

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07186

研究課題名(和文) 西日本の溪流沿い植物の系統地理及び集団維持に関する研究

研究課題名(英文) Phylogeographic study of riparian plants in Western Japan

研究代表者

山城 考 (Yamashiro, Tadashi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：50380126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウとアキノタムラソウの溪流沿い集団の起源を明らかにすることを目的とし、SSRによる集団解析を行った。リンドウでは集団クラスタリングの結果、四国の溪流沿い集団は単一のクラスターを形成したが、他の溪流沿い集団は独立にクラスターを形成した。また、すべての溪流沿い集団は陸上集団とまとまらなかつた。このことから、リンドウの溪流沿い集団は地域ごとに起源したことが示唆された。アキノタムラソウでは集団クラスタリングの結果、5クラスターに分類された。アキノタムラソウの溪流沿い集団は混成集団、または、他地域の陸上型とクラスターを形成した。そのため、溪流沿い集団は地域ごとに独立に起源したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Population genetic analyses based on microsatellite markers were conducted on *Gentiana scabra* and *Salvia japonica* in eastern Japan to examine the origin of their riparian populations. For *Gentiana scabra*, the result of STRUCTURE simulations, riparian populations were clustered separately, except for those of some Shikoku populations. Furthermore, all riparian populations did not consist a cluster with inland populations. These results suggested that the most of riparian populations might be independently originated from local ancestral populations in *Gentiana scabra*. Clustering analyses on riparian *Salvia japonica* populations also supported their independent origin from their local ancestral populations.

研究分野：植物系統分類学

キーワード：溪流沿い植物 マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

日本の河川は河口から源流までの距離が短く急勾配である。そのため、河岸に生育する植物は急激な増水時の流水による強い選択圧を受けている。溪流沿い植物とは河川が増水した際に冠水する環境に生育する植物であり、細い葉や強靱な茎を持つという環境適応が見られる植物群である。これらの溪流沿い植物に対して、これまで新分類群としての記載、陸上型の葉と溪流沿い型の葉の比較解剖学的研究、遺伝的解析による溪流型の系統を明らかにする研究が行われてきた。その結果、溪流沿い植物は単一起源 (e.g. Yatabe et al. 2009) のものや、複数回起源である (e.g. 三井, 2013) ものがあることが明らかにされているが、多くの溪流沿い植物がどのような祖先集団から、起源したのかについては不明である。特に、四国の河川では多くの溪流沿い植物が見られ、それらの推定祖先である陸上型の分布が冷温帯を中心に分布する群が多い (小川 2000)。申請者はアキノタムラソウを対象に溪流沿い集団と陸上型集団の形態および繁殖生態の違いについて研究を行ってきた。アキノタムラソウは四国では照葉樹林から亜寒帯まで生育する多年草で、溪流沿い集団では陸上型に比べ矮小化しており小葉が有意に細くなっている。さらに、陸上型集団が7~8月に開花するのに対して、溪流沿い集団では開花期が5月上旬~中旬と開花期の分化が起こっていることを明らかにした。申請者は移植実験から、アキノタムラソウの高標高地集団 (剣山 1995m) の個体を低地で栽培すると5月上旬に開花することを確認している。このように高標高域のアキノタムラソウが同程度の標高では溪流沿い集団と同じ時期に開花することや、陸上型が冷温帯や亜寒帯に分布する種が多いことから、四国の河川に生育する溪流沿い植物の多くが、亜寒帯や冷温帯の植物が河川環境に適応して分化した可能性が高いと考えられる。このことは、溪流帯が最終氷期に分布を広げた寒冷地植物の局所的なレフュージアとなった可能性を示唆している。このような視点からの溪流沿い植物に対するアプローチはこれまで行われていない。そのため、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究では西日本を中心に分布する溪流沿い植物であるリンドウとアキノタムラソウについてマイクロサテライトマーカーを使用した集団解析を行い、その起源について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 採集・DNA抽出・フラグメント解析

リンドウとアキノタムラソウのサンプリングは図1に示した地点で行った。リンドウは22集団から11-29個体ずつ、計474個体をアキノタムラソウは20集団から14-23個体ずつ、計380個体を採集した。生葉から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用し、全DNAの抽出を行った。

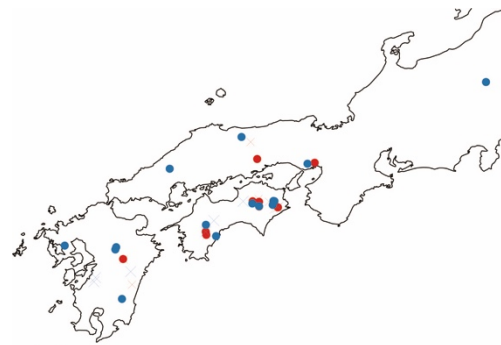


図1. リンドウ及びアキノタムラソウの採集地点。

● リンドウ陸上型, × リンドウ渓流型,
● アキノタムラソウ陸上型, × アキノタムラソウ渓流型

リンドウとアキノタムラソウの解析に使用したマイクロサテライトマーカーは表1と2に示した。アキノタムラソウで使用した、Salvia4、Salvia6、Salvia12、Iso9、Iso47は

表1. リンドウの解析に使用したマイクロサテライトのプライマー配列。

配列 (5'-3')	蛍光色素	N_A	H_O	H_E	F_{IS}
Gtm7 GCTGTTTCATGGACATGGAAGAAA TCATCCTGCAAGGCAAGTTATGAA	D3	17	0.7	0.7	0.1
Gtm47 ACTGGCTCCCATTTTCAAGTATCTG GCTTTTAGCCATTTCTGGAAATCAA	D4	10	0.5	0.5	-0
Gtm57 AACAGGAACATCAGTGATTTGAG ATTGCGGTGACTTCTGTACTTT	D2	16	0.5	0.5	0
Gtm59 GTAGGACTCTGCACAAGAAGTAGGT ACAATAAATATGGAGGCTGTAGGC	D2	15	0.5	0.6	0.1
Gtm65 AAGACCACTAGGGAGATGATTGAC GGAAAGAATAAAACAACCACCTC	D2	3	0.1	0.2	0.2
Gtm68 TGATGGGCAGTTTTCTTTGTA GGTCAAATCCAGTGCACAATA	D4	13	0.6	0.6	0.1
Gtm81 GTTCTCTCTCTCTACTCTTTCT GTCAGCAGTTTCTGTAGTTCAA	D3	24	0.7	0.7	0.1
Gtm84 GTGAGTGGCTTGATGAATGGT TACAGCACCGAAATGTAAAGTAGC	D3	27	0.6	0.6	-0
Gtm91 AGCACATTTCCCGCTACAAC TCTCAGGAGGAGGAGTTTGTAGT	D4	7	0.4	0.5	0.1
Gtm93 ATTAGAGGAAAAGGAGAAGGCCA CCCTTAAATGCTCTGTTGTCTATG	D3	5	0.4	0.4	-0.1
平均		14	0.5	0.5	0

表2. アキノタムラソウの解析に使用したマイクロサテライトのプライマー配列。

配列 (5'-3')	蛍光色素	N_A	H_O	H_E	F_{IS}
Salvia4 F: GCGGATATGAACCAA R: ACCATCAAATAACTATG	D2	22	0.6	0.7	0.1
Salvia6 F: CCGGTTTCAGTCAATCCTA R: ACGTTGGCCGGAACACGTCAAAT	D2	24	0.8	0.8	0
Salvia12 F: TCACTGTGATCTCATTAGGCTC R: TACTGTGTCTCGTTGTACATGC	D3	23	0.8	0.8	-0
Iso9 F: TATTTGGGTCTCTTCGACAC R: ACAGCTCTCTTCCATTACA	D3	4	0.1	0.1	-0
Iso47 F: CCAGGAAATAGTAGGC R: ATAGCGGTCTGAGCATTGGA	D4	6	0.2	0.2	0.1
平均		16	0.5	0.5	0

本研究の過程で開発したものである。リンドウについては Sato-Ushiku *et al.* (2011) により開発されたプライマーのうち 10 個を使用した。

各マイクロサテライトは蛍光色素 (Beckman Dye 2-4) で修飾したプライマーにより、Type-it Microsatellite PCR (Qiagen) を使用して増幅を行った。PCR 産物はサイズスタンダード GenomeLab size standard 400 (AB SCIEX) を加え、オートシーケンサー CEQ-8000 (AB Sciex) により、フラグメント解析を行った。

(2) データ解析

リンドウとアキノタムラソウの各集団について、得られた遺伝子型に基づき、遺伝的多様性のパラメーター (平均対立遺伝子数、ヘテロ接合体の観察値および期待値、固定指数) を GenoDive ver. 2.0 を用いて算出した。各集団におけるマーカーのハーディワインバーグ平衡からのずれと連鎖不平衡の検出は Genepop ver. 3.3 を使用して行った。

リンドウとアキノタムラソウの集団の遺伝的構造は STRUCTURE 2.3 を用いて解析を行った。admixture モデルと LOCPRIOR オプションを使用し、リンドウは $K=1-K=22$ 、アキノタムラソウは $K=1-20$ について 10 回のシミュレーションを行った。すべてのシミュレーションの MCMC に関して 50000 回の反復を burn-in とし、その後の 100000 回の反復を解析に使用した。得られた結果は STRUCTURE HARVESTER を使用し、 ΔK と $\text{LnPr}(X|K)$ の値からクラスター数を推定した。また得られた個体のクラスターへの帰属確率は pophelper を使用し、グラフ化した。STRUCTURE による解析は可能な限り、1 回目のシミュレーション解析から得られたクラスターが $K=2$ に分かれるまで、階層的に行った。

集団間の遺伝的分化は遺伝子分化係数 (F_{ST}) により求めた。

4. 研究成果

(1) 遺伝的多様性

リンドウとアキノタムラソウの遺伝的多様性のパラメーターは表 3 及び表 4 に示した。リンドウの平均対立遺伝子数は 4.3 であり、ヘテロ接合体の観察値と期待値は 0.50 と 0.53 であった。アキノタムラソウでは、平均対立遺伝子数は 4.9 であり、ヘテロ接合体の観察値と期待値は 0.48 と 0.50 であった。すべての集団において、ハーディワインバーグ平衡からのずれと連鎖不平衡は検出されなかった。

(2) 集団の遺伝的分化と遺伝的構造

リンドウ 22 集団に対する STRUCTURE による集団クラスタリングの結果、4 つのクラスターが得られた ($K=4$: 図 2)。4 つのクラスターは本州・九州北部 (Cluster I)、四国

表 3. リンドウの遺伝的多様性のパラメーター.

コード	採集地	N_A	H_O	H_E	F_{IS}
GS1	群馬榛名山	3.5	0.56	0.50	-0.11
GS2	兵庫神戸	5.7	0.64	0.65	0.01
GS3	岡山蒜山	5.3	0.62	0.63	0.01
GS4	広島深入山	4.6	0.62	0.63	0.02
GS5	徳島大川原	5.9	0.63	0.65	0.02
GS6	徳島神山	5.3	0.63	0.62	-0.01
GS7	徳島上勝	4.5	0.49	0.53	0.07
GS8	徳島那賀川	3.4	0.32	0.37	0.15
GS9	徳島落合峠	3.4	0.38	0.39	0.04
GS10	徳島剣山	4.2	0.49	0.52	0.05
GS11	徳島大步危	3.7	0.40	0.43	0.07
GS12	高知カルスト	4.7	0.61	0.63	0.03
GS13	高知仁淀川	3.1	0.31	0.36	0.15
GS14	高知窪川	5.9	0.60	0.64	0.05
GS15	高知四万十川	3.8	0.39	0.45	0.13
GS16	長崎大村	3.2	0.48	0.45	-0.07
GS17	熊本阿蘇1	4.6	0.47	0.50	0.06
GS18	熊本阿蘇2	4.9	0.52	0.62	0.15
GS19	宮崎高岡	4.9	0.54	0.57	0.04
GS20	宮崎耳川	3.2	0.41	0.41	0.00
GS21	球磨川1	3.3	0.52	0.57	0.08
GS22	球磨川2	4.1	0.47	0.52	0.10

表 4. アキノタムラソウ 22 集団の遺伝的多様性.

コード	採集地	N_A	H_O	H_E	F_{IS}
SJ1	香川竜王山	5.2	0.54	0.57	0.06
SJ2	徳島大川原	6.4	0.56	0.61	0.09
SJ3	徳島鮎喰川	4.2	0.53	0.52	-0.02
SJ4	徳島那賀川1	7	0.64	0.60	-0.06
SJ5	徳島鷲敷	5.2	0.50	0.49	-0.02
SJ6	徳島那賀川2	5.2	0.42	0.48	0.13
SJ7	徳島貞光川	3.8	0.43	0.45	0.03
SJ8	徳島一宇	5.2	0.54	0.55	0.02
SJ9	徳島風呂塔	4	0.44	0.45	0.02
SJ10	徳島剣山	3.2	0.34	0.38	0.13
SJ11	高知構原	5.4	0.52	0.59	0.11
SJ12	高知四万十川1	4.6	0.45	0.45	0.01
SJ13	高知四万十町	3.8	0.54	0.53	-0.02
SJ14	高知四万十川2	5.2	0.40	0.40	0.01
SJ15	兵庫神戸	5.6	0.54	0.54	0.01
SJ16	岡山奥津深	3.2	0.40	0.42	0.04
SJ17	岡山和気	4.2	0.39	0.39	0.02
SJ18	宮崎五ヶ瀬川	6.2	0.52	0.56	0.06
SJ19	宮崎小丸川	5.6	0.60	0.59	-0.01
SJ20	熊本山都	5	0.41	0.50	0.19

1 (Cluster II)、四国 2 (Cluster III)、九州中南部 (Cluster IV) と地理的にまとまる傾向が得られた。さらに、クラスターごとを対象にした階層集団クラスタリングの結果、各クラスターはさらに地域的に細分化された。Cluster I では群馬、神戸・岡山、広島・長崎の 3 つに分かれた。Cluster II では那賀川は他の集団と区別された。Cluster III では落合峠・剣山、四国カルスト・窪川の陸上型集団のまとまりと吉野川・仁淀川・四万十川の河川集団がまとまる結果になった。Cluster IV では阿蘇の集団と宮崎南部の陸上集団がまとまり、河川集団は別々のクラスターになった。

リンドウ 22 集団の F_{ST} の値は 0.03-0.51 で

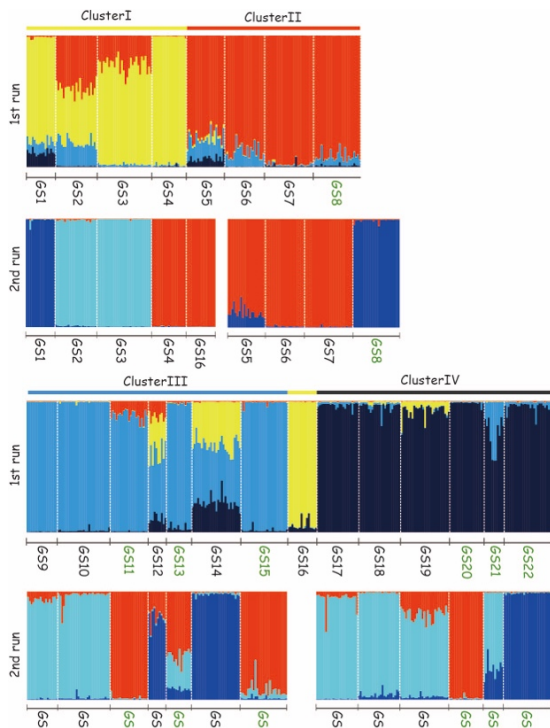


図2. リンドウ22集団のSTRUCTUREによるクラスタリングの結果。緑色の集団は溪流沿い集団を表す。

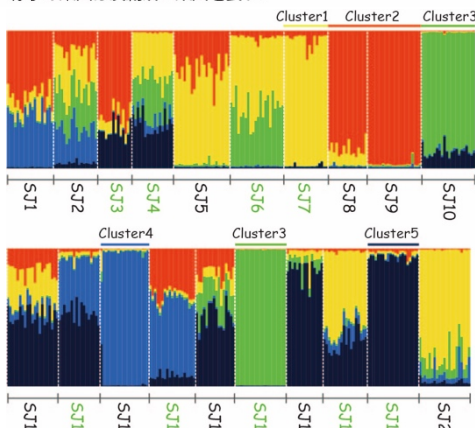


図3. アキノタムラソウ20集団のSTRUCTUREによるクラスタリングの結果。緑色字は溪流沿い集団を表す。

あり、溪流沿い集団間では0.20-0.49と比較的大きく、地域内の陸上型集団との間の遺伝的分化が低い傾向が見られた。これらのことから、リンドウの溪流沿い集団は地域ごとに独立に起源している可能性が示唆された。溪流沿い集団は当初の予想とは異なり、高標高域の集団とはクラスターを形成しなかった。特にCluster IIIでは吉野川・仁淀川・四万十川の溪流沿い集団が遺伝的に近く、クラスターにまとまることから、単一起源の可能性が示唆された。

アキノタムラソウはSTRUCTUREによるクラスタリングの結果、5つのクラスターに分類された(図3)。貞光川(Cluster I)、一字・風呂塔(Cluster II)、剣山・奥津溪谷(Cluster III)、四万十町(Cluster IV)、宮崎小丸川溪谷(Cluster V)についてはほとんどの個体が

比較的高い割合(85%以上)で、集団へ帰属していたが、その他の集団では2~4つのクラスターの遺伝的特徴が混ざり合っていた。アキノタムラソウ20集団の F_{ST} の値は0.04-0.36であり、河川間では0.06-0.35であった。九州と中国地方ではサンプリングできた集団が少なく、傾向が不明であるが、四国の集団では、溪流沿い集団は近隣の陸上集団とは遺伝的に遠く、地理的に離れた陸上集団とより遺伝的に近い傾向が見られた。

アキノタムラソウでは異なる地域の溪流沿い集団がクラスターを形成することは無く、溪流沿い集団は混成集団かまたは、他地域の陸上型とクラスターを形成した。そのため、溪流沿い集団は地域ごとに独立に起源している可能性が示唆された。また、溪流集団の近隣地域の高標高域の陸上集団との遺伝的近縁性は示唆されなかった。しかし、例えば、那賀川1(SJ4)と鷲敷(SJ5)や貞光川(SJ7)と一字(SJ8)のように溪流沿い集団の近隣の陸上集団とは遺伝的に異なっている傾向が見られた。このことは、溪流集団と近隣の陸上型とでは起源が異なっていることを支持する結果であると思われる。

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1件)

1. Yamashiro T, Yamashiro A, Ogawa M, Maki M. 2018. Natural hybridization between the endangered herb *Artemisia gilvescens* (Asteraceae) and the Common Congener, *Artemisia indica* var. *maximowiczii* in Japan. Act. Phytotax. Gobot. 69(2) in press. 査読有り。

[学会発表](計1件)

1. 喜屋武隆太・木村拓真・宇野貴裕・山城考・米倉浩司・牧雅之. 海浜生植物ソナレムグラの分子系統地理と生態ニッチモデリングによる分布変遷の解明. 日本植物分類学会第17回大会 金沢大学(石川県金沢市). 2018年3月8日。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山城考 (Yamashiro, Tadashi)
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業領域)・准教授

研究者番号: 50380126