

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430191

研究課題名(和文) 東アジアのナシの起源をさぐる：秋子梨・沙梨野生個体の集団構造の把握と多様性

研究課題名(英文) The origin of *Pyrus* species native to East Asia: Population structure and genetic diversity of Wild Ussurian and sand pears

研究代表者

片山 寛則 (KATAYAMA, HIRONORI)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50294202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：東アジアのナシ属植物の起源地である中国では砂漠化、人為的な環境破壊などから野生ナシは急速に減少している。日本の東北地方に自生するイワテヤマナシと同種の秋子梨は中国東北部で個体数が激減しており保全計画の策定が急務である。またニホンナシ栽培品種の起源種とされる沙梨野生個体の探索調査、DNA分析を行った。秋子梨野生集団の探索、形態調査、遺伝的多様性、集団遺伝構造の把握、系統解析より絶滅の恐れのある集団の保全計画を策定した。イワテヤマナシと秋子梨との系統関係について両者は遠縁だった。また中国中部の山脈にて沙梨野生集団の探索を行い16集団をDNA分析を試みたところ、多くはマメナシとの雑種化個体だった。

研究成果の概要(英文)：Pyrus ussuriensis Maxim. is native to the northern part of China, but whose habitats are currently being destroyed by environmental changes and human deforestation. Wild Ussurian pear populations possessed low genetic diversity as a result of habitat fragmentation. These were divided into 5 groups based on the Bayesian clustering method using nSSRs and by haplotype distributions by cpSSRs. The genetic diversity of the populations in Inner Mongolia and north east of Heilongjiang representing unique genotypes was especially low. These populations need urgent conservation because of their genetic vulnerability and peculiarity. Distant evolutionary relationships between *P. ussuriensis* Maxim. in China and var. *aromatica* in Japan inferred from phylogenetic analysis are also discussed. Although wild sand pears were also explored on mountain areas in central region of China, individuals sampled were identified with interspecific hybrids between sand pear cultivar and pea pear by DNA analysis.

研究分野：果樹遺伝資源学

キーワード：Pyrus ussuriensis Pyrus pyrifolia Pear Population genetics Population structure Genetic diversity Phylogeny Origin of pear

1. 研究開始当初の背景

中国は東アジアのナシの起源地であり主に *Pyrus calleryana*, *P. ussuriensis*, *P. pyrifolia*, *P. bretschneideri*, *P. sinkiangensis* など 5 種が存在し、これらには栽培種も多く含まれている。しかし起源地でありながら中国の野生ナシに関する系統だった情報は少ない。ニホンナシ等の栽培ナシの起源、栽培化についての研究を行う上で野生ナシの情報は必須であるが謎に包まれたままであった。これまで研究代表者は日本の東北地方に自生するイワテヤマナシ (*P. ussuriensis* var. *aromatica*) の起源や系統進化学的、保全生態学的研究を行ってきた。しかしイワテヤマナシの起源を知るためにはイワテヤマナシと同種であり、中国に自生する *P. ussuriensis* Max. (秋子ナシ) との系統関係を明らかにする必要がある。そこで秋子ナシ野生集団の探索を行い、その分布や形態形質や DNA 分析による遺伝的多様性の調査、秋子梨やイワテヤマナシの系統関係を明らかにしたいと考えた。またニホンナシ栽培品種の起源種とされる *P. pyrifolia* 野生個体 (沙梨 = 砂梨) の中国での探索調査と集団遺伝構造解析によりニホンナシの起源に関する知見の集積が必要であり本研究課題を着想した。

本課題は研究代表者がこれまで行ってきた東北地方に自生するイワテヤマナシ (*P. ussuriensis* Max.) の遺伝的多様性の把握と保全に関する研究が基となっている。1998 年より日本の東北地方におけるイワテヤマナシの網羅的な探索を行い、イワテヤマナシの分布域を明らかにし (Katayama & Uematsu 2006)、果実や花の形質調査、SSR (マイクロサテライト) マーカーを用いたイワテヤマナシの集団構造解析により自生集団を特定し、その起源について考察した (Katayama et al. 2007; Iketani et al. 2010)。これらの結果は史前帰化植物による野生種への遺伝子移入例 (ニホンナシからイワテヤマナシ) として日本で初めての報告となった。イワテヤマナシは 2007 年に絶滅危惧種 IA 類に登録され、現在自生地の保全計画が練られるに至っている (Iketani & Katayama 2012)。

また研究代表者は日本に自生するイワテヤマナシと中国に自生する秋子梨野生個体との系統関係を調査すべく、2008 年より中国林科院泡桐・経済林研究開発センターの WUYUN Tana 教授と共同で中国東北部に自生する秋子梨 (*P. ussuriensis* Max.) の探索を行ってきた。これまでに自生種と思われる 6 集団を内モンゴル、黒龍江省、吉林省にて発見済みである。また内モンゴルに自生する秋子梨は砂漠化により急速に個体数が減少しており生息域外保全が急務なこと、また研究代表者の開発した (Katayama et al. 2012) 世界のナシ属 24 種の系統解析に有効な葉緑体 DNA マーカー (*accD-psaI* と *rps16-trnQ* の 2 遺伝子間領域の構造変異) を用いて予備

的に集団解析を行ったところ、内モンゴルの野生の秋子梨は他の地域に比べて著しく多様性が低いことが明らかとなった。これは中国に自生する野生種の起源や果樹類の遺伝資源探索というデリケートな分野で日中共同研究がスムーズに行われてきた貴重な例である。

2. 研究の目的

東アジアのナシ属植物の起源を知るには発祥地である中国の野生ナシ抜きには語れない。しかし中国での砂漠化、環境破壊などから野生ナシは急速に減少している。起源地における野生種の喪失は遺伝的多様性の減少などその影響は人類にとって計り知れない。日本の東北地方に自生するイワテヤマナシ (= ミチノクナシ, *Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) と同種とされる秋子梨は中国東北部で個体数が激減しており保全計画の策定が急務である。またニホンナシ栽培品種の起源種とされる沙梨 (*P. pyrifolia*) の野生個体は中国ではすでに存在しないと考えられてきた。本研究ではイワテヤマナシ、ニホンナシのルーツとされる中国に自生する秋子梨、沙梨野生集団の探索、形態形質調査、DNA 分析による集団遺伝構造の把握、系統解析を行い、野生集団の保全計画を策定する。くわえてイワテヤマナシ、ニホンナシの起源に関する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

黒龍江省南東部の牡丹江市周辺域での秋子梨の探索調査。

東アジアのナシ属植物で利用可能な葉緑体 SSR マーカー、核 SSR マーカーの選抜。

新たに発見した秋子梨野生集団と秋子梨栽培品種を含めた DNA 集団構造解析 (STRUCTURE 解析、PCA、Bottleneck test)。

また花器・果実形質と DNA データとの相関。秋子梨とイワテヤマナシの系統関係を調べることでイワテヤマナシの起源を推定。

河南省の沙梨の野生集団を探索。

沙梨野生集団の DNA 集団構造解析、花器・果実形質と DNA データの相関。

黒龍江省南東部の牡丹江市周辺域での探索調査

これまでの分析より不足していると考えられた黒龍江省南東部の牡丹江市周辺域での探索調査を WUYUN 教授と 5 月上旬に共同で行う。花器 6 形質データの計測、DNA 抽出用若葉のサンプリングを行う。

東アジアのナシ属植物で利用可能な葉緑体 SSR マーカー、核 SSR マーカーの選抜

葉緑体 SSR マーカーはすでに葉緑体 DNA の全塩基配列が決定されている '豊水' の配列 (Terakami et al. 2012) を参考にして選抜に供試する。核 SSR マーカーはリンゴやニホンナシ、セイヨウナシ由来の配列を参考に選抜に供試する。ニホンナシ栽培品種、在来品

種やイワテヤマナシ、秋子梨を用いて選抜する。イワテヤマナシ由来の集団遺伝構造解析データと整合性を持たせるため共通した SSR マーカーを選抜する。

新たに発見した秋子梨野生集団や秋子梨栽培品種を含めた DNA 集団構造解析 (STRUCTURE 解析、PCA、Bottleneck test)、また花器・果実形質と DNA データとの相関。

研究代表者によって選抜されたマーカーの配列を参考にして にて収集された個体を含む秋子梨野生 8 集団を用いて WUYUN 教授の研究室にて DNA 抽出し、PCR 反応後、電気泳動を行い PCR 産物の分子量を決定する。分子量データは神戸大学にて集団遺伝学的解析を行う。花器、果実の形態形質データも統計解析を行い DNA 由来のデータと関連づける。

秋子梨とイワテヤマナシの系統関係を調べることでイワテヤマナシの起源を推定。

中国の秋子梨野生集団の形態・DNA データとイワテヤマナシのそれらを統合して集団遺伝学的解析を行う。また系統関係も調査してイワテヤマナシの起源について考察する。

河南省の沙梨の野生集団を探索。

河南省にて偶然発見された沙梨野生集団の探索調査を WUYUN 教授と 4 月中旬に共同で行う。収集個体の花器データの計測、DNA 抽出用若葉のサンプリングを行う。

沙梨野生集団の DNA 集団構造解析、花器・果実形質と DNA データの相関。

研究代表者によって選抜されたマーカー配列を参考にして にて収集、DNA 抽出された個体を含む沙梨野生集団を用いて WUYUN 教授の研究室にて PCR 反応後、電気泳動を行い産物の分子量を決定する。分子量データは神戸大学にて集団遺伝学的解析 (STRUCTURE 解析、PCA、Bottleneck test ほか) を行う。果実のサンプリングおよびその形態計測は WUYUN 教授が担当する。データ分析は神戸大学で行う。

4. 研究成果

秋子梨については本課題により黒龍江省南東部、甘肅省東部の自生地を探索し、33 個体のサンプリング、それらの位置情報、植生、聞き取り調査、花器・果実形態調査を行った。すでに探索済の内モンゴル、吉林省、黒龍江省北東部由来の個体と合わせて 13 集団、153 個体となり中国における秋子梨の生息域を広範にカバーする事ができ、それらの GPS データを公表した。

花器では 5 種類の形態調査から秋子梨栽培品種では花弁が大きかったのに比べて、内モンゴル集団は花弁が小さく、細長かった。黒龍江省由来の花弁はその中間的なサイズを示し、地理的な変異が見られた。果実形態は栽培品種が大きく、その他の野生集団は小さかった。花柄 (果柄) の長さは、黒龍江省由来の個体は長く、内モンゴルの個体は短かった。これまでの報告では秋子梨の花柄は短いとされていたが多様性が認められた。

葉緑体 SSR マーカーは '豊水' の全塩基配列を参考に 67SSR 領域から全ての個体で産物が得られた 16SSR マーカーが選抜された。また 20 種類の核 SSR マーカーにより全てのナシの SSR 座の分子量が決定された。

葉緑体ハプロタイプおよび核の SSR マーカーによる集団遺伝構造解析から、内モンゴルおよび黒龍江省北東部の 2 集団 (HLYCS3, HLFYX) は遺伝的多様性が極めて低く、近親交配 (FIS) が進んでいる可能性が示唆された。内モンゴルの集団は厳しい乾燥による選抜、黒龍江省の 2 集団は人的な環境破壊による生息域の縮小と、異なる要因が存在していた。STRUCTURE 解析により中国の秋子梨野生集団は内モンゴル (赤色)、吉林省 (黄色)、黒龍江省南東部 (緑色)、黒龍江省北東部 (紫・青色) の 2 グループの合計 5 つのグループに分けられた (図 1a)。その中でも黒龍江省北東部の HLYCS2 は独自の遺伝子型を示した。また系統解析から黒龍江省南東部の牡丹江周辺の HLMTZ 集団は秋子梨栽培品種と近縁であり、栽培品種の逸失個体である可能性が示唆された (図 1b)。さらに葉緑体 SSR マーカーによるハプロタイプネットワーク分析から黒龍江省北東部の集団で見られる E 型ハプロタイプが最も共通であり、黒龍江省北東部から派生したと推察された。これらの結果および生息地の環境を考慮し、秋子梨野生集団の保全単位を決定した。乾燥化による絶滅の恐れが高い内モンゴルの集団は生息域外保全が急務であり、人的要因による絶滅の恐れがある黒龍江省北東部は生息域内保全が妥当であろう。

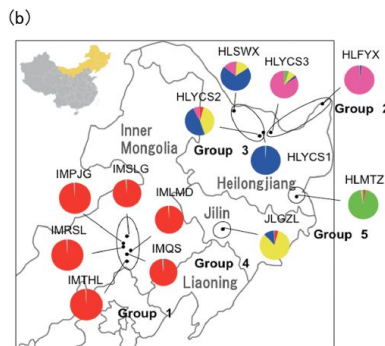
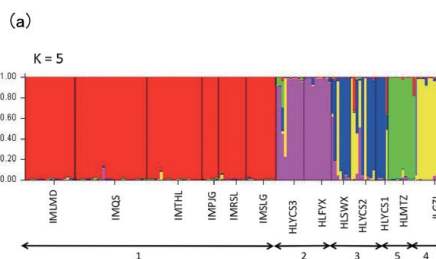


図 1. (a) STRUCTURE 分析による中国の秋子梨野生集団における集団構造の推定 (K=5)。(b) 秋子梨野生集団の地理的分布 (内モンゴル、吉林省、黒龍江省) と STRUCTURE 解析によるジーンプールの割合をバイチャートで示した。

沙梨野生集団の探索は中国中部の秦嶺ホワイライン上の山脈に沿って行われた。6 集団 58 個体を発見し、花器・果実の形態調査、DNA 分析を行った。しかし収集個体の多くが

沙梨栽培品種の逸失個体が在来品種であり、野生種の可能性は低かった。また調査地域にはマメナシ(*P. calleryana*)の自生個体が多く生息しており、沙梨とマメナシが雑種化したと予想される個体(果実が大きく室数3~4)も見つかった。SSR マーカーによるDNA分析を行った結果からも同様に沙梨栽培品種とマメナシとの雑種化が予想された。中国国内で沙梨野生集団はこれまで見つかっておらずすでに消失した可能性が高い。

日本の東北地方に分布するイワテヤマナシの起源を明らかにするために、イワテヤマナシ14集団274個体と秋子梨13集団153個体の合計27集団を花器の形態およびDNAマーカーを用いて遺伝的多様性の比較、集団構造、類縁関係を調査した。花器形態はイワテヤマナシは秋子梨のそれよりも花弁が大きく、幅が広い等の特徴を持っていた(図2)。

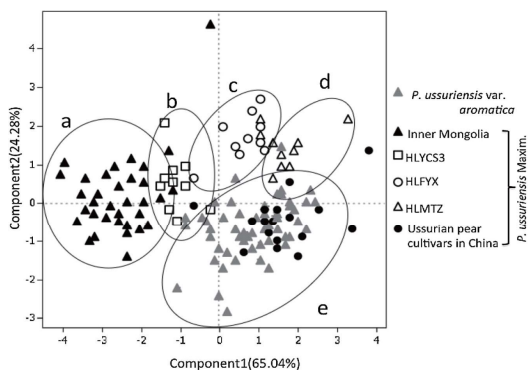


図2. イワテヤマナシおよび秋子梨由来の花器官5形質における主成分図: ▲イワテヤマナシ

遺伝的多様性(Na, Ne, Ho, He)はイワテヤマナシのほとんどの集団で秋子梨野生集団のそれよりも高かった。またSTRUCTURE解析では両者は基本的に異なるジーンプールから形成されていた。また系統解析からも両者は遠縁であることが明らかとなった(図3)。イワテヤマナシは鮮新世から更新世の間の気候変動でできた日本海による地理的分断の産物かも知れない。

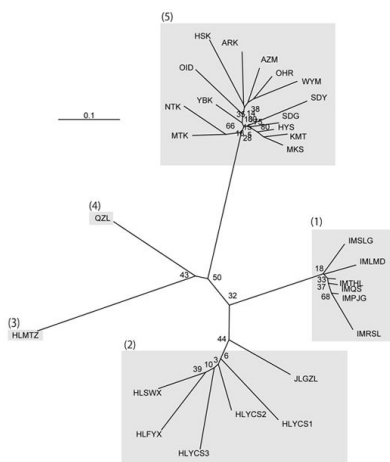


図3. 近隣接合法(NJ)によるイワテヤマナシ集団と秋子梨集団の系統関係
(1)秋子梨:内モンゴル集団、(2)秋子梨:黒龍江省集団、
(3)秋子梨:黒龍江省牡丹江集団、(4)秋子梨栽培品種、(5)イワテヤマナシ

今回、中国の秋子梨野生集団の遺伝的多様性、集団構造解析を行う事で、絶滅が危惧される集団の保全単位を決定した。また主要ハプロタイプや集団の派生順位を予想した。これらの結果から、多様性が大きい黒龍江省北東部の集団から他の集団に分化していったことが分かった。しかし黒龍江省北東部は人為的な攪乱が強く、既存の集団はすでに厳密な意味での野生集団とは言えない。今後、秋子梨やイワテヤマナシの起源を解明するには、より北部地域のロシアのシベリア・沿海州に自生する *P. ussuriensis* maxim. の探索・収集、遺伝的多様性、集団遺伝構造を把握することが必要である。

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6件)

KATAYAMA, Hironori, AMO, Hitomi, WUYUN, Tana, UEMATSU, Chiyomi, IKETANI, Hiroyuki, Genetic structure and diversity of the wild Ussurian pear in East Asia. *Breeding Science*, 査読有, Vol.66, 2016, pp.90-99, doi:10.1270/jsbbs.66.90

WUYUN, Tana, AMO, Hitomi, XU, Jingshi, MA, Teng, UEMATSU, Chiyomi, KATAYAMA, Hironori, Population structure of and conservation strategies for wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. in China. *PLoS ONE*, 査読有, Vol.10, 2015, (8), e0133686,

doi:10.1371/journal.pone.0133686
IEGUCHI, Takahiro, TAKAOKA, Motoko, NOMURA, Keiichi, UEMATSU, Chiyomi, KATAYAMA, Hironori, Pear (*Pyrus* L.) genetic resources from Northern Japan: evaluation of antioxidant capacity. *Acta Horticulturae*, 査読有, Vol.1094, 2015, pp.539-548, doi:10.17660/ActaHortic.2015.1094.72

YAMADA, Katsuhisa, UEMATSU, Chiyomi, KATAYAMA, Hironori, Pear (*Pyrus* L.) genetic resources from Northern Japan: organoleptic evaluation of ornamental pear trees. *Acta Horticulturae*, 査読有, Vol.1094, 2015, pp.117-122, doi:10.17660/ActaHortic.2015.1094.11

KATAYAMA, Hironori, OHE, Miho, SUGAWARA, Etsuko, Diversity of odor active compounds from wild and local varieties of Iwateyamashi (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) revealed by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *Breeding Science*, 査読有, Vol.63, 2013, pp.86 - 95, doi:

10.1270/jsbbs.63.86
WUYUN, Tana, MA, Teng, UEMATSU, Chiyomi, KATAYAMA, Hironori, Low genetic diversity of wild Ussurian pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in Inner Mongolia, China revealed by hypervariable regions of chloroplast DNA. *Tree Genetics and Genomes*, 査読有, Vol.9, 2013, pp.167-177, doi:10.1007/s11295-012-0544-1

〔学会発表〕(計4件)

AMO, Hitomi, XU, Jingshi, MA, Teng, WUYUN, Tana, UEMATSU, Chiyomi, KATAYAMA, Hironori, Conservation strategy of wild Ussurian pear in China based on the genetic structure analysis, 第61回日本生態学会, 2014年3月16日, 広島市(広島県)

片山 寛則, 中国の野生梨の保全研究への貢献と神戸大学におけるイワテヤマナシのジーンバンクの紹介, アジア遺伝資源利用促進小集会「アジアにおける遺伝資源のポテンシャルとその育種利用」, 園芸学会平成27年度秋季大会, 2015年9月25日, 徳島大学(徳島県)

片山 寛則, ナシのルーツを求めて: 世界のナシ, 日本のナシ, 「作物の起源と人が育てた栽培植物」, 日本育種学会2015年度市民公開シンポジウム講演要旨集, pp.32-35, 2015年9月13日, 新潟大学(新潟県)

片山 寛則, 東アジアの野生梨 (*Pyrus ussuriensis*) の集団構造と起源に関する研究, グループ研究集会「第45回生物進化, 細胞遺伝談話会 / 遺伝資源海外調査の現状と課題」日本育種学会第129回講演会, 2016年3月22日, 横浜市立大学(神奈川県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~hkata/kenkyunaiyoNashi.htm>

http://www.edu.kobe-u.ac.jp/ans-foodres/b_03_edu_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 寛則 (KATAYAMA, Hironori)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号: 50294202

(2) 研究分担者

植松 千代美 (UEMATSU, Chiyomi)

大阪市立大学・理学研究科・講師

研究者番号: 30232789

(3) 研究協力者

ウーユン タナ (WUYUN, Tana)

中国林科院泡桐経済林研究開発センター・教授