

中国内陸乾燥地に自生する白刺 (*Nitraria*) 属の
クローン構造解析および形態的特徴

1181904 稲川崇史

主査：金澤昭彦 教授、副査：黒岩崇 准教授、江場宏美 准教授

Analysis of Clonal structure and Morphological characters of genus *Nitraria*
which grow in inner dry land of China

No.1181904 Takashi Inagawa

1.背景・目的

近年、世界各地で沙漠化が進行している。沙漠化とは、国際連合の砂漠化対処条約により「乾燥、半乾燥地および乾燥亜湿潤地域における種々の要因による土地の劣化」と定義される現象である。沙漠化により、その土地は生産力や生物多様性などを損なう。中でも中国の沙漠化は著しく、2005 年に行われた調査によれば、約 174 万 km²、国土の約 18%が沙漠化していると言われている⁵⁾。

そのため、沙漠化した土地を修復しようと緑化活動が行われている。緑化には、土地との相性などの観点から在来種を用いることが適切とされる。中国内陸乾燥地に自生する在来種である白刺 (*Nitraria*) 属は劣化した土地で先駆種となり¹⁾、風砂に物理的に抵抗性がある²⁾。地を這うように成長する途上で砂を捕捉しマウンド (小砂丘) を形成し、砂を固定する¹⁾など緑化植物としての利用が見込まれている。しかし、基礎的な情報が不足しており、緑化植物として利用する際

に様々な判断を行うための情報が少ないのが現状である。例えば、マウンドの形成過程が明らかとなっていない。そこで、不明確な部分の多いマウンドの形成過程を明らかにすることで、播種や植樹を行う際に重要な情報を得られると考えられる。また、白刺属は種内の形態が多型性に富んでいることが知られている²⁾。そのため、形態的な特徴を把握し、DNA 多型との関連性を探る事により緑化に用いる際に有益な情報を収集できると考えられる。更に、白刺属の中でも *N.sibirica* は、染色体数が $2n=24, 60$ の 2 つのタイプがあるとの報告もあり¹³⁾、種間交雑を起こしている可能性が示されている。従って、形態的特徴に合わせて、交雑の有無などについても調査しておくことは重要であると考えられる。

そこで、本研究では白刺属のクローン構造解析を行い、マウンドの形成過程を推測することと、



図 1.沙漠化した元草原地



図 2.白刺属のマウンド

形態的特徴と DNA 多型に関連があるのか否かを検討すること、調査地の白刺属の種判別と交雑の有無を含めた現状の把握を行うことで白刺属の基礎的な情報を収集することを目的とした。

2.材料・方法

2-1.調査地概要

調査地は中国内蒙古自治区阿拉善盟にある騰格里沙漠の東縁である。阿拉善盟は年平均降水量 110-180mm、年平均気温 7.8℃の乾燥気候である。騰格里沙漠は総面積 4 万 2 千 km² で年 20-200m の速度で拡大している¹⁶⁾。

調査は沙漠化し、NPO 法人世界の砂漠を緑で包む会により緑化活動が行われている JICA 教育センター（北緯 38 度 36 分、東経 105 度 36 分）を中心に約 20km 圏内で行った。

2-2.材料

調査対象地に自生する白刺属のマウンドを対象とした。1 地点 6 マウンドから、葉のついた 10cm 程度の枝を計 24 本採取し、実験に用いるまでシリカゲルとともに密閉したビニール袋の中に入れ乾燥状態で保存した。また、6 地点から 1 地点 7-10 マウンド、計 52 マウンドから葉を各 10 枚、計 520 枚採取した。更に、同 52 マウンドから葉のついた約 10cm の枝を 1 本採取し、実験に用いるまでシリカゲルとともに密閉したビニール袋の中に入れ乾燥状態で保存した。

2-3.方法

2-3-1.クローン構造解析

コンパスを用いて一辺 50m の正方形のコドラートを設置した。コドラート内のマウンドの長辺、短辺の長さをメジャーで、高さをコンパスと 5m のスタッフを用いて測定した。測定値からマウンドのサイズ分けを行い、コドラートの中から小、中、各 3 マウンドを選定した。選定したマウンドから、図 4 の様にサンプルを採取した。

サンプルから改良ガラス濾紙法¹¹⁾を用いて DNA の抽出を行い、表 1 に示したプライマー OPA15、OPA16 (オペロン) を用いて RAPD 法¹⁵⁾を行うことで DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を電気泳動により検出し、全断片を比較することでクローン構造解析を行った。

2-3-2.形態的特徴の把握

サンプルを採取した 52 マウンドの葉の色を白、白緑、緑、黄緑の 4 色とその他に分け、記録した。また、デジタルノギスを用いて葉の厚みと図 5 の測定箇所の測定を行った。測定した値を

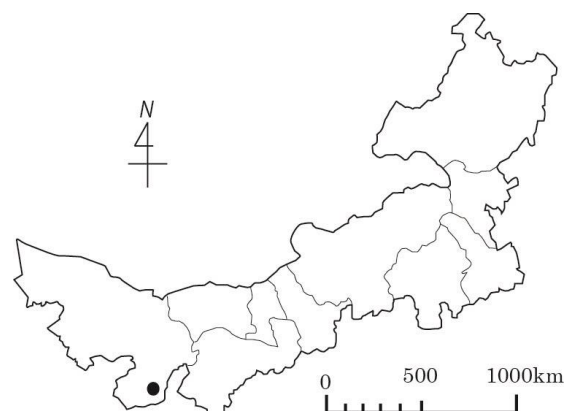


図 3. 内モンゴ地図

黒丸は調査地を表す。



図 4. サンプル採取地点
(左から中、小)

表 1. RAPD 法に使用したプライマー

プライマー名	5'-3'
OPA7	GAA ACG GGT G
OPA14	TCT GTG CTG G
OPA15	TTC CGA ACC C
OPA16	AGC CAG CGA A

用いて葉形指数 (Leaf Index、LI) と、C と A の比を求めた。それら 5 変数と Excel 2010 (Microsoft) を用いて地点毎に全ての葉に対して主成分分析を行った。また、マウンド毎に測定値の平均値をとり、同様に主成分分析を行い、地点毎、葉の色毎にまとめた。

2-3-3.DNA 多型の把握

2-3-2 で用いたマウンドと同一のマウンドから採取した葉を用いて改良ガラス濾紙法¹¹⁾により DNA を抽出した。表 1 に示したプライマー OPA7、OPA14 (オペロン) を用いて RAPD 法¹⁵⁾を行い、DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を電気泳動により検出し、検出されたバンドを有、無の 2 パターンに分けてバイナリデータ化し、Excel 2010 (Microsoft) を用いて主成分分析を行った。

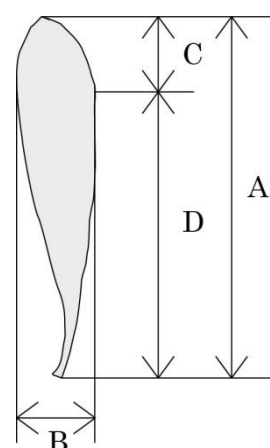


図 5.葉の測定箇所

2-3-4.種判別

2-3-2 で抽出した DNA サンプルの一部を用いて種判別を行った。PCR 法により葉緑体 DNA の trnL-trnF (trnLF) 領域 15 サンプルと核 DNA の ITS 領域 9 サンプルを増幅した。この時利用したプライマーを表 2 に示す。

PCR 産物をラベリングし、ダイレクトシーケンスを行うことで塩基配列を得た。得られた塩基配列は Bioedit v. 7.0.9.0 (Tom Hall, 2007) を用いて整えた。整えた塩基配列を張勇³⁾により行われ、ジ

表 2.ダイレクトシーケンスに用いたプライマー^{9) 14)}

領域	プライマー名	5'-3'
trnLF	trnLe	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC
	trnLf	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

ーンバンク (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に登録されている *Nitraria* 属 5 種 (*N.tangutorum*, *N.sibirica*, *N.praevisa*, *N.roborowskii*, *N.sphaerocarpa*) の塩基配列と合わせてアライメントした。trnLF 領域はアライメントしたデータを用いて塩基配列の置換箇所を比較した。また、ITS 領域はアライメントしたデータと PAUP v. 4.0b10 (David L Swofford, 2001) を用いてブートストラップ 1000 回で最節約系統樹を作成し、厳密合意樹を作成した。

3.結果

3-1.クローン構造解析

クローン構造解析の一例として中サイズマウンドの電気泳動写真を図 6 に示す。図 6 の様に小 3 マウンド、中 3 マウンドの解析を行った結果、全てのサンプルで別のバンドパターンが検出された。このことから、今回解析したマウンドサイズ小、中のマウ

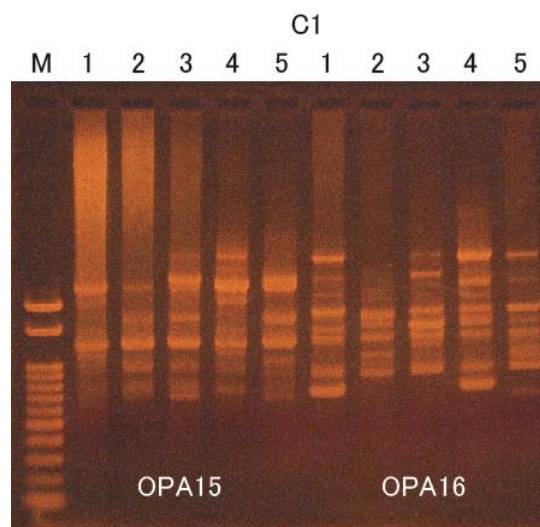


図 6.中サイズのクローン構造解析結果

ンドは全て複数個体で形成されていることが明らかとなった。

3-2.形態的特徴

各地点の葉全てに対して主成分分析を行った結果の一例として、地点4の第一、第二主成分の負荷量と寄与率を表3に、第一、第二主成分得点散布図を図7に示す。

表3.地点4の第一、第二主成分の負荷量と寄与率

主成分	主成分負荷量					寄与率
	全長	全幅	厚さ	LI	全長/先端	
第一	0.96	0.77	-0.22	0.71	0.74	0.52
第二	0.16	0.52	0.86	-0.47	-0.04	0.25

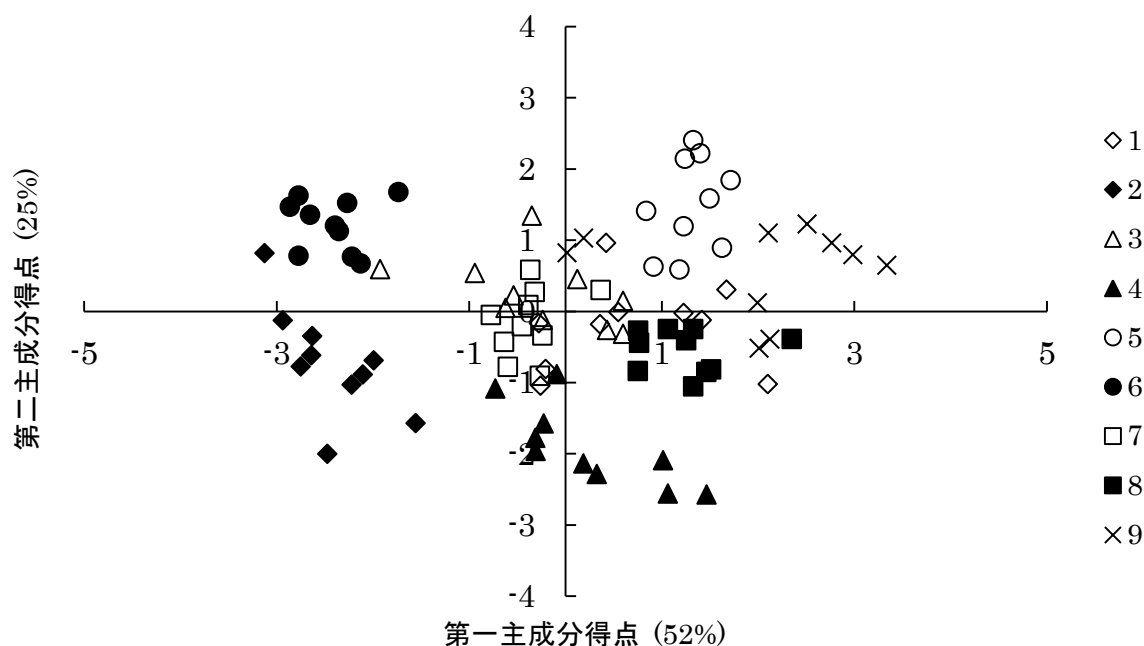


図7.地点4で採取した葉の形態について主成分分析を行った際の第一、第二主成分得点散布図

図7の様に地点1から地点6まで解析を行った結果、各葉は採取したマウンド毎にまとまりが認められた。

マウンド毎に葉の測定値を平均して主成分分析を行った際の主成分負荷量と寄与率を表4に示す。また、第一、第二主成分得点を用いて作成した散布図を図8に示す。図8より、地点や葉の色毎に葉の形態のまとまりは認められなかった。

表4.マウンド毎の第一、第二主成分の負荷量と寄与率

主成分	主成分負荷量					寄与率
	長さ	全幅	厚さ	LI	全長/先端	
第一	0.86	0.34	-0.62	0.65	0.69	0.42
第二	0.35	0.94	0.19	-0.61	-0.15	0.29

3-3.DNA 多型

OPA7プライマー、OPA14プライマーにより得られた16バンドをバイナリデータ化した。16バンド中15のバンドで多型が検出された(約94%)。バイナリデータを用いて主成分分析を行った際の第一、第二主成分の負荷量と寄与率を表5に、第一、第二主成分得点を用いた散布図を図9に示す。図9より、DNA多型と、採取地点、葉の色に関連はないことが明らかとなった。

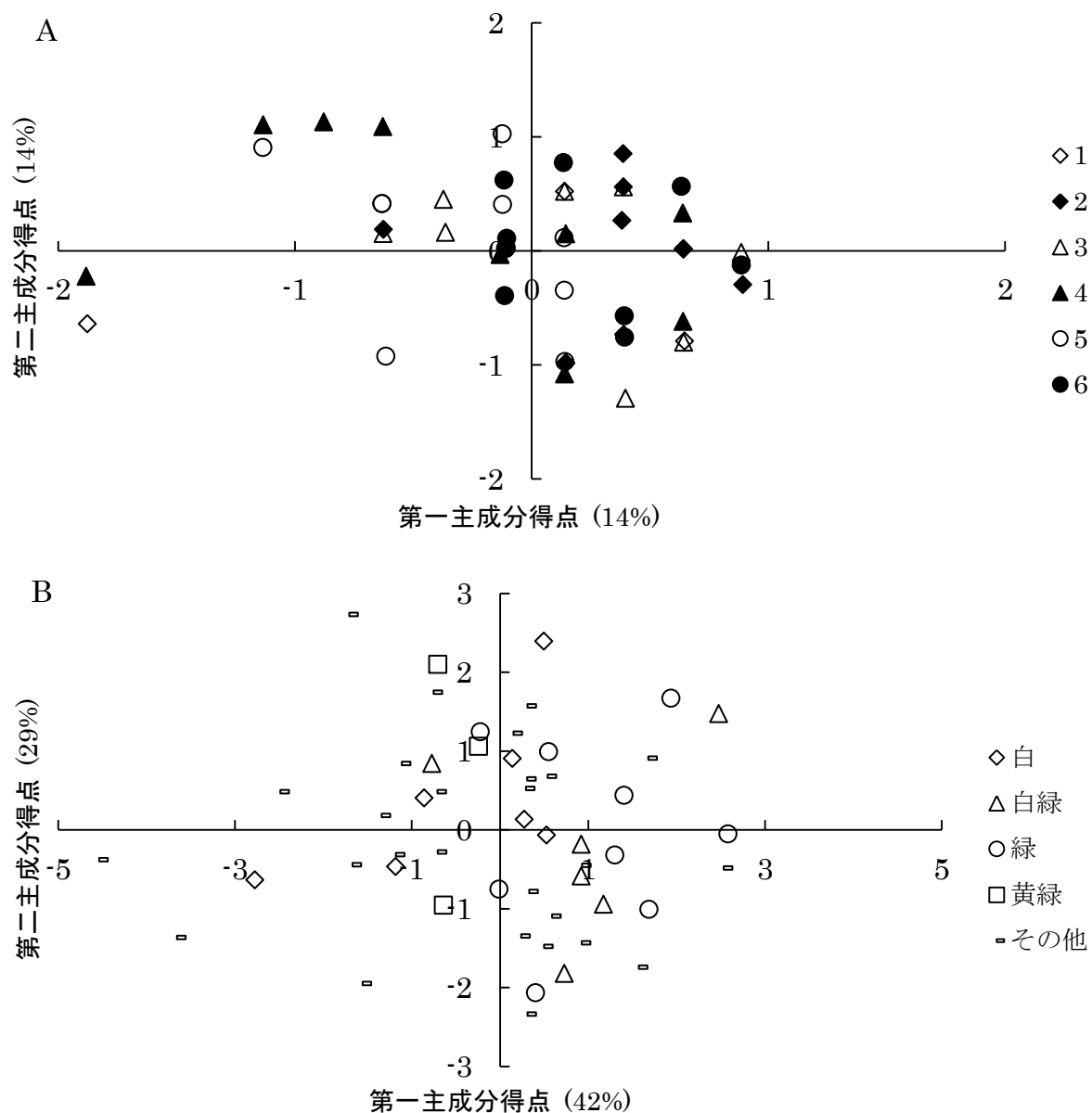


図 8.マウンド毎の葉の形態について主成分分析を行った際の第一、第二主成分得点散布図

A：採取地点別。記号が同じものは採取地点が同一であることを示す。

B：葉の色別。記号が同じものは葉の色が同一であることを示す。ただし、その他は主要な白、白緑、緑、黄緑以外の全ての色を含む。

表 5.DNA 多型について主成分分析を行った際の第一、第二主成分の負荷量と寄与率

主成分	主成分負荷量																	寄与率
	OPA7 バンドサイズ							OPA14 バンドサイズ										
	480	700	850	1250	1700	1900	2500	550	800	1000	1100	1300	1500	1900	2500	3000	4000	
第一	0.00	0.16	0.15	0.15	0.16	0.16	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.14
第二	0.05	0.02	0.06	0.04	-0.35	-0.08	0.03	-0.06	-0.09	-0.16	0.32	0.05	0.33	0.08	0.02	-0.03	-0.15	0.14

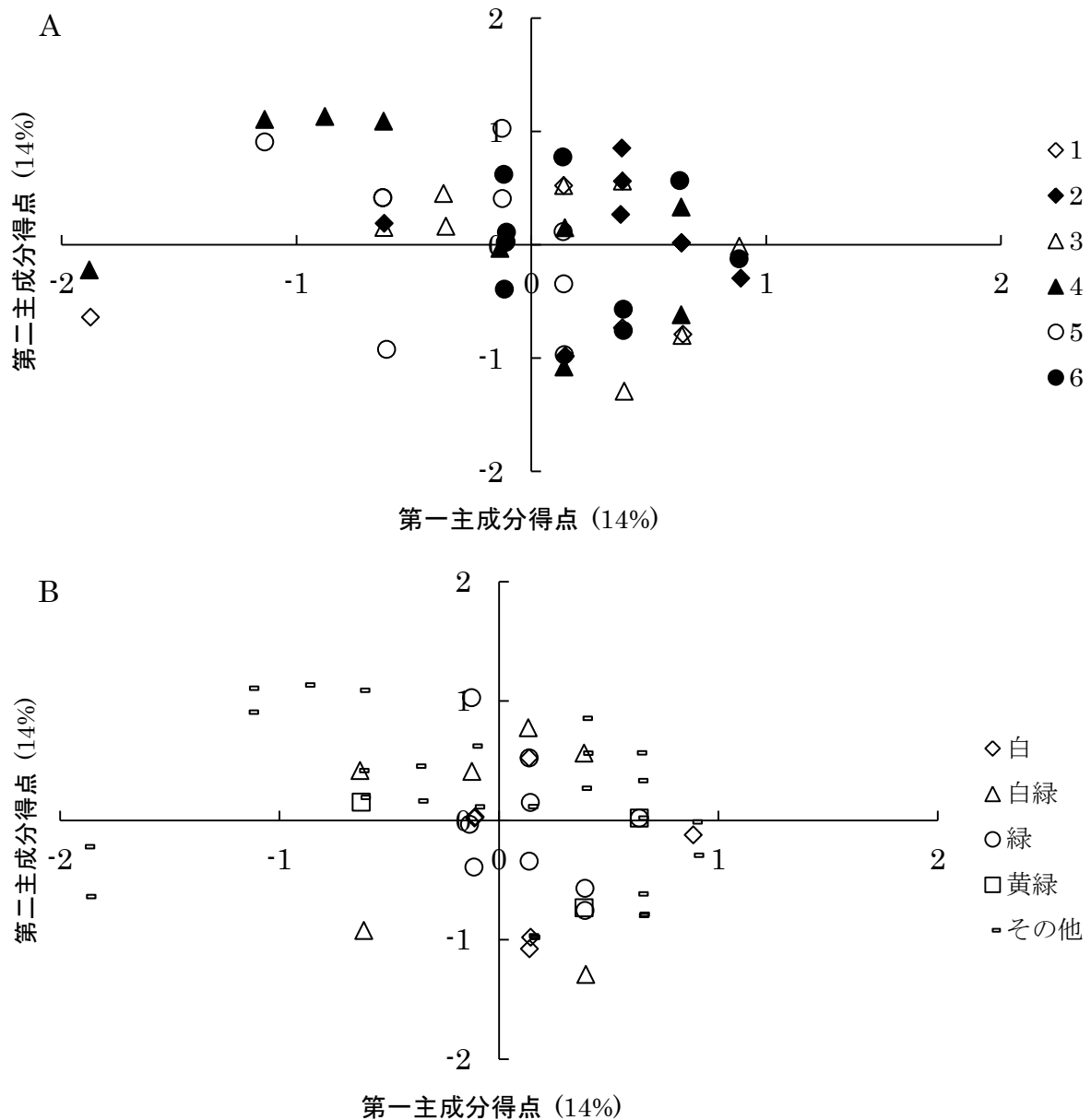


図 9.DNA 多型について主成分分析を行った際の第一、第二主成分得点散布図

A：採取地点別。記号が同じものは採取地点が同一であることを示す。

B：葉の色別。記号が同じものは葉の色が同一であることを示す。ただし、その他は主要な白、白緑、緑、黄緑以外の全ての色を含む。

3-4.種判別

サンプルの *trnLF* 領域の塩基配列と *gene bank* に登録されている白刺属 5 種の塩基配列を比較し、塩基置換の箇所を示したものを表 6 に示す。表 6 より、サンプルの *trnLF* 領域の塩基配列は *N.praevisa* と *N.sphaerocarpa* の *trnLF* 領域の塩基配列と完全に一致した。白刺属 5 種とサンプルの ITS 領域を用いた最節約系統樹の厳密合意樹を図 10 に示す。なお、ITS 領域は 2 つの塩基配列が認められたため、サンプルが 2 つ含まれている。図 10 より、サンプルは *N.tangutorum*、*N.praevisa*、*N.roborowskii* と 100% の確率で同クレードに属するという事が明らかとなった。

表 6. *Nitraria* 属 5 種とサンプルの trnLF 領域の塩基配列の塩基置換の場所

解析対象	塩基置換の場所												
	37	49	66	87	100	116	127	138	146	161	181	338	342
<i>N.tangutorum</i>	T	-	-	-	-	-	-	A	-	-	T	G	A
<i>N.sibirica</i>	-	-	T	-	C	T	C	G	G	A	-	A	T
<i>N.praevisa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T
<i>N.roborowskii</i>	-	T	-	T	C	T	-	-	-	-	T	A	T
<i>N.sphaerocarpa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T
sample	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	T

また、ITS 領域には判別不可能な塩基が複数個含まれていた。ITS 領域の判別不可能だった塩基の位置をサンプル 2 つの塩基配列と、同クレードに属した *N.tangutorum*、*N.praevisa*、*N.roborowskii* のみで表 7 にまとめた。判別不可能だった塩基の状態を図 11 に示す。図 11 の様に、判別不可能だった塩基は同領域同箇所二つの塩基が検出された。

表 7. ITS 領域のサンプルの判別不可能塩基箇所

解析対象	判別不可能塩基箇所					
	143	148	346	350	384	408
<i>N.tangutorum</i>	C	C	A	C	C	G
<i>N.roborowskii</i>	T	T	G	T	T	A
<i>N.praevisa</i>	C	T	G	T	T	A
sampleA	Y	Y	R	Y	Y	R
sampleB	Y	Y	R	Y	Y	A

Y: T or C R: A or G

4. 考察

4-1. クローン構造解析

一つのマウンドは複数個体で形成することが可能であることが明らかとなった（図 12）。更に、マウンドサイズ小のマウンドも複数個体で形成されていることから、実生同士が密に存在していても生育できる可能性が示唆された。

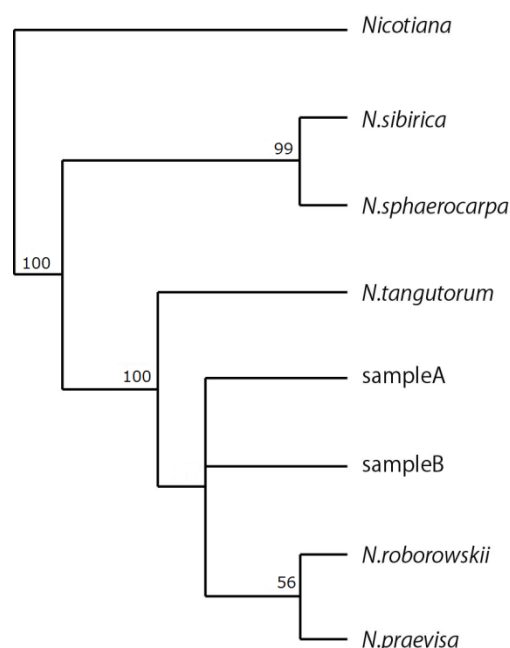


図 10. ITS 領域を用いた厳密合意樹。
図内の数値は各枝の支持率を表す

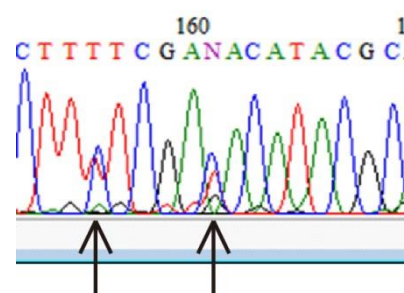


図 11. 判別不可能塩基の状態

4-2.形態的特徴

地点毎に葉の形態を主成分分析で分類したところ、マウンド内で葉の形態に変異は少ないことが明らかとなった。マウンド内で葉の形態に変異が少ないことは、1個体でマウンドを形成している個体が多く存在している可能性を示唆している。あるいは、マウンドは複数個体で形成されているものの環境に合わせて各個体の葉の形態がある程度変化している可能性が考えられる。すなわち、葉の形態に可塑性がある可能性が考えられる。

マウンド内の葉の形態を平均し、採取地点や葉の色と比較してみたところ、関連性はなかった。葉の形態は非常に多様性に富んでいるが、その形態が採取地点に依らないという事は採取地点同士が送粉距離や種子散布距離より近く、調査範囲では遺伝子流動が十分に起こっていることが示唆される。また、環境要因によって葉の形態をある程度変化させることができる特性を保持している可能性が示唆される。また、葉の色と関連性がないことは葉の形態と色は連動して変化するものではなく、片方は固定化されているあるいは双方ともに変化し、変化の要因が異なることを示唆していると考えられる。

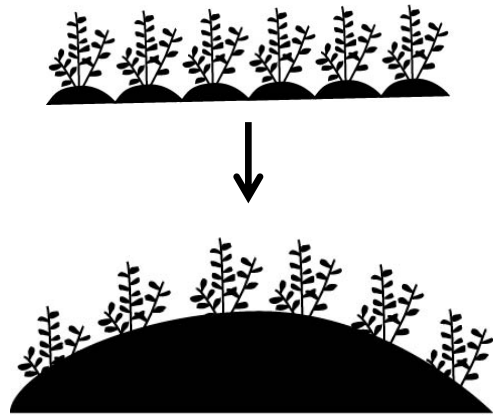


図 12.マウンドの形成過程模式図
(河合⁴⁾を参考に作図)

4-3.DNA 多型

DNA 多型は採取地点、葉の色と関連性がないことが明らかとなった。採取地点と DNA 多型に関連性がないことは採取地点同士が孤立しておらず十分に遺伝子流動が起こっている可能性を示唆している。また、葉の色と関連性がないことは遺伝的距離に関わらず葉の色は変動することを示しており、葉の色は遺伝的に強く固定化されているものではない可能性を示唆している。

4-4.種判別

ITS 領域同箇所にも 2 つの塩基が検出され判別が不可能だったのは、サンプルの祖先が種間交雑を起こしていた可能性を示している。葉緑体 DNA の一部である trnLF 領域が *N.praevis* と *N.sphaerocarpa* と完全に一致したことから、種子親はこの 2 種のいずれかであることが明らかとなった。図 10 から *N.tangutorum*、*N.praevis*、*N.roborowskii* の 3 種と 100% の確率で同クレードに入ったこと、潘ら (2003) により、*N.tangutorum*、*N.praevis*、*N.roborowskii* は染色体数が $2n=48$ で、*N.sphaerocarpa* は $2n=24$ であり核型が異なることが示されていることから種子親は *N.praevis* であると考えられる。以上のような種判別の結果から *N.praevis* と *N.tangutorum*、*N.roborowskii* のどちらか、あるいは両方が複数回交雑した子孫が調査地には繁栄している可能性が示された。また、*N.praevis* と *N.tangutorum*、*N.roborowskii* の生息地を図 13 に示す。図 13 より、調査地はちょうど生息域が重なる場所であり、交雑を起こしやすい場所であることが考えられる。また、本研究の結果は白刺属が種間交雑をおこしやすいグループである可能性を示唆している。種間交雑をおこしやすいということは、生物科学的種概念では中国に自生する白刺属は種レベルの分化をおこしているわけではなく、変種・亜種レベルの分化である可能性が考えられる。変種・亜種レベルの分化であるために、形態が連続的に変化している可能性も考えられる。

5.総合考察

クローン構造解析の結果から密な播種、植樹が可能である可能性が示唆された。灌木は砂の移動が始まっているところの緑化に良いとされる⁶⁾。そのため、灌木である白刺属は緑化の最前線、流動砂丘付近に配置する形で緑化活動に利用できるだろう。最前線で密に列状に播種、植樹することで砂の固定化に寄与でき、緑化に利用できると思われる。更に、密に生育させることで背後の防風・防砂林帯に与える風砂の影響を抑え、防風・防砂林の個体数抑制して水利用を抑えることも期待される。

調査を行った白刺属の植物は過去に種間交雑を起こした個体の子孫であることが明らかとなった。このことから遺伝的多様性も高くなっている可能性が示唆される。ト

ウガラシ (*Capsicum*) 属内の品種に対する解析において、Paran ら⁸⁾は1種34系統でRAPD法による解析を行った結果、検出バンド中多型を有するバンドの割合は22%であったと報告している。更にタマネギ (*Allium cepa*) を用いたRAPD法による22品種同定の研究においても、88本の増幅バンド中35本のみ(約40%)が多型を有していたとの報告もある¹²⁾。今回の調査を行った白刺属は、16バンド中15バンド(約94%)で多型が検出されている。これは、白刺属は品種分けされている種よりも遺伝的多様性が高い可能性を示唆している。このことから、交雑による遺伝子交流に起因する遺伝的多様性の高さを有している可能性が考えられる。遺伝的多様性の高さにより、葉の形態も多様になっている可能性も考えられ、それら多様性の高さがあるが故にDNA多型と葉の形態に関連性が認められなくなっている可能性も示唆される。



図 13. *Nitraria* 属 3 種の中国における分布域
白丸は調査地を表す。

6.今後の展望

白刺属は種間交雑を起こすことが明らかとなったため、交雑が地域毎にどの程度生じているのかなど分類の再検討を含めて詳細に検証する必要がある。

緑化植物として集めておくべき情報としては、可塑性の有無がある。形態が多様であることは明確になっており、特に葉の形態はマウンド間で変異が生じている。このような葉の形態の多様性の高さが可塑性によるものなのか、世代間で形態が容易に変わることによるものなのかを調査しておく必要はあるだろう。それにより、播種、植樹前の処理が変わってくると考えられる。また、白刺属を緑化植物として利用する際には緑化地域の最前列、流動砂丘近くに列状などにして配置することが望ましい。そのため、どの程度の飛砂や埋没に耐えうるのか、年成長量などの調査が必要不可欠になると考えられる。その他、密に播種・植樹した際に生じる白刺属への影響を検証

するために粗に白刺属がいる場所、密に白刺属がいる場所の実生を採取し、成長量の差異を検証するなどの調査も必要であると考えられる。

5.引用・参考文献

- [1]中国科学院蘭州砂漠研究所 2002 「中国砂漠・沙地植物図鑑 木本編」東方書店 東京
- [2]中国科学院中国植物誌編集委員会 1998 「中国植物誌 第四十三卷 第一分冊」 科学出版社 北京
- [3]张勇 2006 白刺属植物分子系统学及遗传多样性研究 兰州大学博士論文
- [4]河合絢子 2009 中国内陸乾燥地に生育する灌木（白刺：*Nitraria tangutorum*）の生育特性と流砂固定効果について 武蔵工業大学卒業論文
- [5]刘拓・张克斌・林琮 2006 「中国土地沙漠化防治策略」 中国林业出版社 北京
- [6]太田誠一 2007 中国における緑化活動 15 年の実績と問題点 日本緑化工学会誌 32(4) 480-483
- [7]潘晓云、魏小平、尉秋实、陈家宽、王根轩 2003 多倍化-白刺属的系统分类、进化特征及应用前景 植物学通报 20(5):632-638
- [8]Paran, I., E. Aftergoot and C. Shifriss. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*. 99:167-173.
- [9]Pierre Taberlet, Ludovice Gielly, Guy Pautou and Jean Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17:1105-1109.
- [10]索有瑞 2010 「柴达木盆地白刺研究与开发」 科学出版社 北京
- [11]高倉耕一 2011 改良ガラス濾紙法による植物 DNA の抽出 日本植物分類学会誌 11(2): 139-149
- [12]Tsuyoshi Tanikawa, Masatoshi Takagi, Masahiko Ichii. 2002. Cultivar Identification and Genetic Diversity in Onion (*Allium cepa* L.) as Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. 園芸学会雑誌 71(2):249-251
- [13]内蒙古植物誌編集委員会 1989 「内蒙古植物誌 第三卷 第二版」 内蒙古人民出版社
- [14]WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE, and J. TAYLOR. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. Pp. 315.322 in PCR protocols: A guide to methods and applications, eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White. San Diego, California: Academic Press.
- [15]Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Lival, J. A. Rafalski & S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.
- [16]吉川賢・山中典和・吉崎真司・三木直子 2011 「風に追われ水が蝕む中国の大地 -緑の再生に向けた取り組み-」 共立出版 東京