

香川県西讃地域の水系に基づいた大型水生植物ガガブタ *Nymphoides indica* (L.) Kuntzeの遺伝的構造

柴山弓季

〒761-0122 香川県高松市牟礼町大町828-12

Genetic structure of pond populations of an aquatic macrophyte *Nymphoides indica* (L.) Kuntze based on water systems of the western part of Kagawa Prefecture.

Yuki Shibayama, 828-12, Ohmachi, Mure-cho, Takamatsu City, Kagawa Prefecture, Japan.

Abstract

Evaluating the genetic structure of organisms in the landscape exposed by human impacts may provide us to reveal the change of pattern of gene flow. I investigated the genetic structure of pond populations of an aquatic macrophyte *Nymphoides indica* based on water systems of the western part of Kagawa Prefecture by using microsatellite markers. Simpson's diversity index (D) showed the high value across populations, which means that most of each ramet sampled has a unique genotype. The number of genotypes detected (G) significantly increased with sample size higher for dimorphic than monomorphic populations, indicating that seed production contributes to the maintenance of genotypic diversity. According to the PCoA (Principle Coordinate Analysis) based on DAS (Shared Allele Distance) among populations, I could not confirm the genetic structure of *N. indica* populations depended on water systems. AMOVA also shows that more than half of the variation in *N. indica* is observed within populations. I conclude that the *N. indica*

populations were genetically isolated and were not affected by historical floodings.

はじめに

景観の人為的改変は、生物の遺伝的構造に著しく影響をもたらすことが知られている (Castric et al., 2001; Costello et al., 2003; Avise, 2004; Keyghobadi et al., 2005)。人為的に改変された景観に属する生物の遺伝的構造を評価することは、ジーンフロー (遺伝子流動) の変化, ボトルネック (びん首効果: 集団内の個体数が減少することによって均一の遺伝子型から構成された集団が形成されること), 創始者効果 (少数の個体が新しいハビタットへ侵入することによって集団が成立すること) や近交弱勢の影響を把握することを可能にする (Hutchison & Templeton, 1999; Castric et al., 2001; Costello et al., 2003; Avise, 2004; Poissant et al., 2005; Keyghobadi et al., 2005; Johansson et al., 2006)。さらに、現在のみならず過去の生物集団の連続性を理解することによって、絶滅の危機にさらされた集団を保全することにも極めて有効である

Table 1. Sampling sites, water systems, sampling number, number of genets and floral morph composition in *N. indica* populations.

Population code	Latitude (N)	Longitude (E)	Water system	Sampling number	Number of genets	Floral morph composition
KA-1	34° 16' 29"	133° 57' 27"	Koto	8	7	Dimorphic
KA-2	34° 15' 47"	133° 56' 38"	Ayagawa	3	3	-
KA-3	34° 15' 43"	133° 56' 38"	Ayagawa	5	4	-
KA-4	34° 15' 20"	133° 56' 41"	Ayagawa	5	3	Monomorphic
KA-5	34° 15' 30"	133° 56' 32"	Ayagawa	7	6	-
KA-6	34° 15' 35"	133° 56' 25"	Ayagawa	8	5	Monomorphic
KA-7	34° 13' 17"	133° 57' 19"	Ayagawa	8	7	-
KA-8	34° 16' 17"	133° 54' 56"	Ayagawa	8	3	-
KA-9	34° 15' 13"	133° 52' 68"	Doki	7	5	-
KA-10	34° 15' 43"	133° 52' 51"	Doki	6	5	-
KA-11	34° 10' 14"	133° 43' 18"	Takase	6	3	-
KA-12	34° 9' 53"	133° 43' 17"	Takase	7	5	-
KA-13	34° 8' 29"	133° 42' 58"	Saita	5	4	-
KA-14	34° 9' 43"	133° 42' 51"	Saita	8	6	-
KA-15	34° 9' 55"	133° 40' 56"	Saita	8	8	-
KA-16	34° 9' 45"	133° 42' 40"	Saita	6	5	Monomorphic
KA-17	34° 10' 15"	133° 42' 0"	Saita	3	2	-
KA-18	34° 6' 36"	133° 47' 4"	Saita	7	6	-
KA-19	34° 6' 46"	133° 42' 5"	Saita	7	6	-
KA-20	34° 3' 47"	133° 40' 56"	Kunita	5	4	Dimorphic

(Saccheri *et al.*, 1998; Sork *et al.*, 1999)。

過去に氾濫原に属した水生植物は、人為的な影響を受けた生物種である。現在では、治水管理や田畑の開発によって大部分の氾濫原は喪失し、二次的なハビタットとして創出された水田やため池といった水域が、水生植物の主な生育地である(角野, 1994)。氾濫原は洪水といった季節的な水流が発生することで生物の遺伝子流動がさかんに行われ、水系間で遺伝的分化が認められたとしても、同一水系内に属する集団間の遺伝的分化は妨げられることが想定しうるのに対し(Kudoh & Whigham, 1997; Akimoto *et al.*, 1998; Pannell & Charlesworth, 2000; Tero *et al.*, 2003; De-woody, 2004; Bousset *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007), ため池や水田は農業生態系のなか

でそれぞれ独立したハビタットであり、遺伝子流動が妨げられる結果、水系に依存せず集団間で遺伝的分化を遂げている(Barrett *et al.*, 1993; Piquot *et al.*, 1996; Arnaud *et al.*, 2001; Charbonnel *et al.*, 2002; Bousset *et al.*, 2004; Schweiger *et al.*, 2004; Shibayama & Kadono, 2007a)。しかしながら、過去および現在の水生植物集団の連続性を把握するために、水系を考慮してため池に属する水生植物の遺伝的構造を把握した研究は皆無である。

大型水生植物であるガガブタ *Nymphoides indica* (L.) Kuntze は、全国版のレッドデータブックでは絶滅危惧種(環境庁, 2000)であり、香川県版のレッドデータブック(香川県, 2004)では準絶滅危惧種として位置づけられている。ガガブタは主に西南日本に生育

し、特に兵庫県や香川県のため池群において分布が集中している (Shibayama *et al.*, 2006)。DNAマーカーの一種であるマイクロサテライトを用いて評価された西南日本のため池群におけるガガブタの遺伝的多様性は他地域と比較して高く維持されており (Shibayama *et al.*, 2006)、ガガブタのホットスポットとして見なすことができる (Dobson *et al.*, 1997)。

香川県西讃地域においてもガガブタの分布が集中しており、それぞれの水系にガガブタ集団が属する複数のため池が存在する。そこで、本研究ではマイクロサテライトマーカーを用いて香川県西讃地域のため池群におけるガガブタの遺伝的構造を把握することを目的にした。

材料と方法

(1) 材料

ガガブタ *Nymphoides indica* (L.) Kuntzeは、

浮葉植物であり、沖積平野に分布が集中している。完全自家不和合性を保持した異型花柱性植物であり、雌蕊が雄蕊よりも長い長花柱花と雄蕊が雌蕊よりも長い短花柱花が共存し、訪花昆虫が両花型間の花粉を相互に運搬することで種子を形成することが出来る (Hamashima, 1979; Shibayama & Kadono, 2003b)。また、根茎と殖芽による栄養繁殖によっても集団を形成する (浜島, 1985)。

(2) サンプルング方法

2004年8月、香川県西讃地域を中心に香東川水系から杵田川水系にわたる20集団から、展葉まもない124個体の葉を採集した (Table1, Fig. 1)。各水系区分は讃岐のため池誌の添付資料に基づく (Table1, Fig. 1; 香川県, 2000)。各集団につき同じ個体からのサンプルングを避けるために、2 m間隔で2~10の生葉を採集した。さらに、5集団においては長花柱花

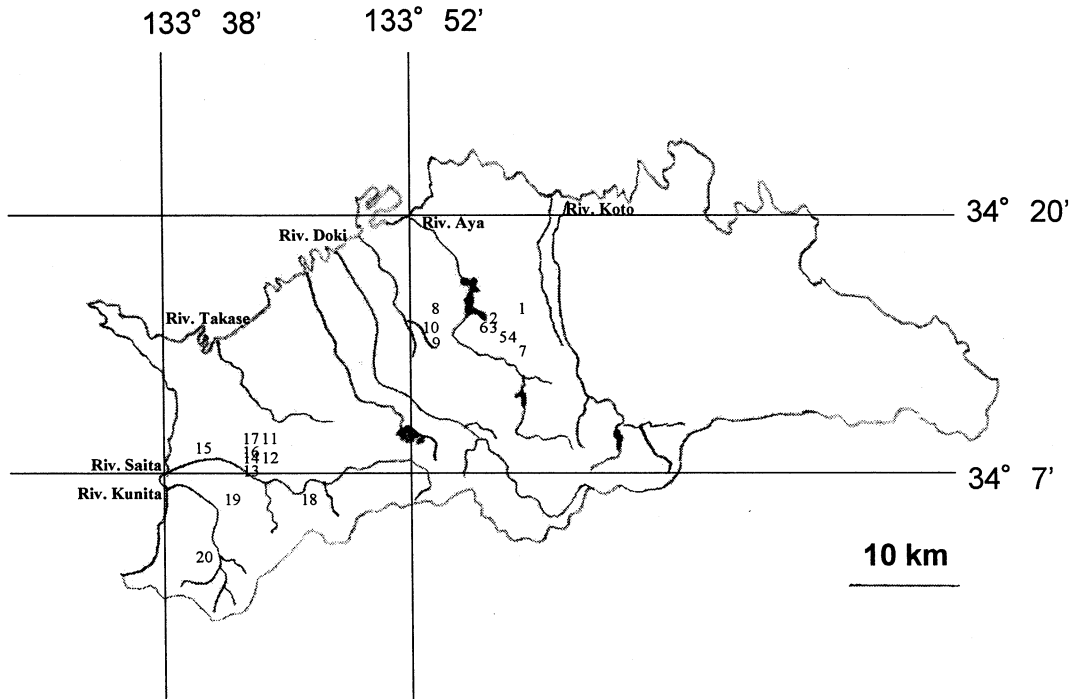


Fig.1. Distribution of *Nymphoides indica* in Kagawa Prefecture. Numerals indicate the location of *N. indica* populations.

と短花柱花の花型構成（二型花もしくは、単型花）も調査した。

(3) マイクロサテライトを用いたガガブタの遺伝解析

CTAB法 (modified cetyltrimethyl ammonium bromide; Tsumura *et al.*, 1995) によってガガブタの葉からDNAを抽出するとともに、Fast DNA Kit (MP Biomedicals) を用いてDNAを精製した。予備実験から同属の近縁種であるアサザ *Nymphoides peltata* (Uesugi *et al.*, 2005) で開発されたプライマーがガガブタでも有効であり、とくに高い多型性が認められた3遺伝子座 (*Ni*152, *Ni*730, および*Ni*306) を用いて、ガガブタの遺伝的多様性の解析を行った。PCRによる遺伝子増幅は、前述の3つの遺伝子座においてGene Amp PCR System (Models 9600 もしくは9700; Applied Biosystems) を用いて熱変性94°C 3分, 熱変性, アニール, 伸長反応をそれぞれ94°C 30秒, 56~58°C 30秒, 72°C 30秒を36~38 サイクルののち, 伸長反

応を 72°C 5分で行った。全量10 μ lの反応液の組成は、各遺伝子座を増幅する0.2 μ M Forward および0.2 μ M Reverse プライマー, 0.2 mM dNTP, 0.2mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.25U Taq DNA polymerase (Promega), 5ng template DNAである。10X buffer, 200mM Tris-HCl (pH 8.4), および 500mM KCl は独立行政法人森林総合研究所 (茨城県つくば市) で作製されたものである。

Forward primerにおいて*Ni* 306は、6-FAM (Operon Technologies) *Ni*152は、HEX (Operon Technologies) *Ni* 730は、NED (Applied Biosystems) で蛍光標識された。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、増幅されたPCR産物の遺伝子型の判定を行った。

(4) 統計解析

それぞれの集団でどの程度ジェネット (遺伝子型) 数が存在するかどうか調べるために、GENODIVE (vers. 1.1, Meirmans & van

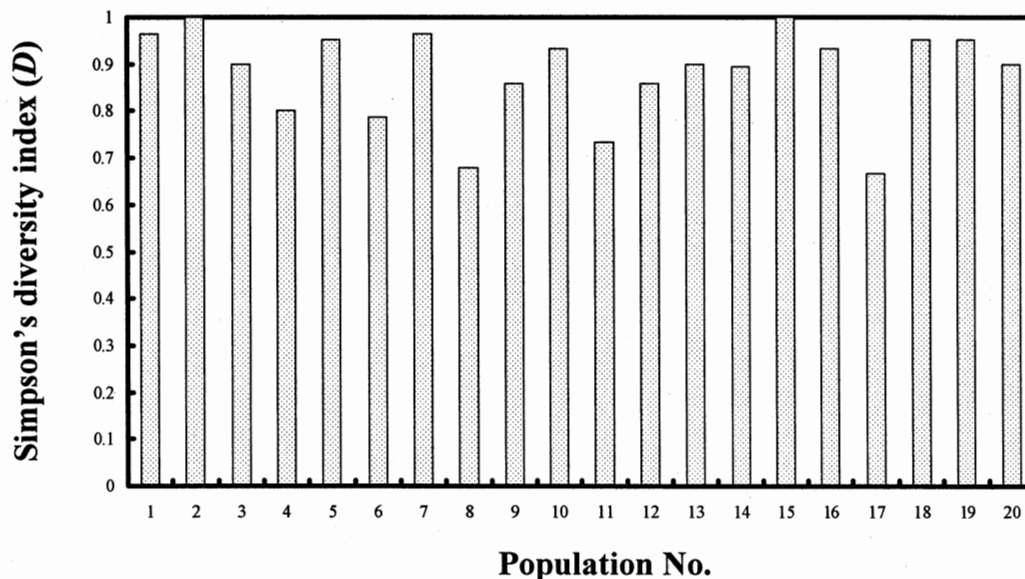


Fig.2. Comparison of genotypic diversity in 20 populations of *Nymphoides indica*. *D* is the probability of sampling without replacement two ramets that differ in genotype and ranges from 0 when all sampled ramets have the same genotype to 1 when each ramet sampled has a unique genotype.

Tienderen, 2004) を用いてサンプリングサイズを考慮した Simpson's diversity index (D) および観察された遺伝子型の数 (G) を算出した。Simpson's diversity index (D) が示す 0 は、サンプリングしたすべてのラメット (独立して生育しうる栄養生殖由来の植物体の単位) が同じジェネットであることを示し、1 が採集したそれぞれのラメットが異なるジェネットであることを表す。つまり、1 に近づくにつれて集団内の遺伝的多様性が高いことを意味する。また集団内の花型構成 (= 種子生産; Shibayama & Kadono, 2003b) が集団内の遺伝的多様性に貢献しているかどうか調べるために、単型花集団と二型花集団それぞれにつき、 G とサンプリング数 (n) の関係について調べた。それぞれのサンプリング数において G の平均値と 95% 信頼限界を決定するために、1000 回のブートストラップ法を用いた。Populations 1.2.28 (Langella, 1999) から集団間の遺伝的距離である shared allele distance (DAS) (Jin & Chakraborty, 1994) を算出した。DAS に基づいて Principle Coordinate Analy-

sis (PCoA: Gower, 1966; Iwata, 2004) を実施し、座標軸上に集団間の遺伝的距離を表した。GenAlEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2006) を用いて、水系間、集団間および集団内の 3 つの階層段階におけるそれぞれの遺伝的変異の割合を知るために AMOVA (Excoffier *et al.*, 2000) を適用した。

結 果

(1) ガガブタにおける集団内の遺伝的多様性

Simpson's diversity index (D) は、0.67 から 1.00 にわたる値を示し (Mean \pm SD: 0.88 \pm 0.10; Fig. 2), 採集されたラメットは、どの集団においてもそれぞれ異なる遺伝子型を示した。また、二型花で構成されている集団は単型花の集団と比較して、サンプリング数に伴って顕著に遺伝的多様性を増加させた (Fig. 3)。つまり、二型花から構成された集団における種子生産が集団内の遺伝的多様性の維持に貢献していることが明らかとなった。

(2) 香川県西讃地域におけるガガブタの遺伝

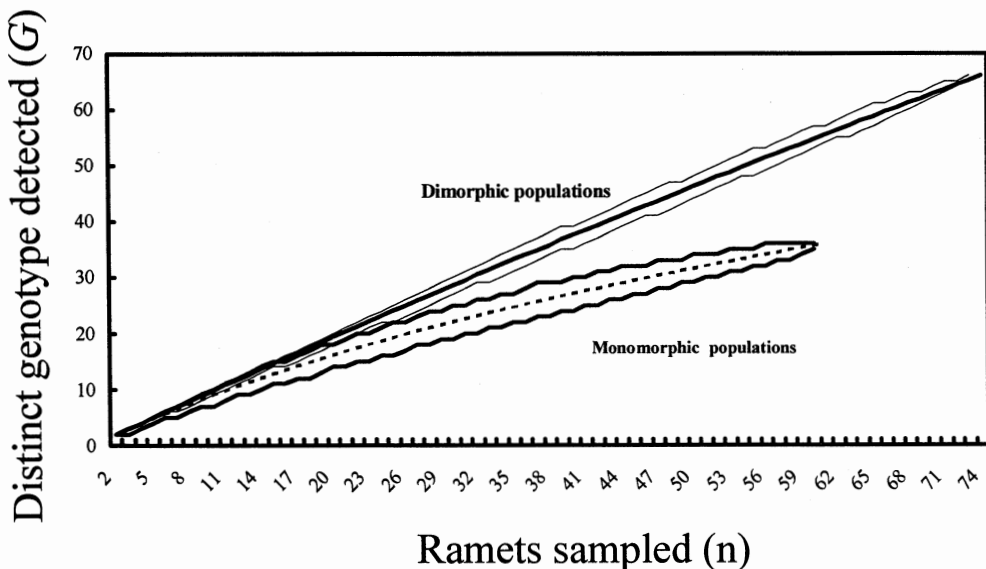


Fig. 3. The number of distinct genotypes detected (G) increases with the number of ramets sampled (n) higher level for dimorphic than monomorphic populations of *Nymphoides indica*.

的構造

DASに基づいたPCoAによる解析から、ガガブタ集団において水系に基づいた明瞭な遺伝的構造は確認されなかった (Fig. 4)。AMOVAによる解析からも遺伝的変異の20%が水系間、24%が集団間、56%が集団内に集中することを示し、ガガブタ集団の遺伝的変異の大部分が集団内で維持されていることが明らかになった ($p < 0.01$; Table 2)。

考 察

(1) ガガブタにおける集団内の遺伝的多様性

マイクロサテライトマーカーを用いて Simpson's diversity index (D) を算出した結果、各集団において比較的高い数値を示した一方、種子生産を可能にする長花柱花と短花柱花の二型花から構成される集団が、どちらか一方の花型から構成される集団よりも遺伝

的多様性が高いことがわかった。この結果は、アロザイムを用いた遺伝解析の結果からも支持される (Shibayama & Kadono, 2007a)。これらの結果により、種子生産から実生の定着といった有性繁殖の成功が、ガガブタの遺伝的多様性の維持に貢献していることが明らかとなった。

対照的に種子生産が出来ない単型花から構成される集団は、遺伝的多様性が低い。単型花集団の遺伝的多様性が低い理由として次の2点が挙げられる。単型花から構成される集団は、創始者効果やボトルネックといった確率的要因によって成立したことが考えられる。2点目として、フィールド調査からガガブタの種子発芽から実生の定着は、水際の湿地帯や濁水によってもたらされる裸地環境で起こることが知られている (Shibayama & Kadono, 2007b)。ガガブタの有性繁殖が成功する環境

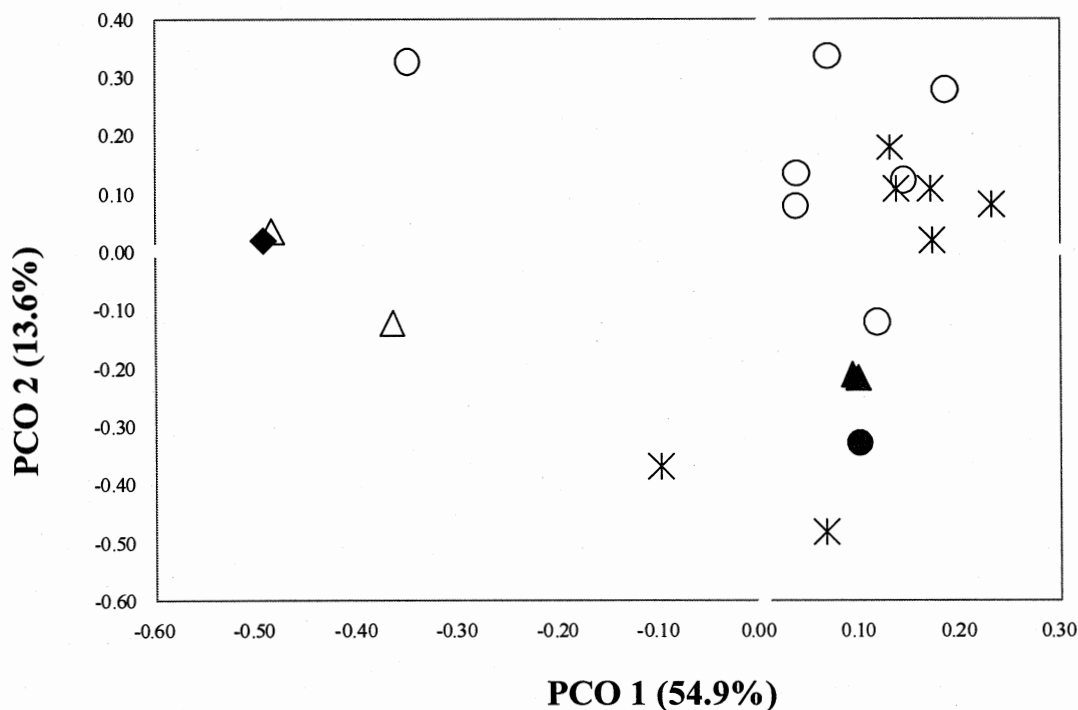


Fig. 4. Principal coordinate analysis based on shared allele distances of populations. Parentheses on each axis show contributions. Each symbol indicates a water system. ◆:Koto; ○: Ayagawa; *:Saita; ▲: Takase; ●:Kunita; △:Doki.

Table 2. Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Source	df	SS	MS	Est. Var.	% total var.	Stat	Value	p-value*
Among water systems	5	59.63	11.93	0.41	20%	ΦRT	0.20	0.01
Among populations within water systems	14	58.91	4.21	0.49	24%	ΦPR	0.30	0.01
Individuals within populations	107	120.78	1.13	1.13	56%	ΦPT	0.44	0.01

* p-value computed based on a simulation of 999 permutations.

とは対照的に現在のため池では、コンクリート護岸といった水際の人為的改変や管理放棄による水位変動の喪失が顕著であり、このことが、ガガブタの有性繁殖の失敗を導き、集団内の遺伝的多様性の低下を招いたことも示唆される。

(2) 香川県西讃地域におけるガガブタ集団の遺伝的構造

PCoAの結果から、ガガブタ集団の遺伝的構造は水系に依存しないことが明確になった。このことは、過去に起こった河川の氾濫がガガブタの集団の成立に影響を与えず、ため池が築造されてから種子や殖芽の散布が行われた結果、集団が成立したことを意味する。香川県における河川は勾配が急で河川延長が短く、降雨があったとしても海に流れやすい特性をもつ。このような水利用に不利な地理的条件が瀬戸内地域における多数のため池の築造を促し、ため池が水生生物のハビタットとしての機能的な役割を果たしている（香川県, 2000）。AMOVAによる解析から56%の遺伝的変異が集団内に内包されている事実からも、香川県のガガブタの遺伝的構造は、農業生態系のなかでそれぞれが独立して存在するため池のハビタット特性に著しい影響を受けていることが明らかになった。

(3) 香川県および兵庫県のため池群におけるガガブタ集団の保全

香川県西讃地域のため池群におけるガガブタ集団は水系に依存しない独立性の高い遺伝

的構造をもち、さらに有性繁殖の成功が認められる集団において遺伝的多様性が高いことが明らかになった。これらの事実は、二型花から構成される集団を優先的に保全するとともに、各ため池において種子発芽から実生の定着といった有性繁殖が成功する水際の湿地帯や裸地環境をもたらす水位変動といった環境を確保することが極めて重要であることを示している。また、先行研究（柴山・石井未発表）においても、遺伝子流動が妨げられるため池のようなハビタットでは、集団内における有性繁殖が成功しない限り、種子生産を決定づける花型構成比に著しい偏りがもたらされ、近い将来、種子生産が出来なくなることがコンピューターシミュレーションによって予測されている。

一方で、多数のため池が存在する兵庫県東播磨地方においても本研究と同様な解析を行った（柴山, 未発表）。香川県とは対照的に兵庫県では水系間の遺伝的分化が認められ、とくに一級河川である加古川水系にはガガブタが属する多数のため池が存在し、過去に加古川の氾濫によるガガブタの遺伝子流動が起こったことが認められた。兵庫県において現在の遺伝的構造に対して過去の景観構造の影響を検出できたことは、ガガブタがクローナル植物で寿命が長く remnant population (Eriksson, 1996; Freckleton & Watkinson, 2002) を形成しやすいことが考えられる。

香川県のガガブタ集団ではそれぞれが独立性の高い遺伝的構造をとっているため、遺伝的多様性を維持するうえで個々のため池にお

いて有性繁殖の成功を促す環境条件の確保が必須であるが、兵庫県では、過去に水流による遺伝子流動が起こっていた事実から同一水系内に属するため池間でのガガブタの移植や交配は可能だといえよう。異なるため池に属するガガブタを交配するにあたって、近交弱勢や遠交弱勢の評価は今後必要となる。概してガガブタのような完全他殖性植物では外交配によって生じた子孫の適応度は、内交配によって生じたものより高いことが知られている (Richard, 2002)。同一水系内のため池間でガガブタを交配させることは、長期にわたって集団を存続するため、つまり適応進化のポテンシャルを維持するためには大変有効な手段であることが考えられる (Montalvo *et al.*, 1997; Ebert, 2002; Ives & Whitlock, 2002)。香川県と兵庫県のため池群におけるガガブタ集団の遺伝的構造の相違は、両者の景観構造の違いからもたらされたものであり、景観構造の影響を考慮することは、地域レベルにおける絶滅危惧植物の保全に多いに寄与しうるに違いない。

謝 辞

本研究を実施する機会を下された東京大学大学院農学生命科学研究科保全生態学研究室 鷲谷いづみ教授、実験の指導や議論にお付き合いして頂いた森林総合研究所森林遺伝研究領域 津村義彦室長、野菜茶業研究所茶IPM研究所 上杉龍士博士、東北農業研究センター 夏秋どりイチゴ研究チーム 本城正憲研究員およびフィールド調査に協力して下さった久米修氏、丸井英幹氏、英文校閲をして頂いた石井奈津子氏に深謝の意を表する。

参 考 文 献

Akimoto, M., Y. Shimamoto And H. Morishima. 1998. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-

- tory traits. *Mol. Ecol.* (7) : 1371-1381.
- Arnaud, J.-F., L. Madec, A. Guiller, And A. Bellido. 2001. Spatial analysis of allozyme and microsatellite DNA polymorphisms in the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda: Helicidae). *Mol. Ecol.* (10) : 1563-1576.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution* 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, MA.
- Barrett, S. C. H., C. G. Eckert And B. C. Husband. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquat. Bot.* (44) : 105-145.
- Bousset, L., P.-Y. Henry, P. Sourrouille And P. Jarne. 2004. Population biology of the invasive freshwater snail *Physa acuta* approached through genetic markers, ecological characterization and demography. *Mol. Ecol.* (13) : 2023-2036.
- Castric, V., F. Bonney And L. Bernatchez. 2001. Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution* (55) : 1016-1028.
- Charbonnel, N., B. Angers, R. Rasatavonjizay, R. Bremond, C. Debain And P. Jarne. 2002. The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population structure of *Biomphalaria pfeifferi* in Madagascar. *Mol. Ecol.* (11) : 2213-2228.
- Chen, L., L. Xu And H. Huang. 2007. Genetic diversity and population structure in *Vallisneria spirulosa* (Hydrocharitaceae). *Aquat. Bot.* 86 : 46-52.
- Costello, A. B., T. E. Down, S. M. Pollard, C. J. Pacas And E. B. Taylor. 2003. The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution* (57) : 328-

- 344.
- DeWoody, J., J. D. Nason And M. Smith. 2004. Inferring demographic processes from the genetic structure of a metapopulation of *Boltonia decurrens* (Asteraceae). *Conserv. Genet.* (5) : 603-617.
- Dobson, A. P., J. P. Rodriguez, W. M. Roberts And D. S. Wilcore. 1997. Geographic distribution of endangered species in the United States. *Science* (275) : 550-553.
- Ebert, D., C. Haag, M. Kirkpatrick, M. Riek, J. W. Hottinger And V. I. Pajunen. 2002. A selective advantage to immigrant genes in a *Daphnia* metapopulation. *Science* (295) : 485-488.
- Eriksson, O. 1996. Regional dynamics of plants: a review of evidence for remnant, source-sink and metapopulations. *Oikos* (77) : 248-258.
- Freckleton, R. P. And A. R. Watkinson. 2002. Large-scale spatial dynamics of plants: metapopulations, regional ensembles and patchy populations. *J. Ecol.* (90) : 419-434.
- Gower, J. C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* (53) : 325-338.
- 浜島繁隆. 1979. ガガブタの二型花と集団内の有効な交配について. *植物研究雑誌* 54 : 319-320.
- 浜島繁隆. 1985. ガガブタの観察 おもに生活環と形態. *水草研究会会報* (22) : 2-4.
- Hutchison, D. W. & A. R. Templeton. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* (53) : 1898-1914.
- Ives, A. R. & M. C. Whitlock. 2002. Inbreeding and metapopulation. *Science* (295) : 454-455.
- Iwata, H. 2004. PCO ver. 1.0: MS-DOS program for principle coordinate analysis. Available from <http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/others/pco/index.html>.
- Jin, L. And R. Chakraborty. 1993. Estimation of genetic distance and coefficient of gene diversity from single-probe multilocus DNA fingerprinting data. *Mol. Biol. Evol.* (11) : 120-127.
- Johansson, M., C. R. Primmer And J. Merila. 2006. History vs. current demography: explaining the genetic population structure of the common frog (*Rana temporaria*). *Mol. Ecol.* (15) : 975-983.
- 角野康郎. 1994. 日本水草図鑑. 文一総合出版. 東京.
- 香川県. 2000. 讃岐のため池誌. 香川県.
- 香川県. 2004. 香川県レッドデータブック. 香川県の希少野生生物. 香川県環境森林部 環境・水政策課.
- 環境庁. 2000. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物—レッドデータブック—vol. 8 植物 I (維管束植物). 財団法人 自然環境研究センター. 東京.
- Keyghobadi, N., J. Roland And C. Strobeck. 1999. Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Mol. Ecol.* (8) : 1481-1495.
- Keyghobadi, N., J. Roland And C. Strobeck. 2005. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Mol. Ecol.* (14) : 1897-1909.
- Krebs, C. J. 1999. *Ecological methodology*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
- Kudoh, H. And D. F. Whigham. 1997. Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. *Am. J. Bot.* (84) : 1285-1293.

- Langella, O. 1999. Populations, 1. 2. 28. Available from the WWW site [http:// www.cnrs-gif.fr/pge](http://www.cnrs-gif.fr/pge).
- Levin, D. A. 1990. The seed bank as a source of genetic novelty in plants. *Am. Nat.* (135) : 563-572.
- Lindborg, R. And O.Eriksson. 2004. Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. *Ecology* (85) : 1840-1845.
- Meirmans, P. G. And P. H. Van Tienderen. 2004. GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Notes* (4) : 792-794.
- Montalvo, A.M., S.L.Williams, K. J. Rice, S. L.Buchmann, C.Cory, S.N.Handel, G.P. Nabhan, R.Primack And R.H.Robichaux. 1997. Restoration biology: a population biology perspective. *Rest. Ecol.* (5) : 277-290.
- Pannell, J.R. And B.Charlesworth. 2000. Effects of metapopulation processes on measures of genetic diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (355) : 1851-1864.
- Peakall, R. And P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* (6) : 288-295.
- Piquot, Y., P. Saumitou- Laprade, D.Petit, P. Vernet And J.T.Epplen. 1996. Genotypic diversity revealed by allozymes and oligonucleotide DNA fingerprinting in French populations of the aquatic macrophyte *Sparganium erectum*. *Mol. Ecol.* (5) : 251-258.
- Poissant, J., T.W.Knight And M. M. Ferguson. 2005. Nonequilibrium conditions following landscape rearrangement: the relative contribution of past and current hydrological landscapes on the genetic structure of a stream-dwelling fish. *Mol. Ecol.* (14) : 1321-1331.
- Richards, C. M. 2000. Inbreeding depression and genetic rescue in a plant metapopulation. *Am. Nat.* (155) : 383-394.
- Saccheri, I., M.Kuussaari, M.Kankare, P. Vikman, W.Fortelius And I. Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* (392) : 491-494.
- Schweiger, O., M. Frenzel And W. Durka. 2004. Spatial genetic structure in a metapopulation of the land snail *Cepæa nemoralis* (Gastropoda: Helicidae). *Mol. Ecol.* (13) : 3645-3655.
- Shibayama, Y. And Y. Kadono. 2003a. Heterostyly in *Nymphoides indica* (Menyanthaceae) in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* (54) : 77-80.
- Shibayama, Y. And Y. Kadono. 2003b. Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations. *Ecol. Res.* (18) : 725-737.
- Shibayama, Y., R. Uesugi, Y. Tsumura And I. Washitani. 2006. Conservation of the Lake Kasumigaura population of *Nymphoides indica* (L.) Kuntze based on genetic evaluation using microsatellite markers. *Limnol.* (7) : 193-197.
- Shibayama, Y. And Y. Kadono. 2007a. Reproductive success and genetic structure of populations of the heterostylous aquatic plant *Nymphoides indica* (L.) Kuntze (Menyanthaceae). *Aquat. Bot.* (86) : 1-8.
- Shibayama, Y. And Y. Kadono. 2007b. The effect of water-level fluctuations on seedling recruitment in an aquatic macrophyte *Nymphoides indica* (L.) Kuntze (Menyanthaceae). *Aquat Bot* (87) : 320-324.
- Sork, V. L., J. Nason, D. R. Campbell And J. F. Fernandez. 1999. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends Ecol. Evol.* (14) : 219-224.
- Tero, N., J. Aspi, P. Siikamäki, A. Jäkäläniemi,

- And J.Tuomi. 2003. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. Mol. Ecol. (12) : 2073-2085.
- Tsumura, Y., T. Kawahara, R. Wickneswari And K. Yoshimura. 1995. Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theo. Appl. Genet. (91) : 1222-1236.
- Uesugi, R., N. Tani, K. Goka, J. Nishihiro, Y.Tsumura And I. Washitani. 2005. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in the aquatic plants, *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae). Mol. Ecol. Notes (5) : 343-345.