

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580039

研究課題名(和文) 国産園芸植物をモデルとした系統地理学的研究に基づいた「系統植栽管理法」の構築

研究課題名(英文) Establishment of a management method to maintain plant lineages based on the phylogeography and modeling of a domestic garden plant

研究代表者

渡辺 均 (Watanabe, Hitoshi)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・准教授

研究者番号：80301092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は絶滅危惧類である西九州に自生するダンギクについて、分布地図の作成、表現型および遺伝子調査により、系統地理学的な構造を明らかにするとともに、その多様性の成立要因を推察した。109自生集団の収集および生育調査の結果、地域間での表現型変異を確認した。DNAシーケンス解析の結果、各自生域を区分するハプロタイプを確認し、系統評価および保全を目的としたマーカーとして利用可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the phylogeographical structure and estimated the establishment factor for a variety of the endangered plant *Caryopteris incana*, which is indigenous to West Kyushu, based on distribution maps and phenotype and genetic investigations. On the basis of samples collected from 109 native populations and growth investigation, we confirmed phenotypic variation among the study areas. DNA sequence analysis, revealed the different haplotypes that grouped in each study area, indicating that this type of marker analysis is an effective method for the purposes of phylogeographical evaluation and lineage maintenance.

研究分野：系統地理学

キーワード：系統評価 ダンギク ハプロタイプ 表現型変異 分子生物学 絶滅危惧種

1. 研究開始当初の背景

(1) 人為的な開発行為などにより、野生植物遺伝資源の攪乱とその多様性の維持が非常に難しくなって来ている。西九州の海岸地や低山の露岩地などに自生するダンギクは、環境省にて絶滅危惧類(VU)に登録されており、その存在が危ぶまれている。しかし、伊藤ら(1988)の研究論文以降、分布調査の報告がされていない。

(2) 青紫色の小花が複数集まった花房を段状に咲かせるダンギクは、その他に桃色および白色の花色の園芸品種が市販されている。これらの品種はガーデン植物や切花として利用されている。しかし、花色以外の形質に品種間差はみられない。

2. 研究の目的

(1) 報告された自生地の現状と新たな自生地の現地調査することで、現在のダンギクの詳細な分布地図を作成することを目的とした。また、系統地理学的研究を背景とした各自生域を区分するツールを開発することで、保全計画への情報提供、および遺伝資源としての多様性の成立要因の解明を目的とした。

(2) 各自生地の表現型の多様性を評価し、各自生環境および遺伝的区分との関連性を明らかにすることで、多様性の成立要因の解明を目的とした。また、育種資源としての情報提供、および既存園芸品種の系統の自生地を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 伊藤ら(1988)により報告された自生地をもとに、長崎県対馬、長崎県本土、壱岐、五島列島および鹿児島県甑島列島において現地調査をおこない、GPS情報や標高などを記録した。また、地図上から自生が予想される露岩地について、新たな地域を調査した。現地における結実個体の草丈および段数を調査するとともに、各自生地の生育調査のため、結実個体より種子を採集した。

(2) 現地からの採集種子より栽培した個体を計測することで、各集団の表現型を比較評価した。採集種子は4月に播種後、温室内の同一条件下にて栽培をおこなった。9月から10月の秋頃より開花が始まるとともに計測調査を開始した。調査項目として、花冠長など花形態に関する10項目、葉身長など葉に関する7項目、草丈や株幅など草姿に関する11項目、花色など色に関する6項目、到花日数および開花期間を合わせた39項目を設定した。これらに二次変数9項目を追加した45項目を、統計ソフトにより統計処理した。また、調査した集団のうち8集団の栽培個体を用いて、結果率調査をおこなった。調査には温室内外にて各試験区を設けて結果率を調査した。

(3) 生育調査用の栽培個体より全DNAを抽出し、ダイレクトシーケンスによる系統評価をおこなった。DNA抽出には腋芽の若葉などをサンプルとして、改良CTAB法により抽出をおこなった。抽出後、DNA濃度を調整し、各自生集団のサンプルとして用いた。調査領域として、Genbankに登録された核DNAのITS領域および葉緑体DNAの3領域と、Shaw(2005;2007)らにより、近縁種の分類に適すると報告された遺伝子間領域を利用した。前者は原著論文に記載されたプライマーを、後者はユニバーサルプライマーを用いてPCR増幅をおこなった。シーケンス解析後、得られた配列を比較し、各集団間を区分するハプロタイプを探索した。

4. 研究成果

(1) 西九州368地点を調査し、109自生集団を確認した。各地域では、対馬において72集団(図1)、長崎県本土において16集団(図2)、五島列島において16集団(図3)、甑島列島において5集団(図4)を確認し、壱岐においては自生の確認ができなかった。対馬および五島列島では道路沿いの露岩地や海岸地など、人里に近い場所に数多くの自生集団がみられたのに対し、長崎県本土では山頂付近の露岩地など、分布域が狭く自生地が限定されており、集団の消滅に瀕している状況が確認された。この地域における自生個体は、対馬における自生個体に比べ小さく貧弱な傾向がみられた。また、長崎県東部および佐賀県東部付近ではダンギクの生育に好適と考えられる環境にも関わらず自生集団がみられなかった。甑島列島では、他地域に比べ自生個体の葉が厚く丸みを帯びており、花房の直径が大きい特徴がみられた。伊藤ら(1988)により報告された自生地以外では、長崎県久賀島、的山大島および鹿児島県甑島などで新たな自生集団を確認した。



図1 長崎県対馬における自生地(72地点)



図2 長崎県本土における自生地(16地点)



図3 長崎県五島列島における自生地(16地点)



図4 鹿児島県甌島列島における自生地(5地点)

(2) 109 自生集団より採集した種子による生育調査の第1回目は、対馬の72集団を対象におこなった。主成分分析の結果より、集団を区別する項目として、草丈や株幅、および開花の早晩性などが挙げられた。クラスター

分析の結果より、72集団は表現型から大きく3グループに分けられ、対馬地域内でも異なる表現型を有していることを確認した。しかし、標高や個体数などの自生地に関する項目と計測結果の間に高い相関はみられず、表現型変異を生み出す環境要因を特定することはできなかった。

(3) 生育調査の第2回目は、対馬以外の自生集団より採取した種子を用いた。比較のため、第1回目の調査結果を基に対馬72集団より、対馬地域の特徴を示す20集団を選出して用いた。西九州の計57集団の栽培個体の計測による比較評価の結果、各地域によって表現型に変異がみられた。主成分分析の結果より、草丈や花色に関する第1主成分および花穂長や開花の早晩性に関する第2主成分が得られた。これら主成分を用いた主成分得点散布図(図5)から、対馬、長崎県本土および五島列島、甌島列島の地域間で表現型の特徴がみられた。

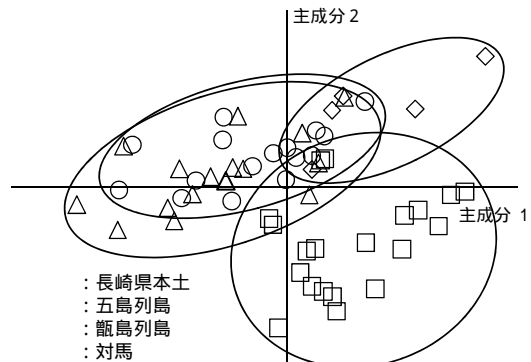


図5 西九州57集団の主成分得点散布図

まず、対馬の自生集団は草丈が高く、花色が濃く、開花が早い傾向がみられた。次に、長崎県本土および五島列島の自生集団は草丈が低く、花色が淡い傾向がみられた。これらの集団の表現型は類似していたが、節間長や到花日数などで有意差がみられ、長崎県本土で小さい値を示した。甌島列島の自生集団は草丈が高く、花色が濃く、対馬と同様の傾向を示したが、開花が遅い傾向がみられた。長崎県本土および五島列島の矮性の表現型を示す環境要因として、これらの地域の自生集団が山頂および海岸付近の露岩地に多く分布していることから、強風による折れに対する適応の結果と考えられた。また、甌島列島の晩生の表現型を示す環境要因として、他地域に比べ台風の影響を多く受けることから、影響の小さくなる頃に開花する晩生個体に有利に働いたと推察された。西九州の自生集団における表現型は対馬地域内よりも表現型の変異幅が大きく、多様性に富んでいることが明らかになった。

(4) 各自生地域より選択された8集団の栽培個体を用いた結果率調査の結果、自動自家受粉の結果率が極端に低いことから、繁殖には

送粉者が必要であることが示された。また、自家受粉より他家授粉の結果率が有意に高いことから、ダンギクの繁殖様式は、主に他殖をおこなう部分他殖であることが明らかになった。さらに、近隣集団との距離が遠く、花粉交流の頻度が低いと考えられる集団では、高い自家授粉の結果率がみられた。このことから、集団の維持のために、他殖から自殖への繁殖戦略の変化が進んでいることが示唆され、ダンギクは各自生集団で独自の繁殖戦略を獲得し、各自生環境への適応性を獲得していると考えられた。

(5) DNA シークエンス解析の結果、Genbank 登録配列およびユニバーサルプライマーを用いて増幅のみられた葉緑体 DNA の 11 領域のうち、6 領域において塩基の挿入および欠失による集団間変異を確認した。6 領域のうち、3 領域において塩基置換がみられ、特に *3'rps16-5'trnK* 領域では、対馬、長崎県本土、五島列島および甌島列島の各地域間を区分する数塩基の変異を確認した。Genbank 登録配列と西九州自生集団の間における塩基配列の変異に対し、自生集団間では変異が小さいことから、比較的近い年代にダンギクの西九州における分布形成が起きたことが示された。長崎県本土の地域では、長崎市周辺と平戸島北部およびその周辺の集団間で異なるハプロタイプが示された。一方で、平戸島北部およびその周辺と甌島列島において同一のハプロタイプが示されたことから、これらの地域では分布形成年代が近いことが推察された。対馬では南北で異なるハプロタイプを示したことから、同一地域内においても分布形成年代が異なることが明らかになった。以上の結果より、ダンギクの西九州における分布形成は、氷期・間氷期サイクルの海水面変動による陸橋形成に伴って、各地域で異なる年代に定着したと推察された。特に甌島列島では、他地域と配列変異が大きいことから、分布形成年代が大きく異なることが示された。また、これらのハプロタイプと表現型変異には関連性がみられなかったことから、各自生環境に適応した結果、各々の特徴的な表現型に分化したものと考えられた。

対馬北部の 1 集団では南部のハプロタイプが示された。この集団は施設手前の道路沿いにあることから、植栽による集団であると考えられ、分布形成への人為的な影響が明らかになった。核 DNA の *ITS* 領域では、ヘテロ型など不明瞭な変異を除いた塩基置換により、対馬の南北、長崎県本土および五島列島、甌島列島で大きく区分された。長崎県本土では一部の集団で対馬北部のハプロタイプが示されたが、その他の集団では五島列島と共通のハプロタイプを示した。また、五島列島の集団は全て同一のハプロタイプを示した。対馬では葉緑体 DNA のハプロタイプ同様、南

北で異なるハプロタイプを示したが、その境界が両者で異なっていた。葉緑体 DNA が母性遺伝であり、ダンギクの種子散布が主に高所から低所への狭い範囲に限定されることから、集団形成後に異なるハプロタイプの集団との花粉交流が生じたことが示唆された。葉緑体 DNA において人為的影響の示された 1 集団では、南部よりも北部のハプロタイプに近いことから、近隣集団の花粉侵入による遺伝子浸透が考えられた。以上の結果より、DNA シークエンス解析は、ダンギク自生集団の系統評価および保護を目的としたマーカーとして活用できることが示された。

(6) 主な既存園芸品種(SA:サカタ、TA:タキイ、FU:福花園、SN:サントリー)の DNA シークエンス解析の結果、葉緑体 DNA の *3'rps16-5'trnK* 領域では、FU ブルー、FU ホワイトは長崎市周辺、SN は対馬北部、それ以外の品種は平戸島北部およびその周辺と甌島列島のハプロタイプを示した。核 DNA の *ITS* 領域では、SA ホワイト、FU ホワイトは、平戸島北部を除く長崎県本土および五島列島の一部が変化した配列、SN は対馬北部、それ以外の品種は甌島列島のハプロタイプを示した。これらの結果より、SA ブルー、SA ピンク、FU ピンク、TA ブルー、TA ピンクは甌島列島に、FU ホワイトは長崎市周辺に、SN は対馬北部に由来することが示唆された。それ以外の品種では核 DNA と葉緑体 DNA の間でハプロタイプの不一致がみられたため、他地域間に由来する個体同士の交配によって育種された品種であることが推察された。以上の結果から、DNA シークエンス解析により、ダンギクの園芸品種として流通している系統の自生地を推定することが可能であることが示された。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者名：渡辺均
発表標題：西九州に自生するダンギクの地理的変異
学会等名：園芸学会
発表年月日：2012 年 9 月 22 日~9 月 24 日
発表場所：福井県立大学福井キャンパス・福井県・永平寺町

発表者名：渡辺均
発表標題：西九州に自生するダンギクの繁殖戦略
学会等名：園芸学会
発表年月日：2013 年 9 月 20 日~9 月 22 日
発表場所：岩手大学上田キャンパス・岩手県・盛岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 均 (Watanabe Hitoshi)

千葉大学・環境健康フィールド科学センタ

ー・准教授

研究者番号：80301092