

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 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880010

研究課題名（和文） タケ亜科植物における推定雑種検出を可能とする DNA バーコーディングの検討

研究課題名（英文） DNA barcoding to detect putative hybrid species in bamboos

研究代表者

久本 洋子 (HISAMOTO YOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60586014

研究成果の概要（和文）：

ササ類は容易に雑種を形成し、外部形態による同定が非常に困難である。本研究は、葉緑体および核遺伝子マーカーがササ類の雑種を検出するのに有効か否か検討した。東京大学秩父演習林と同北海道演習林において、2種のササ類の分布が重複する領域を含むようにそれぞれ 37、16 個体を採集した。外部形態による同定の結果、それぞれ属間および種間雑種が確認された。遺伝解析の結果、核遺伝子・花成促進遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* が雑種の推定に有効な可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Japanese dwarf bamboos (*Sasa*-group) develop hybrids easily, and the identification on the basis of the external morphologic traits of vegetative organs is difficult. The aim of this study was to investigate the usefulness of chloroplast and nuclear genes as DNA markers for differentiation between *Sasa*-group hybrid taxa. Thirty-seven and sixteen samples were collected in the University of Tokyo Chichibu Forest and the University of Tokyo Hokkaido Forest, respectively. Intergeneric and interspecific hybrids were identified on the basis of external morphologic traits. At the result of molecular analysis, one of the flowering genes, *FLOWERING LOCUS T (FT)* may be a useful DNA marker to detect hybrids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林科学

キーワード：ササ類・推定雑種分類群・核遺伝子マーカー・葉緑体遺伝子マーカー・花成促進遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)*

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、特定の遺伝子領域の短い塩基配列情報に基づいて生物種の同定を行う「DNA

バーコーディング」が世界規模で進行している。動物においては、ミトコンドリア DNA 上の Cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) の

部分塩基配列をバーコード領域として使うことが Hebert ら (2003) によって提唱されたが、植物においては、COI 領域は保存性が高く変異が少ないことから、2009 年 11 月に開催された第 3 回国際会議において、*rbcL* 部分領域および *matK* 部分領域をターゲット領域にすることが決定された (CBOL Plant Working Group 2009)。日本においては、2009 年から Japanese Barcode of Life Initiative (JBOLI) によって DNA バーコード情報のデータベース化が開始された (神保・伊藤 2010)。また、日本産樹木種を対象として DNA バーコードを決定するプロジェクトが 2009 年より開始された (吉村ら 2010)。

(2) 日本の野生植物・自然集団には、推定雑種起原の分類群が普遍的に存在する。これらの分類群が種の同定を困難にしている主要因にも拘らず、DNA バーコードとして指定された各種葉緑体遺伝子は母性遺伝するため、これらの推定雑種起原の分類群を検出できない特性を持っている。

日本列島固有のタケ亜科植物においても、8 属のうち 4 属までが属間雑種起原の分類群であり、浸透性交雑により生じた限りない中間形や複合体により同定が極めて困難な分類群の一つとみなされている (小林 2001, 2005, 2006)。とりわけ、ササ属植物は冷温帯林床優占種として、ブナーチシマザサ群集、ブナースズダケ/ミヤコザサ群集のように、日本の植物社会の標徴種を含み、その一斉開花が森林の天然更新の重要な契機の一つとみなされ、森林施業においても重要な分類群である。

(3) シロイヌナズナやイネなどのモデル植物における研究により、2007 年にこれまで謎であった花成ホルモン・フロリゲンの実体が花成促進遺伝子 *FLOWERING LOCUS T (FT)* のタンパク質であることが明らかとなった (Corbesier et al. 2007, Tamaki et al. 2007)。申請者はこれまでに、イネの *FT* ホモログ *Hd3a* の塩基配列を手がかりとし、2004 年に静岡県富士竹類植物園で一斉開花を起こしたマダケ属の 1 種モウハイチク *Phyllostachys meyeri* から *FT* ホモログ *PmFT* を探索し、全 4 コピーをクローニングし、それぞれの全塩基配列を決定した (Hisamoto & Kobayashi 2007)。さらに、イネ科の初期分岐群を含む代表的な世界のタケ類 27 分類群の *PmFT* ホモログの塩基配列からタケ類における花成遺伝子の進化傾向を調べた (Hisamoto et al. 2008)。その結果、それぞれの分類群が亜科または連の分類単位に非常にきれいにまとめられ、*PmFT* ホモログがイネ科の分類に利用可能なマーカーとなることを示した。また、イネ科の最も重要な分類形質である花序、すな

わち小穂構造の進化に密接に関わることを示唆し、タケ類の開花現象とともに、有限・無限という花序の形態に深く関わる可能性を示唆した。

一方、Schlüter et al. (2007) は花芽運命決定遺伝子 *LEAFY (LFY)* がランの近縁種間において系統学的に有効なマーカーとなり得ることを明らかにした。

2. 研究の目的

日本の植物社会を特徴づける雑種起原の代表的な植物分類群であるタケ亜科植物、特にササ類について、誰にでも同定可能な簡明な検索システムの構築することは、生物多様性の保全のみならず、林業などの応用分野においても必要とされる課題に違いない。

そこで、ササ類を解析対象とし、DNA バーコーディングのターゲット領域として葉緑体遺伝子 *rbcL* および *matK* の部分配列を使用すると同時に、核遺伝子 *PmFT* および *LFY* ホモログを取り上げ、それらが雑種およびその両親種を検出可能なマーカーとして有効か否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料

東京大学大学院農学生命科学研究科秩父演習林において標高 920~1900 m に分布するササ類 37 個体を (図 1A)、同北海道演習林において標高 530~1200 m に分布するササ類 16 個体を採集した (図 1C)。両地点とも事前調査より 2 種のササ類の分布が重複する領域を含むように設定した。

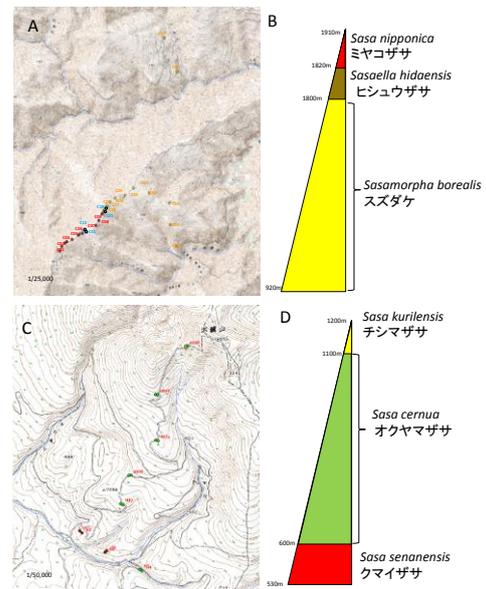


図 1 A: 秩父演習林における採集地点 B: 秩父演習林のササ類の標高別分布図 C: 北海道演習林における採集地点 D: 北海道演習林のササ類の標高別分布図

(2) 方法

DNA バーコーディングの手法に従い、以下の通り実施した (図 2)。

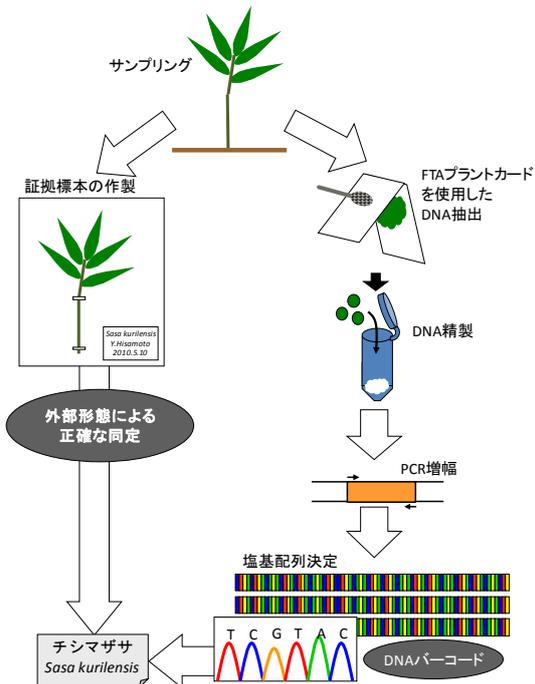


図 2 ササ類における DNA バーコーディングの概略図

① 採集個体は押し葉標本にし、栄養繁殖器官の外部形態の検索表 (Kobayashi & Furumoto (2004), 小林 (2005)) に基づいて同定を行った。

② FTA プラントカードを使用して葉から DNA 抽出精製を行い、各マーカー用プライマーで PCR し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。また、他の地域で採集され正確に同定されたタケ亜科植物 24 種の DNA を比較対照とした。

表 1 本研究で使したプライマー配列

プライマー名	フォワードプライマー	リバースプライマー
rbcl (David Erickson unpub.)	5'-ATGTCACCACCAACAGAGACTAAAGC-3'	5'-GTAAATCAAGTCCACCRGC-3'
matK 3f/1R (Ki-Joong Kim unpub.)	5'-CGTACAGTACTTTGTGTTTACGAG-3'	5'-ACCCAGTCCACTCTGGAAATCTTG6TTC-3'
matK XI/5r (Ford et al. 2009)	5'-TAATTACGATCAATTCATTC-3'	5'-GTTCTAGCACAAAGAGTCG-3'
matK 390f/1326r (Cuenoud et al. 2002)	5'-CGATCTATTCAATCAATTC-3'	5'-TCTAGCACAGAAAGTCGAAT-3'
Sasa FT	5'-CCATTTTCGATGTTTCTCT-3'	5'-AACATGCAGGAAAGGAAG-3'
Sasa LFY	5'-ACACCGGTAGGAGGATGT-3'	5'-ACCTTAGTGGGACTTGTG-3'

葉緑体遺伝子マーカーは植物 DNA バーコーディングのターゲットと定められた *rbcl* および *matK* 部分領域を使用した (表 1)。核遺伝子マーカーにはタケ亜科植物の *FT* および *LFY* ホモログ配列から保存的な領域を選んで設計した。

③ 塩基配列情報を MEGA 5 プログラムソフトによりアライメントし系統解析を行い、配

列情報に基づく同定結果と証拠標本の外部形態による同定結果とを照合した。

4. 研究成果

(1) 外部形態による同定

秩父演習林では高標高域にミヤコザサ (*Sasa nipponica*) が、低標高域にスズダケ (*Sasamorpha borealis*) が分布し、標高 1800 m 付近にササ属とメダケ属の推定属間雑種ヒシュウザサ (*Sasaella hidaensis*) が確認された (図 1B)。

北海道演習林では 1200 m 地点にチシマザサ (*Sasa kurilensis*) が、530 m 地点にクマイザサ (*Sasa senanensis*) が確認された以外はチシマザサ-チマキサザ複合体のオクヤマザサ (*Sasa cernua*) であった (図 1D)。

(2) 遺伝解析

① 表 2 に 4 遺伝子の解読塩基数および変異塩基数を示した。

表 2 解析塩基数および変異塩基数

	rbcl	matK	Sasa FT	Sasa LFY
Amplified seq.	553 bp	Not amplified	253 bp	319 bp
Verified seq.	2 bp	-	18 bp + 3~36 bp indels	None

rbcl 配列ではスズダケ属に特異的な 2 個の 1 塩基置換が検出されたのみであった。一方、*matK* 配列は 3 種の異なるプライマーを使用したにもかかわらず、増幅されなかった。*LFY* 配列は保存性が高く、変異は検出されなかった。一方、*FT* 配列では複数の 1 塩基置換に加え、3~36 bp の挿入・欠失が検出された。

② 葉緑体遺伝子 *rbcl*、核遺伝子 *FT* を使用して系統解析を行った (図 3)。秩父演習林のサンプルでは、*rbcl*、*FT* ともにスズダケ属が一つの分岐群を形成した (図 3A, B)。属間雑種ヒシュウザサはミヤコザサと一つの分岐群を形成した。このことから、ヒシュウザサと同定されたサンプルは母親がミヤコザサである可能性が示唆された。また、F1 雑種のために雑種性が検出されなかった可能性が考えられた。

北海道演習林のサンプルでは、*rbcl* では 16 サンプル全てが一つの分岐群にまとまった (図 3C)。一方、*FT* では種間雑種オクヤマザサの個体間で、推定両親種と一つの分岐群を形成したものとそれ以外の分岐群に分かれた (図 3D)。このことから、オクヤマザサ内の浸透交雑が検出された可能性が示唆された。

以上の結果から、核遺伝子 *FT* 配列は葉緑体遺伝子 *rbcl* と併用することで属間雑種の母親推定に利用できるとともに、浸透交雑した種間雑種の推定にも有効な可能性を示した。

第 59 回日本生態学会 2012 年 3 月 18 日
 龍谷大学瀬田キャンパス (滋賀県)

② 久本 洋子 (2012) 日本産ササ類における
 推定雑種検出を可能とする開花遺伝子マ
 ーカーの検討

第 123 回日本森林学会 2012 年 3 月 28 日
 宇都宮大学峰キャンパス (栃木県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久本 洋子 (HISAMOTO YOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：60586014

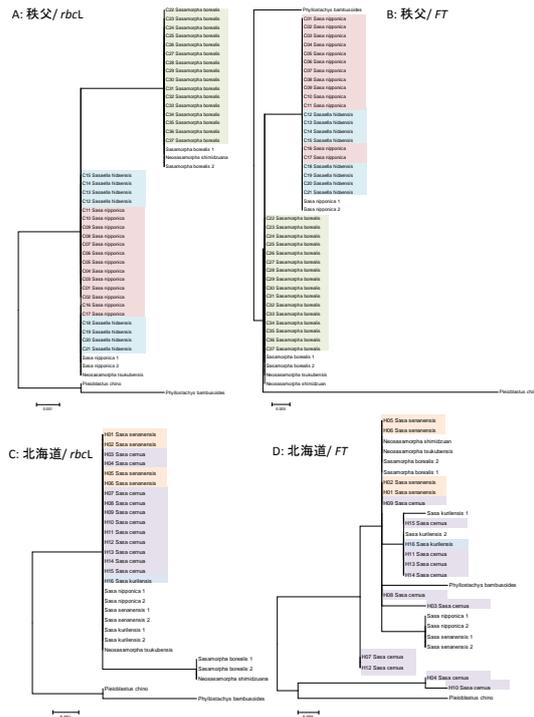


図 3 最尤分子系統樹：秩父演習林 37 サンプルにおける *rbcL* 配列 (A) および *FT* 配列 (B) の解析結果、北海道演習林 16 サンプルにおける *rbcL* 配列 (C) および *FT* 配列 (D) の解析結果

今後、サンプル数を増やす一方で、プライマーを再設計して遺伝子の解析範囲を広げること、核遺伝子マーカーとしての有用性を高める予定である。

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 2 件)

① Hisamoto Y., Kobayashi M. (2010) Protoplast isolation from bamboo leaves. *Plant Biotechnology* 27:353–358 査読有

② Hisamoto Y., Kobayashi M. (2012) Flowering habit of two bamboos *Phyllostachys meyeri* and *Shibataea chinensis* analyzed with flowering gene expression. *Plant Species Biology* DOI: 10.1111/j.1442-1984.2012.00369.x 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Hisamoto Y. (2012) Utility of flowering genes as nuclear DNA markers to detect putative hybrid species in Japanese dwarf bamboos.