

絶滅危惧植物チチブイワザクラの遺伝的多様性の解析

生命科学研究室

指導教員 倉田薫子准教授

東京都市大学 知識工学部 自然科学科 0924027 藤巻弘樹

1. 緒論

現在、日本に自生する 7000 種の維管束植物のうち、レッドリストで絶滅危惧 I A 類 (CR), 絶滅危惧 I B 類 (EN), 絶滅危惧 II 類 (VU) に指定されている種は、2155 種にのぼる³⁾。野生植物の減少には、開発、盗掘、食害や温暖化などの要因が挙げられ、生物多様性の損失に繋がっている。生物多様性とは、遺伝的多様性、種多様性、生態系の多様性の 3 段階で構成され、中でも遺伝的多様性の維持は、長期的な種の存続のため必要である。現在では、SSR 遺伝子座に存在する対立遺伝子の多型性の高さから遺伝的多様性の評価を行う方法が一般的である。



図 1. チチブイワザクラ

チチブイワザクラ (*Primula reinii* var. *rhodotricha*) は、サクラソウ科サクラソウ属コイワザクラ (*Primula reinii*) の変種で、武甲山固有の多年生草本である。武甲山の標高 900m 前後の石灰岩の北側斜面にかつて自生していたが、現在自生集団は確認されていない。武甲山は全山石灰岩で、固有の植物群落が形成されており、チチブイワザクラ以外にいずれも絶滅危惧植物であるキバナコウリンカ、ブコウマメザクラ、チチプリンドウなどが武甲山石灰岩特殊植物群落として登録されている。

サクラソウ科は、地下茎による栄養繁殖と虫媒による種子繁殖の 2 つの繁殖様式をもつ。他殖促進のため、異型花柱性と呼ばれる雄蕊と雌蕊の長さが異なる 2 種類の花型の花をつける。しかし近年、サクラソウ (*Primula sieboldii*) を例とした日本固有のサクラソウ属で、開発による自生地縮小、送粉昆虫の消失から異型花柱性が崩壊し、自殖が進むことで、集団内の遺伝的多様性の低下が報告されている⁴⁾。チチブイワザクラも同様に開発に伴って自生地が消失しており、現存する個体が少数のため、絶滅危惧 I A 類 (CR) に指定されている³⁾。そこで本研究では、チチブイワザクラを適切に保全するために、残存個体の遺伝的多様性を把握する事を目的とする。

2. 材料と方法

2-1. 材料

材料は、埼玉県秩父市武甲山の株式会社太平洋セメント三輪鉱業所内に管理されているチチブイワザクラ株 171 個体を対象とした。この中から 20 個体を選出し、葉を 1~2 枚ずつ採取してシリカゲルで乾燥保存した。また、6, 8, 10 月には植物体の観察を行った。

2-2. 方法

改良ガラス濾紙法²⁾により抽出した 4 個体の DNA を用いて DNA の増幅を確認した。増幅に用いた SSR プライマーは、サクラソウで開発された 76 組を使用した⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾。このうち単一なバンドが見られたサンプルについて、DNA 塩基配列解析装置 (3100 Genetic Analyzer, ABI PRISMTM) で泳動し、多型の有無を確認した。次に多型性が確認されたプライマーを用いて、20 個体のサンプルの DNA 多型を解析した。多型の解析は、DNA フラグメント解析用ソフト (Peak ScannerTM, Applied Biosystems) を用いて行った。各遺伝子座の評価は、遺伝的多様性評価ソフト (Arlequin ver 3.1, Laurent Excoffier) を用いて、対立遺伝子数 (Na)、ヘテロ接合度の観察値 (Ho)、ヘテロ接合度の期待値 (He)、近交係数 (Fis) で表した。

3. 結果

DNA の増幅に用いたプライマー 76 組のうち 24 組で単一のバンドが確認され、DNA 塩基配列解析装置によるスクリーニングで、4 組の遺伝子座から多型が確認された。この 4 組の遺伝子座を 20 個体に適用した結果を表 1 に示す。表 1 より 1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数は平均 2.5、ヘテロ接合度の観察値は 0.437、ヘテロ接合度の期待値は 0.503、近交係数の平均値は 0.103 であった。

4. 考察

表 1 より、ヘテロ接合度の期待値が 0.503 で、ヘテロ接合度の観察値の 0.437 を上回ったことから、ハーディ・ワインバーグ平衡下になく、ホモ接合体が多いことが示唆された。また、近交係数の値が 0 に近い場合、個体群内で自由交配が行われていることを示している。しかし表 1 から、近交係数の平均値が 0.103 であることから、近親交配が行われていることが考えられる。八ヶ岳に自生する 1 集

表 1. チチブイワザクラ 20 個体における 4 遺伝子座の解析結果

遺伝子座	Na	Ho	He	Fis
ga0344	2	0.700	0.466	-0.499
ga0668	2	0.350	0.480	0.272
ga0691	4	0.300	0.598	0.498
ga0948	2	0.400	0.466	0.142
平均値	2.5	0.437	0.503	0.103

団のサクラソウ 16~24 個体を対象とした同一の遺伝子座による解析では、近交係数の平均値は 0.24 であったことから、サクラソウがチチブイワザクラに比べ近親交配の頻度が高いといえる。しかし、サクラソウでは緯度や集団サイズによって近交係数が大きく変動することが知られている⁵⁾。従って、チチブイワザクラは八ヶ岳に自生するサクラソウに比べて自由交配が行われていると断言出来ない。

サクラソウは、長花柱花の一部では自殖を行うことも知られている。しかし自殖個体は近交弱勢の影響を強く受け、他殖個体に比べて生長が悪く生存率が低いことが報告されている⁵⁾。チチブイワザクラ個体群では、他の個体に比べて早く地上部を枯らした個体が 1 割程度確認されており（8 月）、6 月に結実が確認された 11 個体は 8 月には 9 個体減少し、正常な種子生産が行われていなかった。また、結実が確認された個体は全て長花柱花であった。以上のことからサクラソウと同様に、チチブイワザクラにおいても自殖あるいは遺伝的に近縁な個体間での交配が行われた結果、近交弱勢による影響が表れていると推測される。従って、今後より多くの遺伝子座を用いて全個体の SSR 解析を行い、詳細な遺伝的多様性の解析を進める必要がある。また、チチブイワザクラの適切な保全のために、結実率や開花率、生長速度などの生態学的な観察を行うことが期待される。

5. 参考文献

- 1) 大沢良, 津村義彦, 生井兵治, 鷲谷いづみ, 田嶋が原サクラソウ野生集団のアイソザイム変異. 育種雑誌 41 : 331-339, 1991.
- 2) 高倉耕一. 改良ガラス濾紙法による植物 DNA の抽出, Bunrui 11 (2) : 139-149, 2011.
- 3) 環境省, 第四次レッドリスト, 2012.
- 4) 北本 尚子, 上野 真義, 津村 義彦, 鷲谷 いづみ, 大澤 良. 絶滅危惧植物サクラソウ (*Primula sieboldii*) におけるマイクロサテライトマーカーの開発, 保全生態学研究 10 : 47-51, 2005.
- 5) 鷲谷いづみ. サクラソウの分子生態学, 東京大学出版, 東京, 2006.
- 6) Shimono, A., Ueno, S., Tsumura, Y. and Washitani, I., Characterization of microsatellite loci in (*Primula modesta*) Bisset et Moore (Primulaceae). Molecular Ecology Notes, 4 : 560-562, 2004.
- 7) Ueno, S., Tsumura, Y. and Washitani, I. Development of microsatellite markers in *Primula sieboldii* E. Morren, a threatened Japanese perennial herb. Conservation Genetics 4 : 809-811, 2003.
- 8) Ueno, S., Kitamoto, N., Ohsawa, R., Tsumura, Y. and Washitani, I. Nine additional microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Morren. Conservation Genetics, 6 : 1063-1064, 2006.
- 9) Ueno, S., Yoshida, Y., Taguchi, Y., Honjo, M., Kitamoto, M., Washitani, I., Ohsawa, R. and Tsumura, Y., Development of 120 microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Moren for linkage mapping. Conservation Genetics, 10 : 1945-1952, 2009.
- 10) Washitani, I., Osawa, R., Namai, H., Niwa, M., Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. Journal of Ecology, 82 : 571-579, 1994.