

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：14403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440237

研究課題名(和文)再発見された絶滅種アイナエ(マチン科)の保全のための生活史と遺伝的多様性の解明

研究課題名(英文)Conservation of the endangered annual plant, *Mitrasacme pygmaea* R. Brown (Loganiaceae): life history, ecology, germination traits and genetic diversity

研究代表者

岡崎 純子 (Okazaki, Junko)

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：20195332

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文):大阪市立大学理学部附属植物園で発見された絶滅種アイナエ(マチン科)の保全を図るため、分布状況、生活史、環境条件、交配様式および遺伝的多様性の解明を行った。その結果大阪府では4地点で分布が確認された。野外集団では5月末に実生が出現し成長して8月～10月に開花結実した。種子は光発芽種子で、発芽・生育には十分な光が必要であることが判明した。交配実験からこの植物は自家和合性で自家受粉の割合が高いことが推定された。地理的遺伝構造はみとめられず植物園の集団の由来は不明瞭であった。この植物の保全には発芽成長期の光環境の確保が重要であり、フェノロジーに対応させた除草の実施が有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文):To conserve the natural populations of the endangered annual plant, *Mitrasacme pygmaea* R. Brown (Loganiaceae) grown at Botanical Garden, Osaka City University, we investigated its distribution, the life histories, the environmental conditions suitable for the growth, the breeding system and the genetic diversity. As a result, we found three more localities the plants were distributed in Osaka pref. And its seedlings appeared at the end of May and flowering began in August. The seeds of the plant revealed to be photoblastic and the enough light intensity were necessary for the germination and growth. They were self-compatible and produced seeds mainly through self-pollination. We could not detect the geographical genetic structures among eight populations examined. We concluded that the maintenance of enough light conditions and proper weeding time and frequencies corresponding to the growth stages would be the most effective for the conservation of this plant.

研究分野：生物学

キーワード：保全 光発芽種子 アイナエ 光環境 自動自家受粉 絶滅危惧種 マチン科 植物園

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

地域フロラ調査の進展と地域レッドデータブックの出版によって絶滅種、絶滅危惧が懸念される種群が明瞭になり、その保全についての多面的な解析が進展している。また個体群として健全に維持されているのかについては、その遺伝的多様性の解明の結果を踏まえた保全対策を図る必要性があり、この視点から集団の全個体遺伝子型調査が様々な種群で進められている。しかし、急激な個体数激減のため保全を図る上で必須である基本的な生活史情報すら解明されていない種群も多く、そのような情報の蓄積が急務となっている。

(2) 着想に至った経緯

申請者岡崎純子と共同研究者山下純・植松千代美は、2009～2012年大阪市立大学理学部附属植物園(大阪府交野市)を「自然環境の多様性理解を進める地域密着型の環境学習フィールド」として活用するため、その基礎情報であるシダ植物・草本相調査を共同研究で行なってきた。この植物園は大都市とその周辺の里山に隣接し、1950年代にもとの自然林・草地を保持する形で取り込んで植林を行い当時としては珍しい生態林見本園として開設された場所である。過去に植栽種のリストは3回発表されているが、園内の自生種の情報はほとんどない。申請者らの調査の結果から、約26haの園内にはこの植物園の位置する生駒山系の自然公園の中では比較的多い数の200種を超える草本植物が自生・野生しており、その草本類の中には近畿地方の稀少林床性草本や近畿地方で個体数が激減している里草地植物もみられ、都市に隣接する緑地として野生植物の非常に重要な避難地となっていることが判明した。この調査で見つかった貴重な種群の一つが申請研究の材料とするアイナエである。アイナエはマチン科の一年生草本で、里草地に生育する。各県版レッドデータブックでは24都道府県で保護を要する植物とされ、近畿(レッドデータブック近畿研究会、2001)では、絶滅の危険性が高くなりつつある種群とされている。特に大阪府では50年以上の採集記録がなく、絶滅種(EX)とされていた。植物園でのアイナエの導入記録はなく、また発見された場所も実験圃場からは離れた自然林近くの草地で、園内植栽植物の逸出とは考えにくい。このようなことから、園内のアイナエは大阪府で唯一残存自生しているアイナエの自然集団の可能性が考えられ、この植物の保全が急務となっている。ただし、富山県では新規造成の公園での出現が報告され、植物園のアイナエも他の植栽時に植物園に持ち込まれた可能性は払拭できず、自生種であるのか、他の集団との遺伝的な系統解析を行って、その由来を明らかにしていく必要がある。

アイナエは植物体長5～10cmと小型で、また分布も点在するためかほとんどその生態は

わかっていない。また、この植物は園内では谷間のシバ草地で発見され、光環境や水分条件がこの種の生育に関与しているものと予想される。アイナエの保全を図るためには、この植物の生活史に関わる基本情報を明らかにし、保全に注意を払うべき生活史の発育ステージを明確にすると共に生育環境としてどのような条件がこの植物の生育・種子生産に影響を与えているのかを解明していく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、植物園でのアイナエの保全のために生活史およびその遺伝的多様性を明らかにすることにより効果的な保全方法の策定を目指した。具体的には次の5点の問題点の解明を行った。

(1) 大阪とその近隣地域でのアイナエの分布生育状況を明らかにする。

(2) 保全上重要な生活史上のステージを特定する。野外でのフェノロジー(発芽、成長、開花時期)の特定と種子の発芽条件を解明する。

(3) 本植物の適切な生育環境の解明を行う。生育環境として光環境、水分環境条件に注目し出現頻度との関係を解析する。

(4) 植物園のアイナエの由来が元々の自生であるのか、他の地域からの移入であるのかを他の自生地域からの葉緑体DNAの系統解析から明らかにする。

(5) 植物園内の集団が十分な遺伝的多様性を保有しているのかをSSRマーカーを用いたアイナエ集団の遺伝的多様性の解析で明らかにする。SSRマーカーでの解析がうまくいかない場合には交配実験を行い、交配様式を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 調査地

調査地としては大阪府交野市私市の大阪市立大学理学部附属植物園集団KSを含め表1に示した8集団を用いた。

調査地記号	地名
HA	石川県白山市
HO	大阪府交野市星田
II	大阪府四條畷市下田原
KS	大阪府交野市私市
SA	島根県大田市三瓶町
Suita	大阪府吹田市
SU	熊本県熊本市中央区
WA	奈良県奈良市

(2) 方法

①分布状況については京都大学博物館(KYO)、兵庫県立人と自然の博物館(HYO)、大阪市立自然史博物館(OSA)の標本調査とアマチュア研究者からの情報をもとに現地調査を行った。

②フェノロジー調査はKSにコドラートを設置し、出現個体を継続観察して行った。種子発芽条件の解明のためには野外5集団

(H0, II, KS, SA, WA) から採取してきた種子を約 1 ヶ月間 5°C 冷湿保存したのち用いた。発芽条件の解明には段階温度法を用いた。段階温度法の温度条件は 5°C~35°C で温度下降系 (DT 系) と温度上昇系 (IT 系) を設定した。発芽の光条件は明期と暗期の 12 時間交代条件と暗条件を設置した。

③生育環境調査は KS で定点コドラートを設置し、5 月~10 月の出現個体数の変動と光環境、水分環境を測定した。光環境については 2013 年に終日設置測定したデータロガーでの積算値と午前 11 時での測定値に相関がみられたため 2013 年と 2014 年は午前 11 時時の相対量子密度を測定し光条件の指標とした。土壌水分条件についてはスタンドアロン土壌水分計を用い土壌水分含量測定を行った。

④植物園の集団が自生か移入であるかの判定を試みるために葉緑体 DNA 遺伝子多型を用いた系統解析をおこなった。11 遺伝子座のプライマーを用いて増幅を試みたうち変異が検出された 3 遺伝子座 rplL16 intron, trnL-trnF IGS, trnV-ndhC IGS を用いた。この解析は KS 集団と他の 7 集団からの葉から各地 7-10 個体抽出して塩基配列を解析した

⑤植物園集団の遺伝的多様性を明らかにするためにマイクロサテライト DNA 多型解析を行った。H0, II, KS, WA 集団から各 15 個体, SA, Suita, SU から各 10 個体ずつ、各個体 1~3 枚採集し、シリカゲル中で乾燥保存した。改変 CTAB 抽出法で DNA 抽出をおこない、テンプレート DNA を作成した。プライマーについては既存のプライマーの報告がなかったため、マチン科に比較的近縁で報告のあるアカネ科のロブスターコーヒノキ (*Coffea canephora* Pierre) とキョウチクトウ科のニチニチソウ (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) の単純塩基配列部より SSR プライマーを設計した。設計には Primer3 Plus ソフトを用いた。PCR 反応後電気泳動を行い、その後増幅の確認を行った。

アイナエの交配様式を明らかにするためには結実率の観察、自動自家受粉実験とそれらとの比較、P/O (花粉数/胚珠数) 比の測定を行った。結実率は結実期に研究室に持ち帰り実体顕微鏡下で観察測定した。自動自家受粉実験は、調査地よりアイナエを持ち帰り実験室で訪花昆虫を排除して観察した。P/O (比) の測定は開花前の花を液浸標本で野外より持ち帰り、双眼実体顕微鏡下で花粉数と胚珠数を数えた。これには KS より 7 個体, Suita より 9 個体を用いた。

4. 研究成果

(1) 大阪とその近隣地域でのアイナエの分布生育状況

標本庫調査から大阪では 1998 年以降、大阪市立大学理学部附属植物園以外でも 1 地点での腊葉標本が確認できた。またアマチュア研究者からの情報からの現地調査によりさらに 2 地点での分布を確認した。

(2) フェノロジー (発芽, 成長, 開花時期) の解明と種子の発芽特性

①フェノロジー

KS 集団でのアイナエは 2013 年は 5/30, 2014 年は 6/3, 2015 年は 6/10 に実生が確認でき、1~2 週間後に本葉をつけた。本葉が 3 対程度、葉の大きさが 1.5 cm ほどとなる 7 月中旬~8 月にかけて花茎を伸ばす開花個体が発見し 10 月下旬まで開花が見られた。KS 集団では 1 ヶ月に 1 回ほど草刈りが行われていた。非開花期では草刈りの影響は顕著ではなかったが開花期では草丈が高くなるため草刈り直後は個体数が減少した。しかしその後個体数の回復がみられ、開花結実に影響を与えない時期で草刈りが実施されることがこの種の保全に重要であると考えられる。

②種子の発芽特性

IT 系明暗交代条件で調査全集団とも高い発芽率を示し、SA では 39.47 (±17.80) % と最も高い値を示した。IT 系暗条件は 3 集団で数% の発芽率を示したが II, KS では発芽が確認されなかった。IT 系明暗交代条件で多くの発芽を確認できたことから光要求性があることが示された。DT 系で発芽を確認出来たのは明暗交代条件の WA1.67 (±2.35) % と SA2.26 (±1.96) % のみ、暗条件では H0 で 1.11 (±1.92) % のみと IT 系と比較して発芽を確認出来内集団が多く得られた。このため休眠解除には低温経験が必要であることが示された。

(3) 生育に適した光環境と水分環境条件の解明

KS において 2012 年~2014 年で光環境と個体出現に有意な相関関係が認められ (2012: χ^2 -test: $p=0.004<0.01$, 2013: χ^2 -test: $p=0.04<0.05$, 2014: χ^2 -test: $p<0.001$)、光条件の良いコドラートにアイナエが出現する傾向が見認められなかった。ただし出現個体数の減少した 2015 年には光環境と個体出現との間に有意な相関関係が認められなかった。

土壌水分含量については 2013 年には出現コドラートと出現しなかったコドラートでは統計的に有意な差が認められたが 2014 年と 2015 年には有意な差が認められなかった。

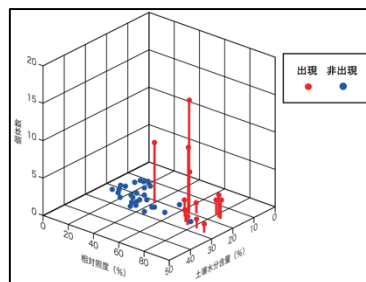


図 1. KS 集団におけるアイナエの出現・非出現地点の光条件と水分条件の関係

図 1 には光条件と水分条件の関係を出現コード

ラートと非出現コドラートとの関連で示した。

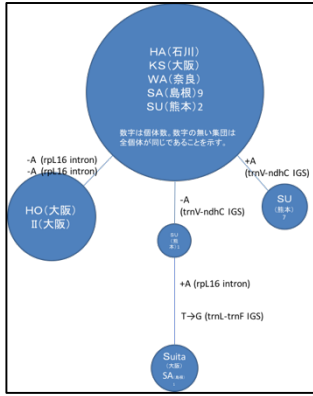


図2 葉緑体DNAハプロタイプのネットワーク解析の結果

これからは 10 ~ 30 % の水分条件下では光条件が大きくその出現に関係してくることが判明した。

(4) 葉緑体 DNA 遺伝子多型を用いた集団間の系統解析

図2にその結果を示した。特に大阪府の4集団 (HO, II, KS, Suita) は地理的には近いが、集団間の遺伝的変異が顕著に見られた。KS 集団が大阪府の他集団と遺伝的に近いとはいえなかった。SU, SA には集団内で多型が認められ、SA 集団の1個体は大阪府の Suita 集団と同じハプロタイプの遺伝子型を示した。全体的として地理的構造が認められず、KS 集団については自生なのか移入種であるのかはこの結果からは判定がつかなかった。

(5) 植物園集団の遺伝的多様性を明らかにするためのマイクロサテライト DNA 多型解析と交配実験

今回表2に示した COF, NIT という2個の遺伝子座についてプライマーを設計して PCR 実験をおこなった。両プライマーともに増幅を確認することができなかった。このことよりアイナエについてはこの種特有のプライマーの設計を行って解析していく必要がある。

表2 作成したSSRプライマー

primer	direction	sequence(5'-3')	アニーリング温度(°C)
COF	forward	TGGAGCAGCTCAAACCTTG	52-56 gradiebt
	reverse	CACCTTGCAGCTGAACCTGAA	52-56 gradiebt
NIT	forward	CCGTTATGCTAGAGGCGAAG	52-56 gradiebt
	reverse	TCTTGCTTACGCGTGGACTA	52-56 gradiebt

表3に交配様式の調査の結果を示した。2013年は調査2集団で自然状態の結実種子数と自動自家受粉での結実種子数との間に有意な差が認められ自然状態の方が多くの種子が生産されることが明らかになった。2015年では自動自家受粉の平均種子数は自然状態の平均種子数との間に有意に差は認められなかったが結実数が集団全体に悪い年でこのような環境状況の影響も考慮する必要がある。

表3 交配様式実験の結果

調査地	自然状態				自動自家受粉			
	平均胚珠数±SD	N	平均種子数±SD	N	平均種子数±SD	N	p	結果率(%)
表2 交配様式実験の結果								
HO	46.3 ± 10.0	20	6.4 ± 6.4	30	3.5 ± 3.9	8	***	87.5
II	62.7 ± 9.3	20	46.7 ± 13.9	30	10.6 ± 11.0	13	***	84.6
KS	56.3 ± 9.6	20	24.1 ± 11.0	30	-	-	-	-
WA	69.5 ± 18.1	20	11.2 ± 15.6	30	-	-	-	-
平均	58.6 ± 14.8		27.8 ± 23.9		7.9 ± 9.5			
2015								
HO	-		12.5 ± 18.8	17	13.3 ± 13.6	8	NS	88.9
II	-		13.7 ± 21.8	21	-	-	-	-
KS	51.7 ± 8.5	18	12.4 ± 17.8	22	-	-	-	-
Suita	49.8 ± 8.7	13	17.8 ± 20.8	17	8.7 ± 12.3	6	NS	75.0
平均	50.9 ± 8.5		13.9 ± 19.8		11.3 ± 12.8			

NS: t-test: p>0.05, non-significant

表4にはP/O比の結果を示した。いずれも14を越える値で岡田・加藤(2002)では

表4 アイナエ2集団からの平均P/O比

調査地	平均花粉数±SD	平均胚珠数±SD	PO比±SD	N
KS	728.5 ± 85.6	50.3 ± 8.6	14.8 ± 4.4	7
Suita	725.6 ± 133.6	51.7 ± 8.1	14.5 ± 3.2	9

$\log(P/O) > 2.5$ で他家受粉, $\log(P/O) < 2.0$ で自家受粉中心の交配様式をもつとしている。アイナエに関して $\log(P/O)$ にすると KS で 1.17, Suita で 1.16 と 2.0 より低い値となった。表2と表3の結果よりアイナエは自殖を主とするが、自然状態の方の結実種子数が有意に高い年もあることや一株が咲かせる花数が少ないことから完全自殖ではなく外交配も行っている可能性が高い。

今回の研究で得られた結果からアイナエにの保全には光発芽種子であることから発芽時期の光条件の確保、およびその生育においても十分な光環境が重要であることが示された。適切な草地管理としてアイナエの出現時に地表面が見えるよう草刈りを行い、刈り取った草の生育地から除去することで光条件の確保と同時に他種との競争を減らしていく必要がある。さらに開花結実時期の刈り取り時期を配慮することにより結実個体の維持を図る必要がある。また自殖をするが外交配も行っていることが示唆されるため、ダイレクトシーケンスなどを用いてアイナエに適した SSR プライマーを設計し、多様性の評価を行っていく必要がある。

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)

[学会発表] (計 3件)

- ① 岡崎純子・小原昌之・植松千代美. 都市に生育する絶滅危惧種の繁殖生態: 大阪で再発見された絶滅危惧種アイナエ (マチン科). 日本生態学会. 2016年3月22日「仙台国際センター (宮城県仙台市)」
- ② 岡崎純子・小原昌之・植松千代美. 絶滅危惧種アイナエ (マチン科) の生育環境と発芽特性. 日本生態学会. 2015年3月21日. 「鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市)」
- ③ 岡崎純子・小原昌之・鶴田翔子・山下純・植松千代美. 絶滅危惧種アイナエ (マチン科) の生活史と個体群変動. 日本生態学会. 2014年3月17日. 「広島国際会議場 (広島県広島市)」

[図書] (計 3件)

- ① 岡崎純子. 2014. 草本植物のレフュージアとしての植物園. 『都市・森・人をつなぐ』 (植松千代美 (編)) pp. 39-58, 京都大学学術出版会.
- ② 植松千代美. 2014. 森の植物園 『都市・森・人をつなぐ』 (植松千代美 (編)) pp. 1-37, 京都大学学術出版会.
- ③ 山下純. 2014 野生シダ植物の多様性と植物相の変化. 『都市・森・人をつなぐ』 (植松千代美 (編)) pp. 76-104, 京都大学学術出版会.

〔その他〕

ホームページ等

① 大阪教育大学理科教育講座植物進化学研究室

<https://www.osaka-kyoiku.ac.jp/~okazaki/>

② 植松千代美「ひらめき☆ときめきサイエンス」

https://www.jsps.go.jp/hirameki/ht27000_jisshi/ht27207jisshi.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 純子 (OKAZAKI, Junko)

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：20195332

(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

山下 純 (YAMASHITA, Jun)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：20432627