

【原著論文】

北海道富良野市に隔離分布する

ハクサンシャクナゲ集団の遺伝的多様性と繁殖様式

犬飼 慎也^{*1}・木村 徳志¹・石塚 航²・後藤 晋³

Genetic diversity and reproductive system of *Rhododendron brachycarpum* populations

disjunctly distributed in Furano, Hokkaido, Japan

Shinya Inukai^{*1}, Noriyuki Kimura¹, Wataru Ishizuka², and Susumu Goto³

要旨 : 5つのSSR (simple sequence repeat) マーカーを用いて北海道富良野市に位置する東京大学北海道演習林内に隔離分布するハクサンシャクナゲの小集団の遺伝的多様性と繁殖様式を調べた。富良野集団の遺伝的多様性は集団間で大きな違いがなかったが、既往研究で用いられた集団サイズの大きな八甲田山の集団よりもいずれも小さかった。遺伝的分化度を示す F_{ST} は全体で 0.293 と高く、集団間では有意な分化が認められた。集団内では同一の遺伝子型を持つ個体が近くに分布する現象が見られ、伏条更新の可能性が示唆された。2009年7月に全集団を対象に開花調査を行った結果、91林班集団の2個体のみが開花していた。これらの2個体から種子を採取し、SSRマーカーを用いて発芽した実生について、比例配分法を用いて父性解析を行った結果、発芽した実生全体の約8割が自殖であると推定された。

キーワード : 遺伝的多様性、ハクサンシャクナゲ、父性解析、 F_{ST} 、SSR

Abstract: We used five simple sequence repeats (SSR) markers to investigate genetic diversity and reproductive system in small populations of *Rhododendron brachycarpum* disjunctly distributed in the University of Tokyo Hokkaido Forest in Furano, Hokkaido. Levels of genetic diversity were lower for the Furano populations than for the large population in Mt. Hakkoda used in the previous study. Overall F_{ST} among all the populations was 0.293 and the populations are significantly differentiated. We found that several individuals with identical genotypes were closely distributed. This finding suggests that this species can be recruited by layering. When we surveyed flowering of the Furano populations in July 2009, only two individuals flowered in the 91 compartment population. As the result of the paternity analysis based on fractional paternity assignment for germinated seedlings derived from the two individuals, we estimated approximately 80% of all the seedlings were generated by self-fertilization.

Keywords: genetic diversity, *Rhododendron brachycarpum*, paternity analysis, F_{ST} , SSR

* E-mail: inukai@uf.a.u-tokyo.ac.jp

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科附属北海道演習林 The University of Tokyo Hokkaido Forest, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 9-61, Higashi-machi, Yamabe, Furano, Hokkaido 079-1563, Japan

² 東京大学大学院総合文化研究科 Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

³ 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林教育研究センター Education and Research Center, The University of Tokyo Forest, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

2012年12月20日受付、2013年8月27日受理

はじめに

ツツジ科ツツジ属の常緑低木ハクサンシャクナゲ (*Rhododendron brachycarpum*) は、北海道、本州中部以北と四国の亜高山帯、朝鮮半島に分布する (佐藤 2006)。花は乳白色から淡紅色で美しく、葉も色つやが良く、観賞用として庭木などに使われる。本種は挿し木増殖が困難な上に、実生増殖にも時間がかかる。さらに生育地が特別保護地域など入手困難な場所にあることも多く、大規模な盗採事件が起きたこともある (山口 2009)。本種は、北海道富良野市の森林内では表土が薄く基岩が露出したような立地に、小集団で隔離分布することが多い。このような集団では、繁殖可能な個体が少なく、他の集団との遺伝子交流が少ないため、集団内の遺伝的多様性が低下し、集団間の遺伝的分化が進んでいる可能性がある (Hamrick et al. 1992)。

また本種は、伏条更新を行う可能性もあり、一定の個体数があるように見えても、それらが遺伝的に同一なジェネットである可能性もある。したがって、本種の隔離小集団を保全するには、ジェネット数の把握、集団内の遺伝的多様性、繁殖実態の解明が必要だと考えられる。

ハクサンシャクナゲと同じツツジ属のホンシャクナゲ (*R. metternichii* var. *hondoense*) では、多様性の高い SSR マーカーが作製され、遺伝的構造、遺伝子流動パターンの解明などが行われている (Kameyama et al. 2001)。これらの SSR マーカーの一部はハクサンシャクナゲにも有効であり、青森県八甲田山では天然集団内の個体間近縁度が推定されている (Hirao 2010)。

本研究では、SSR (simple sequence repeat) マーカーを用いて、北海道富良野市に隔離分布しているハクサンシャクナゲの小集団を対象に、集団内の遺伝子型の数と遺伝的多様性、集団間の遺伝的分化度を求めた。次に、2009年に開花した2個体から種子を採取し、発芽実生の父性解析を行い、ハクサンシャクナゲの繁殖様式と花粉散布パターンを調べた。

調査地と方法

調査地とサンプリング

本研究では、北海道富良野市に位置する東京大学大学院農学生命科学研究科附属北海道演習林 (以下、演習林) 内で確認されたハクサンシャクナゲの4集団を調査地と

した (図-1)。演習林内で本種がある程度まとまって分布しているのはこれらの4箇所、その他はほぼ単木状に分布している。4林班では、約10×10mの範囲に高さ1.3m以上の幹が20本程度認められたが、明らかに同じ株ではない8個体を選定した。なお、本研究では、このように明らかに同じ株でないことが確認できた幹を個体と称することとする。15林班では30本程度の幹が認められたが、その中から同様に20個体を選定した。31林班では、100本程度の幹が生育していたが、その中から同様に明らかに同じ株の幹を除いて19個体を選定した。広範囲だが個体数の少ない91林班では、発見された16個体全てを選定した。上記の4集団、合計63個体の位置座標は、GPS受信機 (Thares社製、MobileMapper) で取得した。各個体から新鮮な成葉を1~2枚採取し、シリカゲルで十分に乾燥させ、DNA分析に供するまで常温で保存した。

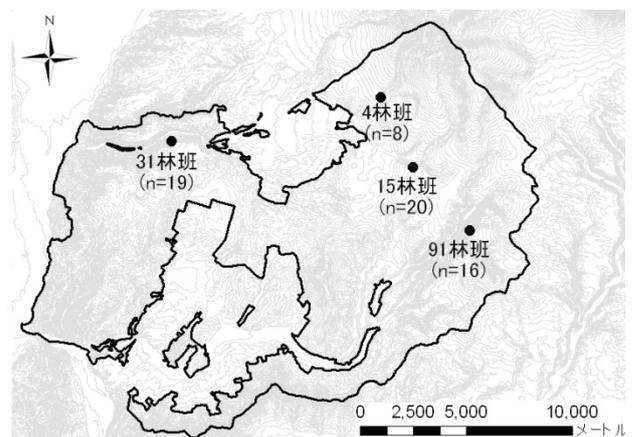


図-1 調査個体の位置図

nはサンプルを採取した個体数。

開花調査と父性解析用サンプルの調整

2009年7月3日と16日に各集団を踏査し、開花調査を行った。その結果、4、15、31林班には開花個体はなく、91林班集団の2個体のみが開花していた。そこで、これらの2個体から2009年9月28日に種子を採取した。採取した種子は、シイナを取り除いてから3週間冷温(4℃)で処理し、アンチホルミン有効塩素1%で表面を殺菌後、0.8%寒天20mLが入ったシャーレに蒔いて、25℃インキュベーターで発芽させた。1つの母樹 (No. 55) から7個体 (発芽率3.4%)、もう1つの母樹 (No. 64) から152個体 (発芽率30.4%) の実生を得たため、それらをピンセットで摘出してチューブに入れ、DNA抽出まで-20℃で冷凍保存した。

DNA抽出と遺伝子型の決定

成葉と実生のサンプルは、いずれもトミー精工の MicroSmash で細かく粉碎し、キアゲン社の DNeasy Plant Mini Kit を用いて全 DNA を抽出した。PCR 反応は、キアゲン社製の Multiplex PCR Kit を用いて、Hirao (2010) がハクサンシャクナゲで用いた RM2D2、RM9D6、RM2D6、RM9D9、RM3D1 の 5 遺伝子座を 1 度に増幅した。PCR 産物は ABI 社の Genetic Analyzer 3130 を用いてピークを検出し、遺伝子型の決定を行った。

データ解析

ジェネットの決定と集団遺伝解析

上記 4 集団、合計 63 個体について、SSR5 座による遺伝子型を決定し、集団ごとに遺伝子型の数を調べた。本研究では、集団内で同じ遺伝子型を示す個体は遺伝的に同一な栄養繁殖由来の個体 (ジェネット) とした。次に、ジェネット単位で集団内の遺伝的多様性や集団間の遺伝的分化度を調べた。この際、遺伝的に異なる 2 個体が偶然同一の遺伝子型を示す確率 (PI ; Probability of Identity) を GenAlEx (Peakall and Smouse 2012) を用いて求めた。集団ごとの遺伝的多様性のパラメータとして、 N_A (対立遺伝子数)、 R (アレリックリッチネス; El Mousadik and Petit 1996)、 h (遺伝子多様度)、 F_{IS} (近交係数) を FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet 2001) を用いて算出した。また、 F_{IS} の有意性について、GenAlEx (Peakall and Smouse 2012) を用いて検定した。また、全集団間の遺伝的分化度 (F_{ST}) と集団ペアごとの F_{ST} を算出し、集団間に有意な分化が生じているかを FSTAT ver. 2.9.3 (Goudet 2001) を用いて調べた。次に、全ジェネットに対して、ジェネット間の遺伝距離を求め、GenAlEx (Peakall and Smouse 2012) を用いて主座標分析を行った。

さらに、遺伝的多様性を演習林以外の集団と比較するため、Hirao (2010) が用いた八甲田山の天然集団を構成する 15 個体の遺伝子型データを用いた。これらの 15 個体は、八甲田山の植物園内の散策路で囲まれた範囲 (約 2 ha) に生えているハクサンシャクナゲ 154 個体から、同一クローンを除き、個体間距離が 3 m 以上になるように、任意に選んだものである (平尾章 私信)。八甲田山の集団についても上記と同様に遺伝的多様性のパラメータを求めた。

発芽実生の父性解析

7 月に開花が確認された 2 個体を父親候補として、発芽実生の遺伝子型と母親個体の遺伝子型を比較し、父性解

析を行った。開花していた 2 個体 (No. 55 と No. 64) の遺伝子型は、5 座中 4 座が異なっていたが、4 座とも片方の対立遺伝子が共通していたため、単純排除法 (Dow and Ashley 1996) で自殖と他個体からの送粉を区別することはできなかった。そこで、メンデルの分離確率を父親候補ごとに計算し、計算されたメンデル確率に応じて父親貢献度を配分する比例配分法 (Fractional assignment method; Devlin et al. 1988) を用いた。なお、開花個体の周囲 100m を踏査したが、当年の開花個体はなかったため、父親候補を 2 個体として、単純に母樹と子供の遺伝子型を比較する本手法を選択した。

結果

集団内の遺伝的多様性

4 集団合計 63 個体について SSR5 遺伝子座の遺伝子型を決定した結果、41 の遺伝子型が検出された。異なる集団で共通する遺伝子型はなかった。異なる 2 個体の遺伝子型が偶然一致する確率 (PI) は、3 集団平均で 0.0075 (1/133) となり、遺伝子型の数とジェネット数はほぼ一致すると考えられた。

表-1 にすべての個体が単一ジェネットであった 4 林班を除く、演習林 3 集団と八甲田山集団の遺伝的多様性パラメータの平均値を示した。演習林の 3 集団の遺伝的多様性は、八甲田山集団に比べて、 N_A 、 R 、 h が明らかに低かった。 F_{IS} は、15 林班と 31 林班の集団では負の値、91 林班の集団で正の値を示したが、いずれもゼロと有意にずれていなかった。

表-1 各集団の遺伝的多様性のパラメータ

集団	n	N_A	R	h	F_{IS}
15 林班	12	2.800	2.800	0.504	-0.189
31 林班	13	2.600	2.553	0.442	-0.184
91 林班	15	3.000	2.905	0.408	0.151
八甲田	15	8.200	7.503	0.795	-0.006

n : ジェネット数、 N_A : 対立遺伝子数、 R : アレリックリッチネス、 h : 遺伝子多様度、 F_{IS} : 近交係数。

集団間の遺伝的分化度

集団全体の遺伝的分化度 F_{ST} は 0.293 であった。集団ペアごとの F_{ST} の値は 0.268 から 0.324 といずれも有意な分

化が認められた。

主座標分析によって得られた主座標のうち、寄与率の高い2軸を用いて図-2を描いた。各ジェネットは集団ごとに異なるクラスターを形成し、それらはほとんど重なり合わなかった。

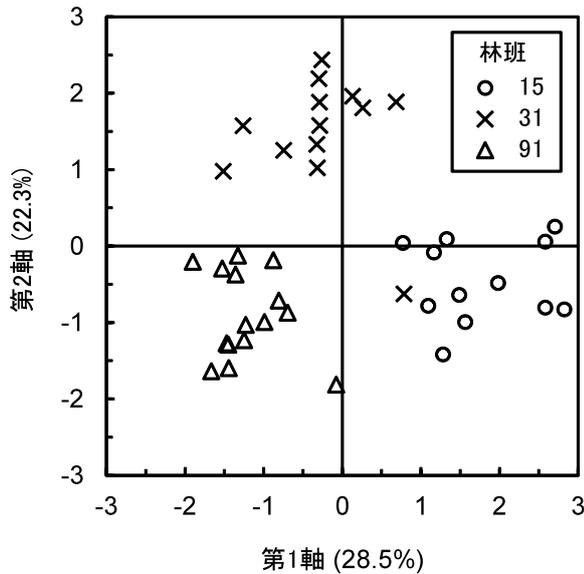


図-2 ジェネット単位の主座標分析の結果

遺伝子型の空間分布

4 林班の 8 個体は、全て同じ遺伝子型であった。15 林班では、12 の遺伝子型が検出され、同じ遺伝子型を示した個体は約 10 m の範囲内に集中していた (図-3a)。31 林班では 13 の遺伝子型が検出され、同じ遺伝子型を示した個体は 10~50 m の範囲内に分布していた (図-3b)。91 林班では 15 の遺伝子型が検出され、同じ遺伝子型の 2 個体は 100 m ほど離れて位置していた (図-3c)。

父性解析

表-2 に父性解析の結果を示す。母樹と矛盾する遺伝子型を示した実生 1 個体は解析から除外した。実生全体で自殖率は 81.3 %、他個体からの送粉は 10.8 %、2 個体以外からの送粉が 7.9 %と推定された。

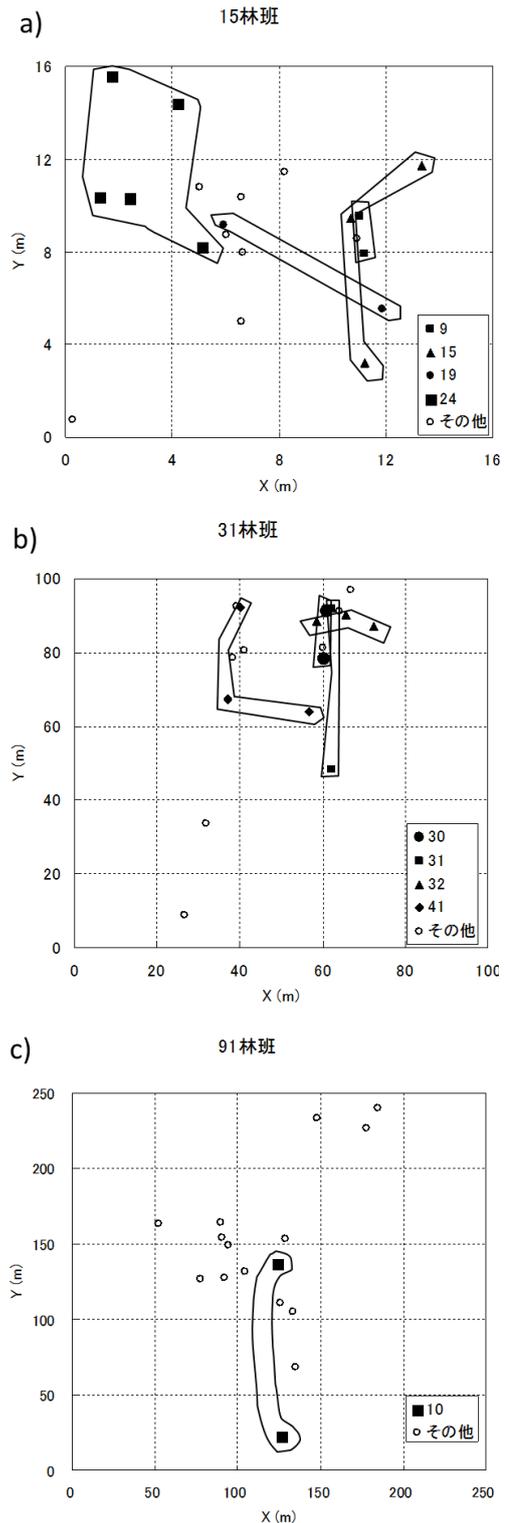


図-3 各集団における遺伝子型の位置図

a) 15 林班、b) 31 林班、c) 91 林班の集団を表す。共通の遺伝子型は同じシンボルで、単独の遺伝子型はすべて白丸で示した。凡例内のシンボル横の数字は遺伝子型の通し番号を表す。

表-2 母樹別種子の父性解析結果

母樹 No.	解析 実生数	自殖	他個体	2 個体 以外
No. 55	6	2.0	2.0	2.0
No. 64	152	123.6	16.4	12.0
計	158	125.6	18.4	14.0
(%)	(100)	(81.3)	(10.8)	(7.9)

自殖: 自殖によって生じた個体数、他個体: No.55 と No.64 の個体間の送粉によって生じた個体数、2 個体以外: No.55 と No.64 以外の個体からの送粉によって生じた個体数。

考 察

隔離集団の遺伝的多様性

北海道富良野市(演習林)の3 集団の遺伝的多様性は、八甲田山の集団よりも低かった。また、演習林の集団はいずれも有意な分化を示し、主座標分析でも集団間の違いは明瞭であった。

一般に、隔離小集団では、遺伝子交流が小さく、遺伝的浮動の影響を受けやすいため、集団内の遺伝的多様性は低く、逆に集団間の遺伝的分化度は高くなる(Hamrick et al. 1992)。

富良野の集団では、八甲田山の集団(Hirao 2010)よりも集団サイズが小さく、ジェネット数も限られており、隔離小集団であることが本研究で対象とした集団の集団内の遺伝的多様性や集団間の分化度に影響を与えている可能性がある。ただし、北海道と東北の集団間でそもそも遺伝的多様性が異なるという可能性もあり、この地域差の影響がどの程度あるかについては、今後の課題である。

ジェネットの分布と伏条更新

4 林班の8 個体は約10×10 m の範囲内に分布し、全て同じ遺伝子型を示していた。現地の形態からみても、これらが伏条更新由来の同一ジェネットであると推察された。他の3 集団では、集団内に12 以上のジェネットが存在していたことから、本種は、栄養繁殖と有性繁殖で集団を維持していると考えられた。

交配様式と花粉散布パターン

父性解析の結果、実生全体の約8 割が自殖と推定された。Hirao (2010) は、ハクサンシャクナゲは、特に結実

期に近交弱勢が働くとしており、自殖した場合には成熟種子にならないことが多いとしている。今回、自殖率が8 割を超えると推定されたが、これらは良好な環境下で発芽したものであり、天然の状態でも発芽できるかどうか、あるいは発芽後に定着できるかどうかについては新たな調査が必要である。

まとめ

本研究で北海道富良野市に隔離分布するハクサンシャクナゲ4 集団を対象に、ジェネット数と遺伝的多様性を調べた。1 集団では、ジェネット数は1 つであったが、他の3 集団では複数のジェネットが検出された。それら3 集団について、ジェネット単位で集団内の遺伝的多様性を調べた結果、北海道富良野市の集団は比較対象とした八甲田山集団よりも遺伝的多様性が低かった。また、富良野の集団間では、遺伝的に有意に分化していた。また、開花個体の自殖率を調べた結果、全体で約8 割と推定された。以上のように、富良野に隔離分布しているハクサンシャクナゲは、実生繁殖と伏条更新の両方を行っており、ジェネット単位で見ると、集団内の遺伝的多様性は低く、集団間の遺伝的分化度は高かった。また、周囲に開花個体がほとんど見られない2 個体から種子を取って父性解析した結果、大多数が自殖であることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、東京大学北海道演習林の坂上大翼博士には、発芽試験を指導して頂いた。同演習林の技術職員、福士憲司、松井理生、小池征寛、高橋功一、及川希、千葉演習林の村川功雄の各氏には現地調査を手伝って頂いた。東京大学森圏管理学研究室の井出雄二教授、齋藤陽子助教には、DNA 分析実験に際して実験室使用に便宜を図っていただくとともに、有用なご助言を頂いた。演習林教育研究センターの三浦直子博士には英文要旨作成に有用な助言を頂いた。ここに記して、深く感謝の意を表します。本研究は、平成21 年度奨励研究(課題番号: 21917007) の助成を受けて行った。

引用文献

- Devlin B, Roeder K, Ellstrand NC (1988) Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. *Theoretical Applied Genetics* 76: 369-380
- Dow BD, Ashley MV (1996) Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical Applied Genetics* 92: 832-839.
- Goudet J (2001) FSTAT; a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hamrick J, Godt M, Sherman-Broyles S (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124
- Hirao AS (2010) Kinship between parents reduces offspring fitness in a natural population of *Rhododendron brachycarpum*. *Annals of Botany* 105: 637-646
- Kameyama Y, Isagi Y, Nakagoshi N (2001) Patterns and levels of gene flow in *Rhododendron metternichii* var. *hondoense* revealed by microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 10: 205-216
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539
- 佐藤孝夫 (2006) 北海道樹木図鑑, 亜璃西社, 札幌
- 山口若生 (2009) 「私の営林署物語」 えりも国有林でのシヤクナゲ盗裁事件 (浦河営林署). *北方林業* 61: 293-294