

ニガナ (*Ixeridium dentatum*) 種内の
遺伝的多様性に関する分子遺伝学的研究

長岡技術科学大学大学院 工学研究科
生物統合工学専攻 応用植物工学研究室

田中 啓介

(様式)

論文内容の要旨

氏名 田中啓介

ニガナ種 (*Ixeridium dentatum*) は、キク科ニガナ属の宿根多年生植物であり、日本全土を含む東アジア温帯・亜熱帯地域の山地や野原、耕地の周辺など至る場所に自生する一般的な野草である。

この植物は、種内で形態や染色体構成に高度な多様性を有することから複合種として扱われている。そして、複合種ニガナの分類体系は、形態学的解析や核型分析に基づき、種内で6亜種、1変種、3品種にまとめられている。しかしながら、これらの情報に基づく分類体系は、人為分類により構築されたものであり、系統関係を明瞭に追跡することができなかった。そこで、分子系統学的な情報からニガナ種内分類群の系統関係を推定することで、進化的道筋を考慮した自然分類から分類体系を正統的に評価できると考えられる。

さらに、ニガナ種内の亜種に分類されているイソニガナ (*Ixeridium dentatum* subsp. *nipponicum*) は、複合種ニガナの中で祖先種と密接に関係しているだろうと考えられている。特に、この亜種は、ニガナ種内における生殖様式の変化のメカニズムを解明する上で非常に重要な分類群である。しかしながら、イソニガナは、新潟県の海岸沿いにのみ生育する固有種であり、環境変化の影響を受けやすい土地で生育していることから、絶滅危惧種に指定されている。そこで、個体群の分布域状況や個体群内及び個体群間の遺伝的多様性を把握することで、効果的な保全対策へのアプローチが図られるべきと考えられる。

本研究は、分子遺伝学的なアプローチによって、ニガナ種内の遺伝的多様性を明らかにすること及び、絶滅危惧種イソニガナの保全対策の検討を行うことを目的として遂行した。

ニガナ種内の系統関係の推定と分類関係の評価に関する研究では、まず解析に用いる試料として、ハイニガナとシラネニガナを除く各分類群の個体を取得した。解析には、形態特性、倍数性レベル、分子系統学的手法として ITS 配列及び AFLP を利用した。倍数性レベルは、2倍体から4倍体の範囲で観測された。ITS 配列は、ニガナ種内の分類群でほとんど差異が見られなかった。AFLP に基づいた分子系統学的解析では、全ての分類群がそれぞれ単系統として示されることを明らかにした。そして、ニガナ種内の分類群を自生地と形態特性とよく一致する5つの Group に識別した。また、現在の分類体系に記載されていない新たな3つの独立したクラスターを示した。これらクラスターのうち、1つは形態特性との対応関係からオゼニガナと判断し、残りの2つは新たな分類群として識別できることが示唆された。よって、本研究では、現状の分類群の一部変更と新たな分類群の導入によって、7亜種、3変種、2品種としてニガナ種内分類群の再構築を提案した。また、分子系統学的解析によって、ニガナ種は、2倍体の祖先種に由来することにより、染色体重複や交雑が、互いの祖先種で独立して生じ、現在確認される多様な分類群が出現したという可能性を持つと考えられた。そして、低地で生育するほとんどの分類群の幅広い分布は、倍数体進化と他の分類群との分岐が低地移入中もしくは移入後に起こったという進化的

プロセスを提案した。

イソニガナの現状の把握と保全アプローチの検討に関する研究では、まず新潟県の海岸沿いの 90 km にわたって個体群の分布域を調査し、10 ヶ所の地域で個体群が存在していることを確認した。さらに、そのうち上越市の 1 ヶ所と柏崎市の 2 ヶ所が数千個体レベルの比較的大きな個体群を形成していた。そして、個体群内及び個体群間の遺伝的多様性を把握するために、10 遺伝子座の SSR マーカーを用い、遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造を解析した。全ての個体群は、対立遺伝子数、ヘテロ接合度、Shannon's information index が類似しており、ヘテロ過剰になる傾向が確認された。一方で、遺伝的クラスターは、上越地方の 2 ヶ所の個体群と、中越及び下越地方の 8 ヶ所の個体群とを明確に識別した。これら結果から、どのイソニガナ個体群も、比較的高い遺伝的多様性を維持していることが考えられた。保全アプローチの検討として、上越市と柏崎市における 3 ヶ所の大規模な個体群に対して、生育環境の条件を維持し、個体群規模を拡大することで優先的に保護すべきであると提案した。さらに、これら個体群は、他の地域に対する種子の供給センターとしての役割を果たすことができると考えられた。すなわち、これら個体群から種子を人為的に分配することによって、小規模な個体群においても現状の生育環境の維持と共に、個体群の拡大を図ることができ、効果的な保全アプローチになることが期待できる。

以上のことから、本研究は、分子遺伝学的解析を利用することで、ニガナ種内の遺伝的多様性及び現存するイソニガナ個体群の集団遺伝学的構造を明確にすることができ、新たな知見を得ることができた。

目次

第1章 序論

1. 1	生物多様性について	1
1. 1. 1	分子系統学の成立と生物多様性に対するアプローチ	2
1. 1. 2	遺伝的多様性と遺伝資源	3
1. 2	ニガナ植物について	5
1. 2. 1	複合種ニガナ種内の系統関係と現状の分類体系	7
1. 2. 2	絶滅危惧種イソニガナの現状	9
1. 3	分類学と系統学で用いられる基礎的概念	10
1. 4	分子マーカーの利用	11
1. 5	研究目的と本論文の構成	13

第2章 ニガナ種内の分類群に対する分子系統学的解析

2. 1	緒言	23
2. 2	実験材料及び方法	24
2. 2. 1	植物試料の採取	24
2. 2. 2	形態特性の観察	25
2. 2. 3	倍数性レベルの推定	25
2. 2. 4	DNA 抽出	26
2. 2. 5	ITS 領域の配列解析	26
2. 2. 6	AFLP による多型解析	27
2. 2. 7	系統樹構築	27
2. 3	結果	28
2. 3. 1	形態特性及び倍数性レベル	28

2. 3. 2	分子系統学的解析	28
2. 3. 2. 1	ITS 配列に基づいた系統解析	28
2. 3. 2. 2	AFLP に基づいた系統解析	29
2. 4	考察	29
2. 4. 1	形態特性及び倍数性レベル	29
2. 4. 2	分子系統学的解析	31
2. 5	結言	32

第3章 絶滅危惧種イソニガナの個体群内及び個体群間の遺伝的多様性

3. 1	緒言	52
3. 2	実験材料及び方法	53
3. 2. 1	イソニガナの分布域調査及び試料採取	53
3. 2. 2	DNA 抽出	54
3. 2. 3	SSR マーカーの開発	54
3. 2. 4	SSR マーカーによる多型解析	55
3. 2. 5	遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造解析	56
3. 2. 5. 1	遺伝的多様性に関する指数の算出	56
3. 2. 5. 2	Structure 解析	57
3. 2. 5. 3	系統樹構築	57
3. 3	結果	58
3. 3. 1	イソニガナの分布域調査	58
3. 3. 2	SSR に基づいた遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的 構造解析	58
3. 4	考察	60
3. 4. 1	イソニガナの分布域調査	60

3. 4. 2	SSR に基づいた遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的 構造解析	66
3. 5	結言	67
第4章 総合考察		
4. 1	ニガナ種内の分子系統学的解析	81
4. 1. 1	新たなニガナ種内の分類体系	82
4. 1. 2	系統関係による進化的プロセス	83
4. 2	分子マーカーの有効性	84
4. 3	絶滅危惧種イソニガナの遺伝的多様性	86
4. 3. 1	イソニガナの保全アプローチ	87
4. 4	今後の課題	88
	謝辞	94
	参考文献	95
	付録	109

第1章 序論

1. 1 生物多様性について

最初の生物が誕生してから約 38 億年、今日では地球上に約 175 万種の生物が確認及び分類されているが、推定では最大で 870 万種の生物が存在していると考えられている (Mora *et al.* 2011)。この推定によれば、動物が 777 万種、植物が 29 万 8000 種、菌類が 61 万 1000 種、原生動物が 3 万 6400 種、クロミスタが 2 万 7500 種であるとそれぞれ見積もられている。これまで、陸上植物では、約 27 万種が確認及び分類されており、さらにこの中でもキク科 (1620 属 22750 種)、ラン科 (880 属 21950 種)、マメ科 (730 属 19400 種) は、特に多くの種数を含む巨大な科を形成している (ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 12: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/top/updates.html#Famlarge>, accessed September 16, 2013)。このように多くの種が存在するのは、生物が長い時間をかけて進化してきた結果として、幅広い生物多様性が形成されてきたためである。

生物多様性は、現代の生物学におけるキーワードの一つとして注目されている。一般的に生物多様性とは、陸上生態系、海洋その他の水界生態系、これらが複合した生態系その他生息又は生育の場のいかなを問わず、すべての生物の間の変異性をいうものとし、種内の多様性、種間の多様性及び生態系の多様性を含むと定義されている (谷津ら 2008)。生物多様性を理解するためには、多角的な調査が必要とされるが、中でも種の分類体系の構築と系統関係を解明することは重要な要素の一つである。そして、分類体系の構築と系統関係の解明に基づき生物多様性を理解することで、最終的には地球環境の保全と重要な遺伝資源の確保につながることを期待されている。

1. 1. 1 分子系統学の成立と生物多様性に対するアプローチ

生物多様性を理解するためには、まず正しい分類体系を構築し、どれだけの分類群が実際に存在しているかを把握する必要がある。すなわち、分類学的及び系統学的要素が鍵となる。

生物の科学的な分類は、1735年の Carl von Linné による著書 *Systema Naturae* において初めて体系化され、これによって種が明確に区別されることとなった。また、Linné は、1753年に著書 *Species Plantarum* を出版し、生物の種を属名と種小名を組み合わせた2語のラテン語からなる学名で表す、二名法を確立した。これにより、異称や別名も多くあった生物の名前が、学名を用いて合理的に体系化されることとなった。これら分類体系の成立、二名法による学名の確立は、現在の分類学の基盤となり大きな役割を担っている。

一方、生物間の系統関係を考える思想体系は少し遅れた。進化論がまだ確立していなかった19世紀半ばまでは、種は不変であるという考えが通説だったからである。生物は不変なものではなく進化するものであるということが定着したのは、1859年の Charles Robert Darwin による著書 *On the Origin of Species* においてであり、これによって現在の多様な生物の種は不変で孤立した存在ではなく、系統関係を持ち類似する一連の生物と結びつきを持つことが示された。その後、生物の系統関係を分かりやすく表示する方法として、1866年の Ernst Haeckel による著書 *Generelle Morphologie der Organismen* において系統樹が考案された。これら進化論の提唱、系統樹の確立は、現在の系統学の最も基礎的な部分として大きな役割を担っている。

20世紀半ばまで、種の分類は、外観的形態のような単純に観測される特性に基づいた人為分類によって行われてきた。例えば、Heinrich Gustav Adolf Engler (1887年)による被子植物の分類(新エングラ体系)は、花の構造に基づいて行われた。人為分類は、人が便宜的に識別形質を定義することによって

行われるので、単純明快に分類される利点を持つ一方、平行進化や収斂進化により生じた形質を区別しないため、しばしば異なった進化的道筋を導く危険性がある。さらに、形態特性に基づいた系統関係の推定には情報量に限界があり、観察者や観察方法によって違いが生じるといった問題も挙げられる。よって、対象の生物の進化的道筋を考慮した上で行われる自然分類に基づく体系が望ましく、そのためには系統関係の把握が必要となる。

分子系統学の展開は、より客観的な、人為分類を排した系統関係を推定すること、すなわち、自然分類に近い分類体系を導くことを可能とした。これは、近年の生体分子の解析手法の開発を基礎とする分子生物学の発展に伴い、個体を構成する一次的要素である DNA や RNA の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列など、分子レベルでの比較解析から系統関係を推定する手法である。得られた解析結果は、以前よりも膨大な情報量を持ち、より正確な系統関係を推定することが期待される。分子系統学に基づいた分類体系の代表的な例として、1998年に初めて発表された Angiosperm Phylogeny Group (APG) 体系が挙げられる。APG 体系は、DNA 情報を基にした被子植物全体を対象とした科レベルの分類体系であり、新エングラ体系と異なり合弁花と離弁花の区分が無くなるなど大きな変更が行われている。APG 体系は、現在進行形の研究であり、未確定な分類群が多い。そのため、確立してからこれまでに2回の訂正が行われ (APG I 1998; APG II 2003)、現在は2009年に改訂された APG III が最新版となっている (APG III 2009)。このように分子系統学的な解析手法は、信頼性が高い分類体系を構築することができ、生物多様性を測る尺度として非常に適していると考えられる。

1. 1. 2 遺伝的多様性と遺伝資源

遺伝的多様性とは、集団内、集団間、あるいは種内、種間において遺伝的変異

が存在することであり、種多様性と生態的多様性と共に、生物多様性を構成する要素になっている。遺伝的多様性が低い種や集団は、周囲の環境変化や病虫害の蔓延に遭遇したときに、被害が大きく絶滅の確率も高い。また、近年のアグリバイオの急速な展開により、従来の育種技術では不可能であった生物種の壁を越えた遺伝子組換えが可能になったため、野生生物の潜在的な遺伝資源としての重要性が強調されるようになってきた。

しかし、最近では、人為的な環境破壊や攪乱により生態系が崩れ、多くの生物種が急速に絶滅の危機にさらされており、その遺伝資源が、現在では危機的状況にさらされている。生物を遺伝資源として保護するためには、近親交配やボトルネック効果による遺伝的多様性の低下を防がなければならない。そのために、個体だけでなく十分な大きさの個体群を保護する必要がある。さらに、野生種は多様な遺伝的変異が種内に生じているため、それら種多様性だけでなく種内での遺伝的多様性の保護も必要になる。そのためには、遺伝的浮動によって低頻度な遺伝子が個体群から失われることがないように、また不自然な強い淘汰をもたらす人為的淘汰圧が作用することがないように、できる限り多数の集団、個体数を本来の分布域全体に渡って維持することが望ましい。

遺伝資源を含む生物多様性の保全に関する具体的な戦略に関する世界的な合意として、生物多様性条約が締結されている。生物多様性条約とは、1992年にリオ・デ・ジャネイロで開催された地球サミットにて調印（1993年に発効）された国際条約であり、同年に日本を含め168国・機関が署名した。そして、1996年以降は2年ごとに開催される締約国会議（Conference of Parties; COP）において、これまでの取り組みや成果、今後取り組むべき課題などが発表され、最近では2012年のCOP11としてインドのハイデラバードで開催された。また、2010年のCOP10では、日本の名古屋が開催地となり、遺伝資源へのアクセスと

利益配分 (Access and Benefit-Sharing; ABS) に関する名古屋議定書が採択された (安藤 2011)。このような経緯から、日本国内でも生物多様性と遺伝資源の重要性及び保全に対する関心は、ますます高まっている。

1. 2 ニガナ植物について

ニガナ種 (*Ixeridium dentatum*) は、キク科ニガナ属の宿根多年生植物であり、日本全土を含む東アジア温帯・亜熱帯地域の山地や野原、耕地の周辺など至る場所に自生している一般的な野草である (Fujishima 1984)。また、この植物名は、葉や茎など組織に傷をつけると、そこから白く粘性のある乳液を出し、これに苦味があることに由来しており、そこからニガナ (苦菜) と名付けられている。

ニガナ種のタイプ標本とされるニガナ (*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev subsp. *dentatum*) の特徴について記す (Fig. 1-1)。茎は、高さ 30~50cm 程度になり、その頂部に直径 1.5cm 程度の黄色い頭花を複数つける。頭花は、5~6 個の小花 (舌状花) からなっている。根出葉は、広被針形~倒卵状長楕円形で長い柄があるが、茎上葉は小さく柄がなく、基部が茎を抱いた状態になっている。葉には、棘状の鋸歯があるが、上部の若い葉には鋸歯がないものもある。果実は、紡錘形の瘦果で、汚白色の冠毛がある。花期は、5~8 月である。本種には、2 倍体系統及び、3 倍体や 4 倍体の多倍体系統が確認されている (竹本 1954, 1956, 1970; 西岡 1956, 1960; Takemoto 1962; Nishioka 1963; Fujishima 1984)。

ニガナにおいては、2 倍体系統では有性生殖が行われるが、多倍体系統ではアポミクシスによる無性生殖が行われることが知られている (岡部 1932; 竹本 1954, 1956, 1970; 西岡 1956, 1960; Takemoto 1962; Nishioka 1963)。

アポミクシスとは、植物の無性生殖のうち有性生殖を伴わない種子による繁殖様式を言い、多くの植物で確認されている現象であるが、その挙動は様々で

ある。近年、アポミクシスは、育種的利用に関して大きく注目されている。それは、主要作物にアポミクシスの導入ができれば、ヘテロシスの固定が可能となり、一代雑種品種の育成と増殖の飛躍的な効率化につながると期待されているためである。ニガナ種は、3 倍体で単為生殖を行う代表的な植物であり、アポミクシス利用の研究材料としても重要である。

ニガナ種の場合、まず胚嚢母細胞からの減数分裂で第一分裂が不均等分裂となり、染色体が紡錘体上で散在し、2つの娘核の形成に至らない (Bhat *et al.* 2005; Noyes 2007; Naumova 2008)。そこで、再び全ての染色体を含む1つの復帰核を形成し、これがさらに第二分裂を行うことで、最終的に母細胞と倍数性が等しい胚嚢細胞を形成することになる。そして、胚嚢細胞から形成した胚嚢における卵細胞が、体細胞と同じ倍数性を持つため、精細胞との受精なしに種子を作出することができる。ゆえに、種子から発芽した子孫は、親と全く同じ遺伝情報を持つクローン個体となる。そのため、ニガナ種の無性生殖系統は、種子が遠隔地まで散布され孤立したとしても、1 個体からクローン種子を散布することで個体群を形成することができることから、繁殖能力が高く分布域が広い。一方、ニガナ種の有性生殖系統は、自家不和合性を持つため、繁殖には最低でも2 個体が必要であり、また個体密度が低いと受粉効率が低くなることから、繁殖能力が低く分布域が狭いという特徴を持っている。

さらに、ニガナ種は独特な生理特性や様々な薬効性を有することから、重要な遺伝子資源を持つ植物の一つであるといえる。東洋医学の薬草としてニガナ植物は、消化不良、肺炎、肝臓炎、打撲傷、癌、糖尿病、腎不全、精神的ストレスに対して用いられてきたことから、ニガナ種の二次代謝産物などの化学的構成要素及びその薬効性が、多くの研究者によって研究されてきた (荒井ら 1983; Seto *et al.* 1986; Choi *et al.* 1990; Chung *et al.* 1994; Chung *et al.* 2002; Yi *et al.* 2002; Chang *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005; Ahn *et al.* 2006; Park *et al.* 2008; Cha

et al. 2012)。例えば、ニガナ種の根から 11 種類のセスキテルペンラクトンの単離が報告されており、その中で zaluzanin、9a-hydroxyguaian-4(15),10(14),11(13)-triene-6,12-olide、crepiside 1 の 3 種類の化合物については、ヒトの結腸癌細胞と肺腺癌細胞に対して比較的高い細胞毒性を示し、ixerin M、crepiside 1 の 2 種類の化合物については、acyl CoA-cholesterol acyltransferase 阻害活性を示したという報告がある (Ahn *et al.* 2006)。これらは、抗癌剤、高コレステロール症治療薬、抗動脈硬化剤への展開が期待されている。また、ニガナ種の植物体を磨り潰した緑汁をラット腹膜肥満細胞に接種し、IgE 複合体によって誘導される受身皮膚アナフィラキシーや、化合物 48/80 で誘導されるかゆみに対する効果を調べた調査では、緑汁の投与量を増やすほど、ラット腹膜肥満細胞からのヒスタミン放出が抑制され、抗アレルギー効果があることを明らかにされている (Yi *et al.* 2002)。さらに、ニガナ種の植物体を乳酸発酵させた場合、より抗アレルギー効果が向上するという報告もある (Park *et al.* 2008)。

また、ニガナ種は、 β カロテンを多く含むなど栄養面でも優れているとされ、最近の報告では閉鎖生態系生命維持システムの候補作物としても注目されている (Cho *et al.* 2012)。

1. 2. 1 複合種ニガナ種内の系統関係と現状の分類体系

日本におけるニガナ種は、祖先種が更新世後期の氷河期に大陸から移入し、長い年月と多様な環境によって種内で複雑に分化した結果、複合種を形成したという仮説が提唱されている (Nishioka 1963)。複合種とは、種内で形態的もしくは遺伝的変異を持つことによって、分類学的に細分化された分類群を包括した種のことを示す。2 倍体の有性生殖系統は、形態が小さかったことから、他種との競合に弱いため限定した地域 (峡谷、山岳、海岸) に隔離分布を持ち、隔離された分布ごとに独自の形態的・遺伝的変異を持つようになったと

考えられる。その後、3 倍体でアポミクシスによる無性生殖を行う系統が生じ、広い分布を持つ野草になったとされている。そのため、ニガナ種は、1 つの種内で大きな遺伝的多様性を示し、種以下の階級である亜種 (Subspecies; subsp.)、変種 (Variety; var.)、品種 (Form; f.) として分類される多くの系統、分類群を含んでいる。

当初、ニガナ種は、*Ixeris dentata* を学名とし、形態特性に基づいて種内で 5 亜種、3 変種、3 品種に分類された (Kitamura 1956, Table 1-1)。それから半世紀の間、ニガナ種内の分類に関する議論は、形態特性と核型解析に基づいて行われてきた (竹本 1954, 1956, 1970; 西岡 1956, 1960; Takemoto 1962; Nishioka 1963; Fujishima 1984, 2001; Pak and Kawano 1990b)。その後、ニガナ種を含め *Ixeris* 属に分類されていた約 20 種の植物は、瘦果を含めた形態特性と核型に基づいて、大きく 2 つのグループ (*Ixeris* 属と *Ixeridium* 属) に分けられることが示唆された (Pak and Kawano 1990a, 1990b, 1992)。すなわち、*Ixeris* 属は、基本染色体数が $x=8$ 、間期核は円形もしくは鞭状の凝集体を含み、染色体サイズが小さいという特徴を持つ。一方、*Ixeridium* 属は、基本染色体数が $x=7$ 、間期核には核全体に散在した多数の小さな凝集体が見られ、染色体サイズが大きいという特徴を持つ。ニガナ種は、この区分では *Ixeridium* 属の特徴と一致する。そして近年、ニガナ種の分類体系の訂正として、まず *Ixeris dentata* から *Ixeridium dentatum* へ学名が変更され、さらにタカネニガナが *Ixeridium alpicola* として別種に分類された (Pak and Kawano 1992)。最終的に、ニガナ種は、種内で 6 亜種、1 変種、3 品種にまとめられた (米倉・梶田 2003, BG Plants index: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013; Yonekura 2005, Table 1-2, 1-3, Fig. 1-2)。

以上が、近年までのニガナの分類学的動向であるが、参照される情報は、形態学的特徴や核型分析に基づく情報に限られていた。そして、種内分化により複雑

な遺伝的多様性を示すニガナ種内分類群の系統関係との対応は、明確に示されておらず、人為分類に留まるものであった。そこで、現在主流となっている塩基配列情報から系統関係を推定する分子系統学的解析を適用し、ニガナ種内分類群の系統関係を示した上で現状の分類体系の妥当性を評価し、進化的道筋を考慮した自然分類に近い分類体系を与えることが望ましいと考えられる。

1. 2. 2 絶滅危惧種イソニガナの現状

ニガナの亜種に分類されているイソニガナ (*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev subsp. *nipponicum* (Nakai) J. H. Pak et Kawano) は、柏崎市内の海岸沿いで初めて発見された植物である (Nakai 1920)。この亜種は、小花が黄色、小花数が 8~12、葉が卵型といった形態上の特性によってニガナ種内の他のグループから識別可能である (Fig. 1-3)。幅広い分布域に自生するニガナやハナニガナのほとんどは、3 倍体あるいは 4 倍体で無性生殖を行うのに対し、イソニガナは全てが有性生殖による 2 倍体である。竹本 (1956) は、倍数体進化の流れから考えれば、イソニガナは、複合種ニガナの祖先種と密接に関係しているだろうと述べている。この亜種は、複合種ニガナの種内分化や生殖様式の変化のメカニズムを解明するうえで非常に重要な植物といえる。しかしながら、イソニガナは、新潟県の海岸沿いにのみ自生する固有種であり、環境変化の影響を受けやすい土地で生育していることから初期の維管束植物レッドリストから、絶滅危惧 II 類 (Vulnerable; VU) として記載されている (環境庁 1997; 環境省 2012a, レッドリスト, 植物 I (維管束植物) : http://www.biodic.go.jp/english/rdb/rdb_f.html, accessed September 16, 2013)。また、新潟県で発刊されている“レッドデータブックにいがた”でも、絶滅危惧 II 類の категорияに記載されている (新潟県 2001)。

イソニガナが発見されて以降の分布域調査報告では、新たな個体群が上越市

の郷津で発見された（竹本 1970）。すでに確認されていた柏崎市内における個体群調査に関しては、佐藤・滝沢（1994）が3ヶ所で個体群を発見し、その調査結果では3ヶ所のいずれもが土地開発によって消滅することを危惧し、個体群の保全及び保護を強調するものだった。一方、安ヶ平ら（1999）によれば、イソニガナの生息地は柏崎市の海岸線約15 km 圏内の6ヶ所で確認され、特に柏崎マリーナ付近の個体群は5000 個体以上あるだろうと推定されたことから、著者らは個体群が直ちに絶滅の危機に陥らないと考え、最低限現状を維持すべきことを主張した。また、分子生物学的解析によって上越市と柏崎市の個体群間には明確な遺伝的差異がなく、両者の密接な関係性が示された（工藤 2005; 田中 2009）。

このように、イソニガナ個体群の生息状況に対するこれまでの調査は、柏崎市と上越市に絞られており、その他の地域における情報が不足しているのが現状の大きな問題といえる。絶滅危惧種生物の保全と保護を図る上で、個体群の分布域情報と現状の個体数、さらに個体群が生息する周辺環境情報を把握することが非常に重要となる。

1. 3 分類学と系統学で用いられる基礎的概念

従来の分類学では、個体が持つ形質を対象とし、形質状態の類似と差異に基づいて個体を分類していた。分類された個体が、いくつかの集団を形成すると、これをクラスターとした。クラスターは、その中の個体同士が十分に近く、他のクラスターとの間に十分な距離を保っている場合、分類階級で位置付けられるタクソン (taxon) として認識できる。すなわち、タクソンとは、ある生物分類群の階級に位置付けられる分類学的単位である。個体をユニットとし、クラスタリングしてできたクラスターが種になる。さらに、種をユニットとすれば、種より上位のタクソンができる。逆に種以下のレベルで、クラスター

を認識できる場合には、亜種、変種、品種といった下位のタクソンが置かれる。そして、認識したタクソンを各階層に並べ、それぞれに階級を付けていくことで分類体系が構築できる。このように、階層構造を持つ分類体系を構築することが、分類学の本質である（馬渡 1997）。

Darwin 以降、分類学への進化論の導入により、種間の類似と差異に基づいた分類は、それらの種の共通祖先との関係を反映していると考えられるようになった。すなわち、同一のタクソンに属している種は、共通の祖先から分化したと解釈されることになる。このことから、系統発生とは、生物の多様性の背後にある歴史プロセスであると認識されるようになり、系統発生に基づき生物を体系化する系統学が誕生した。系統学では、分類学とは異なり、生物の特徴を手がかりにして類縁関係を追究すると共に、系統樹を構築することが目的になった。しかしながら、方法論としては、相同形質に基づいた分類が行われ、分類学の方法とほとんど変わりはない。これは、従来の分類学が実践してきた方法、すなわち自然の多様性の中に秩序を探る方法が正しかったからである。近年では、分子生物学の発展により、DNA や RNA の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列などの分子レベルでの解析が可能になり、類縁関係、系統関係、分岐年代を推定する新たな方法として発展した。分子生物学を導入した系統学は、分子系統学と称されており、これは現在の系統解析に必要不可欠な手法として定着している。

1. 4 分子マーカーの利用

多型とは、同一種内の個体間で特定の形質について多様性が存在する状態をいい、特にそれが遺伝的な差異に基づく場合を遺伝的多型という。分子系統学では、遺伝的多型を利用した多型解析が情報取得方法の一つになっている。

分子マーカーが分子系統学的解析手法として適用され始めたのは、1960 年代

であり、アロザイム分析による酵素を対象とした遺伝的多型が利用されていた。アロザイム分析は、遺伝情報が全くなくても信頼できる結果が得られるため、遺伝的変異の調査に対して優れた手法である。しかしながら、得られる情報に限りがあり、淘汰に関わる形質などは連鎖している場合を除いて検出できない。さらに、検出される多型性の程度が比較的に低いため、その応用範囲に限界があるなどの問題点があった。

1990年代以降から、PCRによるDNAを増幅する技術が開発されたことを機に、この技術を応用した様々な遺伝的多型を検出する手法が考案されてきた。DNAを対象とした遺伝的多型を検出するための分子マーカーには、使用できる遺伝子座数に實際上制限がないこと、ゲノム全体での比較が可能であること、淘汰に対して中立ではない遺伝子座も解析可能であること、超多型を伴う遺伝子座が利用可能であることなど、多くの利点が挙げられる。

以下には、DNAに対する分子マーカーで、初期の遺伝的多様性の研究から用いられてきた代表的な多型解析の特徴を示す (Table 1-4)。制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) は、DNAプローブを放射性同位元素または蛍光色素等で標識し、制限酵素処理を行ったゲノムDNAとハイブリダイゼーションを行い、多型を検出する方法である。単純反復配列 (Simple Sequence Repeat; SSR, マイクロサテライト) は、ゲノム内に多数存在する (CT)_n、(CA)_n、(GTG)_n などのような 2~6 塩基の繰り返し配列の配列数の違いにより、多型を検出する方法である。配列標識部位 (Sequence Tagged Site; STS) は、塩基配列情報に基づいてプライマーを設計し、ターゲット部分だけを増幅する方法である。切断増幅多型配列 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences; CAPS) は、STSでPCR増幅されたDNA断片を制限酵素で消化し、多型を検出する方法である。ランダム増幅多型DNA (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) は、ゲノムDNAをランダムに増幅する方法で、

10～12 塩基のランダムプライマーを用いて、これらと同じ配列を持つ部分に挟まれた領域を PCR 増幅し、多型を検出する方法である。単純反復配列間 (Inter Simple Sequence Repeat; ISSR) は、アンカー配列を付加した SSR 配列をプライマーとして、SSR 領域に挟まれた部分を特異的に PCR 増幅し、多型を検出する方法である。増幅断片長多型 (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP) は、制限酵素で切断した部位に特異的なアダプターを付け、これらに相補的な配列にさらに 1～3 塩基のアンカーを付けたものをプライマーとし、一度に 50～100 の DNA 断片を増幅し、多型を検出する方法である。このように、多型解析では、多くの方法が考案されており、試料の質や研究目的に合わせて利用すべきである。

近年では、次世代シーケンサーの発達と低コスト化に伴い、全ゲノム関連解析 (Genome-Wide Association Study; GWAS) や、ある生物種を識別できる特定の短い DNA 配列を対象とした DNA バーコーディングなどの新たな分子系統学的手法が展開されている。例えば、GWAS を利用した研究では、イネのジャポニカ品種が中国の珠江中流周辺に由来し、さらにインディカ品種が東南アジアや南アジアの野生種とジャポニカ品種との交雑から誕生したことを明らかにした (Huang *et al.* 2012)。そして、DNA バーコーディングを利用した研究では、新たに構築されたコンピュータプログラム (query-centric auto-k-nearest-neighbor: QCauto) が、高速かつ客観的に既知 DNA 情報と照合することで、あらゆる生物種を識別できる可能性を展開した (Tanabe and Toju 2013)。このように、近年では一層の技術展開が広がっているが、現在もなお伝統的な分子マーカーは、多くの生物種に対して用いられ効果を発揮している。

1. 5 研究目的と本論文の構成

これまで、ニガナ種内の系統関係と分類体系に関して、多くの研究者により

様々な議論や研究が行われてきた。しかしながら、それらの研究は、植物個体の形態学的特徴や染色体の構造・構成に基づいた情報が用いられており、分子系統学的なアプローチに基づいた情報については、示されてこなかった。形態学的特徴や核型分析に基づいた情報は、個体間を区別できるが、相違する一連の形質のうち、本質的で重要な形質を識別することが困難であるため、系統関係を明瞭に追跡することができない。分子系統学的な情報を取り入れることによって、ニガナ種内分類群の系統関係を推定し、進化的道筋を考慮した自然分類から分類体系を正統的に評価できるだろうと考えられる。

さらに、本種の亜種イソニガナについては、遺伝的多様性と遺伝資源の保全の面から、その保全を考えるべきである。イソニガナは、新潟県の海岸沿いにのみ自生する固有種であり、分布域が狭い。人里に分布していることから、高い絶滅リスクが懸念される。絶滅危惧種の保全を図るためには、個体群の分布域情報と個体群ごとの現状個体数、さらに個体群が生育する周辺環境情報を把握することが必須情報となる。そして、各個体群内及び個体群間の遺伝的多様性を評価することで、効果的な保全対策へのアプローチへ着手できることが期待される。

本研究は、分子遺伝学的なアプローチによって、ニガナ種内の遺伝的多様性を明らかにすること及び、絶滅危惧種イソニガナにおける個体群の生育状況や現状の遺伝的多様性を把握した上で保全対策の検討を行うことを目的として遂行した。

第 2 章では、ニガナ種内の系統関係の解明と分類体系の評価を目的とし、本研究で得られた各分類群に対する形態特性、染色体数計測、そして分子マーカー利用による多型解析を行った結果を報告する。

第 3 章では、絶滅危惧種イソニガナの現状の把握と保全アプローチの検討を目的とし、イソニガナ個体群の調査、そして各個体群を対象とした分子マーカー

を利用した遺伝解析を行った結果を報告する。

第 4 章では、総合考察として、ニガナ種内の分子系統学的解析から提案される分類体系、本研究で中心的に用いられた分子マーカーの有効性、絶滅危惧種イソニガナの遺伝的多様性と保全アプローチに関する検討について議論する。



Fig. 1-1 ニガナ (*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev subsp. *dentatum*)。

Table 1-1 初期のニガナ種内の分類体系 (Kitamura 1956)。

学 名	和 名
<i>Ixeris dentata</i> (Thunb.) Nakai	ニガナ
f. <i>atropurpurea</i> (Nakai) Hara	クロニガナ
var. <i>albiflora</i> (Makino) Nakai	シロバナニガナ
f. <i>amplifolia</i> Hiyama	ハナニガナ
var. <i>stolonifera</i> Nemoto	ハイニガナ
subsp. <i>alpicola</i> (Takeda) Kitam.	タカネニガナ
var. <i>tenuissima</i> (Honda) Hara	ホソバタカネニガナ
subsp. <i>kimurana</i> (Kitam.)	クモマニガナ
f. <i>albescens</i> Kitam.	シロバナクモマニガナ
subsp. <i>shiranensis</i> Kitam.	シラネニガナ
subsp. <i>nipponica</i> (Nakai) Kitam.	イソニガナ
subsp. <i>kitayamensis</i> Murata	ドロニガナ

Table 1-2 現在のニガナ種内の分類体系（米倉・梶田 2003, BG Plants index:
http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013;
 Yonekura 2005)。

学 名	和 名
<i>Ixeridium dentatum</i> (Thunb.) Tzvelev	
subsp. <i>dentatum</i>	ニガナ
f. <i>stoloniferum</i> (Kitam.) Yonek.	ハイニガナ
subsp. <i>nipponicum</i> (Nakai) J. H. Pak et Kawano	イソニガナ
var. <i>albiflorum</i> (Makino) Tzvelev	シロバナニガナ
f. <i>amplifolium</i> (Kitam.) H. Nakai et H. Ohashi	ハナニガナ
f. <i>atropurpureum</i> (Nakai) H. Nakai et H. Ohashi	クロニガナ
subsp. <i>kimuranum</i> J. H. Pak et Kawano	クモマニガナ
subsp. <i>ozense</i> (Sugim.) Yonek.	オゼニガナ
subsp. <i>shiranense</i> (Kitam.) J. H. Pak et Kawano	シラネニガナ
subsp. <i>kitayamense</i> (Murata) J. H. Pak et Kawano	ドロニガナ

Table 1-3 これまでに報告されてきた各分類群における染色体数。

分類群	染色体数	引用
ニガナ	2n = 14	Pak and Kawano (1990b)
	2n = 21	岡部 (1932, 1935) ; 竹本 (1954, 1970) ; 西岡 (1956) ; Takemoto (1962) ; Nishioka (1963) ; Fujishima (1984) ; Pak and Kawano (1990b)
	2n = 28	Fujishima (1984, 2001) ; Pak and Kawano (1990b)
ハイニガナ	2n = 14	Nishioka (1963) ; 竹本 (1970)
	2n = 21	西岡 (1960) ; Takemoto (1962, 1970)
イソニガナ	2n = 14	西岡 (1956, 1960) ; 竹本 (1956, 1970) ; Nishioka (1963) ; Takemoto (1962) ; Pak and Kawano (1990b) ; Fujishima (2001)
シロバナニガナ	2n = 21	岡部 (1932) Takemoto (1962, 1970) ; Fujishima (1984)
ハナニガナ	2n = 14	Takemoto (1962) ; 竹本 (1970)
	2n = 21	竹本 (1954, 1970) ; 西岡 (1956, 1960) ; Takemoto (1962) ; Nishioka (1963) ; Fujishima (1984, 2001)
	2n = 28	Fujishima (2001)
クロニガナ	2n = 21	岡部 (1932)
クモマニガナ	2n = 14	Nishioka (1963)
	2n = 21	Nishioka (1963) ; Pak and Kawano (1990b)
	2n = 28	岡部 (1935) ; 西岡 (1960) ; Takemoto (1962) ; Nishioka (1963) ; 竹本 (1970) ; Pak and Kawano (1990b)
オゼニガナ	Unknown	
シラネニガナ	2n = 21	Nishioka (1963)
ドロニガナ	2n = 14	西岡 (1960) ; Takemoto (1962) ; Nishioka (1963) ; 竹本 (1970) ; Pak and Kawano (1990b)
	2n = 21	竹本 (1970) ; Pak and Kawano (1990b)



ニガナ



ハイニガナ



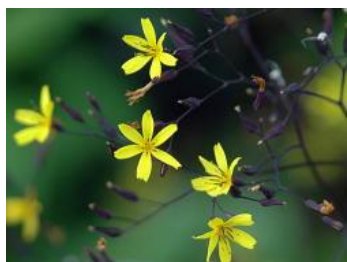
イソニガナ



シロバナニガナ



ハナニガナ



クロニガナ



クモマニガナ



オゼニガナ



シラネニガナ



ドロニガナ

Fig. 1-2 ニガナ種内に分類される植物。



Fig. 1-3 イソニガナ (*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev subsp. *nipponicum* (Nakai)
J.H.Pak et Kawano)。

Table 1-4 各分子マーカーによる多型解析の特徴 (津村 2007)。

分子マーカー	DNA ライブラリー	操作	塩基配列データ	多型性	必要な DNA 量	検出特性
RFLP	必要	やや労力必要	不要	中	多量	共優性
SSR	必要	時間・労力必要	必要	極高	微量	共優性
STS	必要	時間・労力必要	必要	中	微量	共優性
CAPS	必要	時間・労力必要	必要	中	微量	共優性
RAPD	不要	簡単	不要	中	微量	優性
ISSR	不要	簡単	不要	中	微量	優性
AFLP	不要	比較的簡単	不要	高	微量	優性

第2章 ニガナ種内の分類群に対する分子系統学的解析

2. 1 緒言

ニガナ種 (*Ixeridium dentatum*) は、多くの種内分類群を含む複合種であり、各分類群は形態特性や核型解析に基づいて種内で 6 亜種、1 変種、3 品種に分類されている (米倉・梶田 2003, BG Plants index: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013; Yonekura 2005, Table 1-2, Fig. 1-2)。しかしながら、これら分類群については未だ分子系統学的解析による情報が示されておらず、また分類群間の具体的な系統関係も明らかにされていない。したがって、分子系統解析によるデータを基に、ニガナにおける系統関係を明らかにすることは、その進化過程を推定する上で大きな意義がある。

キク科の分子系統学的解析では、特定のゲノム領域、例えばリボソーム DNA (rDNA) の Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域、External Transcribed Spacer (ETS) 領域、葉緑体遺伝子配列 (*rbcL* や *matK* など) を対象とした解析、及び全ゲノムを対象とした AFLP や RAPD などの解析手法が、多様な系統関係を明らかにするために組み合わせられ、用いられてきた (Smitsen and Breitwieser 2008; Sehgal *et al.* 2009; Galbany-Casals *et al.* 2012)。ITS 領域と AFLP データの組み合わせは、これまでも多くの他の植物種の分子系統学的解析として適用されてきた (Hodkinson *et al.* 2000; Huang *et al.* 2002; Marhold *et al.* 2004; Gottlieb *et al.* 2005; Kolarčik *et al.* 2010)。

本研究では、ニガナ種内の各分類群及びその近縁種の計 74 個体から試料を採取し、まずそれらの形態特性及び倍数性レベルを調査した。それから、分子系統学的アプローチとして、各個体からゲノム DNA を抽出し、ITS 領域の配列及び AFLP による分子系統学的解析を行った。また、分子系統学的解析によって得られたデータに基づいて、分子系統樹を構築した。本章では、ITS 領域と AFLP

による分子系統学的アプローチから明らかになったニガナ種内の系統関係と、新たな分類体系の提案に関して議論する。またここでは、新たな分類群として位置付けられると考えられた個体に関する報告も報告する。

2. 2 実験材料及び方法

2. 2. 1 植物試料の採取

試料を採取するにあたり、まず図鑑、論文、ウェブサイトの情報を通じてニガナに分類される個体群の生育域に関する情報を得た。野外における植物試料では、本学を含めた新潟県及び、その隣県に位置する群馬県、福島県、長野県に自生するニガナ種及び近縁種の個体を採取することとした (Fig. 2-1)。また、隔離分布を示す亜種には、高山や亜高山に自生する種類も存在する。これらに関して得られた情報では、生息地の多くが自然公園法に基づいて保護され、植物の採取が規制されている場所になっていた。そのため、作業許可が必要な場所については、事前に必要な申請書類を提出し、許可を得た上で採取作業を行った (Table 2-1)。

採取作業においては、イソニガナのような絶滅危惧種や小さな局所個体群を有する隔離分布種も含まれるため、個体群の現状に対して直接的なダメージを与えないことが重要である。そこで、本研究では、試料採取は種子採集により行うこととした。ニガナの果実（種子）は瘦果であり、埋土種子として長期間土中で休眠することはないため、現存する植物個体が、その個体群の遺伝的多様性を担っており、定着個体の株採取は避けることが望ましい。宿根多年草であるニガナは、個体群の維持と更新に必要な数を大きく上回る数の種子を毎年散布し、そのうちごく少数が、次世代の定着個体となるため、種子採取が個体群の維持及び遺伝的多様性に対して与える影響は、極めて小さいと考えられる。

ニガナ種内の分類群のうち、野外で植物試料を取得できなかった亜種や品種に関しては、ドロニガナを筑波実験植物園より提供を受け、クロニガナを株式会社アルペンガーデンやまくさより購入することでそれぞれ取得した。また、本研究ではハイニガナとシラネニガナについては取得することができなかった。一方、ニガナ種ではないが、タカネニガナとジシバリは、ニガナ種の近縁種として取得した。各分類群の個体の採取地、入手先に関して、Table 2-2 にまとめる。

採取した種子は、有機プランター培養土（あかぎ園芸株式会社）を敷いたセルトレイ（49 穴）に播種し、温度管理された室内において人工照明下で発芽させた。そこから得られた幼植物体の根を倍数性レベルの推定に用い、葉を分子系統学的解析に供試する DNA 抽出に用いた。

2. 2. 2 形態特性の観察

ニガナ種内の各分類群の形態特性には、花色、小花数、体色が有効な識別項目になる（Nakai 1920, 1928; 岡部 1935; 村田 1952; 北村 1955; Kitamura 1956; Pak and Kawano 1992; Iwatsuki *et al.* 1995）。そこで、各個体の形態観察は、これらを含めた花色、小花数、体色、葉形、葉輪郭の 5 項目に関して調査した。種子収集時に種子を形成する前の開花段階にある植物体を観察できた場合、野外での採取作業を行った現地で直接項目調査と記録を行った。一方、すでに種子を作出した状態の植物体で花色と小花数が確認できない場合は、その種子を採取して発芽から開花まで生育させ、観察を行った。

2. 2. 3 倍数性レベルの推定

倍数性レベルの推定を行うにあたって、染色体標本作製するために従来から多くの方法が植物一般に用いられてきた。特に注意すべき点は、1 細胞中の

染色体を明瞭に染め、観察時に染色体が重ならないようにすることである。染色方法には、酢酸カーミン、酢酸オルセイン、フォイルゲン染色など、試薬を用いた多くの手法があり、染色体を散乱及び展開させる方法には、押し潰し法や酵素解離法などがある。本研究では、染色体標本の作製方法の中では比較的容易で迅速的に展開できる染色体を酢酸カーミンによって染色し、押し潰し法による方法を行った。実際の手順は、【付録】の通りである。

2. 2. 4 DNA 抽出

ゲノム DNA の抽出は、室内の人工照明下で発芽させた植物体から 100 mg の葉を試料として採取し Plant Geno-DNA Template (G-Biosciences, St. Louis, MO) を用いて行った。抽出操作は、キットのマニュアルに従った。抽出した DNA の純度 (A 260 / A 280) と濃度は、GeneQuant RNA / DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) を用いて測定した。

2. 2. 5 ITS 領域の配列解析

ITS 領域は、植物を含む真核生物の rDNA 中のスペーサー領域である。この配列は、rDNA の反復配列中の 18S - 5.8S rRNA コード領域間の ITS1、5.8S - 28S rRNA コード領域間の ITS2 という 2 ヶ所の領域からなる (Fig. 2-2)。また、それは、比較的高い進化速度で変異を蓄積する領域であり、一般的に種間レベルの識別が可能となる多様性を示す。初期の研究において、多くの生物種に有効で、これら領域を含む近傍の配列から安定して PCR 増幅可能なユニバーサルプライマーの設計が行われた (White *et al.* 1990)。本研究では、White *et al.* (1990) によって設計されたユニバーサルプライマー (ITS1 : 5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3'、ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') を用い、2 ヶ所の ITS 配列を含む領域の PCR 増幅を行った。試料には、ニガナ種内の各分類群

及び近縁種から、それぞれ 1 個体のゲノム DNA を用いた。実際の手順は、【付録】の通りである。

2. 2. 6 AFLP による多型解析

AFLP は、ゲノム全体を対象として種間や品種間などの差異を多型として検出する手法である (Vos *et al.* 1995)。また、事前に配列情報を必要とせず、原理的には全ての生物種に適用できるため、分子系統学において主要な解析手法の一つとなっている。この手法は、主として制限酵素処理、アダプターライゲーション、一次増幅、二次増幅の 4 つのステップで構成されている (Fig. 2-3)。AFLP では、最初の制限酵素処理による認識部位の位置、さらにこれら認識部位近傍の塩基配列と認識部位間の配列の長さが、それぞれ多型として検出される。このように、いくつもの多型検出の機会が与えられるため、一度の解析で多くの情報を得ることができるのが最大のメリットである。試料には、採取・収集したニガナ種内の各分類群及び近縁種 74 個体のゲノム DNA を用いた。AFLP のステップのうち、一次増幅及び二次増幅には TaKaRa Ex Taq polymerase を用いた。この Taq polymerase 利用による本研究と類似した手法が用いられた以前の研究には、例としてオオムギ、ダイズ、トリバニンジンが対象とされており、ニガナに対しても十分に適用可能だと考えられた (馬場ら 2002; Matsumura *et al.* 2005; Choi *et al.* 2008)。また、二次増幅において、10 組のプライマーを用いた (Table 2-3)。実際の手順は、【付録】の通りである。

2. 2. 7 系統樹構築

系統樹は、生物の系統学的関係を示す樹形図であり、階層的クラスター解析によって与えられたデータから構築される。階層的クラスター解析には、様々な方法があり、中でも距離行列法の一つである近隣結合法は、計算量が少ない点で

効率的である (Saitou and Nei 1987)。また、全ての系統に対して進化速度を一定と仮定しないので、より真に近い系統関係を推定することができるかとされている。本研究では、ITS 配列と AFLP 多型で得られた情報に対して、この近隣結合法による階層的クラスター解析を行い、系統樹を構築した。実際の手順は、【付録】の通りである。

2. 3 結果

2. 3. 1 形態特性及び倍数性レベル

本研究では、13ヶ所の地域での種子採取、及び植物個体の提供と購入により、近縁種を含め 74 個体の植物試料を採取した。そして、現在の分類体系の分類群の識別を含め、これら個体の形態特性の観察と倍数性レベルの推定を行った (Table 2-4)。クモマニガナやオゼニガナのような生育場所が高山や湿地に限られる亜種を除いて、形態特性として特に花色、小花数、そして体色が、ほとんどの分類群を分類し、特徴付ける有用な情報となった。葉の形態特性に関しては、イソニガナだけが、卵形の葉を持ち特異性を示したが、他の分類群では、線形、披針形、へら形のいずれかからなる葉を持ち、明確な違いが確認されなかった。倍数性レベルに関しては、イソニガナとドロニガナは 2 倍体 ($2n=2x=14$)、クモマニガナは 4 倍体 ($2n=4x=28$)、その他のニガナ種内の分類群は全て 3 倍体 ($2n=3x=21$) であった (Fig. 2-4)。

2. 3. 2 分子系統学的解析

2. 3. 2. 1 ITS 配列に基づいた系統解析

ITS 配列の解析には、各分類群から 1 個体ずつを用いた。決定した ITS1 と ITS2 の配列を統合し、アラインメントを行った結果、ニガナ種内の分類群間で 13ヶ所 (2.7%)、ニガナ種とタカネニガナとの間で 31ヶ所 (6.5%) の相違が

あった。これら相違は、全て塩基置換であり、ニガナ種内の分類群間では挿入及び欠失は確認されなかった。クロニガナ、オゼニガナ、黄花型ニガナの配列が同一であり、同様にハナ様ニガナ、ドロニガナ、白花型ニガナの配列が同一だった。

ITS 配列に基づいて構築した系統樹は、ニガナ種とタカネニガナとの間では、十分な枝の長さで高いブートストラップ値を伴い、明確な種間差を示した (Fig. 2-5)。対照的に、ニガナ種内の分類群間の差異は、ほとんど示されなかった上、形態特性や倍数性レベルのような他の要因との関連性が示唆されなかった。

2. 3. 2. 2 AFLP に基づいた系統解析

AFLP による多型解析は、バンドプロファイルにより 1 個体ごとに 757 個からなるバイナリーデータ (多型率: 97.0%) を得た (Fig. 2-6)。このデータに基づいて構築した系統樹は、各分類群を分岐する枝に対して高いブートストラップ値を示した (Fig. 2-7)。各分類群は、それぞれ単系統となるクラスターを形成し、さらに各クラスター中で複数の地域で採取した個体は、地理的な関連性に従ってサブクラスターを示した。

2. 4 考察

2. 4. 1 形態特性及び倍数性レベル

本研究では、倍数性レベルに関して、イソニガナとドロニガナは 2 倍体、クモマニガナは 4 倍体、その他のニガナ種内の分類群は全て 3 倍体であった (Table 2-4)。これらの結果は、過去の報告と一致していた (竹本 1954, 1956, 1970; Takemoto 1962; 西岡 1956, 1960; Nishioka 1963; Pak and Kawano 1990b; Fujishima 1984, 2001)。

ここで、採取した植物試料のうち、現在の分類体系の分類群に適用し難い個体について述べる (Table 2-4, Fig. 2-8)。

第一に、柵池高原で採取したニガナの分類群に含まれる個体である。ここで採取した個体には、花色が黄色と白色でそれぞれ識別されるものが観察された。以前の報告では、黄色花色と白色花色でそれぞれ品種として識別されることが提案されており、学名として、黄色花色のニガナは *Ixeris dentata* (Thunb.) Nakai、白色花色のニガナは *Ixeris dentata* (Thunb.) Nakai f. *albida* Kitam. とされた (Kitamura 1956)。しかしながら、現在の分類 (米倉・梶田 2003, BG Plants index: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013; Yonekura 2005) によれば、白花花色のニガナは、独立した分類群としては分類されていない。本研究では、これら花色によって差異が確認されたニガナに関して、便宜的に黄花型ニガナと白花型ニガナと仮称した分類群として区別することとした。

第二に、ニガナとハナニガナの中間的な形態特性を示した個体である。この個体は、葉の形態特性がハナニガナに類似しているものの、小花数がニガナとハナニガナの間を示した。本研究では、長岡技術科学大学の学内で採取したものだけを試料としたが、他にも新潟県内では鯨波や弥彦山、長野県内では柵池高原においても同じ形態特性を示した植物体が複数観察されている。また、最近では野草愛好家の間でも、この個体の認識があり、植物図鑑によってはアイノコハナニガナとして区別されることがある (岩槻 2006)。本研究でも、この個体を区別するために、便宜的にハナ様ニガナと仮称し、ハナニガナと同じ階層の分類群として一時的に位置付けた。

第三に、長岡技術科学大学の運動場内にある湿地で自生していた個体である。この個体は、自生地特性と花色及び小花数においてオゼニガナの特徴に類似していた。オゼニガナは、尾瀬国立公園の中でタイプ標本が得られたもの

であり、尾瀬固有のものではない。実際に、青森県十和田市の湿原地域でオゼニガナの個体群が確認された報告がある（環境省 2012b）。本研究は、この個体を区別するために、便宜的にオゼ様ニガナと仮称し、オゼニガナと同じ階層の分類群として一時的に位置付けた。

2. 4. 2 分子系統学的解析

ITS 配列の解析では、ニガナ種内の分類群間の差異は、ほとんど示されなかった。さらに、形態特性及び倍数性レベルとの関連性が不明確であった（Fig. 2-5）。したがって、ニガナ種内の分類群間の系統関係を調査する目的での、ITS 配列の利用は、極めて困難であると考えられる。

一方、AFLP 解析では、2.4.1 節で述べた形態特性の理由により仮称として位置付けられた 3 つの分類群に関して、白花型ニガナは、黄花型ニガナやクロニガナの姉妹群として位置付けられ、ハナ様ニガナ及びオゼ様ニガナは、オゼニガナの姉妹群として位置付けられた（Fig. 2-7）。特に、オゼ様ニガナは、オゼニガナと直接分岐することを示した。したがって、白花型ニガナ及びハナ様ニガナは、現在分類されているどの分類群にも当てはめられず、新たな分類群になる可能性があり、そしてオゼ様ニガナはオゼニガナであることが強く示唆された。

また、構築した系統樹は、自生地、形態特性、特に小花数に基づいて 5 つの Group に分けられるだろうと考えられた（Fig. 2-7）。そして、5 つの Group における各分類群は、花色や体色によって識別された。近縁種として採取したタカネニガナは、クモマニガナやドロニガナと密接な関係にあることが分かった。しかしながら、ITS 配列に基づいた系統解析の結果に基づいて、タカネニガナの遺伝的距離がニガナ種内のどの分類群に対しても十分に離れていたことから、別種として識別されることは明確となった（Fig. 2-5）。よって、

この Group 分類では、タカネニガナを Group I には入れないこととした。

倍数性の変動は、Group I と Group II で生じていたことが分かった (Fig. 2-7)。植物進化の特徴の一つは、染色体倍化が頻繁に生じることであり、さらに多年生植物は、比較的多くの倍数体シリーズを保有する傾向にある (Stebbins 1950, 1971)。そのような特徴に従えば、多年生植物であるニガナ種もまた 2 倍体起源の祖先から分化してきたと考えられる。実際に、Nishioka (1963) や Fujishima (2001) は、ニガナ種内分化の推定を 2 倍体起源として考えている。したがって、ニガナ種の祖先が 2 倍体起源だとするならば、倍数性の変動は、Group II と Group III の共通祖先と、Group IV と Group V の共通祖先とが分岐した時期にも起こっていたことが推定される。

通常、自生地や形態特性による分類群の区分は、人為分類であり、必ずしも自然分類とは一致しない。しかしながら、現在の分類体系における分類群の判断材料として調査した形態特性は、AFLP に基づいて分子系統学的に構築した自然分類にほとんど適合する結果となった。ただし、白花型ニガナとクロニガナが直接の分岐を伴いクラスターを示した一方、黄花型ニガナが、このクラスターから除外される系統関係になった。したがって、花色に基づいた分類は、人為分類であり、自然分類を反映しないと考えられる。対照的に、小花数に基づいた分類は、自然分類と一致していると考えられ、ニガナ種の種内分化において重要な形態変異であったと考えられる。

2. 5 結言

本研究は、多くの亜種、変種、品種からなる複合種ニガナ種内の系統関係を明らかにするために、形態特性、倍数性レベル、ITS 配列、AFLP を利用した。倍数性レベルは、2 倍体から 4 倍体の範囲で観測された。ITS 配列は、ニガナ種内の分類群間でほとんど差異が見られなかった。AFLP に基づいた分子

系統学的解析は、ニガナ種内の分類群が自生地と形態特性とよく一致する 5 つの Group に分けられることを明らかにした。そして、各 Group には、異なる形態特性や倍数性レベルを伴う分類群が含まれていた。また、現在の分類体系に記載されていない新たな 3 つの独立したクラスターを示した。白花型ニガナと仮称した分類群は、黄花型ニガナとクロニガナが含まれる小花数 5~6 を共通の形態特性とする Group に位置付けられた。そして、ハナ様ニガナとオゼ様ニガナとそれぞれ仮称した分類群は、オゼニガナが含まれる小花数 6~8 を共通の形態特性とする Group に位置付けられた。これらのうち、白花型ニガナ及びハナ様ニガナは、新たな分類群になる可能性がある。一方、オゼ様ニガナはオゼニガナの姉妹群として位置付けられたことから、これら双方を統合しオゼニガナとすることが妥当であることが示唆された。

ニガナ種の種内分化において、各分類群が同質倍数体あるいは異質倍数体のどちらに起因しているかは、明確にすべき問題の一つである。これまでの報告によれば、分類群間の一連の染色体セットは、核型解析によって対応関係を示したことから、同質倍数体に由来することが示唆されてきた (竹本 1954; 西岡 1956; Takemoto 1962; Nishioka 1963; Fujishima 1984)。一方で、本研究では、ITS 配列による分子系統学的解析からこの問題について指摘することができる。すなわち、全ての分類群間における ITS 配列は、ほとんど差異を示さず保存性が非常に高いことが明らかになった。このことは、rDNA のような高度反復領域で協調進化が生じ、各分類群の一連の染色体セットで配列情報が均一になった可能性を与える。したがって、ITS 配列の解析結果からいえば、本研究もまた、ニガナ種の種内分化が同質倍数体に起因することを支持する。

現在のニガナ種内の分類は、自生地、形態特性、核型特性に由来する。本研究によって構築した分子系統樹は、それらに基づいた分類体系と完全な対応関係を示すものではなく、現在の分類が人為分類であることを示し、その一方で自然

分類に基づく新たな知見を与えた (Table 1-2, Fig. 2-7)。まず、AFLPによる多型解析結果に基づいて構築した系統樹では、各 Group で共通性を示した形態特性は小花数のみであり、AFLPによる多型と形態特性との関連性は低かった。したがって、形態特性は、真の分類体系の構築及び系統関係の推定に対する指標として不十分と考えられる。一方で、これら Group は、自生地と地理的分布に対して関連性を示した。例えば、Group I は、クモマニガナとドロニガナの 2 つの亜種で構成されている。クモマニガナは、多くの山岳の高山・亜高山帯で隔離分布として生育し、ドロニガナは、和歌山県、三重県、奈良県に位置する瀨峡だけで生育する固有種であることが知られている。対照的に、Group III と Group IV は、幅広い高度と領域に分布している分類群からなった。実際に、ニガナとハナニガナは、ニガナ種を代表する亜種と品種であり、日本中に分布している。また、本研究では、新潟県のニガナ及びハナニガナは、長野県や尾瀬国立公園の個体群と密接な関係を示した。最後に、本研究は、核型特性が分類体系の構築に対して効果的な指標にならないことを示唆した。それは、2倍体である 2 つの亜種、ドロニガナとイソニガナが、それぞれ異なる Group に配置されたからである。以上のように、本研究の分子系統学的解析は、従来の形態特性などを基準とした人為分類では識別できなかった多くの情報を明らかにすることができた。

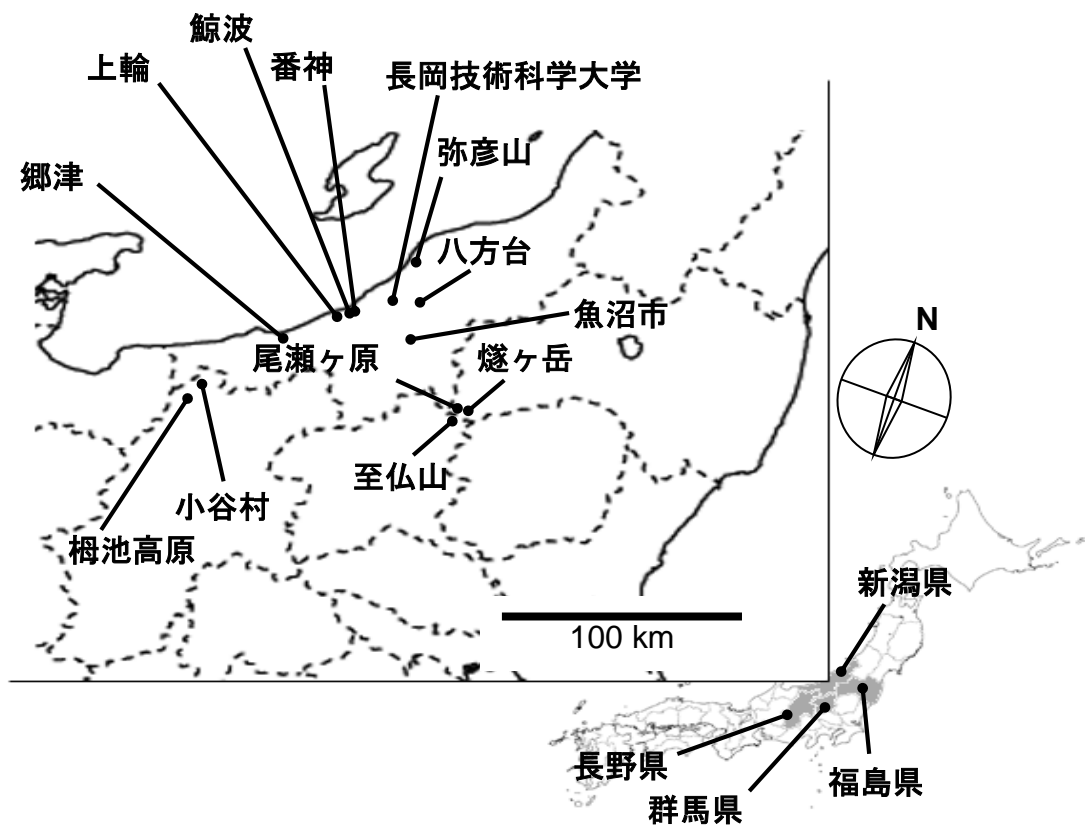


Fig. 2-1 野外採取を行った植物試料の採取地域の位置。

Table 2-1 自然公園法に基づいて保護されている地域での作業許可申請。

地域名称	申請内容【申請先（許可番号）】
尾瀬国立公園 (群馬県)	①自然公園法による特別保護地区での植物採取許可 【関東地方環境事務所（環関地国許第 090427003 号）】
	②自然公園法による第 1 種特別地域での植物採取許可 【関東地方環境事務所（環関地国許第 090427004 号）】
	③文化財保護法による特別天然記念物の現状変更許可 【片品村教育委員会（片教発第 17 号）】 【文化庁（20 委庁財第 4 の 8087 号）】
	④土地立入許可 【尾瀬林業株式会社】
	⑤森林法による保安林内での下草採取許可 【利根環境森林事務所】
尾瀬国立公園 (福島県)	①自然公園法による特別保護地区での植物採取許可 【関東地方環境事務所（環関地国許第 100412003 号）】
	②自然公園法による第 1 種特別地域での植物採取許可 【南会津地方振興局（20 南会振第 2167 号、21 南会振第 2220 号）】
	③文化財保護法による特別天然記念物の現状変更許可 【福島県檜枝岐村教育委員会（21 教第 24 号、21 教第 25 号）】 【福島県教育委員会（21 教文第 74 号、21 教文第 1031 号）】 【文化庁（21 受庁財第 4 の 6084 号、21 受庁財第 4 号の 1302）】
	④鳥獣保護区特別保護地区内での植物採取許可 【南会津地方振興局（福島県指令南会振第 190 号、22 南会振第 428 号）】
	⑤国有林入林許可 【会津森林管理署（21 会支第 276 号、22 会支第 244 号）】
	⑥森林法による保安林内での下草採取許可 【会津森林管理署（21 会支第 277 号、22 会支第 245 号）】 【南会津農林事務所（21 南会農林第 1126 号、22 南会農林第 985 号）】
中部山岳 国立公園 (長野県)	①自然公園法による第 1 種特別地域での植物採取許可 【長野県北安曇地方事務所（22 北安地環第 1-7 号）】
	②国有林入林許可 【中信森林管理署（中信管第 388 号）】
	③作業実施許可 【拇池高原観光協会】

Table 2-2 各採取地、入手先から得られたニガナ種内の各分類群及び近縁種。

採取地、入手先		取得した個体
新潟県	長岡技術科学大学	黄花型ニガナ、ハナニガナ、ハナ様ニガナ、オゼ様ニガナ
	八方台	ハナニガナ
	弥彦山	黄花型ニガナ、シロバナニガナ、ハナニガナ
	番神	イソニガナ
	鯨波	黄花型ニガナ、イソニガナ、ハナニガナ、ジシバリ
	上輪	ハナニガナ
	郷津	黄花型ニガナ、イソニガナ、ハナニガナ
	魚沼市	ハナニガナ
群馬県	至仏山	ハナニガナ
福島県	尾瀬ヶ原	黄花型ニガナ、ハナニガナ、オゼニガナ
	燧ヶ岳	クモマニガナ、タカネニガナ
長野県	小谷村	シロバナニガナ、ハナニガナ
	梅池高原	黄花型ニガナ、白花型ニガナ、ハナニガナ
筑波実験植物園		ドロニガナ
株式会社アルペンガーデン やまくさ		クロニガナ

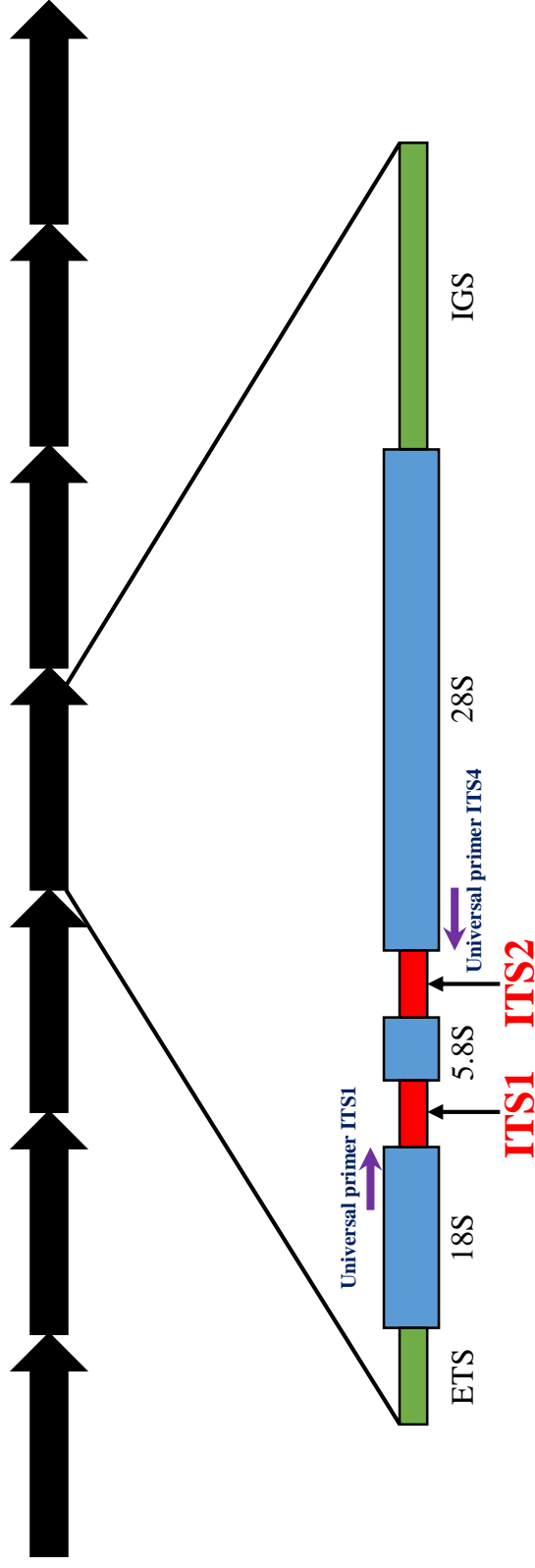


Fig. 2-2 ITS 領域とその近傍を示した模式図。植物を含む真核生物の rDNA は、External Transcribed Spacer (ETS) 領域、18S、ITS1、5.8S、ITS2、28S、Intergenic Spacer Region (IGS) を繰り返し単位とし、反復配列で構成されている。ITS 領域の配列を決定するために、本研究で PCR 増幅の際に用いたユニバーサルプライマー (ITS1、ITS4) がアニーリングされる位置は、それぞれ 18S と 28S に位置する。

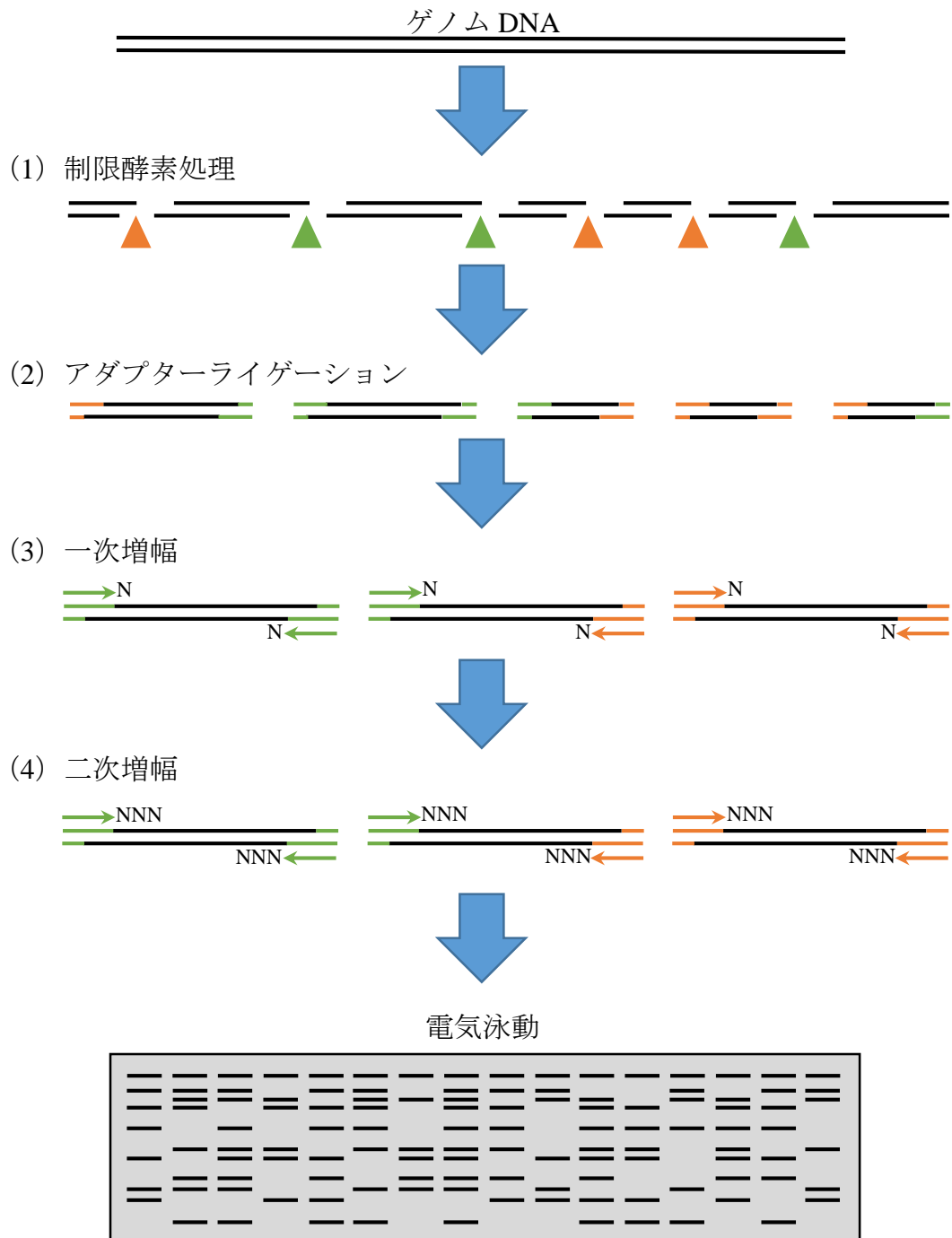


Fig. 2-3 AFLP による多型解析の原理。

Table 2-3 AFLP の二次増幅で用いたプライマーの組み合わせ。

各プライマー配列の 3'側の 3 塩基（赤字）は任意塩基になる。

プライマーペア	E-site (5'-3')	M-site (5'-3')
1	GACTGCGTACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAA CCC
2	GACTGCGTACCAATTC ATC	GATGAGTCCTGAGTAA CGC
3	GACTGCGTACCAATTC AGT	GATGAGTCCTGAGTAA CGC
4	GACTGCGTACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAA CTG
5	GACTGCGTACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAA CTC
6	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CAC
7	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CTG
8	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CGT
9	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CGG
10	GACTGCGTACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAA CCC

Table 2-4 各分類群に関する採取地、入手先ごとで示した形態特性及び倍数性レベルの調査結果。(N：個体数)

分類群 / 採取地、入手先	N	高度 (m)	形態特性			倍数性		
			花色	小花数	体色		葉形	葉輪郭
ニガナ種								
黄花型ニガナ								
長岡技術科学大学 (新潟県)	3	60	黄色	5~6	緑色	線形 / 披針形	全縁	3
弥彦山 (新潟県)	3	551	黄色	5~6	緑色	線形 / 披針形	全縁	3
鯨波 (新潟県)	2	31	黄色	6	緑色	線形 / 披針形	全縁	3
郷津 (新潟県)	1	28	黄色	6	緑色	線形 / 披針形	全縁	3
梅池高原 (長野県)	1	944	黄色	5	緑色	線形 / 披針形	全縁	3
尾瀬ヶ原 (福島県)	4	1405	黄色	5~6	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3
白花型ニガナ								
梅池高原 (長野県)	4	944	白色	5~6	緑色	披針形/ へら形	全縁	3

Table 2-4 (続き) 各分類群に関する採取地、入手先ごとで示した形態特性及び倍数性レベルの調査結果。(N: 個体数)

分類群 / 採取地、入手先	N	高度 (m)	形態特性				倍数性	
			花色	小花数	体色	葉形		葉輪郭
イソニガナ								
番神 (新潟県)	1	8	黄色	10~11	緑色	卵形	全縁	2
鯨波 (新潟県)	3	31	黄色	10	緑色	卵形	全縁	2
郷津 (新潟県)	4	28	黄色	10	緑色	卵形	全縁	2
シロバナニガナ								
弥彦山 (新潟県)	4	405	白色	9~10	緑色	披針形/へら形	全縁	3
小谷村 (長野県)	2	325	白色	9~10	緑色	披針形/へら形	全縁	3

Table 2-4 (続き) 各分類群に関する採取地、入手先ごとで示した形態特性及び倍数性レベルの調査結果。(N: 個体数)

分類群 / 採取地、入手先	N	高度 (m)	形態特性			倍数性		
			花色	小花数	体色		葉形	葉輪郭
ハナニガナ								
長岡技術科学大学 (新潟県)	3	60	黄色	9~12	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3
八方台 (新潟県)	1	565	黄色	10	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
弥彦山 (新潟県)	2	551	黄色	9~10	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
鯨波 (新潟県)	1	31	黄色	10	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3
上輪 (新潟県)	1	73	黄色	8~10	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
郷津 (新潟県)	2	28	黄色	8~11	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3
梅池高原 (長野県)	2	944	黄色	9~10	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
小谷村 (長野県)	1	325	黄色	10	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3
魚沼市 (新潟県)	2	189	黄色	8~10	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
尾瀬ヶ原 (福島県)	2	1405	黄色	8~9	緑色	披針形/ へら形	全縁	3
至仏山 (群馬県)	2	1818	黄色	9~10	緑色	披針形/ へら形	全縁 / 切れ葉	3

Table 2-4 (続き) 各分類群に関する採取地、入手先ごとで示した形態特性及び倍数性レベルの調査結果。(N：個体数)

分類群 / 採取地、入手先	N	高度 (m)	形態特性				倍数性	
			花色	小花数	体色	葉形		葉輪郭
ハナ様ニガナ								
長岡技術科学大学 (新潟県)	3	60	黄色	6~8	緑色	披針形/へら形	全縁	3
クロニガナ								
株式会社アルペンガーデンやまくさより購入	2	—	黄色	5	黒色	線形 / 披針形	全縁	3
オゼニガナ								
尾瀬ヶ原 (福島県)	3	1405	白色	6~8	緑色	披針形/へら形	全縁	3
オゼ様ニガナ								
長岡技術科学大学 (新潟県)	5	60	白色	6~8	緑色	線形 / 披針形	全縁	3

Table2-4 (続き) 各分類群に関する採取地、入手先ごとで示した形態特性及び倍数性レベルの調査結果。(N: 個体数)

分類群 / 採取地、入手先	N	高度 (m)	形態特性			倍数性		
			花色	小花数	体色		葉形	葉輪郭
クモマニガナ								
燧ヶ岳 (福島県)	5	2196	黄色	11	緑色	披針形/ へら形	全縁	4
ドロニガナ								
筑波実験植物園より提供	2	—	黄色	8~9	緑色	へら形	全縁	2
タカネニガナ								
燧ヶ岳 (福島県)	2	2310	黄色	10	緑色	披針形/ へら形	全縁	2
ジンババリ								
鯨波 (新潟県)	1	31	黄色	20	緑色	卵形	全縁	2

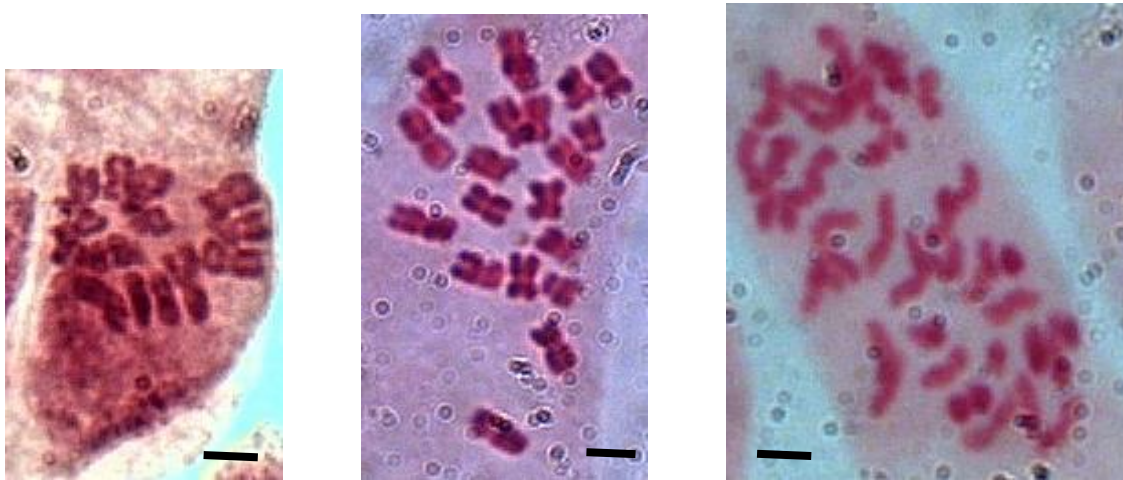


Fig. 2-4 ニガナ種内分類群で確認された各倍数体の染色体 (Bar = 30 μ m)。

左から、2 倍体 ($2n=2x=14$) のイソニガナ、3 倍体 ($2n=3x=21$) のニガナ、4 倍体 ($2n=4x=28$) のクモマニガナでそれぞれ観察された結果を示す。

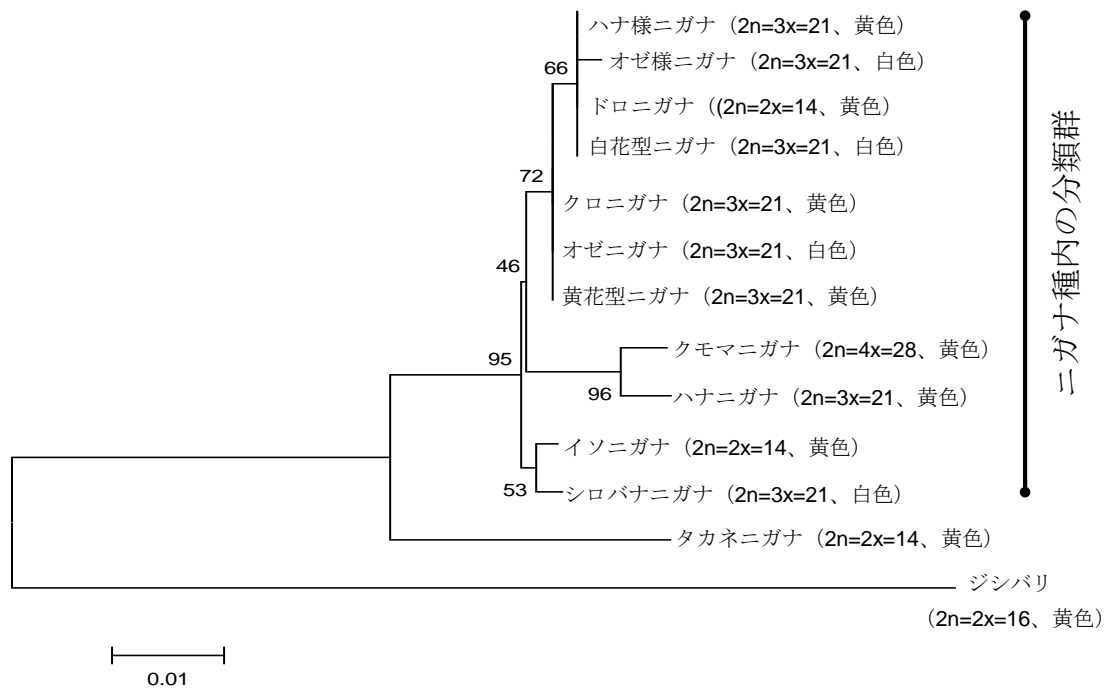


Fig. 2-5 ITS 配列に基づく系統解析として近隣結合法によって構築された系統樹。各枝にはブートストラップ値（1000 反復）を示す。各分類群の括弧内には、本調査で明らかになった倍数性レベルと花色の情報を示す。

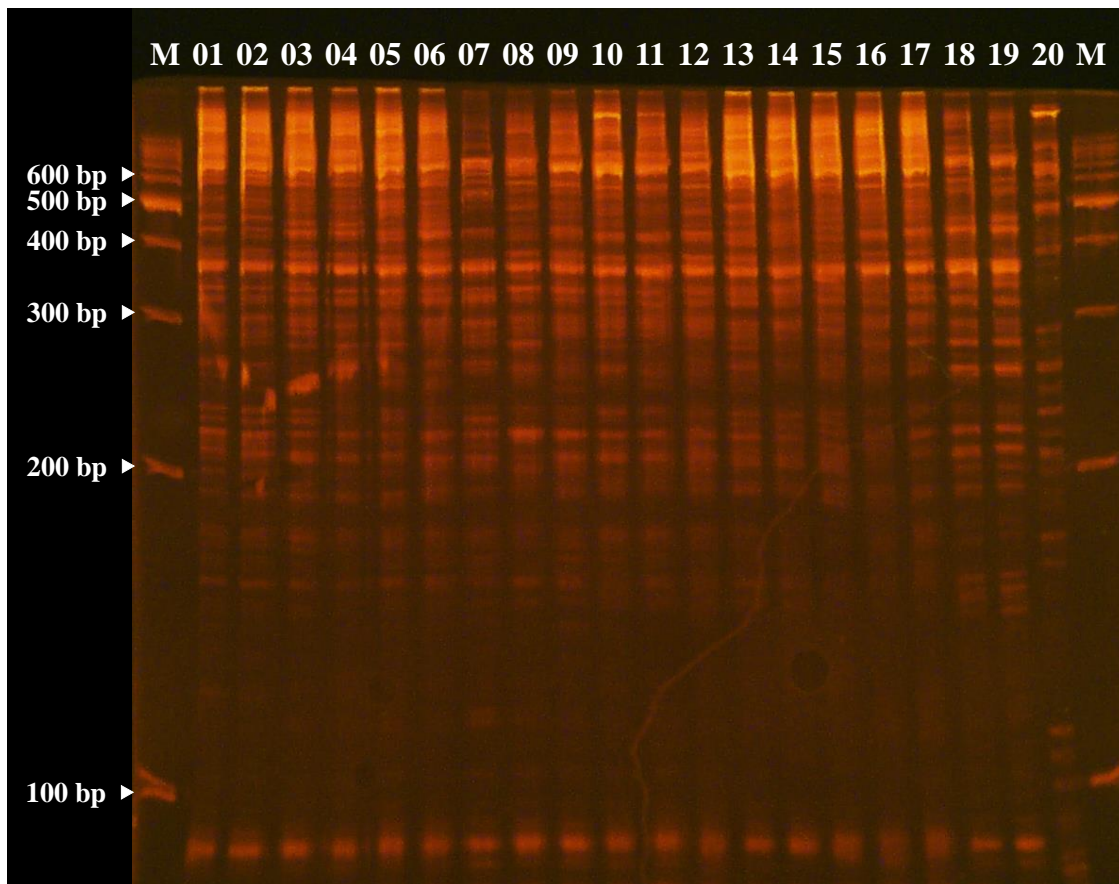


Fig. 2-6 AFLPによる多型解析の結果の一例（プライマーペアー10）。
レーン M は、分子量マーカー（100 bp Ladder）。レーン 01～20 は、
解析試料。

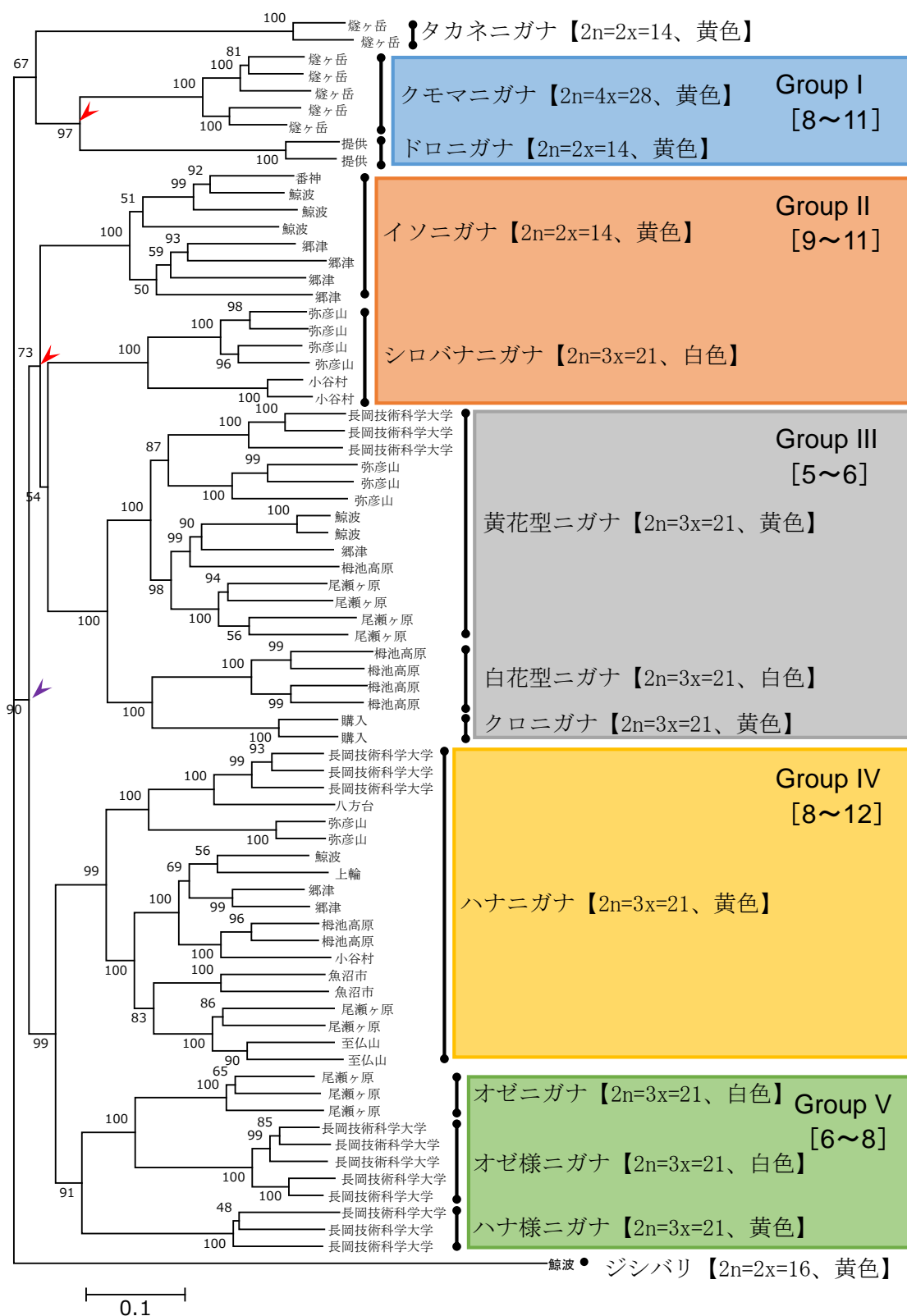


Fig. 2-7 AFLP による多型解析に基づく系統解析として近隣結合法によって構築された系統樹。各枝にはブートストラップ値 (1000 反復) を示す。

ノード中に示される赤色の矢印は、明確な倍数体変化を伴う分岐を示し、紫色の矢印は、推定される倍数体変化を伴う分岐を示す。各枝先の名称は採取地、入手先を示し、縦線の範囲内で各分類群がまとめられる。分類群の括弧内には、本調査で明らかになった倍数性レベルと花色の情報を示す。ニガナ種内の分類群は、自生地と形態特性によって 5 つの **Group** に分けられることを示唆する。小花数を各 **Group** 名の下に示す。



Fig. 2-8 現在の分類体系の分類群に適用できなかった個体。

本研究では、これら個体をそれぞれ白花型ニガナ（左）、ハナ様ニガナ（中央）、オゼ様ニガナ（右）と仮称した。

第3章 絶滅危惧種イソニガナの個体群内及び個体群間の遺伝的多様性

3.1 緒言

イソニガナ (*Ixeridium dentatum* (Thunb.) Tzvelev subsp. *nipponicum* (Nakai) J. H. Pak et Kawano) は、柏崎市内の海岸沿いで初めて発見された宿根多年生植物で、ニガナの亜種に分類されている (Nakai 1920)。この植物は、新潟県の海岸沿いにもみ自生する固有種で小さな自生地に点在し、全体の自生地面積も狭小である。環境変化の影響を受けやすい土地で生育していることから、初期の維管束レッドリストから、絶滅危惧 II 類 (Vulnerable, VU) として記載されている (環境庁 1997; 環境省 2012, レッドリスト, 植物 I (維管束植物) : http://www.biodic.go.jp/english/rdb/rdb_f.html, accessed September 16, 2013)。また、新潟県で発刊されている“レッドデータブックにいがた”でも、絶滅危惧 II 類のカテゴリーに記載されている (新潟県 2001)。そのため、イソニガナの保全と保護を図ることが急務とされている。

絶滅危惧種の保全と保護をどのように行うべきか戦略を立てるにあたって、まず基本情報として個体群の分布域と現状の個体数の把握が必要となる。さらに、遺伝的多様性を分子レベルで評価することで、より具体的な戦略を提案することにつなげられることが期待できる。そこで、個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造も把握することが重要となる。

分子マーカーは、様々なアプローチによって展開され、幅広い研究領域で用いられている。単純反復配列 (Simple Sequence Repeat; SSR, マイクロサテライト) マーカーには、他の分子マーカーと比べ超多型、共優性、再現性、操作的単純性、高い解像度のジェノタイピングといった様々な利点があり、集団遺伝学や系統学的研究だけでなく、マーカー育種、ゲノムマッピング、機能的ゲノミクスのような様々なアプリケーションにも効果的である (Kalia *et al.* 2011)。SSR

領域は、2～6 塩基対の単純な配列のタンデムリピートからなり、そのリピート数が同種個体間でも高度な多型を示す。SSR 領域を挟むように設計したプライマー間で PCR を行うことで増幅され、スラブゲル電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動で PCR 産物を分離することによって、異なるタンデムリピート数が多型として検出される (Arif *et al.* 2010)。

SSR マーカーは、AFLP のようにランダムな配列領域を検出する解析ではなく、事前に特定の配列情報を取得し、この配列領域を多型として検出する。そのため、開発された SSR マーカーは、ほぼ種特異的にしか適用されない。複合種ニガナを含むキク科植物では、すでに多くの種で SSR マーカーの開発の成功が報告されている (Mao *et al.* 2009; Nakagawa and Ito 2009; Nomura *et al.* 2009; Ruas *et al.* 2009; Lembicz *et al.* 2011)。

イソニガナは、新潟県の海岸沿いに固有の植物種とされているが、これまでの個体群の調査報告は、柏崎市及び上越市の一部の海岸沿いのみでしか調査が行われていない。そのため、新潟県にどれくらいの個体群が存在するか全貌が明らかになっていない。本研究は、まず新潟県の海岸沿いに自生するイソニガナ個体群の探索を行った。そして、発見した 10 ヶ所の個体群に対して 10 遺伝子座の SSR マーカーを用いて解析し、イソニガナ個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造を評価した。また、これらの結果に基づいて、イソニガナに対して最適と考えられる保全アプローチの検討を行った。

3. 2 実験材料及び方法

3. 2. 1 イソニガナの分布域調査及び試料採取

本研究は、イソニガナ個体群の分布域を探索するために、2012 年 5 月から 8 月にかけて新潟県の上越地方、中越地方、下越地方における海岸線の道路を

移動しながら調査を行い、道路沿いの土地に対して、可能な範囲の全てにおいて実見調査を行った。個体群を発見した際の調査項目として、個体数、個体群の被覆面積、緯度と経度、高度を記録した。また、面積、緯度と経度、高度に関する数値は、GPS (eTrex Vista HCx, Garmin, Kansas, USA) を用いて測定した。

SSR マーカーによる多型解析に用いる DNA を得るために、調査によって発見した 10 個体群からランダムに個体を選び、1 個体から 1 枚の葉を採取し、計 421 個体の葉を DET buffer (20% DMSO, 0.25 M EDTA, 100 mM Tris, pH 7.5, and NaCl to saturation; Seutin *et al.* 1991) で保存した。

3. 2. 2 DNA 抽出

本章では、大量の試料を用いることから、ゲノム DNA を抽出するにあたって、迅速かつ低コストで、DNA を得る抽出法を必要とした。そこで、本研究は、市販のキットを使用せず、植物の DNA 抽出実験において一般的な CTAB 法に改良を加えた方法によって DNA を抽出することとした (Chen and Ronald 1999)。実際の手順は、【付録】の通りである。

3. 2. 3 SSR マーカーの開発

SSR マーカーは、多型性が非常に高く共優性であることから、同種の個体間や個体群間でさえも遺伝的差異を検出することができるという特徴を持つ。しかしながら、他の分子マーカーの開発と比較すると、SSR マーカーの開発には多大な労力と時間が必要であり、相対的に大きなコストが負担となる。従来の SSR マーカーの開発方法は、コロニーハイブリダイゼーションを基本としていた。この方法では、まず制限酵素処理やランダム増幅により得られた DNA 断片をベクターにライゲーションされる。そして、このベクターを大腸菌に形質転換した後、培養した形質転換体のコロニーと化学的に標識した反復配列を

含むオリゴヌクレオチドプローブをハイブリダイゼーションすることで SSR 領域を含む断片を持つコロニーがスクリーニングされる。最終的に、ベクターを回収し配列決定を経て SSR マーカーが開発される。従来の SSR マーカーの開発は、この方法が頻繁に利用され、その後には磁気ビーズを用いた選択的なハイブリダイゼーションを取り入れるなどいくつかの工夫により、この方法の改良が施されることで、開発効率は向上したものの依然として労力、時間、コストがかかるという問題は残されていた。そこで、Lian and Hogetsu (2002) によって新たな SSR マーカーの開発方法が考案された (Fig. 3-1)。この方法では、まず制限酵素処理した DNA 断片にアダプターをライゲーションし、アダプター配列と相補的なプライマーと反復配列のプライマーを用いて PCR によってアダプターと SSR 領域間を増幅し、この増幅断片の配列中からプライマーを設計する。続いて、その設計したプライマーとアダプター配列と相補的なプライマーを用いて PCR によって SSR 領域近傍とアダプター間を増幅することで、増幅断片の配列中からプライマーを設計する。これら設計したプライマーセットを用いることで、SSR 領域を挟んで PCR 増幅することができ、試料間で遺伝的多型が検出されれば SSR マーカーとして利用することができる。この新たな方法は、初期の方法と比較すると、費用、労力、時間の点で大きく効率が向上しており、開発にかかる問題も大いに解消された。そこで、本研究は、この方法を用いてイソニガナに有効な SSR マーカーの開発を行った。実際の手順は、【付録】の通りである。

3. 2. 4 SSR マーカーによる多型解析

SSR マーカーによる多型は通常、SSR 領域を含むプライマーセットを用いて PCR 増幅後、その増幅断片をキャピラリー電気泳動によって分離することで検出される。この分離技術では、検出感度が高く、1~2 塩基の差異を比較的

容易に識別可能とするが、ランニングコストがかかるという点で問題がある。この代替手法として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離が有効であると考えられる。この際、ゲル濃度を高くすることでキャピラリー電気泳動と同様に1~2塩基の差異を識別できるようになる。本研究は、この代替手法を用いて、SSR マーカーによる多型解析を行うこととした。また、解析には、本研究で開発した SSR マーカーと共に、以前にニガナ種とその近縁種を対象として開発された SSR マーカーも利用した (Nakagawa and Ito 2009)。実際の手順は、【付録】の通りである。

3. 2. 5 遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造解析

生態学における遺伝的多様性を測る手法として、解析された個体もしくは個体群に対するデータセットから、数値計算によって導かれる様々な指標を用いる。特に、遺伝的多様性に関する指数の算出と、階層的もしくは非階層的クラスター解析による集団遺伝学的構造解析は、頻繁に用いられる。また、近年では集団遺伝学的構造に対する新たなクラスター解析として、ベイズモデルを利用した Structure 解析が考案され (Pritchard *et al.* 2000)、より客観的で詳しい集団遺伝学的構造を把握できるようになった。そこで、本研究は、SSR マーカーによる多型解析で得られたデータから遺伝的多様性に関する指数の算出、集団遺伝学的構造解析として Structure 解析及び階層的クラスター解析による系統樹構築を行った。各解析方法に関して、以下に述べる。

3. 2. 5. 1 遺伝的多様性に関する指数の算出

POPGEN version 1.32 (Yeh and Boyle 1997) を用い、ジェノタイプデータから対立遺伝子数 (N_A)、効果的対立遺伝子数 (N_E)、ヘテロ接合度の観測値 (H_O)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)、近交係数 (F_{IS})、Shannon's information index (I)、

Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱の評価を行った。

3. 2. 5. 2 Structure 解析

Structure 解析は、集団遺伝学的解析の一つであり、個体ごとに算出される対立遺伝子頻度を任意に設定された集団数、すなわち分集団に割り当てる。そして、各分集団の割合に基づき、個体群内及び個体群間の遺伝的多様性を評価することができる。したがって、ここで示す分集団とは、類似した対立遺伝子頻度を伴う個体の集まりのことである。

STRUCTURE version 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) を用い、バイナリーデータからベイズモデルに基づいたクラスター解析を行った。プログラムの設定は、Length of Burnin Period を 100000、Number of MCMC Reps after Burnin を 100000、Ancestry Model を Admixture Model、Allele Frequency Model を Allele Frequencies Correlated とした。解析の実行にあたって、分集団の範囲を $K = 1 \sim 20$ とし、解析回数を分集団数 (K) ごとに 10 反復とした。

ウェブベースソフトウェア STRUCTURE HARVESTER version 0.6.93 (Earl and vonHoldt 2011) を用い、Delta K (Evanno *et al.* 2005) 及び対数尤度値 ($\ln P(D)$) の各最大値から最適な分集団数 (K 値) を決定した。最適な K 値によって各分集団が割り当てられた個体は、試料を採取した地点ごとにグラフとしてまとめた。

3. 2. 5. 3 系統樹構築

Populations version 1.2.32 (<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) を用い、個体群間を対象とした階層的クラスター解析を行った。バイナリーデータから Nei の遺伝的距離 (D_A ; Nei *et al.* 1983) を算出し、近隣結合法による階層的クラスター解析、ブートストラップ解析 (1000 反復) を行った。

MEGA version 5.05 に実装されている機能の系統解析を用いて系統樹を構築した。なお、各枝に対して示されたブートストラップ値に関して、40 以下の値は、切り捨てることとした。

3. 3 結果

3. 3. 1 イソニガナの分布域調査

本研究は、以前から確認されているイソニガナ個体群を含め、10ヶ所の地点で個体群を確認することができた (Fig. 3-2, 3-3, Table 3-1)。地点 B、地点 E、地点 F の 3ヶ所の個体群は、数百 m² 以上の範囲で 1000 個体以上だった。その一方で、地点 C、地点 D、地点 H、地点 I の 4ヶ所の個体群は、35 個体未満であった。

よって、個体群によって自生する個体数が大きく異なることが分かった。

また、これら発見した個体群は、新潟県の海岸沿いにおいて約 90 km にわたっており、自生するイソニガナ個体群は、非連続的に分布していることが明らかになった (Table 3-2)。これら個体群間の距離が 10 km 以上あったのは、地点 A-地点 B 間、地点 B-地点 C 間、地点 F-地点 G 間、地点 G-地点 H 間であり、特に上越地方と中越地方で分けられる地点 B-地点 C 間が、30 km 以上で最も間隔が開いていた。

3. 3. 2 SSR に基づいた遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造解析

本研究で、イソニガナに対して有効な 7 遺伝子座の SSR マーカーを開発することができた (Table 3-3)。そのうち、6 遺伝子座の SSR マーカー (masnip01～msnip06) は、単一もしくは複数の 2 塩基反復であった。そして、1 遺伝子座の SSR マーカー (msnip07) は、2 塩基反復と 6 塩基反復であった。

SSR マーカーによる多型解析には、本研究で発見した 10ヶ所の個体群から

採取した計 421 個体の試料を用いた。解析に用いた SSR マーカーは、本研究で開発した 7 遺伝子座及び、以前に Nakagawa and Ito (2009) によって開発された 3 遺伝子座の計 10 遺伝子座を用いた (Fig. 3-4)。

今回の解析から得られた指数について、まず遺伝子座に対する遺伝的多様性に関する指数を示す (Table 3-4)。対立遺伝子数 (N_A) は、2~4 で平均 2.800 からなった。ヘテロ接合度の観測値 (H_O) は、0.211~0.765 で平均 0.566 になり、ヘテロ接合度の期待値 (H_E) は、0.253~0.748 で平均 0.568 になった。さらに、msnip06 と msid6 は、Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱を示した ($P < 0.001$)。これら 2 つの遺伝子座は、msnip06 が $H_O = 0.211$ 及び $H_E = 0.253$ 、そして msid6 が $H_O = 0.219$ 及び $H_E = 0.271$ として、ヘテロ接合度において比較的低い値を示した。

また、各個体群に対する遺伝的多様性に関する指数を示す (Table 3-5)。遺伝子座ごとの平均対立遺伝子数 (N_A) は、地点 C と地点 F が 2.700 だったことを除いて、全ての個体群で 2.800 を示した。遺伝子座ごとの効果的対立遺伝子数 (N_E) は、2.240~2.668 で平均 2.471 になり、地点 C、地点 D、地点 H、地点 I の 4 個体群は平均を下回った。ヘテロ接合度の観測値 (H_O) は、0.500~0.657 で平均 0.572 になり、ヘテロ接合度の期待値 (H_E) は、0.502~0.607 で平均 0.550 になった。これらヘテロ接合度に関しては、平均から大きく逸脱したものは確認されなかった。

近交係数 (F_{IS}) は、ほとんどの個体群で負の値を示し、特に地点 C ($F_{IS} = -0.302$) はヘテロ過剰の傾向にあった (Table 3-5)。対照的に、地点 C に最も近い地点 D ($F_{IS} = -0.082$) は、類似した近交係数を示さなかった。

Shannon's information index (I) は、0.812~0.970 で平均 0.884 になった (Table 3-5)。上越地方の地点 A ($I = 0.967$) と地点 B ($I = 0.970$) は、他の個体群よりも高い遺伝的多様性を示した。

ベイズモデルによる Structure 解析において、Delta K に基づいた計算では $K = 2$ 、事後確率の尤度に基づいた計算では $K = 6$ が、それぞれ最適であることが推定された (Fig. 3-5)。そこで、各分集団を割り当てる集団遺伝学的構造については、これら最適な分集団数を範囲とした $K=2\sim6$ で連続的に示した (Fig. 3-6)。結果として、どの分集団数においても上越地方の地点 A と地点 B は、特異的に一つの分集団が割り当てられており、これらは一つのクラスターとして他の個体群から識別された。その一方で、中越及び下越地方の 8 個体群では、個体群の全てが分集団を共有しており、個々もしくはいくつかの個体群ごとに識別することができなかった。

近隣結合法による階層的クラスター解析から構築した系統樹は、上越地方の地点 A / 地点 B と他の 8 ヶ所の個体群との間で明確に分離した (Fig. 3-7)。ベイズモデルによるクラスター解析結果と組み合わせると、上越地方の個体群は、互いに類似した集団遺伝学的構造を示し、他の個体群から区別できることが示された。

3. 4 考察

3. 4. 1 イソニガナの分布域調査

発見した 10 ヶ所のイソニガナ個体群には、数十～数千の範囲で個体数に大きな違いがあった (Table 3-1)。また、これら発見した個体群は、新潟県の海岸沿いにおいて約 90 km にわたっており、自生するイソニガナ個体群は、非連続的に分布していることが分かった (Table 3-2)。したがって、ほとんどの個体群間で遺伝的交流が行われるのは難しいだろうと考えられる。以下には、各個体群の詳細な情報を示す。

地点 A (名立) は、上越市名立区のうみてらす名立付近の民家を越えたすぐそばの丘で新たに発見した場所である。この丘には途中まで道路が舗装

されていたものの民家がなく、人の立ち入りが頻繁でないだろうことがうかがえた。この道路脇の約 200 m² の範囲で 407 個体のイソニガナ個体群が発見された。周辺にはイネ科植物やシダ植物が広く群生していたが、イソニガナはそのような植生と競合しない開けた平地や斜面に自生していた。また、この地点では、同じニガナ種内に分類されるハナニガナも確認された。この地点は、特に土地開発が行われておらず、他種との競合も確認されなかったため、個体群は安定して維持されていると考えられる。

地点 B（びょうぶ谷野球場）は、上越市市街地から少し離れた場所にある郷津の海水浴場そばの丘に位置する野球場施設であり、以前にも自生地確認の報告があった場所である（工藤 2005; 田中 2009）。ここには、野球場の他にアーチェリー競技用広場もあり、特にこの広場でイソニガナの密集した個体群が観察された。施設全体は芝生で覆われてよく管理されており、特に草丈が高い植物は確認されなかった。聞き込み調査では、定期的に草刈りが行われており、植生が管理されていることが分かった。この地点では、約 12000 m² と面積が広大なこともあって 4000 個体以上のイソニガナが確認され、本調査では最も規模が大きい個体群となった。したがって、この地点の個体群は十分に安定して維持されていると考えられる。この地点では、同じニガナ種内に分類されるニガナとハナニガナも確認された。また、この施設周辺の道路沿いの石垣でも数 10 個体のイソニガナが確認された。

地点 C（米浦福浦八景県立自然公園（西側））は、柏崎市にある鷗ヶ鼻から下に降りた波打ち際の岩場であり、以前にも報告があった場所である（佐藤・滝沢 1994; 工藤 2005; 田中 2009）。このイソニガナは、17 個体と非常に少なく、全ての個体が岩場付近の崖に点在していた。他の植物は、ほとんど自生しておらず、イソニガナと他種の競合する可能性は低いと考えられる。これは、この地点が潮風や海水の水しぶきに晒されている環境

であり、植物の生育条件には適さないためと考えられる。イソニガナは、もともと海岸沿いで生育する植物であるため、このような環境には耐性があると考えられるが、イソニガナにとっても生育に適した条件とはいえないだろうと考えられる。したがって、この地点のイソニガナの自然繁殖と個体群の維持は、現状の個体数と環境条件から難しいことが想定される。

地点 D（米浦福浦八景県立自然公園（東側））は、地点 C より崖を隔てた砂浜であり、以前にも報告があった場所である（佐藤・滝沢 1994；田中 2009）。この地点と地点 C との間には荒波が打つ険しい崖で隔てられており、これら地点間では遺伝的交流がないと推測され、本調査では別々の個体群として取り扱った。ここのイソニガナも地点 C と同様、この砂浜周辺の崖に点在しており、34 個体と少ない個体数だった。環境も類似していることから、イソニガナの自然繁殖と個体群の維持は、困難であると考えられる。

地点 E（番神御野立公園）は、柏崎市にある鯨波海水浴場付近の公園であり、以前にも報告があった場所である（安ヶ平ら 1999；工藤 2005；田中 2009）。イソニガナ個体群は、公園敷地内はもとより、駐車場付近から民家が並ぶ道路脇、駐車場から柏崎マリーナ付近の道路へ通じる階段歩道脇の斜面、そして柏崎マリーナの広場にまで広がっていた。また、公園と柏崎マリーナ間の崖にもイソニガナが自生していたことから、本調査ではこれらの群生範囲で一つの個体群になるだろうと推定した。この地点では、個体群が被覆する面積が約 3000 m² であり、その中で 1800 個体以上のイソニガナが自生しており、個体数は地点 B に次ぐが、群生密度は地点 B よりも高いことが分かった。この地点は、カタバミやクズなど様々な植物が群生しており、イソニガナと競合が見られた。さらに、この地点では、同じニガナ種内に分類されるニガナとハナニガナも確認された。この地点は、公園敷地内と周辺に草刈りが定期的に行われる管理された土地である。したがって、他種との競合が緩和されて

おり、この地点のイソニガナ個体群は安定して維持されると考えられる。

地点 F (番神) は、地点 E から約 1 km 離れた民宿が並ぶ道路沿いであり、以前にも報告があった場所である (安ヶ平ら 1999; 工藤 2005; 田中 2009)。全てのイソニガナは、民宿周辺の崖土に自生していた。この崖土は、常に水が滴るほど湿っており、イソニガナ以外では多くのイネ科植物が非常によく生育していた。この地点では、約 90 m² に 1200 個体以上が自生しており、本調査では最も大きい群生密度となった。この地点では、崖土に擁壁などの施工が入らない限り、個体群は安定して維持されるだろうと考えられる。

地点 G (越後出雲崎天領の里) は、三島郡にある道の駅内のアスレチック広場で新たに発見した場所である。イソニガナは、シロツメクサが群生する平地の中で約 100 個体が発見された。そのため、個体群規模は、あまり大きいとはいえない。しかしながら、この地点は、十分に管理されている公共施設であり、他種との競合が少ないためイソニガナの個体数は、直ちに減少することはないだろうと考えられる。

地点 H (寺泊中央海水浴場) は、長岡市にある海水浴場周辺の広場で新たに発見した場所である。イソニガナは、樹木の木陰にわずかに自生しており、本調査では 16 個体が発見された。この地点では、大規模に群生している他の植物がなかったため、他の植生と競合していないと考えられるが、イソニガナ個体群そのものの規模が非常に小さいため、個体群の安定した維持は難しいと考えられる。

地点 I (日本海夕陽ステーション) は、新潟市にある越後七浦観音が設置されている駐車場周辺の砂浜ぎわにある野原で新たに発見した場所である。イソニガナは、この場所の歩道脇でわずか 15 個体だけ発見された。この地点では、いくつかのイネ科植物やタデ科植物が幅広く群生しており、イソニガナと競合している状態になっていた。この地点では、イソニガナ個体群が非常に

小さいうえに、人が出入りする様子がなく、ほとんど管理されていない土地であると思われた。したがって、個体群の安定した維持は難しいと考えられる。

地点 J（こめぐりの郷公園）は、地点 I から約 1 km 離れた広場で新たに発見した場所である。イソニガナは、この広場の平地の中で 100 個体以上発見された。そのため、個体群規模は、あまり大きいとはいえない。この地点では、大規模に群生している植物がなかったため、他の植物と競合していないと考えられる。また、この地点は、十分に管理されている公共施設であり、イソニガナの個体数は、直ちに減少することはないと考えられる。

以上のことから、本調査で発見した 10 ヶ所の個体群は、3 つの地域特性に分けられる。すなわち、地点 A、地点 B、地点 E、地点 G、地点 H、地点 I、地点 J のほとんどの個体群は、丘や公園などの人に管理されている土地に自生しており、地点 C と地点 D は、海岸の崖で自然状態の土地に自生しており、地点 F は、道路沿いの崖土に自生していた。

海岸線の道路沿いの多くは、防波堤や擁壁が施工されており、ほとんど植生が見られなかった。植生が確認された場所では、非常に草丈が高いイネ科植物や、つる性のマメ科植物が大半であり、イソニガナは全く確認されなかった。このように、人工構築物と植生の両面から、イソニガナの自生可能な場所は、大きな制約を受けており、そのため自生地は分断され点在している。

地点 C や地点 D のような波打ち際の崖では、他種の植物は少なかったが、イソニガナの個体も非常に少なかった。ただ、地点 C と地点 D で確認されたイソニガナは、人の出入りが自然環境下に自生していることから、海岸に自生する植物として最も本来的な生態学的地位を示す集団として考えられ、今回確認されたイソニガナ個体群の中でも、重要な個体群といえる。他の個体群は、草刈りなどにより、人為的に他種との競合が緩和された環境にあった。

地点 C や地点 D と同様な海岸植生から競合が緩和されることで、自生地が拡大した可能性が考えられる。

一方で、本調査では、佐藤・滝沢（1994）、工藤（2005）、田中（2009）によって報告された青海川駅付近と笠島地区におけるイソニガナ個体群を確認することはできなかった。

本調査の結果より、イソニガナの個体群は、限られた地域にしか自生しておらず、やはり絶滅危惧種として位置付けられるべき植物である。そのため、イソニガナをどのように保護すべきか保全アプローチを考える必要があるといえる。最適な保全アプローチは、イソニガナが本来生育する土地を焦点に当てるべきである。イソニガナは、柏崎市の海岸沿いで初めて発見され、そこでは洪積層の赤褐色粘土層にダイモンジソウなどと共に群生していた（Nakai 1920）。このような土地環境が、本来のイソニガナの生育地といえる。今回、柏崎市の地点 C、地点 D、地点 E、地点 F で発見した個体群には、土地開発による人の手が入ってない崖に生育するイソニガナが確認され、これらは残存した本来の生育地であることが考えられる。しかしながら、現在では海岸沿いにアスファルトの道路が舗装され、さらに多くの建物が立ち並んでいる。また、海岸沿いの崖は、擁壁の施工により覆われており、むき出しになった崖は、ほとんど確認されない。このことから、本来の生育地の環境は、ほとんど失われているだろうと考えられる。したがって、本来のイソニガナの生育地を保全するというアプローチは、困難であることが考えられる。

本調査では、発見した個体群のほとんどが人為的に管理されている土地に自生していることが分かった。これは、草刈りなどの人の手が入ることにより他種との競合が緩和されることによって、個体ごとの生存率が高くなり、個体群が維持されやすくなっていると推定される。実際に環境省は、絶滅危惧種が生育する地域の保全に対して、一例として生育地での捕獲や開発を禁止し、草刈りを行う

ことを指摘している（環境省 2011）。また、草刈りや耕起による人為的な管理は、絶滅危惧種オキナグサ、オオヒキヨモギ、タコノアシなど多くの草本植物に対する保全に有効であることが指摘されている（兵庫県 2009; 米村 2013）。したがって、イソニガナも、通常 of 自然環境下で個体群を維持及び繁殖させるよりも、むしろ植生が管理され他種との競合が緩和された人の管理下による土地で生育させた方が、個体群を安定して維持および繁殖させるのに好ましいと考えられる。

3. 4. 2 SSR に基づいた遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造解析

全ての採取した個体群の遺伝的多様性に関する指数は、対立遺伝子数、ヘテロ接合度、Shannon's information index に対して類似した結果を示した (Table 3-5)。それにもかかわらず、地点 C ($F_{IS} = -0.302$) や地点 I ($F_{IS} = -0.126$) のような小規模な個体群は、ヘテロ過剰の傾向を示した。ヘテロ過剰の原因は、異系交配、広大な集団交配、雑種強勢、負の同系交配によるものであることが以前から述べられてきた (Peng *et al.* 2005; Celka *et al.* 2010; Haundry *et al.* 2012)。生殖プロセスにおいてイソニガナは、自家不和合性であることが確認されている (竹本 1956)。小規模な個体群では、完全な任意交配を仮定した際の自殖の寄与が相対的に大きくなるため、自家不和合性による自殖によって生じた種子の排除がヘテロ過剰の要因となり得る。

集団遺伝学的構造解析では、上越地方の 2 ヶ所の個体群と中越及び下越地方の 8 ヶ所の個体群との間で遺伝的隔離を生じている可能性を示唆した (Fig. 3-6, 3-7)。個体群の分布域調査では、上越地方の個体群の一つ地点 B と中越地方の個体群の一つ地点 C が、30 km 以上離れていたという他の個体群間とは圧倒的に距離を取っていた (Table 3-2)。このことから、上越地方と中越及び下越地方の間では、遺伝子交流が、極端に低下したということが一つの要因として

考えられる。

しかしながら、集団遺伝学的構造は、上越地方と中越及び下越地方との間を完全に分離したものではなく、ある程度の分集団を共有する結果を示した (Fig. 3-6)。これは、2つの原因が可能性として挙げられる。

一つは、かつて新潟県内全域に個体群が分布し、一つの遺伝子プールを共有したという可能性である。それから、地形変動や環境変化による自然的要因、もしくは土地開発による人為的要因によって、個体群が縮小・分断され、現在の分布域になった。そして、個々の個体群の縮小を受け、遺伝的多様性が低下した結果、個体群間で分集団の共有と偏りが生じたと考えられる。もう一つは、既存の個体群から個体もしくは種子が、新たな土地へ移入した可能性である。移入によって形成された新たな個体群は、既存の個体群と分集団を共有するが、個体群規模が小さく、既存の個体群よりも遺伝的多様性が低いことから、異なった集団遺伝学的構造を示したと考えられる。

これら2つの原因は、それぞれボトルネック効果と創始者効果に基づいて説明されるが、本研究では現存する個体群の分布域情報と集団遺伝学的情報のみから得られた結果なので、これら原因を裏付ける証拠を示すことができなかった。

3. 5 結言

本研究は、個体群の分布域調査と遺伝的多様性に関する指数及び集団遺伝学的解析の組み合わせることによって、新潟県の海岸沿いに固有の絶滅危惧種イソニガナの現状に関する情報を把握した。

まず、イソニガナの個体群の分布域調査では、新潟県の海岸沿いの 90 km にわたって 10ヶ所の地域で個体群が存在していることを確認した。これら個体群では、数十から数千と個体数の規模が大きく異なった。また、これら個体群は、

人の管理下にある土地で安定的に自生している傾向にあった。よって、個体群の維持と繁殖は、自然環境そのものに委ねるだけでなく、ある程度管理された土地がセーフサイトの役割を果たすと考えられるため、他種との競合が緩和された環境での個体群維持が重要である。

そして、本研究で開発した 7 遺伝子座を含めて、10 遺伝子座の SSR マーカーを用い、10 ヶ所のイソニガナの個体群に対する遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造を解析した。全ての個体群は、対立遺伝子数、ヘテロ接合度、Shannon's information index に対して類似する傾向にあり、またヘテロ過剰になる傾向が確認された。一方で、遺伝的クラスターは、上越地方の 2 ヶ所の個体群と、中越及び下越地方の 8 ヶ所の個体群とを明確に識別した。この識別された要因は、上越地方の個体群と他の個体群の距離により遺伝的隔離が生じていることによることが示唆された。

以上のような結果から、イソニガナは、新潟県の海岸沿いで限られた地域にしか自生していないが、各個体群がヘテロ過剰の傾向にあったこと、ほとんどの個体群が複数の分集団から構成されていたことから、比較的遺伝的多様性は維持されていると考えられる。

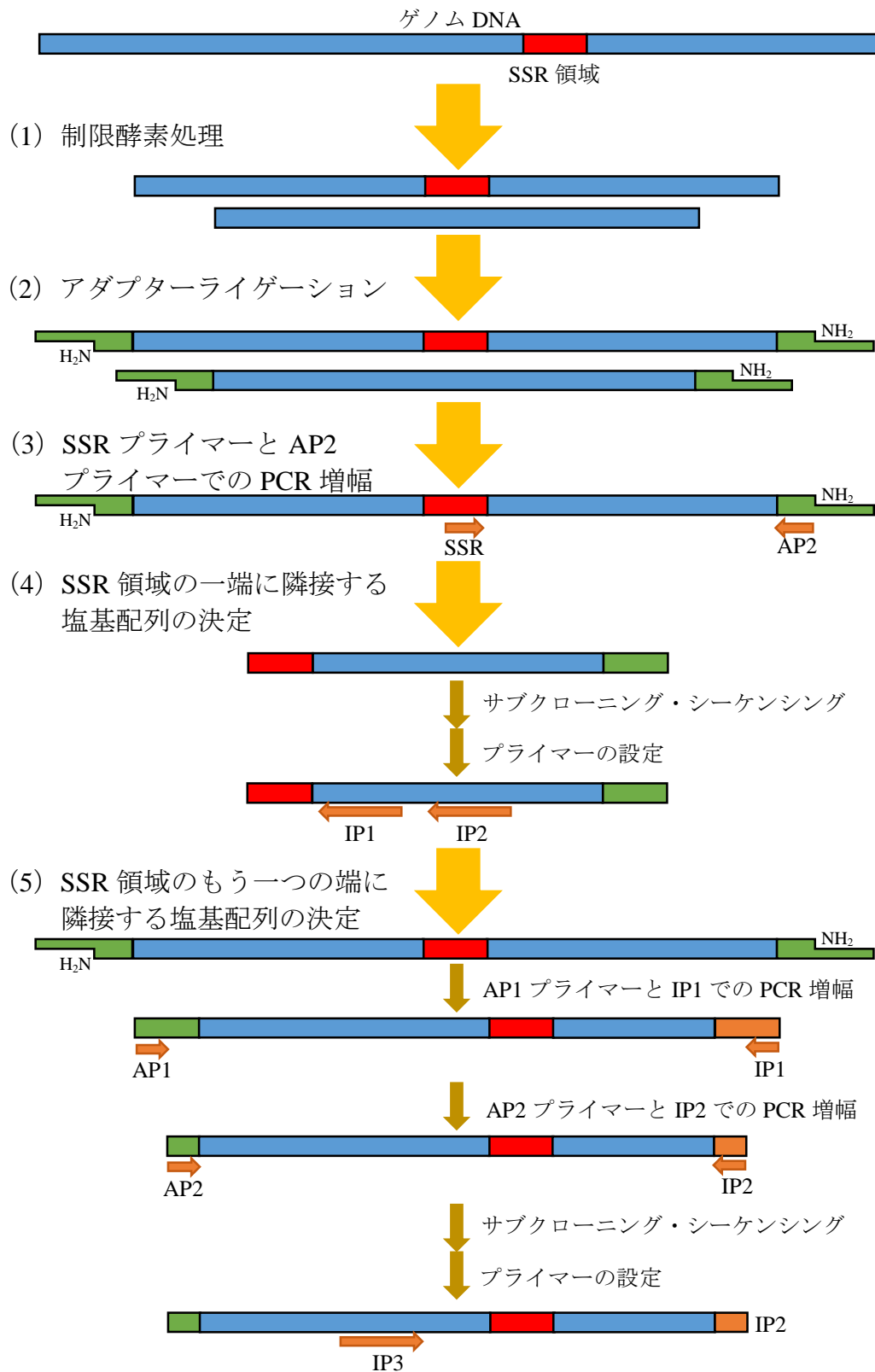


Fig. 3-1 SSR マーカー開発の原理を示した概略図。

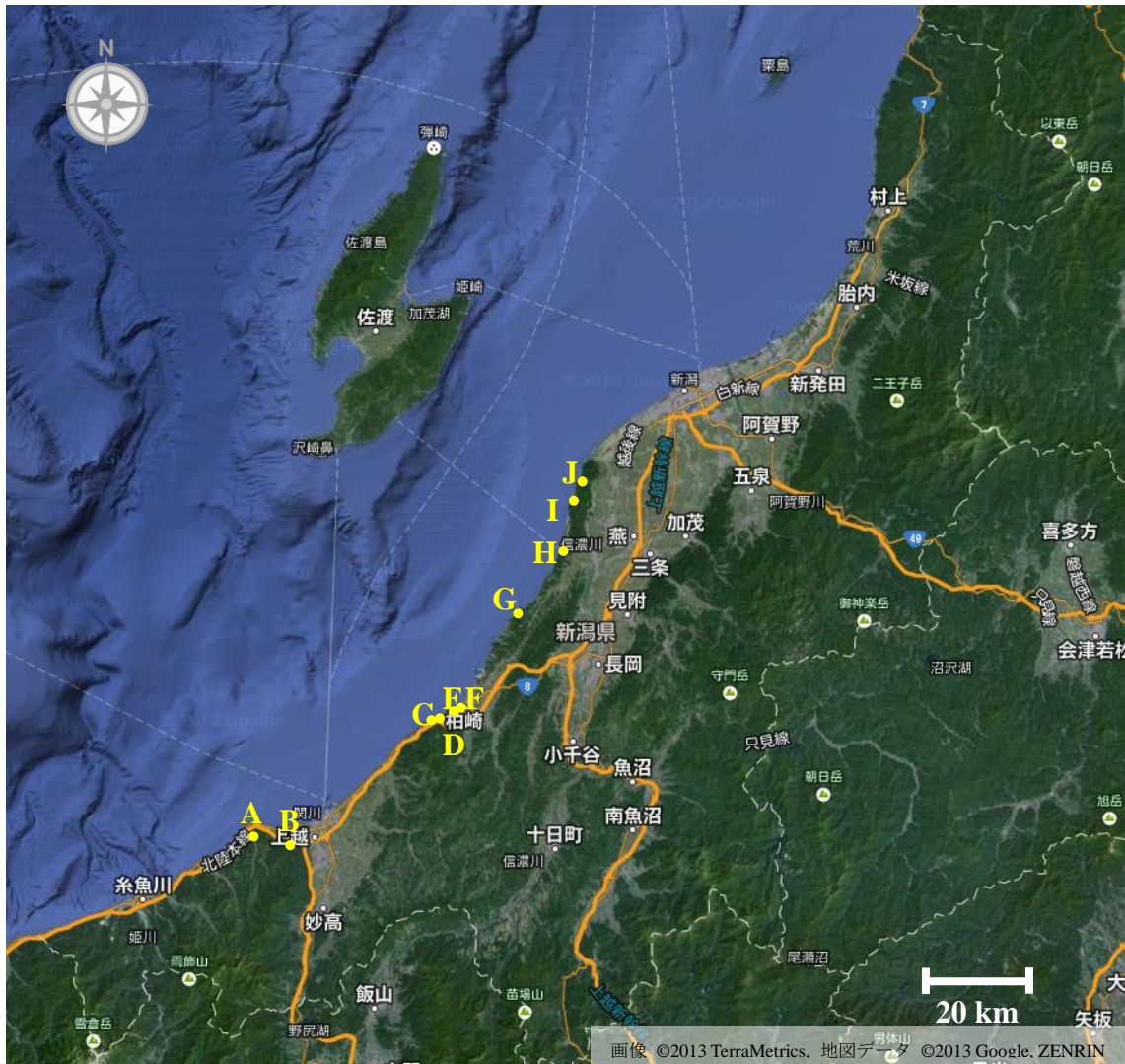


Fig. 3-2 イソニガナの分布域調査によって確認した個体群の位置情報。



Fig. 3-3 イソニガナの分布域調査によって確認した個体群が生育する環境。

A:名立、B:びょうぶ谷野球場、C:米浦福浦八景県立自然公園（西側）、
D:米浦福浦八景県立自然公園（東側）、E:番神御野立公園、F:番神、
G:越後出雲崎天領の里、H:寺泊中央海水浴場、I:日本海夕陽
ステーション、J:こめぐりの郷公園。

Table 3-1 確認したイソニガナの個体群の採取及び確認した個体数、被覆面積、位置情報。

地点	地域名称	採取した個体数	確認した個体数	被覆面積 (m ²)	緯度 (N)	経度 (E)	高度 (m)
A	名立	44	407	200	37°16'34"	138°08'98"	30
B	びょうぶ谷野球場	52	4121	12000	37°16'68"	138°21'25"	33
C	米浦福浦八景県立自然公園 (西側)	9	17	5	37°35'18"	138°48'86"	5
D	米浦福浦八景県立自然公園 (東側)	6	34	20	37°35'18"	138°49'16"	35
E	番神御野立公園	146	1802	3080	37°35'93"	138°51'86"	12~27
F	番神	43	1272	90	37°36'52"	138°52'79"	13
G	越後出雲崎天領の里	48	107	6	37°53'81"	138°67'69"	3
H	寺泊中央海水浴場	13	16	4	37°64'79"	138°77'01"	5
I	日本海夕陽ステーション	15	15	4	37°72'93"	138°79'23"	15
J	こめぐりの郷公園	45	125	100	37°73'82"	138°79'51"	2

Table 3-2 確認したイソニガナ個体群間の地理的距離 (km)。

地点	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A										
B	10.9									
C	41.1	32.0								
D	41.3	32.2	0.3							
E	43.8	34.6	2.8	2.5						
F	44.8	35.6	3.8	3.5	1.1					
G	66.6	58.3	26.6	26.4	24.3	23.3				
H	80.8	72.8	41.3	41.1	39.1	38.1	14.7			
I	88.5	80.9	49.9	49.7	47.8	46.8	23.6	9.3		
J	89.3	81.8	50.8	50.7	48.7	47.8	24.6	10.3	1.0	

Table 3-3 イソニガナに対する 10 遺伝子座の SSR マーカーの特性。(T_A: アニールリング温度)

マーカー	リピートモチーフ	プライマー配列 (5'-3')	T _A (°C)	対立遺伝子サイズ (bp)	Accession number
msnip01	(AC) ₁₀ (AG) ₁₅	F: TTCTGTATGGTGTGCGACT R: GCTAATGTCGCCCTTCAATCCT	54	166~190	AB780500
msnip02	(AC) ₁₃ AT(AG) ₁₉	F: CCCACCACAAACACCTGAC R: TCATCGGCCCTCCTAGATCAC	56	178~210	AB780501
msnip03	(GA) _{35...} (AC) ₆ (AG) ₆	F: GAGAAATCCGAAAGAGCGAGA R: TGGAGGTTGTGACTTCGGTA	54	198~266	AB780502
msnip04	(AC) ₁₄ (AG) ₃₄	F: TCTGGATTTGTCATCGCTGT R: GATGGTCCTCGGAAATTGAC	54	190~220	AB780503
msnip05	(AG) ₁₃ (AC) ₁₁ (AG) ₁₇	F: CCTTGGATGCCGAAATACCTC R: CGGCATTGATTTGAAATGGT	52	190~210	AB780504
msnip06	(AC) ₁₀	F: GGAGGTGGTAGTGGTGGTTTC R: CTCGCCGGATTCACCTCTG	56	186~200	AB780505
msnip07	(AC) _{3...} (GTGTT) _{3...} (AC) ₁₇	F: CACCGACAACGTCCTTACCT R: GCAGAACCTGTCCCCCTCTT	56	190~210	AB780506
msid4	(TC) ₆ (AC) ₆	F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC R: TACAACCTCGGAAACTGAGC	57	170~190	AB503707
msid5	(TC) ₆ (AC) _{7...} (TC) ₃	F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC R: GACACAATGCCCTGACCGTGGTTTGC	62	180~200	AB503708
msid6	(AC) ₆ (AG) _{5...} (GA) ₃ (TA) ₂	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: GACTATGATCTAACTAGGGTGC	57	204~220	AB503709

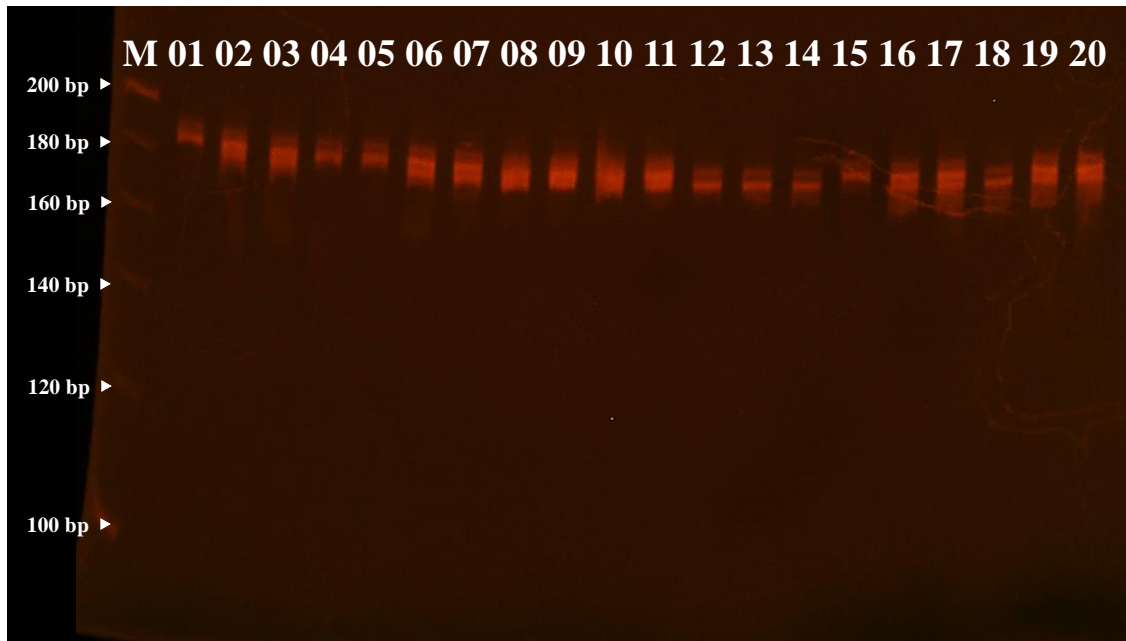


Fig. 3-4 SSR マーカーによる多型解析の結果の一例 (msid4 を使用)。

レーン M は、分子量マーカー (20 bp Ladder)。レーン 01~20 は、解析試料。

Table 3-4 10ヶ所から採取した計421個体のイソニガナに基づく各遺伝子座に対する遺伝的多様性に関する指数。

マーカー	N_A	H_O	H_E
msnip01	2	0.527	0.501
msnip02	4	0.755	0.747
msnip03	4	0.765	0.748
msnip04	3	0.679	0.665
msnip05	2	0.473	0.500
msnip06	2	0.211*	0.253*
msnip07	3	0.706	0.662
msid4	3	0.653	0.666
msid5	3	0.672	0.665
msid6	2	0.219*	0.271*
Mean	2.800	0.566	0.568

N_A : 対立遺伝子数、 H_O : ヘテロ接合度の観測値、 H_E : ヘテロ接合度の期待値

* msnip06 及び msid6 は Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱を示す ($P < 0.001$)。

Table 3-5 各個体群に対する遺伝的多様性に関する指数。

地点	N_A	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	I
A	2.800	2.636	0.657	0.607	-0.095	0.967
B	2.800	2.668	0.612	0.607	-0.017	0.970
C	2.700	2.328	0.656	0.533	-0.302	0.833
D	2.800	2.282	0.550	0.555	-0.082	0.850
E	2.800	2.560	0.536	0.530	-0.016	0.881
F	2.700	2.627	0.567	0.559	-0.028	0.908
G	2.800	2.476	0.527	0.533	0.001	0.879
H	2.800	2.383	0.500	0.538	0.034	0.861
I	2.800	2.240	0.547	0.502	-0.126	0.812
J	2.800	2.508	0.571	0.533	-0.083	0.882
Mean	2.780	2.471	0.572	0.550	-0.071	0.884

N_A : 遺伝子座ごとの平均対立遺伝子数、 N_E : 遺伝子座ごとの効果的対立遺伝子数、 H_O : ヘテロ接合度の観測値、 H_E : ヘテロ接合度の期待値、 F_{IS} : 近郊係数、 I : Shannon's information index

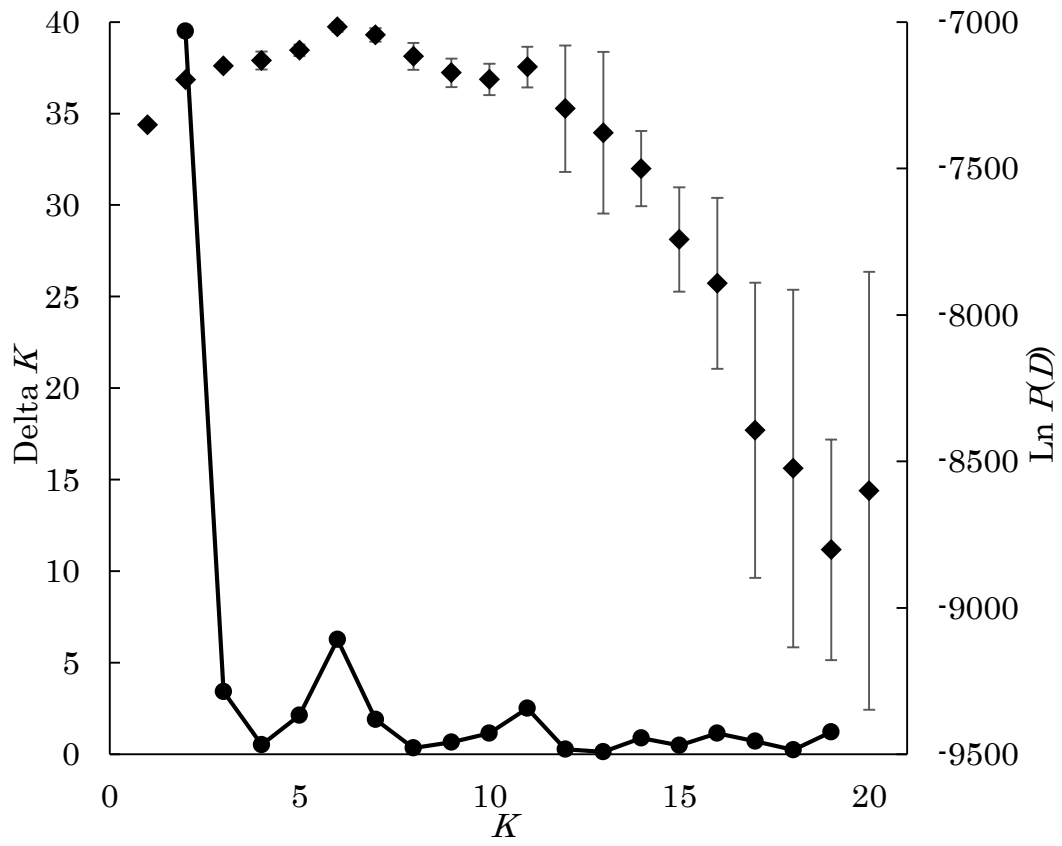


Fig. 3-5 各分集団に対する Delta K (●) と事後確率の尤度 (◆)。

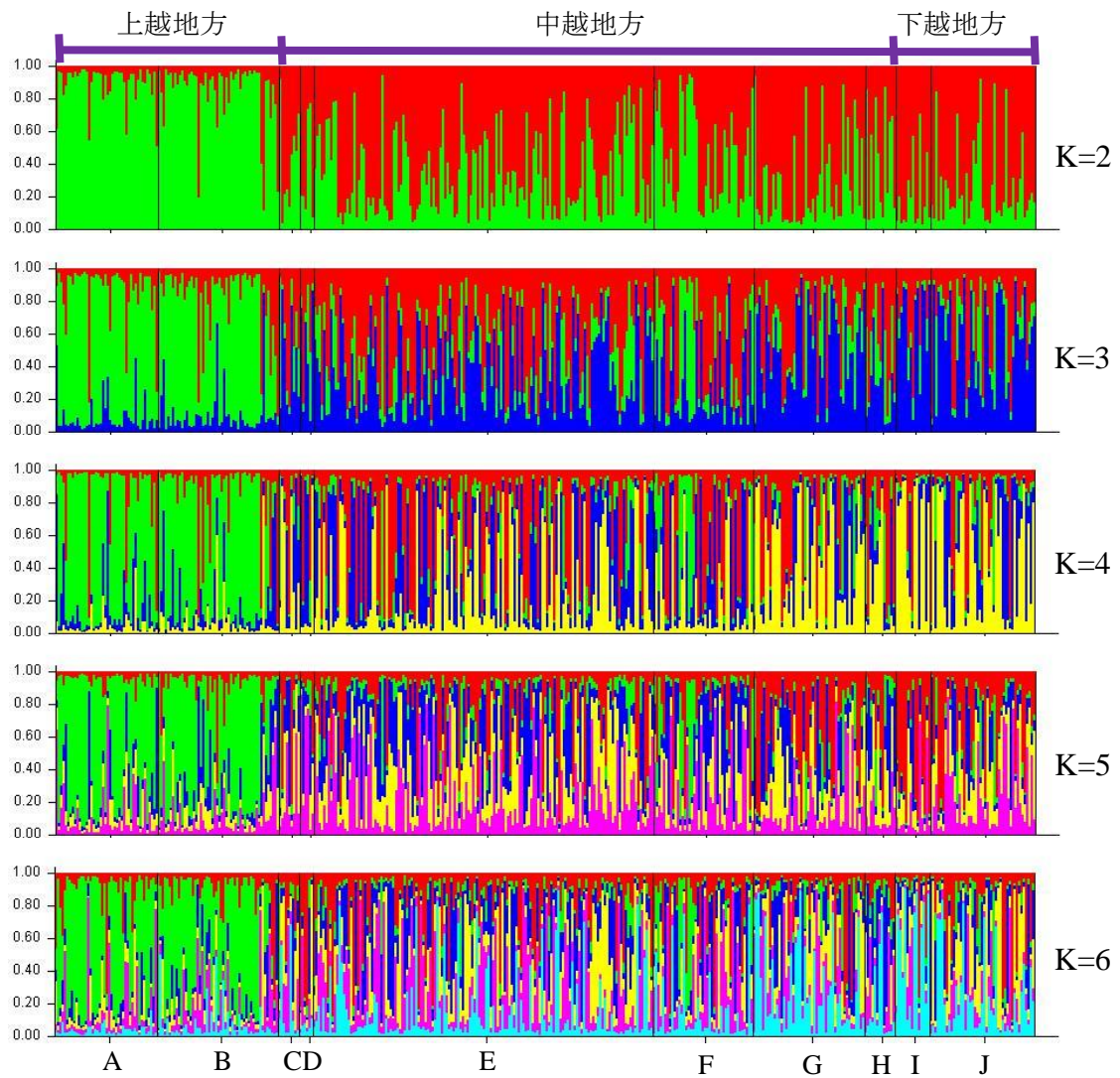


Fig. 3-6 バイズモデルによる Structure 解析の結果に基づいた 421 個体の集団遺伝学的構造。個体は、各集団群にまとめられている。各色は、異なる分集団として割り当てられる。

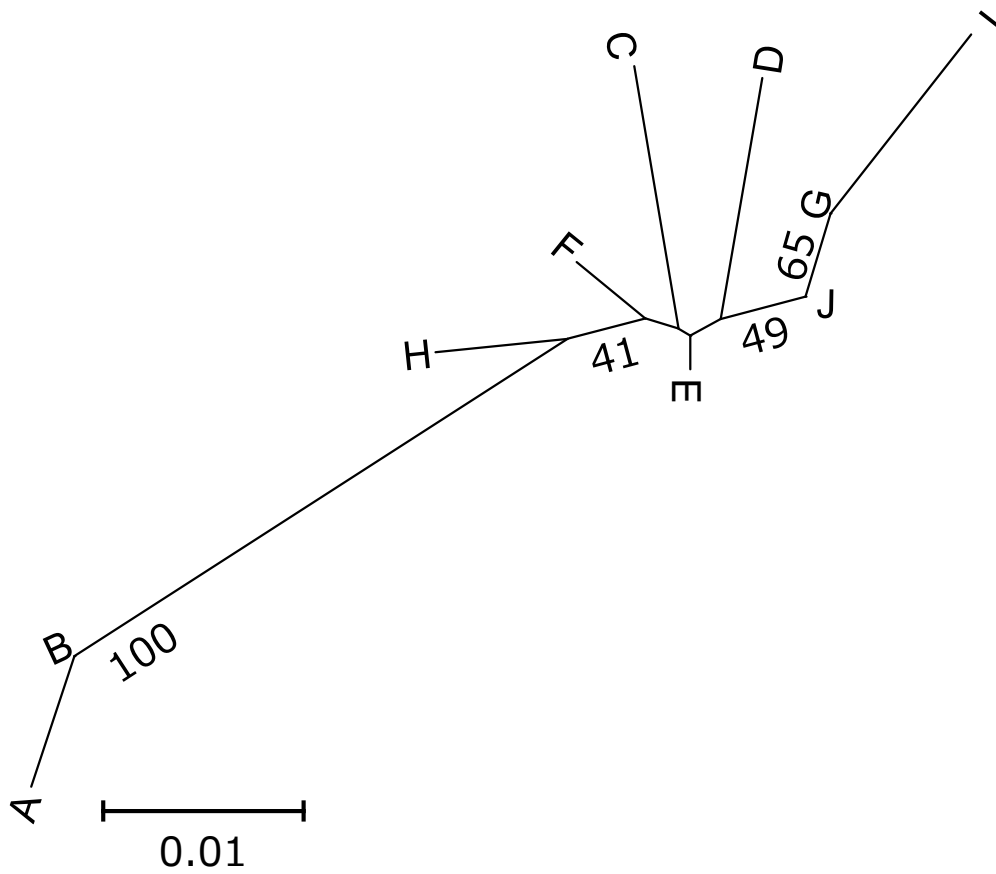


Fig. 3-7 イソニガナの系統関係を示した近隣結合法による系統樹。

ブートストラップ値 (1000 反復) は、各枝に示される。また、各枝に対して得られたブートストラップ値の中で、40 以下の値は切り捨てることとした。

第4章 総合考察

4. 1 ニガナ種内の分子系統学的解析

ニガナ種は、祖先種が日本に移入した後、種内で複雑に分化することによって複合種を形成したとされている (Nishioka 1963)。現在のニガナ種の分類体系では、種内の分類群において 6 亜種、1 変種、3 品種として *Ixeridium dentatum* という 1 つの種にまとめられている (米倉・梶田 2003, BG Plants index: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013; Yonekura 2005, Table 1-2, Fig. 1-2)。これら種内の分類体系は、形態学的特性や核型分析による情報に基づく、人為分類によって構築されていた。そのため、種内で複雑な遺伝的多様性を示すニガナ種内の分化の過程及び、分類群間の系統関係についてはほとんど議論されてこなかった。そこで、本研究は、ニガナ種に対して分子データに基づいた情報を取り入れ、現状の分類体系の妥当性を評価し、さらに系統関係を推定することでニガナ種内分化のプロセスを明らかにすることを目的とした。

まず、新潟県及びその隣県での収集作業、試料提供や購入を通して、ニガナ種内の分類群に含まれる試料を得た。それから、従来の分類体系において観察されてきた形質を中心とした形態特性、倍数性レベルに加え、分子系統学的情報として ITS 配列及び AFLP に関してそれぞれ調査を行った。結果として、AFLP に基づいた分子系統学的解析が、ニガナ種内の分類群に対する自生地特性と形態特性において対応関係を示し、また全ての分類群がそれぞれ単系統として示されることを明らかにした (Fig. 2-7)。さらに、現在の分類体系に属さない自生地特性及び形態特性を持った 3 つの分類群のうち、白花型ニガナとハナ様ニガナが独立した分類群であることが示唆された一方、オゼ様ニガナはオゼニガナの姉妹群として位置付けられ、

オゼニガナとすることが妥当であることが示唆された。以下において、本研究の結果に基づき、新たなニガナ種内の分類体系及び系統関係による進化的プロセスに関してそれぞれ議論する。

4. 1. 1 新たなニガナ種内の分類体系

分子マーカーを用いたニガナ種内の分子系統学的解析は、これまで形態特性や核型分析で得られていた知見を超えて、多くの情報を明らかにした。特に、AFLPによる多型解析に基づいた系統解析によって得られた情報を基に、現在のニガナ種内の分類体系の一部を再構成する必要があると考えられる。本研究の結果は、従来の分類と多くの点で一致しており、完全な再分類を求めるものではない。現在の分類と比較して大きな変更点は、AFLP データでは亜種イソニガナに属する分類群が多系統として生じたことが示されたにもかかわらず、従来の形態学的分類ではシロバナニガナ及びハナニガナが同じ変種・品種とされている点である (Fig. 2-7)。結論として、本研究は、現在の分類階級を再構成すべきだろうと考える (Table 4-1)。まず、AFLP データ由来の近隣結合法による系統樹で独立した各クラスターを亜種として位置付ける。これにより、共通の小花数を伴う分類群は、同じ亜種に分類される。変種は、花色の違いによって分類される一方で、品種は、栄養器官のような他の違いによって分類される。また、本研究で新たに独立した分類群として識別した2つの分類群に関しては、白花型ニガナを *Id. dentatum* subsp. *dentatum* var. *albidum* (和名：シロニガナ)、ハナ様ニガナを *Id. dentatum* subsp. *ozense* var. *xanthinum* (和名：キバナオゼニガナ) としてそれぞれ命名し、新たに識別することを提案する。最終的に、本研究で提案する分類体系は、7 亜種、3 変種、2 品種で構成される。

4. 1. 2 系統関係による進化的プロセス

AFLP に基づいて構築した近隣結合法による系統樹は、ニガナ種内の分類群に対する系統関係を明確にした (Fig. 2-7)。本節では、この結果に基づきニガナ種内の分化モデルを提案する。提案する分化モデルを体系的に図式化したものを Fig. 4-1 に示す。まず、クモマニガナとドロニガナは、Group I に対応し *Relic species type* として分類される。これら亜種が、狭い自生地特性と有性生殖による 2 倍体系統を示すことによって (西岡 1960; Takemoto 1962; Nishioka 1963; Fujishima 2001)、複合種ニガナの分化の中で比較的初期に分化したであろうと考える。この仮説は、祖先種に密接な系統が遺存種として山岳地域で生育してきたという西岡 (1960) による推定を支持する。また、この分化初期ステージは、タカネニガナを生じる種間スケールの分化を含む可能性が示唆された。次の段階として、*Relic species type* と分岐した Common ancestor A は、Common ancestor B と Common ancestor C に分化し、それらが本研究の系統樹でグループ化して示した Group II / Group III と Group IV / Group V にそれぞれ分化した。イソニガナとシロバナニガナの 2 つの分類群は、Group II に対応し *Nipponicum-type* として分類される一方、ニガナ、シロニガナ、クロニガナは、Group III に対応し *Dentatum-type* に分類される。これらタイプは、Common ancestor B から分化したニガナ種内の分類群であると提案される。ハナニガナだけが、Group IV に対応し *Amplifolium-type* として分類される一方、オゼニガナ、キバナオゼニガナは、Group V に対応し *Ozense-type* に分類される。これらタイプは、Common ancestor C から分化したニガナ種内の分類群であると提案される。

Common ancestor B と Common ancestor C に由来するグループは、様々な倍数体を伴う分類群を含むが、これら祖先種は、2 倍体に由来することが予測される。2 倍体の祖先種に由来することにより、染色体重複や交雑が、互いの

祖先種で独立して生じ、現在確認される多様な分類群が出現したという可能性を持つと考えられる。低地における Group II~V の分類群の幅広い分布は、倍数体進化と他の分類群との分岐が Common ancestor B と Common ancestor C の低地移入中もしくは移入後に起こったように思われる。しかしながら、Common ancestor B と Common ancestor C が、高地で形成したか、もしくは Common ancestor A の拡散後に低地で形成したかに関しては、本研究では明らかにできず不明確なままである。今後の調査は、複合種ニガナにおける倍数体シリーズ（2 倍体、3 倍体、4 倍体）の発生メカニズムや生殖様式の変遷（有性生殖、無性生殖）のような基本的問題を解決していく必要があるだろう。

4. 2 分子マーカーの有効性

本研究は、ニガナ種内の分類体系の評価と系統解析に対して ITS 領域の配列解析及び AFLP による多型解析を行い、イソニガナの個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する指数及び集団遺伝学的構造解析に対して SSR による多型解析を行った。

ニガナ種内の分類体系の評価と系統解析では、ITS 領域は、ニガナ種内の分類群間を明確に識別することは困難であった。ただし、ここで留意すべきことは、ITS 領域が高度反復配列である rDNA に含まれることから、個々の領域で若干の配列に差異が生じる問題である。そのため、本来であれば、一つの個体から複数回の配列解析を行った上で、配列を決定すべきである。本研究では、ニガナ種内分類群間の ITS 配列の比較でさえも差異が確認されなかったことから、複数回の配列解析を行うまでには至らなかった。

一方、AFLP は、分類群ごとに一つのクラスターとしてまとめることができた上、分類群間で十分な遺伝的距離を持ち識別された。さらに、AFLP 由来の分子マーカー利用による結果は、新たな分類体系の可能性を導き、さらに

進化的プロセスを推定することにも有効だった。しかしながら、植物進化に対する AFLP の適用は、利点と限界を持つ (Mueller and Wolfenbarger 1999; Koopman 2005; Meudt and Clarke 2007)。本研究で調査した分類群は、異なった倍数体系統を含むことから情報量の違いを生じる。優性マーカーでは、期待値の単純計算でも 3 倍体は、2 倍体の 1.5 倍の多型バンドを示す。そのため、優性マーカーである AFLP は、間違った結果を導く可能性がある。この問題を打開するために、本研究は ITS 領域の配列解析を併用することを試みたが、ニガナ種内での ITS 配列の多型性が小さかったため、両結果を照合しながら議論するまでには至らなかった。したがって、ニガナ種内の分類体系の評価と系統解析を行うことに対して AFLP 由来のデータは、従来の方法による形態特性や核型分析による結果との多くの整合性を示したことで、その有効性が評価されるが、この分子マーカーが全ての問題を解決できると考えることはできない。ゆえに、さらに正確な分子マーカーの適用による分子生物学的解析が、複合種ニガナの分類体系の展開に必要であると考えられる。また、この強力な分子マーカーには、核ゲノム以外にも配列ベースとした葉緑体ゲノムやミトコンドリアゲノムの遺伝子間領域も期待される。

イソニガナの個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する指数及び集団遺伝学的構造解析では、SSR マーカーは、個体群内及び個体群間の遺伝的多様性を明らかにした。したがって、SSR マーカーは、イソニガナの遺伝的多様性に関して基本的な情報を与えるために必要なものであるといえる。イソニガナは、ニガナ種内の亜種に属するため、この SSR マーカーは、複合種ニガナの形成や進化の基本的情報を与えることにも有効である可能性が期待される。しかしながら、SSR マーカーは、個体群内および個体群間の規模で遺伝的多様性を評価できるという利点がある一方で、欠点も挙げられる。それは、ヌル対立遺伝子の存在であり、これが多くの個体で検出された場合、誤った

遺伝的多様性を導いてしてしまう可能性がある。ヌル対立遺伝子の存在を直接確認することは困難であるため、多型解析によって得られたデータを統計解析によって評価する方法がある。本研究では、2つの SSR マーカーに対して Hardy-Weinberg 平衡からの逸脱が確認された (Table 3-4)。この要因の一つとして、ヌル対立遺伝子が反映していると考えられる。SSR マーカーの欠点を解消する方法として、利用する SSR マーカーをさらに増やし、少数の遺伝子座で遺伝的多様性の評価しないようにすることがよいと考えられる。

4. 3 絶滅危惧種イソニガナの遺伝的多様性

イソニガナは、ニガナ種内の亜種に分類されている植物である。この植物は、新潟県柏崎市内の海岸沿いにのみ生育している固有種であると同時に、自生地が限られ、個体数も少ないことから絶滅危惧種に指定されている (環境庁 1997; 新潟県 2001; 環境省 2012a, レッドリスト, 植物 I (維管束植物) : http://www.biodic.go.jp/english/rdb/rdb_f.html, accessed September 16, 2013)。また、近年ではイソニガナが生息する地域周辺で土地開発が進み、個体群の縮小もしくは消滅が懸念されている (佐藤・滝沢 1994)。そのため、現状のイソニガナ個体群の分布域の把握と、個体群内及び個体群間の遺伝的多様性として遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造を明らかにした上で、イソニガナの保全を行うべきかどうかの評価、そして保全を行うためにはどのようにアプローチを組み立てるべきかを考える必要がある。しかしながら、イソニガナの個体群が、どの地域でどれくらいの規模を持って生息しているかに関し、詳細な把握が行われておらず、さらにイソニガナの個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する情報も不明確であった。そこで、本研究は、イソニガナの保全の必要性に関する評価、そして保全を実施する上での効果的な保全アプローチを考案するために、現状のイソニガナの分布と遺伝的多様性を明らかにすることを

目的とした。

まず、新潟県内の海岸沿いの土地においてイソニガナの分布域を調査した。それから、本研究で開発した7遺伝子座のSSRマーカーと以前に開発されたSSRマーカー (Nakagawa and Ito 2009) を用い、本研究の分布域調査で発見した10ヶ所の個体群から得られた421個体を対象に多型解析を行い、そこから得られたデータを用いて遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造を解析した。

結果として、本研究の分布域調査ではイソニガナの個体群が新潟県の海岸沿いにおいて90 km圏内にわたる10ヶ所で発見された (Fig. 3-2, 3-3, Table 3-2)。特に、上越市の1ヶ所と柏崎市の2ヶ所の3地点で、大規模な個体群が存在することを示した (Table 3-1)。遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造に対する解析では、各個体群が豊富な遺伝的多様性を保持していることを示し (Table 3-5)、さらに上越地方の2ヶ所の個体群が他の8ヶ所の個体群から遺伝的に明確に識別されることが分かった (Fig. 3-6, 3-7)。以下において、本研究の結果に基づき、イソニガナの保全アプローチに関する提案を議論する。

4. 3. 1 イソニガナの保全アプローチ

イソニガナは、新潟県の海岸沿いにのみ自生する絶滅危惧種である。それにもかかわらず、保全計画に対する動きは、国や自治体を通してまだ見られていない。本研究におけるイソニガナの個体群の分布域に関する調査は、新潟県の90 km圏内の10ヶ所で発見し、中には十数個体しか確認されなかった比較的に小さな個体群も含まれた。したがって、イソニガナの保全を行うための計画を立ち上げることが急務であると考えられる。本研究で行われたイソニガナの分布域の調査により、上越市の1ヶ所と、柏崎市の2ヶ所がそれぞれ1000個体以上を

伴う大規模な個体群であることが明らかとなった。また、これら 3 ヶ所は、遺伝的多様性も十分に維持しており、上越市の個体群は上越地方、柏崎市の個体群は中越地方及び下越地方、それぞれの地域に特徴的な遺伝的多様性を示した。よって、これら 3 ヶ所の大規模な個体群に対して、生育環境の条件を維持し、個体群規模を拡大することで優先的に保護するべきであるということ提案する。この保全アプローチは、土地開発による個体群消滅の回避のみを目的とするものではない。新潟県の海岸沿いでは、台風や地震による津波のような危機的な自然災害が生じる可能性があり、この保全アプローチは、危機的災害に対しても有効であると考えられる。また、これら 3 ヶ所の大規模な個体群は、十分な個体群規模を持っているだけでなく、多様な対立遺伝子頻度を維持していることも明らかになった。したがって、これら個体群が自生する地域は、他の地域に対する種子の供給センターとして役割を果たすことができると考えられる。これら大規模な個体群から種子を人為的に分配することによって、小規模な個体群においても現状の生育環境の維持と共に、個体群の拡大を図ることができると期待される。また、イソニガナが安定して生育するセーフサイトとして役割を果たすだろうと示唆された公園などの管理地で新たに個体群を導入することも、イソニガナの保全に役立つだろう。

4. 4 今後の課題

ニガナ種は、種内で複雑に分化した複合種であり、6 亜種、1 変種、3 品種の 10 種の分類群に分類されている（米倉・梶田 2003, BG Plants index: http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html, accessed September 16, 2013; Yonekura 2005, Table 1-2, Fig. 1-2)。また、ニガナ種内で亜種に分類されているイソニガナは、新潟県の海岸沿いでのみ自生し、同様に亜種に分類されているドロニガナは、和歌山県、三重県、奈良県に位置する瀨峡にのみ自生していることで、これら

亜種は絶滅危惧種に指定されている（環境庁 1997; 環境省 2012a, レッドリスト, 植物 I (維管束植物) : http://www.biodic.go.jp/english/rdb/rdb_f.html, accessed September 16, 2013)。本研究は、ニガナ種内で分類されている 10 種の分類群のうち、8 種の分類群を含めて現在の分類体系の評価と系統関係を示した。また、ニガナ種内の絶滅危惧種のうち、イソニガナの分布域を明らかにし、さらに個体群内及び個体群間の遺伝的多様性に関する指数と集団遺伝学的構造から遺伝的多様性を明らかにすることで、イソニガナの絶滅を回避するための保全アプローチを提案することができた。ここで最後に、本研究が明らかにしたことから今後の課題を議論する。

まず、ニガナ種内の分類体系の評価と系統解析に関する今後の課題である。このことに関しては、3 つの課題が挙げられる。第一に、現在分類されている全ての分類群を用いて一括した比較解析が行われるべきである。本研究は、ハイニガナとシラネニガナの試料を得ることができなかつたため、これら分類群に関しては議論することができなかつた。よって、全ての分類群を用いることができれば、現在の分類体系に対して全体を評価することができ、より詳細な系統関係を明らかにすることができる。第二に、試料として用いられる植物個体の採集地域をさらに広げるべきである。本研究は、新潟県とその周辺地域を中心に由来した植物個体を試料とした。しかしながら、ニガナ種に属するほとんどの分類群は、日本全土に分布しており、特にニガナとハナニガナは、幅広い環境条件や高度で自生する一般的な野草とされている。また、ニガナは、西日本で連続的に分布する傾向にある一方、ハナニガナは、北日本で連続的に分布する傾向にあると以前に報告されている（小山 1981）。よって、植物個体の採集地域を拡大することで、地理的規模でより詳細な種内分化の動向を推定することができると考えられる。第三に、他の分子マーカーを用いた分子系統学的解析が行われるべきである。本研究において、ITS 領域の配列解析では

各分類群を識別することを困難であり、AFLPによる多型解析の結果だけで議論しなければならなかった。ニガナ種の分子系統学的解析における問題は、種内レベルの比較的小さな変異を対象としており、さらに各分類群で異なる倍数性を持つ個体を対象としているため、単一の分子マーカーでは十分な情報が得られないという可能性が懸念される。本研究でイソニガナの遺伝的多様性を調査するために用いた SSR マーカーは、個体群レベルで識別を可能としたことから、この分子マーカーは、ニガナ種内の分子系統学的解析にも有効であると期待される。よって、SSR マーカーや他の有効な分子マーカーを適用することで、複雑に分化したニガナ種内の系統関係を示し、それぞれの分子マーカーによって得られた情報を包括して議論することが望ましいといえる。以上のことから、ニガナ種内の分類体系の評価と系統解析に関する今後の課題は、現在分類されている全ての分類群を含め、大規模な地域で採集した個体を試料とし、複数の分子マーカーの適用による分子系統学的解析によって行われるべきである。

続いて、ニガナ種内の絶滅危惧種イソニガナに関する今後の課題である。本研究は、イソニガナの分布域と遺伝的多様性を明らかにし、そこから保全アプローチの提案までを行った。そこで今後は、実際に保全活動を行うにあたって、具体的にどのように活動計画を立てるかが課題となる。この課題の最大の壁は、保全を行うための人員と資金の確保である。ここで、一つ挙げられる提案として、まず生態保全を目的とした NPO もしくは NGO 団体を設立して保全アプローチを実行するか、もしくは既存の団体に対して保全アプローチを投げかけることから始められる。そして、現在ますます展開されているソーシャルネットワークサービスや教育機関の課外授業を利用することで、ボランティアを募り、人員を確保できることが期待される。また、資金面に関しては、環境や生態保全に対して助成金を支援する企業や団体を通じて確保

できると考えられる。新潟県においても、多くの企業が助成基金を設置し、多くの住民や団体に対して支援している。このような理想的提案が、必ず実行できるものではないと思われるが、近年ではこのような理想的な保全の取り組みを現実として支援する法律ができた。それは、2010年に制定（翌年に施行）された生物多様性地域連携促進法である。この法律は、制定された同年に名古屋市で開催された COP10 で愛知目標が採択されたことに踏まえて立案されたものである。すなわち、この法律は、地域の自然的・社会的条件に応じた生物多様性の保全のための活動を地域における多様な主体が有機的に連携して行うことを促進し、豊かな生物多様性の保全、現在及び将来の国民の健康で文化的な生活の確保に寄与すること目的としている。そして、主体とするのは、市町村や NPO 団体などの非営利組織、地域住民、企業などの事業者、教育・研究機関など、あらゆるものを含めており、これらが一丸となって保全活動に取り組めることを目指している。したがって、保全アプローチには、地域連携型による取り組みが、重視されるようになったといえる。新潟県海岸沿いの植物には、イソニガナだけではなくシロヨモギやハマゴウなど他にも希少とされている植物がある。保全活動を行うにあたって最も重要なのは、これら植物の現状が多くの人々に認識され、関心を持つ多くの人が保全に携わることだろう。

Table 4-1 本研究が新たに提案するニガナ種内の分類体系。

現在の分類体系		本研究が提案する分類体系	
学名	和名	学名	和名
<i>Ixeridium dentatum</i>		<i>Ixeridium dentatum</i>	
subsp. <i>dentatum</i>	ニガナ	subsp. <i>dentatum</i> (黄花型ニガナに対応)	ニガナ
f. <i>stoloniferum</i>	ハイニガナ	f. <i>stoloniferum</i>	ハイニガナ
		var. <i>albidum</i> (白花型ニガナに対応)	シロニガナ
subsp. <i>nipponicum</i>	イソニガナ	f. <i>atropurpureum</i>	クロニガナ
var. <i>albiflorum</i>	シロバナニガナ	subsp. <i>nipponicum</i>	イソニガナ
f. <i>amplifolium</i>	ハナニガナ	var. <i>albiflorum</i>	シロバナニガナ
f. <i>atropurpureum</i>	クロニガナ	subsp. <i>amplifolium</i>	ハナニガナ
subsp. <i>ozeense</i>	オゼニガナ	subsp. <i>ozeense</i> (オゼ様ニガナを含める)	オゼニガナ
		var. <i>xanthinum</i> (ハナ様ニガナに対応)	キバナオゼニガナ
subsp. <i>kimuranum</i>	クモマニガナ	subsp. <i>kimuranum</i>	クモマニガナ
subsp. <i>kitayamense</i>	ドロニガナ	subsp. <i>kitayamense</i>	ドロニガナ
subsp. <i>shiranense</i>	シラネニガナ	subsp. <i>shiranense</i>	シラネニガナ

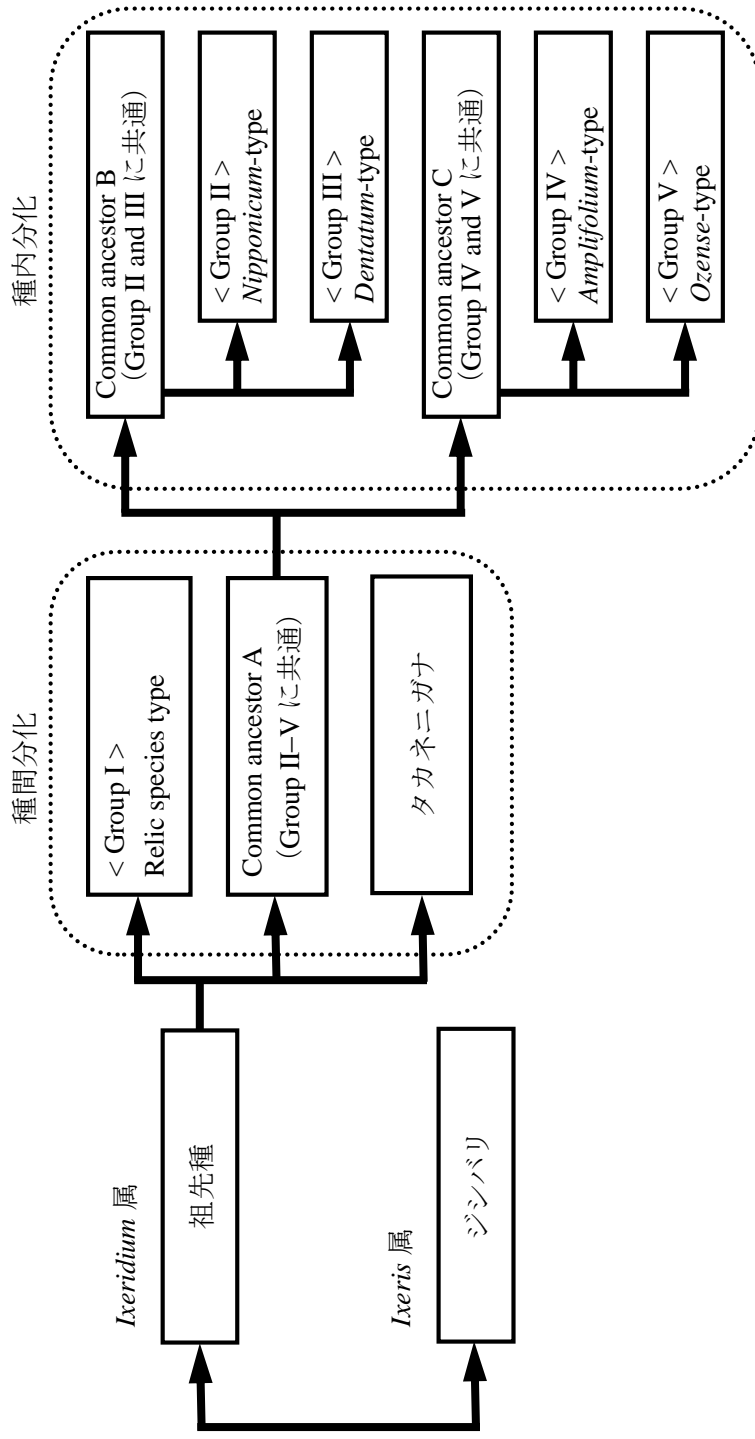


Fig. 4-1 複合種ニガナの種間レベル及び種内レベルによる分化モデル。

謝辞

本研究は、長岡技術科学大学工学部生物系物質工学講座、応用植物工学研究室で行いました。本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導、ご鞭撻下さった長岡技術科学大学工学部生物系生物物質工学講座、高原美規准教授及び、長岡技術科学大学工学部生物系生物情報工学講座、滝本浩一教授に深く感謝致します。

本研究で野外から試料採取を行うにあたり、尾瀬国立公園及び柵池高原における採取許可申請に関して、桧枝岐自然保護官事務所、片品村教育委員会、尾瀬林業株式会社、利根沼田環境森林事務所、桧枝岐村教育委員会、南会津地方振興局、会津森林管理署、南会津農林事務所、長野自然環境事務所、中信森林管理署、柵池高原観光協会、各位には採取許可申請書類の手続きの際、ご親切に対応して下さいました。ニガナ種内の系統関係を把握するという重要性を真剣に聞き入れて下さった上、本研究への対応に踏み切って下さった各位に厚くお礼申し上げます。

また、取得した試料のうちドロニガナを提供して下さいました筑波実験植物園の松本定博士に心より感謝申し上げます。

さらに、本研究は、イソニガナの分布域調査及び、遺伝的多様性の調査を行うにあたって、公益財団法人こしじ水と緑の会・朝日酒造自然保護助成基金の助成を受け、また、イソニガナの分布域調査の成果を報告するにあたって、柏崎市立博物館のご協力を賜りました。絶滅危惧種イソニガナの保全アプローチへつなげることができたことに対してご支援下さった各位に感謝の意を表します。

最後に、日々の研究生活において、様々な面でお世話になりました先輩、同輩、後輩の皆様、そして、本学で学業を営むために多大なるご支援と度重なる激励下さった両親ならびに親族の皆様におかれましては心よりお礼申し上げます。

引用文献

Ahn E. M., Bang M. H., Song M. C., Park M. H., Kim H. Y., Kwon B. M., Beak N. I.
(2006) Cytotoxic and ACAT-inhibitory sesquiterpene lactones from the root of *Ixeris dentata* forma *albiflora*. Arch. Pharm. Res. 29: 937-941

安藤 勝彦 (2011) 生物多様性条約第 10 回締約国会議 (COP10) ABS (Access and Benefit-Sharing) 名古屋議定書の採択. 化学と生物 49: 66-70

ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 12 [online]. Available from <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/top/updates.html#Famlarge>, [accessed September 16, 2013]

APG (1998) An ordinal classification for the families of flowering plants. Ann. Mo. Bot. Gard. 85: 531-553

APG II (2003) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 141: 399-436

APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 161: 105-121

荒井 洋子, 楠本 洋子, 長尾 恵美, 塩島 憲治, 上田 博之 (1983) キク科植物成分: オオジシバリおよびニガナの脂肪族およびトリテルペノイド成分. 薬学雑誌 103: 356-359

Arif I. A., Bakir M. A., Khan H. A., Al Farhan A. H., Al Homaidan A. A., Bahkali A. H., Al Sadoon M., Shobrak M. (2010) A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 2079-2096

馬場 孝秀, 間野 吉郎, Sayed-Tabatabaei B. E., 川崎 信二, 小松田 隆夫 (2002) 小型ゲルと銀染色を用いた簡易 AFLP 法. *育種学研究* 4: 1-4

Bhat V., Dwivedi K. K., Khurana J. P., Sopory S. K. (2005) Apomixis: an enigma with potential applications. *Curr. Sci.* 89: 1879-1893

Celka Z., Buczkowska K., Baczkiewicz A., Drapikowska M. (2010) Genetic differentiation among geographically close populations of *Malva alcea*. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 52 (2): 32-41

Cha M. R., Choi C. W., Lee J. Y., Kim Y. S., Yon G. H., Choi S. U., Kim Y. H., Ryu S. Y. (2012) Two new amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from *Ixeris dentata*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 33: 337-340

Chang Y. J., Jin J., Nam H. Y., Kim S. U. (2005) Point mutation of (+)-germacrene A synthase from *Ixeris dentata*. *Biothechn. Lett.* 27: 285-288

Chen D. H., Ronald P. C. (1999) A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 53-57

Cho Y. Y., Choi K. Y., Lee Y. B., Son J. E. (2012) Growth characteristics of sowthistle (*Ixeris dentata* Nakai) under different levels of light intensity, electrical conductivity of nutrient solution, and planting density in a plant factory. Hort. Environ. Biotechnol. 53: 368-372

Choi Y. E., Ahn C. H., Kim B. B., Yoon E. S. (2008) Development of species specific AFLP-derived SCAR marker for authentication of *Panax japonicas* C. A. MEYER. Biol. Pharm. Bull. 31: 135-138

Choi J. S., Young H. S., Kim B. W. (1990) Hypoglycemic and hypolipemic effects of *Ixeris dentata* in diabetic rats. Arch. Pharm. Res. 13: 269-273

Chung H. S., Jeong H. J., Han M. J., Park S. T., Seong K. K., Baek S. H., Jeong D. M., Kim M. J., Kim H. M. (2002) Nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by *Ixeris dentata* in mouse peritoneal macrophages. J. Ethnopharmacol. 82: 217-222

Chung H. S., Woo W. S., Lim S. J. (1994) Dentatins: sesquiterpene glucosides from *Ixeris dentata*. Arch. Pharm. Res. 17: 323-326

Doyle J. J., Doyle J. L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15

Earl D. A., vonHoldt, B. M. (2011) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet. Resour. 4: 359-361

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620

Franklin I. R. (1980) Evolutionary changes in small populations. In: Soule ME, Wilcox BA (Eds.) *Conservation biology, an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland: 135-149

Fujishima H. (1984) Karyomorphological studies of the *Ixeris dentata* complex on Mount Ishizuchi. *Bot. Mag. Tokyo* 97: 137-150

Fujishima H. (2001) A karyological study on speciation of the *Ixeris dentata* complex. *Chrom. Sci.* 5: 7-14

Galbany-Casals M., Carnicero-Campmany P., Blanco-Moreno J. M., Smissen R. D. (2012) Morphological and genetic evidence of contemporary intersectional hybridisation in Mediterranean *Helichrysum* (Asteraceae, Gnaphalieae). *Plant Biol.* 14: 789-800

Gottlieb A. M., Giberti G. C., Poggio L. (2005) Molecular analyses of the genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in southern South America, evidence from AFLP and ITS sequence data. *Am. J. Bot.* 92: 352-369

Haudry A., Zha H. G., Stift M., Mable B. K. (2012) Disentangling the effects of breakdown of self-incompatibility and transition to selfing in North American *Arabidopsis lyrata*. *Mol. Ecol.* 21: 1130-1142

Hodkinson T. R., Renvoize S. A., Chonghaile G. N., Stapleton C. M. A., Chase M. W. (2000) A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). *J. Plant Res.* 113: 259-269

Huang J., Corke H., Sun M. (2002) Highly polymorphic AFLP markers as a complementary tool to ITS sequences in assessing genetic diversity and phylogenetic relationships of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and its wild relatives. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49: 541-550

Huang X., Kurata N., Wei X., Wang Z. X., Wang A., Zhao Q., Zhao Y., Liu K., Lu H., Li W., Guo Y., Lu Y., Zhou C., Fan D., Weng Q., Zhu C., Huang T., Zhang L., Wang Y., Feng L., Furuumi H., Kubo T., Miyabayashi T., Yuan X., Xu Q., Dong G., Zhan Q., Li C., Fujiyama A., Toyoda A., Lu T., Feng Q., Qian Q., Li J., Han B. (2012) A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490: 497-501

兵庫県 (2009) 生物多様性ひょうご戦略. 兵庫県

岩槻 秀明 (2006) 街でよく見かける雑草や野草がよーくわかる本. 秀和システム: 85

Iwatsuki K., Yamazaki T., Boufford D. E., Ohba H. (Eds.) (1995) *Flora of Japan Volume IIIb, Angiospermae Dicotyledoneae Sympetalae (b)*. Kodansha Ltd., Tokyo

Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. (2011) Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334

環境省 (2011) 絶滅する前にできること 絶滅危惧種の生息域外保全. 環境省

環境省 (2012a) レッドリスト, 植物 I (維管束植物) [online]. Available from http://www.biodic.go.jp/english/rdb/rdb_f.html [accessed September 16, 2013]

環境省 (2012b) 平成 23 年度モニタリングサイト 1000 陸水域調査報告書. 環境省, 東京

環境庁 (1997) 植物版レッドリスト. 環境庁, 東京

Kim M. Y., Chang Y. J., Bang M. H., Baek N. I., Jin J. Lee C. H., Kim S. U. (2005) cDNA isolation and characterization of (+)-germacrene A synthase from *Ixeris dentata* form. *Albiflora* Hara. *J. Plant Biol.* 48: 178-186

北村 四郎 (1955) オウニガナの件. *植物分類・地理* 16: 4

Kitamura S. (1956) *Compositae Japonicae, Pars Quinta*. *Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp Univ., Ser. B, Biol.* 23: 116-123 (in Latin)

Kolarčik V., Zozomová-Lihová J., Mártonfi P. (2010) Systematics and evolutionary history of the *Asterotricha* group of the genus *Onosma* (Boraginaceae) in central and southern Europe inferred from AFLP and nrDNA ITS data. *Plant. Syst. Evol.* 290: 21-45

Koopman W. J. M. (2005) Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Syst. Biol.* 54: 197-217

小山 博滋 (1981) ニガナ =ミチバタニガナの仲間の多様性=. 田村道夫編, 日本の植物研究ノート, 培風館: 148-165

工藤 貴寛 (2005) 複合種ニガナ種内の遺伝的多様性. 長岡技術科学大学大学院 工学研究科生物機能工学専攻修士論文修士論文. (未公刊)

Lembicz M., Piszczalka P., Grzybowski T., Woźniak M., Jarmołowski A., Borkowska L., Falińska K. (2011) Microsatellite identification of ramet genotypes in a clonal plant with phalanx growth: The case of *Cirsium rivulare* (Asteraceae). *Flora* 206: 792-798

Lian C., Hogetsu T. (2002) Development of microsatellite markers in black locust (*Robinia pseudoacacia*) using a dual-suppression-PCR technique. *Mol. Ecol. Notes* 2: 211-213

Mao C., Pan Y., Wang J., Gong X. (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae). *Conserv genet* 10: 1853-1855

Marhold K., Lihová J., Perný M., Bleeker W. (2004) Comparative ITS and AFLP analysis of diploid *Cardamine* (Brassicaceae) taxa from closely related polyploid complexes. *Ann. Bot.* 93: 507-520

Matsumura H., Watanabe S., Harada K., Senda M., Akada S., Kawasaki S., Dubouzet E. G., Minaka N., Takahashi R. (2005) Molecular linkage mapping and phylogeny of the chalcone synthase multigene family in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1203-1209

Meudt H. M., Clarke A. C. (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses, and advances. *Trends Plant Sci.* 12: 106-117

Mueller U. G., Wolfenbarger L. L. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389-394

Mora C., Tittensor D. P., Adl S., Simpson A. G. B., Worm B. (2011) How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.*, 9: e1001127

村田 (中井) 源 (1952) 北山峽の新植物. *植物分類・地理* 14: 127-129

Nakagawa S., Ito M. (2009) Development and characterization of microsatellite loci in *Ixeridium dentatum* (Asteraceae, Lactuceae). *J. Plant Res.* 122: 581-584

Nakai T. (1920) Notulae ad plantas Japoniae et Koreae, XXIII. *Bot. Mag. Tokyo* 34: 147-158 (in Latin)

Nakai T. (1928) Notulae ad plantas Japoniae et Koreae, XXXV. *Bot. Mag. Tokyo* 42: 1-26 (in Latin)

Naumova T. N. (2008) Apomixis and amphimixis in flowering plants. *Tsitol Genet* 42: 51-63

Nei M., Tajima F., Tateno Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.* 19: 153-170

新潟県 (2001) レッドデータブックにいがた. 新潟県

西岡 泰三 (1956) 日本産タンポポ類の核型分析. *植物学雑誌* 69: 586-591

西岡 泰三 (1960) ニガナ類の分化について -1-. *植物学雑誌* 73: 431-437

Nishioka T. (1963) Phylogenetic study in the *Ixeris dentata* group, II. General aspect of the *Ixeris dentata* group. *J. Jpn. Bot.* 18: 199-223

Nomura N., Fujiwara K., Takaso T., Ito M., Uehara K., Setoguchi H. (2009) Development and characterisation of microsatellite loci in *Farfugium japonicum* (Asteraceae). *Conserv. Genet.* 10: 1093-1095

Noyes R. D. (2007) Apomixis in the Asteraceae: diamonds in the rough. *Func. Plant Sci. Biotech.* 1: 207-222

岡部 作一 (1932) にがなノ單性生殖 (豫報) . *Bot. Mag. Tokyo* 46: 518-523

岡部 作一 (1935) 高山に産するニガナ類に就て. *生態學研究* 1: 278-281

Pak J. H., Kawano S. (1990a) Biosystematic studies on the genus *Ixeris* (Compositae-Lactuceae) I. Fruit wall anatomy and its taxonomic implications. *Acta Phytotax. Geobot.* 41: 43-60

Pak J. H., Kawano S. (1990b) Biosystematic studies on the genus *Ixeris* (Compositae-Lactuceae) II. Karyological analyses. *Cytologia* 55: 553-570

Pak J. H., Kawano S. (1992) Biosystematic studies on the genus *Ixeris* and its allied genera (Compositae-Lactuceae) IV. Taxonomic treatments and nomenclature. *Mem. Fac. Sci., Kyoto Univ., Ser. Biol.* 15: 29-61

Park E. K., Sung J. H., Trinh H. T., Bae E. A., Yun H. K., Hong S. S., Kim D. H. (2008) Lactic acid bacterial fermentation increases the antiallergic effects of *Ixeris dentata*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 308-313

Peng Y. H., Lu Z. X., Chen K., Luukkanen O., Korpelainen H., Li C. Y. (2005) Population genetic survey of *Populus cathayana* originating from Southeastern Qinghai-Tibetan plateau of China based on SSR markers. *Silvae Genet.* 54: 116-122

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959

Ruas C. F., Nakayama T. J., Ortiz M. Á., Kuroki M. A., Stuessy T. F., Tremetsberger K., Ruas E. A., Santos M. O., Talavera S., Ruas P. M. (2009) Isolation and characterization of eight microsatellite loci from the endangered plant species *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae). *Conserv. Genet.* 10: 1413-1416

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 4: 406-425

佐藤 俊男, 滝沢 則之 (1994) 柏崎のイソニガナ生育地の現状報告. 新潟県植物保護 16: 2

Sehgal D., Raina S. N., Devarumath R. M., Sasanuma T., Sasakuma T. (2009) Nuclear DNA assay in solving issues related to ancestry of the domesticated diploid safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and the polyploid (*Carthamus*) taxa, and phylogenetic and genomic relationships in the genus *Carthamus* L. (Asteraceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 53: 631-644

Seto M., Miyase T., Fukushima S. (1986) Sesquiterpene lactones from *Ixeris dentata* Nakai. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4170-4176

Seutin G., White B. N., Boag P. T. (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69: 82-92

Smitsen R. D., Breitwieser I. (2008) Species relationships and genetic variation in the New Zealand endemic *Leucogenes* (Asteraceae: Gnaphalieae). *New Zealand J. Bot.* 46: 65-76

Soulé, M.E. (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In: Soulé, M.E., Wilcox, B.A. (Eds.) *Conservation biology, an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, 151-169

Stebbins G. L. (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia Univ. Press, New York

Stebbins G. L. (1971) *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold Publishers Ltd., London

竹本 貞一郎 (1954) ニガナの核型研究 -1-. 染色体 21: 747-751

竹本 貞一郎 (1956) イソニガナの染色体について. 植物学雑誌 69: 325-328

Takemoto T. (1962) Cytological studies on *Taraxacum* and *Ixeris*, II. Some Japanese races of the *Ixeris dentata* complex. *Biol. J. Okayama Univ.* 8: 59-89

竹本 貞一郎 (1970) 複合種”ニガナ”の生態と染色体. 岡山大学教育学部研究収録 29: 71-89

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739

Tanabe A. S., Toju H. (2013) Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *Plos One* 8: e76910

田中 啓介 (2009) 複合種ニガナ (*Ixeridium dentatum*) における形態学的・遺伝学的多様性を用いた系統解析. 長岡技術科学大学大学院工学研究科生物機能工学専攻修士論文. (未公刊)

谷津 義男, 末松 義規, 北川 知克, 江田 康幸, 田島 一成, 村井 宗明, 盛山 正仁 (2008) 生物多様性基本法. 株式会社ぎょうせい: 26

津村 義彦 (2007) プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド. 種生物学会編, 森の分子生態学, 文一総合出版: 158-169

馬渡 峻輔 (1997) 分類学はこれまで何をしてきたか. 岩槻邦男, 馬渡峻輔編, バイオダイバーシティ・シリーズ 1 生物の種多様性, 裳華房: 12-52

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Fritjers A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, 315-322

安ヶ平 紀子, 佐藤 浩二, 高原 美規, 山元 皓二 (2000) 絶滅危惧種イソニガナとその近縁種の遺伝的多様性. 長岡技術科学大学研究報告 21: 111-117

Yeh F. C., Boyle T. J. B. (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Belg. J. Bot. 129: 157

Yi J. M., Hong S. H., Lee H. J., Won J. H., Kim J. M., Jeong D. M., Baek S. H., Lim J. P., Kim H. M. (2002) *Ixeris dentata* green sap inhibits both compound 48/80-induced anaphylaxis-like response and IgE-mediated anaphylactic response in murine model. Biol. Pharm. Bull. 25: 5-9

米倉 浩司, 梶田 忠 (2003) BG Plants wamei-gakumei (Japanese-Latin) index (YList) [online]. Available from http://bean.bio.chiba-u.jp/bgplants/ylist_main.html [accessed September 16, 2013]

Yonekura K. (2005) Taxonomic notes on vascular plants in Japan and its adjacent regions (I). -New combinations and new names of Japanese plants-. J. Jpn. Bot. 80: 323-333

米村 惣太郎 (2013) 絶滅危惧植物タコノアシの保全と再生に関する生態学的研究. 清水建設研究報告 90: 157-166

付録

第2章 ニガナ種内の分類群に対する分子系統学的解析

2. 2. 3 倍数性レベルの推定

- ① 染色体を凝縮させ観察しやすくするために、前処理として根端を含む幼植物体を冷水に浸漬（0℃、24時間）した。
- ② 根端をファーマー液（氷酢酸：エタノール = 3：1）に浸し（室温、24時間）、体細胞の固定化処理を行った。
- ③ 固定化処理した根端を多量の純水で濯いだ後、1N HCl に浸し（60℃、1分間）、解離処理を行った。
- ④ 解離処理した根端を多量の純水で濯いだ後、1.5%酢酸カーミン溶液と1N HCl の混合液（9：1）に浸し（室温、1時間）、染色処理を行った。
- ⑤ 余分に付着した染色液を除き、そして根端をスライドガラスに置き、カバーガラスを被せ、押し潰し法によって根端細胞を平面化し、染色体を展開させた。
- ⑥ 光学顕微鏡を用い、標本を観察し染色体数を計測することで倍数性レベルの推定を行った。

2. 2. 5 ITS 領域の配列解析

- ① 0.2 ml の 8 連 PCR チューブを用い、各チューブ中には滅菌超純水を 14.8 μ l、10×Gene *Taq* Universal Buffer（15 mmol / l Mg²⁺ plus）を 2 μ l、2.5 mmol の dNTP Mixture を 1.6 μ l、10 μ M のユニバーサルプライマーを各 0.25 μ l、10 ng / μ l の鋳型 DNA を 1 μ l、5 units / μ l の *Taq* DNA Polymerase を 0.1 μ l 添加し、最終量 20 μ l の PCR 反応溶液を調製した。
10×Gene *Taq* Universal Buffer、dNTP Mixture、*Taq* DNA Polymerase は、

Gene Taq (Nippon Gene, Tokyo, Japan) によるセットで提供されている試薬を用いた。

- ② PCR Thermal Cycle SP (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を用い、以下のプログラムで PCR 増幅を行った。

Step 1 : 初期変性 (94°C、3 分間)

Step 2 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (52°C、30 秒間)、

伸長 (72°C、1 分間)

35 サイクル

Step 3 : 最終伸長 (72°C、10 分間)

- ③ 増幅産物の一部を用いて、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって単一の増幅断片を確認した。
- ④ 残りの増幅産物を Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega Corporation, Madison, WI, USA) によって精製した。
- ⑤ 精製した増幅断片を pGem T-easy plasmid cloning vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) によってベクターへライゲーション (20°C、2 時間) した。
- ⑥ ライゲーションしたベクターを JM109 high-efficiency competent cells (Promega Corporation, Madison, WI, USA) へ導入し、形質転換体を作製した。
- ⑦ 形質転換体をアンピシリン、Xgal、IPTG 含有の LB プレート培地へ接種し、インキュベーターで培養 (37°C、24 時間) した。
- ⑧ ブルー・ホワイトセレクションによって白いコロニーをピックアップし、ライゲーションした断片を含むベクター配列に対応したユニバーサルプライマー (T7: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'、SP6: 5'-GATTTAG

GTGACACTATAG-3') を用いてコロニーPCR を行い、断片の存在を確認した。

- ⑨ 確認できた断片を含むコロニーからプラスミド DNA を単離するために、GenElute Plasmid Mini-Prep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。
単離操作は、キットのマニュアルに従った。
- ⑩ 単離したプラスミド DNA 中の目的領域を含む断片の配列を決定するために、試料を株式会社バイオマトリックス研究所 (Chiba, Japan) に送付、受託解析を依頼し、配列決定した。
- ⑪ 決定した配列データを DDBJ へ登録した : Accession Nos. AB766214-AB766226

2. 2. 6 AFLP による多型解析

- ① 500 ng のゲノム DNA を用い、AFLP Core Reagent Kit and AFLP (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって制限酵素処理及びアダプターライゲーションを行い、それから反応溶液を滅菌超純水によって 10 倍希釈した。
- ② 0.2 ml の 8 連 PCR チューブを用い、各チューブ中には Pre-amp Primer Mix I (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 8 μ l、10 \times Ex *Taq* Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) を 1.1 μ l、鋳型 DNA を 1 μ l、2.5 mmol の dNTP Mixture を 0.8 μ l、5 units / μ l の TaKaRa Ex *Taq* DNA polymerase を 0.05 μ l 添加し、最終量 10.95 μ l の PCR 反応 溶液を調製した。
10 \times Ex *Taq* Buffer、TaKaRa Ex *Taq* DNA polymerase は、TaKaRa Ex *Taq* (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) によるセットで提供されている試薬を用いた。
- ③ PCR Thermal Cycle SP を用い、以下のプログラムで一次増幅を行った。

Step 1 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (56°C、1 分間)、

伸長 (72°C、1 分間)

20 サイクル

④ 増幅産物を滅菌超純水によって 50 倍希釈した。

⑤ 0.2 ml の 8 連 PCR チューブを用い、各チューブ中には滅菌超純水を 14.8 μ l、鋳型 DNA を 5 μ l、10 μ M の二次増幅用プライマーを約 1 : 5 の割合 (E-site : M-site = 0.08 μ l : 0.42 μ l)、10 \times Ex *Taq* Buffer (20 mM Mg²⁺ plus) を 2 μ l、2.5 mmol の dNTP Mixture を 1.6 μ l、5 units/ μ l の TaKaRa Ex *Taq* DNA polymerase を 0.1 μ l 添加し、最終量 20 μ l の PCR 反応溶液を調製した。

⑥ PCR Thermal Cycle SP を用い、以下のプログラムで二次増幅を行った。

Step 1 : 初期変性 (94°C、3 分間)

Step 2 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (65.0~55.9°C、30 秒間)

(1 サイクルごとに 0.7°C ずつ下げる設定)

伸長 (72°C、1 分間)

13 サイクル

Step 3 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (56°C、30 秒間)

伸長 (72°C、1 分間)

23 サイクル

Step 4 : 最終伸長 (72°C、5 分間)

⑦ 増幅産物に対して、7% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって多型を検出した。

- ⑧ 多型検出した AFLP バンドプロファイルをバイナリーデータ（1：バンドあり、0：バンドなし）として記録した。

2. 2. 7 系統樹構築

「ITS 配列に基づいた系統樹構築」

- ① 決定した配列データから ITS1 及び ITS2 の配列を抽出し統合した。
- ② MEGA version 5.05 (Tamura *et al.* 2011) に実装されている機能の Clustal W を用いて、配列データのアライメントを行った。
- ③ 同ソフトウェアに実装されている機能の系統解析を用いて、近隣結合法による階層的クラスター解析及び系統樹を構築した。

クラスター解析の設定条件には、maximum composite likelihood model を用い、変異割合の評価には塩基置換、挿入及び欠失を含めた。また、系統樹の各枝の信頼性を評価するために、ブートストラップ解析（1000 反復）を行った。

「AFLP 多型に基づいた系統樹構築」

- ① 得られた AFLP バンドプロファイルのバイナリーデータから Phyltools version 1.32 (http://www.plantbreeding.wur.nl/UK/software_PhylTools.html) 及び Phylip version 3.69 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) を用いて、Nei の遺伝的距離、近隣結合法による階層的クラスター解析、ブートストラップ解析（1000 反復）を行った。
- ② MEGA version 5.05 に実装されている機能の系統解析を用いて系統樹を構築した。

3. 2. 2 DNA 抽出

- ① 1.5 ml マイクロテストチューブ中で約 50 mg の葉試料を液体窒素で凍結し、ペッスルを用いて粉碎した。
- ② 予め余熱 (65°C) した Extraction Buffer (2% w/v CTAB, 1.42 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2% w/v polyvinylpyrrolidone, 5.0 mM ascorbic acid, and 4.0 mM diethyldithiocarbamic acid; Doyle and Doyle 1990) 700 μ l と、RNase A 溶液 (20 mg/ml) 7 μ l を混合液とし、粉碎した葉試料に添加した。
- ③ 転倒混和後、インキュベート (65°C、5 分間) した。
- ④ クロロホルム : イソアミルアルコール混合液 (24 : 1) を 570 μ l 添加した。
- ⑤ 転倒混和後、遠心分離 (19000 g、室温、10 分間) を行った。
- ⑥ 上清を新たな 1.5 ml マイクロテストチューブに移し、その量に対し 0.7 倍量のイソプロパノールを添加した。
- ⑦ 転倒混和後、インキュベート (室温、10 分間) した。
- ⑧ 遠心分離 (19000 g、室温、5 分間) を行い、沈殿物をチューブの壁に付着させ、溶液をピペットで除去した。
- ⑨ 70% エタノールを 1 ml 添加し、沈殿物を洗浄した。
- ⑩ 遠心分離 (19000 g、室温、5 分間) を行い、沈殿物をチューブの壁に付着させ、溶液をピペットで除去した。
- ⑪ チューブ中に残るエタノールを完全に除去するために、乾燥処理を行った。
- ⑫ TE Buffer を 20 μ l 添加し、沈殿物を溶解し DNA 試料とした。
- ⑬ 抽出した DNA の純度 (A 260 / A 280) と濃度は、GeneQuant RNA / DNA Calculator で測定した。

3. 2. 3 SSR マーカーの開発

- ① 1.5 ml マイクロテストチューブ中にゲノム DNA を 10 μ g、平滑末端を

生じる制限酵素 (*AluI*、*EcoRV*、*HaeIII*、*HincII*、*RsaI*、*SspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)) とそれらに対応する 10×Reaction Buffer を 10 μl 添加し、滅菌超純水によって最終量 100 μl の反応液を調製しゲノム DNA を断片化 (37°C、12 時間) し、その後制限酵素の失活処理 (70°C、15 分間) を行った。

② 1.5 ml マイクロテストチューブ中に不等長アダプター (長鎖 : 5'-GTAATAC GACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'、短鎖 : 5'-ACCAGCCC-NH₂-3') を 1.4 μg、と 10×Ligation Buffer を 6 μl と共に T4 DNA Ligase (TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) を 0.5 μl 添加し、滅菌超純水によって最終量 60 μl に調製しライゲーション (16°C、24 時間) を行った。

③ 0.2 ml PCR チューブにライゲーションした断片を含む溶液を 8 μl、10 mM の ddGTP (ddNTP, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を 5 μl、GeneAmp 10× PCR Gold Buffer を 5 μl、25 mM Mg²⁺を 3 μl、5 U/μl の AmpliTaq Gold DNA Polymerase を 0.25 μl 添加し、滅菌超純水によって最終量 50 μl の反応液を調製しアダプターの短鎖側の完全なブロッキング (94°C、9 分間⇒50°C、10 分間) を行い、それから滅菌超純水によって 10 倍希釈した。

GeneAmp 10×PCR Gold Buffer、Mg²⁺、AmpliTaq Gold DNA Polymerase は、AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によるセットで提供されている試薬を用いた。

④ 0.2 ml PCR チューブに GeneAmp 10×PCR Gold Buffer を 5 μl、dNTP Mixture (AmpliTaq Gold 360 DNA Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を 4 μl、25 mM Mg²⁺を 3 μl、鋳型 DNA を 1 μl、10 μM の AP2 primer (5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3') を 1 μl、10 μM の SSR primer ((AC)₁₀ : 5'-ACACACACACACACACACAC-3'、(GA)₁₀ : GAGAGAGAGA

GAGAGAGAGA、(AC)₆(AG)₅ : ACACACACACACAGAGAGAGAG、
(TC)₆(AC)₅ : TCTCTCTCTCTCACACACACAC) を 1 μl、5 U/μl の AmpliTaq
Gold DNA Polymerase を 0.25 μl 添加し、滅菌超純水によって最終量 50 μl
の PCR 反応溶液を調製した。

⑤ PCR Thermal Cycle SP を用い、以下のプログラムで PCR 増幅を行った。

Step 1 : 初期変性 (94°C、9 分間)

Step 2 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (62°C、30 秒間)

伸長 (72°C、1 分間)

5 サイクル

Step 3 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (60°C、30 秒間)

伸長 (72°C、1 分間)

38 サイクル

Step 4 : 最終伸長 (72°C、5 分間)

⑥ 増幅産物に対して、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウム
ブロマイド染色によってスメア化した断片を確認し、そこから
300~1000 bp の断片を含む領域のアガロースゲルを切り取った。

⑦ 切り取ったゲルから増幅断片を Wizard SV gel and PCR clean-up system
によって回収・精製した。

⑧ 精製した増幅断片を pGem T-easy plasmid cloning vector によってベクター
へライゲーション (20°C、2 時間) した。

⑨ ライゲーションしたベクターを JM109 high-efficiency competent cells へ
導入し、形質転換体を作製した。

⑩ 形質転換体をアンピシリン、Xgal、IPTG 含有の LB プレート培地へ接種し、

インキュベーターで培養（37°C、24 時間）した。

- ⑪ ブルー・ホワイトセレクションによって白いコロニーをピックアップし、ライゲーションした断片を含むベクター配列に対応したユニバーサルプライマー（T7 及び SP6）を用いてコロニーPCR を行い、断片の存在を確認した。
- ⑫ 確認できた断片を含むコロニーから GenElute Plasmid Mini-Prep Kit を用いてプラスミド DNA を単離した。単離操作は、キットのマニュアルに従った。
- ⑬ 単離したプラスミド DNA 中の断片の配列を決定するために、試料を株式会社バイオマトリックス研究所（Chiba, Japan）に送付、受託解析を依頼し、配列決定した。
- ⑭ ウェブベースソフトウェア Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いて、得られた配列情報から SSR 領域と AP2 プライマーアニーリング部位との間で 2 ヶ所に対応するプライマー（IP1 及び IP2）を設計した。
- ⑮ 0.2 ml PCR チューブに GeneAmp 10×PCR Gold Buffer を 2 μ l、25 mM Mg²⁺ を 2 μ l、dNTP Mixture を 1.6 μ l、鋳型 DNA を 1 μ l、10 μ M の AP1 primer（5'-CCATCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'）を 1 μ l、10 μ M の IP1 primer を 1 μ l、5 U / μ l の AmpliTaq Gold DNA Polymerase を 0.1 μ l 添加し、滅菌 超純水によって最終量 20 μ l の PCR 反応溶液を調製した。
- ⑯ PCR Thermal Cycle SP を用い、以下のプログラムで PCR 増幅を行った。
 - Step 1 : 初期変性（94°C、9 分間）
 - Step 2 : 変性（94°C、30 秒間）
 - アニーリング（各最適温度、30 秒間）
 - 伸長（72°C、1 分間）
 - 35 サイクル

Step 3 : 最終伸長 (72°C、5 分間)

- ⑰ 増幅産物を滅菌超純水によって 100 倍希釈した。
- ⑱ プライマーの組み合わせを AP2 primer と IP2 primer に変更し、これ以外⑮と⑯と同じ手順とし nested PCR を行った。
- ⑲ 増幅産物の一部に対して、1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって単一の断片であることを確認した。
- ⑳ 残りの増幅産物を Wizard SV gel and PCR clean-up system によって精製し、それから⑧-⑬の手順と同様の操作により、配列決定までを行った。
- ㉑ ウェブベースソフトウェア Primer3 を用いて、得られた配列情報から SSR 領域と AP2 プライマーアニーリング部位と対応するプライマー (IP3) を設計した。
- ㉒ 開発した SSR マーカーのプライマーの組み合わせ (IP1 / IP3 または IP2 / IP3) により実際に PCR 増幅されるかを確認した。
- ㉓ 増幅確認された組み合わせのプライマーを SSR マーカーとし、プライマーアニーリング部位から SSR 領域を含む増幅全体の配列データを DDBJ へ登録した (AB780500- AB780506)。

3. 2. 4 SSR マーカーによる多型解析

- ① 0.2 ml の 8 連 PCR チューブを用い、各チューブ中には 10×ThermoPol Reaction Buffer を 2 µl、dNTP Mixture を 1.6 µl、5 ng / µl の鋳型 DNA を 1 µl、10 µM の SSR マーカーのプライマーの組み合わせを各 0.5 µl、5 U / µl の Taq DNA Polymerase を 0.1 µl 添加し、滅菌超純水によって最終量 20 µl の PCR 反応溶液を調製した。

10×ThermoPol Reaction Buffer、Taq DNA Polymerase は、Taq DNA Polymerase with ThermoPol Buffer (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) による

セットで提供されている試薬を用いた。

- ② PCR Thermal Cycle SP を用い、以下のプログラムで PCR 増幅を行った。

Step 1 : 初期変性 (94°C、3 分間)

Step 2 : 変性 (94°C、30 秒間)

アニーリング (各最適温度、30 秒間)

伸長 (72°C、1 分間)

35 サイクル

Step 3 : 最終伸長 (72°C、10 分間)

- ③ 増幅産物に対して、12% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって多型を検出した。
- ④ 多型検出した SSR バンドプロファイルをジェノタイプデータ及びバイナリーデータ (1 : バンドあり、0 : バンドなし) として記録した。