid research*, **8**, 4321-4325.
- 3) SUGAYA, T., TAKEUCHI, T., YOSHIMARU, H. and KATSUTA, M., 2002. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Kandelia candel* (L.) Druce. *Molecular Ecology Note*, **2**, 65-66.
- 4) SUGAYA, T., TAKEUCHI, T., YOSHIMARU, H. and KATSUTA, M. (submitted) development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Bruguiera gymnorhiza* (L.) Lam.
- 5) KIMURA, M. and CROW, J.F., 1964. The number of alleles

- that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**, 725-738.
- 6) NEI, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
 - 7) NEI, M. and ROYCHOUDHURY, A.K., 1974. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, **76**, 379-390.
 - 8) NEI, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of National Academy of Science USA*, **70**, 3321-3323.
 - 9) NEI, M. and CHESSEY, R.K., 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics*, **47**, 253-259.
 - 10) NEI, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, **106**, 283-292.
 - 11) SNEATH, P.H.A. and SOKAL, R.R., 1973. Numerical taxonomy. 573 pp, W.H. FREEMAN, San Francisco, CA.
 - 12) SAITO, N. and NEI, M., 1987. The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
 - 13) CONSTANTINE, C.C., HOBBS, R.P. and NIMBERY, A.J., 1994. FORTRAN programs for analyzing population structure from multilocus genotypic data. *Journal of Heredity*, **85**, 336-337.
 - 14) OTA, T., 1993. DISPAN : Genetic distance and phylogenetic analysis. The Pennsylvania State University, University Park, PA, 16802.
 - 15) TAKEZAKI, N., 1999. NJBAFD : Neighbor-joining tree construction from allele frequency data. National Institute of Genetics, Yata 1111, Mishima, Shizuoka, 411-8540.
 - 16) HORGARTH, P.J., 1944. The Biology of Mangrove OXFORD UNIVERSITY PRESS, 163-164.

Genetic differentiation among *Kandelia cadel* and *Bruguiera gymnorrhiza* populations in the Southwest Islands, Japan

By

Tosikazu TAKEUCHI*, Takashi SUGAYA**, Hiroshi YOSHIMARU***
and Masaki KATSUTA*

(Received May 31, 2002/Accepted September 25, 2002)

Summary : The genetic differentiation of the mangrove tree species *Kandelia cadel* and *Bruguiera gymnorrhiza* in the Southwest Islands of Japan was investigated. These islands are located at the periphery of the distribution area of the two species, and their populations are relatively small.

Genetic analyses using microsatellite marker of 3 markers in *Kandelia cadel* and 6 markers in *Bruguiera gymnorrhiza* revealed very high genetic variation in both species

At the species level, the average effective number of alleles per locus was 2.152, and the average expected heterozygosity was 0.409 in *Kandelia cadel*.

The corresponding figures for *B. gymnorrhiza* were 1.593 and 0.318, respectively.

The coefficients of genetic differentiation among the populations were high (G_{ST} =0.316 for *K. cadel* and 0.380 for *B. gymnorrhiza*).

The genetic variation and habitat area of *K. cadel* on the Islands Amami and Okinawa are greater than on Iriomote island.

The genetic variation and habitat area *B. gymnorrhiza* is greater on Iriomote island than the islands Okinawa and Amami.

The level of genetic variation in both of the species might be related to their population size and locality.

Key Words : *Bruguiera gymnorrhiza*, genetic differentiation, *Kandelia cadel*, mangrove species, microsatellite marker

* Department of Forest Science, Faculty of Regional Environment Science, Tokyo University of Agriculture

** Department of Forest Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Bio-Resources Technology Division, Forestry and Forest Products Research Institute