

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580003

研究課題名（和文） ベニバナの系統解析と地域観光資源としての遺伝育種

研究課題名（英文） Phylogenetic study of safflower and its genetics and breeding as local tourist attraction

研究代表者

笹沼 恒男 (SASANUMA TSUNEO)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：70347350

研究成果の概要（和文）：山形県の県花でもあるベニバナの系統解析と遺伝的特徴の解明を行った。その結果、(1) ベニバナ属は、栽培ベニバナを含むグループと倍数性種を含む野生種のみからなる2グループに大別され、両グループ間は遺伝的に遠いこと、(2) 山形県で栽培されている品種「最上紅花（もがみべにばな）」は、品種の中に遺伝的多様性が存在し、農家の自家採種によりそれが維持されていること、(3) アジアの栽培ベニバナは、東西の地理的分化が見られ、最上紅花は朝鮮半島由来の系統に遺伝的に近いこと、が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Phylogenetic analysis and genetic characterization of safflower, that is the prefectural flower of Yamagata Prefecture, were carried out. Three main results were obtained as follows. (1) Genus *Carthamus* were divided into two major groups. One is that including cultivated safflower, and the other is that formed by only wild species including polyploidy species. The genetic distance between the two groups was further than previously expected. (2) “Mogamibenibana”, a local safflower variety grown in Yamagata, contains genetic variation within a variety, which has been maintained by self seeds gathering by farmers. (3) Asian cultivated safflowers were diverged geographically, mainly into western and eastern groups. Mogamibenibana was genetically similar to Korean accessions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：遺伝資源、系統分化、ベニバナ、進化

1. 研究開始当初の背景

ベニバナ (*Carthamus tinctorius*) は、古代エジプト時代より、染料・油料作物として

利用されてきた重要な栽培植物である。日本人にとっても古来、紅の原料として身近な工芸作物であり、現在では山形県の特産として

有名である。このようによく知られた作物でありながら、ベニバナの系統進化には未解明な部分が多く、また遺伝育種も国内ではほとんど行われていなかった。

系統関係に関しては、世界的に広く栽培されている重要作物であるにもかかわらず、その属全体の系統関係については、あまり研究が進んでおらず、1960年代の細胞遺伝学的解析に基づき、ベニバナ属が4群に分かれるということが長く信じられてきたが、近年の我々の分子系統学的研究により、この説を否定する結果が出され、さらなる検証が必要となっていた。また、日本のベニバナに関しても、主要産地である山形県で栽培されている「最上紅花」について、ほとんど遺伝育種学的な研究はなされておらず、どのような品種なのかということがわかっていない状況であった。一方で、ベニバナは、山形県の県花として、注目される存在であり、地域観光促進の面から、その宣伝を推進したいというようぼうが官民ともに強まっていた。

2. 研究の目的

本研究では、(1) ベニバナ属の系統関係の解明、(2) 日本在来ベニバナの多様性と起源の解明、(3) 山形県の地域観光資源としてのベニバナの遺伝育種、の3点を目指した。(1)については、ベニバナ属には、25種・亜種が存在するが、栽培種は、*C. tinctorius* 1種のみである。他の野生種に関しては、AゲノムとBゲノムからなる二、四、六倍性の倍数性系列が存在するとされてきたが、近年の我々の分子生物学的手法による研究で倍数性種の成立にBゲノムは関与していない可能性が示唆された。ただし、この結果は、1つの核遺伝子のみに基づくものであり、倍数性種のゲノム提供種が未同定であるという問題もあったことから、種を増やし、さらに別の遺伝子領域を用いた解析も行うことで、ベニバナ属全体の系統関係の解明を目指した。(2)については、国内のベニバナの主要産地は山形県であり、そこで栽培されているのは「最上紅花」という品種である。最上紅花という名前は、江戸時代の文献で出てくる山形県産の紅花の名前である。しかし、現在栽培されている最上紅花は、明治以降に山形県内でベニバナ栽培がほぼ途絶えた後、戦後、農家に残されていたわずかな種子から増殖と選抜を繰り返し、成立したものである。この最上紅花については、これまで、ほとんど遺伝学的な研究がなされていなかったため、他の系統との関係は不明であり、在来品種としての特徴を備えているかどうかもわかっていなかった。本研究では、最上紅花の品種としての遺伝的特徴を明らかにするとともに、その系統的起源の解明を目指した。(3)については、(2)の内容と重複する

が、山形県の代表作物である最上紅花の特徴を科学的に明らかにすることにより、その得られた情報を紅花観光に役立て、さらには育種へつなげていくことを目指したものである。

3. 研究の方法

本研究は、上述の3課題からなるため、課題ごとに方法を述べる。

(1) ベニバナ属の系統関係の解明、これまでに行ってきた核のSACPD遺伝子及び葉緑体IGS領域に基づく系統解析については、新たにドイツのIPK ジーンバンクより未解析の二倍性種を入手し、倍数性種のゲノム提供種の解明を目指した。さらに、系統関係をよりはっきりさせるため、他の遺伝子として、Chapman et al. (2007)によって開発されたキク科共通の核遺伝子プライマーを用い、系統解析を行った。解析手法は、PCRによる遺伝子断片の増幅後、断片のクローニングと配列の決定というルーチン化された手順で行った。

(2) 日本在来ベニバナの多様性と起源の解明

県内で実際に栽培されている最上紅花をサンプリングし、その遺伝的特徴と品種内多様性をAFLP法により解析した。また、農家からの聞き取り調査も行った。このサンプリング、聞き取り調査は3カ年継続的に行い、経時的な多様性の変化の動態を把握することも目指した。さらに、最上紅花に加え、アメリカ農務省のジーンバンクより、アジアを中心とする世界の紅花遺伝資源約50系統を入手し、AFLP解析及び、ISSR解析を行うことにより、アジアのベニバナの系統関係の解明、及び、最上紅花の遺伝的起源の解明を目指した。

(3) 山形県の地域観光資源としてのベニバナの遺伝育種

最上紅花の遺伝的特徴を明らかにするため、上述したアジアを中心とする世界のベニバナ遺伝資源を加え、形質調査を行った。対象とした形質は、開花日、草丈、草型、耐病性、トゲの程度、花色、花序数、花序の直径、花卉の重さ、花序当たり種子数、種子の重さ、の11形質であり、2011年に山形大学農学部附属農場にて栽培して計測した。また、観光資源、遺伝育種のニーズを知るため、ベニバナ栽培農家や山形県農林水産部に聞き取り調査を行った。なお、当初計画では、この課題に関して、花色やとげの発達などを支配する重要遺伝子の単離を目指す予定であったが、これに関しては、あまり進展できなかったが、農家の聞き取り調査のさい、トゲなしや白花の変異体を入手することができた。

4. 研究成果

研究の成果も、方法と同様に、3課題ごとに述べる。

(1) ベニバナ属の系統関係の解明、

これまでの我々の分子系統学的研究で、ベニバナ属の四倍性はXYゲノム、六倍性種はAYX、もしくは、AYAゲノムをもつという結果が示唆され、これらの種X、Yゲノムの祖先となった二倍性種は不明であった。そこでまず、これまでの研究に加えていなかった *C. dentatus* と *C. tenuis* を入手し、これまでの研究と同じ核のSACPD遺伝子及び葉緑体のtrnL-F IGS領域の塩基配列を決定し、系統解析を行った。その結果、両種とも、これまでに解析を行った二倍性種と同様、倍数性種のX、Yゲノムの配列のクラスターには属さず、両種とも倍数性種の祖先ではないことが示唆された。*C. dentatus* に関しては、系統樹上で、他の二倍性種のクラスターとは独立の位置に存在したことから、新たにZゲノムと分類することとした。これら2種を加えたSACPDの塩基配列に基づく系統樹を図1に示す。

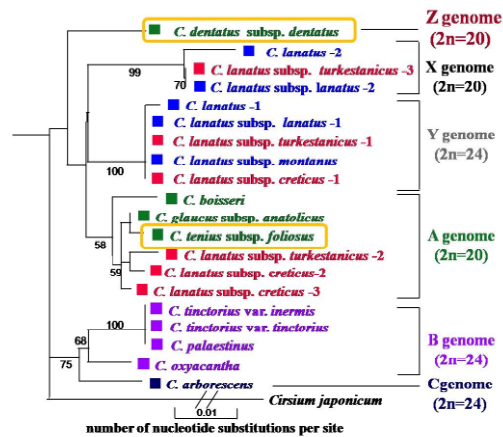


図1. ベニバナ属 14 種・亜種の SACPD の塩基配列に基づく NJ 系統樹。緑、紫、青、赤字がそれぞれ、細胞遺伝学的に A、B ゲノム二倍性種、四倍性種、六倍性種とされていたもの。*C. arborescens* はゲノム未同定であったが、以前の我々の研究で新たに C ゲノムと分類した。倍数性種からとられた異なる配列は種名の後ろに数字を付けて区別している。橙色の枠は、本研究で新たに加えた種。

次に、Chapman et al. (2007)により開発されたキク科共通プライマー10セットから A39 と B12 の2セットを選抜し、ベニバナ属 14 種・亜種を用い、系統解析を行った。しかし、二倍性種から複数の異なる配列が得られた、一部の配列がベニバナ属よりも合うとグループのアザミに近かった、など実験の正確性に問題があったと考えられる結果が得ら

れたため、次年度に可能な限り DNA を抽出し直し、A39 について、改めて、PCR、クローニング、シーケンシングを行った。その結果、二倍性種から複数の、倍数性種からもゲノムの数以上の種類の配列が再び得られたことから、この配列については、ベニバナ属内で遺伝子重複が生じていると結論づけた。しかし、1つの種から得られた配列の同一性を互いに比較すると、種内の配列は種間のものよりも近く、また倍数性種もゲノムの数にグループ化できることがわかった。このことから、重複遺伝子は、その起源が種分化以降であるか、あるいは、二倍性種の種内及び倍数性種のゲノム内で協調進化による配列の均一化が生じていると考えられ、系統解析が可能であることがわかった。そこで、10種から得られた全 37 配列をもとに NJ 系統樹を作成したところ、栽培種 *C. tinctorius* を含む B ゲノム二倍性種のみからなるクラスターと、その他の A、Z 二倍性種、及び、倍数性種の配列からなるクラスターの二つの主要なクラスターが見られ、基本的には、SACPD 遺伝子に基づく系統樹と同じ系統関係を示した。このことから、ベニバナ属は、大きく2つのグループに分かれ、これまでの細胞遺伝学的研究で言われてきた A、B ゲノム間で交雑倍数化を起こして進化してきたのではなく、B ゲノムの種と他の種の間は遺伝的に大きく離れている、ということがより強く結論づけられた。倍数性種の祖先種については、以前不明であったが、A39 の系統樹では、六倍性種2種のゲノム構成がいずれも AX Y であると推定され、SACPD 遺伝子により得られた結果を若干修正する結果となった。

(2) 日本在来ベニバナの多様性と起源の解明

①最上紅花の品種内多様性

平成 21 年 7 月のベニバナ開花期に、山形県内のベニバナ栽培農家をまわり、サンプリングと遺伝的多様性に関する聞き取り調査を行った。まず、聞き取り調査の結果、最上紅花は、畑の中に、葉の切れ込みの大きさや、草丈について形態的変異があり、とげなしや白花の個体が出現することということがわかった。多くの農家は、県の試験場から4年に1回程度種子を入手し更新をし、それ以外は自家採種により系統を維持しているとのことだった。20年以上栽培を続けている農家の話では、白花やトゲなしの変異個体の出現頻度は、栽培開始当初よりはだいぶ減ったが、それでも現在でもときおり出現することであった。実際に、我々の調査時にも、上山市内の畑で白花個体と葉が針状になった個体を各1個体、トゲなしについてはほぼ全ての畑で確認することができた。聞き取りで

は、栽培農家は最上紅花の品種内多様性について確実に認識していることもわかった。県内でもっとも栽培歴の長い農家の1人である山形市高瀬地区の井上市郎氏は、「選抜を進めても、草丈が著しく高いものや低いものが出てくるのが最上紅花の品種の特徴であると思っている」と語っていた。また、白鷹町の青木勝助氏は、背の高い個体をオオヒメボタン、低い個体をコヒメボタンと、普通のベニバナとは違うものと認識していた。

畑の中の多様性がDNAレベルでも存在するのかを確かめるため、5カ所の農家の畑から採種したサンプル(各2~4個体)を用い、AFLP解析を行った(図2)。その結果、DNAレベルでも最上紅花には多型が存在することが明らかになった。系統樹を作成すると、サンプリングした最上紅花は、大きく2つのクラスターに分かれることがわかった。1つのクラスターには、草丈の高いもの、葉の切れ込みが深いものなどの形態変異個体が多く含まれ、もう1つのクラスターには通常の形態の個体が多く含まれた。AFLPで検出された多型が、形態変異に関するものなのかを知るため、多型バンドを切り抜きシーケンシングを行ったが、検出されたバンドに形態変異との関係を示唆する遺伝子断片は見られなかった。このことから、2つのクラスターは、選抜が進んだ個体群と、原種に近く選抜が進んでおらず結果的に形態の変異を多く保持している個体群の違いを反映したものではないかと推測される。AFLPでは農家ごとの違いは検出されず、どの農家の畑にも同様の多様性が存在することが明らかになった。前述の白鷹町の青木氏は、県の

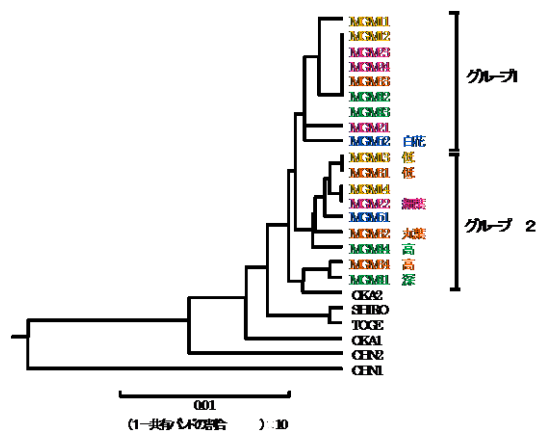


図2. 山形県内の各農家の畑からサンプリングした最上紅花を用いたAFLP系統樹。同じ文字色は同じ農家の畑のサンプルであることを示す。形態変異個体は番号の後ろに特徴を表記。緑字が青木氏の畑のサンプル。黒字は比較のため加えた最上紅花以外の系統。

紅花生産組合連合会に加盟しておらず、栽培を始めた20年以上前からずっと自家採種で品種を維持してきたことから、他の畑との違いが見られることが予想されたが、系統樹では青木氏の畑のサンプルも独立したクラスターを形成することはなかった。このことから、最上紅花の多様性は、20年以上前の現在の最上紅花が復活栽培されるようになった当初から品種内に存在していたものが、現在も維持され続けているものであることが示唆された。

平成22年度、23年度も続けて農家の聞き取り調査を行い、21年度と同様、最上紅花は形態的に品種内多様性をもっていることが確認できた。3年間で聞き取り・サンプリングを行った農家・生産者は、寒河江市の佐藤富美夫氏、佐藤逸郎氏、河北町の後藤慶治氏、山形市の井上市郎・トメノ夫妻、白鷹町の青木勝助氏、今野正明氏、上市市の石山隆志氏、NPO法人上山まちづくり塾、上山明新館高校の計9件にのぼる。この場を借りてご協力に感謝を表したい。畑の中の遺伝的多様性が自家採種により年度を越えて維持されるのかどうかを検証するため、山形市の井上市郎氏の畑で3年間継続してサンプリングし、AFLP解析を行った。その結果、図3で示すように、年度を越えて同じ多型バンドが検出された。図には示していないが、多くの多型が3年続けて検出されている。在来品種は、自家採種により遺伝的多様性が維持されている、ということは理論的によく言われることであるが、今回の結果はそれを実際のデータとして証明したものである。このことは、とりもなおさず、戦後わずかに残された種子から増殖と選抜を繰り返し品種として確立された現在の最上紅花が、在来品種としての特徴を備えていることを示している。

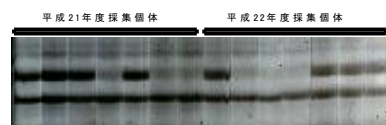


図3. 平成21、22年度で共通してみられたAFLP多型バンドの一例。

②アジアのベニバナの系統解析

アメリカ農務省より入手したアジアを中心とするベニバナ約50系統と最上紅花とその派生系統であるトゲなしベニバナからDNAを抽出し、10プライマーセットを用いてAFLP解析を行った。実験過程の不具合などもあり、最終的には45個体で解析を行った。その結果、アジアのベニバナは、中国、日本、朝鮮半島、モンゴルの東アジア由来の系統からなるクラスターと、中央アジア、インド、アフガニスタン、中近東などそれ以外

のアジア地域由来の系統からなるクラスターの2つに大別され、大きく地理的分化があることがわかった(図4)。これまで発表された分子系統解析でも、世界のベニバナ遺伝資源は、アフリカ、ヨーロッパ、中近東など

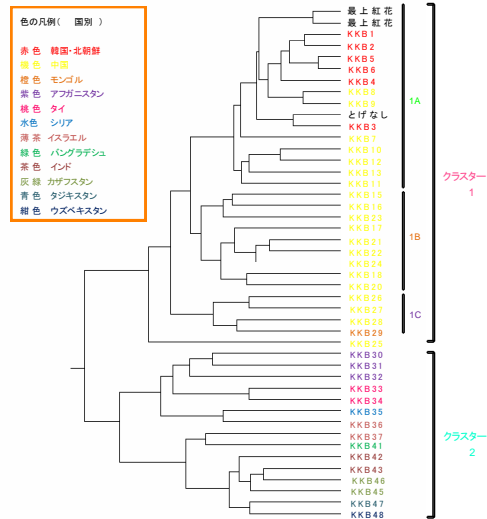


図4. 最上紅花を含むアジアのベニバナ45個体のAFLPに基づく系統樹

大きく地理的に分化しているとの報告がなされており、本研究の結果もそれを支持する結果となった。細かいクラスタリングに関しても、例外はあるものの、アフガニスタン、中央アジア、中近東などの各地域由来の系統からなるサブクラスターが見られたことから、アジアのベニバナに地理的起源が示された。東アジアのベニバナは3つのサブクラスターにわかれ、最上紅花はその派生系統であるトゲなし紅花と朝鮮半島とそれに近い地域の中国由来の系統からなるサブクラスターに属した。最上紅花と最も遺伝的に近い関係を示したのは韓国由来の系統であった。これらのことから、最上紅花は朝鮮半島由来で伝来した系統であることが強く示唆された。前述のように最上紅花には品種内多様性が存在したため、AFLPには、品種内多様性解析で別のクラスターに分かれた2個体の最上紅花を用いたが、互いに非常に近い関係であり、系統樹上で他の系統が2個体間に割り込んでくることはなかった。このことから、最上紅花の品種内多様性は系統間の違いを超えるものではないことが分かった。なお同じ系統を用い、ISSR解析も行ったが、明瞭なバンドの増幅ができたプライマーセットが5つしかなく、全ての系統を区別できなかったこと、及び一つのプライマーセットの有無で系統関係に大きな違いが生じる場合が

あること、などから、結論的な系統関係を論じることはできなかった。

(3) 山形県の地域観光資源としてのベニバナの遺伝育種

農家での聞き取り調査の結果、農家が求めるベニバナは、サクランボの収穫や、夏休みの観光シーズンなどとの兼ね合いから、現在の最上紅花とは花期の異なる品種であることがわかった。それ以外にも、花卉が多い品種、また変わった例では、花卉だけでなく若葉を食用として用いるためにそれに適した品種が欲しいなどの意見があった。本研究では、重要形質の原因遺伝子の単離はできなかったが、まずは基本的なデータとして、前述のアジアを中心とするベニバナ遺伝資源の形質調査を行った。平成23年度に山形大学農学部の附属農場で栽培を行ったが、この年は花期直前の6月末から7月初めにかけて、立て続けに集中豪雨に見舞われ、全県的にベニバナの生育状況が記録的に悪く、我々の材料も、多くが倒伏やその後の罹病により開花前に枯死してしまった。ベニバナは個体ごとに大きな形態形質の変異が見られるが、それが遺伝的なものなのか、環境的なものなのかを知るために、遺伝率を推定した(表1)。枯死した個体が多く、生き残った個体も生育が著しく悪いものもあったため、信頼できるデータとするためには反復実験が必要ではあるが、量的形質に関して、草丈は遺伝率が比較的高く、花卉・種子に関わる形質は遺伝率が比較的低いという結果となった。個体当たりの花序数、花序当たりの種子数、種子の重さは、個体の成長度合いによって大きく差がある一方、花序の直径は比較的環境要因に左右されにくいことがわかった。系統巻の違いについては、遺伝率が低い形質が多いため、あまり結論的なことは言えないが、世界的に珍しい染料用品種である最上紅花も他の染料用品種と比べ、特に花卉の重さの値が大きいということはなかった。開花日に関しては、遺伝率が低いものの、東アジアの系統の方が

表1. 反復がとれた16系統の形質調査に基づく11形質の遺伝率

調査形質	範囲	平均	遺伝率
草丈(cm)	34.9-116.5	72.1	69.1
草型	7.1-64.1	32.2	55.0
耐病性	2.5-4.0	3.22	31.0
開花までの日数	8.0-28.0	18.9	18.5
とげの有無	1.5-5.0	3.27	92.3
花の色	2.0-4.0	3.33	69.4
花卉の重さ(g)	0.03-0.16	0.09	39.9
花序の数	3.2-48.0	18.3	35.5
花序の直径(mm)	13.00-22.95	17.3	79.7
種子の数	1.0-25.9	11.2	40.9
種子の重さ(g)	0.01-0.24	0.03	8.5

開花日が早い傾向が見られた。

(1)～(3)の課題を通して、ベニバナ属全体の系統関係について、我々が以前に行った分子系統解析の結果、すなわち細胞遺伝学に基づく分類と異なり、ベニバナ属のA、Bゲノム二倍性種は大きく遺伝的に異なっており、Bゲノムのグループは交雑倍数化に関与していないこと、また、四倍性種、六倍性種に存在するX、Yゲノムは、現存する二倍性種には存在しない可能性が高いこと、が九九人でき、最上紅花の遺伝的特徴については、形態及びDNAレベルでの品種内多様性の存在と自家採種によるその維持を明らかにし、さらには起源が朝鮮半島由来であることを明らかにすることができた。さらに研究を通じ、ベニバナ栽培農家との交流、情報交換を行うことができ、今後のベニバナの遺伝育種に向けた体制を整えることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Tsuneo Sasanuma、Sayuri Watanabe、Toshinori Abe、Deepmala Sehgal、Tetsuo Sasakuma、Soom N. Raina、Reconsideration of phylogenetic relationship of genus *Carthamus* based on the nuclear SACP gene and chloroplast *trnF-trnL* IGS region、Journal of Oilseeds Research、査読無、Vol. 29、2012、6-9

[学会発表] (計6件)

- ① 笹沼恒男、木村薫、和田慶子、阿部利徳、アジアのベニバナの遺伝的多様性及び山形県在来品種「最上紅花」の系統的起源、日本育種学会第121回講演会、2012年3月29日、宇都宮大学
- ② Tsuneo Sasanuma、Sayuri Watanabe、Toshinori Abe、Deepmala Sehgal、Tetsuo Sasakuma、Soom N. Raina、Reconsideration of phylogenetic relationship of genus *Carthamus* based on the nuclear SACP gene and chloroplast *trnF-trnL* IGS region、8th International Safflower Conference、2012年1月12日、インド・ハイデラバード市
- ③ 笹沼恒男、木村薫、阿部利徳、東アジアのベニバナの遺伝的多様性及び山形県在来品種「最上紅花」の遺伝的特徴、日本育種学会第119回講演会、2011年3月29日、東日本大震災のため講演会中止。要旨集のみでの発表

- ④ 木村薫、渡辺さゆり、阿部利徳、笹沼恒男、山形県の在来品種ベニバナ「最上紅花」の遺伝的特徴の解明、日本育種学会第118回講演会、2010年9月25日、秋田県立大学
- ⑤ 笹沼恒男、ベニバナ属の進化に関する分子系統学的解析、第17回山形分子生物学セミナー、2009年12月26日、鶴岡市先端研究産業支援センター
- ⑥ 渡辺さゆり、Deepmala Sehgal、Soom N. Raina、阿部利徳、笹沼恒男、ベニバナ属倍数性種の祖先二倍性種解明のための系統解析及び山形県における栽培ベニバナの特徴、日本育種学会第116回講演会、2009年9月26日、北海道大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹沼 恒男 (SASANUMA TSUNEO)
山形大学・農学部・准教授
研究者番号：70347350

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：