

# 野生サクラソウ集団の多様性と適応に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士（農学）学位論文

吉田 康子

## 目次

### 緒論

1. はじめに -----	1
2. 遺伝的多様性の重要性と評価方法 -----	2
3. サクラソウ <i>Primula sieboldii</i> の概要 -----	6
4. サクラソウの長期的な存続に必要な遺伝的多様性における形質の重要性 -----	8
5. サクラソウにおける形質の遺伝的多様性評価のための分子マーカーの有効性	9
6. 本研究の目的 -----	10
1章 野生サクラソウ集団における花卉形態の遺伝的多様性の評価 -----	12
材料 -----	13
方法 -----	13
結果 -----	15
考察 -----	17
2章 同一環境栽培による適応関連形質と遺伝構造の把握 -----	29
材料 -----	30
方法 -----	31
結果 -----	34
考察 -----	37

3章 複数環境栽培による表現型可塑性の遺伝的変異の評価 -----	56
材料 -----	57
方法 -----	58
結果 -----	59
考察 -----	62
4章 サクラソウにおける量的形質の遺伝的多様性評価および花型の識別を 目的とした分子マーカーの有効性の検証 -----	85
材料 -----	86
方法 -----	87
結果 -----	91
考察 -----	97
5章 総合考察 -----	147
摘要 -----	156
謝辞 -----	159
引用文献 -----	161

## 緒論

### 1. はじめに

現在は「第6の大量絶滅」と呼ばれるように、過去の5度の大量絶滅に匹敵するほど地球上の生物多様性は急速に減少している。現代の様々な生物種の減少は、人間活動による直接的、また間接的な影響が主な要因である。プリマック・小堀(1997)は、McNeely(1988)とMcNeely *et al.*(1990)の分類をもとに、生物多様性の価値には直接的価値と間接的価値があるとしている。直接的価値とは、人間の生活には不可欠な食料や木材、医薬品や品種改良などの将来様々な面において潜在的な可能性をもつ生物資源などである。一方、間接的価値とは、使用しても消費されない価値をさし、太陽エネルギーなどの生態系の生産力や水資源や土壌資源の緩衝作用、廃棄物の浄化作用、レクリエーションやエコツーリズムなど多岐にわたる。いずれの価値もこのような人間の生活にとって不可欠であることから、生物多様性の減少が国際的に大きな問題となり、1992年6月にリオデジャネイロで開催された国連環境開発会議(地球サミット)において「生物の多様性に関する条約」が署名され、1993年12月に発行された。日本は1993年5月に18番目の締約国としてこの条約を締結した後、1995年10月に最初の生物多様性国家戦略を制定、2002年3月には新・生物多様性国家戦略を策定し、生物多様性の保全と持続可能な利用を目的とした方針を定めた(環境省 2008)。

生物多様性は基本的には遺伝的多様性、種多様性、生態系多様性の3つの階層より構成されており、国際資源保護連合(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources; IUCN)はこれらの3つのレベルすべてにおける保全の必要性を提唱している(Frankham *et al.* 2002)。遺伝的多様性は種を、種多様性は生態系を構成していることから、3つの階層の中で最も下層に位置する遺伝的多様性は、種や生態系の基盤

であり、生物多様性の根本として重要である。

本章では、はじめに絶滅の危険性がある種を保全するに際しての遺伝的多様性の重要性とその評価方法について、次に本研究の対象であるサクラソウの長期的な存続に必要な遺伝的多様性における形質の重要性ならびに形質の遺伝的多様性評価のための分子マーカーの有効性について概観し、最後に本研究の具体的な目的を述べる。

## 2. 遺伝的多様性の重要性と評価方法

遺伝的多様性は種の適応進化の基盤であり、環境変動に対応していくために不可欠である。遺伝的多様性が高いほど潜在的な進化ポテンシャルを保有していると考えられている (Frankham *et al.* 2002)。そのため種の長期的な存続には個体数だけでなく、遺伝的多様性の維持も不可欠である。一般的に種の遺伝的多様性は集団内変異と集団間変異とで構成されている。集団内変異とは各集団が保有する遺伝的多様性であり、多様性が高いほど集団の長期的な存続が見込まれる。一般的に集団内の遺伝的変異の維持は集団サイズに大きな影響を受ける。生育地の分断化などによって引き起こされる集団サイズの縮小は近親交配を進めるため、繁殖能力や生存率の低下による絶滅の危険性を増大させる。さらに集団サイズが小さい集団では偶然よっても遺伝的多様性が減少する。一方、集団間変異は集団内に遺伝的変異が存在する場合に、方向性選択や遺伝的浮動によって生じる。一般的に方向性選択によって分化した集団は、それぞれ異なる自然選択を受けて自生地の環境に適応した結果、その集団に固有の遺伝的変異を保持している。その反面、その環境に不利な遺伝的変異は淘汰されていくため、集団内の遺伝的変異は小さくなる。各集団の長期的な存続にはそれぞれの環境に適した遺伝的組成を維持していくことが必要である。

遺伝的多様性の評価は主に分子マーカーと量的形質によって行われる。一般的に自然選択に中立で、主に遺伝的浮動と遺伝子流動を反映するとされる分子マーカーはこれまで多くの種で用いられており (Haig 1998) これまで量的形質の評価では不可能だった進化の過程や花粉流動の把握、あるいは親子判定などが行えるようになった。分子マーカーによる評価は、少量の組織があれば比較的容易に解析が行えることから進化生物学だけでなく、保全生態学の研究においても有効な方法である。一方、量的形質は遺伝的浮動と遺伝子流動に加え自然選択の影響を受ける。野生集団が持っている量的形質の遺伝的多様性の評価は Clausen *et al.* (1940) により同一環境栽培や複数環境栽培、相互移植実験が行われたことによって盛んに行われるようになった。特に固着性の植物は、これまでに緯度や気温などの様々な環境要因によって生態型分化を示していることが報告されている (福田 1982) 。

また同一環境下での栽培や複数環境での栽培による形質評価は、育種において伝統的で普遍的な手法であり、品種の一般適応性や広域適応性などを評価するために用いられている (鵜飼 2002) 。

これまで同一環境栽培や複数環境栽培を行って評価しなければならなかった量的形質に比べて、比較的簡便に行うことのできる分子マーカーを用いた遺伝的多様性の評価が様々な種で行われてきた。さらに、分子マーカーを利用した量的形質の遺伝的多様性評価がこれまで多くの研究者によって試みられ、分子マーカーと量的形質によって評価された集団内の遺伝的変異や集団間の分化程度の関係性が調べられてきた (Reed and Frankham 2001, Karhu *et al.* 1996, Bekessy *et al.* 2003, Merilä and Crnokrak 2001, McKay and Latta 2002, Leinonen *et al.* 2008) 。

しかしながら、ほとんどの場合で両者の遺伝的変異の関係性は認められず (Reed and Frankham 2001) 。

適応に関連した形質の集団内および集団間の遺伝的多様性の把握には量的形質の評価が重要であることが改めて強調されてきた (Storfer 1996, McKay *et al.* 2001, McKay *et al.* 2005, Holderegger *et al.* 2006) 。

一般的に、分子マーカーによって評価された遺伝的変異は適応分化に関連する遺伝的変異の情報を与えることができないが、量的形質の遺伝的変異を比較することで初めて集団間の遺伝的分化を引き起こす要因を推定することができる (Merilä and Crnokrak 2001, McKay and Latta 2002)。Spitze (1993) は、これまでに提唱されていた量的形質の集団間の分化程度が分子マーカーによる集団間分化程度が同程度であれば量的形質の分化は自然選択に中立な遺伝子によるものであるという帰無仮説 (Lande 1992) を検証するために、量的形質における集団間の遺伝的分化程度を  $Q_{ST}$  とし、アロザイムによる変異を自然選択に中立的な変異とみなして集団間分化程度の比較を行った。量的形質の集団間の遺伝的分化程度 ( $Q_{ST}$ ; Spitze 1993) と分子マーカーによって評価された集団間の遺伝的分化程度 ( $F_{ST}$ ; Weir and Cockerham 1984) の関係は以下の3つである。(1)  $Q_{ST} > F_{ST}$  の場合、量的形質の分化は方向性選択によって引き起こされていると考えられる。(2)  $Q_{ST} \approx F_{ST}$  の場合、量的形質の集団間分化は主に遺伝的浮動によって引き起こされていると考えられる。(3)  $Q_{ST} < F_{ST}$  の場合、安定化選択によって同じような表現型が選抜されたと考えられる。しかしこの場合は、安定化選択によるものかほとんど自然選択の対象になっていないかの区別は難しい。

これまでは集団間で違いが認められたとしても、その違いが遺伝的浮動によるものか自然選択によるものなのかは区別できなかったが、 $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  比較を行うことによって自然選択が関与しているということを明確にすることができるようになった。

Merilä and Crnokrak (2001) や McKay and Latta (2002) による総説以来、約5年間で  $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  の比較による適応的な集団間分化の評価についての研究が大幅に進んだ (Leinonen *et al.* 2008)。しかしながら、分子マーカーと適応関連形質の両方による評価の重要性が認識されているのにも関わらず、実際の保全策のひとつである保全単位の決定には分子マーカーと適応関連形質の2つの結果が反映されていない場合が多い

( de-Guia and Saitoh 2007 )。保全単位とは、Ryder( 1986 )が始めて提唱した概念であり、歴史的また現在において適応的および遺伝的に分化した集団を保全する集団の単位である。しかし、これまでは分子マーカーによって把握できる遺伝的な分化のみを考慮して決定された保全単位が多く、適応的な集団間分化を無視していたため、Crandall *et al.* ( 2000 ) や Fraser and Bernatchez ( 2001 ) は両方を考慮した保全単位の重要性を改めて主張した。de-Guia and Saitoh ( 2007 ) は 1998 ~ 2005 年の間に保全単位や進化的に重要な単位 ( Evolutionarily Significant Unit; ESU ) に関する 188 の研究をとりまとめ、保全単位には分子データか生態データのどちらかのデータのみを考慮した保全単位、すなわち Partial ESU を決定している研究が多いことを指摘した。両方の分化を考慮した研究が増えてきたものの ( Denoël 2007, Cano *et al.* 2008 )、分子マーカーによって把握される遺伝的な集団間分化に加え、適応的な集団間分化を考慮した保全単位の例はまだ少なく、特に植物においてはほとんど研究例がない。近年では、遺伝的な地域固有性を考慮した自生集団の復元や緑化に際しては、用いる材料の遺伝的多様性や遺伝構造の評価がなされていることから ( Knapp *et al.* 1996, Richards *et al.* 1998, Gordon and Rice 1998, 津村・岩田 2006 )、種の遺伝的多様性の保全においてはこのような保全単位の決定が不可欠である。

量的形質の遺伝的分化を明らかにするに際して、通常の変異型の遺伝的多様性の把握だけでなく表現型可塑性の多様性の把握も重要であると考えられる。なぜならば、集団は環境に対して遺伝的組成を何世代もかけて変化させていくが、環境変動が植物の 1 世代よりも短い場合には、遺伝的多様性が十分に存在する場合でもすぐに対応することができないため、一般的に遺伝子型が環境に応じて異なる表現型を示す可塑性は、個体の一生よりも短い間の環境変動に対応する上で重要となる ( Jump and Peñuelas 2005 )。一般的に可塑性の程度は遺伝的であり ( Bradshaw 1965, Schlichting 1986, Scheiner 1993,



工藤 2000)、種または集団の長期的な生存においてはその変異が大きいことが望ましい (Via 1994)。特に動物とは異なり、固着性であり、環境の影響を受けやすい植物の存続には、環境変動に対する緩衝効果としても可塑性が不可欠である (河野 1974)。

これまでに表現型可塑性は Bradshaw (1965) を始めとし、適応的な表現型可塑性 (Givnish 1988, Weinig 2000, Ghalambor *et al.* 2007)、可塑性に関するコストや制限 (DeWitt *et al.* 1998, van-Kleunen and Fischer 2005)、集団の平均値と可塑性の量やパターンとの関係性や遺伝的変異と可塑性の関係性 (Macdonald and Chinnappa 1989, Santamaría *et al.* 2003) など多くの研究が進めされてきた。ある特定の形質が環境が異なることによって変化することがなんらかの適応的意義を有するか否かに関して十分な検討をされた事例は極めて限定されおり (河野 1974)、実際に植物における表現型可塑性が環境への適応に有利に働くことが明確に示された研究はこれまでに避陰反応と害虫・病原菌に対する耐性の 2 例しかない (van-Kleunen 2005)。

集団の将来の存続可能性を推定していく上では、遺伝的多様性に加え、表現型可塑性の遺伝的変異を評価していくことが必要である。

### 3. サクラソウ *Primula sieboldii* の概要

サクラソウ (*Primula sieboldii* E. Morren,  $2n=24$ ) は、サクラソウ科サクラソウ属の多年性植物であり、北海道から九州およびアジア北東部に生育している (Yamazaki 1993)。サクラソウは種子繁殖だけでなく地下茎による栄養繁殖も行い、栄養繁殖によって増えた遺伝的に同一で生理的に独立した株をラメット、それらの集合をジェネットと呼ぶ。各ラメットはおよそ数十年以上生きると言われている (鳥居 1985)。生殖様式は、長花柱花個体と短花柱花個体の 2 つの花型 (morph) が集団内に存在する異型花柱性の自家不和合性を示す他殖性である。自生地内での健全な種子生産には、長花柱花と短花柱花

の割合が1対1であることが望ましく、トラマルハナバチ (*Bombus diversus* Smith) を主要なポリネーターとした虫媒により受粉結実を行う (Washitani *et al.* 1994)。

サクラソウの生活環は、冬から春にかけて出芽し、特別天然記念物として指定されている埼玉県田島が原の自生地のように、比較的冬の気温が高い場所では3月の中旬から、標高の高い、あるいは高緯度地域のように冬の気温の低い場所では5月中下旬から開花する。開花時には5~20cmの花茎をラメットあたり1本伸ばし、5~15個の小花を咲かせる。結実した種子は、親個体の近傍に重力散布され (Ishihama *et al.* 2003) 開花を終えたジェネットは8月頃までに地上部から姿を消し、次年度の出芽までの期間は土壌内で栄養繁殖によって地下芽を増大させる (中村 未発表)。

サクラソウは、開発などによる生育地の消失や分断化、園芸目的の盗掘などにより全国的に個体数が減少し、2000年の環境庁の植物版レッドリストでは絶滅危惧類に分類された (環境庁 2000)。2007年のレッドリストの見直しの際に、これまでの保全努力によって絶滅の危険性が下がったという理由から、アサザなどと共に準絶滅危惧類に再分類された (Iwatsuki 2008)。しかし野生個体群は保全対策の下で維持されている場合が多く、保全対策の継続が必要であるとも記載された。

これまでサクラソウ保全のための基礎的知見を得ることを目的とし、生理生態学や集団遺伝学などの観点から様々な研究が進められ、「かつての身近な絶滅危惧種」の保全のシンボルとしても地位を獲得してきたサクラソウ (鷲谷 2006) は、生物学的・生態学的情報を蓄積している野生植物のモデル植物のひとつである。サクラソウが他殖性であること、また種子繁殖だけでなく栄養繁殖も行うこと、ポリネーターを介する虫媒植物であるということ、また多年生であることから、多くの野生植物で共通してみられる性質を持っているため、サクラソウを題材とした研究はサクラソウ以外の野生植物の保全戦略に対しても十分有益である。

絶滅危惧種保全のモデル植物としてだけではなく、サクラソウは日本の伝統的な園芸品種としての価値を持つ。これまで江戸時代から育種が行われてきており、現在では300以上の品種が作出されている(鳥居 1985)。園芸品種の起源を野生集団から探った結果、主に荒川流域の野生集団から育種されてきたことが明らかになっている(Honjo *et al.* 2008)。荒川流域の野生集団は田島が原集団を除く、多くの集団で個体の減少または消失によって遺伝的多様性が失われていることから、園芸品種は現在では失われている種の遺伝的変異を保有しているジーンバンクとしても重要である(本城 2005)。

#### 4. サクラソウの長期的な存続に必要な遺伝的多様性における形質の重要性

形質には質的形質と量的形質が存在するが、サクラソウの代表的な質的形質としては長花柱花と短花柱花を表す花型(morph)があり、集団内の花型の割合により種子生産は左右される。花型を除く多くの形質は量的形質であり、量的形質には自然選択を受ける適応に関連した形質と自然選択に中立な形質がある。花弁形状は、サクラソウの量的形質の中でも集団内と集団間の変異が評価されている形質であり、花弁を指標としてジェネット間識別が可能であること、また自然選択に中立な形質である可能性が示されてきた(Washitani *et al.* 1991, Yoshioka *et al.* 2007b)。

これまでにサクラソウの保全のために、北海道から九州まで日本全国に分布する32の野生集団を対象に葉緑体DNAとマイクロサテライト(Simple Sequence Repeat; SSR)マーカー8座を用いて遺伝的多様性の評価が行われている(Honjo *et al.* 2004, Honjo *et al.* in press)。その結果、緯度が高くなるほど集団内の遺伝的変異が減少していることや地理的に離れている集団ほど遺伝的に分化していることが明らかにされた。さらにそれらの結果に基づいて、Honjo *et al.* (in press)は、全国の野生集団を4つの遺伝的グループ(北海道、東北、関東・中部、西日本)に分類し、それらを保全単位とした。

サクラソウの長期的な存続を保障するためには、適応に関する遺伝多様性とその集団間分化を考慮した保全策の構築が不可欠だが、これまで野生サクラソウ集団の適応に関する情報は極めて少ない。また保全策のひとつである保全単位の設定には、これまで Honjo *et al.* (in press) により分子マーカーを用いて評価されてきた集団間分化に加えて、適応的な集団間分化に関する遺伝構造に関する形質の情報が必要である。そのためには、日本に分布する野生集団を用いて、様々な形質の集団内、集団間の遺伝的多様性を評価し、サクラソウの適応に関連した形質とその遺伝構造の把握を行う必要がある。さらに、集団の生存に不可欠な表現型可塑性についてもその遺伝的変異を把握することが望ましい。集団内の可塑性の遺伝的多様性を評価することは、集団がどの程度環境の変動に対応できるかを評価することであり、環境が大きく変動する昨今においては表現型可塑性も重要な形質のひとつである。

#### 5. サクラソウにおける形質の遺伝的多様性評価のための分子マーカーの有効性

これまでに述べたように、サクラソウの長期的な生存をはかるための保全策を講じる上では、適応に関連した形質の把握とその遺伝構造を考慮していくことが必要である。一般的に適応分化に関連した形質の遺伝的変異を把握するには同一環境下での栽培が必要であるが、全国に分布するサクラソウ集団を同一環境で栽培するには膨大な時間や場所、労力が必要になる。さらに準絶滅危惧類であるサクラソウは自生地からの個体の採取ができない場合もあるため、適応に関連した形質の評価には同一環境栽培による形質の表現型で評価するのではなく、分子マーカーを用いて対象とする形質の遺伝的多様性を評価することが望まれる。量的形質に関与する遺伝子座 (Quantitative Trait Loci; QTL) を解析することによって、QTL の近傍にあるマーカーを検出することができる。形質を支配する遺伝子座と密接に連鎖していることが期待されるマーカーを用いるこ

とによって各形質を支配する遺伝座の対立遺伝子により形質の多様性が評価できると考えられる。

育種においては対象とする形質の選抜を、形質を支配する遺伝子そのものの対立遺伝子やその遺伝子座の近傍にある分子マーカーを用いて行っている。このマーカー利用選抜により、生育初期段階での選抜が可能になり、特に家畜や果樹など生育に時間がかかる対象にとっては時間効率が向上や、遺伝率が低く、表現型が環境の影響を受けやすい形質の確実な選抜が可能になる（鵜飼 2000）。育種においては、作物や樹木においても目的遺伝子を用いた選抜や選抜を行うための遺伝子の特定、また生育上重要な形質を支配する遺伝子について野生集団が保有する遺伝的多様性や、育種素材としての野生集団の利用可能性を推定するための野生集団の多様性評価など様々な研究が進んできている（Guillet-Claude *et al.* 2004, Skøt *et al.* 2005, Wilcox *et al.* 2007, Jones *et al.* 2008）。

QTL の近傍にあるマーカー座により遺伝的多様性の評価を行うことで、同一環境栽培を行わずに、日本に分布しているサクラソウ集団の適応関連形質の遺伝的多様性の把握が可能となり、栽培地および自生地の環境に左右されず遺伝的多様性を評価することが期待できる。この方法は自生地における個体そのものの採取を必要とせず、少量の組織だけで評価が可能であることから、絶滅の危機にあるサクラソウの保全にとっては有効である。しかし、遺伝子座と QTL との距離次第ではその間で組換えが生じる可能性があり、正確な評価ができない場合があることに留意する必要がある（鵜飼 2000）。

## 5. 本研究の目的

本研究は、野生サクラソウの保全策を構築するために必要な適応に関連した形質とその遺伝構造の把握を行うために、量的形質とその表現型可塑性の集団内および集団間の遺伝的多様性の評価を試みた。さらに分子マーカーによる適応に関連した形質の遺伝的

多様性の間接的な評価の可能性について検証した。

1章では、これまで自然選択に中立であるとされ、目視による集団内の遺伝的多様性評価のための指標として用いられてきた花卉形状と面積を対象に、野生サクラソウ集団の集団内・間の遺伝的変異の評価および遺伝率の推定を行う。 $Q_{ST}$ と $F_{ST}$ の比較により、花卉形状と面積が自然選択に中立かどうか、また実際に目視による多様性評価の指標となりうるのかを検証する。

2章では、野生サクラソウの適応に関連している形質とその遺伝構造の把握を行うために、6形質の集団内と集団間の遺伝的変異を評価し、 $Q_{ST}$ と $F_{ST}$ の比較によって適応関連形質を明らかにする。さらに各集団の自生地5つの環境要因との関係を調べ、集団間分化を引き起こす要因を推定する。

3章では、複数環境栽培を行い、表現型可塑性の集団内・間の遺伝的多様性の評価を行う。

4章では、1~3章で評価された形質とサクラソウの異型花柱性に関連する花器形態に關与するQTLを明らかにし、適応関連形質と異型花柱性に関する花型に強く連鎖するマーカー遺伝子座を用いた野生集団の遺伝的多様性の評価を行い、分子マーカーを用いた遺伝的多様性評価の有効性について論じる。

5章では、各章で得られた結果をふまえ、サクラソウの保全における形質の重要性和今後の気温上昇などの環境変動に対する野生集団の生存可能性について論じるとともに、Honjo *et al.* (in press) がSSRマーカー8座の結果をもとに決定した保全単位について2章で得られた適応的な集団間分化を考慮して新たに考察する。さらに形質に連鎖する分子マーカーを用いた遺伝的多様性評価の今後の有用性について論じる。最後に現存する野生サクラソウの遺伝的多様性を保全するための指針について総合的に考察する。

## 1章 野生サクラソウ集団における花卉形態の遺伝的多様性の評価

### 緒言

サクラソウは江戸時代から育種が行われ、現在では 300 以上の品種が存在する日本の伝統的な園芸品種である（鳥居 1985）。これらの品種は野生種から作出されたことが Honjo *et al.* (2008) によって示唆されている。花卉形態はサクラソウの園芸品種において重要な形質の一つであり、園芸品種のもととなった野生サクラソウはそれぞれの集団において色や形状、大きさなど様々な花卉形態の変異を保有している（図 1-1）。

自生地の花卉形態の変異について、Yoshioka *et al.* (2007b) は画像解析を用いて自生地で採取した野生集団の花弁形状を評価した。これによって、花弁形状変異の約 90% が花弁の最大幅、切れ込みの深さ、重心の位置の 3 つの形状パラメーターで説明された。各パラメーターの集団間の遺伝的距離を比較したところ、分子マーカーによる集団間の遺伝的距離とも地理的距離とも関係が認められなかった。しかし Yoshioka *et al.* (2007b) は花弁形状を示す全てのパラメーターを用いて評価した集団間の遺伝的距離と地理的距離との間に有意な相関を認め、その分化は創始者効果が isolation-by-distance によるものだと推測し、花弁形状変異は自然選択に対し中立であることを示唆した。しかし、評価に用いた花弁は自生地で採取した小花であり、遺伝的変異と各自生地の環境効果による変異を含んでいることから、単純に花弁形状が自然選択に中立な形質であると言えない。

さらにこれまで花弁の違いによってジェネット間の識別が可能であることが報告されており（Washitani *et al.* 1991）花弁は多様性評価には有効な指標であるものの、実際にはどの程度遺伝的な形質であるのか知られていない。花卉形態の遺伝率が高く、遺伝的な要因によって支配されていること、また自然選択に中立的な形質であることが証明

されるならば、花卉形態は集団内の遺伝的多様性と集団間の遺伝的分化を把握するための有効な指標になりうると考えられる。

そこで本章では同一環境下で栽培した野生サクラソウの花弁形状と花弁面積の画像解析を行い、花卉形質に関する広義の遺伝率の推定および集団内、集団間の遺伝的多様性の評価を行った。また花卉形質が自然選択に対して中立な形質であるのかを明らかにするため、分子マーカーによって算出された集団間の分化程度 ( $F_{ST}$ ) と花卉形質の集団間の分化程度 ( $Q_{ST}$ ) を比較した。

## 材料

供試材料として 2000 年に北海道、埼玉、長野の 3 地域由来の野生 5 集団から採取した 108 ジェネットを用いた (表 1-1)。各自生地よりジェネットあたり 1 ラメットを採取し、3 年間筑波大学で増殖させた。集団内のジェネット数が 100 を越える北海道集団と長野 1 集団は、花卉形態と空間的な距離、ラメットの密集程度よりジェネット識別を行い、全体を網羅するように採取された 24 と 27 ジェネット (Honjo *et al.* 2004) を用いた。集団内のジェネット数が 30 未満であった長野 2 と長野 3 集団は、現存するジェネットを全て採取し (Honjo *et al.* 2004) それぞれ 26 と 13 ジェネットを供試した。天然記念物に指定されている埼玉集団は、Washitani and Kabaya (1988) の実験材料の後代である 18 ジェネットを用いた。現在 300 ジェネット以上が存在している埼玉集団の 18 のジェネット数は集団サイズに比べてやや少ないが、現在はすでに天然記念物となり採取が不可能であるため、これらにより埼玉集団をあらわすものとした。

## 方法

花弁面積と花弁形状の集団内・間の遺伝的変異を評価するために、108 ジェネット 433



ジェネットを 2003 年に筑波大学農林技術センター内のビニールハウスで栽培した。クローンの芽は直径 12cm の黒いビニールポットに人工培土 (Metro-Mix 350 (HYPONeX, JAPAN, CORP.)) を用いて定植した。1 ジェネットあたり 2~4 ラメットを用いた。第一花開花日が記録された 3 日後に最初に開花した第一小花を採取し、1 ラメットあたり 1 小花を測定した。

#### < 花弁形態の定量的評価 >

Yoshioka *et al.* (2004) を参考に、画像解析により花弁形状と面積を測定した。花弁形状は小花をカッターナイフで 5 枚の花弁に分割し、サイズマーカー (9cm×9cm) とともに一緒にデジタルカメラ (COOLPIX-850, Nikon, Tokyo) で撮影した (図 1-2)。花弁形状と面積は SHAPE 1.2 (Iwata and Ukai 2002) を用いて量的に評価した。分散 - 共分散行列に基づいて行われた主成分分析から得られた 40 個の標準化されたフーリエ係数を花弁形状のパラメーターとした。花弁形状の変異は対称変異と非対称変異に分割することができるが、Yoshioka *et al.* (2004) により非対称変異は環境効果が大きいことが明らかになっていることから本章では対称変異のみを対象とした。

#### データ解析

Nested ANOVA を用いて花弁面積と形状における全分散を集団間、集団内ジェネット間、ジェネット内ラメット間の各階層に分割し、各階層の全分散における寄与を推定した。ジェネット内ラメット間分散は同一遺伝子型間の分散であるため、環境変異とみなし、ジェネット間と集団間の分散を遺伝的変異とし、全分散における遺伝的変異の割合を広義の遺伝率 (Falconar 1981) として算出した。

集団内変異が集団間で同程度かどうかを調べるために、等分散検定として Bartlett's

検定を用いた。Nested ANOVA によって有意な集団間差が認められた形質については、各集団間を比較するために Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較を行った。これらの統計解析には、統計解析ソフト JMP ver.6.0.0 ( SAS Institute Inc. 2005 ) を用いた。

花卉形質の集団間の分化程度を推定するために、以下の式より  $Q_{ST}$  ( Spitze 1993 ) を推定した。

$$Q_{ST} = \sigma_{g(b)}^2 / (\sigma_{g(b)}^2 + 2\sigma_{g(w)}^2)$$

$\sigma_{g(b)}^2$  は集団間の分散成分を、 $\sigma_{g(w)}^2$  は集団内 ( ジェネット間 ) の分散成分を示しており、これらの分散成分は Nested ANOVA より算出した。さらに花卉形質の集団間分化の要因を推定するために、Honjo *et al.* ( in press ) の SSR マーカー 8 座による遺伝子型データをもとに本章で用いた 108 ジェネットの集団間の分化程度 (  $F_{ST}$  ) をプログラムソフト FSTAT2.9.3 ( Goudet 2001 ) より算出した。

## 結果

108 ジェネットのうち、開花した 94 ジェネットを解析の対象とした。

### < 花卉形質の定量的評価 >

SHAPE を用いた花卉形状解析によって明らかになった対象変異に関する第一主成分 ( PC1 ) から第三主成分 ( PC3 ) を図 1-3 に示した。PC1 は花卉の切れ込みの深さと最大幅を表し、寄与率は 58.4%、PC2 は花卉の長幅比を表し、寄与率 30.5%、PC3 は花卉の重心位置を表し、寄与率は 3.8% だった。これら 3 つの主成分で全分散のおよそ 93% が説明された。

花卉形状に関する PC1 ~ PC3 の遺伝率はそれぞれ 0.58、0.68、0.53、花卉面積は 0.69 であった ( 表 1-2 )。これらの形質のうち、PC1 と PC3 は PC2 と花卉面積に比べてラメ

ット間変異が大きく(図 1-4)、切れ込みと最大幅および重心の位置は、長幅比と花弁面積に比べ環境の影響を受けやすい形質であることが明らかになった。

#### < 花弁形質における集団内と集団間の遺伝的変異 >

Nested ANOVA の結果より、全ての形質で有意なジェネット間差が認められた( $P<0.01$ ; 表 1-2)。また PC1 ( $P<0.05$ ) と花弁面積 ( $P<0.01$ ) は集団間で有意に異なっていたが、PC2 と PC3 とに有意な集団間差は認められなかった( $P=0.25, 0.17$ ; 図 1-5)。

Bartlett's 検定を行った結果、花弁形質における集団内変異は 5 集団間で有意な違いは認められなかった。集団サイズは 16 ~ 300 ジェネット、サンプルサイズは 13 ~ 27 ジェネットと各集団で異なっていたものの、これらの結果から、花弁形質は同程度の集団内変異が維持されていることが明らかになった。北海道集団は他の集団に比べ、PC1 が有意に小さく、花弁面積は有意に大きかったことから、切れ込みが浅く幅広い、面積の大きな花弁を持っていることが示された。

花弁面積は花弁形状(PC1 ~ PC3)に比べて集団間の分散成分値が大きかった(図 1-4)。全形質とも、全分散成分における集団間の分散成分の割合が最も小さく、ジェネット間の分散成分の割合が最も大きかった。花弁形状における PC1 ~ PC3 の  $Q_{ST}$  はそれぞれ 0.055、0.006、0.000、花弁面積の  $Q_{ST}$  は 0.124 であった(図 1-4)。

#### < 量的形質と分子マーカーを用いた遺伝的変異 >

SSR マーカー 8 座を用いて算出された  $F_{ST}$  は 0.169 (95%信頼区間: 0.118 ~ 0.222) であった(表 1-4)。  $Q_{ST}$  と比較すると、花弁形状に関する 3 つの主成分(PC1 ~ PC3)は  $F_{ST}$  よりも小さく、花弁面積は  $F_{ST}$  とほぼ同じ値を示した。

## 考察

### < サクラソウの遺伝率 >

Nested ANOVA の結果、全ての花卉形質において 1%水準で有意なジェネット間差が認められた。また遺伝率 ( $h^2$ ) は花卉形状よりも花卉面積の方が高かった (表 1-2)。これまで多くの研究で野生集団の花卉形質の広義の遺伝率が推定されている。例えば、低い遺伝率を示す *Eichhornia paniculata* の花のサイズ ( $h^2 = 0.19 \sim 0.35$ ; Worley *et al.* 2001) や *Campanula rapunculoides* の花冠サイズ ( $h^2 = 0.25$ ; Vogler *et al.* 1999)、*Echium vulgare* の花冠サイズ ( $h^2 = 0.33$ ; Klinkhamer and van der Veen-van Wijk 1999) から、*Spergularia marina* の花卉サイズ ( $h^2 = 0.67 \sim 0.71$ ; Delesalle and Mazer 1995) や *Penstemon centranthifolius* の花冠の長さや幅 ( $h^2 = 0.86, 0.94$ ; Randall and Shaw 1993) のように高い遺伝率を示すものまで様々報告されている。Ashman and Majetic (2006) は 68 の研究をまとめた結果、花冠サイズの平均遺伝率は 0.46 (ばらつきは 0~1 の値を示す) であると述べている。この数値を見ると、サクラソウの広義の遺伝率は比較的高い範疇に入るものといえる。

### < 花卉形質の集団内・間の遺伝的多様性 >

切れ込みの深さと最大幅と示す PC1 や花卉面積は集団間で有意な違いが認められたが (図 1-5)、遺伝的変異の大部分はジェネット間差によるものであり、花卉形質の遺伝的変異は主に集団内に存在していた (図 1-3)。さらに集団内の変異は Bartlett's 検定の結果より、各集団はサンプルサイズに関係なく、花卉形質において同程度の遺伝的変異を保有していた。今回供試したジェネットを母集団の標本とみなすと、各集団が保有する花卉形質の遺伝的変異は集団サイズに関わらず同程度の変異が維持されていると言える。一般的に集団内の遺伝的変異には集団サイズが大きく関与するが、サクラソウの花卉形質に関する遺伝的多様性の維持には集団サイズの大小に関わらず、現存するジェ

ネットの維持が重要である。

花弁形質の集団間の分化程度 ( $Q_{ST}$ ) は PC3 の 0 から花弁面積の 0.124 までであった (図 1-4)。花弁形状の  $Q_{ST}$  は花弁面積に比べ小さく、花弁形質の  $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  を比較した結果、PC1 ~ PC3 の花弁形状の  $Q_{ST}$  は  $F_{ST}$  よりも小さい値を示したことから、花弁形状は自然選択を受けない形質であることが示唆された。一方、花弁面積の  $Q_{ST}$  は  $F_{ST}$  とほぼ同じ値を示していることから、自然選択ではなく主に遺伝的浮動によって分化していることが示唆された。また PC1 と花弁面積は集団間で有意に異なっていたが (表 1-2) これらの形質の集団内の遺伝的変異が大きいことから (図 1-4)  $Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  よりも同じ、または小さい値を示したように、比較的分化程度が低くなったと考えられる。Yoshioka *et al.* (2007a) はマルハナバチの先天的な選択と学習による選択行動を調べたところ、野生集団では見ることができないほど極端に細い花弁でのみ選択行動が生じ、通常の花弁形状変異ではマルハナバチの選択行動に差が認められなかったことから、野生集団の花弁形状に対してはマルハナバチの選択行動が方向性選択の淘汰圧として働いていないことを明らかにした。本研究の結果は、Yoshioka *et al.* (2007b) の方向性選択によって花弁形状は集団間分化をしていないという結果を支持するものである。

#### < 保全における花弁形態の有効性 >

本章では、花弁形状を示す花弁の切れ込みの深さと最大幅 (PC1) と長幅比 (PC2) と重心の位置 (PC3) および花弁面積が遺伝的な形質であり、自然選択に中立な形質であることが明らかになった。これまで自生地で行ってきた目視評価では、実際には花弁形状や面積だけでなく色やパターンにも基づいて行ってきたが、本研究の結果は、花弁形状と面積を対象に、花弁の切れ込みの深さと最大幅 (PC1) と長幅比 (PC2) と花弁面積の違いを識別することで、効率的にかつ非破壊的に自生地でのジェネットの識別を

行うことが可能であることを示している。重心の位置（PC3）は、花卉形状の全変異において 3.8%の寄与率であることに加え、他のパラメーターに比べてジェネット間の違いを識別することが難しいことから、目視評価に用いるには使いにくいパラメーターである。Conner *et al.* (2003) は制御環境下での遺伝率は自然環境下のものと比べて過大評価しやすいとの指摘している。従って、同一環境下よりも環境変異が大きい自生地では、花卉形質の中では比較的遺伝率の高い花卉面積と長幅比を中心に識別を行うべきであり、各パラメーターにおいてわずかな差異を示すジェネットにおいては識別を控えた方が良い。さらに環境変異は集団内に比べ年次間や集団間でかなり大きいことが予測されるため、目視評価は比較的環境変異が小さい集団内の多様性評価にのみ用いるべきである。以上より、自然選択を受けていないことが明らかになった、花卉の切れ込みの深さと最大幅、長幅比および花卉面積を用いた目視評価は、環境変異が比較的小さい集団内の多様性評価に有効であると考えられる。

表 1-1. 供試した 5 集団とジェネット数

集団名	所在地	緯度	経度	標高	集団 サイズ <sup>1</sup>	供試 ジェネット数
北海道	北海道 日高町	142°01'N	42°31'E	30 m	140	24
埼玉	埼玉 さいたま市	139°36'N	35°50'E	10 m	>300	18
長野1	長野 臼田町	138°31'N	36°12'E	960 m	166	27
長野2	長野 軽井沢町	138°38'N	36°19'E	940 m	28	26
長野3	長野 軽井沢町	138°31'N	36°21'E	1120 m	16	13

<sup>1</sup> 北海道と長野1集団は、自生地において花卉形態およびパッチの状態（密集程度）から推定した。長野2と長野3集団はSSRマーカーの結果から推定した。埼玉集団は自生地での目視によるおおよその推定値を示す。

表 1-2. 花弁形質における Nested ANOVA の結果

要因	df	PC1			PC2		
		MS	<i>F</i>	$h^2$	MS	<i>F</i>	$h^2$
集団	4	0.0158	2.67 *		0.0050	1.37	
ジェネット	94	0.0059	5.35 **	0.58	0.0037	8.04 **	0.68
ラメット	249	0.0011			0.0005		

要因	df	PC3			花弁面積		
		MS	<i>F</i>	$h^2$	MS	<i>F</i>	$h^2$
集団	4	0.00051	1.56		19.093	8.06 **	
ジェネット	94	0.00032	5.08 **	0.53	2.370	6.85 **	0.69
ラメット	249	0.00006			0.346		

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$



表 1-3. 花卉形質における各集団の平均値と分散

花卉形質		北海道	埼玉	長野1	長野2	長野3	Ave.
PC1	Ave.	-0.0876	-0.0113	0.0077	0.0414	0.0404	-0.0019
	Var.	0.0036	0.0071	0.0043	0.0023	0.0032	0.0041
PC2	Ave.	0.0079	-0.0282	0.0458	-0.0273	-0.0085	-0.0021
	Var.	0.0020	0.0017	0.0029	0.0026	0.0026	0.0023
PC3	Ave.	0.00137	0.00669	-0.00314	-0.00556	0.00634	0.00114
	Var.	0.00025	0.00031	0.00036	0.00040	0.00038	0.00034
面積	Ave.	5.9309	5.2326	5.1047	4.8058	5.5454	5.3239
	Var.	0.7850	0.7741	0.6773	0.6588	0.8676	0.7526

表 1-4. SSR マーカー8 座に基づく各集団内の遺伝的多様性と  $F_{ST}$

遺伝的多様性の指標	北海道	埼玉	長野1	長野2	長野3	$F_{ST}$
$H_e$	0.614	0.604	0.642	0.754	0.742	0.169
$n_{13a}$	4.098	5.316	4.855	6.262	6.625	
$F_{IS}$	-0.063	-0.059	0.039	-0.007	-0.125	

$H_e$  : ヘテロ接合度

$n_{13a}$  : 最小集団サイズ (13ジェネット) を考慮した座あたり平均対立遺伝子多様度

$F_{IS}$  : 固定指数



図 1-1. 供試した 5 集団の花弁変異

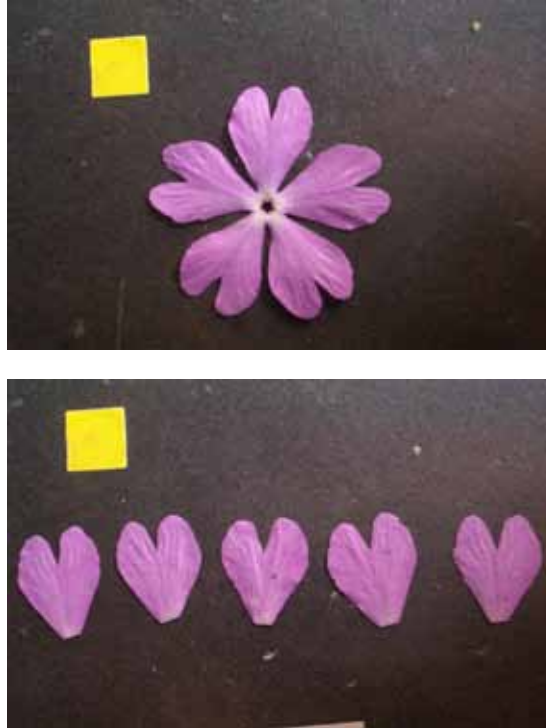


図 1-2. 画像解析に用いた写真

上段：花卉面積

下段：花卉形状

サイズマーカー：9mm×9mm

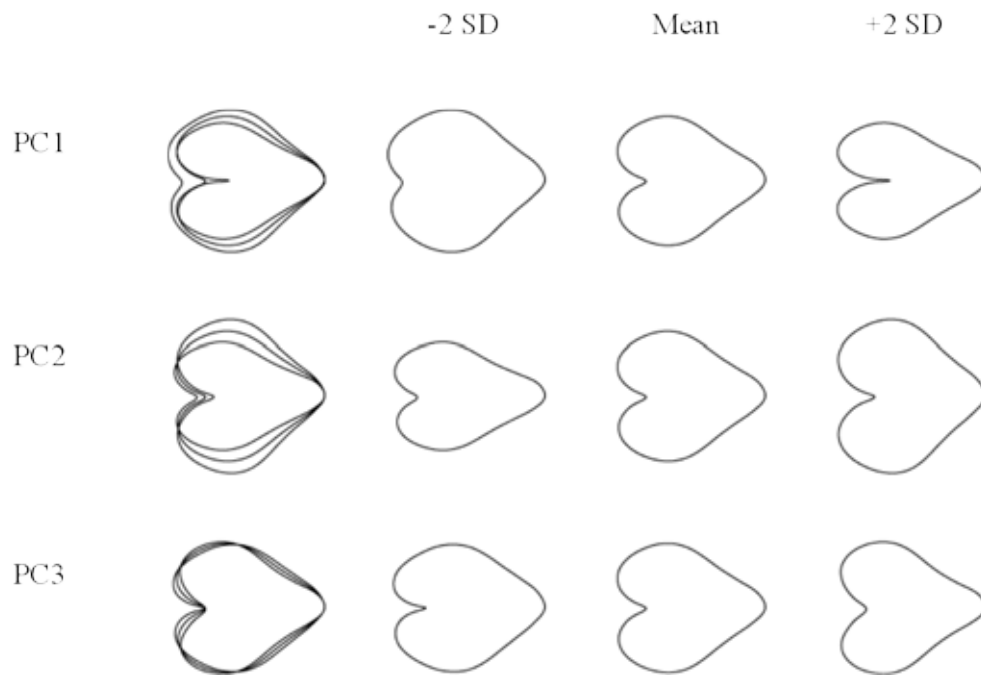


図 1-3. サクラソウの花弁形状に関わる第 1~3 主成分

PC1 : 切れ込みの深さと最大幅、PC2 : 長幅比、PC3 : 重心の位置

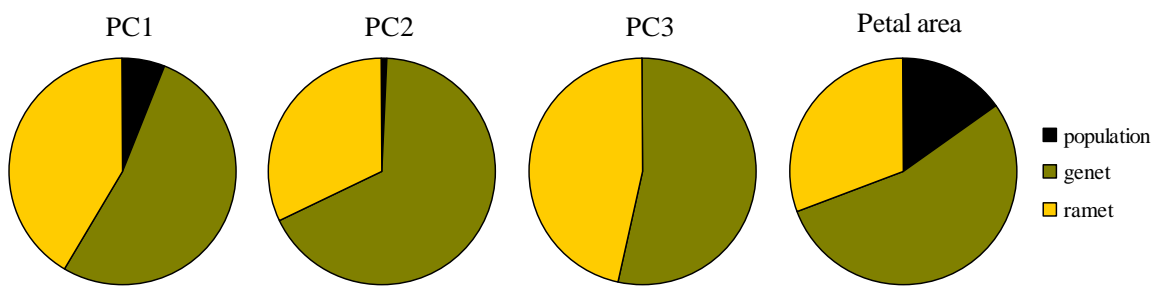


図 1-4. 花弁形質の全分散における 3 つの分散成分(集団間、ジェネット間、ラメット間)の割合と集団間の遺伝的分化程度 ( $Q_{ST}$ )

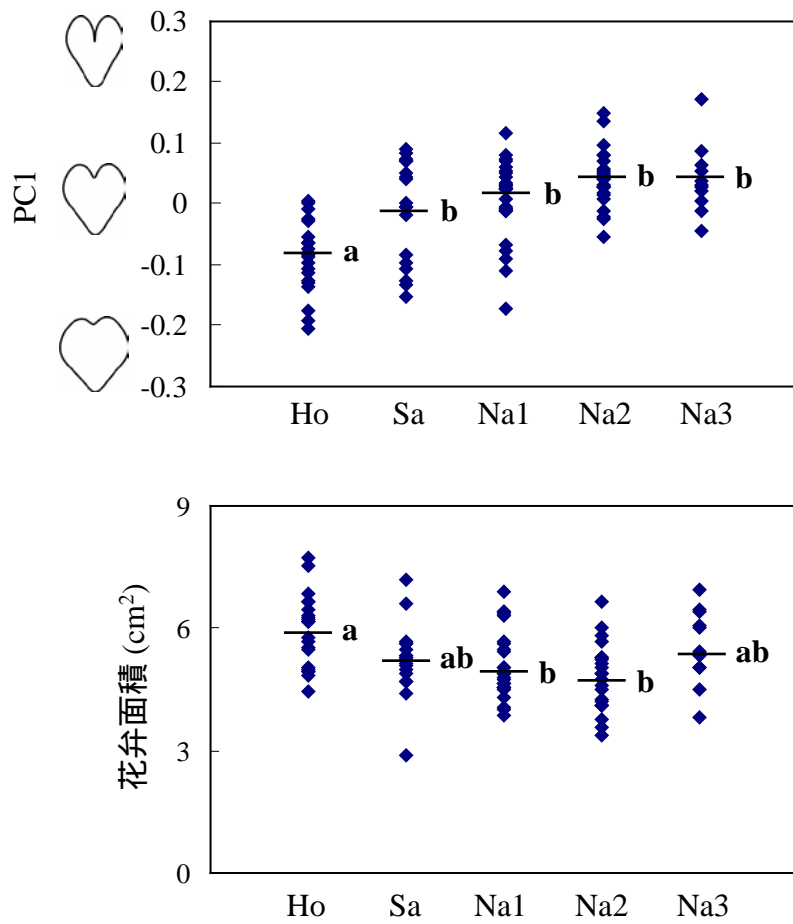


図 1-5. PC1 と花弁面積における各集団のジェネット値

異なる文字の各集団の平均値間では、統計的に 5 水準で有意差あり  
 Ho : 北海道、Sa : 埼玉、Na1 : 長野 1、Na2 : 長野 2、Na3 : 長野 3

## 2章 同一環境栽培による適応関連形質と遺伝構造の把握

### 緒言

1章では、サクラソウの花弁形状と面積に関する遺伝的変異が主に集団内に存在し、花弁形質は自然選択を受けない形質であることを明らかにした (Yoshida *et al.* 2008)。しかし花弁形質は目視によるジェネット識別に有効な指標であるものの自然選択に中立な形質であるため、花弁以外の形質を対象に同一環境栽培を行い、サクラソウの長期的な生存のために必要な適応に関連した形質を明らかにする必要がある。

これまでサクラソウの保全のための種内の遺伝的多様性を把握することを目的として、32の野生集団を対象に葉緑体DNAとSSRマーカーを用いた核DNAの遺伝的多様性の評価が行われ (Honjo *et al.* 2004, Honjo *et al.* in press, 本城 2005)。緯度が高くなるほど集団内の遺伝的多様性が小さくなることや集団間の地理的に離れているほど遺伝的に分化していることが明らかになっており、その結果から歴史的な進化の過程を考慮した4つの保全単位が決定された (Honjo *et al.* in press)。

保全を行ううえでは、分子マーカーに評価された遺伝的な分化に加え、各自生地の環境に適応した遺伝的組成を維持していく必要があり、保全単位の決定にも適応的な集団間分化と分子マーカーで見られる遺伝的な集団間分化の両方を考慮することが望ましい (Ryder 1986, Crandall *et al.* 2000, Fraser and Bernatchez 2001, de-Guia and Saitoh 2007)。これまで多くの研究者によって量的形質と分子マーカーによる集団内・間の遺伝的変異の比較がなされてきたが (Reed and Frankham 2001, Merila and Crnokrak 2001)、量的形質と分子マーカーを比較した研究結果が一致しないことから、同一環境下で量的形質を評価し、サクラソウの適応的な集団間分化を把握する必要がある。 $Q_{ST}$ と $F_{ST}$ の比較を通して、サクラソウ形質の集団間の遺伝的分化を引き起こす要因を推定することにより特



定した適応関連形質の遺伝構造を把握することはサクラソウの保全単位の決定に必要不可欠である。

鷲谷・矢原(1996)は、種の保全のためには、個体群を構成する個体の生存・成長・繁殖を良好な状態に保つために必要な環境条件を明らかにしなければならないと述べている。集団の適応分化を引き起こす環境要因は個体群が生存に対して最適な遺伝組成を保つために必要な環境条件であり、分化を引き起こす要因もまた種の保全のためには重要な情報となる

そこで本章では、野生サクラソウの適応関連形質とその遺伝構造を把握するために、北海道と埼玉、長野の3地域由来の野生5集団を3年間にわたり同一環境下で栽培した。6つの量的形質を対象に集団内、集団間の遺伝的変異を評価し、各形質の集団内の遺伝的変異とSSRマーカー8座を用いて評価された集団内の遺伝的変異を比較した。さらに $Q_{ST}$ と $F_{ST}$ を比較し、各形質の集団間の遺伝的分化を引き起こす要因および適応関連形質の推定を行った。最後に $Q_{ST}$ と $F_{ST}$ を比較した結果より方向性選択が働いていると考えられる形質については、集団間分化を引き起こす要因を推定するため各自生地の環境要因との関係を解析した。

## 材料

1章と同様に北海道、埼玉、長野地域由来の5集団から採取した110ジェネットを供試した(表2-1)。北海道の集団はHonjo *et al.* (in press)より他の集団と異なる遺伝的保全単位の属しており、地理的に離れていることから大きく分化した集団である。埼玉集団と長野の3集団は、同一の保全単位の属しているが、埼玉集団は関東地域内で標高が10mと低く2~3月の気温が4.2~7.5と暖かい場所であり、一方長野集団は標高が940~1120m高く-3.4~2.6と冬期の気温が低い場所である(表2-1)。また同じ長野地

域内に存在する 3 集団は地理的に近いことから、分子マーカーの結果より歴史的な関係が強く、集団間で分化していないことが明らかになっている (Honjo *et al.* in press)。

各集団の自生地における気象データは気象庁のホームページ (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) を参照し、表 2-1 に記載した。平均気温は、サクラソウの生育期間である 2 月から 6 月までの 1979~2000 年間の平均値を示している。長野 2 集団と長野 3 集団の自生地がかなり近くに位置しているため、同じ気象データを用いた。

## 方法

量的形質の集団内、集団間の遺伝的変異を評価するために、2003~2005 年の 3 年間にわたり筑波大学農林技術センター内のビニールハウスで 110 ジェネット 425~450 ラメットを栽培した。供試個体数は 1 ジェネットあたり 2~4 ラメットとした。2003 年と 2004 年は直径 12cm の黒いビニールポットに、2005 年は 4 号の素焼き鉢に、人工培土 (Metro-Mix 350 (HYPONeX, JAPAN, CORP.)) を用いて、前年度にクローン成長で増殖した地下芽が土壌表面から 1cm 下に前年度にクローン成長によって増殖した地下芽の先端がくるように定植した。定植期間はおよそ 1 週間であった。各ビニールポットまたは素焼き鉢はハウス内にランダムに配置した。

測定形質は、出芽日、第一花開花日、開花初期花茎長、開花終期花茎長、小花数、葉数とした。出芽日は地下芽が地上部 1cm になった日とし、第一花開花日は第一花の花口が見えた日とした。解析を行うために、各年の出芽日は各年の全ラメットの中で最初に観測された日をそれぞれ 1 として算出した。同様に全ラメット中で最初に出芽が観測された日から第一花開花日までの期間を開花まで日数とした。また、サクラソウの開花初期から開花終期にかけてサクラソウ個体周辺の植生の草丈が高くなることによって、

開花初期と開花終期で個体を取り巻く環境が大きく変化するため、本章では花茎長を第一花開花日と開花終期に二度測定した。小花数と葉数は開花終期に測定した。本章での開花終期とは全ての小花が咲き終えた時期を表す。

## データ解析

### < 量的形質の評価 >

各形質における集団、年次、集団×年次、ジェネットの効果を推定するために、ラメット値を用いて Factorial analysis を行った。集団と年次は固定効果として、またジェネットは変量効果とした。また全表現型分散に対する集団間、集団内ジェネット間、ジェネット内ラメット間の寄与率を、REML (Restricted maximum likelihood; 制限付き最尤法) を用いて推定した。1章と同様に、ジェネット間分散と集団間分散を用いて広義の遺伝率 (Falconar 1981) を算出した。全ての形質における各集団の差異を Tukey-Kramer の多重比較 ( $P < 0.05$ ) により検出した。Factorial analysis と REML を用いた分散成分の算出、Tukey-Kramer の多重比較は統計ソフト JMP6.0.0 (SAS Institute Inc., USA) を用いて行った。

### < 集団内の遺伝的変異 >

各形質の集団内 (ジェネット間、 $V_g$ ) の遺伝的変異は、

$$V_g = (MS \text{ genets} - MS \text{ ramets}) / r$$

より算出した。MS は平均平方を、 $r$  は有効反復数 (吉田 1980) を示している。有効反復数は以下の式より算出した。

$$r = \left( \sum_{i=1}^a r_i - \frac{\sum_{i=1}^a r_i^2}{\sum_{i=1}^a r_i} \right) / (a - 1)$$

$a$  は各集団内のジェネット数を、 $r_i$  は  $i$  番目のジェネット数を示している。各形質で集団内の遺伝的変異を集団間で比較するために、各年の各集団内の遺伝変異を用いて Kruskal-Wallis 検定を行った。

Honjo *et al.* (2008) の SSR マーカー 8 座の遺伝子型データより、本章で供試した 110 ジェネットについてヘテロ接合度 ( $H_e$ ; Nei and Roychoudhury 1974) と長野 3 集団の最小集団サイズ (13 ジェネット) を考慮した座あたりの期待される平均対立遺伝子多様度 (*Allelic richness*;  $n_{13a}$ )、固定指数 ( $F_{IS}$ ) を算出し、集団内の遺伝的変異とした。これらの 3 つの指標は FSTAT 2.9.3. (Goudet 2001) を用いて算出した。

#### < 集団間の遺伝的分化程度 >

各形質の集団間の分化程度は 1 章と同様  $Q_{ST}$  で表した。さらに  $Q_{ST}$  と比較し、各形質における集団間分化の要因を推定するために分子マーカーによる集団間の分化程度である  $F_{ST}$  を算出した。集団間の分化についてより詳細な情報を得るために、総当りの組み合わせによる各集団間の集団間の分化程度、pairwise  $Q_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  を比較した。pairwise  $Q_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  の関係はマンテル検定 (Mantel 1967) によって評価した。 $F_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  の算出は FSTAT 2.9.3. を用いて行った。

#### < 集団間分化と環境要因との関係 >

$Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  を比較した結果より、方向性選択によって集団間で分化していたことが示された形質を対象に、集団間の分化を引き起こす要因を推定するために、各自生地の 5 つの環境要因、平均気温、緯度、経度、標高および地理的距離との関係を調べた。平均気温と標高、緯度、経度は各集団の平均値と比較した。地理的距離は pairwise  $Q_{ST}$  と比較した。各集団間の地理的距離は、国土地理院のホームページより参照したプログラム

( <http://vldb.gsi.go.jp/sokuchi/-surveycalc/bl2xyf.html> )より各自生地の緯度と経度から得られた平面直角座標を用いて算出し、常用対数に変換して解析した。5つの環境要因との相関関係は spearman の順位相関を用いて解析した。

## 結果

2005年に開花したジェネットが少なかったため、開花まで日数、小花数、開花初期花茎長、開花終期花茎長は2003と2004年のデータで解析した。各形質の解析に用いたジェネット数と年次数を表2-2に示した。

### < 量的形質の評価 >

全ての形質で有意なジェネット間差が認められ ( $P < 0.01$ ; 表2-3)、サクラソウにおいて遺伝的な形質であることが示された。出芽日と開花まで日数、小花数、葉数には有意な集団間差が認められた。特に  $F$  値が最も大きい出芽日は、3年間通じて埼玉集団は安定して出芽が早く、長野2集団は比較的出芽が遅い傾向にあった(表2-4, 図2-1)。出芽日の次に  $F$  値が大きい開花まで日数は、各年の集団間差は大きいものの、開花まで日数の長さの順番が年次で変化していた(表2-4, 図2-1)。葉数は常に埼玉集団と長野1集団が多くなった。開花初期花茎長は集団間差が認められず、開花終期花茎長は2003年では集団で有意に異なっていたものの、2004年では有意な集団間差が認められなかった。小花数では有意差は認められなかったが、北海道集団が少ない傾向にあった。全形質とも年次間で有意な差が認められ、年次による効果が大きいことが示された。2003年から2005年にすすむにつれて出芽日と開花まで日数は長くなった(表2-4, 図2-1)。2004年は2003年に比べて開花初期花茎長は長くなったが、開花終期花茎長は短くなった。また小花数と葉数は減少した。集団と年次の交互作用を見ると、出芽日と開花まで

日数、開花終期花茎長で有意な交互作用が認められた（表 2-3）。出芽日は、2003 年では埼玉集団以外の 4 集団の間でも有意差が認められたが、2004 年と 2005 年では差が認められなかったことにより、また開花終期花茎長は 2003 年では集団間差が認められたが 2004 年ではどの集団も同じような長さになったことにより、それぞれ交互作用が有意になったものと考えられる。また各集団の開花まで日数の平均値が年次で大きく異なっていたことから、有意な交互作用が認められた。

全形質において 2003 年の広義の遺伝率は 2004 年や 2005 年に比べて高い値を示した。形質ごとにみると、出芽日と開花まで日数は年次に 2 年または 3 年通じてラメット間変異が小さく、遺伝率が高かった（表 2-5）。一方、葉数はラメット間差が大きく、3 年間通じて遺伝率が低かった。開花初期花茎長は 0.5~0.6 の遺伝率を示し、比較的安定していたが、開花終期花茎長と小花数は 2003 年が 2004 年に比べ遺伝率が大きくなった。

#### < 量的形質の集団内・間の遺伝的変異 >

全分散における集団間と集団内（ジェネット間）変異の割合をみると（表 2-5）、出芽日では全分散のうち約 45% が集団間変異であることが示され、出芽日のみジェネット間分散よりも集団間分散が大きかった。一方、開花まで日数と開花初期花茎長、開花終期花茎長、小花数、葉数は、全分散においてジェネット間分散が最も大きく、これらの形質は主に集団内に遺伝的変異を保有している形質であることが示された。

形質ごとの各集団内変異を表 2-6 に示した。Kruskal-Wallis 検定の結果、全形質において集団内の遺伝的変異は集団間で有意な差が認められず、同程度の集団内変異を維持していることが示された。しかし有意な差は見られなかったが、埼玉集団の開花初期と開花終期の花茎長の集団内変異は、他の集団に比べて比較的大きい傾向が見られた。

集団間の遺伝的分化程度 ( $Q_{ST}$ ) は、全形質を合わせると 2004 年の開花終期花茎長の

0.004 から 2005 年の出芽日の 0.623 と、幅広い値が示された(表 2-5)。出芽日  $Q_{ST}$  は他の形質に比べ特に大きく(0.400 ~ 0.623)、開花初期花茎長の  $Q_{ST}$  (0.018 ~ 0.031) が他の形質に比べ特に小さかった。

< 量的形質と分子マーカーによる遺伝的変異の比較 >

Honjo *et al* (in press) から参照した 110 ジェネットの遺伝子型を用いて解析した結果、 $H_e$  と  $n_{13a}$  はそれぞれ 0.604 ~ 0.751 と 4.03 ~ 6.63 を、 $F_{IS}$  は -0.110 ~ 0.029 を示した(表 2-6)。これらの 3 つの指標と各形質の集団内変異の関係を調べたところ、有意な相関関係は認められなかった。

SSR マーカーによる集団間の分化程度 ( $F_{ST}$ ) は、0.172 (95% 信頼区間は 0.115 ~ 0.232) であった。 $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  を比較した結果(図 2-2)、出芽日と葉数の  $Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  よりも大きく、開花まで日数と小花数は 2 年間とも  $F_{ST}$  と同程度の値を示した。開花初期花茎長の  $Q_{ST}$  は  $F_{ST}$  より小さく、開花終期花茎長は年次によるばらつきがあるものの、平均値は  $F_{ST}$  よりも小さくなった。

全ての形質において pairwise  $Q_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  に有意な相関関係は認められなかった(図 2-3)。相関関係は有意ではなかったものの、出芽日では 2004 年と 2005 年の埼玉集団と他の 4 集団間の pairwise  $Q_{ST}$  は顕著に大きな値を示した。これは埼玉集団の出芽日が他の集団に比べて大きく分化していることを示している。葉数も同様に、埼玉集団と他の集団の pairwise  $Q_{ST}$  が大きく、次に長野 1 集団と他の集団間の pairwise  $Q_{ST}$  が大きい傾向にあった。また小花数は、長野 1 集団と他の集団間の pairwise  $Q_{ST}$  が大きい傾向にあった。

#### < 量的形質と環境要因の関係 >

$Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  より大きな値を示した出芽日と葉数に着目して各自生地の環境要因との関係を調べた結果、2004年と2005年の出芽日が自生地の気温と有意な負の相関が認められた(図 2-4)。葉数は2003~2005年で自生地の気温と有意な正の相関が認められた(図 2-5)。出芽日と葉数は2~6月の平均気温とどの月も同じような相関関係を示したため、図 2-4 と図 2-5 では2月の平均気温と各形質の関係のみを示した。また両形質の pairwise  $Q_{ST}$  と地理的距離には有意な相関関係は認められなかった(図 2-6)。

#### 考察

##### < サクラソウの適応関連形質 >

Factorial analysis の結果より、開花初期花茎長と開花終期花茎長は集団間で有意な差異が認められなかった(表 2-3)。開花終期花茎長は2003年に集団間差が認められ、年次間変動が認められたものの、これらの2つの形質は、 $Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  よりも小さかったことから、自然選択を受けていない形質であることが示された。

集団間で有意差が認められた出芽日と開花まで日数、小花数、葉数のうち(表 2-3)開花まで日数と小花数の  $Q_{ST}$  は年次変動も小さく、2年間ともに  $F_{ST}$  とほぼ同程度であったことから(図 2-2)、これらは主に遺伝的浮動によって分化した形質であることが示された。

出芽日と葉数の  $Q_{ST}$  は  $F_{ST}$  よりも大きくなった(図 2-2)。特に出芽日は、年次間変動が大きいものの、3年間通して遺伝率が安定して高く、遺伝的に強く支配されている形質であることが考えられる。そのため、各集団が自生地で自然選択によって最適な遺伝子型が選抜された結果、他の形質に比べて表現型の固定が進み、集団間で分化していることが推測される。一方、葉数は2003年と2005年の  $Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  よりもやや大きく、2004



年は  $F_{ST}$  と同程度の値を示した結果 (表 2-5, 図 2-2) 平均して  $Q_{ST}$  が  $F_{ST}$  よりも大きな値になった。葉数は出芽日とは異なり、遺伝率が他の形質に比べて最も低いことから、表現型の固定ではなく環境に対して柔軟な形質であり、最適な環境において葉数が多くなる、すなわち環境と遺伝子型の交互作用が大きな形質であると考えられる。従って葉数が出芽日と同様に強い選択を受け、表現型の固定が進んだ形質であるとは結論できないが、これらの結果から、サクラソウにおいて出芽日と葉数が適応分化関連形質であることが示された。

#### < 適応分化を引き起こす要因 >

適応に関連した形質であると推定された出芽日と葉数の集団間分化を引き起こしている要因を調査した結果、2~6月の自生地での平均気温が2004年と2005年に出芽日と有意な負の相関が、また2003~2005年の葉数と有意な正の相関が認められた(図2-4)。

他の集団に比べて顕著に出芽が早い埼玉集団の自生地における2月の平均気温は、北海道集団よりも9度高く、長野地域の中では一番暖かい長野1集団の自生地よりも5度高くなっており(表2-1) 自生地の気温がサクラソウの出芽の早晩に関係していることが示唆された。実際に出芽日の遅い長野集団の自生地に近い八ヶ岳演習林内では、5月の上旬でも遅霜が見られるため、このような環境に自生する集団では霜などの耐性を持たないジェネットや出芽が早いジェネットは淘汰された可能性があり、自生地の気温が低い3つの長野集団や北海道集団には埼玉集団に比べて出芽日の遅いジェネットが多く存在しているのだと推測される。一方、出芽時期と低温耐性や耐霜性などの関係は、サクラソウと同じ多年生で他殖性の樹木のヨーロッパアカマツ (*Pinus Sylvestris*) やダグラスファー (*Pseudotsuga menziesii*) では同一環境栽培により、またポプラ (*Populus trichocarpa* × *P. deltoides*) ではQTL解析により報告されており、出芽に関する形質であ

る、芽吹きや冬芽の形成が気温と密接に関係した適応関連形質であることが報告されている (Hurme *et al.*1997, Howe *et al.*2003)。さらには、QTL 解析から多面発現か強い連鎖によって低温耐性と芽吹きに関する QTL が同じ場所で検出されており (Howe *et al.*2003)、冬の寒さや春の温度、霜が芽吹きのタイミングを制御している要因であることが明らかになっている (Jermstad *et al.* 2003)。これらの研究からも自生地の気温が低い長野や北海道集団のサクラソウは、耐霜性や低温耐性に関して適応分化した結果、出芽が遅いジェネットが選抜されてきたことが予測される。一方、他の4集団に比べて自生地の気温が高い埼玉集団は、長野集団や北海道集団とは反対に出芽日の早いジェネットが選抜されてきた可能性が考えられる。出芽の時期が遅れてしまう場合、成長期間が短くなることから他の植物との競争能力や成長の可能性が減少してしまうことがあるため (Frewen *et al.* 2000)、サクラソウの出芽の時期は周囲の植物との競争において重要であり、埼玉集団は周囲の他の植物との競争において出芽が早いジェネットが選抜されてきたのではないかと推測される。

また多年性のサクラソウは種子繁殖だけでなくクローン成長も行うため、実際に当年に未開化ラメットは開花ラメットに比べクローン成長によって増えた地下芽が大きく、未開花ラメットが次年度の開花に備えているように (中村 未発表)、一年性の植物と異なり、必ずしも毎年開花して種子生産を行う必要がない。このことから、サクラソウにとって開花や種子生産の有無ではなく、生存すること (出芽すること) が適応戦略のひとつであることが考えられる。そのため、出芽日は生存に強く関わる形質であることから、出芽日には強い選択圧を受けてきており、出芽日が集団間で大きく分化した形質であると考えられる。

葉数は3年間通じて埼玉集団と長野1集団が多く、他の集団との間で分化していた (図 2-4)。また全形質の中で全分散におけるラメット間による分散が最も大きく、3年間の

遺伝率(0.324~0.401)も低いことから、環境の影響を強く受ける形質であると言える。野田ら(2006)は、サクラソウは弱光条件では強光条件よりも早く葉を枯らすことを報告しており、葉数は環境に対してかなり柔軟性の高い形質であることが考えられる。特に他の集団に比べて葉数が多かった埼玉集団においては、他の集団に比べてつくばの環境が自生地環境に一番近かったことから、ホームサイトアドバンテージによって葉数が多くなったと推測される。ホームサイトアドバンテージとは他所の集団由来の植物よりも高い適応度を示すことであり(工藤 2000)、葉数は自生地環境条件で最も適応度が高くなるように選抜された可能性がある。本実験で葉数がホームサイトアドバンテージを示したことを証明するためには、供試した5集団を北海道や長野3集団の自生地または自生地に近い環境で栽培し(相互移植実験)、各集団の葉数が自生地環境で最も適応度が高い形質であるか調べる必要がある。

これまで Honjo *et al.* (in press) によって示された地理的距離に応じた集団間分化は、遺伝的浮動や遺伝子流動によって生じており、これらの遺伝的な集団間分化に基づいて決定された4つの遺伝的グループ(北海道、東北、関東・中部、西日本)はそれぞれ歴史的に同じ進化の過程をたどっていることが明らかにされた。特に3つの長野集団と埼玉集団は Honjo *et al.* (in press) が定めた同じ保全単位に属していることから、同じ祖先から由来している近縁関係であることが示されている。しかし適応的な集団間分化が認められた出芽日では、地理的な距離との関係が認められず、同じ保全単位に属する埼玉と3つの長野集団でも、明らかに埼玉集団が長野集団と遺伝的に分化していることから、各自生地の気温が選択圧となり、集団間で適応分化がしていることが示唆された。また地理的に近くに自生している3つの長野集団についても、長野2集団は2003年に他の2つの長野集団に比べて有意に出芽日が遅く、3年間通じて出芽日が遅い傾向がみられた(図2-1)。これらの結果は、適応的な集団間分化と分子マーカーで評価された集団間

分化に基づく保全単位を再考するための重要な情報である。

< 量的形質と分子マーカーで評価された集団内変異 >

出芽日は集団内変異よりも集団間変異が大きく、集団内変異が小さかった(表 2-5)。これは各自生地の環境に有利な遺伝子型が選抜された結果、集団内の変異が小さくなったものと考えられる。現在のところ、5 集団とも出芽日に関する遺伝的変異は同程度維持しており、遺伝的多様性の減少が進んでいる集団は存在しなかった。

これまで SSR マーカーによって評価された集団内変異は緯度と関連が明らかになっており、本章で供試した集団では北海道集団は他の 4 集団に比べ集団内変異が小さいことが示されている (Honjo *et al.* in press)。本章でも表 2-6 より北海道の  $n_{13a}$  が他の集団に比べて小さかったが、出芽日の  $H_e$  や  $F_{IS}$ 、他の 5 形質については北海道集団の遺伝的多様性が低いという結果は認められなかった。これは Honjo *et al.* (in press) が示した集団内変異と緯度との相関が低いことが要因として挙げられるが ( $R^2=0.153$ )、一般的に量的形質には多くの QTL が関与しているため、ボトルネックなどの効果が表現型に直接反映されていない可能性が考えられる。またサクラソウはクローン成長を行うため、ラメットの寿命は数十年と長く (鳥居 1985)、現存するジェネットは過去に成立したのも多く含まれるため、自生地の分断や孤立の影響が現れていない可能性も考えられる。

これまで多くの種において分子マーカーと量的形質によって評価された集団内の遺伝的変異に相関関係は認められておらず (Reed and Frankham 2000)、サクラソウも同様に、全形質の集団内変異と SSR マーカー 8 座によって評価された集団内変異、 $H_e$  と  $n_{13a}$ 、 $F_{IS}$ 、には有意な相関関係は認められなかった。一般的に分子マーカーは自然選択に中立であると考えられているが、複数の遺伝子座の関与が考えられる量的形質のうち、特に適応に関連する形質は自然選択の対象となる可能性が高いため、分子マーカーと遺伝

的変異を評価する場合、評価の対象としている遺伝子座が異なることが有意な関係性が認められない原因のひとつではないかと言える。そのため、これまで分子マーカーを用いて適応に関連した形質の遺伝的多様性を評価することができないことから ( Karhu *et al.* 1996, Bekessy *et al.* 2003 ) 適応的な集団間分化を把握する場合には、同一環境栽培下で量的形質を評価するか、適応に関連した形質を支配する QTL の近傍にある分子マーカーを用いて評価すべきである。

表 2-1. 供試集団とジェネット数、各自生地の環境条件

集団名	経度	緯度	標高	集団 サイズ	供試ジェ ネット数	平均気温 ( ) <sup>1</sup>				
						2月	3月	4月	5月	6月
北海道	142°01'E	42°31'N	30 m	140	26	-5.1	-0.7	4.9	9.9	13.9
埼玉	139°36'E	35°50'N	10 m	>300	18	4.2	7.5	13.3	17.9	21.3
長野1	138°31'E	36°12'N	960 m	166	27	-1.3	2.6	9.2	14.4	18.4
長野2	138°38'E	36°19'N	940 m	28	26	-3.4	0.0	6.6	11.6	15.4
長野3	138°31'E	36°21'N	1120 m	16	13	長野2と同じ				

<sup>1</sup> 気象庁のHPより参照した。1979～2000年間の平均値を示す。

表 2-2. 実際に解析に用いたジェネット数と年次数

形質	ジェネット数	年次数
出芽日	104	3
開花まで日数	93	2
開花初期花茎長	91	2
開花終期花茎長	88	2
小花数	90	2
葉数	92	3

表 2-3. Factorial analysis の結果

要因	出芽日			開花まで日数		
	df	MS	F	df	MS	F
集団	4	6851.6	43.89 **	4	326.9	5.31 **
年次	2	80512.7	515.72 **	1	17298.1	280.96 **
集団×年次	8	780.2	5.00 **	4	216.0	3.51 *
ジェネット (集団)	99	156.1	4.09 **	88	61.6	5.17 **

要因	開花初期花茎長			開花終期花茎長		
	df	MS	F	df	MS	F
集団	4	31.2	1.79	4	19.3	1.02
年次	1	150.3	8.62 **	1	559.4	29.43 **
集団×年次	4	8.3	0.48	4	49.8	2.62 *
ジェネット (集団)	86	17.4	5.13 **	83	19.0	5.76 **

要因	小花数			葉数		
	df	MS	F	df	MS	F
集団	4	90.1	6.34 **	4	159.1	10.53 **
年次	1	1241.3	87.42 **	2	1026.8	67.96 **
集団×年次	4	23.5	1.65	8	20.5	1.36
ジェネット (集団)	85	14.2	2.97 **	86	15.1	2.72 **

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$



表 2-4. 6 形質の 2 年または 3 年間の各集団の平均値と遺伝分散

	出芽日 <sup>1</sup>						開花まで日数 <sup>1</sup>			
	2003		2004		2005		2003		2004	
	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.
北海道	13.1 b	12.54	22.2 a	25.34	44.7 b	14.61	47.35 a	10.48	53.30 a	10.46
埼玉	9.3 c	12.17	11.1 b	9.39	27.3 a	19.65	45.94 ab	14.30	47.21 b	22.80
長野1	14.4 b	9.67	21.4 a	12.18	45.6 b	23.48	44.04 b	6.42	50.43 ab	5.71
長野2	19.8 a	12.07	24.5 a	16.72	49.1 b	26.28	48.60 a	9.20	51.35 a	11.40
長野3	12.1 bc	7.55	24.5 a	10.71	45.6 b	23.07	43.16 b	10.61	51.55 ab	3.06

	開花初期花茎長 (cm)				開花終期花茎長 (cm)			
	2003		2004		2003		2004	
	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.
北海道	6.21 a	1.68	7.71 a	0.62	10.40 ab	2.28	8.54 a	0.74
埼玉	5.44 a	4.71	6.49 a	7.00	8.88 b	5.24	8.56 a	8.09
長野1	5.11 a	2.03	6.34 a	3.09	10.18 b	2.30	7.44 a	4.13
長野2	6.42 a	3.75	6.81 a	2.99	11.94 a	4.66	7.60 a	2.66
長野3	5.85 a	1.03	7.31 a	1.70	9.46 b	1.14	8.05 a	3.05

	小花数				葉数					
	2003		2004		2003		2004		2005	
	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.
北海道	7.61 c	3.04	5.01 b	0.63	5.83 b	2.46	5.11 b	3.69	3.27 b	0.80
埼玉	8.74 bc	1.65	7.09 a	3.02	9.72 a	5.27	7.66 a	4.91	4.91 a	0.31
長野1	10.73 a	1.65	6.72 a	0.27	8.17 a	2.87	6.14 ab	1.32	4.38 a	1.05
長野2	9.89 ab	4.67	5.97 ab	2.31	6.19 b	0.00	5.84 ab	0.26	3.44 b	0.62
長野3	8.33 bc	1.96	5.45 ab	2.00	7.24 ab	6.97	5.35 ab	1.72	3.15 b	0.15

平均値が文字が異なる場合、Tukey-Kramerの多重比較より5%水準で各年次、集団間で有意差あり。

<sup>1</sup> 2003年と2005年の基準日を2月18日、2004年の基準日を2月15日とした。

表 2-5. REML 法を用いて算出された 3 つの分散成分 ( 集団間、ジェネット間、ラメット間 ) および広義の遺伝率 ( $h^2$ ) と  $Q_{ST}$

	出芽日			開花まで日数		開花初期花茎長	
	2003	2004	2005	2003	2004	2003	2004
集団	42.6	44.3	47.0	17.6	16.9	3.4	1.7
ジェネット	32.0	21.0	14.2	45.5	39.7	53.8	47.0
ラメット	25.3	34.6	38.8	36.9	43.4	42.9	51.2
$h^2$	0.746	0.653	0.612	0.631	0.566	0.572	0.487
$Q_{ST}$	0.400	0.513	0.623	0.162	0.175	0.031	0.018

	開花終期花茎長		小花数		葉数		
	2003	2004	2003	2004	2003	2004	2005
集団	18.7	0.4	16.4	9.0	16.0	9.6	18.3
ジェネット	54.4	49.2	34.9	24.0	19.8	22.8	21.8
ラメット	26.9	50.3	48.7	66.9	64.2	67.6	59.8
$h^2$	0.731	0.496	0.513	0.330	0.358	0.324	0.401
$Q_{ST}$	0.147	0.004	0.190	0.158	0.288	0.174	0.296

表 2-6. Honjo *et al.* (in press) の SSR マーカー 8 座の遺伝子型データから算出された 110 ジェネットの各集団の遺伝的変異

Locus	対立遺 伝子数	北海道			埼玉			長野 1			長野 2			長野 3		
		$H_e$	$n_{13a}$	$F_{IS}$	$H_e$	$n_{13a}$	$F_{IS}$	$H_e$	$n_{13a}$	$F_{IS}$	$H_e$	$n_{13a}$	$F_{IS}$	$H_e$	$n_{13a}$	$F_{IS}$
ga0235	12	0.727	4.83	-0.266	0.690	5.58	-0.088	0.770	5.59	-0.010	0.828	7.00	0.024	0.788	8.00	-0.163
ga0381	8	0.314	2.95	0.109	0.231	2.74	-0.081	0.532	2.89	-0.253	0.615	3.64	0.188	0.727	5.00	-0.031
ga0653	8	0.587	2.99	-0.159	0.721	5.44	0.133	0.724	6.24	-0.023	0.802	6.54	0.041	0.655	5.00	-0.145
ga0666	24	0.707	5.17	-0.019	0.796	8.07	-0.099	0.437	4.11	0.153	0.906	11.00	-0.104	0.928	13.00	-0.078
ga0668	7	0.572	3.00	0.090	0.700	4.50	-0.071	0.486	2.00	0.161	0.558	3.89	0.105	0.489	3.00	-0.023
gal277	16	0.809	5.90	-0.236	0.585	5.43	-0.174	0.798	7.15	0.026	0.824	6.15	-0.027	0.795	8.00	-0.152
Pri0146	15	0.613	4.69	-0.043	0.515	5.19	0.150	0.646	4.84	0.140	0.865	7.71	-0.068	0.814	7.00	-0.228
PS-2	6	0.543	2.74	-0.178	0.590	2.99	-0.272	0.754	4.91	0.066	0.608	3.00	-0.264	0.735	4.00	-0.021
Total	96	0.609	4.03	-0.108	0.604	4.99	-0.062	0.643	4.71	0.029	0.751	6.12	-0.018	0.741	6.63	-0.110

$H_e$  : ヘテロ接合度

$n_{13a}$  : 長野3集団の最小集団サイズ (13 ジェネット) を考慮した座あたりの期待される対立遺伝子多様度

$F_{IS}$  : 固定指数

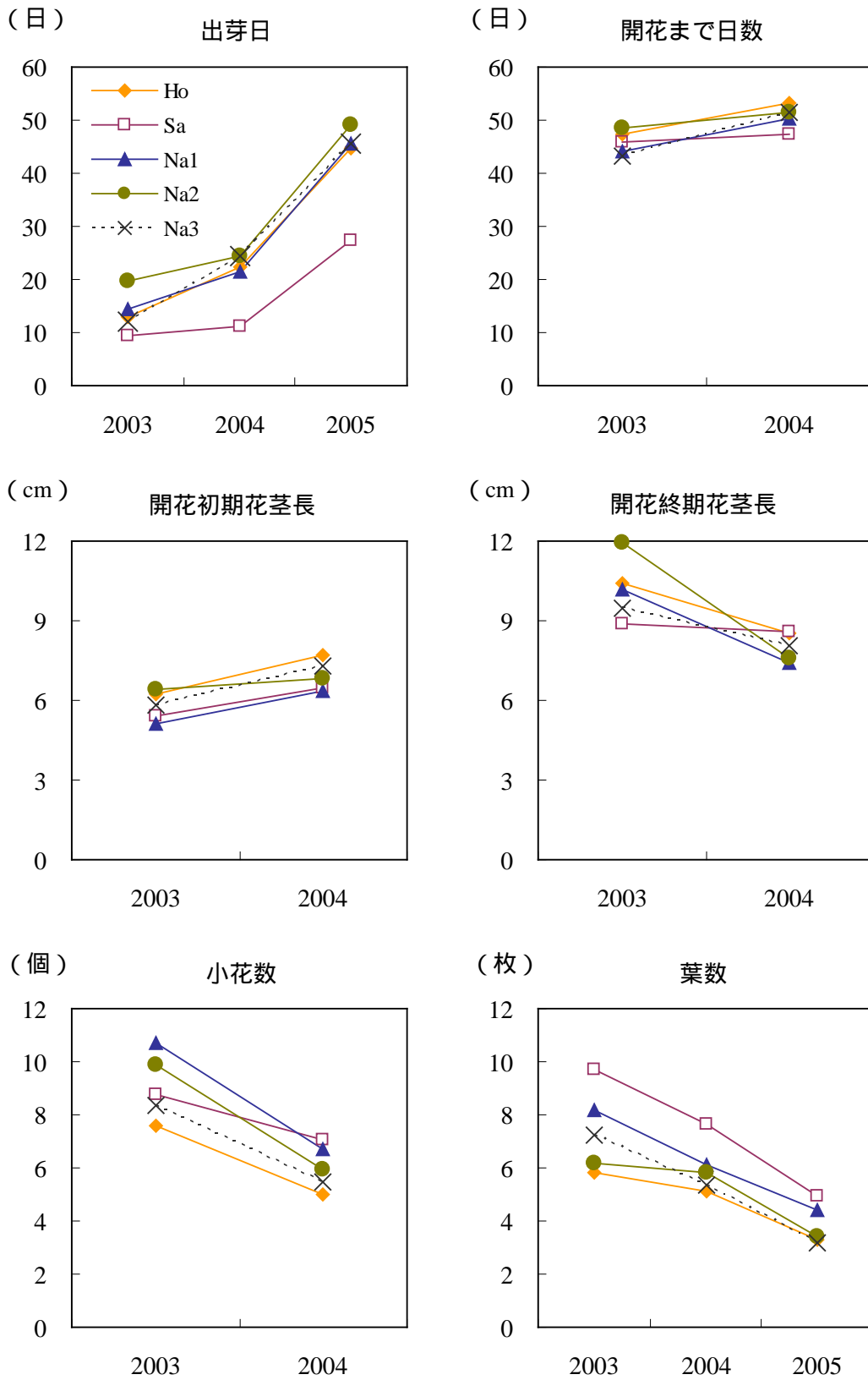


図 2-1. 各形質における 2003～2005 年の集団平均値の推移

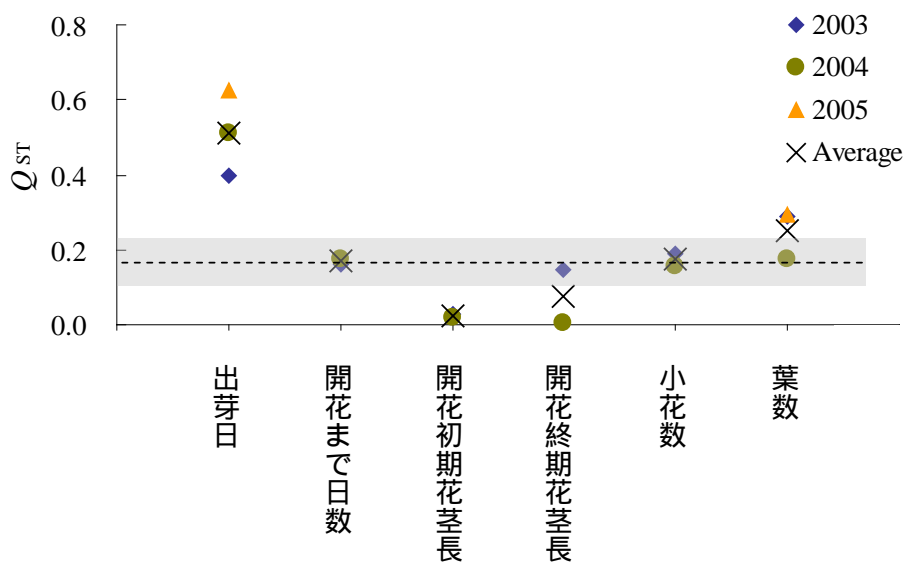


図 2-2. 各形質における 2003 ~ 2005 年の集団平均値の推移

点線は  $F_{ST}$  (0.172) を、灰色の部分は 95% 信頼区間 (0.115 ~ 0.232) を示す。

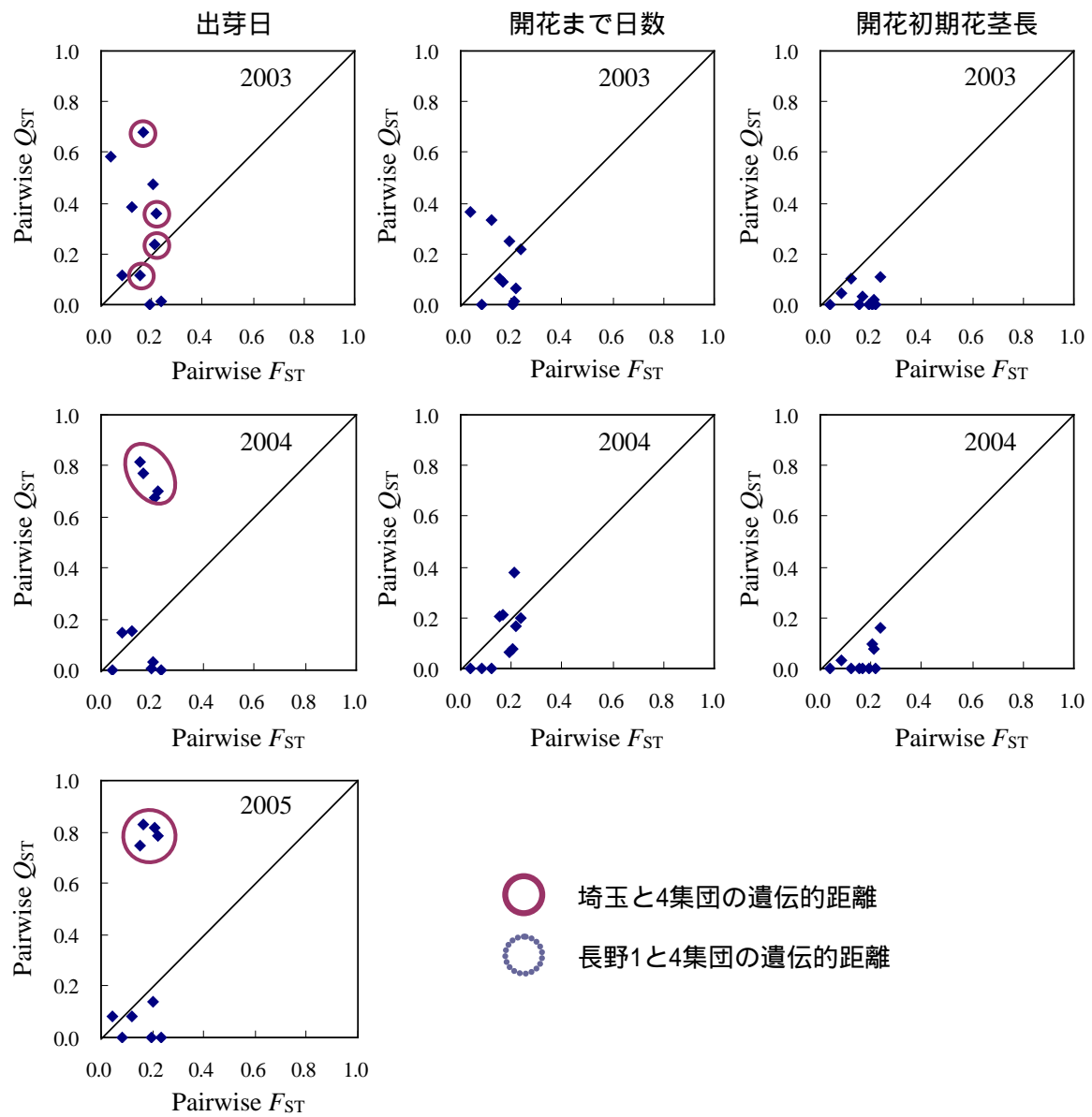


図 2-3. 各形質の pairwise  $Q_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  の関係

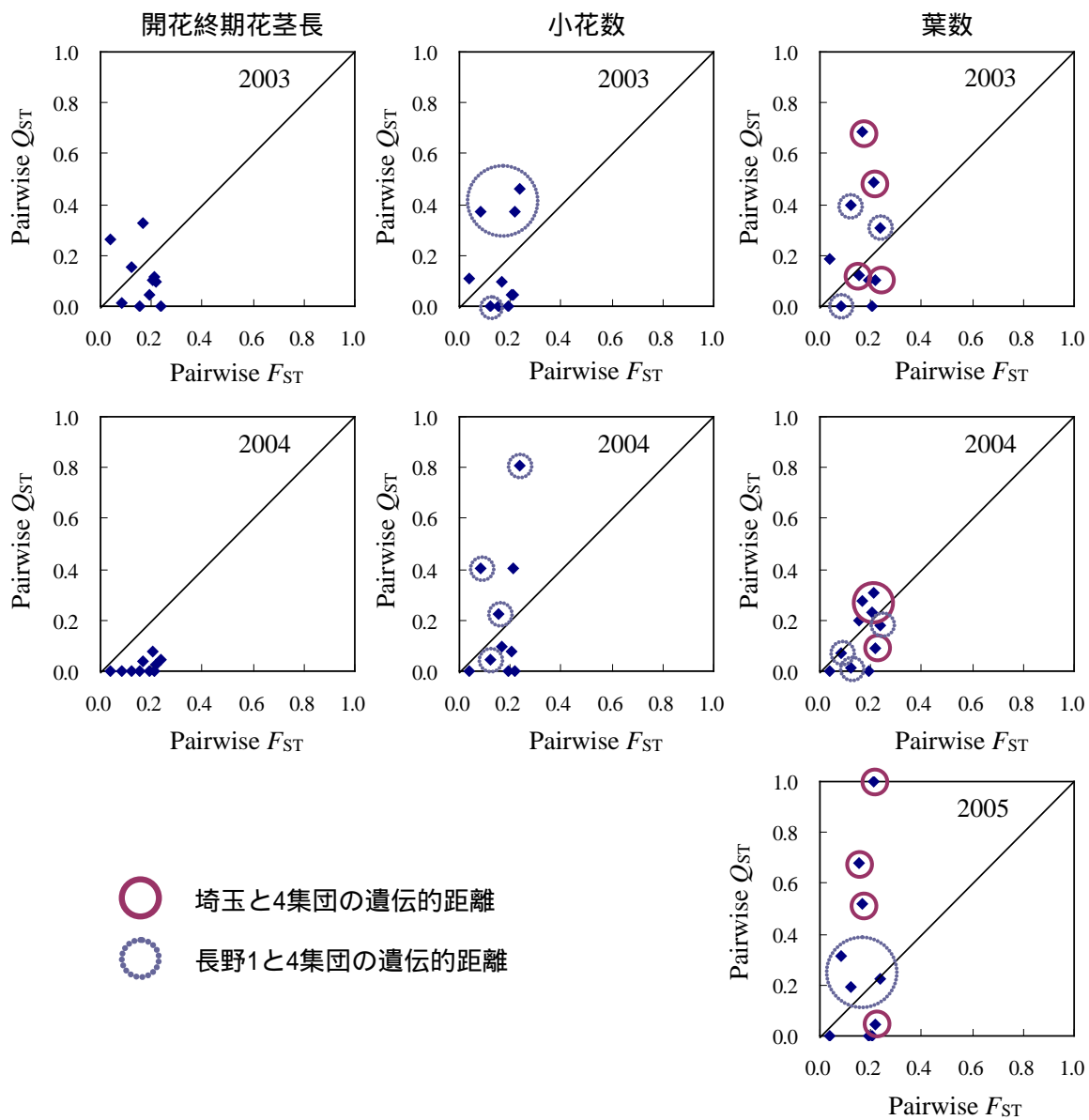
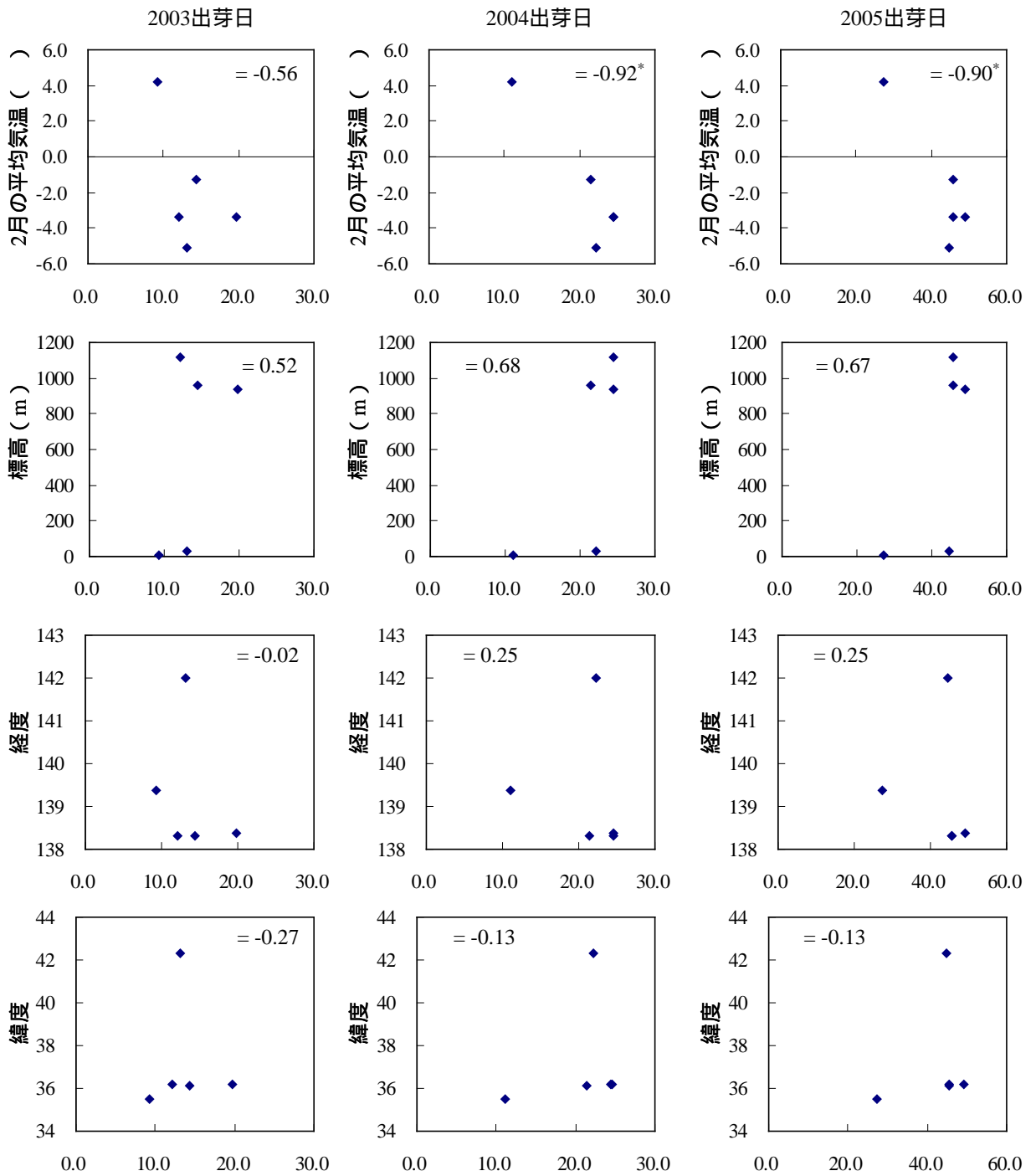


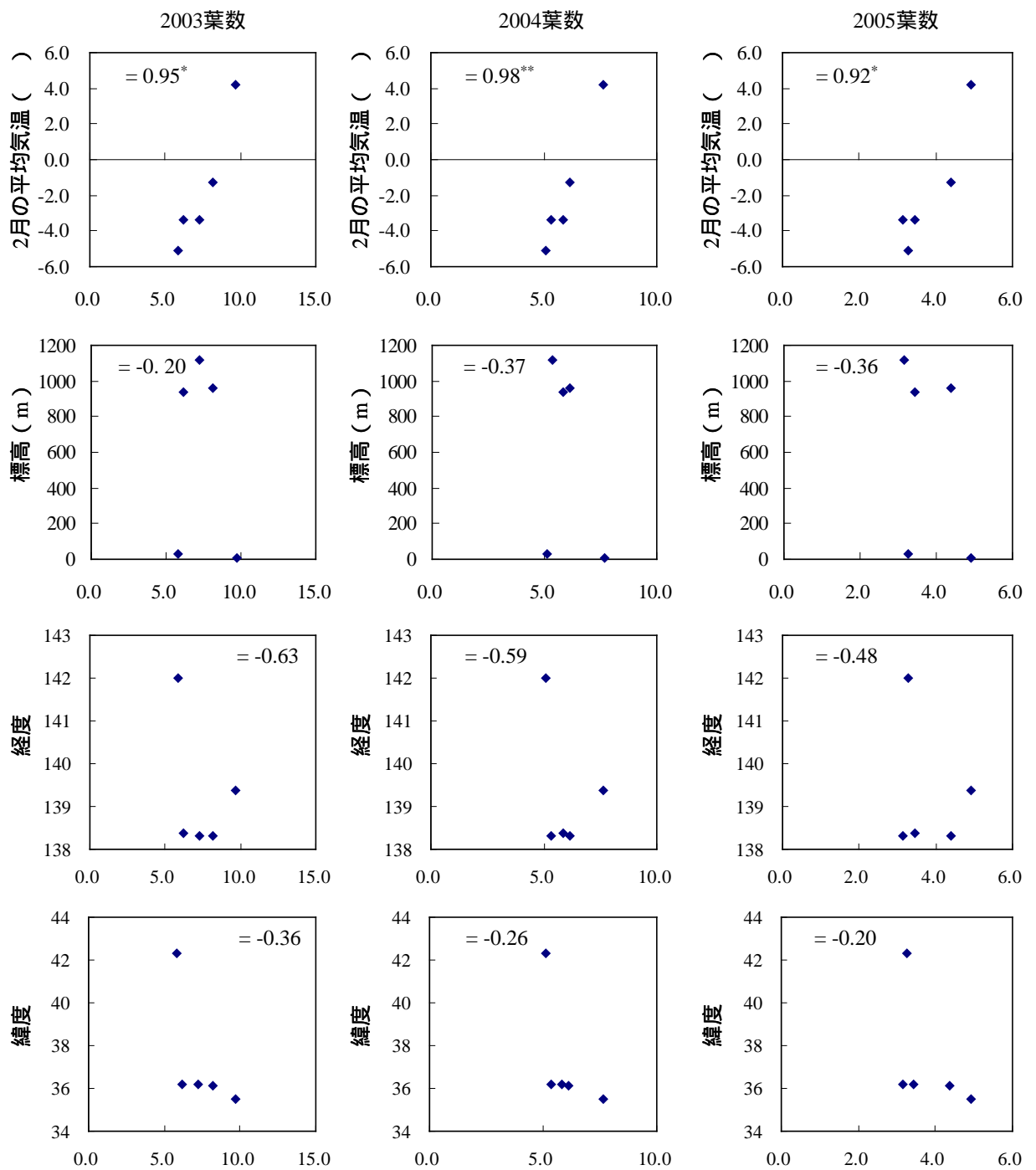
図 2-3. 各形質の pairwise  $Q_{ST}$  と pairwise  $F_{ST}$  の関係 (続き)



\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

図 2-4. 出芽日の集団平均値と環境要因（平均気温、標高、経度、緯度）の関係





\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

図 2-5. 葉数の集団平均値と環境要因 (平均気温、標高、経度、緯度) の関係

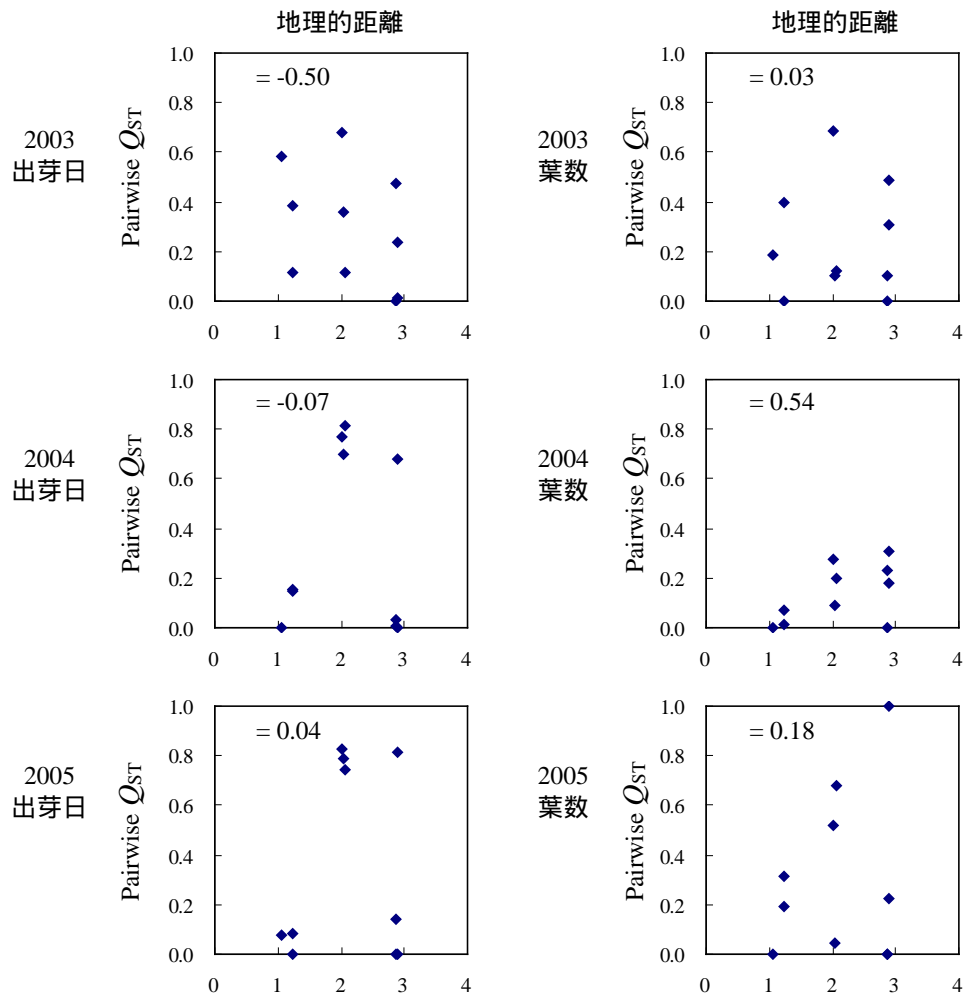


図 2-6. 出芽日と葉数の pairwise  $Q_{ST}$  と地理的距離の関係

地理的距離は常用対数変換した値を示す。

### 3章 複数環境栽培による表現型可塑性の遺伝的変異の評価

#### 緒言

2章で出芽日と葉数が適応に関連した形質であることを明らかにし、これらの遺伝的多様性は長期生存においては重要であることを述べてきた。しかし、Bradshaw (1965) が、集団は環境変化に対し遺伝的組成を何世代もかけて変化させていくものの、環境変化がその植物の一生よりも短い場合には、表現型可塑性によって対応していかななくてはならないと述べていることをうけて、Jump and Peñuelas (2005) は環境変動には形質の遺伝的変異が大きいだけでなく表現型可塑性の変異が大きいことも必要だと述べている。また、可塑性は固着性である植物にとっては、環境変動に対して緩衝効果をもつことから(河野 1974)、サクラソウの長期的な存続においても、環境変動に対応するために各集団がもつ表現型可塑性の遺伝的変異が多様であることが望ましく、特に適応関連形質の表現型可塑性の遺伝的変異を把握することで、どの程度の環境まで対応できるのかを推定することができるものと考えられる。

表現型可塑性とは、ある遺伝子型が環境に応じて表現型を変化させることであるため (Bradshaw 1965) これらの遺伝的変異を評価するためには複数環境下での栽培が必要である。

本章ではつくば・諏訪・八ヶ岳の3環境を栽培地とした。2005年に実験地とした筑波大学八ヶ岳演習林(八ヶ岳)は標高が1400mで、サクラソウ自生地の中でも標高が最も高い場所の一つである。筑波大学の演習林内にも多数のジェネットが存在しており、現地での開花は5月中旬から下旬にかけて始まる。本研究で用いる3つの長野集団の自生地の環境は八ヶ岳の環境に近いものと推測する。また2004年の実験地である諏訪は、サクラソウ自生地のうちのひとつであり、つくばと八ヶ岳の間である標高770mに位

置し、5月上旬より開花が始まる。諏訪は2~3月の気温はつくばよりも約3~4度低く、八ヶ岳より約4度高い環境である(表3-1)。つくばは諏訪や八ヶ岳を異なり野生サクラソウの自生地ではないが、2~3月の気温が3.6~6.5度と、同じ関東地域内の埼玉集団と同様に冬期でも氷点下を超えず、供試した5集団の中では気温の暖かい環境であるため(表3-1)、つくばと埼玉集団の自生地が同程度の環境であるとした。埼玉にある天然記念物の田島が原集団の開花は3月下旬ころから始まる。これらの3環境を用いることによって、各集団のジェネットが各環境にどの程度対応できるのかを評価することができる。

そこで本章では、2004年につくばと諏訪で、2005年につくばと八ヶ岳で2環境栽培を行い、2章で測定した6形質の表現型可塑性の集団内、集団間の遺伝的変異を評価した。

## 材料

### <つくば・諏訪での2環境栽培>

供試材料は、1章と2章で用いた北海道、埼玉、長野由来の5集団を用いた(表3-2, 表3-3)。供試ジェネットは2003年につくばで行った同一環境栽培の結果に基づき、最も大きな集団間差が認められた出芽日の変異を網羅するように各集団から6-9ジェネットを選択した。

### <つくば・八ヶ岳での2環境栽培>

つくばと諏訪での栽培と同様の5集団より、40ジェネット420ラメットを供試した(表3-1, 表3-2)。供試ジェネットは、2003~2004年のつくばと2004年に諏訪で行った同一環境栽培の結果から出芽日の変異を網羅するように選択したため、2004年では

栽培しなかったジェネットを含み、各集団 4~11 ラメットを供試した。(表 3-3)。

## 方法

形質の表現型可塑性の集団内、集団間の遺伝的変異の評価を行うために、2004 年に筑波大学農林技術センター内ビニールハウス(つくば)と長野県諏訪清陵高等学校敷地内(諏訪)で栽培を行った。反復として各集団 1 ジェネットあたり 4 ラメットを基本とし、4 ラメット足りないものは 2~3 ラメットとした。また 2005 年に筑波大学農林技術センター内ビニールハウス(つくば)と筑波大学八ヶ岳演習林の敷地内(八ヶ岳)で栽培を行った。つくばでは 1 ジェネットあたり 4 ラメットを基本とし、ラメット数が足りない場合は 2~3 ラメットを供試した。八ヶ岳では 1 ジェネットあたり 6 ラメットを基本とし、ラメット数が足りない場合は 3~5 ラメットを供試した。1 ジェネットあたり 6 ラメット以上を用いているジェネットについては(表 3-3) 実験時には異なるジェネットとして用いたが、Honjo *et al.* (in press) の SSR マーカー 8 座の遺伝子型から同じジェネットであることが明らかになったため、解析時には同一ジェネットとして扱った。

各栽培環境では、2 章と同様の方法で出芽日、第一花開花日、開花初期花茎長、開花終期花茎長、小花数、葉数の 6 形質を測定した。

## データ解析

解析した形質は、2 章と同様の出芽日と開花まで日数、開花初期花茎長、開花終期の花茎長、小花数、葉数に加え、適応関連形質である出芽日に関する形質として出芽率も解析した。出芽率は供試したラメット数に対する出芽したラメット数の割合とし、ジェネットごとに算出し、逆正弦変換を行った後に解析を行った。

本章ではつくば、諏訪、八ヶ岳の栽培環境を比較するため、それぞれの環境を示す指

標として環境指数を用いた。環境指数は、多環境試験で各マクロ環境における条件の良・不良を表すための指数であり、気温や雨量などの具体的な環境要因ではなく（植物育種学辞典 2005）各環境における全ジェネットの平均値を環境指数とし、形質ごとに算出した。2004年のつくばを基準値1として、各環境の指数を相対値で求めた。

栽培環境ごとに各形質における集団間の差異を検出するために、集団を要因としたANOVAを行った。また2環境間でジェネットがどのような反応をするかを把握するために、出芽率を除いた6形質についてジェネットと環境を要因としたTwo-way ANOVAを行った。また出芽率は環境間での差異を調べるために環境を要因としてANOVAを行った。

各形質の表現型可塑性の集団内、集団間の遺伝的変異を評価するために、つくばや諏訪、八ヶ岳の環境指数を説明変数に、各ラメット値を目的変数として得られた回帰直線の傾きを表現型可塑性とし（鵜飼 2002）、2004年と2005年でそれぞれジェネットごとに算出した。各形質において各集団がどのような可塑性を示すジェネットを保有しているのかを調べるために、形質ごとにBartlett's検定を用いて等分散検定を行い、5%水準で有意差が認められた形質はF検定を用いて2集団の集団内変異を比較した。さらに表現型可塑性の集団間の差異は、Bartlett's検定によって等分散であることが示された形質についてはANOVAを、等分散でないことが示された形質はWelch法を用いてを検証した。

## 結果

2005年につくばでと八ヶ岳で開花した個体数がそれぞれ全個体の20%と9%と、開花した個体が少なかったことから、2005年のつくばと八ヶ岳データの解析は出芽率と出芽日についてのみ行った。

今回用いた各栽培環境がどのような環境であったかを把握するために、形質ごとに環

境指数を算出した(図 3-1)。出芽率を見ると、八ヶ岳は他の 3 環境に比べ、低い値を示した。出芽日は八ヶ岳が顕著に高く、次いで諏訪、2005 年のつくばの順になり、他の形質に比べ環境間で大きくばらついた。開花まで日数と葉数も同様につくばに比べ諏訪で高い値を示した。開花初期花茎長と開花終期花茎長と小花数はつくばと諏訪でほぼ同じ値を示した。

#### <つくばと諏訪における 2 環境栽培>

出芽率につくばと諏訪とも集団間で有意な違いは認められなかったが(表 3-4)、長野 2 の出芽率は両環境で 100%の出芽率を示し、5 集団の中で一番高かった(図 3-2)。また埼玉集団の出芽率につくばで 100%だったが、諏訪での出芽率は 75%と 5 集団の中で一番低い値を示した。出芽日と開花まで日数が両環境において有意な集団間差が認められ、埼玉集団の出芽日はつくばと諏訪で他の集団に比べて有意に早かった。開花まで日数も両環境で埼玉集団が一番早く、北海道集団が遅い傾向にあった。一方、開花初期花茎長と開花周期花茎長、小花数、葉数は集団間で有意な違いは認められなかった。各集団の出芽率は環境間で有意な差は認められなかった(図 3-2)。

ジェネットが 2 環境でどのように反応しているのかを調べるために行ったジェネットと環境を要因とした Two-way ANOVA の結果、全ての形質について 1%水準でジェネット間に有意差がみられた(表 3-5)。出芽日と開花まで日数、葉数が 1%有意水準においてつくばと諏訪の環境間で有意に異なった(表 3-5, 図 3-3)。5%の有意水準で交互作用が認められたのは、出芽日と開花終期花茎長だった。開花初期花茎長は統計的には有意ではないものの( $P<0.06$ )、様々な反応を示すジェネットが存在した(図 3-3)。

形質ごとに各集団の可塑性に関する頻度分布を図 3-4 に示した。形質ごとに平均値を見ると、開花終期花茎長を除いた 5 形質では基本的に 0~1 前後の値を示していた。分

散を見ると、開花終期花茎長は他の5形質に比べて明らかに大きくなった。一方、出芽日と開花まで日数の分散は他の形質に比べて小さかった。集団ごとに可塑性に関する集団内変異を比較すると、Bartlett's 検定の結果、出芽日と開花初期花茎長、開花終期花茎長の集団内変異が集団間で異なったため、これらの3形質について各集団でF検定を行ったところ、出芽日では北海道と長野1集団の集団内変異が他の3集団に比べて大きかった。開花初期花茎長と開花終期花茎長は北海道集団の集団内変異が他の4集団に比べて大きく、開花終期花茎長において長野1集団の集団内変異が北海道と長野2と長野3集団よりも小さいことが示された。開花まで日数と小花数、葉数では集団内変異は集団間で有意な違いは認められなかった。形質ごとに可塑性の集団間の平均値を比較した結果、出芽日と開花まで日数がそれぞれ1%と5%水準において集団間で有意に異なった。

#### <つくばと八ヶ岳における2環境栽培>

八ヶ岳で全集団の出芽率が低下した(表3-6, 図3-5)。北海道集団を除く4集団のつくばでの出芽率はほぼ100%であり、つくばと八ヶ岳の環境間で出芽率が有意に異なった(図3-5)。特に八ヶ岳における埼玉集団の出芽率の低下は著しく、八ヶ岳での出芽率は30%であった。反対に3つの長野集団の出芽率はつくばと八ヶ岳の環境間で有意差があるものの、八ヶ岳での出芽率は73~83%を示し、北海道や埼玉集団に比べて高かった。北海道集団はつくばと八ヶ岳で有意な環境間差は認められなかったが、両環境で出芽率は低い傾向にあった。出芽日においては、どの集団もつくばに比べて八ヶ岳で出芽が遅くなった。つくばでは明らかに出芽が早かった埼玉集団は、分散が大きいことにより有意差は認められなかったが、八ヶ岳では他の集団に比べて著しく遅くなった(表3-6)。

つくばと八ヶ岳間での出芽率が集団間で大きく異なったため、集団ごとにジェネットの出芽率を示した(図3-6)。北海道集団において、つくばでの出芽率が高いジェネット



トは八ヶ岳でも出芽率が高く、つくばでの出芽率が低いジェネットは八ヶ岳でも出芽率が低い傾向にあった。つくばで 100% の出芽率を示した埼玉集団の 6 ジェネットは、八ヶ岳においては 0~100% まで様々な出芽率を示した。3 つの長野集団には、各集団 1 ジェネットずつ 40% 以下の低い出芽率を示していたが、それ以外のジェネットは 60% 以上の高い出芽率を示していた。

ジェネットと環境を要因とした Two-way ANOVA を行ったところ、1% の有意水準においてジェネット間と環境間に有意な差が、また有意な交互作用が認められた(表 3-7)。ジェネット×環境の交互作用の  $F$  値が 8.9 を示し、ジェネットの  $F$  値よりも大きく、つくばと八ヶ岳における交互作用が大きいことが示された。

出芽日に関する表現型可塑性の頻度分布を図 3-8 に示した。Bartlett's 検定より集団内変異が集団間で異なっていることが示されたため、 $F$  検定を行ったところ、埼玉集団と長野 1 集団の集団内変異が他の集団に比べて有意に大きいことが示された。統計的に有意ではなかったが、北海道の集団内変異が小さい傾向にあった。また可塑性に関する集団平均値を比較した結果、1% 水準において集団間で有意な差が認められ、埼玉集団が他の 4 集団に比べ平均値が大きく異なっていた。

## 考察

### < 複数環境栽培における各形質の反応 >

2004 年のつくばと諏訪における出芽率は約 75% 以上と比較的高い値を示した(表 3-4, 図 3-2)。2005 年のつくばで、北海道集団の出芽率は他の集団に比べて有意に低かったが、残りの 4 集団の出芽率はほぼ 100% に近い値を示した(表 3-6, 図 3-5)。一方、八ヶ岳では全ての集団の出芽率が低下したが、特に埼玉集団の出芽率が 30% とつくばでの出芽率に比べ大幅に低下した。埼玉集団の出芽率についてジェネットごとに見ると、八ヶ

岳では 0~100%の出芽率を示し(図 3-6) 八ヶ岳の環境に対応できるジェネットから全く対応できないジェネットまで存在していた。埼玉集団の自生地での出芽期にあたる 2~4 月の埼玉集団の自生地と八ヶ岳の気温差は約 9 度であり(表 3-1) その時期の八ヶ岳ではまだ積雪が確認されることから、埼玉集団のジェネットは八ヶ岳の低温などの環境に対応できず、低温耐性や耐霜性を持っていないジェネットが死んだものと考えられる。

3ヶ所の栽培環境で大きな違いが認められた出芽率について、各環境における集団ごとの出芽率と栽培環境内変異と集団内変異を示す指標として変動係数を表 3-8 に示した。栽培環境内変異を見ると、2004 年のつくばと諏訪、2005 年のつくばに比べて八ヶ岳での出芽率の変異が明らかに大きかった。これは、各集団の低温耐性の変異が八ヶ岳で顕在化したためだと考えられる。また各集団内変異をみると、北海道と埼玉集団が顕著に 3つの長野集団に比べて大きな値を示していた。これらは各集団の自生地と八ヶ岳の気温差が小さく、長野の 3 集団はこれまでに自然選択によって低温耐性を持ったジェネットが選抜されていたことから、3つの長野集団は八ヶ岳での環境に十分対応できる力を持っていたことが考えられる。北海道集団も同様に自生地の気温が低いため、低温耐性を持ったジェネットが集団の中に選抜されていることが予測されるが、北海道集団はどの環境においても 90%以上の高い出芽率が示されなかったため、低温ではない他の要因が関係している可能性が考えられる。

3ヶ所の栽培環境の中で最も生育状況の厳しい八ヶ岳において、供試した全 245 個体のうち 148 個体が出芽し、146 個体が生育後期まで生残した。このことは、サクラソウにおいて出芽できるか否かは生存できるか否かと同じ意味を持つことを示している。これは 2 章で述べたようにサクラソウの出芽のタイミングには強い選択圧がかかっているという推測を支持する結果となった。

つくばと諏訪間で有意な環境間差が認められたのは出芽日と開花まで日数、葉数の3形質であり、 $F$ 値は出芽日、開花まで日数、葉数の順で大きかった(表3-5)。さらにつくばと八ヶ岳間でも出芽日の環境間差は有意であった(表3-7)。環境効果による分散の大きさは、可塑性の量を表すパラメーターとしても用いられていることから(Via 1994)、出芽日と開花まで日数と葉数は他の3形質に比べて、マクロ環境の影響を受けやすく、これらの3形質は可塑性の大きい形質であると言える。つくば、諏訪、八ヶ岳の順に出芽日が遅くなったが、出芽日は出芽時期の気温に大きく影響を受ける形質であることが2章の結果から推測されたため、環境間の気温の違いによって出芽日が遅れたと考えられる。各環境の2~4月の平均気温は、諏訪はつくばに比べて3~4度低く、八ヶ岳は諏訪に比べて4度低い。このことから、各環境で出芽が遅くなったのは環境間の気温の違いが原因と考えられ、八ヶ岳で生残したジェネットはつくばと八ヶ岳の10度近い温度差に対応したと言える。

開花まで日数も出芽日同様、つくばに比べ諏訪で早くなった。出芽に合わせて開花時期も同様に遅らせてしまうと、花粉媒介昆虫の虫媒による種子生産や周囲との光合成のための光を受容の競争などから、開花までの日数がある程度短くなることが考えられる。杉坂ら(2007)は、他殖性の一年生草本を例に挙げ、開花時期を決定する仕組みには強い自然選択が働いていると推測し、野外の環境変動で最適な開花時期を実現するには表現型可塑性が大きな役割を果たすことを述べている。サクラソウの開花期が2章では自然選択を受けて、適応分化した形質であるということが示されなかったものの、最適な開花時期に合わせるために大きな可塑性を示す形質であることが推測される。

葉数はつくばに比べ諏訪で多く、各環境では集団間で有意な違いは認められなかった。2章のつくばでの同一環境栽培では埼玉集団が多くなったが、本章では集団間差が認められなかった。これはサンプルサイズが2章よりも少ないことも原因であると考えられ

が、つくばでは埼玉集団が他の集団に比べて多い傾向がみられ、諏訪では他の集団間との差がつくばに比べて小さくなった。2章では埼玉が他の集団に比べて葉数が多くなったのは、つくばの環境が埼玉集団の自生地環境に近かったことによるホームアドバンテージによるものであると推定した。つくばに比べて諏訪の環境は、埼玉集団の自生地環境からはなれ、長野集団や北海道集団の自生地環境に近いと考えられること、また実際に埼玉集団の葉数が他の集団との差が小さくなったことは、葉数はそれぞれの自生地環境において最適な表現型を示すように適応した形質であることを示唆している。

#### < 表現型可塑性の集団内・間の遺伝的変異 >

2004年のつくばと諏訪における表現型可塑性の集団間変異は、出芽日と開花まで日数がそれぞれ1%と5%水準で有意であり、その他の4集団は集団間で有意な差は認められなかった。表現型可塑性がある遺伝子によって制御されていると仮定した場合、自然選択を受けることによって各集団でそれぞれ異なる遺伝子型が選択されてきた可能性が考えられることから、集団間で有意に異なった出芽日と開花まで日数の表現型可塑性には自然選択を受けてきた可能性があり、これらの形質の集団内変異が他の4集団に比べて小さかった結果はこれらの可能性を支持するものである。

2005年のつくばと八ヶ岳の環境においては、出芽率に集団間変異があるものの、全ての集団の出芽日が八ヶ岳において低下した(表3-5)。これは生死に関わる耐性が八ヶ岳のような低温環境で顕在化したためである。特に出芽率が顕著に低下した埼玉集団においては、ジェネットの平均出芽率が30.8%と(表3-5)63個体中19個体しか八ヶ岳の環境で生存できず、多くの埼玉集団のジェネットは自生地と八ヶ岳の大きな気温差(2月は約9度:表2-1,表3-7)に対応できなかったものと考えられる。生残した個体

について出芽日を見ると、つくばでは他の集団に比べて顕著に早かった埼玉集団の出芽日が、八ヶ岳では他の集団と同じくらいか、または少し遅くなったため（図 3-7）他の集団に比べて大きな可塑性を示した。八ヶ岳で生残した個体のつくばと八ヶ岳における出芽日の表現型可塑性は集団間で有意に異なっており、集団間変異はつくばと諏訪に比べて大きくなった（図 3-8）。特に埼玉集団は先に述べたようにつくばの環境に比べて、八ヶ岳の環境では他の集団に比べ相対的に遅くなったために、他の集団に比べて平均値が異なると考えられる。さらに埼玉集団の集団内変異は他の集団に比べて顕著に大きかったが、これは今までに埼玉集団が自生地において、八ヶ岳のような気温の低い環境で低温などの強い選択圧を受けた経験がないため、このような大きな変異が顕在化したものと推察される。一方、自生地の気温が低い4集団は、これまでに八ヶ岳のような低温環境で強い選択圧を受けてきたことによって八ヶ岳の環境で対応できるジェネットが選抜されてきたことから、4集団の集団内変異が小さく、同じような可塑性を示すジェネットを保有していたものと考えられる。

表現型可塑性は変動する様々な環境に対してできる限り適応度が下がらないようにする利点をもっているため、特定の環境に特化したもの（スペシャリスト）に比べて複数の環境条件で適応度が低くなるようならば、可塑性は有利には働かない（塚谷 2007）。比較的安定している環境においては、可塑性の維持するコストの観点からもスペシャリストが有利になるため表現型を固定する方向に進む（Weinig 2000）。一方、環境が不安定な場合はスペシャリストではなく様々な環境に対応できるようなもの（ジェネラリスト）が有利となる（Weinig 2000）。塚谷（2007）は比較的安定した環境で生育する植物にとってはスペシャリストとなることが有利であると述べており、この観点から考えると、出芽日はこれまでに強い選択圧を受けている結果、各自生地の環境に合ったジェネットが選抜されているため、表現型の固定が進んだ結果、各自生地におけるスペシャリ

ストとなったことが考えられる。そのため、それぞれの集団のジェネットの表現型の固定が進んだ結果、特に埼玉集団では自生地環境と大きく異なる八ヶ岳で多くの個体が対応できずに死んでしまったが、埼玉集団の中には八ヶ岳環境でも対応できるジェネットが存在し、自生地よりも大幅に気温が低い環境にも対応できることが明らかになった。このような埼玉集団のジェネットは変動の大きな環境下での生存に適応的なジェネットであると言える。

表 3-1. つくば、諏訪、八ヶ岳の平均気温

栽培環境	経度	緯度	平均気温( ) <sup>1</sup>				
			2月	3月	4月	5月	6月
つくば	140°07'	36°03'	3.6	6.5	13.1	16.3	23.0
諏訪	138°06'	36°02'	-1.0	3.0	9.6	14.8	18.8
八ヶ岳	138°28'	35°56'	-5.2	-1.0	5.4	10.4	14.4

<sup>1</sup>つくばの平均気温は栽培に用いたビニールハウス内の観測値を示す。諏訪・八ヶ岳の平均気温は気象庁HP ( <http://www.data.kishou.go.jp/etrn/index.html> ) を参照した。

表 3-2. 供試験した集団と各環境で栽培したジェネット数とラメット数

地域	集団	緯度	経度	標高	2004年 供試ジェ ネット数	つくば 諏訪		2005年 供試ジェ ネット数	つくば 八ヶ岳	
						ラメット 数	ラメット 数		ラメット 数	ラメット 数
北海道	北海道	142°01'N	42°31'E	30 m	7	28	24	6	21	27
埼玉	埼玉	139°36'N	35°50'E	10 m	7	28	26	10	44	63
長野	長野1	138°31'N	36°12'E	960 m	7	28	28	9	36	51
	長野2	138°38'N	36°19'E	940 m	9	29	32	11	46	63
	長野3	138°31'N	36°21'E	1120 m	6	35	34	4	28	41
計					36	148	144	40	175	245



表 3-3. 各環境で供試した各ジェネットの反復ラメット数

集団	供試ジェネット名 <sup>1</sup>	2004		2005		集団	供試ジェネット名 <sup>1</sup>	2004		2005	
		つくば	諏訪	つくば	八ヶ岳			つくば	諏訪	つくば	八ヶ岳
北海道	P1			3	3	長野2	P1	4	4		
北海道	P7	2	2			長野2	P3	4	4	4	6
北海道	P9	3	3			長野2	P4	3	2	3	4
北海道	P16			4	6	長野2	P7	4	4	4	6
北海道	P17&P18	8	8	4	6	長野2	P8			4	4
北海道	T1	2	2	4	5	長野2	P10&P11			8	12
北海道	T5	3	3			長野2	P13	2	2	4	4
北海道	T6	2	2	3	3	長野2	P14			4	6
北海道	T11	4	4	3	4	長野2	P16	4	4	3	3
埼玉	1			4	6	長野2	T1	4	4	4	6
埼玉	4	4	4			長野2	T2	4	4	4	6
埼玉	5			4	6	長野2	T12	4	4	4	6
埼玉	6	4	4	4	5	長野3	2&3	4	5	8	12
埼玉	7	4	2			長野3	8-17	16	16	12	18
埼玉	8&14			8	11	長野3	20	4	4	4	6
埼玉	9			4	6	長野3	21			4	5
埼玉	11	4	4	4	6	長野3	23	4	2		
埼玉	13	4	4	4	5	長野3	24	3	3		
埼玉	15			4	6	長野3	25	4	4		
埼玉	16	4	4	4	6						
埼玉	18	4	4	4	6						
長野1	P1	4	4	4	6						
長野1	P6			4	6						
長野1	P9			4	4						
長野1	P12	4	4	4	6						
長野1	PH1	4	4								
長野1	PH2	4	4	4	6						
長野1	T1	4	4	4	5						
長野1	T9	4	4	4	6						
長野1	T11			4	6						
長野1	T13	4	4	4	6						

<sup>1</sup> Pは長花柱花、Tは短花柱花を示す

集団	出芽率 (%)				出芽日 <sup>1</sup>				開花まで日数 <sup>1</sup>				開花初期花茎長 (cm)			
	つくば		諏訪		つくば		諏訪		つくば		諏訪		つくば		諏訪	
	平均 <sup>2</sup>	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散
北海道	82.1 a	1398	85.7 a	595	22.8 a	55.0	50.1 a	15.4	59.7 a	24.3	77.3 a	13.9	6.2 a	8.5	8.1 a	10.9
埼玉	100.0 a	0	75.0 a	1458	10.4 b	8.9	40.3 b	7.0	50.0 b	30.1	71.1 b	24.2	6.0 a	6.8	6.3 a	7.6
長野1	92.9 a	149	89.3 a	387	21.9 a	5.9	52.5 a	37.9	57.2 ab	8.4	72.3 ab	3.0	4.9 a	1.3	5.5 a	3.5
長野2	100.0 a	0	100.0 a	0	25.4 a	10.5	49.5 a	6.4	56.4 ab	5.3	76.0 ab	4.5	7.3 a	5.1	7.3 a	8.9
長野3	94.8 a	100	100.0 a	0	25.4 a	13.7	49.2 a	3.5	56.2 ab	15.6	74.0 ab	9.0	6.8 a	3.1	6.5 a	1.3
平均	94.0	90.0	85.0	900	21.2	48.3	50.0	10.0	55.9	74.1	74.1	10.0	6.2	6.8	7.3	6.8

集団	開花終期花茎長 (cm)				小花数				葉数			
	つくば		諏訪		つくば		諏訪		つくば		諏訪	
	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散
北海道	7.1 a	14.1	8.3 a	11.6	4.0 a	0.6	4.0 a	5.1	5.2 a	4.4	8.3 a	5.4
埼玉	9.1 a	9.8	8.7 a	4.7	7.1 a	6.5	6.1 a	1.7	8.2 a	17.9	9.3 a	7.2
長野1	5.6 a	2.6	6.9 a	1.8	6.7 a	2.9	7.2 a	2.1	4.5 a	7.0	8.7 a	2.0
長野2	7.8 a	5.4	7.7 a	10.8	7.1 a	6.9	6.1 a	5.6	6.4 a	1.3	9.0 a	5.5
長野3	6.5 a	1.3	6.6 a	2.3	4.9 a	2.3	4.5 a	1.9	5.1 a	2.4	7.4 a	2.8
平均	7.2	7.6	7.6	6.0	6.0	5.6	5.9	5.9	8.5	8.5	8.5	5.4

<sup>1</sup>出芽日と開花まで日数の基準日を2月15日とした。

<sup>2</sup>異なる文字間はTukey-Kramerの多重比較において5%水準で統計的に異なることを示す。

表 3-5. つくば・諏訪におけるジェネットと環境を要因とした Two-way ANOVA の結果

出芽日				開花まで日数			
要因	df	MS	F	要因	df	MS	F
ジェネット	33	212.71	12.50 **	ジェネット	28	66.86	4.78 **
環境	1	40286.00	2367.85 **	環境	1	11086.17	792.66 **
ジェネット ×環境	33	41.86	2.46 **	ジェネット ×環境	28	13.38	0.96
誤差	197	17.01		誤差	100	13.99	

開花初期花茎長				開花終期花茎長			
要因	df	MS	F	要因	df	MS	F
ジェネット	28	23.33	7.77 **	ジェネット	28	22.49	7.68 **
環境	1	8.66	2.89	環境	1	0.63	0.22
ジェネット ×環境	28	4.61	1.53	ジェネット ×環境	28	7.92	2.70 **
誤差	101	3.00		誤差	92	2.93	

小花数				葉数			
要因	df	MS	F	要因	df	MS	F
ジェネット	28	22.72	7.12 **	ジェネット	28	13.38	3.23 **
環境	1	8.25	2.59	環境	1	197.42	47.71 **
ジェネット ×環境	28	4.04	1.27	ジェネット ×環境	28	6.47	1.56
誤差	95	3.19		誤差	93	4.14	

\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

表 3-6. つくば・八ヶ岳における各集団の平均値と分散

集団	出芽率 (%)				出芽日 <sup>1</sup>			
	つくば		八ヶ岳		つくば		八ヶ岳	
	平均	分散	平均	分散	平均	分散	平均	分散
北海道	69.4 a	1352	43.1 bc	956	40.4 a	30.5	68.6 a	13.8
埼玉	96.3 a	102	30.8 c	1009	24.0 b	81.4	80.5 a	138.0
長野1	97.2 a	69	75.6 a	696	42.2 a	40.2	71.9 a	162.8
長野2	100.0 a	0	82.6 a	636	48.0 a	68.0	71.2 a	36.3
長野3	100.0 a	0	73.2 abc	366	41.8 a	17.6	72.6 a	92.9
平均	92.6		61.1		39.3		73.0	

<sup>1</sup>出芽日の基準日を2月18日とした。

異なる文字間はTukey-Kramerの多重比較において5%水準で統計的に異なることを示す。

表 3-7. つくば・八ヶ岳におけるジェネットと環境を  
 要因とした Two-way ANOVA の結果

出芽日			
要因	df	MS	F
ジェネット	35	355.59	7.11 **
環境	1	61016.61	1220.70 **
ジェネット ×環境	35	444.50	8.89 **
誤差	231	49.99	

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$

表 3-8. つくば・諏訪・八ヶ岳における出芽率の集団内変異と栽培環境内変異

集団	2004つくば	諏訪	2005つくば	八ヶ岳	集団内変異(CV)
北海道	82.1 a	85.7 a	69.4 a	43.1 bc	47.12
埼玉	100.0 a	75.0 a	96.3 b	30.8 c	49.69
長野1	92.9 a	89.3 a	97.2 b	75.6 a	23.69
長野2	100.0 a	100.0 a	100.0 b	82.6 a	15.77
長野3	94.8 a	100.0 a	100.0 b	73.2 abc	18.06
栽培環境内変異(CV)	20.7	25.6	18.3	52.6	

異なる文字間はTukey-Kramerの多重比較において5%水準で統計的に異なることを示す。

CVは変動係数を示す。

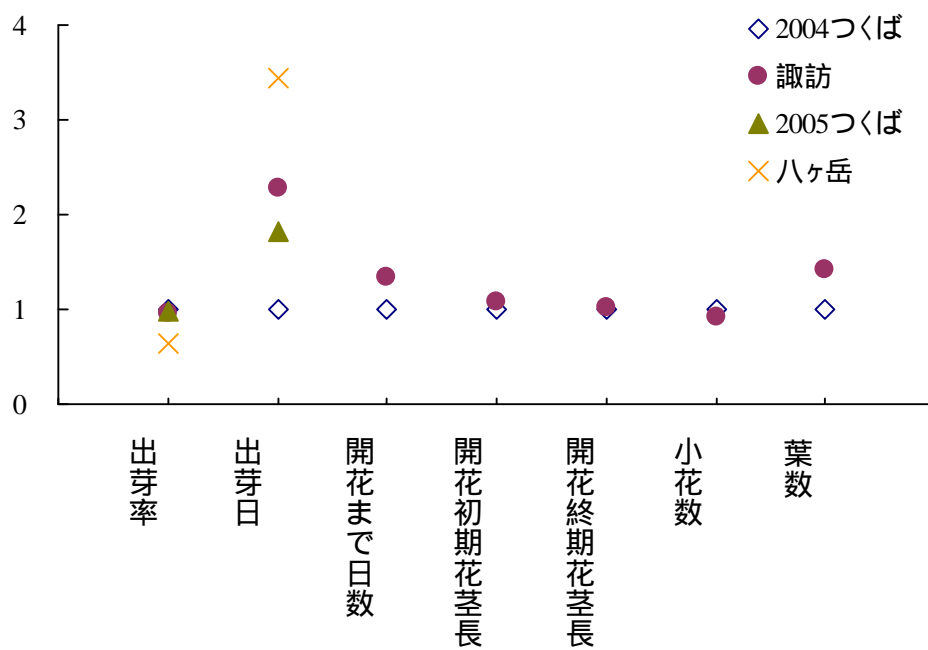


図 3-1. 2004 年と 2005 年における各形質の環境指数

2005 年は開花個体数が少なかったため、出芽率と出芽日のみ算出した。

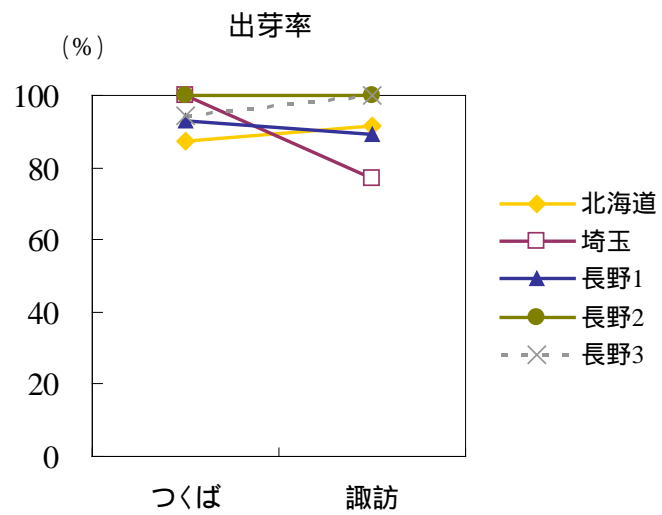


図 3-2. つくば・諏訪における各集団の出芽率

各集団の出芽率は環境間で有意差なし。



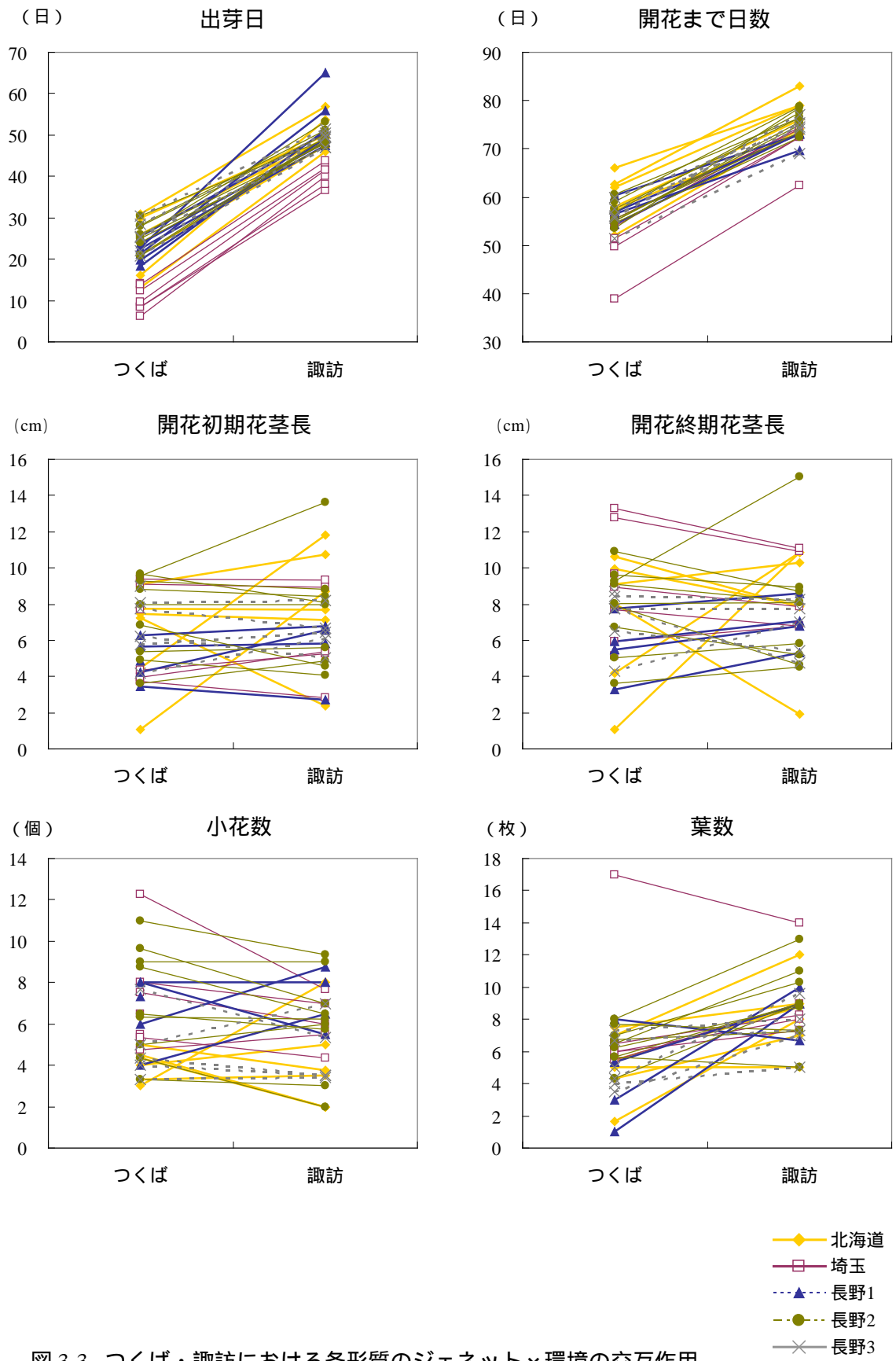
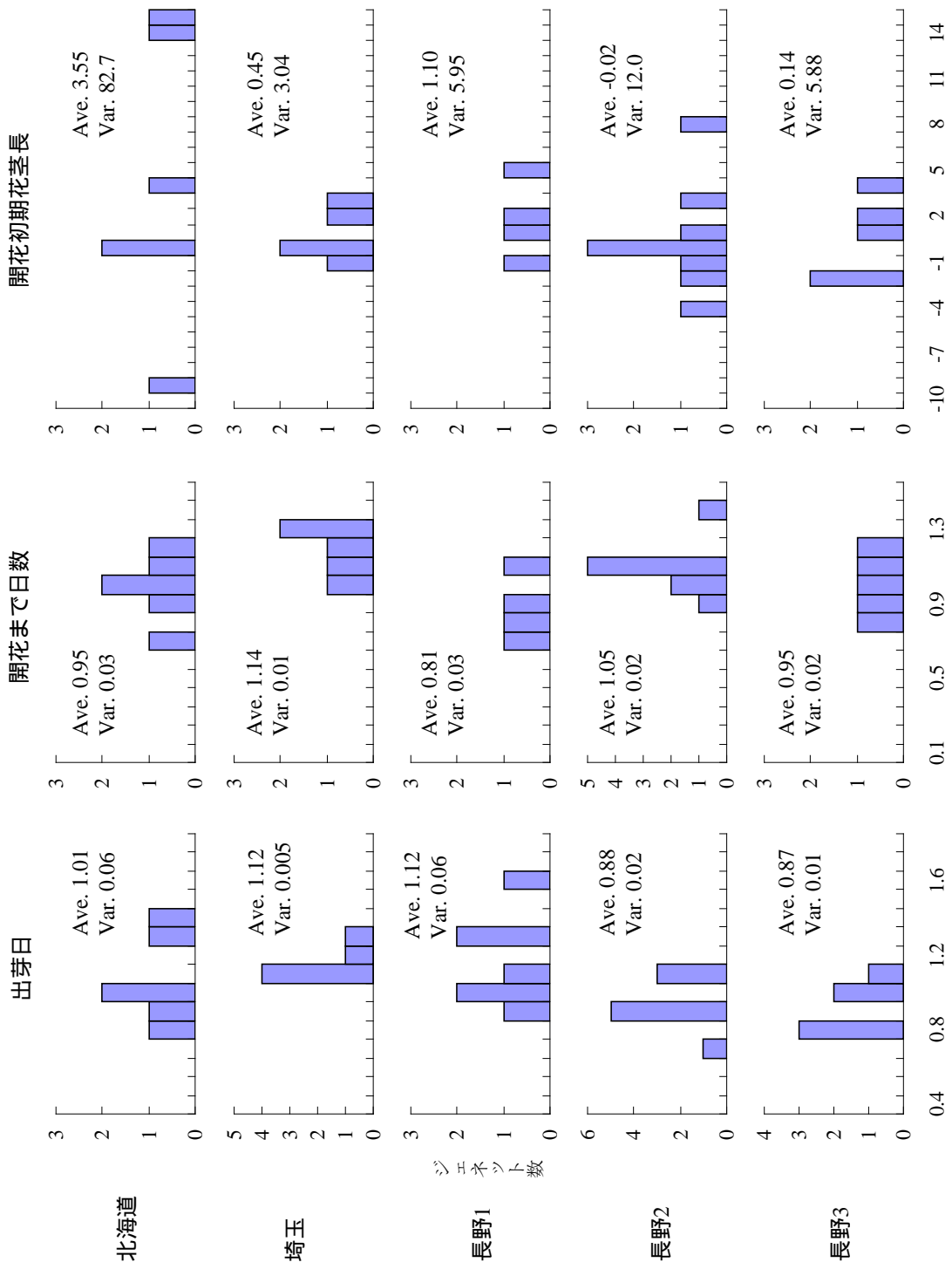
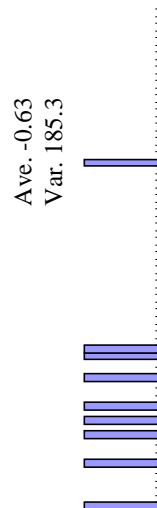
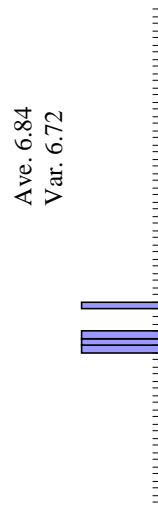
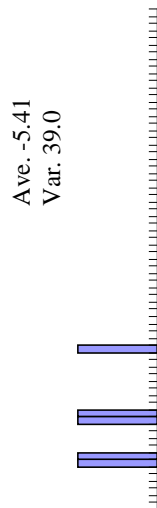
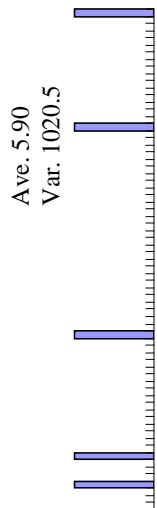


図 3-3. つくば・諏訪における各形質のジェネット×環境の交互作用

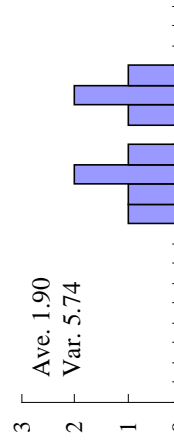
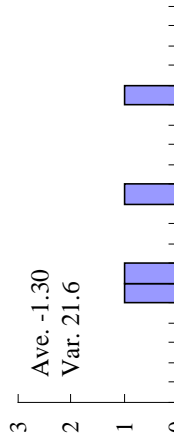
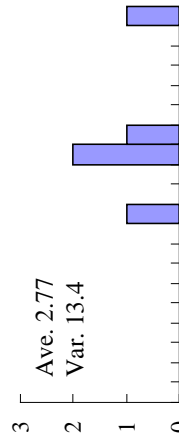
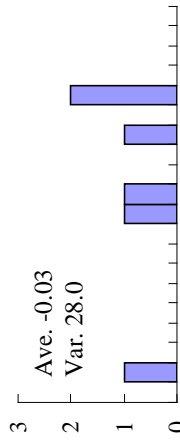


表現型可塑性 (回帰係数)

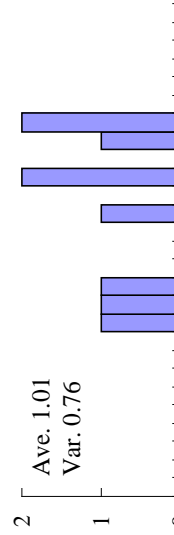
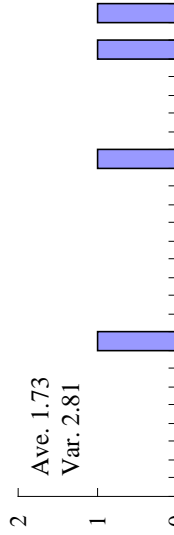
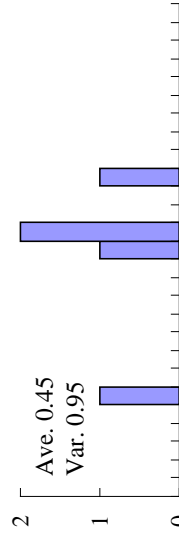
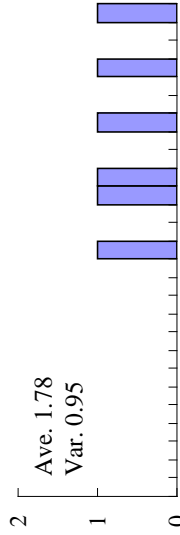
開花終期花莖長



小花数



葉数



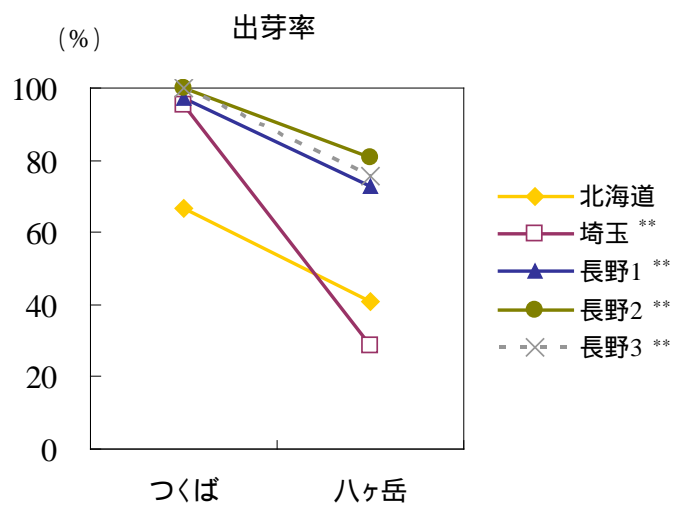


図 3-5. つくば・八ヶ岳における各集団の出芽率

北海道集団を除く 4 集団の出芽率で環境間差あり。

\*\*  $P < 0.01$

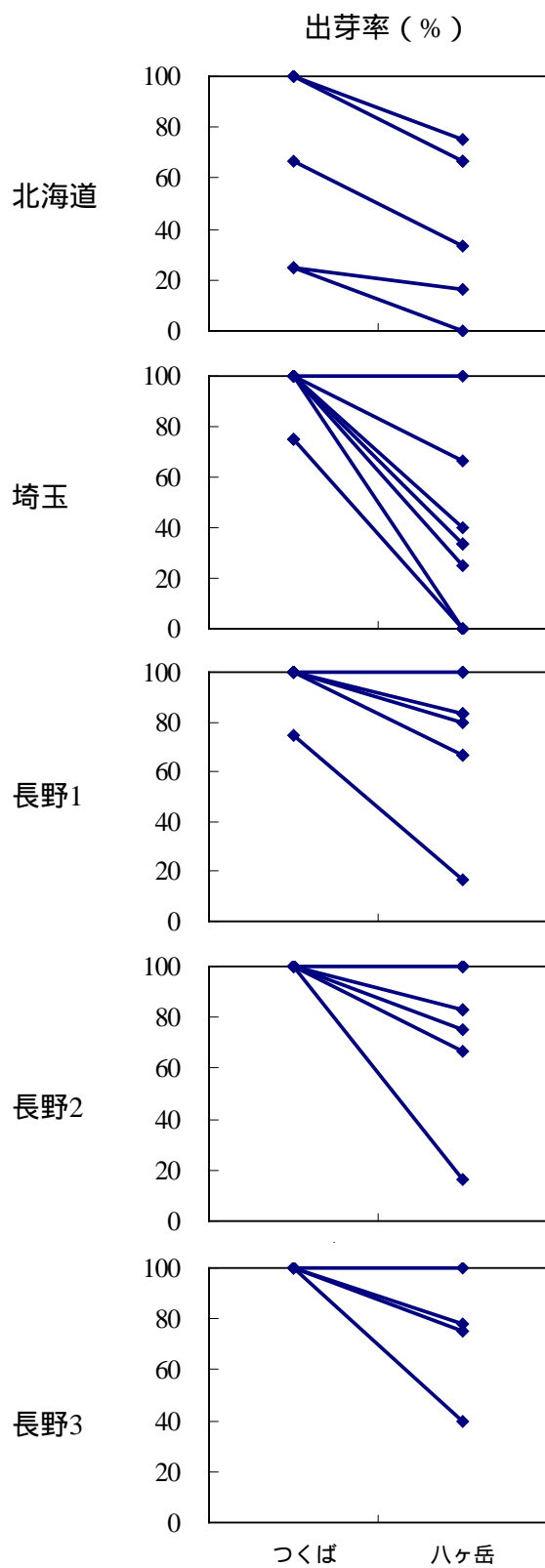


図 3-6. つくば・ハケ岳における 5 集団の各ジェネットの出芽率

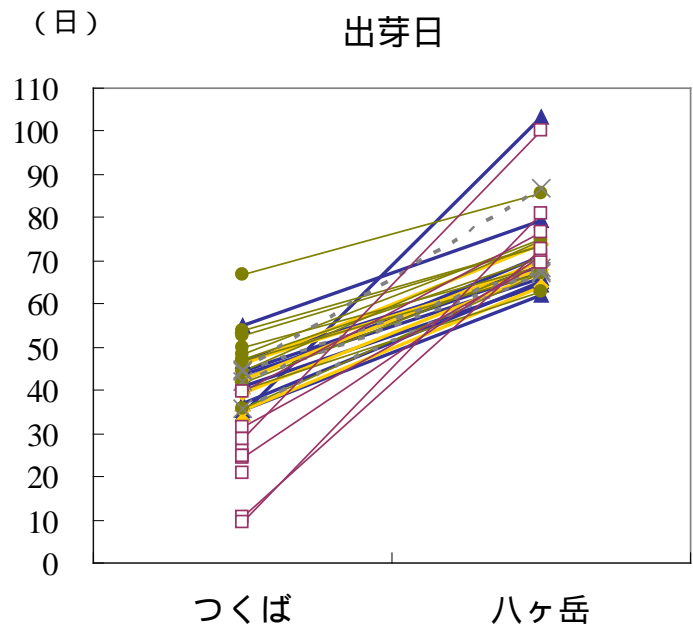


図 3-7. つくば・ハケ岳における出芽日のジェネット×環境の交互作用

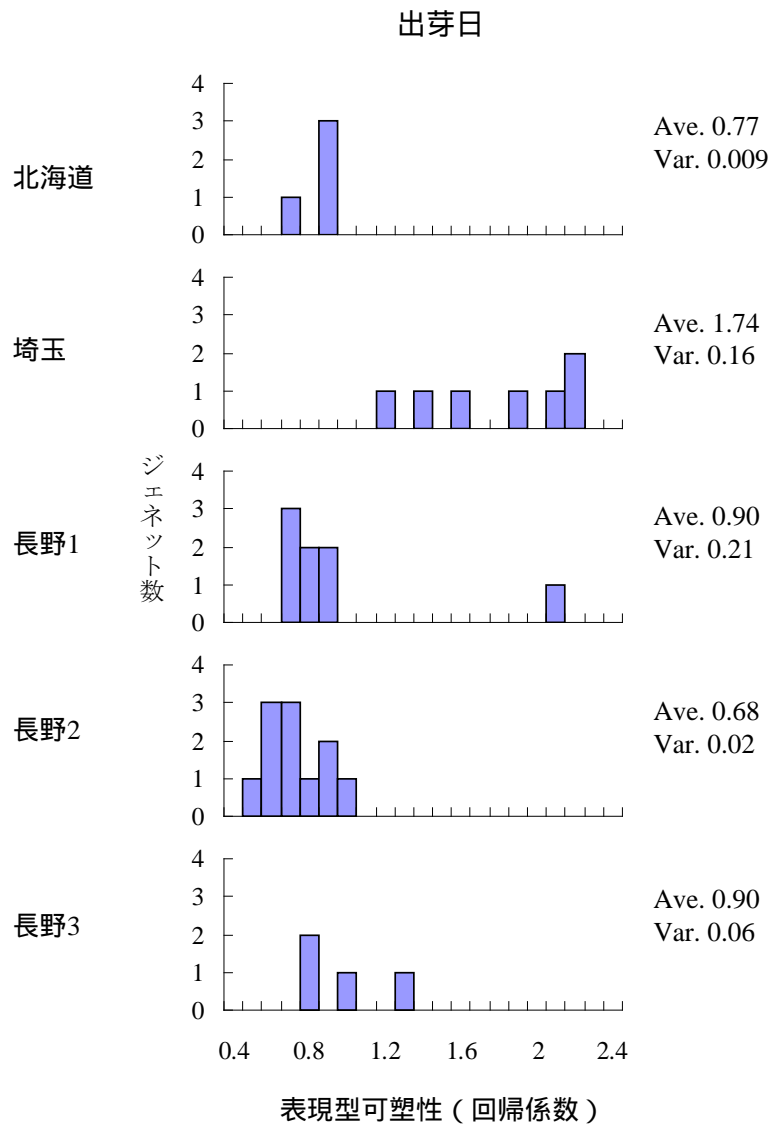


図 3-8. つくば・八ヶ岳における出芽日の表現型可塑性の頻度分布

#### 4章 サクラソウにおける量的形質の遺伝的多様性評価および花型の識別を目的とした分子マーカーの有効性の検証

##### 緒言

これまでに1章では花卉形質、2章では適応的な集団間分化が認められた出芽日や葉数を含む量的形質、3章では表現型可塑性のそれぞれ集団内、集団間の遺伝的変異の評価を行ってきた。しかし量的形質の遺伝的変異の評価には、同一環境栽培や複数環境栽培を行う必要があり、時間や労力がかかるため、分子マーカーを用いた多様性評価に比べて容易ではない。

2章でも述べたように、これまで分子マーカーと量的形質の集団内、集団間の遺伝的変異の関係性において一貫した結果が得られないのは、解析に用いているマーカーによる評価が実際に各形質を支配している遺伝子を評価していないことが原因のひとつであると考えられる。育種においては、すでに対象形質の遺伝子領域や形質に関与する遺伝子座の近傍にある分子マーカーを用いて選抜を行っているため(鵜飼 2000)、形質を支配している遺伝子に連鎖している分子マーカーを用いることによって、量的形質の遺伝的多様性を間接的に評価できる可能性がある。

分子マーカーを用いた間接的な量的形質の遺伝的多様性の評価は、個体のサンプリングができない状況も考えられる絶滅危惧植物のサクラソウにとって有効である。たとえば、集団間で適応分化している出芽日の多様性が分子マーカーで評価可能になれば、同一環境下で栽培が行えない集団の遺伝的多様性を考慮した保全単位を決定できる。また異型花柱性に関わる遺伝子はいまだ特定されていないが、花型についてはこれまでにサクラソウ属の *Primula vulgaris* で長花柱花と短花柱花に特異的な対立遺伝子の増幅に成功している (Manfield *et al.* 2005, Li *et al.* 2007)。これらの遺伝子あるいは異型花柱性と



連鎖しているマーカーを用いることで花型を識別できれば、調査時期や個体の成育ステージの制限を受けずに集団内の花型の把握が可能になる。

これまでにサクラソウを含むサクラソウ属では、連鎖地図の作成されておらず、QTL解析には到っていない。サクラソウは他殖性で強い自家不和合性を示すため、自殖による分離家系を作成することができない。このような植物種では、四系交配による分離家系を作成して連鎖解析を行う方法である pseudo-testcross (Grattapaglia and Sederoff 1994) が利用される。

そこで本章では、サクラソウの量的形質の QTL 近傍にあるマーカーを用いて、形質の遺伝的多様性評価の有効性を検証することを目的として、連鎖地図を作成し、つくばと八ヶ岳の異なる 2 環境下で調査した形質について QTL 解析を行った。さらに、適応関連形質であり、生存において可塑性の遺伝的変異の重要性が認められた出芽日について、QTL の近傍にある分子マーカーを用いて集団の多様性評価を試みた。またサクラソウの異型花柱性に関わる花型に連鎖する遺伝子座と花型の関連についても調査した。

## 材料

連鎖地図作成と QTL 解析の供試材料として、北海道日高地方由来の野生個体 (HP05, HT02) と長野県八ヶ岳地方由来の野生個体 (YP108, YT112) を利用した四系交配 (HP05 × YT112) × (HT02 × YP108) 家系 192 個体を分離家系として用いた (図 4-1)。

分子マーカーを用いた多様性評価の有効性を検証するために行った集団解析には、これまで 1~3 章で用いた 3 地域 5 集団のうち各地域から 1 集団とし、北海道集団、埼玉集団、長野地域から選ばれた 2 章で最も出芽日が遅かった長野 2 集団を選び、供試ジェネットは、北海道集団 26 ジェネット、埼玉集団 16 ジェネット、長野 2 集団 26 ジェネットとした。

## 方法

### <連鎖地図作成>

#### 1. プライマー

既存の SSR プライマー169 対と発現遺伝子配列断片 (expressed sequence tag; EST) 情報を利用して開発された SSR プライマー (EST-SSR プライマー) 14 対および一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) プライマー40 対の計 223 プライマー対を用いて、親個体 (2B1,5G14) のスクリーニングを行った。その結果、親個体間で多型が認められた各プライマー対を四系交配家系の分離解析に用いた。本章で用いたプライマーは全てサクラソウ由来であり、表 4-1 と表 4-2 に示した。SSR プライマー169 対のうち、26 対はすでに報告されているが (Isagi *et al.* 2001, Ueno *et al.* 2003, Kitamoto *et al.* 2005, Ueno *et al.* 2005) 残りの SSR プライマー143 対と EST-SST プライマー14 対、SNP's プライマー40 対は未報告である。

#### 2. DNA 抽出

CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) を改変した以下の手法を用いて DNA 抽出を行った。生葉を 2.0ml チューブに入れ-30 のフリーザーで保存した後、液体窒素に浸し Vibration Mill Type MM300 (QIAGEN Inc.) を用いて粉碎した。2×CTAB 溶液を 400μl 加えた後、60 で 1 時間インキュベートした。たんぱく質を除去するためにフェノール:クロロホルム:イソミルアルコール=25:24:1 のフェノールクロロホルムを 300μl 加え、10 分攪拌させた。15000rpm で 25 10 分遠心した後、上清を回収した。回収した上清にイソプロパノールを 240μl 加えた後、15000rpm で 4 20 分遠心し、DNA を沈殿させた。エタノールで洗浄して乾燥させ、約 300μl の TE で溶解させた。

### 3. PCR 条件と遺伝子型の決定

プライマーによる断片長の増幅には、PCR 法と Multiplex PCR 法を用いた。PCR 法は Honjo *et al.* (2008) のプロトコルに従い、温度サイクルを、94 3 分間の熱変性、94 30 秒、アニーリング温度 30 秒、72 30 秒を 30 サイクル、72 7 分間の伸張で行った。一方、Multiplex PCR は QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN 社) のプロトコルを基本として、増幅断片長と蛍光色が重ならないよう考慮しながらセットあたり 5 - 10 個のプライマーを組み合わせ、温度サイクルは 95 15 分間の熱変性後、94 30 秒、60 90 秒、72 60 秒の 30 サイクル、60 30 分間で行った。SNP の検出には、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit のプロトコルを基本とし、まず、EST プライマーを、94 3 分間の熱変性後、94 30 秒、60 90 秒、72 90 秒を 40 サイクル行い、72 で 7 分間の伸張の PCR 条件で増幅した後、dNTP と残留プライマーの除去のための精製を行った。次にこの増幅産物を鋳型とし、SNP's プライマーを 96 2 分間の熱変性後、96 10 秒、50 5 秒、60 30 秒を 25 サイクル行い、60 7 分間の PCR 条件で増幅した後、ddNTP 除去のための精製を行った。2 度の精製は 37 1 時間で酵素反応させた後、75 15 分で酵素を失活させることによって行った。SNP's プライマーは Multiplex PCR を用いたため、増幅断片長を考慮して、4-6 プライマーを 1 セットで組み合わせた。各 PCR 法で用いたプライマーのアニーリング温度は表 4-3 に、PCR と精製の反応液組成を表 4-4 に示した。

PCR 産物を ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて電気泳動を行い、Gene Scan software Gene Mapper (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて遺伝子型を決定した。

#### <つくば・八ヶ岳における形質評価>

2008 年に筑波大学農林技術センター内のビニールハウスと筑波大学八ヶ岳演習林内

圃場で分離家系 192 ジェネットを栽培した。1 ジェネットあたり反復として 2~4 ラメット用いた。4 号の素焼き鉢に土壌表面から 1cm 下に芽の先端がくるように、人工培土 (Metro-Mix 350 (HYPONeX, JAPAN, CORP.)) を用いて定植した。定植はつくばで 2008 年 1 月 6、7 日に、八ヶ岳で 2008 年 1 月 9、10 日に行った。

## 1. 測定形質

つくばと八ヶ岳の両環境で、出芽日、第一花開花日、開花初期花茎長、開花終期花茎長、小花数、葉数を測定した。出芽日と開花まで日数は 2 章と同様の方法で算出し、開花初期花茎長、開花終期花茎長、小花数、葉数と合わせて 6 形質を解析した。加えてつくばでは、花弁面積、花弁形状、花筒長、柱頭高、葯高、葯長を測定した。花弁面積と花弁形状、花筒長、柱頭高、葯高、葯長の測定には、第一花開花日から 1 週間後の第一花を、第一花が奇形の場合は二番目に開花した小花を用いた。花弁面積と形状は 1 章と同様の方法を用いて測定した。花筒長、柱頭高、葯高、葯長は、花筒をピンセットで半分に分解し、サイズマーカー (9mm × 9mm) と共に撮影した後、画像計測プログラム makijaku ver. 1.1 (岩田 2003) を用いて測定した (図 4-2)。

## 2. データ解析

つくばと八ヶ岳における各形質の広義の遺伝率は、REML 法を用いて全分散成分のうちジェネット間の分散成分の割合として算出した。また 2 環境で測定した形質においては、環境とジェネットを要因とした Two-way ANOVA を行った。つくばと八ヶ岳で測定した 7 形質は、各形質の表現型可塑性は、3 章と同様に、環境指数を用いて推定された回帰係数を表現型可塑性とした。

### < QTL 解析 >

連鎖地図は JoinMap ver. 4.0 を用いて作成した。さらに各ジェネット内のラメットを平均して算出したジェネット値を形質値とし、MapQTL ver. 5.0 を用いて interval mapping による QTL 解析を行った。しかし作成された連鎖地図のマーカー間の距離が大きい場合やマーカーが極端に特定の場所に偏り、大きなギャップが生じている場合には Interval-Mapping によって検出された QTL の精度が落ちるため、Kruskal-Wallis 検定によって各形質の発現に関与していると考えられる遺伝子座を特定することにした。また 1 遺伝子によって支配されているとされる質的形質の花型は、長花柱花が劣性遺伝子のホモ型 (gpa/gpa)、短花柱花は優性遺伝子と劣性遺伝子のヘテロ型 (GPA/gpa) であることから (Dowrick 1956)、花型に連鎖する遺伝子座の位置を推定した。

### < 分子マーカーを用いた多様性評価の有効性の検証のための集団解析 >

適応関連形質に連鎖する遺伝子座による野生 3 集団の遺伝的多様性評価の有効性を検証するため、適応関連形質である出芽日に、1 章で自然選択に中立であることが明らかになった花卉面積と 2 章で集団間分化が認められなかった開花初期花茎長を比較対照として加えた 3 形質に連鎖する全遺伝子座に基づいた  $F_{ST}^L$  を算出した。本章では  $F_{ST}^L$  (L は Link を意味する) を、各形質に連鎖する遺伝子座のみを用いて算出した  $F_{ST}$  とするため、これまで SSR マーカー 8 座で算出してきた  $F_{ST}$  を  $F_{ST}^N$  (N は Neutral を意味する) とした。連鎖する遺伝子座が形質を支配する遺伝子座であれば、 $F_{ST}^L$  が  $Q_{ST}$  と同程度の値を示すことが予測される。各形質の  $Q_{ST}$  は 1 章または 2 章で用いた 2003 年の解析データより、野生 3 集団を対象に再計算した。

さらに出芽日の QTL に強く連鎖していると考えられる遺伝子座を用いて、分離家系の表現型値から実際の対立遺伝子座の効果を検証し、各遺伝子座において対立遺伝子に

よる野生集団の多様性解析を行った。また異型花柱性に関わる花器形態においては、花型の QTL の近傍の遺伝子座を用いて、各座の対立遺伝子と長花柱花と短花柱花との関連を調べた。

## 結果

### <連鎖地図作成>

親の遺伝子型により、SSR マーカー124 座、EST-SSR マーカー13 座、SNP's マーカー34 座の計 171 座で多型が検出された。うち SSR マーカー18 座ではどちらかの親で Null 対立遺伝子 (Null allele; 無効対立遺伝子) が検出され、2 マーカーにおいてはマーカーあたり 2 座の遺伝子型を得ることができた。連鎖解析に用いられなかった 52 マーカーのうち、19 マーカーで多型が検出されず、残り 33 マーカーは分離家系で増幅しなかった。

JoinMap ver.4.0 を用いて連鎖地図を作成した結果、128 座より 14 個の連鎖群に分類され、全長 662.9cM の連鎖地図が得られた (図 4-3)。連鎖の認められなかった 43 座のうち 11 座が 5%の有意水準において分離比に歪みが見られた。ga0580 は ga1373-2 と、ga1183 は PS-3 と、分離家系の全てのジェネットがそれぞれ同じ遺伝子型を示したため、ga1183 と ga0580 は解析から除外した。残りの 30 座はどの座とも有意な連鎖関係が認められなかった。連鎖群 1 のようにある特定の領域でマーカーが密集するような傾向が連鎖群 3 や 4 など多くの連鎖群でみられた。

### <つくば・八ヶ岳における形質調査>

花弁の形状解析の結果を図 4-4 に示した。花弁形状を表す第一主成分 (PC1) は、切れ込みの深さと花弁の大きさを表しており、これにより全分散の 83.4%が説明され、第

二主成分 (PC2) は切れ込みの深さを花卉の丸み具合を表し、6.4%を説明している。花卉の切れ込みの角度を表す第三主成分 (PC3) は全分散の 4.4%を占める。これらの 3つの主成分で全分散の 94%を説明している。

形質調査の結果は、各形質の平均値と分散を表 4-5 に、両環境における各形質の頻度分布を図 4-5 と図 4-6 に示した。出芽日はつくばで 3 月 14 日、八ヶ岳では 4 月 18 日から、第一花開花日はつくばで 4 月 5 日、八ヶ岳では 5 月 12 日から始まった。つくばでの平均出芽率が 98.6%であるのに対して、八ヶ岳では 71.9%に減少した。出芽日、第一花開花日ともにつくばに比べて八ヶ岳では約一ヶ月遅くなった。両環境の出芽日と開花まで日数は 3 月 14 日を基準日として算出した。開花初期と開花終期の花茎長と小花数は八ヶ岳で減少し、葉数は八ヶ岳で増加した。開花まで日数以外の 5 形質はつくばに比べて八ヶ岳でばらつく傾向にあった。つくばと八ヶ岳で測定した 6 形質について栽培環境を要因とした ANOVA の結果、全形質で有意な環境間差が認められた ( $P<0.01$ )。短花柱花の花筒長と葯長は長花柱花に比べ大きく、同様に短花柱花の花器形態の分散は長花柱花に比べて大きくなった。

つくばと八ヶ岳における各形質の広義の遺伝率を表 4-6 に示した。花器形態については、花型ごとでも算出した。つくばと八ヶ岳で共通の 6 形質を見ると、つくばでは出芽日の遺伝率が 0.64 と最も高く、葉数が一番低い 0.28 を示した。各形質の遺伝率は 2 章の野生集団で測定した遺伝率とほぼ同じであった。一方、八ヶ岳での遺伝率を見ると、つくばで最も高い遺伝率を示した出芽日は 0.46 と低下した。葉数は両環境とも 0.28 と全形質の中で最も低い遺伝率を示しており、2 章と同様に環境の影響を強く受ける形質であることが示されたが、環境間で変動は見られなかった。葉数を除く 5 形質は、全て八ヶ岳において遺伝率が低下した。花卉形態においては花卉面積が 0.74 と最も遺伝率が高く、形状の中では PC1 が 0.62 と一番高い遺伝率を示した。花器形態は測定した全

形質の中でも 0.57 ~ 0.97 と遺伝率が最も高く、花型ごとに見ても花筒長と柱頭高と約高は高い遺伝率を示した。葯長は花筒長、柱頭高、葯高に比べて遺伝率が低く、他に比べて環境の影響を受ける形質であることがわかる。短花柱花の花器形態は長花柱花に比べて遺伝率は高かった。

Two-way ANOVA の結果、全ての形質は 1%水準において栽培環境とジェネット間で有意に異なった(表 4-7)。F 値を見ると、特に開花まで日数の環境間で大きくなっていった。出芽日も開花まで日数に次いで環境間差が大きい形質であった。葉数は全ての形質の中で環境間差が小さく、環境による形質値の差が最も小さいことが示された。

各形質における表現型可塑性の頻度分布を図 4-7 に示した。平均値は形質間で大きな違いは認められなかった。葉数の表現型可塑性の分散は他の形質に比べ最も大きく、開花まで日数の表現型可塑性の分散は最も小さかった。この結果は、開花まで日数に関してはジェネットが 2 環境で同じような反応をしたことによって、集団内変異が小さくなったことを示している。

#### < QTL 解析 >

作成した連鎖地図は特定の領域でマーカーの密度が高く、多くの連鎖群でギャップが生じているため(図 4-3)、Interval-Mapping で QTL 解析を行うことができなかったことから、本章では Kruscal-Wallis 検定を行い、分離家系の各形質と有意な関与が認められた遺伝子座を検出した。つくばで調査した 14 形質と八ヶ岳で調査した 6 形質、表現型可塑性の 6 形質に関してそれぞれ有意差が認められた遺伝子座をそれぞれ表 4-8、表 4-9、表 4-10 に示した。つくばと八ヶ岳での各形質やその表現型可塑性は、多くの遺伝子座との連鎖が認められた。両環境ともひとつの遺伝子座が複数の形質と連鎖していることが認められた。



表現型可塑性に関して検出された遺伝子座数は、つくばや八ヶ岳で検出された各形質そのものに連鎖する遺伝子座よりも少なかった（表 4-10）。両環境で検出された各形質の遺伝子座と各形質の表現型可塑性について検出された遺伝子座が認められた連鎖群を表 4-11 に示した。つくばと八ヶ岳で検出された各形質の遺伝子座についてみると、つくばの環境のみで検出された遺伝子座、八ヶ岳の環境でのみ検出された遺伝子座、また両環境で検出された遺伝子座があった。特に出芽日や開花まで日数、開花初期花茎長は両環境で検出された遺伝子座が多かった。反対に八ヶ岳のみで検出された遺伝子座はどの形質も 1~3 座であった。また開花終期花茎長や小花数、葉数について検出された遺伝子座の大部分が両環境で認められた。表現型可塑性で検出された遺伝子座について連鎖群でみると、出芽日の 3 連鎖群から開花まで日数と葉数の 7 連鎖群まで有意水準 5%において各形質で様々な遺伝子座が検出された（表 4-11）。そのうち両環境で検出された遺伝子座が大部分だったが、表現型可塑性でのみ検出された遺伝子座は出芽日と小花数をのぞく 5 形質で認められた。

サクラソウの適応関連形質である出芽日とサクラソウ自家不和合性の維持に不可欠な異型花柱性に関する花器形態について述べていく。

出芽日は連鎖群 3、4、5、8、9、10、11、12、13 の 9 遺伝子群において、5%の有意水準でつくばまたは八ヶ岳における出芽日に関与する遺伝子座が検出された（表 4-11、表 4-12）。そのうちつくばでだけ検出された遺伝子座は連鎖群 4 と 10 に存在し、八ヶ岳だけで検出された遺伝子座は連鎖群 9 と 11 と 13 に存在した。両環境で検出された連鎖群では、ほとんどの遺伝子座がつくばと八ヶ岳で検出されたものであるか、その近傍にある遺伝子座から検出された（表 4-12）。表現型可塑性に関する遺伝子座は、連鎖群 3 と 4 で検出され、検出された遺伝子座は 2 座（遺伝子座 5ga081、ga0719）を除いて、つくばまたは八ヶ岳でも検出された（表 4-11、表 4-12）。2 つの連鎖群のうち特に連鎖群 3

では高い有意水準で検出され、連鎖群 4 で検出された 1 遺伝子座はつくばでも検出された。

花器形態の 4 形質に関する遺伝子座は、多くの遺伝子群で高い有意水準で検出されたが（表 4-11）、4 形質全てが同じ遺伝子座と連鎖関係が認められたのは連鎖群 8 だけであった（表 4-8）。各形質を見ると、花筒長と葯長は 8~9 個の遺伝子群で関係する遺伝子座が検出されたのに比べて、柱頭高と葯高では連鎖が認められた遺伝子群の数はそれぞれ 6、3 と少なかった（表 4-11）。一方、質的形質である花型に連鎖する遺伝子座も同様に、全ての花器形態に関する遺伝子座が見つかった連鎖群 8 の遺伝子座 ga1277 と PS-4 の間の領域で検出された（図 4-8）。

#### < 分子マーカーを用いた多様性評価の有効性の検証のための集団解析 >

Kruskal-Wallis 検定の結果より、5%の有意水準において出芽日と花弁面積、開花初期花茎長がそれぞれ 19、64、25 の遺伝子座と連鎖していることが示された（表 4-13）。3 形質と連鎖していた 80 座のうち 33 座で野生 3 集団の遺伝子型を決定した。残りの 36 座ではうまく増幅しなかった。47 座のうち、出芽日では 13 座、花弁面積では 21 座、開花初期花茎長では 15 座を用いて算出した  $F_{ST}^L$  はそれぞれ 0.253、0.293、0.202 であった（表 4-14）。当初は  $F_{ST}^L$  が  $Q_{ST}$  と同程度の値を示すことが予想されたが、全ての形質でこのような関係が認められなかった。出芽日の  $F_{ST}^L$  は  $F_{ST}^N$  より大きく、 $Q_{ST}$  よりは大幅に低い値を示した。花弁面積の  $F_{ST}^L$  は 3 形質の中では一番低く、 $F_{ST}^N$  とほぼ同じ値を示していたが、 $Q_{ST}$  とは値が異なった。開花初期花茎長の  $Q_{ST}$  は 3 形質の中で最も低い値を示していたが、 $F_{ST}^L$  は 3 形質の中で最も高い値を示していた。

出芽日において  $F_{ST}^L$  の算出に用いた遺伝子座のうち、Kruskal-Wallis 検定においてより強く連鎖していると判断できる有意水準 1%以上で検出された 2 遺伝子座（08I22、

09J20) を対象に各座の対立遺伝子の効果を検証した。効果の検証する際に表記した遺伝子型は JoinMap ver.4.0 に基づいており、全ての遺伝子型タイプの一覧を表 4-15 に示した。

出芽日では遺伝子座 08I22 は母親が Null 対立遺伝子を持っているため 3 つの遺伝子型タイプに分類され、“ - ” は Null を示す (図 4-9)。その結果、e 対立遺伝子を持っていると出芽が早く、g 対立遺伝子を持っていると出芽が遅くなる傾向にあることがわかった。遺伝子座 09J20 をみると、2 遺伝子型間で出芽日に 2 日の違いが認められ、m 対立遺伝子を持っていると出芽が遅くなる傾向を示した。この 2 座について野生 3 集団の遺伝子型を見ると、分離家系で検出されなかった対立遺伝子が 1 つずつ検出され、u と表示した。遺伝子座 08I22 では出芽日が遅い長野 2 集団だけに特異的な遺伝子型 gu と eu が存在し、u 対立遺伝子を保有していた (表 4-16)。反対に ee または e と eg の遺伝子型は長野 2 集団には存在しなかった。北海道集団と出芽日の早い埼玉集団では対立遺伝子頻度に違いが認められなかったが、長野 2 集団は他の 2 集団に比べて、e 対立遺伝子頻度が低く、g 対立遺伝子頻度がやや高くなった。遺伝子座 09J20 においては、埼玉集団に lm の遺伝子型をもつジェネットがひとつ存在したが、どの集団も l と m の対立遺伝子頻度は同程度であった (表 4-16)。

連鎖群 8 で検出された花型に連鎖する遺伝子座の近傍にある 4 つの遺伝子座、ga0495、ga1277、PS-4、ga0821 について (図 4-8)、分離集団における各座の対立遺伝子と花型ごとにジェネット数を表 4-18 に示した。遺伝子座 ga0495、PS-4、ga0821 では、基本的には遺伝子型 ee または ef を持つ個体は長花柱花、遺伝子型 eg または fg を持つ個体は短花柱花であった。遺伝子座 ga1277 では、遺伝子型 ad や bd を持つ個体は長花柱花、遺伝子型 ac または bc を持つ個体は短花柱花であり、d 対立遺伝子を持つ個体は長花柱花であり、c 対立遺伝子を持つ個体は短花柱花であった。このことから、a と d 対立遺

伝子が長花柱花と短花柱花に特異的であることが示された。これら 4 座の対立遺伝子を用いて野生 3 集団の花型を識別した結果、68 ジェネットのうち 47 ジェネットの花型を識別することができた(表 4-18)。遺伝子座 PS-4 で遺伝子座 ff を示した北海道の 1 ジェネットのみ、短花柱花 (T) であり、予測される花型 (P) と異なった。野生 3 集団で検出された各座の対立遺伝子数のうち分離集団では検出されなかった対立遺伝子数は、遺伝子座 PS-4 の 2 対立遺伝子から遺伝子座 0832 の 16 対立遺伝子であった(表 4-18)。また遺伝子座 ga0495 と ga1277 では、花型の識別に有効であった遺伝子型が少なく、各座において分離集団では検出された g 対立遺伝子 c 対立遺伝子が野生集団ではそれぞれ検出されなかった。

## 考察

### <連鎖地図作成>

サクラソウの染色体数は  $2n=24$  であるため、連鎖群が 12 個となるはずであるが、今回作成された連鎖群は 14 個だった。ほぼ染色体数と同じ連鎖群に分類されたものの、連鎖群 8 でマーカー間距離が最大 51.1cM であるように、連鎖地図には多数のギャップが存在するため、本章で作成された連鎖地図はまだ精度が低い。しかし、サクラソウ属において初めて作成された連鎖地図である。また出芽日などの多くの形質に連鎖する遺伝子座や異型花柱性に関わる花型に特異的な対立遺伝子が検出されたことから、野生集団の多様性評価を行うのに有効な地図であると考えられる。しかしながら、より精度の高い連鎖地図を作成し、Interval-Mapping を行うためには、これらのギャップを埋め、マーカー区間がおおよそ 20cM 程度の等間隔になるような連鎖地図作成が望ましい。精密な連鎖地図の作成には、200 近い個体数を用いることが必要であることから(津村 2001)、本研究では個体数には問題がなく、マーカー数を増やす必要があると考えられ

る。さらにギャップを埋めていくためには、異なる種類のマーカーを用いることが有効であり（鵜飼 2000）、今後は SSR マーカーを増やすとともに AFLP（Amplified Fragment Length Polimorphism）マーカーなどの SSR マーカー以外のマーカーを用いていくことが必要である。

#### < 出芽日と異型花柱性の花型に関する QTL >

分離家系において、全ての形質で有意なジェネット間差が認められたことから、これらの形質は遺伝的な形質であることが明らかになり、今後 QTL 解析を行う上での、QTL の存在が示された。つくばにおける各形質の遺伝率は葉数の 0.28 から柱頭高の 0.97 と幅広い変異を示した（表 4-6）。広義の遺伝率は QTL の推定精度に大きな影響を与えるため（鵜飼 2000）、遺伝率の高い花器形態では高い精度で各形質を支配する QTL が検出されている可能性が、また特に遺伝率の低い葉数では、葉数を支配する QTL が全て検出されない可能性が考えられる。そのため葉数に連鎖する遺伝子座はつくばでは 6 遺伝子群で、八ヶ岳では 2 連鎖群で検出されているが、連鎖群 11 以外では全て 5%水準で検出された遺伝子座であるため、効果の大きな QTL は連鎖群 11 のみに存在することが推測される。またつくばと八ヶ岳の環境間では、つくばに比べて八ヶ岳での遺伝率が低下したのは、八ヶ岳の環境ではジェネット間変異が小さくなることを示唆している。

つくばと八ヶ岳の両環境で検出された出芽日に連鎖する遺伝子座は、連鎖群 3 と 5 と 8 と 12 に存在し、基本的には同じ遺伝子座またはその近傍の遺伝子座であった（表 4-12）。これは推定精度などの理由から両環境で検出された遺伝子座が全て一致していないが、ほぼ同じ領域から検出されていることから、両環境の出芽日においては同じ QTL が関与しているものと考えられる。特に連鎖群 3 ではつくばと八ヶ岳の両環境における出芽日と、出芽日の表現型可塑性に連鎖する遺伝子座が高い有意水準で多く検出されている

ことから、連鎖群 3 に出芽日に関する QTL が存在することが示唆された。また、つくばまたは八ヶ岳のどちらかの環境で遺伝子座が検出された連鎖群は、つくばで連鎖群 4 と 10、八ヶ岳では連鎖群 9 と 11 と 13 であった。特に効果の大きな遺伝子座が複数存在している連鎖群 4 と 10 と 11 が各環境における出芽日に関与した QTL が存在している可能性があり、各連鎖群に属する遺伝子座が両環境間の出芽日の大きな違いを引き起こしている可能性がある。本章で解析した出芽日の QTL については、今後どのような要因によって支配され、どのようなメカニズムが関わっているのかを把握していくことが重要である。

表現型可塑性に連鎖する遺伝子座が検出された 2 連鎖群はともにつくばか両環境で検出された遺伝子座と一致していたことから、両環境間の反応性を支配する遺伝子座が存在するのではなく、表現型可塑性は出芽日を支配する QTL によって説明されると考えられる。本章で検出された表現型可塑性に連鎖する遺伝子座のほとんどが連鎖群 3 に存在しており、効果の大きな遺伝子座が検出されなかった理由としては、親間での遺伝的な違いが小さかったとも考えられる。育種においては、品種のマクロ環境の変動に対する安定性が求められることから、イネやオオムギなどの様々な形質がこのような複数環境下で栽培することによって QTL × 環境相互作用 (QE 相互作用) を解析し、広域適応性が評価されてきた (鵜飼 2000)。サクラソウの出芽日においては、大きく環境が異なるつくばと八ヶ岳の両環境で検出された連鎖群 3 と 5 に属する遺伝子座は、安定性の高い QTL であると言える。一方、連鎖群 4 と 10 と 11 に属する遺伝子座はつくばや八ヶ岳のように、標高や気温の高低の環境で発現する特異的な遺伝子座であると考えられることから、多様性評価を行う際には、広い地域で安定して発現する QTL の近傍にある分子マーカーを用いて評価することが望ましい。

4 つの花器形態に関する遺伝子座は様々な連鎖群において検出されたが、全ての花器

形態に強く関係した遺伝子座は連鎖群 8 でのみで検出され(表 4-8)、同様に花型に関する遺伝子座も連鎖群 8 で検出されたことから(図 4-8)、連鎖群 8 に花型を決定する遺伝子座が存在すると考えられる。さらに長花柱花と短花柱花を合わせて算出した柱等高と葯高の遺伝率が 90% 以上の遺伝率であることから、これらの形質が強く遺伝的に制御されており、小数の寄与率の高い QTL が存在することが示唆された。異型花柱性に関する遺伝子座は一般的に *S*-locus またはスーパーゼーンと呼ばれ、複数の遺伝子が互いに近距離に遺伝子座を持っていると言われている(Dowrick 1956)。Dowrick (1956) は、*S*-locus は雌ずいの発達に関わる *G*、花粉サイズに関わる *P*、葯のポジションに関わる *A* の 3 つの遺伝子から成り立っていることを提唱した。本研究では、柱頭高が *G* 遺伝子を、葯高が *A* 遺伝子と関わっていると考えた。*S*-locus は量的形質の遺伝子座(QTL)であると仮定し、検出された花型の QTL は *S*-locus であると推定した。柱頭高と葯高を含む 4 つの花器形態に連鎖する遺伝子座と異型花柱性に関する花型に連鎖する遺伝子座が全て連鎖群 8 で検出されたことから連鎖群 8 に異型花柱性に関する QTL が存在することを証明したと言える。*S*-locus に直接関与していない花筒長と葯長が柱頭高や葯高に比べ遺伝率が低く、多くの連鎖群で検出されたことより、花筒長と葯長は寄与率の低い複数の QTL が関与しており、異型花柱性を支配する *S*-locus とは異なるものと考えられる。

< 形質を支配する遺伝子座に連鎖した分子マーカーを用いた多様性評価とその有効性 >

$F_{ST}^L$  を算出した結果、一番小さくなることを予測していた開花初期花茎長の  $F_{ST}^L$  は 0.293 と 3 形質の中で一番大きく、一番大きくなると予測していた出芽日では 0.253 と、花茎長の次に大きい値を示した(表 4-14)。本章では、どの形質でも予想していたような  $Q_{ST}$  と同程度の値を示す  $F_{ST}^L$  は算出されなかった。これらの結果が当初の予想と大きく異なった理由

としては、1) 今回用いた遺伝子座は Kruscal-Wallis 検定によって検出された遺伝子座であることから、遺伝効果や寄与率を把握できていないため、各形質の QTL と強く連鎖した遺伝子座を網羅していなかったこと、2) 連鎖や多面発現などが生じるため、他の形質と相関の強い遺伝子座で評価してしまっていることが挙げられる。

出芽日の  $F_{ST}^L$  は、開花初期花茎長の  $F_{ST}^L$  や出芽日の  $Q_{ST}$  よりも小さかった。出芽日の  $F_{ST}^L$  の算出に用いた遺伝子座は集団間分化程度の小さい形質と相関が高いものも含まれていたが、開花初期花茎長や花弁面積に比べて検出された遺伝子座が少なく、実際に出芽日に強く連鎖した遺伝子座を検出できていない可能性がある。

QTL 解析で検出された遺伝子座は、多面発現や強連鎖があるため、QTL の関係を考慮した上で寄与率の大きな QTL の近傍にあるマーカーを用いた評価が望ましい。Kruscal-Wallis 検定を用いた場合は、さらに遺伝効果や寄与率も把握することができないため、高い有意水準で検出されたマーカーを用いた場合でも、強い表現型相関がある場合には同じ遺伝子座が検出されてしまう場合もあることから、特に他の形質との関係を考慮した上で評価に用いる遺伝子座を選択する必要がある。

以上の結果より、出芽日や花弁面積や開花初期花茎長に連鎖する遺伝子座を用いて推定された集団間分化程度 ( $F_{ST}^L$ ) は各形質の集団間分化程度 ( $Q_{ST}$ ) を反映しておらず、連鎖した遺伝子座での集団間分化を評価することはできなかった。今回用いた Kruscal-Wallis 検定では評価に用いた遺伝子座が実際の寄与率が把握できないというデメリットが挙げられるため、正確に多様性評価を行うためには、Interval-Mapping 法などによりそれぞれの遺伝子座の寄与率を推定し、寄与率や他の形質との連鎖関係を考慮して選んだ遺伝子座を用いて行う必要がある。

しかし Kruscal-Wallis 検定では寄与率がわからないが、高い有意水準で検出された遺伝子座は寄与率が高いことが推定されるため、効果の大きいと予測される遺伝子座におけるそ



それぞれの対立遺伝子の効果を見ることは、形質の多様性評価を行う上では重要である。そこで出芽日について、有意水準 1%以上で検出された 2 つの EST マーカー (08I22 と 09J20) を用いて野生集団の遺伝的多様性解析を行った結果、遺伝子座 08I22 は分離家系において、e 対立遺伝子を持つと出芽が早くなり、g 対立遺伝子を持つと出芽が遅くなる傾向にあることが明らかになった(図 4-9)。e と g 対立遺伝子について野生集団の多様性を評価すると、出芽が遅い長野 2 集団には他の 2 集団にはない gu と eu の 2 つの遺伝子型をもっており、特に gu 遺伝子型のジェネットが多数存在した(表 4-16)。一方、埼玉や北海道集団に多数ある eg や ee または e-の遺伝子型を示すジェネットが長野 2 集団には存在していなかった。3 集団を対立遺伝子頻度でみると、出芽を早くする e 対立遺伝子頻度においては、長野 2 集団が北海道と埼玉集団に比べて顕著に低く、g 対立遺伝子頻度と u 対立遺伝子頻度においては北海道と埼玉集団が長野 2 集団より高かった(表 4-16)。この座においては対立遺伝子頻度が集団間で異なり、長野 2 集団と北海道・埼玉集団を明確に評価することができたが、3 年間通じて北海道と長野 2 集団よりも常に発芽が早い埼玉集団を評価することができず、この座を用いた多様性評価は不十分であると言える。一方、遺伝子座 09J20 において分離家系では m 対立遺伝子を持つと発芽日が早くなる傾向にあり(図 4-9)。実際の野生 3 集団においては効果のわからない対立遺伝子 u を含む lu、ll、lm の 3 つの遺伝子型が検出された(表 4-16)。遺伝子型 ll に比べ分離家系において発芽が早くなる効果を持っている遺伝子型 lm が、埼玉集団の 1 ジェネットしか存在しておらず、野生 3 集団では m 対立遺伝子を用いた多様性評価は行えなかったため、l 対立遺伝子を用いて野生集団を評価したところ、どの集団でも遺伝子型 ll を示すジェネットが多く存在していた。そのため、l 対立遺伝子頻度を見ても集団間で違いが認められず、発芽日との関係が認められなかった。以上のことから、1%水準で検出された遺伝子座 09J20 と 0.5%で検出された遺伝子座 08I22 では発芽日の集団間の違いを説明することができなかった。理由としてはこれらの遺伝子座と発芽日の QTL とが

強く連鎖しておらず、これらの間に組換えが生じたこと、あるいは寄与率が低かったことが考えられる。

花型の QTL の近傍に存在した 4 遺伝子座のうち、遺伝子座 ga0495、PS-4、ga0821 では、遺伝子型 ee または ef を持つと長花柱花を示すこと、また g 対立遺伝子を持つ個体ののが短花柱花であったことから、e または f 対立遺伝子が劣性対立遺伝子であり、g 対立遺伝子が優性対立遺伝子であることが示された (表 4-17)。しかし、これらの座については各遺伝子型から推測される花型と異なる花型を示した個体が 1~2 ジェネット存在したことから、花型を支配する遺伝子座との間で組換えが生じた可能性が考えられる。一方、長花柱花と短花柱花にそれぞれ特異的な対立遺伝子が検出された遺伝子座 ga1277 は、花型に連鎖する遺伝子座とは 0.29cM しか離れておらず、遺伝子座 ga0495 と 0.71cM、遺伝子座 PS-4 とは 0.48cM の距離であった (図 4-8)。しかしこれらの遺伝子座のマーカー間距離が小さいにもかかわらず、遺伝子座 ga0495 と PS-4 では組換えが生じていたため、遺伝子座 ga1277 のごく近傍に S-locus が存在している可能性が示唆された。Manfield *et al.* (2005) や Li *et al.* (2007) が検出した各花型に特異的な対立遺伝子が連鎖群 8 のこれらの遺伝子座付近に座上すれば、花型に連鎖する遺伝子座が S-locus である可能性は高まる。

しかし遺伝子座 ga1277 が S-locus の近傍に存在していると推定されるが、遺伝子座 ga1277 が非常に多くの対立遺伝子が検出された多型性の高いマーカーであるため、実際に野生集団では分離家系では検出されなかった効果が不明な 7 対立遺伝子が検出された (表 4-18)。さらに野生 3 集団では優性対立遺伝子である c 対立遺伝子が検出されなかったことから、遺伝子座 ga1277 だけで花型を識別できたジェネットは 76 ジェネット中 1 ジェネットだけであり、この座の abcd 対立遺伝子で花型を識別するのは難しく、実際の集団では応用しにくいことが示された。そのため、組換えが生じる可能性があるものの、近傍の 3 遺伝子座を合わせて花型の識別を行ったところ、68 ジェネット中 47

ジェネットの花型を識別することができ(表 4-18)、遺伝子座 ga1277 による識別に比べて、大幅に花型を識別できるジェネットが増えた。組換えが生じたことにより、予想される花型と実際の花型が異なった個体が 1 ジェネット存在したが、組換えが生じる個体は低頻度であるため、これら 4 座の遺伝子型による花型の識別は実際の自生地における評価に有効であると考えられる。本章での野生集団の花型識別には、4 座のうち遺伝子座 ga1277 と ga0495 においては、既知の効果を示す対立遺伝子がほとんど検出されず、識別に有効な遺伝子型が顕著に少なく、識別には遺伝子座 PS-4 と ga0821 の遺伝子型が有効であった(表 4-18)。今後は、ga1277 の遺伝子座の近傍に存在することが推定される S-locus の領域を同定し、実際の遺伝子の発現領域での長花柱花と短花柱花の多型を用いてジェネット間の花型の識別が行えるようにしたい。

以上のことから、本章では 2 遺伝子座の対立遺伝子を用いて出芽日の多様性を明確に評価ができなかったが、4 遺伝子座を用いた花型の識別は野生個体で可能であることが示された。出芽日においては、用いた 2 遺伝子座で集団間の違いを説明できなかったことから、出芽日の QTL に強く連鎖する遺伝子座が検出できなかった可能性がある。今後はマーカー数を増やし、連鎖地図を充実させることにより、強く連鎖する遺伝子座を検出する必要がある。花型においては、野生個体の約 7 割の花型を識別できたものの、識別に有効だったのは 257 遺伝子型中 70 遺伝子型であった。本研究で行った QTL に基づく多様性評価は、分離家系で検出された効果がわかる対立遺伝子だけを対象としているため、多くの多型が得られる SSR マーカーでは野生集団内に効果がわからない対立遺伝子数を多く検出してしまふ。SSR マーカーを用いる限りは、このような効果が未知な対立遺伝子が多様性評価の精度を下げてしまうため、今後は各遺伝子座における効果が未知な対立遺伝子と表現型を照らし合わせながら、表現型から対立遺伝子の効果を推定していくことが必要になる。SSR マーカーを用いて大まかであるがゲノム全体を評価できた後は、形質の発現に関与してい

ると推測され、実際の発現領域を評価できる EST マーカーを用いることが望ましい。

表 4-1. 連鎖解析に用いたSSRマーカーとEST-SSRプライマー一覧

種類	Primer name	アニーリング温度		断片長 (bp)	Reference
		PCR	Multiplex PCR		
SSR	1ca360		60	267-269	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca375		60	133-139	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca378	60		252-256	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca561		60	278-284	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca640	50		305-311	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca642		60	146-152	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	1ca733	60		220-236	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	2ca135		60	275-277	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	2ca174	60		222-262	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	2ca287	55		92-108	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga002	60		209-211	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga009	55	60	173-192	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga027	60	60	205-214	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga039	60		149-167	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga044	60		177-181	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga081		60	236-246	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga086	60		229-258	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	5ga101		60	283-287	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	em1atg248	60		264-273	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	em1ga0041	58		138-154	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	em1ga0090		60	288-299	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	em2ca038		60	350-363	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0007	60		393-409	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0017		60	195-200	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0024		60	372-422	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0032	55		354-371	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0047	55		378-388	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0049	55		342-360	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0054		60	407-420	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0056		60	221-225	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0059	55		153-160	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0063	55		166-172	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0074	55		92-108	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0084	55		309-341	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0098	60		350-393	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0108		60	195-197	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0115		60	259-263	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0139		60	80-95	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0161		60	111-120	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0166		60	249-265	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0173		60	320-338	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0206	68		248-252	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)

表 4-1. 連鎖解析に用いたSSRマーカーとEST-SSRプライマー一覧(続き)

種類	Primer name	アニーリング温度		断片長 (bp)	Reference
		PCR	Multiplex PCR		
SSR	ga0208	58		365-373	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0212	56		343-355	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0218	68		96-98	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0235	60		333-341	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0242	60		229-231	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0250		60	272-276	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0267	60		294-310	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0326	55		109-133	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0330		60	239-245	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0340		60	175-181	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0343		60	318-323	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0344	60		119-124	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0349		60	287-331	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0358	65		99-105	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0363	60		168-174	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0381		60	112-126	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0382	55		133-150	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0409		60	193-197	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0428		60	132-156	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0429	63		174-195	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0454		60	326-329	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0472		60	342-372	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0495		60	229-242	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0577		60	97-101	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0580		60	213-217	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0599		60	191-205	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0624	55		259-277	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0625	55		125-159	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0626		60	188-194	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0653		60	266-270	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0666		60	273-296	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga0668		60	112-121	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga0691	55		201-220	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0701	55		309-317	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0719	50		374-388	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0727		60	110	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0757	60		168-188	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0821		60	108-119	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0832		60	181-198	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0884		60	74-79	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0889		60	223-263	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0908	55		202-213	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)

表 4-1. 連鎖解析に用いたSSRマーカーとEST-SSRプライマー一覧(続き)

種類	Primer name	アニーリング温度		断片長 (bp)	Reference
		PCR	Multiplex PCR		
SSR	ga0937		60	266-330	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0948	60		372-391	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga0961	55		134-144	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1000		60	332-338	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga1040	55		132-185	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1041		60	412-421	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1045		60	238-248	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1074		60	399-421	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1116		60	129-143	Ueno <i>et al.</i> (2005)
SSR	ga1136		60	133-143	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1140		60	410-416	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1155	55		237-243	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1160		60	325-327	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1183		60	224-232	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1201	55		144-163	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1239		60	197-211	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1251		60	219-242	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1277		60	249-276	Ueno <i>et al.</i> (2003)
SSR	ga1312		60	307-321	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1349	50		119-133	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1373		60	161-217	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1388		60	193-210	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1459	55		302-310	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1542		60	258-274	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1662	55		96-102	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga1677	55		231-238	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga2029		60	247-262	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga2066		60	286-298	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga2079		60	164-170	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	ga2143	55		274-298	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
SSR	Pri0126	50		252-280	Kitamoto <i>et al.</i> (2005)
SSR	PS-2		60	203-223	Isagi <i>et al.</i> (2001)
SSR	PS-3		60	224-232	Isagi <i>et al.</i> (2001)
SSR	PS-4	55		201-207	Isagi <i>et al.</i> (2001)
SSR	PS-5	50		99-113	Isagi <i>et al.</i> (2001)
EST-SSR	01A16		60	129-131	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	04B22		60	88-94	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	06C01		60	213-223	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	06C07		60	432-436	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	06H20		60	258-260	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	07M06		60	157-159	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)

表 4-1. 連鎖解析に用いたSSRマーカーとEST-SSRプライマー一覧(続き)

種類	Primer name	アニーリング温度		断片長 (bp)	Reference
		PCR	Multiplex PCR		
EST-SSR	07N19		60	153-159	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	08B11		60	114-124	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	08I22		60	195-198	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	08N10		60	205-207	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	09J20		60	178-181	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	10J09		60	181-187	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)
EST-SSR	MT3_59_C08		60	93-104	Ueno <i>et al.</i> (unpublished)



表 4-2. 連鎖解析に用いたESTとSNPsプライマー一覧

EST Primer name	アニーリング温度	SNP Primer name	アニーリング温度
E06O07F	60	06O07F	60
E09G10F	60	09G10F	60
E01B15R	60	01B15R	60
E01I04	60	01I04	60
E02B22	60	02B22	60
E02C02	60	02C02	60
E02G06	60	02G06	60
E02H20	60	02H20	60
E02J18	60	02J18	60
E03A23	60	03A23	60
E03F03	60	03F03	60
E03K07	60	03K07	60
E03M16	60	03M16	60
E04B19	60	04B19	60
E04I03	60	04I03	60
E04N12	60	04N12	60
E05B16R	60	05B16R	60
E06M08	60	06M08	60
E07B22	60	07B22	60
E07H18	60	07H18	60
E07K20	60	07K20	60
E07M19	60	07M19	60
E06C07	60	06C07	60
E07J19R	60	07J19R	60
E08A23	60	08A23	60
E08J23F	60	08J23F	60
E06I23	60	06I23	60
E08F22R	60	08F22R	60
E08G19F	60	08G19F	60
E05L11R	60	05L11R	60
E05C15R	60	05C15R	60
E04C14	60	04C14	60
E01K15F	60	01K15F	60
E03B18F	60	03B18F	60
E05P11	60	05P11	60
E06B11R	60	06B11R	60
E02B17	60	02B17	60
E05O19	60	05O19	60
E06I08R	60	06I08R	60
E07G17R	60	07G17R	60

未発表のため、プライマー名とアニーリング温度のみ示す。

表 4-3. PCRとMultiplexPCRの反応液組成

**PCR**

成分	分量 (μl)	濃度
テンプレートDNA	1	約2ng/μl
2μMプライマー (Forward)	1	0.2μM
2μMプライマー (Reverse)	1	0.2μM
5×バッファー	2	
Taqポリメラーゼ <sup>1</sup> (2.5U/μl)	0.1	0.025U/μl
滅菌水	4.9	
<b>総量</b>	<b>10</b>	

<sup>1</sup> Brend Taq Polymerase (TOYOBO)

**Multiplex PCR<sup>1</sup>**

成分	分量 (μl)	濃度
テンプレートDNA	1	約4ng/μl
10μMプライマー (Forward)	0.3	0.1μM
10μMプライマー (Reverse)	0.3	0.1μM
QIAGEN Multiplex PCR Kit	1.6	
滅菌水	1.8	
<b>総量</b>	<b>5</b>	

<sup>1</sup> 6プライマーを混合させた場合の組成を示す。

表 4-4. PCR産物の精製のための反応液組成

**dNTPと残留プライマーを除去するための精製**

成分	分量 (μl)	濃度
PCR産物 <sup>1</sup>	12	
Exo-Sap(1U/μl) <sup>2</sup>	0.1	0.1U/μl
滅菌水	3.9	
総量	16	

<sup>1</sup> 6プライマー分の分量を示す。

<sup>2</sup> Exo-SAP-IT (GEヘルスケアバイオサイエンス)

**ddNTPを除去するための精製**

成分	分量 (μl)	濃度
PCR産物	5	
Exo-Sap(1U/μl)	0.1	0.1U/μl
滅菌水	0.9	
総量	6	

表4-5. つくば・八ヶ岳における測定形質の平均値と分散

栽培環境	出芽日 <sup>1</sup>		開花まで日数 <sup>1</sup>		開花初期花茎長		開花終期花茎長		小花数		葉数							
	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.						
つくば	13.85	a	21.32	35.68	a	11.90	13.10	a	4.16	17.03	a	3.98	9.24	a	3.20	5.40	a	1.40
八ヶ岳	49.23	b	80.50	70.12	b	8.20	8.85	b	5.07	11.62	b	8.83	5.90	b	5.57	6.35	b	2.64

栽培環境	PC1		PC2		PC3		花卉面積(cm <sup>2</sup> )		花筒長(cm)		柱頭高(cm)		葯高(cm)		葯長(cm)	
	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.	Ave.	Var.
つくば	0.00164	0.00372	-0.00042	0.00022	0.00014	0.00017	6.87	0.89	1.418	0.008	1.035	0.048	1.157	0.034	0.167	0.000
長花柱花									1.393	0.006	1.233	0.004	0.992	0.004	0.162	0.000
短花柱花									1.444	0.007	0.819	0.007	1.332	0.007	0.172	0.000

異なる文字間はTukey-Kramerの多重比較より5%水準で有意差あり。

<sup>1</sup> 出芽日と開花まで日数は3月14日を基準日とした。

つくば	花卉形態				長花柱花				短花柱花												
	出芽日	開花 開始日	開花 終期	小花数	葉数	PC1	PC2	PC3	花卉 面積	花筒長	柱頭高	葯高	葯長	花筒長	柱頭高	葯高	葯長				
Genet	64.4	58.9	52.1	53.1	28.0	62.3	40.1	53.4	74.1	75.5	96.6	93.1	57.3	72.70	71.00	68.80	48.50	76.40	88.90	77.00	56.60
Ramet (error)	35.6	41.1	47.9	46.9	47.1	72.0	37.7	59.9	25.9	24.5	3.4	6.9	42.7	27.30	29.00	31.20	51.50	23.60	11.10	23.00	43.40
$h^2$	0.64	0.59	0.52	0.53	0.28	0.62	0.40	0.53	0.74	0.76	0.97	0.93	0.57	0.73	0.71	0.69	0.49	0.76	0.89	0.77	0.57

### 八ヶ岳

分散成分	出芽日	開花 開始日	開花 終期	小花数	葉数	
	Genet	45.9	49.2	50.0	44.0	44.6
Ramet (error)	54.1	50.8	50.0	56.0	55.4	72.5
$h^2$	0.46	0.49	0.50	0.44	0.45	0.28

表 4-7. 環境とジェネットを要因とした Two-way ANOVA の結果

要因	出芽日			開花まで日数			開花初期花茎長		
	df	MS	<i>F</i>	df	MS	<i>F</i>	df	MS	<i>F</i>
環境	1	255475.6	8784.5 **	1	143215.8	23690.1 **	1	2092.5	804.4 **
Genet	172	129.4	4.4 **	127	28.7	4.7 **	125	15.1	5.8 **
環境 × Genet	172	121.8	4.2 **	127	11.6	1.9 **	125	4.9	1.9 **

要因	開花終期花茎長			小花数			葉数		
	df	MS	<i>F</i>	df	MS	<i>F</i>	df	MS	<i>F</i>
環境	1	3557.4	992.9 **	1	1374.4	571.6 **	1	157.8	65.6 **
Genet	129	19.1	5.3 **	129	12.0	5.0 **	166	6.3	2.6 **
環境 × Genet	127	7.2	2.0 **	129	3.6	1.5 **	166	3.8	1.6 **

\*\*  $P < 0.01$

表4-8. つくばの環境において検出された全形質における遺伝子座一覧

連鎖群	位置	遺伝子座	出芽日	開花 開花 で日数	開花 初期 花茎長	開花 終期 花茎長	小花数	葉数	つくば							
									PC1	PC2	PC3	花卉 面積	花筒長	柱頭高	葯高	葯長
1	0	ga0472-2			****	****	****					**	**	**	**	**
1	0.364	ga0599-2			**	**	****					**	**	**	**	**
1	8.971	01104														
1	27.488	ga0063			****	****	****					**	**	**	**	**
1	34.599	ga1373-2			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	36.033	ga2143			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	37.096	03B18			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	37.785	5ga044			****	****	****			**		**	**	**	**	**
1	38.328	02H20			****	****	****			**		**	**	**	**	**
1	38.395	ga2029			****	****	****			**		**	**	**	**	**
1	38.685	ga0429			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	38.825	MT3_59_C08			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	38.891	ga2066			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	38.951	5ga101			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	39.067	ga0626			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	39.767	em1ga0090			**	**	**			**		**	**	**	**	**
1	41.608	2ca174			****	****	**			**		**	**	**	**	**
1	42.949	5ga027			**	**	**			**		**	**	**	**	**
1	56.935	5ga009			**	**	**			**		**	**	**	**	**
2	0	ga0267						**								
2	6.004	ga1677														





表4-8. つくばの環境において検出された全形質における遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	つくば				花筒長	柱頭高	葯高	葯長
			開花 初期 花茎長	開花 末期 花茎長	開花 日数	出芽日				
5	0	Ica378	**	**	****	****	****	****	****	
5	0.860	ga0326	**	**	****	****	****	****	****	
5	22.350	07G17	**	**	****	****	****	****	****	
5	33.332	08J23	**	**	****	****	****	****	****	
5	33.410	ga0206	**	**	****	****	****	****	****	
5	33.609	Ica375	**	**	****	****	****	****	****	
5	35.073	ga0108	**	**	****	****	****	****	****	
6	0	07M19	**	**	****	****	****	****	****	
6	13.521	ga0032	****	**	****	****	****	****	****	
6	41.271	09G10F	**	**	****	****	****	****	****	
6	52.480	ga0666	**	**	****	****	****	****	****	
6	53.021	ga0330	**	**	****	****	****	****	****	
6	53.332	ga0937	**	**	****	****	****	****	****	
7	0	ga0059	**	**	****	****	****	****	****	
7	1.856	ga1388	**	**	****	****	****	****	****	
7	1.976	ga409	**	**	****	****	****	****	****	
7	2.422	ga0577-1	**	**	****	****	****	****	****	
7	4.136	08F22	**	**	****	****	****	****	****	
7	4.547	05O19	**	**	****	****	****	****	****	
7	4.901	07H18	**	**	****	****	****	****	****	
7	6.426	ga0017	**	**	****	****	****	****	****	
7	30.702	02B17	**	**	****	****	****	****	****	
7	32.175	04B19	**	**	****	****	****	****	****	
7	82.148	ga1160	**	**	****	****	****	****	****	
7	87.817	ga0381	**	**	****	****	****	****	****	
8	0	ga1140	**	**	****	****	****	****	****	
8	1.647	ga0495	**	**	****	****	****	****	****	
8	2.276	ga1277	**	**	****	****	****	****	****	
8	3.028	PS-4	**	**	****	****	****	****	****	
8	3.029	ga0821	**	**	****	****	****	****	****	
8	4.552	em2ca038	**	**	****	****	****	****	****	
8	6.500	ga1000	**	**	****	****	****	****	****	
8	57.564	ga0208	**	**	****	****	****	****	****	

表4-8. つくばの環境において検出された全形質における遺伝子座一覧(続き)

連鎖群	位置	遺伝子座	出芽日	開花		開花 初期 花茎長	開花 終期 花茎長	小花数	葉数	つくば			花弁 面積	花筒長	柱頭高	葯高	葯長
				開花 まで 日数	初期 花茎長					PC1	PC2	PC3					
9	0	2ca135				**	**			**	**	**	*****	*****	*****	**	
9	2.034	ga1373-1				**	**			*****	*****	*****	*****	*****	*****	**	
9	2.388	07B22				**	**			**	**	**	*****	*****	*****	*****	
9	3.540	01A16				**	**			**	**	**	*****	*****	*****	*****	
9	3.699	1ca640		**	**	**	**			*****	*****	*****	*****	*****	*****	**	
9	3.813	em1ga0041				**	**			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
9	3.837	ga0047				**	**			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
9	3.877	ga0250				**	**			**	**	**	*****	*****	*****	*****	
9	4.037	ga0349				**	**			**	**	**	*****	*****	*****	*****	
9	6.768	ga0166				**	**			*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	0	07J19R		**	**	**	**			**	**	**	*****	*****	*****	*****	
10	30.417	ga0889	**	*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	32.038	ga0428	**	*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	32.200	ga0049		*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	32.344	09J20	***	*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	32.580	ga0212		*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	33.817	10J09		*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	34.426	ga0084		*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
10	44.743	06O07F	*****	*****	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	0	03K07		**	**	**	**	**	**	**	**	**	*****	*****	*****	*****	
11	8.432	ga1312		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.441	ga0173		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.441	ga0007		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.442	ga0363		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.449	ga0235		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.488	ga0948		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.489	5ga002		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	8.684	ga1239		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
11	14.510	ga0624		**	*****	**	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

表4-8. つくばの環境において検出された全形質における遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	出芽日	開花まで日数	開花		葉数	つくば				花筒長	柱頭高	葯高	葯長	
					初期花茎長	終期花茎長		PC1	PC2	PC3	花卉面積					
12	0	<i>ga0625</i>						****				****				
12	12.220	<i>ga0024</i>						****				****				
12	17.497	<i>06C07-E</i>						**				****				
12	17.617	<i>06C07-S</i>					**	****				****				
12	17.904	<i>01B15</i>						****				****				
12	20.124	<i>5ga039</i>	**					****				****				
12	20.249	<i>ga1041</i>						****				****				
12	20.421	<i>02C02</i>	**					****				****				
12	24.348	<i>ga0161</i>						**				****				
12	54.717	<i>02J18</i>						****				****				
13	0	<i>ga1155</i>						**				****				
13	24.480	<i>5ga086</i>						**	**			****				
13	27.259	<i>ga0832</i>						**				****				
13	42.225	<i>ga0098</i>						****		**		****				
13	56.674	<i>06I08</i>						****				****				
14	0	<i>01K15</i>														
14	3.316	<i>em1atg248</i>														

\*\*\*\*\* 0.01%  
 \*\*\*\*\* 0.05%  
 \*\*\*\*\* 0.1%  
 \*\*\*\*\* 0.5%  
 \*\*\* 1%  
 \*\* 5%

表4-9. 八ヶ岳の環境において検出された全形質における遺伝子座一覧

連鎖群	位置	遺伝子座	八ヶ岳					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
1	0	<i>ga0472-2</i>					**	
1	0.364	<i>ga0599-2</i>						
1	8.971	<i>01104</i>						
1	27.488	<i>ga0063</i>						
1	34.599	<i>ga1373-2</i>						
1	36.033	<i>ga2143</i>					**	
1	37.096	<i>03B18</i>						
1	37.785	<i>5ga044</i>						
1	38.328	<i>02H20</i>					**	
1	38.395	<i>ga2029</i>					***	
1	38.685	<i>ga0429</i>						
1	38.825	<i>MT3_59_C08</i>						
1	38.891	<i>ga2066</i>						
1	38.951	<i>5ga101</i>						
1	39.067	<i>ga0626</i>						
1	39.767	<i>em1ga0090</i>						
1	41.608	<i>2ca174</i>						
1	42.949	<i>5ga027</i>						
1	56.935	<i>5ga009</i>					**	
2	0	<i>ga0267</i>						
2	6.004	<i>ga1677</i>						
3	0	<i>ga1251-1</i>						
3	0.393	<i>ga1251-2</i>						
3	17.868	<i>08B11</i>						
3	20.422	<i>ga0727</i>						
3	24.783	<i>ga1045</i>						
3	24.793	<i>5ga081</i>						
3	33.880	<i>02B22</i>	**					
3	38.475	<i>ga0115</i>	**			**		
3	38.503	<i>ga0719</i>						
3	38.652	<i>ga0218</i>	****					
3	38.661	<i>ga0884</i>	***					
3	38.684	<i>03A23</i>						
3	38.684	<i>ga0056</i>						
3	38.718	<i>ga0054</i>	**			**		
3	39.063	<i>PS-3</i>	**					
3	40.729	<i>1ca561</i>	***			**		
3	47.461	<i>ga0343</i>	****		**	**	***	
3	53.991	<i>ga1116</i>	**		**			
3	76.997	<i>06I23</i>						
4	0	<i>08I22</i>			**	*****	**	
4	11.958	<i>05C15</i>						
4	40.086	<i>ga0340</i>			***	*****		
4	40.939	<i>1ca642</i>			***	*****		
4	43.137	<i>ga0757</i>			**			
4	69.913	<i>ga0908</i>		**				
4	83.567	<i>ga0691</i>						
4	108.406	<i>ga1136</i>						
4	108.409	<i>04B22</i>						

表4-9. 八ヶ岳の環境において検出された全形質における遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	八ヶ岳					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
5	0	<i>1ca378</i>	**		**			
5	0.860	<i>ga0326</i>	**		**	**		
5	22.350	<i>07G17</i>						
5	33.332	<i>08J23</i>	***		****			
5	33.410	<i>ga0206</i>	**		**			
5	33.609	<i>1ca375</i>	**		**			
5	35.073	<i>ga0108</i>	**		**			
6	0	<i>07M19</i>						
6	13.521	<i>ga0032</i>			**			
6	41.271	<i>09G10F</i>		**		**		
6	52.480	<i>ga0666</i>			**	**	**	
6	53.021	<i>ga0330</i>			**			
6	53.332	<i>ga0937</i>			**			
7	0	<i>ga0059</i>		***				
7	1.856	<i>ga1388</i>		**				
7	1.976	<i>ga409</i>		**	**	**		
7	2.422	<i>ga0577-1</i>			**			
7	4.136	<i>08F22</i>		***				
7	4.547	<i>05O19</i>			**			
7	4.901	<i>07H18</i>						
7	6.426	<i>ga0017</i>		**	*****			
7	30.702	<i>02B17</i>						
7	32.175	<i>04B19</i>						
7	82.148	<i>ga1160</i>						
7	87.817	<i>ga0381</i>						
8	0	<i>ga1140</i>						
8	1.647	<i>ga0495</i>						
8	2.276	<i>ga1277</i>						
8	3.028	<i>PS-4</i>						
8	3.029	<i>ga0821</i>						
8	4.552	<i>em2ca038</i>						
8	6.500	<i>ga1000</i>						
8	57.564	<i>ga0208</i>	**					
9	0	<i>2ca135</i>						
9	2.034	<i>ga1373-1</i>						
9	2.388	<i>07B22</i>						
9	3.540	<i>01A16</i>						
9	3.699	<i>1ca640</i>						
9	3.813	<i>em1ga0041</i>						**
9	3.837	<i>ga0047</i>	**					**
9	3.877	<i>ga0250</i>						
9	4.037	<i>ga0349</i>						
9	6.768	<i>ga0166</i>						

表4-9. 八ヶ岳の環境において検出された全形質における遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	八ヶ岳					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
10	0	07J19R						
10	30.417	ga0889		****	**			
10	32.038	ga0428		*****	**			
10	32.200	ga0049		*****	**			
10	32.344	09J20						
10	32.580	ga0212		*****	**			
10	33.817	10J09		*****	***			
10	34.426	ga0084		*****	****			
10	44.743	06O07F						
11	0	03K07						*****
11	8.432	ga1312	**					*****
11	8.441	ga0173	**					*****
11	8.441	ga0007						****
11	8.442	ga0363						*****
11	8.449	ga0235						**
11	8.488	ga0948	***					*****
11	8.489	5ga002	***					*****
11	8.684	ga1239	**					*****
11	14.510	ga0624						***
12	0	ga0625						
12	12.220	ga0024	**					
12	17.497	06C07-E					**	
12	17.617	06C07-S	****					
12	17.904	01B15	****					
12	20.124	5ga039	**					
12	20.249	ga1041	**					
12	20.421	02C02	**					
12	24.348	ga0161						
12	54.717	02J18						
13	0	ga1155	**					
13	24.480	5ga086						
13	27.259	ga0832						
13	42.225	ga0098					***	
13	56.674	06I08						
14	0	01K15						
14	3.316	em1atg248						

*****	0.01%
*****	0.05%
*****	0.1%
****	0.5%
***	1%
**	5%

表4-10. 各形質の表現型可塑性に関する遺伝子座一覧

連鎖群	位置	遺伝子座	表現型可塑性					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
1	0	<i>ga0472-2</i>						
1	0.364	<i>ga0599-2</i>						**
1	8.971	<i>01I04</i>						****
1	27.488	<i>ga0063</i>						
1	34.599	<i>ga1373-2</i>		**				**
1	36.033	<i>ga2143</i>						
1	37.096	<i>03B18</i>						**
1	37.785	<i>5ga044</i>						
1	38.328	<i>02H20</i>						**
1	38.395	<i>ga2029</i>						**
1	38.685	<i>ga0429</i>						
1	38.825	<i>MT3_59_C08</i>						
1	38.891	<i>ga2066</i>						
1	38.951	<i>5ga101</i>						
1	39.067	<i>ga0626</i>						**
1	39.767	<i>em1ga0090</i>						**
1	41.608	<i>2ca174</i>						
1	42.949	<i>5ga027</i>						
1	56.935	<i>5ga009</i>						
2	0	<i>ga0267</i>						
2	6.004	<i>ga1677</i>						
3	0	<i>ga1251-1</i>						
3	0.393	<i>ga1251-2</i>						
3	17.868	<i>08B11</i>						
3	20.422	<i>ga0727</i>						
3	24.783	<i>ga1045</i>						
3	24.793	<i>5ga081</i>	**					
3	33.880	<i>02B22</i>	**					
3	38.475	<i>ga0115</i>	**			**		
3	38.503	<i>ga0719</i>	**					
3	38.652	<i>ga0218</i>	****	**				
3	38.661	<i>ga0884</i>	****	**				
3	38.684	<i>03A23</i>						***
3	38.684	<i>ga0056</i>						***
3	38.718	<i>ga0054</i>	**			**		**
3	39.063	<i>PS-3</i>	****	**				
3	40.729	<i>1ca561</i>	****			**		
3	47.461	<i>ga0343</i>	*****	**	**		****	
3	53.991	<i>ga1116</i>	****	**				
3	76.997	<i>06I23</i>						
4	0	<i>08I22</i>		**		**		
4	11.958	<i>05C15</i>		**				
4	40.086	<i>ga0340</i>		**		**		
4	40.939	<i>1ca642</i>	**	**		**		
4	43.137	<i>ga0757</i>		**			**	
4	69.913	<i>ga0908</i>						
4	83.567	<i>ga0691</i>						
4	108.406	<i>ga1136</i>						
4	108.409	<i>04B22</i>						

表4-10. 各形質の表現型可塑性に関する遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	表現型可塑性					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
5	0	<i>lca378</i>				***		
5	0.860	<i>ga0326</i>				***		
5	22.350	<i>07G17</i>						
5	33.332	<i>08J23</i>			**	****	**	
5	33.410	<i>ga0206</i>				**		
5	33.609	<i>lca375</i>				**		
5	35.073	<i>ga0108</i>				**		
6	0	<i>07M19</i>						
6	13.521	<i>ga0032</i>						
6	41.271	<i>09G10F</i>						
6	52.480	<i>ga0666</i>						
6	53.021	<i>ga0330</i>						
6	53.332	<i>ga0937</i>						
7	0	<i>ga0059</i>						
7	1.856	<i>ga1388</i>					**	
7	1.976	<i>ga409</i>						
7	2.422	<i>ga0577-1</i>			**		**	
7	4.136	<i>08F22</i>						
7	4.547	<i>05O19</i>			**		**	
7	4.901	<i>07H18</i>						
7	6.426	<i>ga0017</i>			**		**	
7	30.702	<i>02B17</i>						
7	32.175	<i>04B19</i>						
7	82.148	<i>ga1160</i>			**			
7	87.817	<i>ga0381</i>			***			
8	0	<i>ga1140</i>			**			
8	1.647	<i>ga0495</i>			**			
8	2.276	<i>ga1277</i>						
8	3.028	<i>PS-4</i>			**			
8	3.029	<i>ga0821</i>			**			
8	4.552	<i>em2ca038</i>						
8	6.500	<i>ga1000</i>			***			**
8	57.564	<i>ga0208</i>						
9	0	<i>2ca135</i>						
9	2.034	<i>ga1373-1</i>						
9	2.388	<i>07B22</i>						
9	3.540	<i>01A16</i>						
9	3.699	<i>lca640</i>						
9	3.813	<i>em1ga0041</i>						
9	3.837	<i>ga0047</i>						
9	3.877	<i>ga0250</i>						
9	4.037	<i>ga0349</i>						
9	6.768	<i>ga0166</i>						



表4-10. 各形質の表現型可塑性に関する遺伝子座一覧（続き）

連鎖群	位置	遺伝子座	表現型可塑性					
			出芽日	開花まで 日数	開花初期 花茎長	開花終期 花茎長	小花数	葉数
10	0	07J19R						
10	30.417	ga0889						
10	32.038	ga0428						
10	32.200	ga0049						
10	32.344	09J20						**
10	32.580	ga0212						
10	33.817	10J09						
10	34.426	ga0084						
10	44.743	06O07F		**				
11	0	03K07			**			
11	8.432	ga1312						
11	8.441	ga0173						
11	8.441	ga0007						
11	8.442	ga0363						
11	8.449	ga0235			**			
11	8.488	ga0948			**			
11	8.489	5ga002			**			
11	8.684	ga1239						
11	14.510	ga0624			**	**		
12	0	ga0625		**				
12	12.220	ga0024						
12	17.497	06C07-E						**
12	17.617	06C07-S						
12	17.904	01B15						
12	20.124	5ga039						
12	20.249	ga1041						
12	20.421	02C02						
12	24.348	ga0161						**
12	54.717	02J18						
13	0	ga1155					**	
13	24.480	5ga086			**	**		
13	27.259	ga0832			**			**
13	42.225	ga0098			**		**	
13	56.674	06I08						**
14	0	01K15						
14	3.316	em1atg248						

\*\*\*\*\* 0.01%  
 \*\*\*\*\* 0.05%  
 \*\*\*\*\* 0.1%  
 \*\*\*\*\* 0.5%  
 \*\*\*\*\* 1%  
 \*\*\*\*\* 5%

表 4-11. つくばと八ヶ岳で検出された各形質の遺伝子座と各形質の表現型可塑性に連鎖する

遺伝子座が属する遺伝子群一覧

形質	検出された連鎖群 (有意水準5%)	表現型可塑性	検出された連鎖群 (有意水準5%)
出芽日	3,4,5,8,9,10,11,12,13	出芽日	3,4
開花まで日数	3,4,5,6,7,10	開花まで日数	1,3,4,10,12
開花初期花茎長	3,4,5,6,7,8,9,10,11	開花初期花茎長	3,5,7,8,11,13
開花終期花茎長	1,3,4,5,6,7,8,9,10,11	開花終期花茎長	3,4,5,11,13
小花数	1,3,4,5,6,7,10,11,12,13	小花数	4,5,7,13
葉数	2,7,8,9,10,11,12	葉数	1,3,8,10,12,13
PC1	1,4,5,7,9,10,11,12,13		
PC2	1,3,5,9,13		
PC3	1,4,7,8,9,11,12,13		
花弁面積	1,3,4,6,8,9,11,12,13		
花筒長	1,3,5,7,8,9,11,12,		
柱頭高	1,3,4,8,11		
葯高	7,8,9		
葯長	1,3,4,5,6,7,8,9,11		

赤字：つくばのみで検出された遺伝子群

青字：八ヶ岳のみで検出された遺伝子群

緑字：つくばと八ヶ岳で検出された遺伝子群

紫字：表現型可塑性に関する遺伝子座だけが検出された遺伝子群

表 4-12. つくばと八ヶ岳で検出された出芽日と出芽日の表現型可塑性に連鎖する遺伝子座

連鎖群	位置	つくば	八ヶ岳	可塑性	連鎖群	位置	つくば	八ヶ岳	可塑性	連鎖群	位置	つくば	八ヶ岳	可塑性
1	ga0472-2				5	1ca378	**	**		10	07J19R			
1	ga0599-2				5	ga0326		**		10	ga0889	**		
1	01104				5	07G17				10	ga0428	**		
1	ga0063				5	08J23	**	***		10	ga0049			
1	ga1373-2				5	ga0206		**		10	09J20	***		
1	ga2143				5	1ca375		**		10	ga0212			
1	03B18				5	ga0108		**		10	10J09			
1	5ga044				6	07M19				10	ga0084			
1	02H20				6	ga0032				10	06O07F	*****		
1	ga2029				6	09G10F				11	03K07			
1	ga0429				6	ga0666				11	ga1312		**	
1	MT3_59_C08				6	ga0330				11	ga0173		**	
1	ga2066				6	ga0937				11	ga0007			
1	5ga101				7	ga0059				11	ga0363			
1	ga0626				7	ga1388				11	ga0235			
1	em1ga0090				7	ga409				11	ga0948		***	
1	2ca174				7	ga0577-1				11	5ga002		***	
1	5ga027				7	08F22				11	ga1239		**	
1	5ga009				7	05O19				11	ga0624			
2	ga0267				7	07H18				12	ga0625			
2	ga1677				7	ga0017				12	ga0024		**	
3	ga1251-1				7	02B17				12	06C07-E			
3	ga1251-2				7	04B19				12	06C07-S		****	
3	08B11				7	ga1160				12	01B15		****	
3	ga0727				7	ga0381				12	5ga039	**	**	
3	ga1045				8	ga1140	**			12	ga1041		**	
3	5ga081			**	8	ga0495				12	02C02	**	**	
3	02B22		**	**	8	ga1277				12	ga0161			
3	ga0115		**	**	8	PS-4				12	02J18			
3	ga0719			**	8	ga0821				13	ga1155		**	
3	ga0218	**	****	****	8	em2ca038				13	5ga086			
3	ga0884	**	***	****	8	ga1000	**			13	ga0832			
3	03A23				8	ga0208		**		13	ga0098			
3	ga0056				9	2ca135				13	06I08			
3	ga0054		**	**	9	ga1373-1				14	01K15			
3	PS-3	**	**	****	9	07B22				14	em1atg248			
3	1ca561	**	***	****	9	01A16								
3	ga0343		****	****	9	1ca640								
3	ga1116	***	**	****	9	em1ga0041					*****	0.05%		
3	06I23				9	ga0047		**			*****	0.1%		
4	08I22	****			9	ga0250					****	0.5%		
4	05C15				9	ga0349					***	1%		
4	ga0340	**			9	ga0166					**	5%		
4	1ca642	**		**										
4	ga0757	**												
4	ga0908													
4	ga0691													
4	ga1136													
4	04B22													

表 4-13. つくばの環境において 5%水準以上で検出された出芽日と花卉面積と開花初期花茎長に連鎖する遺伝子座

連鎖群	位置	遺伝子座	出芽日	花卉面積	開花初期花茎長	遺伝子型決定
1	36.033	<i>ga2143</i>		**		
1	37.785	<i>5ga044</i>		***		
1	38.685	<i>ga0429</i>		**		
1	38.825	<i>MT3_59_C08</i>		**		
1	38.891	<i>ga2066</i>		**		
1	38.951	<i>5ga101</i>		**		
1	39.067	<i>ga0626</i>		**		
1	39.767	<i>em1ga0090</i>		**		
1	41.608	<i>2ca174</i>		***		
1	42.949	<i>5ga027</i>		**		
1	56.935	<i>5ga009</i>		***		
3	33.880	<i>02B22</i>		*****		
3	38.475	<i>ga0115</i>		****		
3	38.503	<i>ga0719</i>		**		
3	38.652	<i>ga0218</i>	**	*****		
3	38.661	<i>ga0884</i>	**	*****		
3	38.718	<i>ga0054</i>		****		
3	39.063	<i>PS-3</i>	**	*****		
3	40.729	<i>1ca561</i>	**	***		
3	53.991	<i>ga1116</i>	***	**		
4	0	<i>08I22</i>	****		***	
4	40.086	<i>ga0340</i>	**	**	**	
4	40.939	<i>1ca642</i>	**		**	
4	43.137	<i>ga0757</i>	**		**	
4	108.406	<i>ga1136</i>		**		
4	108.409	<i>04B22</i>		**		
5	0	<i>1ca378</i>	**			
5	33.332	<i>08J23</i>	**			
6	13.521	<i>ga0032</i>			****	
6	41.271	<i>09G10F</i>		*****		
6	52.480	<i>ga0666</i>		**	**	
6	53.021	<i>ga0330</i>		****	**	
6	53.332	<i>ga0937</i>		**	**	
7	4.547	<i>05O19</i>			**	
8	0	<i>ga1140</i>	**	*****		
8	1.647	<i>ga0495</i>		*****		
8	2.276	<i>ga1277</i>		*****		
8	3.028	<i>PS-4</i>		*****		
8	3.029	<i>ga0821</i>		*****		
8	4.552	<i>em2ca038</i>		*****		
8	6.500	<i>ga1000</i>	**	*****	***	
9	0	<i>2ca135</i>		**		
9	2.388	<i>07B22</i>		***		
9	3.540	<i>01A16</i>		**		
9	3.699	<i>1ca640</i>		**	**	
9	3.837	<i>ga0047</i>		**		
9	3.877	<i>ga0250</i>		**		
9	4.037	<i>ga0349</i>		**		
9	6.768	<i>ga0166</i>		**		
10	0	<i>07J19R</i>			***	
10	30.417	<i>ga0889</i>	**		*****	
10	32.038	<i>ga0428</i>	**		*****	
10	32.200	<i>ga0049</i>			*****	
10	32.344	<i>09J20</i>	***		*****	
10	32.580	<i>ga0212</i>			*****	
10	33.817	<i>10J09</i>			*****	
10	34.426	<i>ga0084</i>			*****	
10	44.743	<i>06O07F</i>	*****		**	
11	0	<i>03K07</i>			****	
11	8.432	<i>ga1312</i>			*****	**
11	8.441	<i>ga0173</i>			*****	**
11	8.441	<i>ga0007</i>			*****	
11	8.442	<i>ga0363</i>			*****	**
11	8.449	<i>ga0235</i>			*****	**
11	8.488	<i>ga0948</i>			*****	
11	8.489	<i>5ga002</i>			*****	
11	8.684	<i>ga1239</i>			*****	**
11	14.510	<i>ga0624</i>			*****	
12	0	<i>ga0625</i>			*****	
12	12.220	<i>ga0024</i>			*****	
12	17.497	<i>06C07-E</i>			*****	
12	17.617	<i>06C07-S</i>			*****	
12	17.904	<i>01B15</i>			*****	
12	20.124	<i>5ga039</i>	**		*****	
12	20.249	<i>ga1041</i>			*****	
12	20.421	<i>02C02</i>	**		*****	
12	24.348	<i>ga0161</i>			*****	
13	0	<i>ga1155</i>			***	
13	24.480	<i>5ga086</i>			***	
13	27.259	<i>ga0832</i>			***	

\*\*\*\*\* 0.01%

\*\*\*\* 0.05%

\*\*\* 0.1%

\*\* 0.5%

\* 1%

5%

表 4-14. 出芽日と花卉面積と開花初期花茎長の  $F_{ST}^L$  と  $Q_{ST}$  と  $F_{ST}^N$

形質	$F_{ST}^L$	$Q_{ST}(2003)$	$F_{ST}^N$
出芽日	0.253 (0.199-0.231)	0.530	0.200 (0.124-0.277)
花卉面積	0.202 (0.163-0.244)	0.250	0.200 (0.124-0.277)
開花初期花茎長	0.293 (0.227-0.265)	0.008	0.200 (0.124-0.277)
予想	$Q_{ST}$	$F_{ST}^L$	

( )内は95%信頼区間を示す。

表 4-15. JoinMap ver.4.0 に基づく本章で検出された遺伝子型

遺伝子型	母親	父親	子供が示す遺伝子型
ab×cd	ab	cd	ac, ad, bc, bd
ef×eg	ef	eg	ee, ef, eg, fg
hk×hk	hk	hk	hh, hk, kk
nn×np	nn	np	nn, np
lm×ll	lm	ll	ll, lm
rr × st <sup>1</sup>	rr	st	sr, tr

<sup>1</sup> JoinMapには存在しない遺伝子型であった。

表 4-16. 出芽日に連鎖する 2 遺伝子座の各集団の遺伝子型数と出芽日の平均値

08I22	遺伝子型 <sup>1</sup>					対立遺伝子頻度 <sup>2</sup>			出芽日		
	gg or g-	eg	gu	ee or e-	eu	e	g	u	2003	2004	2005
北海道 (26)	7	11	0	8	0	0.519	0.481	0.000	13.64	22.10	45.01
埼玉 (16)	6	3	0	7	0	0.531	0.469	0.000	9.47	10.52	24.99
長野2 (26)	11	0	15	0	1	0.019	0.685	0.296	19.76	24.82	49.03

09J20	遺伝子型 <sup>1</sup>			対立遺伝子頻度			出芽日		
	lu	ll	lm	l	m	u	2003	2004	2005
北海道 (26)	3	23	0	0.942	0.000	0.058	13.64	22.10	45.01
埼玉 (16)	2	13	1	0.906	0.031	0.063	9.47	10.52	24.99
長野2 (26)	1	25	0	0.981	0.000	0.019	19.76	24.82	49.03

<sup>1</sup> uは分離家系で検出されなかった1対立遺伝子を示す。

<sup>2</sup> Null対立遺伝子をもつ可能性のある遺伝子型の場合は、ホモであることを想定して頻度を算出した。

()内は供試ジェネット数を示す。

表 4-17. 分離集団における花型 (Morph) の QTL 近傍ある 4 遺伝子座  
の各遺伝子型と花型の関係

**ga0495**

ee		ef		eg		fg		
P	T	P	T	P	T	P	T	
53	0	39	2	0	42	2	47	g: 優性対立遺伝子 e, f: 劣性対立遺伝子

**ga1277**

ac		ad		bc		bd		
P	T	P	T	P	T	P	T	
0	31	30	0	0	33	42	0	c: 優性対立遺伝子 a, b, d: 劣性対立遺伝子

**PS-4**

ee		ef		eg		fg		
P	T	P	T	P	T	P	T	
56	0	42	0	0	42	1	49	g: 優性対立遺伝子 e, f: 劣性対立遺伝子

**ga0821**

ee		ef		eg		fg		
P	T	P	T	P	T	P	T	
57	0	42	0	0	42	1	49	g: 優性対立遺伝子 e, f: 劣性対立遺伝子

数値は分離家系のジェネット数を示す。



表 4-18. JoinMap ver.4.0 に基づく本章で検出された遺伝子型

集団	genet 番号	花型 <sup>1</sup>	遺伝子座 <sup>2</sup>				識別 <sup>3</sup>	集団	genet 番号	花型 <sup>1</sup>	遺伝子座 <sup>2</sup>				識別 <sup>3</sup>
			ga0495	ga1277	PS-4	ga0821					ga0495	ga1277	PS-4	ga0821	
北海道	1	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ee	-	-	埼玉	9	-	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-
北海道	2	P	fu <sub>2</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>5</sub>	fu <sub>2</sub>	fu <sub>2</sub>	-	埼玉	10	P	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>3</sub>	-
北海道	3	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	-	埼玉	11	P	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>3</sub>	-
北海道	4	P	fu <sub>6</sub>	-	-	-	-	埼玉	12	P	fu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>6</sub>	-	u <sub>3</sub> u <sub>9</sub>	-
北海道	5	P	fu <sub>6</sub>	u <sub>4</sub> u <sub>5</sub>	ef	ff	-	埼玉	13	T	u <sub>1</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>7</sub>	-	u <sub>8</sub> u <sub>8</sub>	-
北海道	6	P	u <sub>6</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>4</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	-	埼玉	14	T	eu <sub>1</sub>	bu <sub>2</sub>	-	u <sub>2</sub> u <sub>16</sub>	-
北海道	7	T	fu <sub>6</sub>	u <sub>5</sub> u <sub>7</sub>	ff	fu <sub>11</sub>	×	埼玉	15	P	u <sub>2</sub> u <sub>8</sub>	au <sub>2</sub>	fu <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>11</sub>	-
北海道	8	P	u <sub>6</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	-	埼玉	16	P	ee	bu <sub>7</sub>	ee	u <sub>8</sub> u <sub>16</sub>	-
北海道	9	P	u <sub>2</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>4</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	-	長野	2 1	T	u <sub>1</sub> u <sub>7</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	fg	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	-
北海道	10	P	fu <sub>6</sub>	u <sub>4</sub> u <sub>5</sub>	ef	ff	-	長野	2 2	P	ee	u <sub>1</sub> u <sub>4</sub>	ef	u <sub>8</sub> u <sub>13</sub>	-
北海道	11	P	fu <sub>6</sub>	u <sub>4</sub> u <sub>5</sub>	ef	ff	-	長野	2 3	P	eu <sub>6</sub>	au <sub>4</sub>	ef	u <sub>8</sub> u <sub>8</sub>	-
北海道	12	P	fu <sub>9</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>5</sub>	ef	ff	-	長野	2 4	P	u <sub>5</sub> u <sub>7</sub>	bu <sub>2</sub>	ef	u <sub>11</sub> u <sub>14</sub>	-
北海道	13	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	-	長野	2 5	P	eu <sub>5</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	ee	u <sub>14</sub> u <sub>15</sub>	-
北海道	14	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>1</sub> u <sub>1</sub>	-	長野	2 6	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	au <sub>2</sub>	ff	u <sub>6</sub> u <sub>8</sub>	-
北海道	15	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>7</sub>	fg	gu <sub>11</sub>	-	長野	2 7	P	u <sub>2</sub> u <sub>6</sub>	au <sub>2</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>7</sub>	-
北海道	16	T	u <sub>4</sub> u <sub>9</sub>	du <sub>2</sub>	eg	gg	-	長野	2 8	P	u <sub>2</sub> u <sub>5</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>14</sub>	-
北海道	17	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>4</sub>	eg	gg	-	長野	2 9	P	u <sub>6</sub> u <sub>10</sub>	au <sub>2</sub>	ef	u <sub>6</sub> u <sub>7</sub>	-
北海道	18	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>7</sub>	fg	gu <sub>11</sub>	-	長野	2 10	P	u <sub>2</sub> u <sub>7</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>2</sub>	fu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	-
北海道	19	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	eg	gg	-	長野	2 11	P	fu <sub>7</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ef	u <sub>11</sub> u <sub>11</sub>	-
北海道	20	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>4</sub>	eg	gg	-	長野	2 12	P	u <sub>6</sub> u <sub>6</sub>	aa	ee	u <sub>8</sub> u <sub>8</sub>	-
北海道	21	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>4</sub>	eg	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-	長野	2 13	P	ee	u <sub>1</sub> u <sub>4</sub>	ef	fu <sub>15</sub>	-
北海道	22	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>7</sub>	fg	u <sub>5</sub> u <sub>11</sub>	-	長野	2 14	P	eu <sub>3</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>4</sub>	ef	fu <sub>15</sub>	-
北海道	23	T	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	du <sub>1</sub>	gu <sub>2</sub>	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-	長野	2 15	P	u <sub>7</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	ff	u <sub>6</sub> u <sub>11</sub>	-
北海道	24	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	eg	gg	-	長野	2 16	T	u <sub>1</sub> u <sub>5</sub>	bu <sub>2</sub>	eg	u <sub>2</sub> u <sub>14</sub>	-
北海道	25	T	u <sub>4</sub> u <sub>6</sub>	du <sub>4</sub>	eg	gg	-	長野	2 17	T	u <sub>4</sub> u <sub>5</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>3</sub>	ee	u <sub>9</sub> u <sub>14</sub>	-
北海道	26	T	u <sub>4</sub> u <sub>10</sub>	du <sub>2</sub>	eg	gg	-	長野	2 18	T	eu <sub>4</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>3</sub>	ee	gu <sub>13</sub>	-
埼玉	1	P	ef	bu <sub>2</sub>	eu <sub>1</sub>	u <sub>10</sub> u <sub>12</sub>	-	長野	2 19	T	eu <sub>4</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>4</sub>	ef	fg	-
埼玉	2	-	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>3</sub>	-	長野	2 20	T	u <sub>4</sub> u <sub>10</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>3</sub>	-	u <sub>6</sub> u <sub>9</sub>	-
埼玉	3	-	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-	長野	2 21	T	eu <sub>4</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>4</sub>	ef	fg	-
埼玉	4	P	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	ee	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-	長野	2 22	T	eu <sub>4</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>3</sub>	ee	gu <sub>13</sub>	-
埼玉	5	-	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>4</sub>	eu <sub>2</sub>	u <sub>5</sub> u <sub>5</sub>	-	長野	2 23	T	u <sub>4</sub> u <sub>5</sub>	u <sub>1</sub> u <sub>3</sub>	-	-	-
埼玉	6	P	fu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>6</sub>	fu <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>9</sub>	-	長野	2 24	T	fu <sub>4</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>4</sub>	ef	fg	-
埼玉	7	T	u <sub>1</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	gu <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>3</sub>	-	長野	2 25	T	fu <sub>4</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>4</sub>	ef	fg	-
埼玉	8	P	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>2</sub>	u <sub>3</sub> u <sub>3</sub>	-	長野	2 26	T	u <sub>1</sub> u <sub>7</sub>	u <sub>2</sub> u <sub>6</sub>	fg	u <sub>2</sub> u <sub>11</sub>	-

<sup>1</sup> 花型が不明なジェネットは" - "とした。

<sup>2</sup> 分離集団で検出されなかった対立遺伝子座はu\*とした。

<sup>3</sup> 対立遺伝子から推測される花型が実際の花型と同じ場合は、異なっている場合は×とした。

青字：識別に有効な遺伝子型

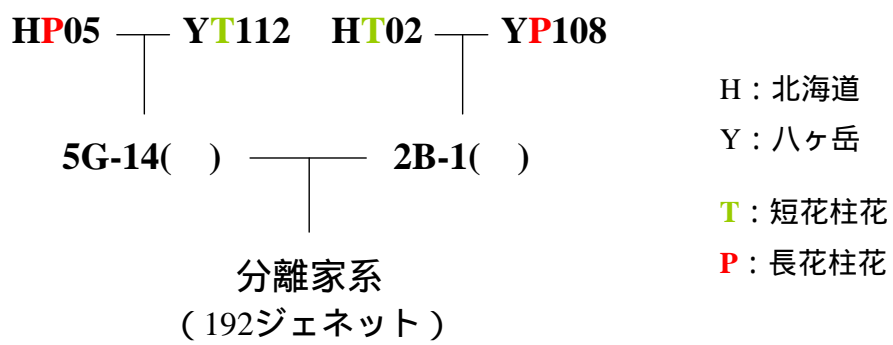
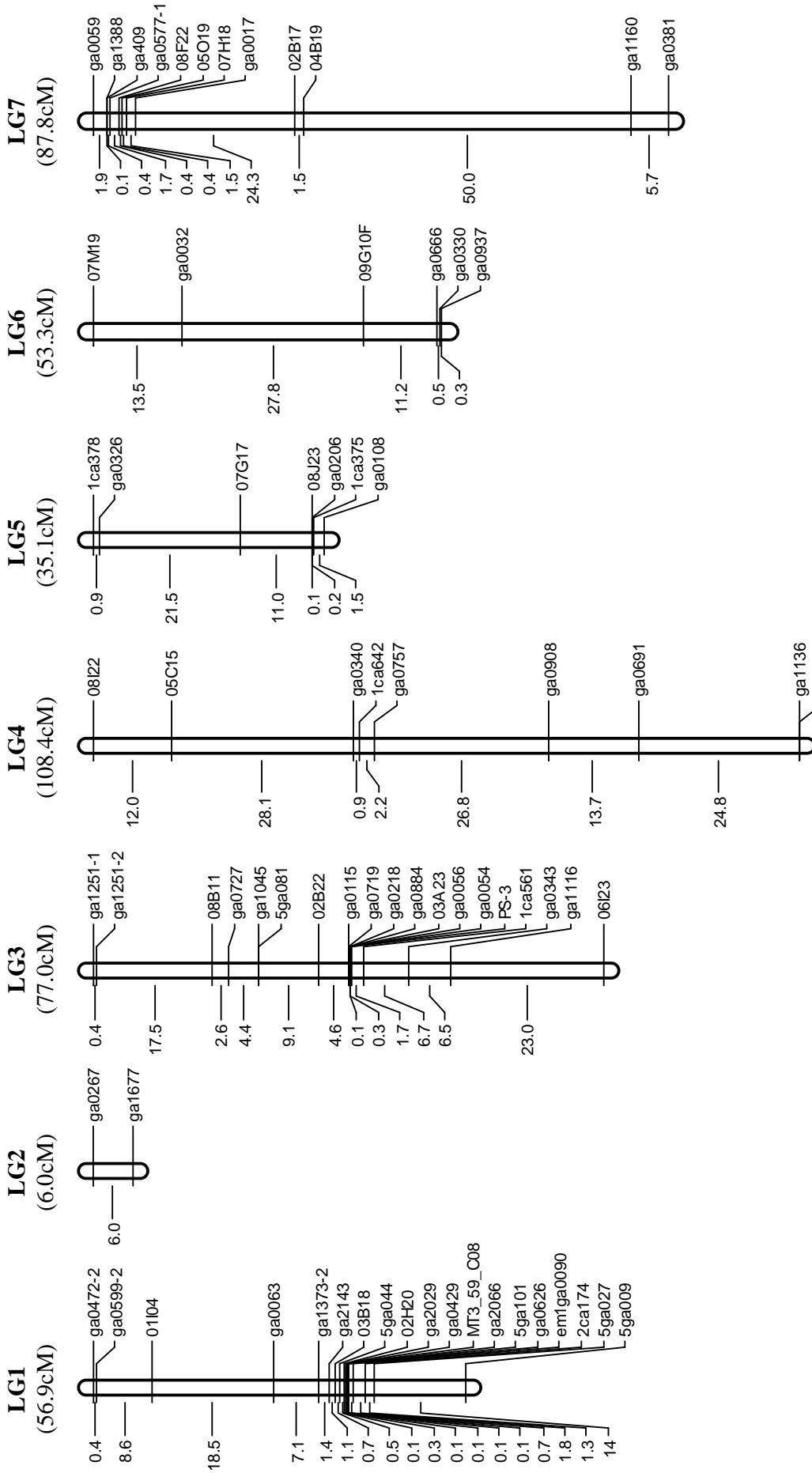


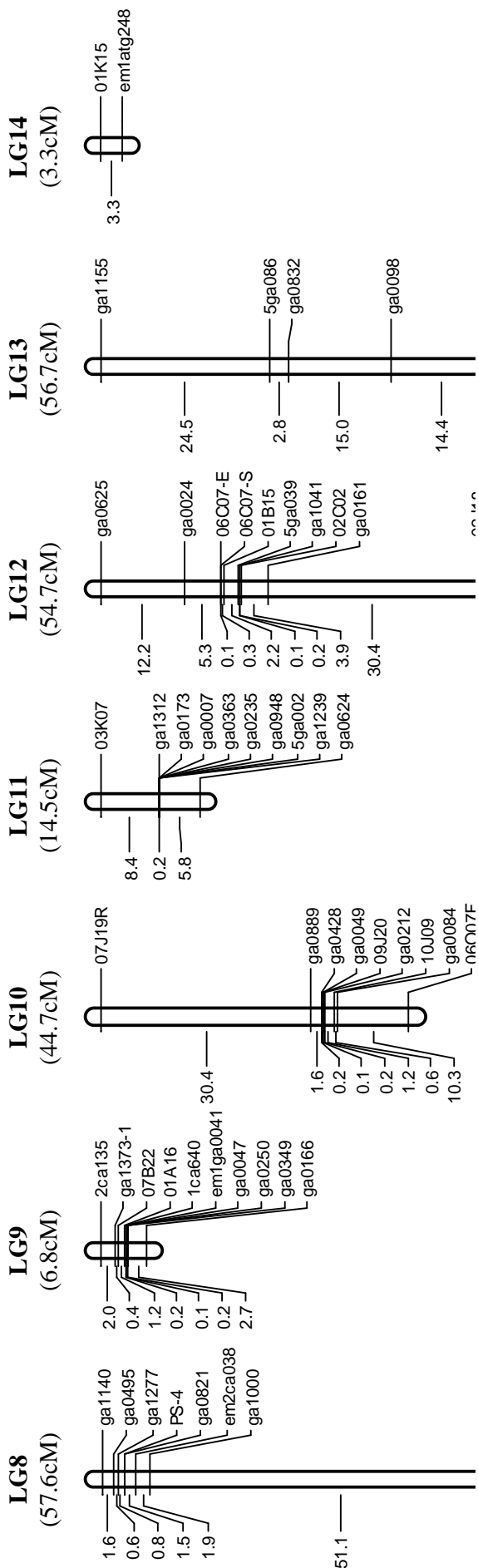
図 4-1. 連鎖地図作成と QTL 解析に用いた分離家系



図 4-2. 花器形態の測定に用いた画像

サイズマーカー：9mm×9mm





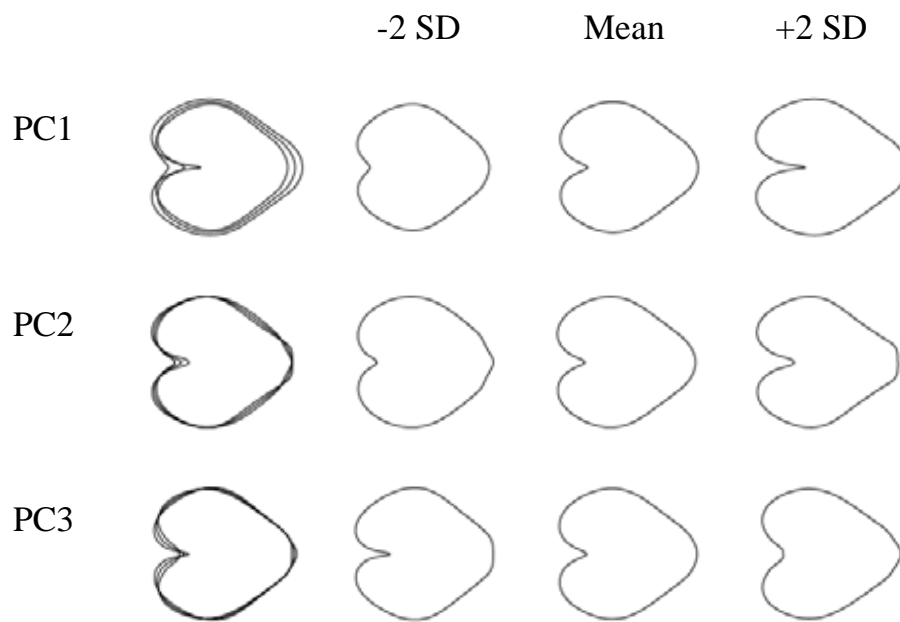


図 4-4. 分離家系の花弁形状に関する第 1~3 主成分

PC1 : 切れ込みの深さと花弁の大きさ、PC2 : 切れ込みの深さと花弁の丸み、

PC3 : 花弁の切れ込みの角度

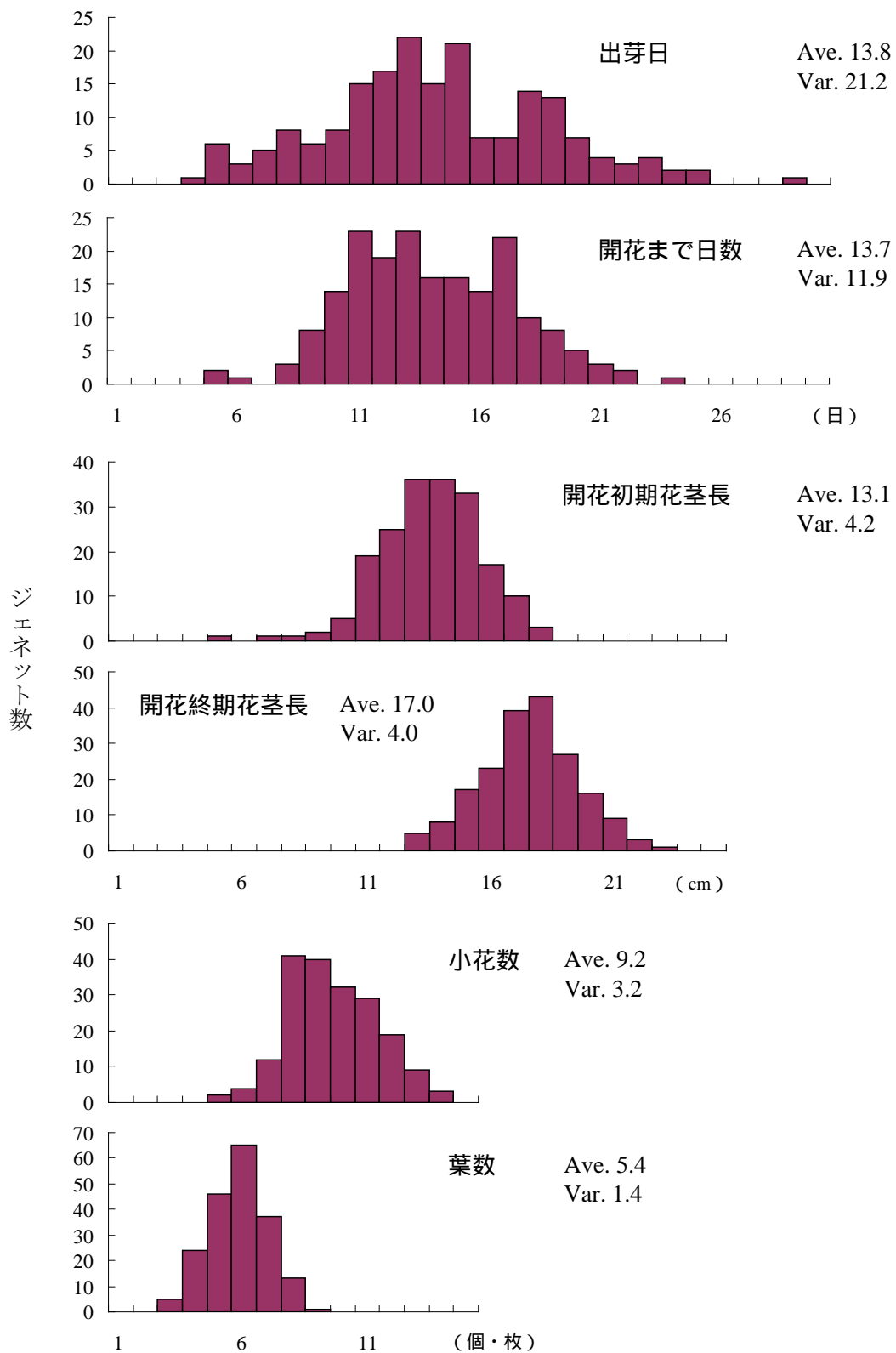


図 4-5. つくばで測定した各形質の頻度分布および平均値と分散

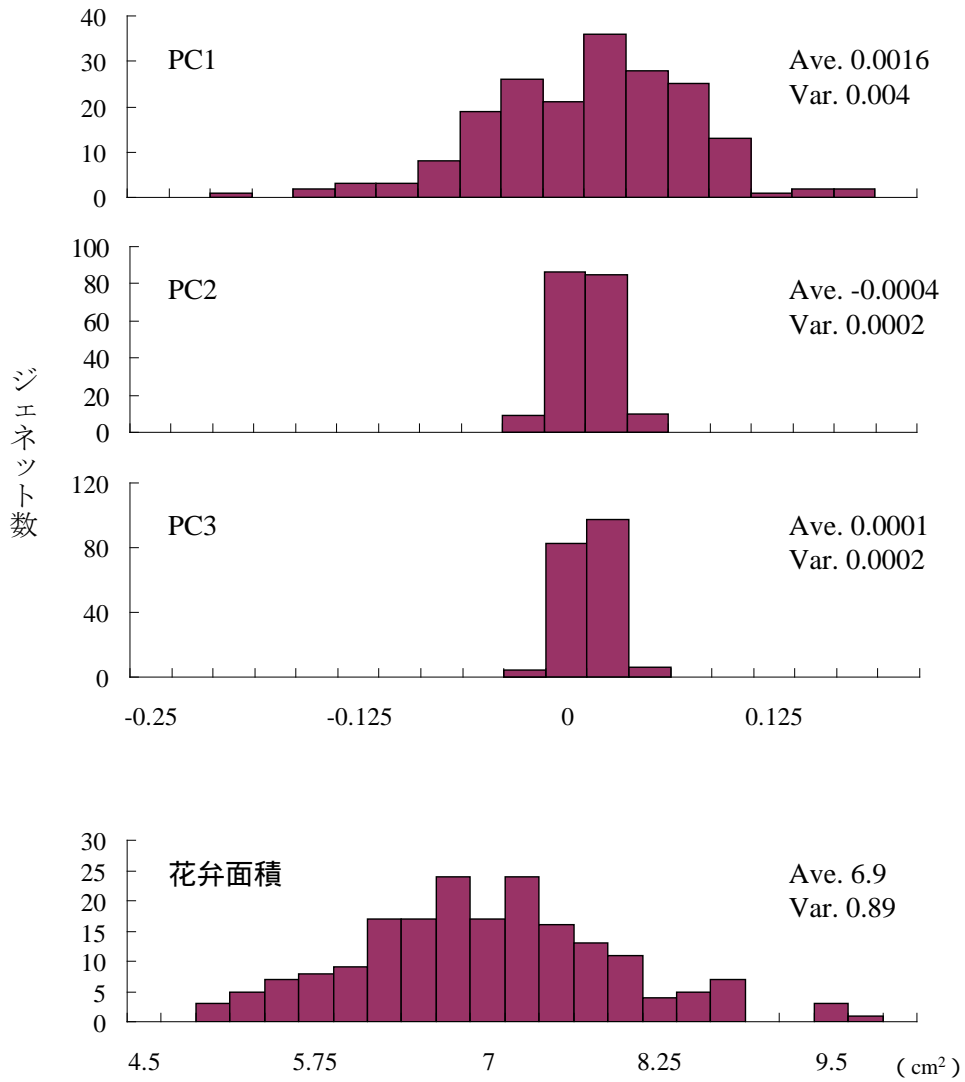
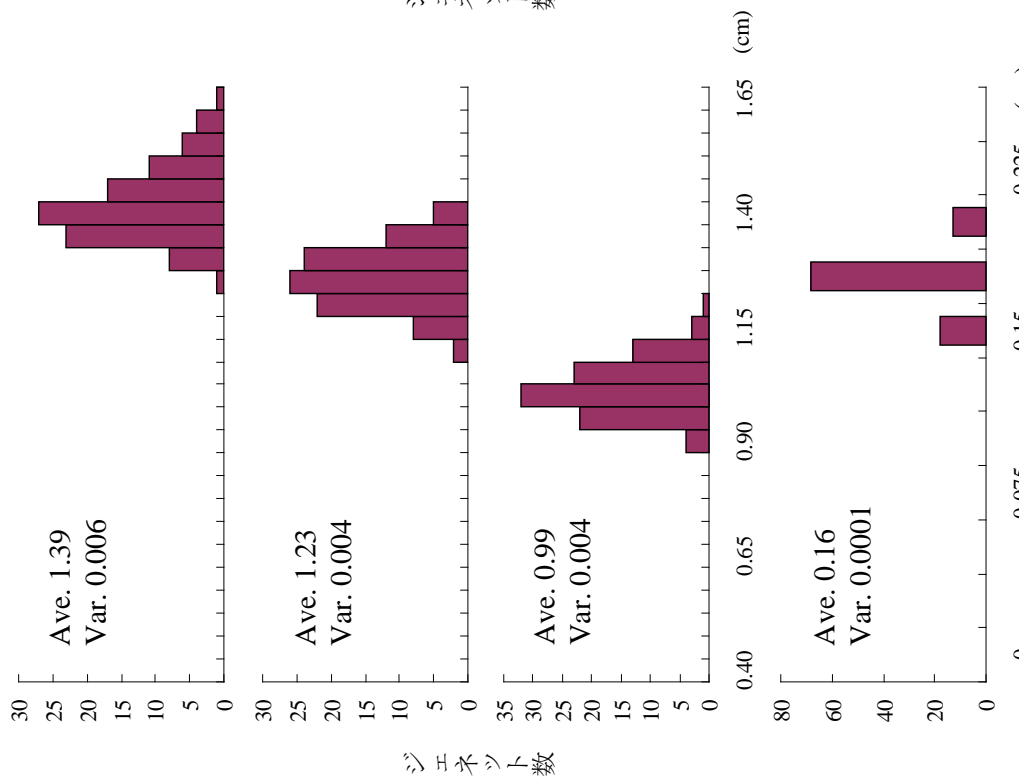


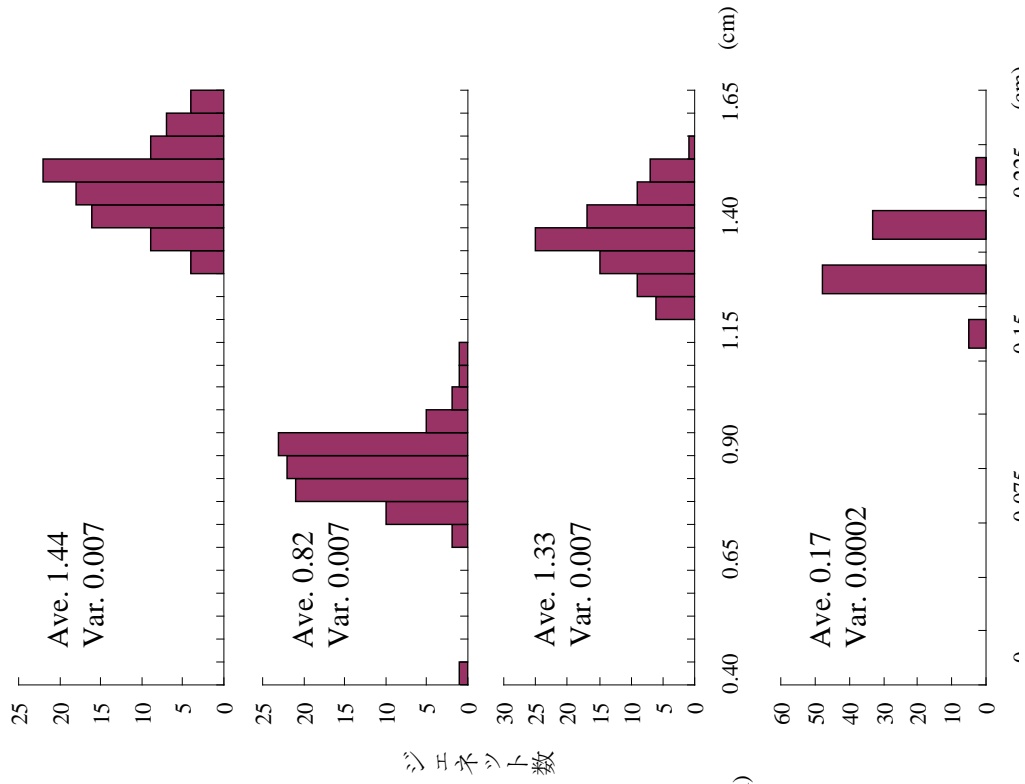
図 4-5. つくばで測定した各形質の頻度分布および平均値と分散 ( 続き )



長花柱花



短花柱花



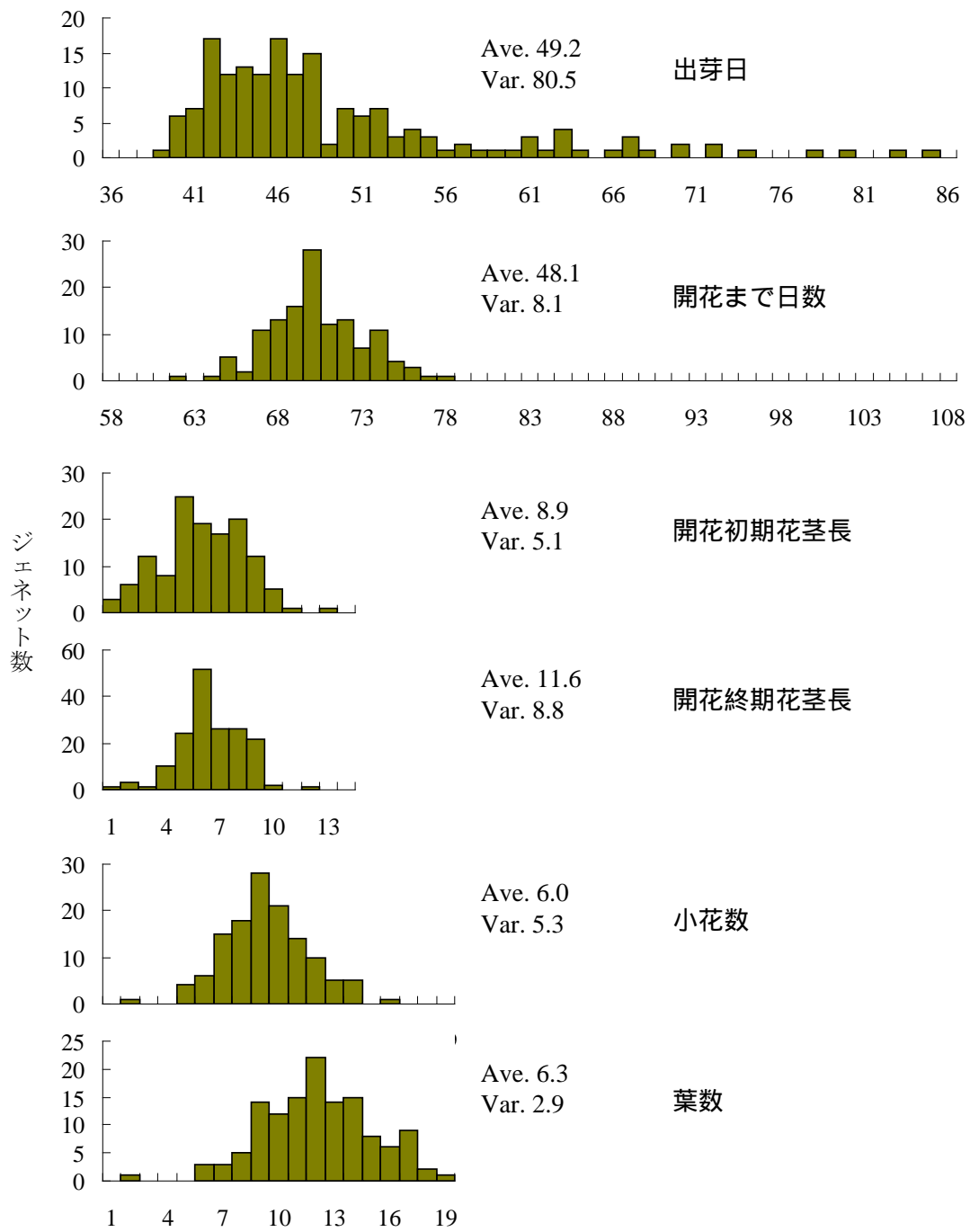


図 4-6. ハヶ岳で測定した各形質の頻度分布および平均値と分散

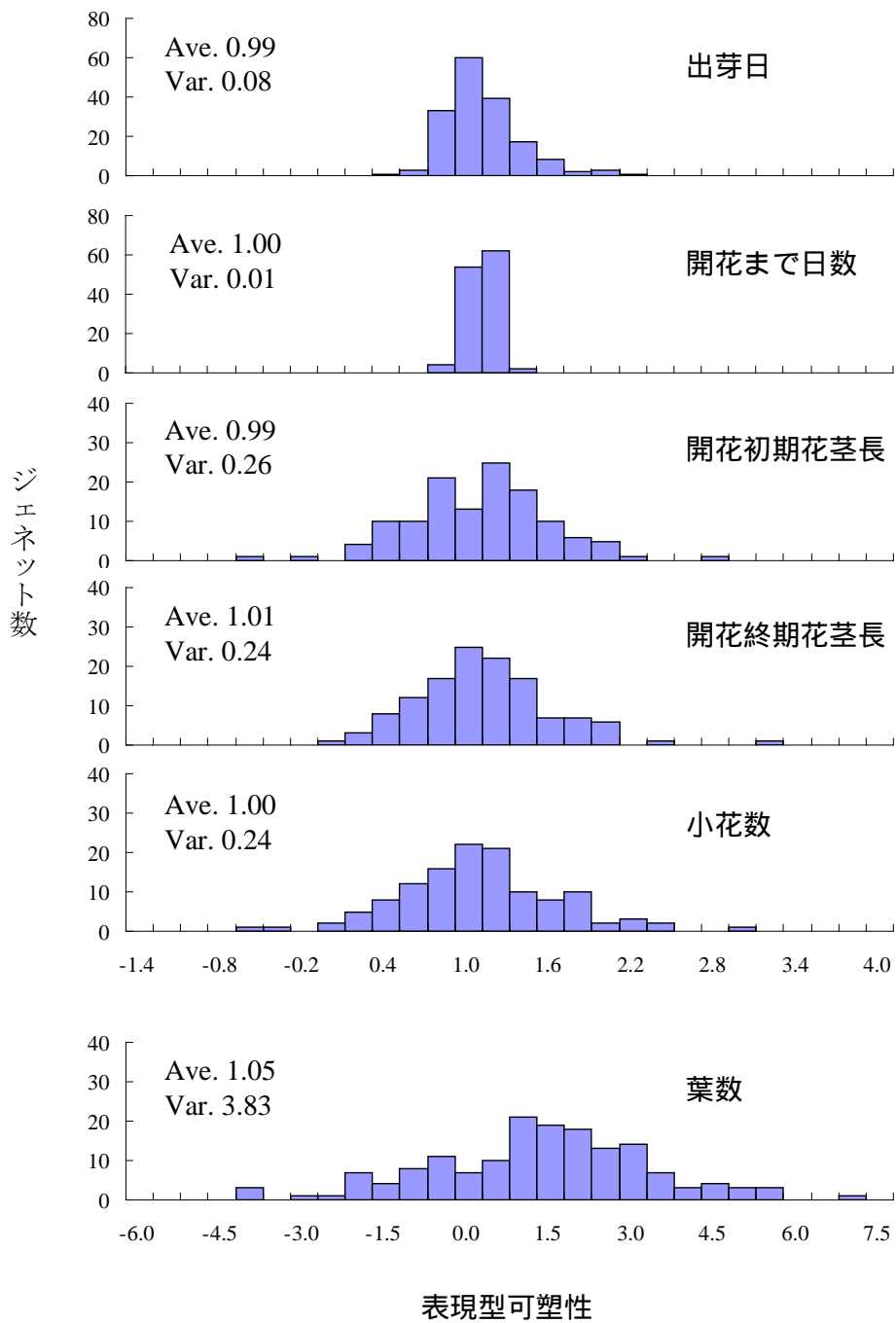


図 4-7. つくば・ハヶ岳における各形質の表現型可塑性の頻度分布および平均値と分散

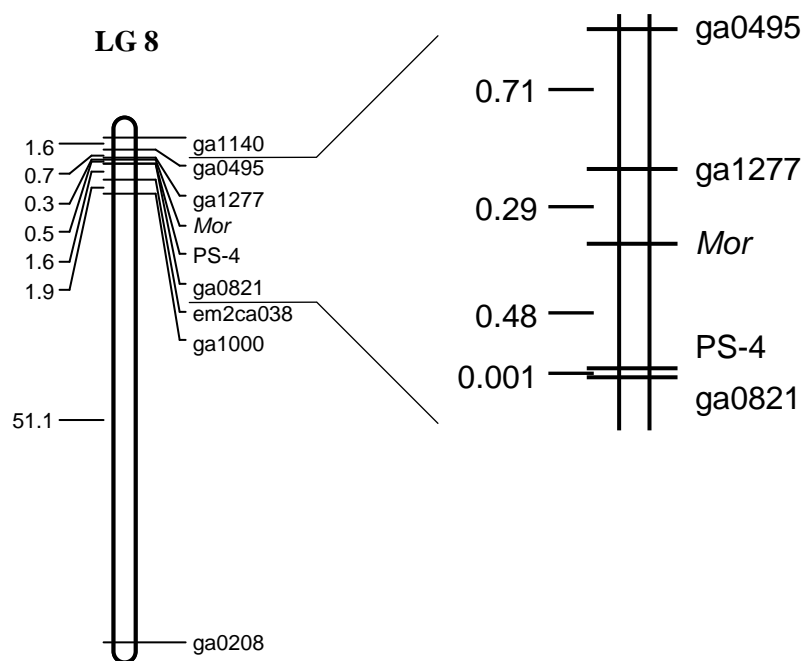


図 4-8. 花型 (*Mor*) を支配する遺伝子座が検出された連鎖群 8

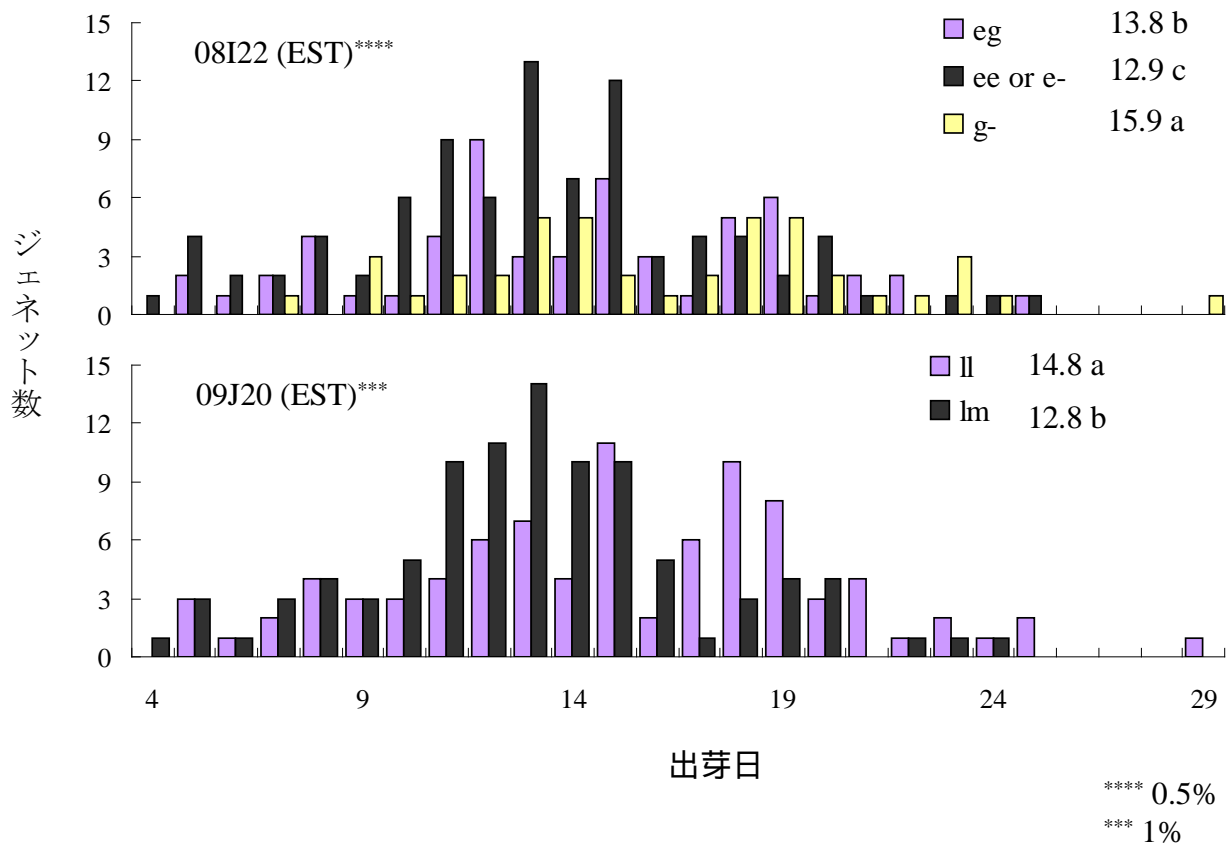


図 4-9. 1%水準以上で検出された出芽日に連鎖する遺伝子座における分離家系の出芽日と遺伝子型の関係  
異なる文字間は Tukey-Kramer の多重比較より 5%水準で遺伝子型間が有意差あり

## 5章 総合考察

本研究では、野生サクラソウの保全策を構築するために必要な適応分化に関連した形質とその遺伝構造の把握ならびに分子マーカーによる適応関連形質の遺伝的多様性の間接的評価の可能性の検証を目的として、これまでに遺伝的多様性の指標として用いられてきた花卉形質の遺伝的多様性の評価、6つの量的形質の遺伝的多様性の評価および適応に関連する形質の特定、表現型可塑性の遺伝的多様性の評価を行った。さらにサクラソウの適応に関連する形質の遺伝的多様性をその QTL に連鎖したマーカー遺伝子型によって評価することの有効性を検証するために、連鎖地図の作成から QTL 解析、さらに形質に連鎖する遺伝子座の対立遺伝子を用いた野生集団の多様性評価を行った。

本章では、野生サクラソウ集団における量的形質の遺伝的多様性について総合的に論議するとともに、適応関連形質とその表現型可塑性の遺伝的多様性を合わせて、野生サクラソウ集団の今後の生存の可能性について考察する。さらにこれまでに Honjo *et al.* (in press) が SSR マーカー8座を用いて決定した保全単位について、本研究で明らかになった適応関連形質の集団間の遺伝的分化を考慮した保全単位について再考し、分子マーカーを用いたサクラソウに重要な形質の遺伝的多様性の評価の有効性と将来の展望について論ずる。最後に野生サクラソウ集団の保全のための指針を提示する。

### 1. 野生サクラソウ集団における量的形質の遺伝的多様性

1章と2章でサクラソウの10形質の遺伝的多様性評価を行った結果、全ての形質が遺伝的な形質であることが示された。そのうち、葉数だけが遺伝的変異よりも環境変異の大きな形質であったものの、その他の形質は環境変異に比べて遺伝的変異が大きかった(表 2-5)。また遺伝的変異を集団内と集団間に分けた結果、出芽日は集団間変異が

大きく、出芽日以外の形質の遺伝的変異は主に集団内に維持されていた。これらの 10 形質において、 $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  を比較することによって集団間の分化を引き起こす要因および適応関連形質の推定をしたところ、出芽日と葉数が方向性選択によって集団間分化した適応関連形質であり、その他の 8 形質には自然選択の関与が認められないことから、これらは適応に関連した形質ではないことが明らかになった。出芽日と葉数は自生地の気温との間に有意な相関関係が認められ (図 2-5)、特に出芽日の集団間の分化程度が大きいことから、低温耐性や耐霜性との関係から出芽時期に自生地の気温が低い集団では出芽が遅いジェネットが、気温の高い集団では出芽が早いジェネットがそれぞれ選抜されてきた可能性がある。開花まで日数、小花数および花弁面積は、集団間で平均値に有意な違いが認められたが、主に遺伝的浮動による分化であることが明らかになった。一方、開花初期花茎長、開花終期花茎長、花弁形状の切れ込みの深さと最大幅、長幅比、重心の位置は自然選択を受けておらず、集団間で分化をしていないため、遺伝的変異の大部分が集団内に保有されていた。

これらの形質が環境変動に対してどのような反応性を示すのかを調べるために、表現型可塑性の集団内および集団間で遺伝的多様性を評価した結果、2 章出強い選択圧を受けきたと推定された出芽日の表現型可塑性の集団内変異が最も小さく、自然選択を受けていないとされた開花初期花茎長と開花終期花茎長の集団内変異が大きいことが示された (図 3-3)。またつくばと諏訪の環境下では表現型可塑性の集団間差が認められたものの、集団間の違いは小さかったが、つくばと八ヶ岳の環境下では埼玉集団が他の集団と大きく異なり、大きな集団間変異が認められた。これらの結果から、埼玉集団は自生地の環境と大きく異なる八ヶ岳においても出芽日を遅らせることで八ヶ岳の環境に対応することができるジェネットを保有していることが明らかになった。

さらに出芽した 148 個体のうち 146 個体が成育後期まで生残したことを合わせると、

適応関連形質である出芽日は、出芽の有無がサクラソウの生残に強く関与していること、ならびに出芽日の表現型可塑性が集団間で異なっており、出芽日の可塑性も自然選択を受けてきた可能性があることから、出芽日はサクラソウの生存に深く関連した形質であることが示唆された。

近年では、保全においても種の歴史や系統関係、遺伝的浮動や遺伝子流動などによる集団間の遺伝的關係、また潜在的な遺伝的多様性を評価することができる分子マーカーを用いた実験が多くの種で用いられている（鷲谷ら 2005）。本実験では  $Q_{ST}$  と  $F_{ST}$  を比較することによって、有意な集団間差が認められた形質が方向性選択によって分化した形質であるのか遺伝的浮動によって分化した形質であるのかを区別することができた。これは、分子マーカーの評価に量的形質の評価を合わせることによって得られる知見であり、改めて量的形質の評価の重要性を示すものである。

## 2. 野生サクラソウ集団の長期的な生存の可能性

これまでに出芽日が特にサクラソウの生存に深く関連した適応関連形質であることが明らかになり、環境変動に対する長期的な存続には各集団が保有する出芽日の遺伝的変異だけでなく、環境の応答能力を示す表現型可塑性の遺伝的変異が重要であることが示された。集団内の表現型可塑性の変異が大きいほど、その集団が環境変動に対して生存できる可能性が高く、潜在的な生存可能性があると推定できる。

本研究では、標高が異なる環境に自生する野性 5 集団を、つくばと諏訪と八ヶ岳の標高差（30m, 770m, 1440m）の大きい 3 環境で栽培し、これらの環境において各集団がどのような環境応答性を示すジェネットを保有しているのか調べるために表現型可塑性の集団内変異を評価した結果。その結果、標高の高い地域（940～1120m）に自生している 3 つの長野集団は、どの環境でも高い出芽率を示した（表 3-8）。標高が低く関東



低地に自生している埼玉集団は、つくばでの出芽率は 100%であったのに対し、諏訪では 75%、八ヶ岳では 30.8%と、栽培地の標高が高くなるにつれて出芽率が大きく低下した。標高は低いが高緯度の高い地域に自生している北海道集団は埼玉や長野集団と異なり、どの環境でも出芽率が 100%になることはなかったが、八ヶ岳で出芽率が著しく低下した。2章で出芽日の集団間分化には自生地が気温が大きく関与していることが明らかになったが、各集団の 3 環境での出芽率の結果と出芽した個体の 99%が生残していたことを考慮すると、特に低温や遅霜が出芽日にとって大きな選択圧として、個体の生存に大きく関わっていることが推測される。現在は温暖化のため気温が上昇していることから、気温の影響を受ける出芽日への影響が懸念されるものの、長野の 3 集団はつくばでも出芽率が高く、北海道集団の出芽率も長野集団ほどではないが 70~80%であった。このことから、気温だけの影響を考えるとつくばの平均気温までの気温上昇であれば、野生 5 集団の個体への影響は小さいものと考えられる。一方、現在温暖化の影響が注視されているが、将来寒冷化が起こった場合には、2章で述べたようにサクラソウが気温の低い環境で生育していくためには低温耐性が必要であるため、埼玉集団の生存への影響はかなり大きく、個体数の減少が予想されるが、3章で低温耐性をもつジェネットまたは可塑性の程度が大きいいため出芽日を遅らせることができるジェネットが埼玉集団に存在していたため、これらのジェネットが生存する可能性があり、八ヶ岳のような低温状況下でも集団が絶滅する可能性は低いものと考えられる。

### 3. 適応的な集団間分化と分子マーカーによって評価された集団間分化を考慮したサクラソウの保全単位の再考

Honjo *et al.* (in press) はこれまでに SSR マーカー 8 座よりサクラソウの保全単位を決定し、全国に分布する野性サクラソウを北海道、東北、関東・中部、西日本 4 つの遺伝

的なグループに分類した。これらの集団間の分化は、歴史的な遺伝子交流を反映していることから、同じ遺伝的グループに属する集団は近縁な関係であると考えられる。本研究で用いた5集団は Honjo *et al.* (in press) に従えば、北海道集団が北海道グループに、埼玉と長野の3集団が関東・中部グループに分類される。しかしながら、本研究の結果に基づいて出芽日を考慮すると、関東・中部グループに属する4集団うち埼玉集団は明らかに長野の3集団と遺伝的に分化しているため、異なる保全単位にすべきである。また、自生地が近い3つの長野集団についてみると、2004と2005年では集団間で出芽日に有意な差が認められなかったものの、2003年には出芽が有意に遅い長野2と出芽が早くなった長野3集団間で有意に異なったこと(表 2-4)、また長野2集団は3年間通じて出芽日が遅い傾向にあったことから、従って、地理的に近距離に存在する長野2と長野3集団も異なる保全単位にすることが望ましい。

Honjo *et al.* (in press) が決定した保全単位では2グループに分かれた5集団は、適応関連形質の遺伝的多様性を考慮すれば、4グループに分類されることになる。現在では地域の遺伝的組成を考慮した緑化や保全が進められており(津村・岩田 2006)、日本緑化工学会の提言では、緑化や保全事業においても長い歴史の中で獲得された遺伝子レベルの変異を維持していくことの重要性と、遺伝子の攪乱をできる限り避けるべきであることが述べられており(小林・倉本 2006)、今後多くの種で地域固有の遺伝組成を重要視した事業が進められていくことが考えられる。このような地域固有の遺伝的組成を考慮した保全策のひとつである保全単位は、適応的な遺伝的組成を維持していくために重要な情報であり、野生サクラソウ集団においても自生地間の距離に関わらず集団間で遺伝的に分化していることから、今後は本章で評価した5集団以外の野生集団の多様性も評価する必要がある。

#### 4. 保全における分子マーカーを用いたサクラソウに重要な形質の遺伝的多様性の評価の有効性と将来の展望

本研究では、分子マーカーによって評価された集団間分化と適応関連形質である出芽日の集団間分化を考慮した結果、新たな保全単位が提唱されたことから、サクラソウにおいては出芽日の集団間の遺伝的な分化を把握する重要性が示された。今後は、本章で供試した5集団以外の野生集団を含めた保全単位を決定するために、これらの集団由来の個体を同一栽培によって評価する必要があるが、同一環境下での栽培は時間や労力がかかることに加え、個体数が少ない集団においては個体を自生地から採取することができないという欠点をもつ。そこで4章で出芽日に連鎖する2つの遺伝子座において対立遺伝子を用いて多様性の有効性を検証した結果、遺伝子座 08I22 では対立遺伝子頻度に違いが認められたものの、出芽日の集団間の違いを説明できず、出芽日との明確な関係性が認められなかった(表 4-16)。一方で、適応関連形質と同様に個体の生存に重要な花型については、4つの遺伝子座における遺伝子型によって供試個体の約7割を識別することができた(表 4-18)。これらマーカーを用いることによって、これまで開花ジェネットのみを対象に目視による花型の識別から、開花期間や開花の有無に制限されず、集団内の花型の割合を把握することが可能であることが示された。さらに本研究では花型のQTLが連鎖群8に存在し、遺伝子座 ga1277の近傍にある可能性が示された(図 4-8)。サクラソウは異型花柱性の様々な崩壊や変質も多く認められるサクラソウ属の中でも、典型的な異型花柱性であるため、繁殖特性や生物間相互作用の意義などからも *S*-locus を明らかにすることは生物学的にも有効である(鷲谷 2006)。加えて、異型花柱性は雑種育種をする上で必要な農業形質である自家不和合性と結びついていることから、異型花柱性の理解が進むことは遺伝学的にも、ひいては育種学的にも有益である。

これまで QTL の近傍のマーカーや目標とする形質の遺伝子領域を用いて、品種の改

良や早期選抜などを行っており、マーカーを用いた手法は植物育種の世界では広く用いられている (Guillet-Claude *et al.* 2004, Skøt *et al.* 2005, Wilcox *et al.* 2007, Jones *et al.* 2008)。本研究では、このようなゲノム情報に基づいたマーカーによる形質の多様性評価を、サクラソウの保全における適応関連形質の遺伝的多様性評価として行った。結果として、現段階では分子マーカーによって出芽日の多様性評価の有用性を示すことができなかったが、質的形質であるが異型花柱性に関する花型はマーカー遺伝子型によって識別が可能であることが示された。今後は、マーカー数を増やして連鎖地図を充実させることや分離家系では効果が不明な対立遺伝子の効果の特定などを行えば、将来的に出芽日の QTL に強く連鎖している複数のマーカー遺伝子型によって出芽日の多様性評価ができることが期待される。このような QTL に基づいた対立遺伝子による適応関連形質の多様性評価は、保全の分野においてはまだ確立された手法ではないが、絶滅の危険性のある植物種においても将来有効な手法となりうると考えられる。

これまでは分子マーカーと形質によって評価された集団内変異に関係性が認められず (Reed and Frankham 2001) 分子マーカーを用いて適応関連形質の遺伝的多様性を評価することの是非については様々な議論がなされてきた (津村・岩田 2006)。しかし本研究において連鎖した遺伝子座を用いた形質の多様性評価の将来的な可能性が示唆されたことから、自然選択に中立であるとされるマーカーでも、QTL に強く連鎖するマーカーは形質の多様性評価を行うために、また連鎖していないマーカーはゲノム全体の多様性評価を行うために、マーカーのゲノム上での位置を考慮した利用が必要であると言える。

##### 5. 野生サクラソウ集団の保全のための指針

各集団の個体および多様性の再生を行う手法として、集団内の個体やシードバンクを

用いた個体の増殖や多様性再生、さらに生息域内保全による個体群維持が不可能になった場合の対応策として、他集団からの個体導入がある（鷲谷・矢原 1996）。しかしこれまで述べてきた通り、3つの長野集団のように自生地間の距離が近い集団間でも適応的な集団間分化が生じていたことから、自生地の距離が近いという理由による安易な集団間での移植は避けるべきである。他の集団の異質の遺伝子型が導入された場合、他殖弱勢による集団内の共通遺伝子複合体の崩壊やそれぞれの自生地の環境に適応した最適な遺伝組成の低下などが他の種でしばしば報告されている（Keller *et al.* 2000, Montalvo *et al.* 2001）。本研究に基づくと、野生サクラソウ集団の保全のために他集団からの移植が必要になった場合には、適応関連形質であり、なおかつ生存に深く関わる形質である出芽日を考慮すべきである。現時点ではまだ分子マーカーによる簡易な多様性評価が行えないが、2章で自生地の気温が出芽日の選択圧であることが明らかになっており、自生地の気温が高い集団の出芽日は早く、気温の低い集団の出芽日は遅いということが推測されることから、マーカーによる多様性評価が可能になるまでは、自生地の気温によって野生集団の出芽日の早晚を推測することも一方策であると言える。

## 6. 結論

本研究では、野生サクラソウ集団の量的形質の遺伝的多様性の評価を行うことによって、既存の分子マーカーによる遺伝的多様性と比較を行い、適応関連形質の特定とその集団間分化を引き起こす環境要因の推定し、表現型可塑性の遺伝的多様性を評価した。その結果、出芽日がサクラソウの生存において重要な形質であることが明らかになり、出芽日を考慮した保全単位を新たに設定し、さらに今後の生存可能性の推定を行った。特に保全単位は今後の保全策構築に際して、その集団の地域固有の適応的な遺伝組成を保全していくためには重要である。分子マーカーは近年では様々な目的に応じて多く利

用されているものの、適応に関する重要な情報を得ることができない。本研究は、分子マーカーに加えて、量的形質とその表現型可塑性の遺伝的多様性を評価することによって初めて保全に必要な遺伝的多様性の評価が可能となることを改めて示したものである。鷲谷ら(2005)はDNA技術が大きく発展しているなか、保全遺伝学の重要な問題のひとつとして適応に関わる遺伝子の解明とその組成の変化の把握の重要性を挙げており、これらは保全におけるモデル植物のゲノム解析が進むべき1つの方向性であることを述べている。本研究は、鷲谷ら(2005)の期待する展開の一端に応えるものである。

## 摘要

遺伝的多様性は種の適応進化の基盤であり、環境変動に対応していくために不可欠である。遺伝的多様性は高いほど潜在的な進化ポテンシャルを保有していると考えられている。分子マーカーによる評価は近年では比較的容易に行えることから多くの種で用いられている。しかし、分子マーカーは一般的に自然選択に中立であることから、集団が長期的に存続する上で重要な適応に関する遺伝的多様性を評価するためには、自然選択を受け、適応に関係していると考えられる量的形質の遺伝的多様性の評価を行うことが重要である。

サクラソウ (*Primula sieboldii*) は、北海道から九州およびアジア北東部に生息する多年生草本であり、自家不和合性をもつ異型花柱性である。また日本の伝統的な園芸植物の一つであるが、現在は開発や乱獲などによって準絶滅危惧植物に指定されている。これまでにサクラソウの保全のために葉緑体 DNA とマイクロサテライトマーカーを用いた核 DNA による野生集団の遺伝的多様性の評価に基づいて、保全単位が決定されている。しかしサクラソウの長期的な存続には、適応に関する遺伝的多様性の把握が不可欠である。そこで本研究では、野生サクラソウの保全のための適応関連形質の遺伝的多様性の評価を目的として、北海道と埼玉、長野の 3 地域由来 5 集団を用いて、量的形質とその表現型可塑性の集団内、集団間の遺伝的多様性の評価および適応関連形質の把握を試みた。さらに分子マーカーを用いた適応関連形質の遺伝的多様性の評価と異型花柱性に関する花型の識別が可能であるかを検証した。

これまでにサクラソウの多様性評価の指標とされてきた花卉形状と花卉面積の集団内、集団間の遺伝的変異を評価したところ、花卉の切れ込みと最大幅と面積は有意な集団間差が認められたものの、花卉形質の遺伝的変異は主に集団内に維持されていた。さ

らに花卉形質は自然選択に中立な形質であり、花卉形状変異の大部分を占める切れ込みと最大幅、長幅比に加え花卉面積が集団内の遺伝的多様性の目視評価の指標となりうることが示された。

次にサクラソウの適応関連形質に関する遺伝構造を評価するために 6 形質を対象に 2003 ~ 2005 年に同一環境栽培を行った。その結果、出芽日が集団内変異よりも集団間変異が大きく、出芽日と葉数の集団間の遺伝的分化程度 ( $Q_{ST}$ ) が分子マーカーによる遺伝的分化程度 ( $F_{ST}$ ) よりも大きいことから各自生地に異なる自然選択によって分化した形質であり、適応関連形質であることが示唆された。特に集団間の分化程度が大きかった出芽日においては、他の 4 集団に比べ明らかに遺伝的に分化した埼玉集団の自生地の気温は高く、実際に出芽日と自生地の気温の間に有意な負の相関が認められた。これは気温の低い環境で自生地している集団は出芽日が遅いことから、出芽時期の低温や遅霜が出芽日の選択圧となり集団間分化を引き起こしていることを示唆している。

6 形質の表現型可塑性における集団内・間の遺伝的変異の評価を行うために、2004 年につくばと諏訪、2005 年につくばと八ヶ岳で複環境栽培を行った。その結果、適応関連形質である出芽日の可塑性はつくばと諏訪で、またつくばと八ヶ岳で有意な集団間差が認められ、これらが自然選択を受けてきた形質であることが示唆された。特に八ヶ岳では、自生地の環境と大きくことなる埼玉集団の出芽率が顕著に低かったが、その中でも八ヶ岳の環境に対応できるジェネットが存在していた。他の 4 集団は気温が低い自生地由来であるため、これまで強い選択圧を受けてきたことが考えられるため、八ヶ岳の環境でも十分に対応できた。

形質の遺伝的多様性を分子マーカーによって間接的に評価が行えるかどうかを検証するために、出芽日と異型花柱性に関する花型を対象に、Kruskal-Wallis 検定より出芽日と花型に連鎖する遺伝子座を用いて多様性評価を行った。その結果、出芽日に連鎖す



る 2 遺伝子座で早晩を示す対立遺伝子が検出され、遺伝子座 09J20 では集団間変異がなく、出芽日との関係が認められなかったが、遺伝子座 08I22 では、集団間で対立遺伝子頻度は異なるものの、それにより出芽日の集団間の違いを説明することはできなかった。理由としては、遺伝子座と QTL とが強く連鎖しておらず、これらの間に組み換えが生じたこと、あるいはその寄与率が低かったことが考えられる。一方、集団の存続に強く関わる異型花柱性においては連鎖群 8 で花型の QTL の存在し、その近傍に位置する 4 遺伝子座で花型との関連を調べた結果、遺伝子座 ga1277 に長花柱花と短花柱花にそれぞれ特異的な対立遺伝子を示す遺伝子座が検出された。さらに 4 遺伝子座の遺伝子型で、野生集団の 68 ジェネット中 47 ジェネットの花型を識別することができたことから、自生地でのジェネットの花型の識別に分子マーカーが有効であることが示唆された。

本研究の結果から、本研究で用いた 5 集団は先行研究より北海道と他の 4 集団が異なる保全単位に分類されていたが、適応関連形質であり、サクラソウの生存に深く関わっている出芽日の集団間分化を考慮すると、3 つの長野集団と同じ単位に属していた埼玉集団は明らかに別の単位にすべきであること、また同じ長野集団でも 2003 年に有意に出芽日が異なった長野 2 と長野 3 集団は別の保全単位とすべきであることが示された。以上の結果から、サクラソウ保全単位を決める上では、適応関連形質の集団間分化を考慮する重要性が示された。今後は 5 集団以外の野生集団の出芽日の遺伝的多様性を評価することが必要であり、本研究では有効性が確認されなかったが、今後は連鎖地図の充実などの改善を加えながら、分子マーカーを用いた多様性評価の有効性を実証していく。

## 謝辞

本研究の計画、遂行ならびに取りまとめにあたり、筑波大学生命環境科学研究科准教授 大澤 良博士には、終始懇切なご指導と多大なご助言をいただきました。ここに深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行および本論文の取りまとめに関しまして、多くのご指導とご助言をいただきました筑波大学生命環境科学研究科教授 奥野員敏博士に深く感謝申し上げます。また、本研究および本論文の取りまとめに関しまして、森林総合研究所森林遺伝研究領域樹木遺伝研究室長 津村義彦博士、筑波大学生命環境科学研究科教授 江面 浩博士には、多大なご助言をいただきました。明治大学農学部 半田 高博士には多くの有益なご助言を頂きました。ここに謹んで感謝の意を表します。

プライマーの提供、遺伝解析の遂行および植替え作業に関しまして、森林総合研究所上野真義博士に丁寧なご指導と多大なご助言、ご協力をいただきました。本研究の計画、遂行、取りまとめおよび調査に関しまして、東北農業研究センター 本城正憲博士ならびに筑波大学生命環境科学研究科 北本尚子博士には、多大なご協力と有益なご助言そして常に暖かい励ましを頂きました。東京大学大学院能楽生命科学研究科教授 鷲谷いづみ博士ならびに 川上美奈子博士には QTL 解析を行うための重要な分離家系の提供をして下さいました。野菜茶業研究所 吉岡洋輔博士にはサクラソウの花弁形状に関して多くの助言をいただき、大変お世話になりました。心より御礼申し上げます。

八ヶ岳演習林での研究遂行におきましては、筑波大学大学院生命環境科学研究科元講師 黒田吉雄博士には、ご助言をいただくとともに調査器具や実験場所の提供をして頂きました。また筑波大学大学院生命環境科学研究科講師 清野達之博士ならびに助教 門脇正史博士には、八ヶ岳演習林での調査の補助、さらに研究遂行が円滑に進むよう調

査に多大なご協力をいただきました。技術専門職員の杉山昌典氏、井波明宏氏、上治雄介氏および非常勤職員 井出陽子氏には、八ヶ岳演習林での調査および作業の補助や八ヶ岳演習林の気象情報の提供など、日々の調査が円滑にいくよう様々なサポートをしていただきました。ここに心からの感謝の意を表します。

筑波大学農林技術センターおよび八ヶ岳演習林における実験準備や系統保存のための植替え作業や調査の手伝いなど、筑波大学植物育種学研究室の皆様には様々な場面における多大なご協力と暖かい励ましを頂きました。特に、育種学研究室の上田卓司氏、小玉昌孝氏、白形由貴氏には、筑波大学農林技術センターにおけるデータ調査や水遣りを、また原 尚資氏、岩松諒氏、多田裕樹氏には八ヶ岳演習林での植替え作業の手伝いをしていただきました。この場をお借りして心よりお礼申し上げます。

技術専門職員の白井靖子氏には筑波大学農林技術センターでの調査や水遣りなど、研究が円滑に進むよう様々な便宜を図っていただき、ここに改めて謝意を表します。

この全ての皆様のご協力とご助言なくしては、本研究を遂行することができませんでした。この場をお借りして、改めて厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- Ashman, T.L. and C.J. Majetic (2006) Genetic constraints on floral evolution: a review and evaluation of patterns. *Heredity* 96: 343-352.
- Bekessy, S.A., R.A. Ennos, M.A. Burgman, A.C. Newton and P.K. Ades (2003) Neutral DNA markers fail to detect genetic divergence in an ecologically important trait. *Biol. Conserv.* 110: 267-275.
- Bradshaw, A.D. (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advance in Genetics* 13: 115-155.
- Cano, J.M., H.D. Mäkinen, T. Leinonen, J. Freyhof, and J. Merilä (2008) Extreme neutral genetic and morphological divergence supports classification of Adriatic three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations as distinct conservation units. *Biol. Consev.* 141: 1055-1066.
- Clausen, D.J., D.D. Keck and W.M. Hiesey (1940) Experimental studies on the nature of Species. I. Effect of varied environments on Western North American Plants. Carnegie Institute of Washington Publications. 520pp.
- Conner, J.K., R. Franks and C. Stewart (2003) Expression of additive genetic variances and covariances for wild radish floral traits: comparison between field and greenhouse environments. *Evolution* 57: 487–495.
- Crandall, K.A., O.R.P. Bininda-Emonds, G.M. Mace and R.K. Wayne (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 290-295.
- de-Guia, A.P.O. and T. Saitoh (2007) The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and

- adaptive variation. *Ecol. Res.* 22: 604-612.
- Delesalle, V.A. and S.J. Mazer (1995) The structure of phenotypic variation in gender and floral traits within and among populations of *Spergularia marina* (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 82: 798-810.
- Denoël, M. (2007) Priority areas of intraspecific diversity: Larzac, a global hotspot for facultative paedomorphosis in amphibians. *Anim. conserv.* 10: 110-116.
- DeWitt, T.J., A. Sih and D.S. Wilson (1998) Cost and limits of phenotypic plasticity. *Trends Ecol. Evol.* 13: 77-81.
- Dowrick C. (1956) Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10: 219-236.
- Falconer, D.S. (1981) Introduction to quantitative genetics, 2nd ed. Longman, London. 340pp.
- 福田一郎 (1982) 選択と変異の保有: 集団の繁殖と構造: 生態遺伝と進化. pp.40-75. 酒井寛一編, 裳華房, 東京.
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. 617pp.
- Fraser, R. and L. Bernatchez (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Eco.* 10: 2741-2752.
- Frewen, B.E., T.H.H. Chen, G.T. Howe, J. Davis, A. Rohde, W. Boerjan and H.D. Bradshaw Jr. (2000) Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in *Populus*. *Genetics* 154: 837-845.
- Ghalambor, C.K., J.K. McKay, S.P. Carroll and D.N. Reznick (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Func. Ecol.* 21: 394-407.
- Givnish, T.J. (1988) Adaptation to sun and shade: A whole-plant perspective. *Aust. J. Plant*

- Physiol. 15: 63-92.
- Gordon, D.R. and K.J. Rice (1998) Patterns of differentiation in Wiregrass (*Aristida beyrichiana*): Implications for restoration effects. Restor. Ecol. 6: 166-174.
- Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Grattapaglia, D and R. Sederoff (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a Pseudo-Testcross: Strategy and RAPD markers. Genetics 137: 1121-1137.
- Guillet-Claude, C., C. Birolleau-Touchard, D. Manicacci, M. Fourmann, S. Barraud, V. Carret, J.P. Martinant and Y. Barrière (2004) Genetic diversity associated with variation in silage corn digestibility for three *O*-methyltransferase genes involved in lignin biotynthesis. Theor. Appl. Genet. 110: 126-135.
- Haig, S.M. (1998) Molecular contributions to conservation. Ecology 79: 413-425.
- Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani and R. Ohsawa (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. Biol. Conserv. 120: 215-224.
- Honjo, M., T. Handa, Y. Tsumura, I. Washitani, and R. Ohsawa (2008) Origins of traditional cultivars of *Primula sieboldii* revealed by nuclear microsatellite and chloroplast DNA variations. Breed. Sic. 58: 347-354.
- Honjo, M., N. Kitamoto, S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani and R. Ohsawa (in press) Management units of the endangered herb *Primula sieboldii* based on microsatellite variation among and within populations throughout Japan. Conserv. Genet.

ODI: 10.1007/s10592-007-9292-4

本城正憲 (2005) サクラソウ集団における遺伝的多様性の保全に関する分子生態遺伝学的研究. 筑波大学大学院生命環境科学研究科, 博士論文. 154pp.

Holderegger, R., U. Kamm and F. Gugerli (2006) Adaptive vs. Neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Land. Ecol.* 21: 797-807.

Howe, G.T., S.N. Aitken, D.B. Neale, K.D. Jermstad, N.C. Wheeler and T.H.H. Chen (2003) From genotype to phenotype: unraveling the complexities of cold adaptation in forest trees. *Can. J. Bot.* 81:1247-1266

Hurme, P, T. Repo, O. Savolainen and T. Paakkonen (1997) Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*) *Can. J. For. Res.* 27: 716-723.

Isagi, Y., M. Honjo and I. Washitani (2001) Development of microsatellite markers for *Primula sieboldii* using degenerate oligonucleotideprimed PCR-amplified DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1: 22-24.

Ishihama, F., C. Nakano, S. Ueno, M. Ajima, Y. Tsumura and I. Washitani (2003) Seed set and gene flow patterns in an experimental population of an endangered heterostylous herb with controlled local opposite-morph density. *Func. Ecol.* 17: 680-689.

岩田洋佳 (2003) Makijaku ver. 1.1

<http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/makijaku/index.html>

Iwata, H. and Y. Ukai (2002) SHAPE: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93: 384-385.

Iwatsuki, K. (2008) Endangered vascular plants in Japan. –Present status and a proposal for conservation- *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 84: 275-286.

Jermstad, K.D., D.L. Bassoni, K.S. Jech, G.A. Ritchie, N.C. Wheeler and D.B. Neale (2003)

- Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas Fir. III. Quantitative trait loci-by-environment interaction. *Genetics* 165: 1489-1506.
- Jones, H., F.J. Leigh, I. Mackay, M.A. Bower, L.M.J. Smith, M.P. Charles, G. Jones, M.K. Jones, T.A. Brown and W. Powell (2008) Population-based resequencing reveals that the flowering time adaptation of cultivated barley originated east of the fertile crescent. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2211-2219.
- Jump, A.S. and J. Peñuelas (2005) Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecol. Lett.* 8: 1010-1020.
- 環境省 (2008) 第3次生物多様性国家戦略. - 人と自然が共生する「いきものにぎわいの国づくり」を目指して - . p.13. 環境省編, 東京.
- 環境庁 (2000) 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物. レッドデータブック - 植物 (維管束植物). 環境庁, 東京. 660pp.
- Karhu, A. P. Hurme, M. Karjalainen, P. Karvonen, K. Karkkainen, D. Neale and O. Savolainen (1996) Do molecular markers reflect patterns of differentiation in adaptive traits of conifers? *Theor. Appl. Genet.* 96: 215-221.
- Keller, M., J. Kollmann and P.J. Edwards (2000) Genetic introgression from distant provenances reduces fitness in local weed populations. *J. Appl. Ecol.* 37: 647-659.
- Kitamoto, N., M. Honjo, S. Ueno, A. Takenaka, Y. Tsumura, I. Washitani and R. Ohsawa (2005) Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing beside separate streams. *Mol. Ecol.* 14: 149-157.
- Klinkhamer, P.G.L. and C.A.M. van der Veen-van Wijk (1999) Genetic variation in floral traits of *Echium vulgare*. *Oikos* 85: 515-522.
- Knapp, E.E. and K.J. Rice (1996) Genetic structure and gene flow in *Elymus glaucus* (blue



- wildrye): Implications for native grassland restoration. *Restor. Ecol.* 4: 1-10.
- 小林達明, 倉本宣 (2006) 生物多様性保全に配慮した緑化植物の取り扱い方法 - 「動かしてはいけない」という声に応えて: 生物多様性緑化ハンドブック. pp.13-57.  
小林達明, 倉本宣編, 地人書館, 東京.
- 河野昭一 (1974) 植物の進化生物学 種の分化と適応. 三省堂, 東京. 407pp.
- 工藤 洋 (2000) 表現型可塑性とは何か: 花生態学の最前線 - 美しさの進化的背景を探る - pp.66-74. 種生物学会編, 文一総合出版, 東京.
- Lande, R. (1992) Neutral theory of quantitative genetic variation in an island model with local extinction and colonization. *Evolution* 46: 381-389.
- Leinonen, T., R.B. O'hara, J.M. Cano and J. Merilä (2008) Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *J. Evol. Biol.* 21: 1-17.
- Li, J., M. Webster, M. Furuya and P.M. Gilimartin (2007) Identification and characterization of pin and thrum alleles of two co-segregate with the *Primula S* locus. *Plant J.* 51: 18-31.
- Macdonald, S.E. and C.C. Chinnappa (1989) Population differentiation for phenotypic plasticity in the *stellaria longipes* complex. *Am. J. Bot.* 76: 1627-1637.
- Manfield, I.W., V.K. Pavlov, J. Li, H.E. Cook, H. Hummel and P.M. Gilmartin (2005) Molecular characterization of DNA sequences from the *Primula bulgaris S*-locus. *J. Exp. Bot.* 56: 1177-1188.
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220
- Mckay, J.K., J.G. Bishop, J. Lin, J.H. Richards, A. Sala and T. Mitchell-Olds (2001) Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268: 1715-1721.

- McKay, J.K., C.E. Christian, S. Harrison and K.J. Rice (2005) "How local is local?" A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restor. Ecol.* 13: 432-440.
- McKay, J.K. and R.J. Latta (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends Ecol. Evol.* 17: 285-291.
- McNeely, J.A. (1988) Economics and biological diversity: Developing and using economic incentives to conserve biological resources. IUCN, Gland, Switzerland. 236pp.
- McNeely, J.A., K.R. Miller, W.V. Reid, R.A. Mittermeier and T.B. Werner (1990) Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, CI, WWF-US, the World Bank, Gland, Switzerland and Washington D.C. 193pp.
- Merilä, J. and P. Crnokrak (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *J. Evol. Biol.* 14: 892-903.
- Montalvo, A.M. and N.C. Ellstrand (2001) Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus Scoparius* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* 88: 258-269.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Nei, M. and A.K. Roychoudhury (1974) Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
- 野田響, 中村真由美, 村岡裕由, 鷺谷いづみ (2006) サクラソウの生理生態学: サクラソウの分子遺伝生態学 - エコゲノム・プロジェクトの黎明 - . pp.115-130. 鷺谷いづみ編, 東京大学出版会, 東京.
- プリマック, R.B., 小堀洋美 (1997) 保全生物学と生物多様性: 保全生物学のすすめ 生物多様性保全のためのニューサイエンス. pp.12-87. 文一総合出版, 東京 .

- Randall, J.M. and R.G. Shaw (1993) Heritability of floral traits for the perennial wild flower *Penstemon centranthifolius* (Scrophulariaceae): clones and crosses. *Heredity* 71: 185-192.
- Reed, D.H. and R. Frankham (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095-1103.
- Richards, R.T., J.C. Chambers and C. Ross (1998) Use of native plants on federal lands: Policy and practice. *J. Range Manage.* 51: 625-632.
- Ryder, O.A. (1986) Species conservation and systematics: the dilemma of the subspecies. *Trends Ecol. Evol.* 1: 9-10.
- Santamaría, L., J. Figuerola, J.J. Pilon, M. Mjelde, A.J. Green, T. de-Boer, R.A. King and R.J. Gornall (2003) Plant performance across latitude: The role of plasticity and local adaptation in an aquatic plant. *Ecology* 84: 2454-2461.
- Scheiner, S.M. (1993) Genetic and evolution of phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 35-68.
- Schlichting, C.D. (1986) The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17: 667-693.
- 植物育種学辞典 (2005) 日本育種学会編, 培風館, 東京. 785pp.
- Skøt, L., M.O. Humphreys, I. Armstead, S. Heywood, K.P. Skøt, R. Sanderson, I.D. Thomas, K.H. Chorlton and N.R.S. Hamilton (2005) An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* (L.) *Mol. Breed.* 15: 233-245.
- Spitze, K. (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics* 135: 367-374.

- Storfer, A. (1996) Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *Trends Ecol. Evol.* 11: 343-348.
- 杉坂次郎, 川越哲博, 工藤洋 (2007) シロイヌナズナにおける開花の表現型可塑性とその分子遺伝学的基盤. *日本生態学会誌* 57: 48-54.
- 鳥居恒夫 (1985) さくらそう. 日本テレビ, 東京. 151pp.
- 塚谷裕一 (2007) 植物の表現型可塑性とその進化: 植物の進化 pp.116-123. 秀潤社, 東京.
- 津村義彦 (2001) プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド: 森の分子生態学. pp.158-169. 種生物学会編, 文一総合出版, 東京 .
- 津村義彦, 岩田洋佳 (2006) 遺伝的データを用いた緑化のガイドラインとそれに基づく三宅島の緑化計画: 生物多様性緑化ハンドブック. pp.77-89. 小林達明, 倉本宣編, 地人書館, 東京.
- Ueno, S., Y. Tsumura and I. Washitani (2003) Development of microsatellite markers in *Primula sieboldii* E. Morren, a threatened Japanese perennial herb. *Conserv. Genet.* 4: 809–811.
- Ueno, S., N. Kitamoto, R. Ohsawa, Y. Tsumura and I. Washitani (2005) Nine additional microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Morren. *Conserv. Genet.* 6: 1063–1064.
- 鵜飼保雄 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析 MAPとQTL. 東京大学出版会, 東京. 350pp.
- 鵜飼保雄 (2002) 量的形質の遺伝解析. 医学出版, 東京. 354pp.
- van-Kleunen, M. and M. Fischer (2005) Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New phytol.* 166: 49-60.
- Via, S. (1994) The evolution of phenotypic plasticity: What do we really know? In: *Ecological*

- Genetics. (Ed. Real, L.A.). pp.35-57. Princeton University Press, New Jersey.
- Vogler, D.W., S. Peretz and A.D. Stephenson (1999) Floral plasticity in an iteroparous plant: the interactive effects of genotype, environment, and ontogeny in *Campanula rapunculoides* (Campanulaceae). *Am. J. Bot.* 86: 482-494.
- Washitani, I. and H. Kabaya (1988) Germination responses to temperature responsible for the seedling emergence seasonality of *Primula sieboldii* E. Morren in its natural habitat. *Ecol. Res.* 3: 9-20.
- Washitani, I., H. Namai, R. Ohsawa and M. Niwa (1991) Species biology of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat population. I. Inter-clonal variations in the flowering phenology, pollen load and female fertility component. *Plant Species Biol.* 6: 27-37.
- Washitani, I., R. Osawa, H. Namai and M. Niwa (1994) Importance of queen bumble bees as pollinators facilitating inter-morph crossing in *Primula sieboldii*. *Plant Species Biol.* 9: 169-176.
- 鷲谷いづみ, 矢原徹一 (1996) 保全生態学入門 遺伝子から景観まで. 文一総合出版, 東京. 271pp.
- 鷲谷いづみ, 武内和彦, 西田睦 (2005) 保全を目指す遺伝学: 生態系へのまなざし. pp.251-279. 東京大学出版会, 東京.
- 鷲谷いづみ (2006) 序章-1: サクラソウの分子遺伝生態学 エコゲノム・プロジェクトの黎明. pp.1-14. 鷲谷いづみ編, 東京大学出版会, 東京.
- Weinig, C. (2000) Plasticity versus canalization: population differences in the timing of shade-avoidance responses. *Evolution* 54: 441-451.
- Weir, B.S. and C.C. Cockerham (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population

structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wilcox, P.L., C.E. Echt and R.D. Burdon (2007) Gene-assisted selection: applications of association genetics for forest tree breeding. In: *Association mapping in plants*. (Eds. Oraguzie, N.C., E.H.A. Rikkerink, S.E. Gardiner, H.N. De-Silva), pp.211-247, Springer, New York.

Worley, A.C. and S.C.H. Barrett (2001) Evolution of floral display in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): genetic correlations between flower size and number. *J. Evol. Biol.* 14: 469-481.

Yamazaki, T. (1993) *Primula*. In: *Flora of Japan* 3a. (Eds. Iwatsuki, K., T. Yamazaki, D.E. Boufford, H. Ohba). pp.87-94. Kodansha, Tokyo.

吉田実 (1980) 1 因子実験計画: 畜産を中心とする実験計画法. p.83. 養賢堂, 東京.

Yoshida, Y., M. Honjo, N. Kitamoto and R. Ohsawa (2008) Genetic variation and differentiation of floral morphology in wild *Primula sieboldii* evaluated by image analysis and SSR markers. *Breed. Sci.* 58: 301-307.

Yoshioka, Y., H. Iwata, R. Ohsawa and S. Ninomiya (2004) Analysis of petal variation of *Primula sieboldii* by elliptic Fourier descriptors and principal component analysis. *Ann. Bot.* 94: 657-664.

Yoshioka, Y., K. Ohashi, A. Konuma, H. Iwata, R. Ohsawa and S. Ninomiya (2007a) Ability of bumblebees to discriminate differences in the shape of artificial flowers of *Primula sieboldii* (Primulaceae). *Ann. Bot.* 99: 1175-1182.

Yoshioka, Y., M. Honjo, H. Iwata, R. Ohsawa and S. Ninomiya (2007b) Pattern of geographical variation in petal shape in wild populations of *Primula sieboldii* E. Morren. *Plant Species Biol.* 22: 87-93.