

別寒辺牛湿原に自生するトキソウの遺伝的多様性の評価

京都教育大学

赤尾奈緒子・南山泰宏

はじめに

日本に自生するラン科植物のうち約 74%が環境省レッドリストのカテゴリーの絶滅 (EX) から準絶滅危惧 (NT) に該当しており、他科と比較して絶滅に瀕した種を多く含んでいる。本研究で研究対象としたラン科のトキソウ属は、東アジアに分布する *Pogonia japonica* Rchb. f., *P. minor* (Makino) Makino および *P. yunnanensis* Finet と、北東アメリカに分布する *P. ophioglossoides* (L.) Ker Gawl の 4 種からなる (Takahashi, 2015)。日本には *P. japonica* (トキソウ) と *P. minor* (ヤマトキソウ) の 2 種が分布しており、トキソウは日本各地の日当たりの良い酸性湿地に、ヤマトキソウは山地や丘陵の草地に主に自生している。トキソウは都道府県によっては高いランクの絶滅危惧に指定されているものの、環境省のレッドリストにおいては、2007 年 8 月に行われた維管束植物版レッドリストの見直しにおいて、保全のための努力が払われた結果として、サギソウなどと同様にそれまでの「絶滅危惧Ⅱ類 (VU)」から「準絶滅危惧 (NT)」に絶滅の危険ランクが引き下げられた (環境省, 2007)。

しかし、トキソウは種子繁殖を行う一方で (Matsui *et al.*, 2001), 生育に適した環境下では地下茎による栄養 (クローン) 繁殖により 10 以上のラメットを生産し、数年にわたって開花することが報告されている (Tatarenko and Kondo, 2006)。トキソウのような繁殖様式をもつ植物では、目視により確認できる個体数と集団を構成するジェネットの数が必ずしも相関しないため、自生地の環境変化によりジェネット数が減少していれば、集団内の遺伝的多様性が低下し、絶滅リスクが高くなっている可能性がある (上杉ら, 2009)。したがって、トキソウの絶滅リスクを評価するためには、集団内の遺伝的多様性について正確に把握することが極めて重要である。

本研究では、これまでに開発した SSR マーカーを用いて、別寒辺牛湿原に自生するトキソウ集団内の遺伝的多様性の評価を行い、別に調査を行っている近畿地方の湧水湿地に自生する集団と比較することで、別寒辺牛湿原のトキソウの遺伝的特性を明らかにすることを目的とした。さらに、別寒辺牛湿原に自生するトキソウの生息域外保全を目的として、人工交配等により採種した種子を無菌播種し系統保存を行った。

材料および方法

植物材料

2018 年 7 月中旬に別寒辺牛湿原の第 1 図に示した区域に自生するトキソウの葉 (葉先 3 cm 程度) を約 20m 間隔で採取した。採取した葉は 1 試料ずつチャック式のポリエチレン製の袋に入れ、DNA の抽出を行うまで -85°C に設定した超低温フリーザー (LAB8, (株) 福島工業) で冷凍保存した。

生息域外保全を目的として、葉の採取と合わせて約 100m 間隔で開花個体の人工交配を行い、2018 年 9 月中旬に着果していたさく果の採取を行った。採取にあたっては人工交配を行ったさく果以外に自然受粉により着果したさく果についても採取した。

トキソウの SSR マーカーによる遺伝子型解析

採取した葉を液体窒素で凍結させた後、3,200 rpm で 2 分間、ビーズ粉碎機 (タイテック株式会社) にかけて粉碎し、ISOSPIN Plant DNA (株) ニッポンジーン) を用いて DNA 抽出を行った。抽出した DNA 溶液の濃度は、フルオロメーター (プロメガ株式会社) により測定して、最終濃度が 15 ng/μl になるよう滅菌水で濃度を調整した。

遺伝子型解析には、これまでに研究室で開発した SSR マーカーのうち特に有効性の高い 9 マーカーを使用し、Shimizu and Yano (2011) のポストラベル法により、DNA シーケンサーを用いた蛍光フラグメント解析を行った。解析結果は、フラグメント解析用ソフトウェア Peak Scanner2 (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社) を用いて DNA 断片長を調査した。

SSR データ分析

9 マーカーの平均対立遺伝子数 (A_n)、平均有効対立遺伝子数 (A_e)、ヘテロ接合度の観察値 (H_o) および期待値 (H_e) は、GenAlEx6.5 (Peakall and Smouse, 2012) を用いて算出した。集団間での遺伝的分化の程度を明らかにするため、GenAlEx6.5 を用いて、固定指数 (F_{st}) を算出するとともに、全ジェネットを用いて Nei *et al.* (1983) の遺伝距離に基づく主座標分析を行った。

トキソウ種子の無菌播種

無菌播種用の培地は、基本培地を無機塩類とビタミン類の濃度を 1/2 にした Murashige-Skoog 培地 (以下 1/2MS 培地) とし、ショ糖 $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ を添加後 pH5.8 に調整し、ゲルライト $4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ を添加して沸騰させ、硬質試験管 (直径 14mm, 長さ 105mm) に 10ml ずつ分注し、 121°C で 15 分滅菌した。トキソウのさく果は 70% のエタノールに浸漬して火炎殺菌した後、滅菌シャーレ内で切断し、綿棒を用いて培地上に種子を置床した。無菌播種した試験管は、温度 25°C 、光量子束密度 $35\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (白色蛍光ランプ)、16 時間日長の恒温室内に静置した。

結果および考察

遺伝的多様性の評価

トキソウの調査は、別寒辺牛川とトライベツ川が合流する地点の北側にあるヌマガヤやスゲ類が自生する湿原域 (第 1 図, 第 2 図) で行った。トキソウは、トライベツ川の流れに沿って北東から南西に広がる高層湿原を挟み込むように北側 (以下, 別寒辺牛北集団とする) と南側 (以下, 別寒辺牛南集団とする) に 500m 以上に渡って自生していた (第 1 図)。調査区域に自生するトキソウを広範にわたって採取するために、20m 程度の間隔で 2 列に平行して移動しながら約 20m 毎に葉を採取し、採取場所の位置情報を記録した。

採取した試料のうち、別寒辺牛北集団から 55、別寒辺牛南集団から 41 の計 96 試料から DNA を抽出し、9 種類の SSR マーカーの遺伝子型の解析を行った。その結果、供試した全 96 試料は異なるジェネ

ットとして判別された(第1表)。近畿地方の湧水湿地(以下、湧水湿地とする)の集団では77試料を採取して調査したが、同じ9マーカーの解析によりジェネット数は32となり、遺伝的に類似した試料が多数含まれていた。近畿地方の湧水湿地の調査区域と比較して別寒辺牛湿原ではかなり広範な調査区域からトキソウを採取したこともあり、遺伝的に異なる個体を多く確認することができた。また、トキソウの集団内で検出された9マーカーの対立遺伝子数は、湧水湿地で平均5.556、総計で50であったのに対して、別寒辺牛湿原では平均14.111、総計で127と2倍以上であった。さらに、平均有効対立遺伝子数(Ae)は、湧水湿地の3.426に対して別寒辺牛湿原で6.001、ヘテロ接合度の期待値(He)は、湧水湿地の0.685に対して別寒辺牛湿原では0.792と、遺伝的多様性を示す指標はどちらも別寒辺牛湿原で高い値となった(第1表)。以上のことから、別寒辺牛湿原に自生するトキソウ集団はジェネット数が多く、遺伝的多様性も高いことから、近畿地方の湧水湿地と比較して絶滅リスクは低いと考えられた。

他方、別寒辺牛湿原と近畿地方の湧水湿地に自生するトキソウ集団間での遺伝的な分化の程度を調べるため、2集団の全128ジェネットを用いてNei *et al.* (1983)の遺伝距離に基づく主座標分析を行った(第3図)。その結果、2集団のジェネットはそれぞれクラスターを形成し明瞭に区分された。別寒辺牛湿原と湧水湿地の集団間の固定指数(Fst)も0.105と高い値であったことから、2集団間での遺伝的な分化が明らかとなった。一方で、別寒辺牛湿原の北集団と南集団の間には、トキソウが生息しない高層湿原が約400mの幅で存在し、花粉を媒介とした遺伝子交流が行われる可能性が低いにもかかわらず、2集団の間に遺伝的な分化は認められなかった。ラン科の植物では長距離散布が可能である微細な種子を生産するため、集団間の遺伝的な分化の程度が一般的に低いとの報告もあることから(Stone *et al.*, 2012)、北集団と南集団の間では種子散布により相互に移入があるのかもしれない。また、主座標分析において別寒辺牛湿原のクラスターから大きく外れた4ジェネットが認められた。本調査地の近隣にトキソウが自生するとの報告もあることから、これらのジェネットは種子散布によって調査区域外から移入した可能性も示唆される。

別寒辺牛湿原自生系統の無菌播種

人工交配と自然受粉したそれぞれ10個と6個のさく果(第4図)を用いて無菌播種を行ったところ、4個のさく果から種子が発芽し、プロトコームさらには地下茎へと生長する個体が得られた(第5図)。本研究では近畿地方に自生するトキソウで行っている無菌播種法に基づいて行ったが、播種したさく果数16に対して発芽生育したさく果数は4とその割合が低かった。トキソウの未熟種子を用いた無菌播種では、受粉からさく果採取までの期間によって発芽率が大きく変動し、発芽に適したさく果採取期間が短いことがわかっている。近畿地方のトキソウと北海道のトキソウでは開花時期やさく果の成熟時期が異なることから、本研究で採取したさく果は発芽適期からやや外れていた可能性もある。さく果や種子の観察から、北海道に自生するトキソウの発芽に適したさく果採取時期は、本研究で行った9月中旬よりもやや早い可能性が考えられた。

引用文献

- 1) 環境省. 2007. 哺乳類, 汽水・淡水魚類, 昆虫類, 貝類, 植物 I 及び植物 II のレッドリストの見直しについて. 2007 年 8 月 3 日更新 (最終閲覧日 2019 年 1 月 8 日). <<https://www.env.go.jp/press/8648.html>>.
- 2) Matsui, K., T. Ushimaru and N. Fujita. 2001. Pollinator limitation in a deceptive orchid, *Pogonia japonica*, on a floating peat mat. *Plant Species Biology*. 16: 231-235.
- 3) Nei, M., F. Tajima and Y. Tateno. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of molecular evolution*. 19: 153-170.
- 4) Peakall R. and P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- 5) Shimizu, T. and K. Yano. 2011. A post-labeling method for multiplexed and multicolored genotyping analysis of SSR, indel and SNP markers in single tube with bar-coded split tag (BStag). *BMC research notes*, 4: 161-169.
- 6) Stone, J. L., P. A. Crystal, E. E. Devlin, R. L. Downer and D. S. Cameron. 2012. Highest genetic diversity at the northern range limit of the rare orchid *Isotria medeoloides*. *Heredity*. 109: 215-221.
- 7) Takahashi, C. 2015. Micropropagation and genetic relationships among three species of *Pogonia* (Orchidaceae). Ph. D. Thesis. Tokyo University of Agriculture. Tokyo.
- 8) Tatarenko, I. V. and K. Kondo. 2006. Population biology of *Pogonia japonica* in Russia and Japan. *Plant species biology*. 21: 185-192.
- 9) 上杉龍士・西廣淳・鷺谷いづみ. 2009. 日本における絶滅危惧水生植物アサザの個体群の現状と遺伝的多様性. *保全生態学研究*. 14: 13-24.



第1図 別寒辺牛湿原のトキシウ調査区域

青色区域は別寒辺牛北集団，赤色区域は別寒辺牛南集団として採取した
地図には国土地理院の5万分の1地形図を用いた



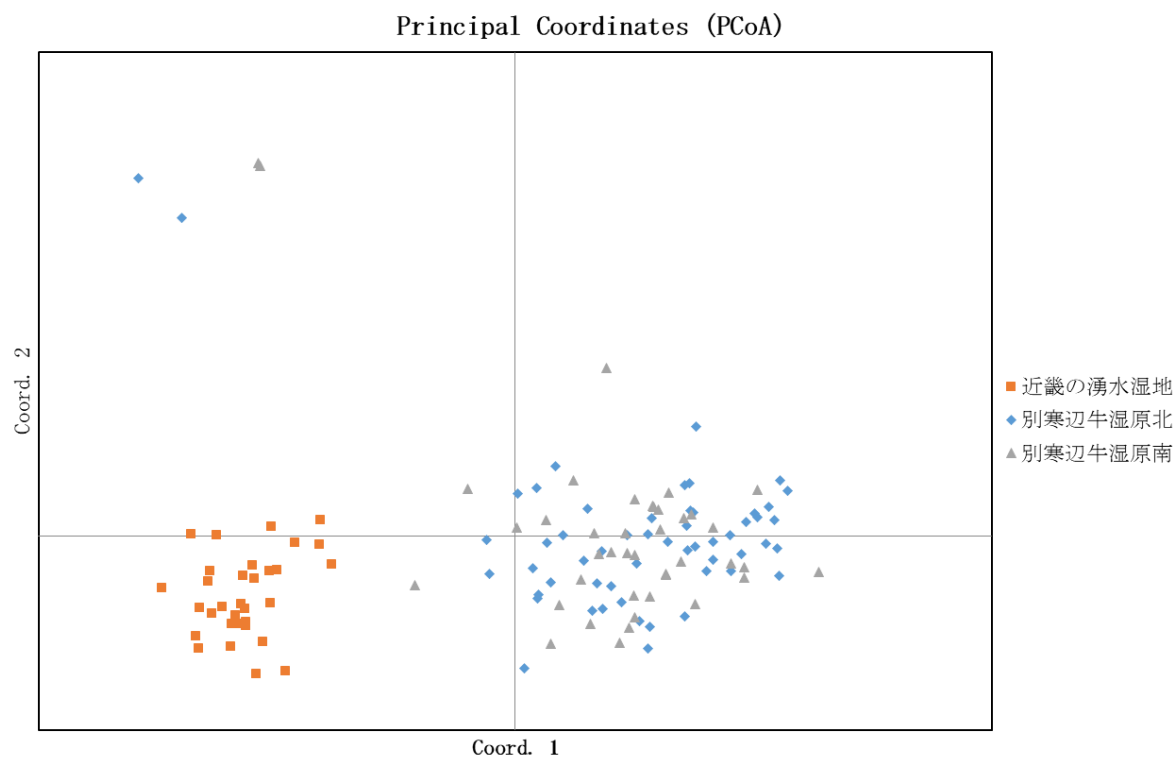
第2図 調査を行った湿原域の様子

上の写真は7月に，下の写真は9月に撮影した

第1表 別寒辺牛湿原と近畿の湧水湿地に自生するトキソウの遺伝的多様性

採取地	N	J	An	Ae	Ho	He
別寒辺牛湿原	96	96	14.111	6.001	0.640	0.792
近畿の湧水湿地	77	32	5.556	3.426	0.712	0.685

N, 採取試料数 ; J, ジェネット数 ; An, 平均対立遺伝子数 ; Ae, 平均有効対立遺伝子数 ;
Ho, ヘテロ接合度観察値 ; He, ヘテロ接合度期待値



第3図 Nei *et al.* (1983)の遺伝距離に基づく主座標分析

第1成分の寄与率は21%, 第2成分の寄与率は10%



第4図 別寒辺牛湿原に自生するトキソウ

写真左：7月に開花しているトキソウ

写真右：9月に結実したトキソウのさく果



第5図 別寒辺牛湿原から採種したトキソウの生長の様子

写真左上：発芽した種子，写真右上：プロトコーム

写真下：プロトコームから生長した地下茎