

令和元年6月26日現在

機関番号：14302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08128

研究課題名（和文）遺伝的多様性に配慮した絶滅危惧種トキソウの自生地における保全に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Conservation of *Pogonia japonica* based on genetic diversity

研究代表者

南山 泰宏（Minamiyama, Yasuhiro）

京都教育大学・環境教育実践センター・教授

研究者番号：00463266

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：環境省のレッドリストで準絶滅危惧であるトキソウにおいて、生息域外保全のための無菌播種法の確立と遺伝的多様性の評価のためのSSRマーカーの作出を行った。トキソウでは受粉から約60日後の未熟種子を無菌播種し、4週間で4週間低温処理することで、高い発芽率が得られた。一方、トキソウ由来の66のSSRマーカーを作出し、大阪府能勢町の湿地に自生する個体群を用いて、21のSSRマーカーによる遺伝的多様性の評価を行った。個体群全体の多様性はヘテロ接合度の観察値で0.619と高かったが、多くの開花が見られた中流域の個体群は遺伝的に似た個体が多く、湿地内の区域によって遺伝的多様性が低下していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トキソウは湿地に生息する多年草で都道府県によっては高いランクの絶滅危惧に指定されている。そのため、自生する個体を増殖するための無菌播種法の確立と、増殖した個体を自生地に再導入する際に必要な遺伝情報を得る手法の開発が望まれていた。本研究の成果により、自生する少数のトキソウから採取したさく果から効率的に発芽・増殖させることが可能となった。さらにこれまでに開発のなかったトキソウで有効に利用できる遺伝子マーカーを多数作出し、自生する個体群の遺伝的多様性や遺伝的特性を正確に評価することを可能とした。これにより、絶滅が危惧されるトキソウの自生地において、遺伝的多様性に配慮した再生が可能となった。

研究成果の概要（英文）：For conservation of *Pogonia japonica* classified as “Near Threatened” in the Japanese Red Data Book, a method of axenic germination and the development of SSR markers for *P. japonica* have been investigated. When immature seeds of *P. japonica* at the 60 days after pollination were sowed on 1/2 MS medium and cultured by low temperature (4 °C) for 4 weeks and treatment, relative high germination rates were shown. On the other hand, we developed 66 SSR markers for *P. japonica* and investigated the genetic diversity within population in the Nose regions, Osaka Prefecture. As a result, the observed heterozygosity ranged from 0.151 to 0.945 with a mean of 0.619 for 21 loci. Although in the mid area of the bog a large number of flowers were observed, almost all the individuals grown there were included in the same group by cluster analysis based on genetic distance of all individuals and the genetic diversity was low.

研究分野：植物遺伝学、園芸学、環境教育

キーワード：トキソウ 無菌播種法 SSRマーカー 遺伝的多様性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トキソウ (*Pogonia japonica*) は東アジアの中国、朝鮮半島、日本に分布するラン科トキソウ属の植物で、日本各地の日当たりの良い湿地に分布している。しかし、開発による自生地の環境の変化や乱獲などにより、自生する都道府県では絶滅危惧種として指定されており、既に絶滅した都県もある。本研究の調査対象とした大阪府能勢町の地黄地区の湧水湿地においても、トキソウの生息が確認されているが、近年の周辺環境の変化に伴う湿地の乾燥化により、平成 23 年に約 62 株であったトキソウ開花株数が、平成 25 年度には約 5 株(大阪緑のトラスト協会事業報告書、2011-2013)と著しい減少が認められており、自生するトキソウの個体を早急に保存し、個体群を再生させる必要がある。

自生する植物の個体群再生においては、単に個体を増殖するだけではなく、環境変動への適応を考慮し、個体群の遺伝的多様性についても保全する必要がある。そのため、栄養繁殖等の無性生殖ではなく、種子繁殖等の有性生殖による個体群の再生が重要である。しかし、ラン科植物の種子は栄養を貯蔵していないため、それぞれの種に適した栄養分を含む培地下で無菌播種により発芽、生育させる必要がある。これまでに、トキソウについては無菌播種法が詳細には検討されておらず、その条件を明らかにする必要がある。他方、トキソウは栄養繁殖を主に行うとともに自家和合性であることから、一見個体数が多くみえても自生する個体群内の遺伝的多様性が低下し、絶滅リスクが高まる可能性がある。そのため、個体群の再生においては遺伝的特性を正確に評価し、遺伝的多様性に配慮する必要がある。近年、多くの植物種では遺伝的特性の評価を目的として、多型性の高い SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーが開発、利用されているが、トキソウにおいては SSR マーカーの開発は行われておらず、遺伝的特性を正確に評価することが困難な現状にある。

### 2. 研究の目的

日本各地の湿地に生息するトキソウは、自生地の環境変化や乱獲により各都道府県で絶滅危惧種等に指定されている。同じラン科の絶滅危惧種の中でも、トキソウは無菌播種や遺伝子解析の手法が確立されておらず、絶滅が危ぶまれている。本研究では、絶滅の危機に瀕している大阪府能勢町の地黄地区に自生するトキソウを研究対象として、トキソウの効率的な無菌播種法を確立して、自生する系統を保存するとともに、自生する個体群の遺伝的特性を評価するための SSR マーカーを開発する。最終的に SSR マーカーにより評価した遺伝的特性に基づいて、保存系統による自生地の個体群再生計画を立てる。これにより、遺伝的多様性に配慮したトキソウの自生地における保全を進めるとともに、絶滅に瀕している他の自生地のトキソウの保全活動の礎を築く。

### 3. 研究の方法

#### (1) トキソウの無菌播種条件の検討と自生地個体群の系統保存

自生地で人工授粉させたトキソウのさく果を供試材料とした。無菌播種条件として、さく果の採取時期(授粉後 50、60、70 日)、基本培地(H 培地、1/2MS 培地)、低温処理(4 週間処理の有無)、培養条件(16 時間日長、暗)について検討した。さく果間で発芽率が異なることから、同じさく果の種子を各試験区に均等に播種し、各試験区の播種量は、1 さく果当たり約 100 粒を基本として行った。無菌播種後の調査は、発芽開始から 1 週間おきに実体顕微鏡を用いて、種子の生育ステージとその種子数を経時的に行った。生育ステージは、「発芽」、「プロトコーム」、「出芽」および「地下茎」の 4 ステージに分けて行った。

人工授粉によりさく果を採取した個体には番号をラベリングするとともに、葉を採取し DNA を抽出して後述の SSR マーカーによる遺伝子型判別を行った。無菌播種により育成した後代には親株と同じ番号をつけて系統として育成した。

#### (2) トキソウのゲノム DNA を由来とする SSR マーカーの開発

大阪府能勢町の地黄湿地に自生するトキソウからゲノム DNA を抽出し、Nunome *et al.* (2006) の手法により 2 種類(CA 反復と GA 反復)の SSR 濃縮ライブラリーを作成した。SSR 濃縮ライブラリーをベクターにクローニングし、大腸菌に導入した後、各モチーフについてそれぞれ 200 以上のクローンの塩基配列を解析した。繰り返し数が 5 以上の SSR を含むクローンについて、SSR 領域を増幅するためのプライマーペアを設計し、トキソウの園芸販売系統、自生系統およびトキソウの近縁種の DNA を用いて PCR により目的領域の増幅と DNA 多型を調査した。作出した SSR マーカーの遺伝子型はシーケンサーによるフラグメント解析により分析した。

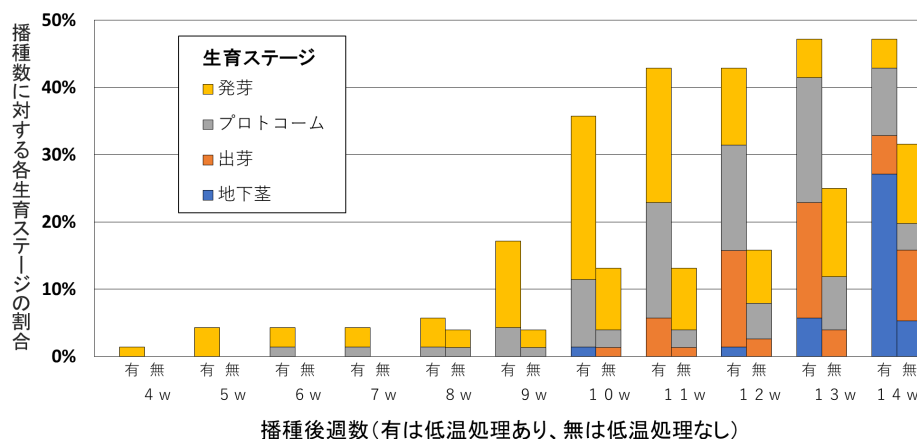
#### (3) 自生地個体群の SSR 多型解析

地黄湿地を上流域、中流域および下流域の 3 区域に分け、各区域から植物材料の採取を行った。採取した試料数は、上流域で 6、中流域と下流域からはそれぞれ 47 と 24、湿地全体で計 77 であった。全試料から DNA を抽出し、作出した 21 の SSR マーカーの遺伝子型をシーケンサーによるフラグメント解析により分析した。全マーカーが同じ遺伝子型であった試料を同一の地下茎由来のジェネットと判断し、集団内のジェネット数とその分布を調査した。また、遺伝子型データから算出した遺伝距離に基づく系統樹を POPTREE2 により作成し、その系統樹から明らかとなった遺伝的な類縁関係に基づいて、集団を構成するジェネットをクラスターに区分した。

## 4. 研究成果

### (1) トキソウの無菌播種条件の検討

基本培地については、1/2MS 培地と H 培地の間で 14 週目の発芽率に有意な差は認められなかった。しかし、14 週目における地下茎移行率(地下茎/発芽種子数)は、H 培地の 66%に対して、1/2MS 培地では 86%と有意に高い値を示し、発芽後の生長は 1/2MS 培地で良好であった。光条件については、暗条件よりも 16 時間明条件で有意に高い発芽率を示した。低温処理を行った際の発芽とその後の生育の経時的変化について第 1 図に示した。低温処理により 14 週目の発芽率に有意な差はみられなかったが、播種後 8 週目から 10 週目にかけて急激に発芽数が増加し、12 週目以降には発芽する種子はほとんど見られなくなったことから、低温処理は発芽を斉一にする可能性が示された。さく果の人工授粉後日数は発芽率に大きく影響し、播種後 12 週目の発芽率は、授粉後 50 日で 0~18%、60 日で 37~88%、70 日では 4~38%であり、総数では授粉後 60 日が 59%で最も高かった。トキソウのさく果は受粉から 140 日程度で裂開することから、授粉後 60 日の未熟果が無菌播種に適しており、適期の前後 1 週間で著しく発芽率が低下することがわかった。



第1図 低温処理による発芽とその後の生育の経時的変化

### (2) トキソウのゲノム DNA を由来とする SSR マーカーの開発

トキソウの SSR 濃縮ライブラリーから CA 反復は 242 個、GA 反復は 202 個のクローンの塩基配列を解析した。5 反復以上の SSR を含むクローンは、CA 反復で 42 個(17%)、GA 反復で 76 個(38%)であり、SSR 含有率は GA 反復が 2 倍以上高い結果となった(第 1 表)。塩基配列情報をもとに作出した 66 の SSR マーカーのうち 34 がトキソウ 6 個体間で多型を示し、対立遺伝子数は平均 5.6、遺伝子多様度は平均 0.697 と高く、遺伝子多様度についてはラン科の他の絶滅危惧種で開発されたものと同程度であった。また、66 マーカーのうち 56 はヤマトキソウでも遺伝子型の分析が可能であり、作出した SSR マーカーがトキソウ属 2 種の遺伝学的研究に有効に利用できることが示された。

第1表 トキソウの2種類のSSR濃縮ライブラリーの特徴とSSRマーカーの作出

プロープ	塩基配列を解析したクローン数	5反復以上のSSRを含むクローン数 <sup>2</sup>	SSR含有率(%) <sup>2</sup>	コアモチーフ			プライマーを設計したクローン数	目的のPCR産物を得たマーカー数
				CA	GA	TA		
(CA)n	242	42 (29)	17.4 (12.0)	28	7	7	29	24
(GA)n	202	76 (52)	37.6 (25.7)	29	46	1	50	42
合計	444	118 (81)	26.6 (18.2)	57	53	8	79	66

<sup>2</sup> 括弧内はライブラリーのモチーフと同じSSRを含むクローン数を示した。

<sup>2</sup> SSR含有率は、(5反復以上のSSRを含むクローン数)/(塩基配列を解析したクローン数)×100として算出した。括弧内はライブラリーのモチーフと同じSSRを含むクローンの含有率を示した。

### (3) 自生地個体群の SSR 多型解析

地黄湿地で採取した全 77 試料は 55 のジェネットで構成されており、多くの開花個体を観察した中流域で採取した 47 試料ではジェネット数が 29 と半数程度であった。全ジェネットを遺伝的な類縁関係をもとに 9 のクラスターに区分したところ、中流域は 1 つのクラスターに含まれるジェネットが優占しており、地下茎での栄養繁殖と近親交配により遺伝的多様性が低下していた。これに対して、下流域で採取した 24 試料は 8 クラスターから成る 20 のジェネットで構成されており、遺伝的多様性が高いことが明らかとなった。このことから、地黄湿地に自生するトキソウの遺伝的多様性を維持・向上するためには、湿地内での移植や域外保全株の再導入が有効であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

小林碧、清水毅夫、南山泰宏、トキソウの組織培養による増殖法の検討、京都教育大学環境教育研究年報、査読無、26、2018、1-9

〔学会発表〕(計3件)

南山泰宏、赤尾奈緒子、湿地に自生する準絶滅危惧トキソウの保全に向けて、京都教育大学環境教育実践センター平成30年度公開講演会、2019

赤尾奈緒子、南山泰宏、湧水湿地に自生するトキソウの遺伝的多様性の評価、日本植物学会第82回大会、2018

赤尾奈緒子、清水毅夫、南山泰宏、トキソウの遺伝的多様性評価のための SSR マーカーの開発、日本植物分類学会第17回大会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。