

DA
1642
1996
HG

常緑性ツツジの類縁関係と園芸品種の起源解明
に関する研究

筑波大学大学院
農学研究科
農林学専攻

小林伸雄

寄	贈
小林 伸雄 氏	平成
	年
	月
	日

目次

ページ

第1章 序論	1
第1節 ツツジ属の分類と日本のツツジ属植物	1
1. ツツジ属植物の分布	1
2. ツツジ属植物の分類体系	2
3. ツツジに関する用語の定義	6
第2節 ツツジ属植物のフェノロジー	7
第3節 ツツジの園芸品種とその成立	11
第4節 本研究の目的	15
第1章の要約	17
第2章 常緑性ツツジにおけるDNAマーカーの適用	18
第1節 DNA抽出法の検討	18
1. ツツジ属植物からのDNA抽出法の確立	19
2. 改変CTAB法の他の植物への応用	23
第2節 常緑性ツツジ園芸品種へのDNAマーカーの適用	26
1. 常緑性ツツジ園芸品種のRAPDマーカーによる同定	26
2. 常緑性黄花ツツジ育成過程におけるRAPDマーカーの遺伝性	32
第3節 常緑性ツツジにおける葉緑体DNAマーカーの遺伝性の検討	40
第2章の要約	50
第3章 九州霧島山系における標高別野生ツツジ集団の解析	51
第1節 形態学的調査	51
第2節 ミトコンドリアおよび葉緑体のDNAマーカーによる解析	67
第3節 多変量解析による総合的評価	84
第3章の要約	94

第4章 常緑性ツツジの葉緑体DNA解析	95
第1節 九州各地における野生種の葉緑体DNA解析	95
第2節 園芸品種の葉緑体DNA解析	106
第4章の要約	112
第5章 総合考察	114
摘要	122
謝辞	125
引用文献	128

第1章 序論

本研究を始めるにあたってまずこの第1章では，ツツジ属の分布と日本のツツジ属植物の分類体系，ツツジ属植物のフェノロジー，園芸品種成立の沿革，そして，本研究の目的について述べる。

第1節 ツツジ属の分類と日本のツツジ属植物

1. ツツジ属植物の分布

ツツジ科 (Ericaceae) ツツジ (*Rhododendron*) 属の植物は，約800種から構成され，北半球を中心に広く分布している。日本にはそのうちの約50種が自生している (中尾・和田，1970)。

ツツジ属植物の起源中心とされる中国 (中華人民共和国) の雲南・四川地域では常緑のシャクナゲが大部分であるのに対し，中国の中南部から日本と北米東部にわたる地域では常緑性あるいは落葉性のツツジの大部分が分布している。日本では，中国に多い常緑性のヤマツツジの仲間と北アメリカに多い落葉性のレンゲツツジの両者に加え，シロヤシオ，アカヤシオ，オオバツツジ，コメツツジ，バйкаツツジ等の固有種が数多く分布している。また，中国大陸に4種だけのミツバツツジの仲間が日本に18種ほど野生し，日本列島の各地で種分化が起こったと考えられていることから，日本はツツジ属のうち特にツツジ亜属やミツバツツジ亜属の二次的な発生中心であるとも言えるであろう (高田，1981；山崎，1989b)。

2. ツツジ属植物の分類体系

Linne (1753) は現在のツツジ属を *Rhododendron* と *Azalea* の二属に分類したが、今日では、後者は前者の異名となり、特にツツジ類に対して用いられている。19世紀中頃から今世紀の初頭にかけてプラントハンターらが中国、ヒマラヤから多くの新種を英国に導入したことにより、今世紀の初めに英国王立エジンバラ植物園の Balfour (国重ら, 1989) や Stevenson (1930) によりツツジ属を園芸的に43シリーズ (series) に分類する体系が発表された。その後、オランダの Sleumer (1949, 1978) による9亜属17節に分ける分類がなされ、一般の承認を得ているが、近年、エジンバラ植物園の研究者 (Cullen, 1980; Chamberlain, 1982; Chamberlain and Rae, 1990) による改訂がなされており、いまだ完全には確定していない (中尾・和田, 1970; 国重ら, 1989; 大場, 1995)。

さらに日本においては山崎 (1989a, b) が日本原産のツツジ属について詳しく分類し、現在ではその分類体系が日本で最もよく用いられている。本研究では、この山崎の分類体系 (第1-1表) に基づいて研究を進めたので、以下にその概要を述べる。

ツツジ属はツツジ科の中で比較的原始的と考えられるツツジ連 (Tribe *Rhodoreae*) に含まれ、5花弁が合生する花冠は左右対称で、葯が先端で開孔し、短い花序に散形状に花をつけ、鱗片状の包葉は果期には落ちる等の特徴をもつ。このツツジ属は、さらに若枝や葉に鱗状毛があり若葉が芽の中で内巻きにたたまるヒカゲツツジ群 (Grex *Rhododendron*) と、鱗状毛はなく若葉が芽の中で外巻きにたたまるツツジ・シャクナゲ群 (Grex *Hymenanthus*) の2群に大きく分けられる (原, 1989)。

450種ほどからなるヒカゲツツジ群は3亜属に大別され、このうち、日本にはエゾムラサキツツジ (*R. dauricum*) とゲンカイツツジ (*R. mucronulatum* var. *ciliatum*) が属すゲンカイツツジ亜属 (Subgen. *Rhodorastrum*) と、ヒカゲツツ

Z

第1-1表. 日本のツツジ属の分類体系

ツツジ科	ツツジ亜科	ツツジ連	ツツジ属	ヒカゲツツジ群	
	イワナシ亜科		ハコネコメツツジ属	ツツジ・シャクナゲ群	
	スノキ亜科		エゾツツジ属		
	エリカ亜科		イソツツジ属		
			ヨウラクツツジ属		
ヒカゲツツジ群	ゲンカイツツジ亜属		エゾムラサキツツジ ゲンカイツツジ	<i>R. dauricum</i> L. <i>R. mucronulatum</i> Turcz. var. <i>ciliatum</i> Nakai	
	ヒカゲツツジ亜属	サカイツツジ列 ヒカゲツツジ列	サカイツツジ ヒカゲツツジ	<i>R. lapponicum</i> L. subsp. <i>parvifolium</i> (Adams) Yamazaki <i>R. keiskei</i> Miq.	
ツツジ・シャクナゲ群	バイカツツジ亜属	セイシカ節	セイシカ アマミセイシカ	<i>R. latoucheae</i> Franch. <i>R. amamiense</i> Ohwi	
		トキワバイカツツジ節	トキワバイカツツジ	<i>R. uwaense</i> Hara et yamanaka	
		バイカツツジ節	バイカツツジ	<i>R. semibarbatum</i> Maxim.	
	ツツジ亜属	コメツツジ節	コメツツジ	<i>R. tschonoskii</i> Maxim.	
		モチツツジ節	ケラマツツジ列	ムニンツツジ サキシマツツジ ケラマツツジ ヤクシマヤマツツジ	<i>R. boninense</i> Nakai <i>R. amanoi</i> Ohwi <i>R. scabrum</i> D. Don <i>R. yakuinsulare</i> Masamune
			モチツツジ列	モチツツジ キシツツジ	<i>R. macrosepalum</i> Maxim. <i>R. ripense</i> Makino
		ヤマツツジ節	ウンゼンツツジ列	ウンゼンツツジ	<i>R. yedoense</i> Maxim. var. <i>hallaisanense</i> (Lev.) Yamazaki <i>R. serpyllifolium</i> (A. Gray) Miq.
	クロフネツツジ亜属 (ミツバツツジ)	クロフネツツジ節	サツキ列	マルバサツキ サツキ	<i>R. eriocarpum</i> (Hayata) Nakai <i>R. indicum</i> (L.) Sweet
			ヤマツツジ列	シナヤマツツジ オオヤマツツジ アシタカツツジ ヤマツツジ フジツツジ ミヤマキリシマ	<i>R. simsii</i> Planchon <i>R. transiens</i> Nakai <i>R. komiyamae</i> Makino <i>R. obtusum</i> (Lindl.) Planchon var. <i>kaempferi</i> (Planchon) Wilson <i>R. tosaense</i> Makino <i>R. kiusianum</i> Makino
		シロヤシオ節	クrofネツツジ列	クrofネツツジ	<i>R. schlippenbachii</i> Maxim.
			シロヤシオ節	シロヤシオ	<i>R. quinquefolium</i> Bisset et Moore
		ミツバツツジ節	サクラツツジ列	サクラツツジ	<i>R. lashiroyi</i> Maxim.
			オンツツジ列	オンツツジ ジングウツツジ アマギツツジ	<i>R. weyrichii</i> Maxim. <i>R. sanctum</i> Nakai <i>R. amagianum</i> Makino
	ミツバツツジ列		ミツバツツジ ウラジロミツバツツジ タカクマミツバツツジ アまくサミツバツツジ ヒュウガミツバツツジ	<i>R. dilatatum</i> Miq. <i>R. osuzuyamense</i> Yamazaki <i>R. viscostylum</i> Nakai <i>R. amakusaense</i> (Takada ex Yamazaki) Yamazaki <i>R. hyugaense</i> (Yamazaki) Yamazaki	
	トウゴクミツバツツジ列		トウゴクミツバツツジ	<i>R. wadanum</i> Makino	
ムラサキヤシオツツジ亜属 (レンゲツツジ)	レンゲツツジ節	コバノミツバツツジ列	ユキグニミツバツツジ サイゴクミツバツツジ ヤクシマミツバツツジ コバノミツバツツジ ナンゴクミツバツツジ キヨスミツバツツジ	<i>R. lagopus</i> Nakai var. <i>niphophilum</i> (Yamazaki) Yamazaki <i>R. nudipes</i> Nakai <i>R. yakumontanum</i> (Yamazaki) Yamazaki <i>R. reticulatum</i> D. Don <i>R. mayebarae</i> Nakai et Hara <i>R. kiyosumense</i> Makino	
		レンゲツツジ	レンゲツツジ	<i>R. japonicum</i> (A. Gray) Suringar	
	ムラサキヤシオツツジ節	ムラサキヤシオツツジ	<i>R. albrechtii</i> Maxim.		
	オオバツツジ節	オオバツツジ	<i>R. nipponicum</i> Matsumura		
	アカヤシオ節 (アケボノツツジ)	アカヤシオ (アケボノツツジ)	<i>R. pentaphyllum</i> Maxim. var. <i>nikoense</i> Komatsu <i>R. pentaphyllum</i> Maxim. var. <i>shikokianum</i> Yamazaki		
シャクナゲ亜属	ハクサンシャクナゲ列	キバナシャクナゲ ハクサンシャクナゲ	<i>R. aureum</i> Georgi <i>R. brachycarpum</i> G. Don		
	シャクナゲ列	アズマシャクナゲ ヤクシマシャクナゲ エンシュウシャクナゲ	<i>R. degronianum</i> Carriere <i>R. yakusimanum</i> Nakai <i>R. makinoi</i> Tagg ex Nakai		

Z ; 山崎 (1989a,b) による

ジ列 (Ser. *Lapponicum*) のヒカゲツツジ (*R. keiskei*) とサカイツツジ列 (Ser. *Triflorum*) のサカイツツジ (*R. lapponicum* ssp. *parvifolium*) が属すヒカゲツツジ亜属 (Subgen. *Rhododendron*) の2亜属が分布している。日本以外では、主にマレーシア、パプア・ニューギニアに約280種あるマレーシャクナゲ亜属 (Subgen. *Vireya*) が知られている。

一方、500種ほどが知られ非常に形態的变化に富んだツツジ・シャクナゲ群は、バイカツツジ亜属 (Subgen. *Azaleastrum*)、ツツジ亜属 (Subgen. *Tsutsusi*)、ミツバツツジ亜属 (Subgen. *Schiadorhodion*)、レンゲツツジ亜属 (Subgen. *Pentanthera*)、シャクナゲ亜属 (Subgen. *Hymenanthus*) の5亜属に大別される。

バイカツツジ亜属はさらに4節に分類され、日本にはこのうち3節が分布し、セイシカ節 (Sect. *Choniastrum*) のセイシカ (*R. latoucheae*) とアマミセイシカ (*R. amamiense*)、トキワバイカツツジ節 (Sect. *Azaleastrum*) のトキワバイカツツジ (*R. uwaense*)、およびバイカツツジ節 (Sect. *Mumeazalea*) のバイカツツジ (*R. semibarbatum*) の4種が自生している。

中国に約50種、日本に19種が分布しているツツジ亜属にはコメツツジ節 (Sect. *Tschonoskia*) として区別されるコメツツジ (*R. tschonoskii*) と、その下位に2亜節5列が設けられており、ケラマツツジ (*R. scabrum*) やムニンツツジ (*R. boninense*) 等が属すケラマツツジ列 (Ser. *Scabra*) と、モチツツジ (*R. macrosepalum*) やキシツツジ (*R. ripense*) 等が属すモチツツジ列 (Ser. *Macrosepala*) を含むモチツツジ亜節 (Subsect. *Macrosepala*) と、ヤマツツジ (*R. obtusum* var. *kaempferi*)、シナヤマツツジ (*R. simsii*)、ミヤマキリシマ (*R. kiusianum*) 等が属すヤマツツジ列 (Ser. *Kaempferia*)、サツキ (*R. indicum*) とマルバサツキ (*R. eriocarpum*) からなるサツキ列 (Ser. *Tsutsusi*) のほか、ウンゼンツツジ (*R. serpyllifolium*) 1種のウンゼンツツジ列 (Ser. *Serpyllifolia*) を含むヤマツツジ亜節 (Subsect. *Tsutsusi*) がある。これら日本のツツ

ジ亜属のうち、ケラマツツジ列、モチツツジ列、ヤマツツジ列、サツキ列からは選抜と交配により「リュウキュウツツジ」、「ヒラドツツジ」、「オオキリシマ」、「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「サツキ」等多数の園芸品種群が作出されている。

中国の4種、朝鮮の1種以外は日本の固有種であるミツバツツジ亜属には、朝鮮から中国東部のクロフネツツジ (*R. schlippenbachii*) 1種が属すクロフネツツジ節、シロヤシオ (*R. quinquefolium*) 1種のシロヤシオ節 (Sect. *Quinquefolia*) と、著しく分化したミツバツツジ節 (Sect. *Brachycalyx*) の3節がある。ミツバツツジ節はさらに5列に分類され、サクラツツジ (*R. tashiroi*) のみからなるサクラツツジ列 (Ser. *Brachycalyx*)、オンツツジ (*R. weyrichii*)、ジングウツツジ (*R. sanctum*)、アマギツツジ (*R. amagianum*) の3種が属すオンツツジ列 (Ser. *Weyrichia*)、関東・中部地方のミツバツツジ (*R. dilatatum*) と北海道から九州まで地域ごとにその変種が分化しているミツバツツジ列 (Ser. *Dilatata*)、トウゴクミツバツツジ (*R. wadanum*) のみからなるトウゴクミツバツツジ列、コバノミツバツツジ (*R. reticulatum*)、サイゴクミツバツツジ (*R. nudipes*)、ヤクシマミツバツツジ (*R. yakumontanum*) 等が属すコバノミツバツツジ列 (Ser. *Reticulata*) がある。

レンゲツツジ亜属は4節に分けられ、日本ではレンゲツツジ (*R. japonicum*) のみが属し、他の大部分は北アメリカに分布するレンゲツツジ節 (Sect. *Pentantha*)、ムラサキヤシオツツジ (*R. albrechtii*) 1種が属すムラサキヤシオツツジ節 (Sect. *Rhodora*)、オオバツツジ (*R. nipponicum*) のみからなるオオバツツジ節 (Sect. *Viscidula*)、アカヤシオ (*R. pentaphyllum* var. *nikoense*) 1種からなるアカヤシオ節 (Sect. *Pentaphylla*) がある。

ヒマラヤから中国の西部を中心としたアジア地域に約200種が知られるシャクナゲ亜属のうち、日本にはヤクシマシャクナゲ (*R. yakusimanum*)、ツクシシャク

ナゲ (*R. degronianum* subsp. *heptamerum*), アズマシャクナゲ (*R. degronianum*), エンシュウシャクナゲ (*R. makinoi*) が属すシャクナゲ列 (Ser. *Hymenanthes*) と, ハクサンシャクナゲ (*R. brachycarpum*) 及びキバナシャクナゲ (*R. aureum*) が属すハクサンシャクナゲ列 (Ser. *Pontica*) の2列が分布している (山崎1989a, b)。

本研究ではおもに, 前述のヤマツツジ列に属すキリシマツツジ (*R. obtusum*), サタツツジ (*R. sataense*), ヤマツツジ (*R. obtusum* var. *kaempferi*), ミヤマキリシマ (*R. kiusianum*), フジツツジ (*R. tosaense*) 等を材料として扱い, これらの類縁関係と, これらの種より作出された園芸品種群である「江戸キリシマ」や, 「クルメツツジ」の成立起源を解明しようとした。

3. ツツジに関する用語の定義

本研究では, このように多くの種から構成されるツツジ属と, 複雑な園芸品種群の名称としてツツジ (*Rhododendron*) 属植物全般を指す場合にツツジ属, その中の1亜属であるツツジ亜属 (Subgen. *Tsutsusi*) を指す場合にツツジ亜属とした。このうち特にケラマツツジ列, モチツツジ列, ヤマツツジ列, サツキ列に属する常緑性あるいは半常緑性の野生種またはそれらを母種とする園芸品種に対し, 常緑性ツツジあるいは単にツツジという言葉を用いた。

また, 野生種は括弧を用いずにそのままカタカナで表記するのに対し, 園芸品種名には ‘ ’, 園芸品種をグループとしてまとめた園芸品種群には「 」を付した。

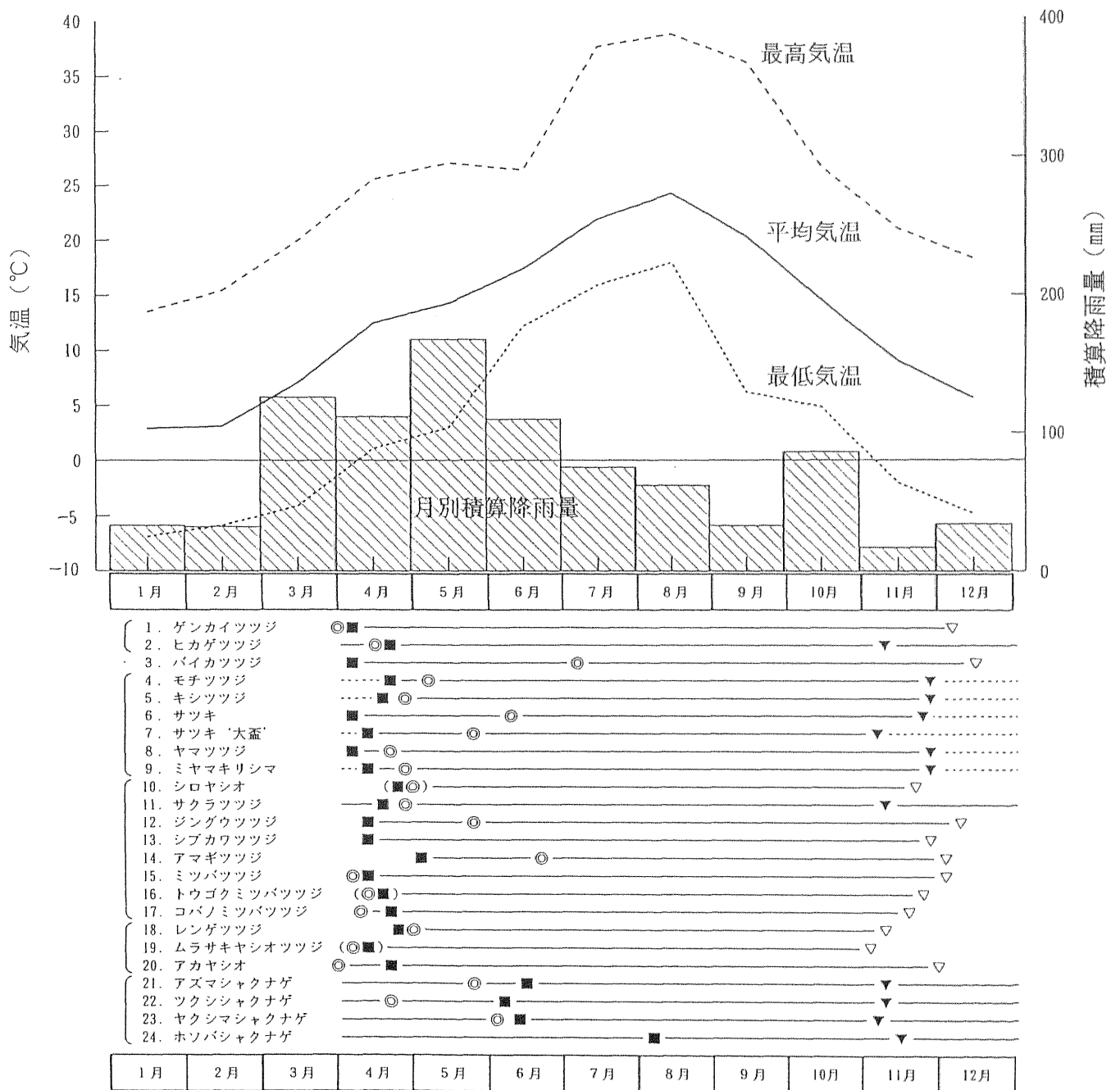
第2節. ツツジ属植物のフェノロジー

生物季節学と訳されるフェノロジー (Phenology) は、動植物の生物現象と気候、気象の時期的変化との相互関係を研究する学問であり (渡辺, 1988; 八田, 1989), 植物におけるフェノロジー観察では、植物分類の基礎とされる形態学的な特性を確認しつつ、各種間の生育パターンの違いや各生育期における形態的特性を把握することができる。

ツツジ属では数種の観察例 (Wade, 1976; Nilsen, 1986; 八田, 1990) がみられるに過ぎないが、本研究では次章以降におけるツツジ属植物の適切な分類、識別のために、日本の野生種18種、1亜種、4変種および1栽培品種についてフェノロジー観察を行い、ツツジ属植物の形態的、生態的形質を把握しようとしてきた。また得られた結果より、系統間におけるこれらの生活環の相違についても検討を加えた (小林, 1992; 小林・八田, 1993)。

筆者はこれまでに国立科学博物館筑波実験植物園 (茨城県つくば市天久保4-1) 植栽のツツジ属植物 (ゲンカイツツジ, ヒカゲツツジ, バイカツツジ, モチツツジ, キシツツジ, サツキ, 「サツキ」 '大盃', ヤマツツジ, ミヤマキリシマ, シロヤシオ, サクラツツジ, ジングウツツジ, シブカワツツジ, アマギツツジ, ミツバツツジ, トウゴクミツバツツジ, コバノミツバツツジ, レンゲツツジ, ムラサキヤシオツツジ, アカヤシオ, アズマシャクナゲ, ツクシシャクナゲ, ヤクシマシャクナゲ, エンシュウシャクナゲ) を材料として、1992年の春の冬芽の裂開から秋の落葉までの生活環を1シーズンを通して観察記録を行い、生物季節学的なデータを集めた。その結果、シュートの伸長パターンや、葉の展開時期と開花時期の違い、紅葉、落葉等の生育パターンにより、これらをいくつかに類別することができた (第1-1図)。

まず、シュートの生育パターンについてみると、高地性のシロヤシオ、レンゲ



括弧は並戻単位, ◎: 開花, ■: 展葉(半常緑種は春葉), ▽: 落葉(落葉種), ▼: 前年葉または夏葉の脱落(常緑または半常緑種), ()内は同時.

第1-1図. 1992年の筑波実験植物園の月別気温と積算降雨量(上図)
および観察したツツジ属の1シーズンの生育相の変化(下図)

ツツジ、ムラサキヤシオツツジおよびアカヤシオではシュート伸長が春季の1カ月前後で終了するのに対し、ツツジ亜属の種については、春季の葉芽の裂開から夏季の頂芽形成の直前まで生育が続く生育パターンを示した。しかし、九州の高山に自生するミヤマキリシマは比較的短期間に生育を停止し、高地性のグループに似た生育パターンを示した。また、ミツバツツジ亜属（サクラツツジ、ジングウツツジ、シブカワツツジ、アマギツツジ、ミツバツツジ、トウゴクミツバツツジ、コバノミツバツツジ）では、頂枝の葉が展開後、腋生する側枝が勢いよく伸長し、仮軸分枝の「添伸」（島地・倉田，1978）の状態を示した。

展葉・開花の時期の違いについてみると、ゲンカイツツジ、ヒカゲツツジ、ミツバツツジ類（ミツバツツジ、トウゴクミツバツツジ、コバノミツバツツジ）およびムラサキヤシオツツジ亜属は、4月の展葉に先立ち、あるいは展葉とほぼ同時に開花した。春季、越冬芽の裂開によって展開する葉（春葉）と夏季後半にかけて展開する葉（夏葉）をもつツツジ亜属では、春葉の展葉中に開花するモチツツジ、キシツツジと、6月に入って夏葉の展葉に伴い開花するサツキがあり、ヤマツツジとミヤマキリシマは両者の中間型に位置し、春葉展葉後期から夏葉の展葉初期にかけて開花した。また、バイカツツジやアマギツツジは展葉後、初夏に開花しており、常緑性であるシャクナゲ類（アズマシャクナゲ、ツクシシャクナゲ、ヤクシマシャクナゲ、エンシュウシャクナゲ）については、いずれも開花後に葉が展開した。

落葉種の紅葉、落葉については、10月下旬から11月上旬にかけて紅葉し、12月の中旬には完全に落葉する傾向が認められた。ツツジ亜属では、ほぼ10月に始まる春葉の紅葉時には頂端部の夏葉は対照的に緑色であるのに対し、11月中下旬の春葉の脱落時に夏葉はやや紅変し頂芽を囲む越冬葉となるという、春葉と夏葉で2型の紅葉パターンを示した。常緑性ツツジのヒカゲツツジとサクラツツジ、各種シャクナゲについても11月に前年葉あるいは一昨年以上前の葉が黄変し、脱落

することが観察された。

以上のように、シュートの伸長パターンや、葉の展開時期と開花時期の違い、紅葉・落葉等の生活環の違いによるグルーピングは、山崎（1989a, b）による自然分類体系の亜属とほぼ合致したが、一部には分類体系を超えたグループに属す種もみられた。このような生物季節学的な事象と自然分類体系とが関連していることをここでは確認できた（小林, 1992）。

ツツジ属植物を対象とした本研究において、これらの観察によって得られた知見と経験は、材料に対してより深い洞察を与えるものであった。また、特にツツジ亜属のミヤマキリシマやヤマツツジにおけるシュートの伸長パターンや、葉の展開時期と開花時期の違い等の生物季節学的なデータは、次章以降のそれらの種を対象とした研究において、重要な形質の観察基準として適用された。

第3節. ツツジの園芸品種とその成立

花の美しいツツジ属植物の中で、主に日本ではツツジ亜属が、西洋ではツツジ亜属とシャクナゲ亜属が栽培化され、多くの園芸品種が作出されてきた。特に日本では、江戸時代の「キリシマツツジ」や「サツキ」の大流行、近年の「サツキ」盆栽ブームなど独特の園芸文化が形成されるほど、ツツジは人々に浸透してきた。

日本の山野のいたるところに自生し、日本人に親しまれてきたツツジは、古くは『万葉集』の中にその名を見出すことができ、鎌倉時代初期の『明月記』（藤原定家）には園芸的に栽培化した記録が出てくる。江戸時代に出版され、我が国最古の園芸書とされる『花壇綱目』（水野勝元）には、147のツツジの園芸品種名の記載が初めて残るが、庶民にまで園芸文化が浸透したといわれる江戸中期の寛文から延宝にかけて（1661～1680）はツツジ栽培の大流行があったことが『足薪翁記』（柳亭種彦）等に記されている（田村ら，1974；中尾，1986；赤羽，1988）。元禄5年（1692）に江戸染井の植木屋伊藤伊兵衛（木村，1975）によって書かれたツツジの専門書である『錦繡枕』は、当時流行した‘キリシマ’をはじめとした「ツツジ」174種，「サツキ」163種について特徴を捉えた図入りで詳細に集録したものであり、その的確な解説，開花期の記号による分類，高度な栽培技術等から極めて優れた園芸書とされ、同時に本書はツツジの園芸品種の歴史を知る上で重要な情報を多数提供している（田村ら，1974；塚本，1976；国重，1983；赤羽，1988）。

野生種から園芸品種が成立する過程として、まず野生種の中から白花や色変わり、八重咲き等の突然変異を選抜し、庭に植栽されることによる品種化に始まり、その後、それらの自然交雑実生からの選抜、さらには人為的な大量播種による品種の選抜、作出を行い、最終的には人為的な交配が行われる。日本人に馴染み深く古くより園芸化がなされてきたツツジ園芸品種群には、このような品種成立の

各例が含まれている（国重，1983）。

まず江戸時代に大流行したサツキやツツジの園芸品種は，山野に自生する野生種の変異から集められたとされる。『錦繡枕』の「サツキ」の部には，野生品より選抜されたと思われる絞り花等の変異品を含め174品種が掲載されている。また，‘キリシマ’については，鹿児島霧島山より正保年中（1644～1648）に京都，大阪へ伝わった品種であり，後に江戸へと運ばれて発達した品種群を「江戸キリシマ」と呼んでいる（山崎ら，1979）。

また，「ミヤマキリシマ」の園芸品種群は，戦前より愛好家等が九州の各山系の自生株の中から白花，色変わり，八重咲き等の変異個体を選抜し，品種化したものである（国重，1983；油屋ら，1979）。

「ヒラドツツジ」は，古くより南方との交易の要衝であった長崎県平戸の武家屋敷の庭に持ち込まれたケラマツツジ，キシツツジ，モチツツジ，「リュウキュウツツジ」，シナヤマツツジ等の自然交雑実生から選抜されたもので，約200品種がある（田村，1963；田村ら，1974；国重，1983）。

「クルメツツジ」は江戸時代末期（天保年間）に久留米藩士坂本元蔵が「キリシマツツジ」やサタツツジ等を母種として，庭の苔に播種するという人為的な播種法によって育成を行った品種群で，現在約300品種がある（赤司，1919；国重，1983）。

一方，海外においては，ヨーロッパやアメリカで1800年代以降に，日本や中国等から導入された野生種や品種をもとに人為的な交配育種によって様々な品種群が育成された。常緑性ツツジでは，シナヤマツツジ，「リュウキュウツツジ」，「サツキ」等から日本で「アザレア」として総称される「ベルジアン アザレア」や「インディアン アザレア」等が育成され，また落葉性ツツジでは日本のレンゲツツジや欧米・中国の野生種をもとに「гент アザレア」や「エクスバリーアザレア」等が育成されている（Wilson and Rehder, 1921；田村ら，1974）。

近年、日本においても「サツキ」と「クルメツツジ」あるいは「アザレア」の交配により新品種が作出されたほか、有鱗片のグループでは国内外の野生種の交配によって新しい特性を持った系統が育成されている。

また、最近、赤羽（1993）、Kobayashi et al.（1996）は、これまでほとんど不可能とされた常緑性ツツジと落葉性ツツジの交配において、ミヤマキリシマとサツキの雑種系統（以下「ミヤマサツキ」）にキレンゲツツジを交配する試験で健全な実生を得ており、育種家の目標の一つであった黄色花の常緑性ツツジの育成に進展を見せている。

これらの園芸品種の成立等に関しては、宮澤（1940）、国重（1973, 1983）、山崎ら（1976, 1979）等が総合的に論じている。

一方、このような園芸品種を材料として、その起源や特性を分析した研究には以下のようなものがある。

Kunishige and Kobayashi（1980）は、「サツキ」と「クルメツツジ」の品種の複雑な花色色素（アントシアニン）の構成は親と考えられる野生種特有のシアニンやマルビジンが交雑によりもたらされ、これが園芸品種の花変異の幅を広げていると報告している。また、小林（1978, 1980）は「アザレア」と「クルメツツジ」品種群の成立についても、同様にアントシアン構成から母種となった野生種の推定を行っている。

ヨーロッパではすでに、「ベルジアン アザレア」を中心にして、花のフラボノイドやアントシアン色素の構成（DeLoose, 1969, 1970a, b, 1979）や、これらの色素と花冠の変異の遺伝性についての研究（Heursel, 1975; Heursel and Horn, 1977）が行われ、育種への応用がはかられてきた。

有隅ら（1986）、宮島（1987, 1988）および Sakata et al.（1991）は「クルメツツジ」等の品種群成立に関わったとされる九州の野生種（ヤマツツジ、ミヤマキリシマ、サタツツジ、マルバサツキ等）の形態、色素等の諸形質の地域変異

について調査し、自然の種間交雑により異質の生殖質が会うところでは花色や形態に大幅な変異拡大がみられることを報告している。

しかし、園芸品種群の成立年代は古く、しかもその成立に当たって複数の原種が関わっている場合が多いと考えられるため、こうした従来の方法で園芸品種の母種や成立過程を推定することは困難であると言わざるを得ない。

一方、近年、分子生物学的見地からのDNA分析はめざましい発展を遂げており（清水，1991），育種をはじめ遺伝学，系統分類学等の分野においてDNAマーカーの幅広い利用がなされている。従来より用いられている形態・生理的形質やアイソザイム等の遺伝的マーカーは、生育ステージ，植物体の部位，季節及び環境等の影響を受けやすいのに対し，DNAは遺伝子そのものであるために安定したマーカーとして利用できるという利点を備えている（河原，1992；長谷部，1990）。

そのため、現在ではこのDNAマーカーを用いて、植物の野生集団の構造や、集団間の関係を解析した報告や、野生植物と栽培種との関係を解析した報告が数多くみられる（Banks and Birky, 1985；Wagner et al., 1987；Neal et al., 1989；Neal and Sederoff, 1989；Arnold et al., 1991；Klein-Lankhorst et al., 1991；Demeke et al., 1992；Halward et al., 1992；Liston et al., 1992；Rieseberg and Brunsfeld, 1992；Kron et al., 1993；Petit et al., 1993；Castillo et al., 1994；Tsumura et al., 1994；Rajora and Dancik, 1995a, b, c）。

第4節. 本研究の目的

ツツジ科ツツジ属植物は、わが国の山野に多く自生し、これらをもとに江戸時代より数多くの常緑性ツツジの園芸品種が作出されてきた。これらの園芸品種は我が国だけでなく欧米でも、園芸や造園の分野で幅広い利用がなされている重要な花木であり、日本が世界に誇る花木の一つでもある。

常緑性ツツジの代表的な園芸品種群である「クルメツツジ」や「江戸キリシマ」は園芸・造園分野で利用価値が高く重要なため、現在の我々にも馴染み深い品種群であり、その起源は江戸時代に遡り、九州の霧島山系をはじめとする野生種をもとに数多くの品種が作出されてきた。しかし、その成立過程や成立に関わった野生種には不明な点が多く、明確な起源・由来は未だはっきりと解明されていない。

そこで著者は、常緑性ツツジの類縁関係と園芸品種の成立起源の解明を目的として本研究を行うことにした。

まず、近年、格段の進歩を遂げているDNA解析技術をツツジ属植物に適用するために、木本性植物からのDNA抽出法やDNAマーカーの適用法について検討を加えた。

そして、「江戸キリシマ」品種群の起源地であり「クルメツツジ」等の常緑性ツツジの園芸品種の成立にも深く関与しているとされる九州霧島山系の標高別野生集団について、形態学的分析とDNA分析を行い、集団間の遺伝子型や形質の差異を明らかにしようと考えた。

次に、常緑性ツツジの園芸品種の母胎となった九州各地のミヤマキリシマやヤマツツジ、またサタツツジ等の近縁種と、現存する園芸品種を含めてDNA分析を行い、野生集団間あるいは、園芸品種との類縁関係を調べた。

最後にこれら一連の研究を通して、常緑性ツツジの園芸品種の成立起源につい

て推察を試みた。

以下にこのような手順に沿ってまとめた本論文の構成を述べる。

第1章では、本研究の序章として、ツツジ属植物の分類体系における日本のツツジ属植物の位置づけとそのフェノロジー、園芸品種成立の沿革等、本研究の背景を概説し、本研究の目的について述べた。

第2章では、DNA抽出法とツツジ属におけるDNAマーカーの適用について述べた。一般にDNA抽出が困難な木本性植物であるツツジ属植物からのDNA抽出に検討を加え、ツツジ属だけでなく他の木本等にも応用できるDNA抽出法の開発を目指した。さらに抽出したDNAを使用して得られるRAPDマーカーや葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーを用いて、品種同定や遺伝性の分析への適用を試みた。

第3章では、九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団について形態学的な比較を行うとともに、DNA分析による解析を行った。霧島山系の山頂域にはミヤマキリシマが、山麓域にはヤマツツジが分布し、その中間帯には両者の自然雑種とされるキリシマツツジが分布している。これらの集団は「江戸キリシマ」をはじめとする常緑性ツツジの園芸品種成立に深く関与したとされるが、各集団について形態学的解析および葉緑体DNA分析により集団間の関連性を解析した。

第4章では九州各地の常緑性野生ツツジ集団と園芸品種についてDNA分析を行った。前章の霧島山系の集団の解析で得られた葉緑体DNAマーカーを用いて九州各地のミヤマキリシマやヤマツツジ等の常緑性野生ツツジについてDNA分析を行い、種間の関連と種分化について考察を加えた。また、「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」の園芸品種について、同様のDNAマーカーを用いて分析し、各園芸品種の起源について推察した。

最後に第5章ではこれら一連の結果を総括し、園芸品種の起源とその成立過程、また、成立に関与した野生種について総合的に考察した。

第1章の要約

本研究の序章として、ツツジ属植物の分類、園芸品種成立の沿革、本研究の背景を概説し、本研究の目的について述べた。

1. ツツジ属植物の分類体系における日本のツツジ属植物の位置づけを概説した。
2. ツツジ属植物のフェノロジー（生物季節学的）観察では、それぞれの種の生育パターンによって自然分類体系にほぼ合致する類別ができることを示した。
3. 日本で江戸時代より、野生の常緑性ツツジをもとに多くの園芸品種が作出されてきているが、これまでの研究では園芸品種の起源種を特定することは困難であった。
4. しかし、形態学的、生物季節学的調査に加え、近年発達したDNA分析技術を用いて、野生種から園芸品種までを通して解析することにより、常緑性ツツジの園芸品種の起源が解明できるものと考えられた。

第2章 常緑性ツツジにおけるDNAマーカーの適用

本章では、近年、格段の進歩を遂げているDNA解析技術をツツジ属植物に適用するために、木本性植物からのDNA抽出法やDNAマーカーの適用法について検討を加えた。まず、一般にDNA抽出が困難な木本性植物であるツツジ属植物からのDNA抽出に検討を加え、ツツジ属だけでなく他の木本等にも応用できるDNA抽出法の開発を目指した。さらに抽出したDNAを用いて得られるRAPDマーカーやPCR-RFLPマーカーについて検索を行い、品種同定や遺伝性の分析への適用を試みた。

第1節 DNA抽出法の検討

植物のDNA分析に用いるDNAは、一般に葉より抽出されるが、木本性植物では多糖類や、ポリフェノール類等の二次代謝産物の含有率が高いため、DNA抽出は困難な場合が多い。また同属でも種、品種により抽出の難易度が異なることも指摘されている。

既存のDNA抽出法としては、Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) や Cetyltrimethylammonium Bromide (CTAB) を試薬として用いるSDS法 (Honda and Hirai, 1990) やCTAB法 (Murray and Thompson, 1980; Doyle and Doyle, 1988) が知られており、抽出する材料により改変法も報告されている (Wagner et al., 1987; Greenwood et al., 1989; Maguire et al., 1994)。

ツツジ属ではこれまでにDNA分析の報告例がほとんどなかった (Iqbal et al., 1995; Kobayashi et al., 1995, 1996)。この原因の一つにはDNA抽出の困難な

ことが挙げられ、実際に筆者のこれまでの研究ではツツジ属のうち特にツツジ亜属からのDNA抽出が困難であり、このことが研究遂行上の妨げとなっていた（小林, 1992）。

本研究ではこの木本性植物のツツジ属からのDNA抽出法について検討を加え、今まで抽出が困難であったツツジ亜属を含むツツジ属の全種からのDNA抽出が可能な方法の確立を図った。更に本法により他の木本性植物においても本研究で確立したDNA抽出法が可能であるか否かを検討した。

1. ツツジ属植物からのDNA抽出法の確立

ツツジ属植物からのDNA抽出の難易性を明らかにするために、ツツジ属の野生種および園芸品種について既存の抽出法であるSDS法（Honda and Hirai, 1990）やCTAB法（Doyle and Doyle, 1987）を用いて、DNA抽出を行った。さらに本研究では、より簡便で安定したDNA抽出法を確立するためにGreenwood et al. (1989)の抽出法からサンプルの濾過等の煩雑な操作を省き、簡便化させた改変CTAB法を考案した。ここでは、これらの抽出法を用いた場合のツツジ属植物からのDNA抽出の難易性を検討した。

材料及び方法

DNA抽出法の検討；各地の植物園、試験場及び自生地等で採取し、凍結保存した日本原産のツツジ属植物のほぼ全種（53種）と常緑性ツツジ園芸品種（124品種）のその春に展開した新葉を用い、SDS法（Honda and Hirai, 1990）、CTAB法（Doyle and Doyle, 1987）及びCTAB法の改変法（Greenwood et al., 1989）をさらに改良した改変CTAB法（第2-1図）により、全DNAを抽出した。DNAの吸光域である分光光度計のUV260nmの吸光度、電気泳動によるDNAバ

1. 新葉 (約70mg) に液体N₂を加え, 乳鉢で磨碎。
↓
2. buffer 1 (1 ml) を加え, さらに磨碎する。
↓
3. チューブ (1.5ml容) に移し, 遠心分離 (12000rpm, 5分, 4℃)。
↓
4. 上澄みを捨てる。
上澄みが粘っている場合は再度buffer 1を加え2, 3, 4を繰り返す。
↓
5. 沈澱にbuffer 2 (300μl), solution 3 (200μl) を加え, 懸濁させる。
↓
6. 湯煎にてインキュベート (10分, 60℃)。
↓
7. クロホルム: イソアミルアルコール (24:1) を等量 (500μl) 加える。
↓
8. 攪拌 (15分, 室温) 後, 遠心分離 (12000rpm, 15分 20℃)。
↓
9. 上層 (水層) (約500μl) を別のチューブ (1.5ml容) に移す。
↓
10. イソプロパノール (-20℃) を上層の2/3量 (約350μl) 加え,
攪拌後, 冷却 (30分, -20℃)
↓
11. 遠心分離 (12000rpm, 5分, 4℃) 後, 上層を捨てる。
↓
12. DNA沈澱に70%エタノール (500μl) を加え, 洗淨する。
↓
13. 遠心分離 (12000rpm, 5分, 15℃) 後, エタノールを捨てる。
↓
14. DNA沈澱を減圧乾燥する。
↓
15. TE (50~100μl) を加え, 溶解させる。

buffer 1 ; 50mM Tris-HCl(pH8.0)
5mM EDTA
350mM Sorbitol
0.1% Mercapto ethanol
10% Polyethylene Glycol

buffer 2 ; 50mM Tris-HCl(pH8.0)
5mM EDTA
350mM Sorbitol
0.1% Mercapto ethanol
1% Sodium sarkosyl

solution 3 ; 710mM NaCl
0.1% CTAB

第2-1図. 本研究で確立した改変CTAB法の手順

ンドの有無，また次節におけるPCR増幅が可能であるか否かにより，種，品種及び抽出法によるDNA抽出の難易性について判定した。

結果及び考察

第2-1表には抽出したDNAをRAPD法におけるテンプレートとして用いた場合に，DNAのPCR増幅が可能であるかどうかを判定基準とした，種，品種及び抽出法によるDNA抽出の難易性の結果を示した。SDS法では種・品種群により抽出の難易性が異なり，ゲンカイツツジ亜属，ミツバツツジ亜属及びムラサキヤシオツツジ亜属の1部ではDNA抽出が容易であった。一方，ヤマツツジを除くツツジ亜属やバイカツツジ亜属等では，DNA増幅ができず，UV260nm波長域にも吸収がないことからDNA抽出が困難であった。また，ツツジ亜属を原種とする各種園芸品種でも母種と同様に全般に困難であり，ツツジ亜属及び園芸品種についてはCTAB法でも同様に抽出が困難であった。ところが改変CTAB法では全種からのDNA抽出が可能であった。

この改変CTAB法が他法に比べてもっとも異なる点は，磨砕したサンプルをポリエチレングリコールやソルビトールを含むbuffer 1（第2-1図）で洗浄する過程があることである（第2-1図の手順4）。この操作では，ポリエチレングリコールやソルビトールによってDNA抽出を阻害する多糖類やポリフェノール類等が可溶化され，buffer 1とともに除去される。一方，比重の重い核やオルガネラは遠心分離によって沈殿する。以下は，DNA抽出阻害物質が除去されたこのサンプルを用いて，従来とほぼ同様の抽出法に移行するという手順をとっている。以上のようなことから，この改変CTAB法によれば木本性のツツジからもDNA抽出が可能になったと考えられる。

第2-1表. 野生種または園芸品種からのDNA抽出の難易性

亜属または品種群	種 ^Z または 品種数	SDS法	CTAB法	改変CTAB法
野生種^Y				
ゲンカイツツジ亜属	3	○ ^x	---	○
ヒカゲツツジ亜属	3	△	---	○
バイカツツジ亜属	3	×	---	○
ツツジ亜属	19	×	×	○
ミツバツツジ亜属	15	○	○	○
レンゲツツジ亜属	4	○	---	○
シャクナゲ亜属	6	△	---	○
園芸品種群				
江戸キリシマ	9	×	×	○
クルメツツジ	40	×	×	○
サツキ	50	×	×	○
ミヤマキリシマ	7	×	×	○
ヒラドツツジ	6	×	---	○
ベルジアンアザレア	12	×	---	○

Z; 変種を含む

Y; 山崎 (1989) の分類に従う。

X; 記号は以下の意味を示す ○: RAPD法に適す高純度のDNAが抽出できる, △: 抽出されるが低純度,
×: 抽出不可能, ---: 試行せず

2. 改変CTAB法の他の植物への応用

ツツジ属植物からのDNA抽出が可能であった改変CTAB法について、他の植物への応用を試みた。

材料及び方法

ツツジ属からのDNA抽出が可能であった改変CTAB法を用いて、木本性植物を中心に主に筑波大学構内で採取した49属の植物の成葉からDNA抽出を行った（第2-2表）。抽出されたDNAの確認は1%アガロースゲルを用いた電気泳動により行った。また、一部のDNAサンプルについては制限酵素処理を行い、DNAの純度を調べた。

結果及び考察

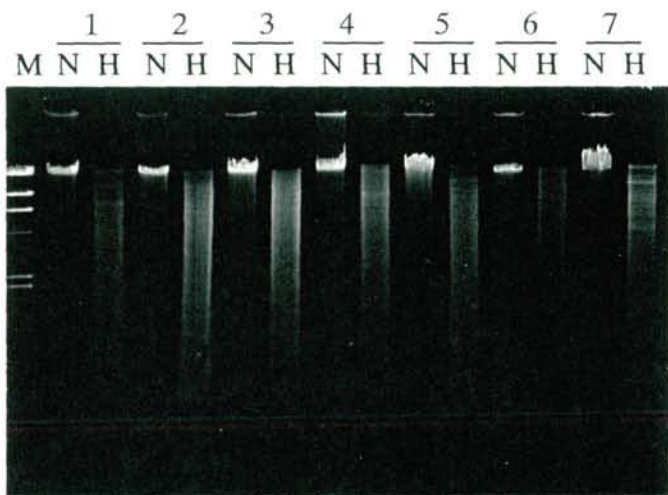
改変CTAB法によれば、草本性植物はもとより多くの木本性植物のすべてのサンプルからのDNA抽出が可能であることが確認された。DNA精製度の基準として数種について制限酵素処理（*Hind* III）を行ったところ、ほぼ完全に消化されていることから、抽出されたDNAは純度の高いDNAであることがわかった（第2-2図）。

今回用いたサンプルの多くは、時期的に新葉ではなく、DNA抽出阻害物質が多いとされる成葉であったにも関わらず、全ての植物からの抽出が可能であった。また、植物によっては磨碎時に粘度の高いものもあったが、buffer 1による洗浄操作を繰り返すことによって改善された。

本研究において、供試したすべての木本性植物でDNA抽出が可能な抽出法を確立できたことは、これまでDNA抽出に困難をきたしていた木本性植物のDNA解析の飛躍的な発展に貢献するものと思われる。

第2-2表. 本研究においてDNA抽出に用いた植物種

学名	和名	英名
<i>Acer japonicum</i> Thunb.	ハウチワカエデ	full-moon maple
<i>Actinidia chinensis</i> Planch.	キウイ	kiwi fruit
<i>Callistemon citrinus</i> Stapf	ブラシノキ	bottlebrush
<i>Camellia sasanqua</i> Thunb.	サザンカ	sasanqua camellia
<i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.	クリ	Japanese chestnut
<i>Chamaecyparis pisifera</i> Endl.	サワラ	sawara cypress
<i>Cinnamomum Camphora</i> Sieb.	クスノキ	camphor tree
<i>Clivia miniata</i> Regel	クンシラン	kaffir lily
<i>Cotinus coggygria</i> Scop.	ケムリノキ	smoke tree
<i>Crinum asiaticum</i> L.	ハマオモト	grand crinum
<i>Cunninghamia lanceolata</i> Hook	コウヨウザン	
<i>Cyclamen persicum</i> Mill.	シクラメン	cyclamen
<i>Dendrobium</i> spp.	デンドロビウム	orchids
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	カキ	Japanese persimmon
<i>Elaeagnus pungens</i> Thunb.	ナワシログミ	gumi
<i>Euphorbia pulcherrima</i> Willd.	ポインセチア	poinsettia
<i>Eustoma russellianum</i> G. Don	トルコギキョウ	eustoma
<i>Fatsia japonica</i> Dence. et Planch	ヤツデ	Japan fatzia
<i>Ficus benjamina</i> L.	ベンジャミンゴム	weeping fig
<i>Ginkgo biloba</i> L.	イチョウ	ginkgo
<i>Hippeastrum</i> spp.	アマリリス	amaryllis
<i>Ipomoea batatas</i> Poir.	サツマイモ	sweet potato
<i>Ilex crenata</i> Thunb.	イヌツゲ	Japanese holly
<i>Kalanchoe blossfeldiana</i> v. Pollen.	カランコエ	kalanchoe
<i>Lagerstroemia indica</i> L.	サルスベリ	crape myrtle
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	トマト	tomato
<i>Lycoris</i> spp.	リコリス	lycoris
<i>Magnolia kobus</i> DC.	コブシ	kobus magnolia
<i>Malus pumila</i> Mill. var. <i>domestica</i> Schneid.	リンゴ	apple
<i>Oryza sativa</i> L.	イネ	rice
<i>Paphiopedilum</i> spp.	パフィオペディルム	
<i>Paulownia tomentosa</i> Steud.	キリ	royal paulownia
<i>Perilla frutescens</i> L.	シソ	perilla
<i>Phalaenopsis</i> spp.	コショウラン	
<i>Phragmipedium</i> spp.	フラグミベディウム	
<i>Pinus densiflora</i> Sieb. et Zucc.	アカマツ	Japanese red pine
<i>Poncirus trifoliata</i> Raf.	カラタチ	trifoliolate orange
<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	ウメ	Japanese apricot
<i>Prunus persica</i> Batsch var. <i>vulgaris</i> Maxim.	モモ	peach
<i>Pyrus serotina</i> Rehd. var. <i>culta</i>	ナシ	Japanese pear
<i>Quercus glauca</i> Thunb. ex Murray	アラカシ	
<i>Rhododendron</i> spp.	ツツジ	azalea
<i>Rhododendron</i> spp.	シャクナゲ	rhododendron
<i>Rosa</i> spp.	バラ	rose
<i>Saintpaulia inantha</i> H. Wendl.	セントポーリア	saintpaulia
<i>Taxus cuspidata</i> Sieb et Zucc.	イチイ	Japanese yew
<i>Vaccinium australe</i> Small	ブルーベリー	buleberry
<i>Vitis vinifera</i> L.	ブドウ	grape
<i>Zygocactus</i> spp.	シャコバサボテン	Christmas cactus



第2-2図. 改変CTAB法によって抽出したDNAとそれを制限酵素処理した際の電気泳動パターン

M; DNA分子量マーカー (λ DNA/*Hind*Ⅲ),
 N; 抽出したDNA, H; *Hind*Ⅲ処理したDNA,
 1; ブラシノキ, 2; コブシ, 3; イチイ, 4; ブルーベリー,
 5; ブドウ, 6; シクラメン, 7; トマト

電気泳動条件; 1%アガロース, 100V30分

第2節 常緑性ツツジ園芸品種へのDNAマーカーの適用

1. 常緑性ツツジ園芸品種のRAPDマーカーによる同定

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法の応用であるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法 (Williams et al., 1990) は、個体間や品種間のDNA塩基配列の小さな差を検出できるという利点を持つため、すでに数多くの植物種で品種の同定や、系統分類等に利用されている (Hu and Quiros, 1991; Harada et al., 1993; Castiglione et al., 1993; Koller et al., 1993; Krahi et al., 1993; Torres et al., 1993; 堀越ら, 1994; Iqbal et al., 1995)。

江戸時代より数多くの品種が作出されてきた常緑性ツツジの園芸品種には、現在でも数百を超える品種があるが、幼苗期や開花期以外での品種同定が難しく、実際の利用面でも異名同品種がある等の問題を抱えている。本研究では、多くの植物で最近利用されているRAPDマーカーを用いたDNA分析により、常緑性ツツジ園芸品種の品種同定を試みた (Kobayashi et al., 1995)。

材料及び方法

「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」及び「サツキ」の各品種群について、前述の改変CTAB法 (第2-1図) により抽出したDNAをテンプレートとし、10塩基のランダムプライマー (OPERON, USA) 100種 (OPK~OPQシリーズ) を用いてRAPD分析を行った。

反応液 (10 μ l) の組成は10ng DNA, 0.5 μ M プライマー, 0.1mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 1 \times reaction bufferおよび0.2unit Taq DNAポリメラーゼ (Nippon Gene, Japan) とし、熱変性94 $^{\circ}$ C 1分, アニーリング36 $^{\circ}$ C 2分, 伸長反応72 $^{\circ}$ C 3分を45サイクル繰り返す条件下でPCR反応 (PC-700; ASTEC, Japan) を行った。

DNA増幅産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、UV照射下で写真撮影することによって解析した。なお、各品種のRAPD分析は2～3反復行った。

結果及び考察

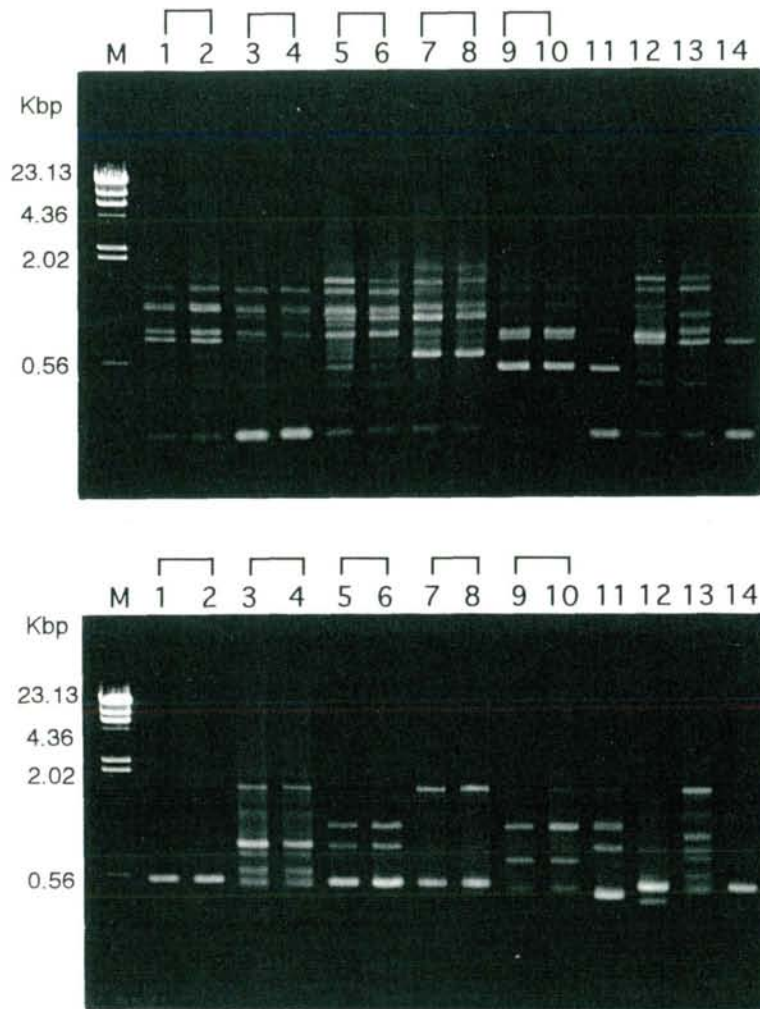
まず、各品種群の代表としてヤマツツジ（館林）、「江戸キリシマ」「日の出霧島」, 「クルメツツジ」「君が代」, ミヤマキリシマ（日光植物園）, 「サツキ」「愛国」を用いて、100種のプライマーについて検索したところ、98種のプライマーで何らかのPCR産物が得られ、うち16種では多型バンドが得られた。このうち特にOPK-19とOPK-20では、鮮明な多型バンドが得られたため、この2種のプライマーを品種同定に用いた。

これらのプライマーを用いて、各園芸品種群のRAPDバンドによる品種比較を試みたところ、「江戸キリシマ」については1種のプライマーで、館林つつじヶ岡公園の9品種を識別でき、同品種の別個体では同じバンドが得られた（第2-3図）。

同様に「クルメツツジ」14品種についても、この2種のプライマーを用いることにより品種識別が可能であった（第2-4図）。

また、枝変わりによって品種育成が盛んに行われている「サツキ」品種についても同様に分析したところ、晃山系では「晃山」とその枝変わりとして登録された3品種の間でバンドの有無による識別が可能であった（第2-5図）。「サツキ」の他の系統では今回用いたプライマーでは差異が見られなかったが、さらに調べるプライマーを増やすことにより、品種識別が可能になるものと考えられる。

なお各RAPDバンドの検出については2反復以上行っているが、いずれも同様のRAPDバンドパターンが得られたことから、RAPDバンドの再現性は高いことが証明された。



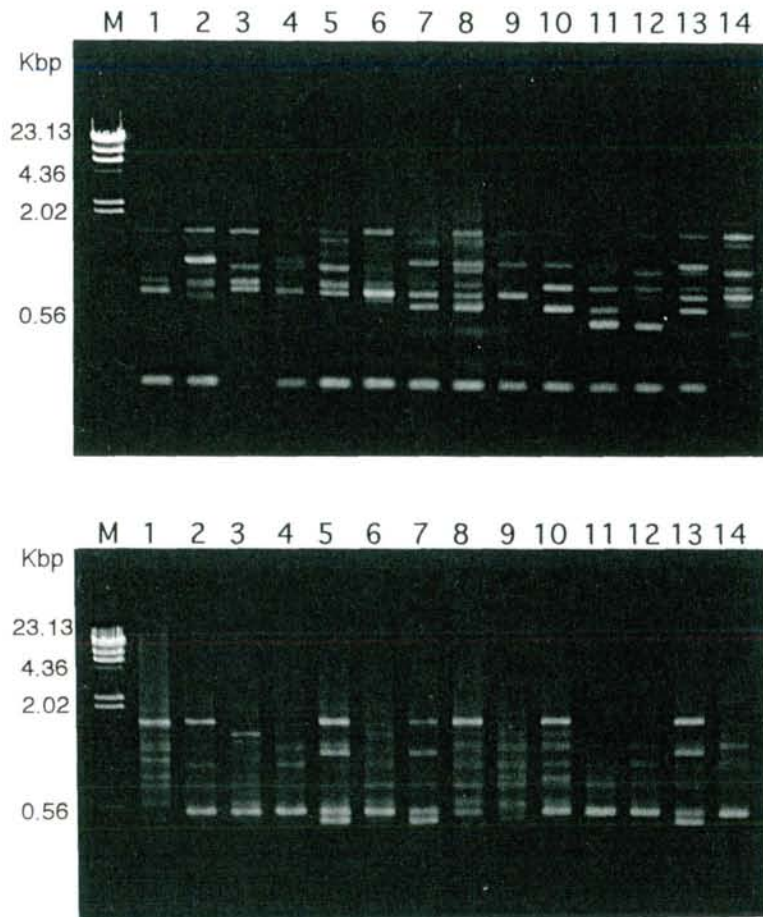
第2-3図. 「江戸キリシマ」9品種のRAPDバンドパターン

上図；プライマーOPK-19 (5' -CACAGGCGGA-3')

下図；プライマーOPK-20 (5' -GTGTCGCGAG-3')

1, 2；'本霧島', 3, 4；'八重霧島', 5, 6；'紅霧島',
7, 8；'白霧島', 9, 10；'品種不明種', 11；'紅の司'
12；'桔梗咲き霧島', 13；'東錦', 14；'日の出霧島'

1と2, 3と4, 5と6, 7と8および9と10はそれぞれ同品種の別個体

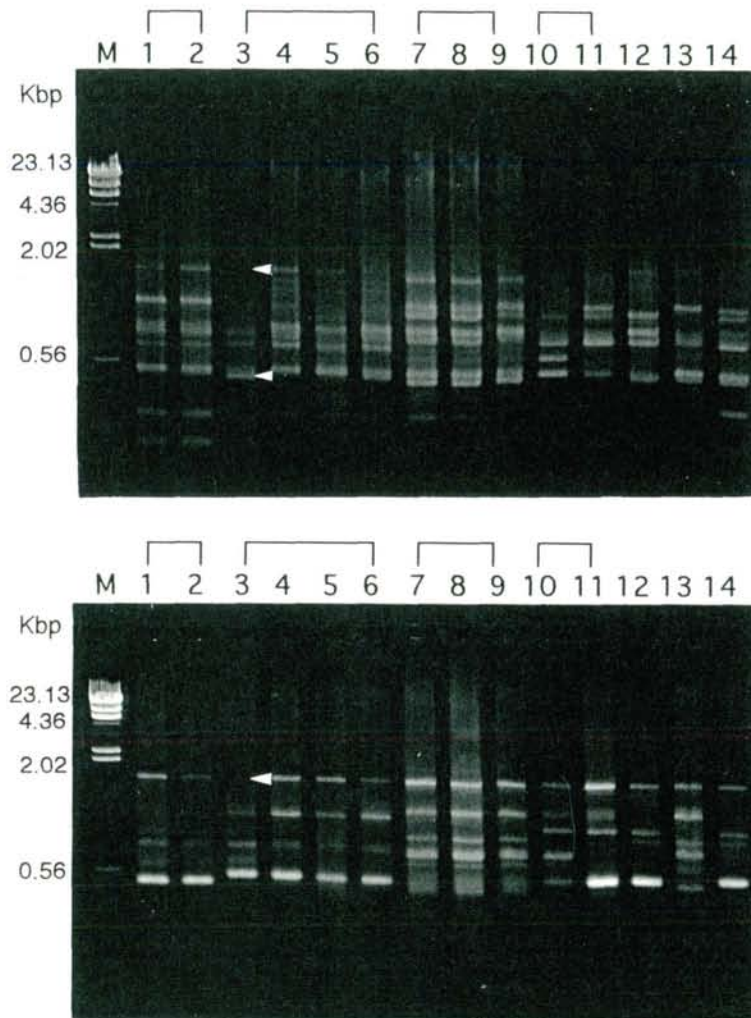


第2-4図. 「クルメツツジ」14品種のRAPDバンドパターン

上図; プライマーOPK-19 (5' -CACAGGCGGA-3')

下図; プライマーOPK-20 (5' -GTGTCGCGAG-3')

1 ; '若楓', 2 ; '小蝶の舞', 3 ; '麒麟', 4 ; '君が代',
 5 ; '一天', 6 ; '日の出霧', 7 ; '二重常夏', 8 ; '暮の雪',
 9 ; '稚児遊', 10 ; '養老', 11 ; '田子の浦', 12 ; '曙',
 13 ; '村雨', 14 ; '高砂'



第2-5図. 「サツキ」14品種のRAPDバンドパターン

上図; プライマーOPK-19 (5' -CACAGGCGGA-3')

下図; プライマーOPK-20 (5' -GTGTCGCGAG-3')

1 ; '高砂', 2 ; 'コバルト', 3 ; '晃山', 4 ; '日光',
 5 ; '如峰山', 6 ; '晃山の光', 7 ; '一生の春', 8 ; '春の苑',
 9 ; '都賀の春', 10 ; '愛国', 11 ; '愛の月', 12 ; '晃雲',
 13 ; '那須野', 14 ; '博多白'

2は1の放射線突然変異品種, 4, 5, 6は3の枝変わり品種, 8, 9は7の枝変わり品種, 11は10の実生系統

以上，本研究によって，従来同定が極めて困難であった常緑性ツツジ園芸品種の同定法としてRAPDマーカーを適用できることが明らかとなった。したがって，本法は次章以降におけるツツジの野生集団を対象とした場合にも，集団内の各個体の識別が可能であると同時に，集団単位での遺伝子型の傾向を把握することにも有効であると考えられる。

2. 常緑性黄花ツツジ育成過程におけるRAPDマーカーの遺伝性

おもに自然雑種や交配による種間雑種をもとに発達した園芸品種の起源種を推定する場合、形態学的特徴とそれを裏付けるDNAマーカーが手がかりとなると考えられる。ここでは、黄色花の常緑性ツツジの作出を目標に育成された、白花ミヤマキリシマと「サツキ」‘博多白’の雑種（以下「ミヤマサツキ」とする）とキレンゲツツジの遠縁雑種個体（赤羽，1993）について、形態学的特徴とRAPDマーカーの遺伝性との関連について検討した（Kobayashi et al., 1996）。

材料及び方法

形態調査

1991年に交配し、翌年播種した9129系3年生の実生（「ミヤマサツキ」No.1×キレンゲツツジNo.1）10個体と、9137系（「ミヤマサツキ」No.11×キレンゲツツジNo.1）5個体の他、交配親のキレンゲツツジNo.1，ミヤマサツキNo.1,11とその両親の白花ミヤマキリシマとサツキ‘博多白’（赤羽，1993）について11月上旬の外観，樹高，分枝数，葉の形態及び12月下旬の落葉度について調査した。なおこれらの材料は栃木県壬生町に植栽されているものを用いた。

RAPDマーカーの遺伝分析

同上の各個体より7月上旬に採取した新葉から前述の改変CTAB法（第2-1図）によって抽出したDNAをテンプレートとし，10塩基のランダムプライマー（OPERON, USA）16種を用いて，RAPDマーカーを検出し，遺伝性を分析した。反応液の組成は前述の品種同定の場合と等しく，PCRの反応条件は前述の条件を熱変性94℃ 1分，アニーリング36℃ 1分，伸長反応72℃ 2分に改変したのを用い，同様の操作でRAPDバンドを検出した。PCR反応はサーマルサイクラ

ー PJ-2000 (Perkin Elmer Cetus - TAKARA, USA) によって行った。なお各反応は2反復以上行った。

また、両親が持つRAPDバンドが雑種個体に遺伝しているか否かを検証するために、両親の増幅産物より切り出したRAPDバンドをプローブとして用い、交配系統のRAPDパターンを転写したナイロンメンブレンにサザンハイブリダイゼーションを行って、バンドの遺伝性の確認を行った。なお、これらのサザン分析にはECLシステム (Amersham, USA) を用いた。

結果及び考察

常緑性黄花ツツジの作出はこれまで多くの育種家等によって試みられてきた。常緑性ツツジが属するツツジ亜属には花に黄色の色素を有する種が存在しないため、黄色花の形質はレンゲツツジ亜属に属する落葉性のキレンゲツツジ (*R. japonicum* f. *flavum*) が花粉親として使われてきた (Spethmann, 1980) が、その亜属間雑種は得られないか、得られてもアルビノが多いことが知られている (野口, 1930; Noguchi, 1932; 赤羽, 1971)。そのため本研究で扱った雑種集団はツツジの育種において非常に重要な意味を持っている。

まず、形態調査の結果をみると、両親は形態上明らかな差異が見られるが、その雑種の9129系、9137系とも外観上の樹形は「ミヤマサツキ」型のものではなく、中間～キレンゲツツジ型に偏り、樹高を含めてレンゲツツジ型で生育がよい傾向が見られた (第2-3表)。葉の大きさは、両親の間ではあるが変異に富み、葉形比及び葉型はほぼ中間型であった。また、実体顕微鏡による葉の毛じの観察では雑種個体にはミヤマキリシマやサツキ特有の剛毛はなく、すべてキレンゲツツジ型の長毛を有し、加えて、キレンゲツツジ特有の短毛のある個体とない個体があった。落葉の程度に関しても、両親の間で個体差がみられた。

RAPDマーカーの分析では、16プライマー中7プライマー (OPK-11, 12, 19

第2-3表. 交配系統各個体の形態特性^Z

個体番号 (#)	個体名	外観 ^Y	樹高 (cm)	分枝数(本)		葉長(cm)	葉幅(cm)	成熟葉の形態		毛の種類	落葉度 ^X	
				一次分枝	二次分枝			葉形比	葉型			
1	白花ミヤマキリシマ	—	—	—	—	1.70	0.83	0.49	楕円	剛毛	無	3
2	「サツキ」 '博多白'	—	—	—	—	2.45	1.12	0.46	楕円	剛毛	無	0
3	「ミヤマサツキ」 No.1 (#1×#2)	—	—	—	—	2.45	1.12	0.46	楕円	剛毛	無	1
4	「ミヤマサツキ」 No.11 (#1×#2)	—	—	—	—	2.05	1.16	0.57	楕円	剛毛	無	2
5	キレンゲツツジNo.1	—	—	—	—	8.58	2.51	0.29	狭倒披針	長毛	有	4
6	9129-1 (#3×#5)	レンゲ	32	12	2	3.49	1.26	0.36	狭楕円	長毛	無	3
7	9129-2 (#3×#5)	レンゲ	39	10	1	4.17	1.48	0.36	狭楕円	長毛	無	2
8	9129-3 (#3×#5)	レンゲ	27	4	0	3.19	1.15	0.37	狭楕円	長毛	有	3
9	9129-4 (#3×#5)	中間	23	5	0	2.78	1.05	0.38	狭楕円	長毛	有	2
10	9129-5 (#3×#5)	中間	22	6	0	3.99	1.43	0.36	狭楕円	長毛	無	3
11	9129-6 (#3×#5)	レンゲ	24	6	2	3.12	1.32	0.43	楕円	長毛	有	3
12	9129-7 (#3×#5)	レンゲ	20	4	2	2.66	1.18	0.45	楕円	長毛	有	3
13	9129-12 (#3×#5)	レンゲ	23	6	2	4.09	1.35	0.33	狭楕円	長毛	有	3
14	9129-14 (#3×#5)	中間	21	10	2	3.06	1.14	0.37	狭楕円	長毛	無	2
15	9129-15 (#3×#5)	レンゲ	20	7	0	3.05	1.17	0.39	狭楕円	長毛	有	2
16	9137-1 (#4×#5)	レンゲ	49	11	5	4.06	1.80	0.44	楕円	長毛	有	2
17	9137-2 (#4×#5)	レンゲ	20	11	2	3.52	1.33	0.38	狭倒披針	長毛	無	4
18	9137-3 (#4×#5)	中間	16	8	6	2.58	1.19	0.46	楕円	長毛	無	2
19	9137-4 (#4×#5)	レンゲ	18	7	0	2.87	1.29	0.45	楕円	長毛	無	3
20	9137-5 (#4×#5)	中間	15	11	5	3.31	1.32	0.40	狭倒披針	長毛	有	2

Z ; 落葉度を除き, 1994年11月1日調査

Y ; 外観上の樹型で, レンゲ: レンゲツツジタイプ, 中間: 中間タイプを示す

X ; 0 : 落葉ほとんどなし (「サツキ」 '博多白'), 1 : 落葉少 (「ミヤマサツキ」 No.1), 2 : 中程度 (「ミヤマサツキ」 No.11), 3 : 大半落葉 (白花ミヤマキリシマ),

4 : 完全落葉 (キレンゲツツジNo.1) を示す (1994年12月23日現在)

; OPM-9, 11 ; OP0-6, 19) で, 再現性のある28本の鮮明な多型バンドが得られ, これらにより本研究に用いた20個体のすべてを識別できた(第2-4表). 9129系, 9137系及び「ミヤマサツキ」No.1,11が所有するバンドはほぼすべてそれぞれの両親から遺伝しており, サザン分析によってもその遺伝性が確認された(第2-6, 2-7図). 各親からのバンド数と保有率を集計すると, 9129系と9137系では9137-3を除くすべての個体で母親の「ミヤマサツキ」のバンドの保有率に比べ, 花粉親のキレンゲツツジNo.1のバンドの保有率が高いことが分かった(第2-5表).

RAPDマーカーはメンデル性の遺伝をする不完全な優性マーカーとされる(Williams et al., 1990; Carlson et al., 1991; Roy et al., 1992). したがって, ここで検証した雑種個体における多様な形態変異やRAPDパターンの多型は, 両親のヘテロ性や亜属間の遠縁交雑によるものと考えられる. また, 全体に花粉親のキレンゲツツジに偏った形態を示す雑種個体では, この花粉親由来のRAPDバンドを有する比率が高く, 逆に母親のミヤマサツキNo.11由来のバンドの比率が最も高い9137-3の形態形質はより母親に近いことから, RAPDマーカーと形態との関連性が示された.

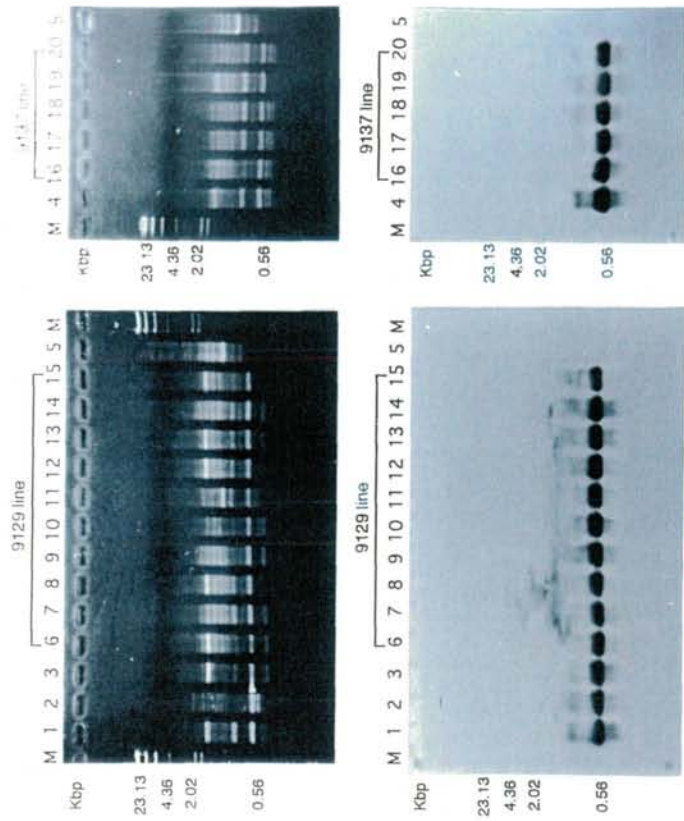
以上の結果は, RAPDマーカーが種間交雑育種の現場における雑種性の検証に有効なことを示すだけでなく, 自然雑種を形成しているような野生集団の解析にも利用できることを示唆している.

第2-4表. 交配系統各個体におけるRAPDバンドの出現状況

Primer	size (bp)	交配系統各個体の個体番号 (#) ^Z																				
		1	2	3	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	5	4	16	17	18	19	20	5
		Y																				
OPK-11	1200	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
	700	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
	650	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
	600	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	570	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	500	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	450	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPK-12	1000	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	950	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	750	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	700	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPK-19	930	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	850	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	700	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	600	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
	500	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	400	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
OPM-9	1450	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	950	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
	550	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPM-11	800	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	700	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
OPO-6	700	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	650	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	550	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPO-19	1000	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	850	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
	800	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
バンド総数 (本)		14	8	16	18	18	21	21	17	16	20	17	19	15	10	13	16	19	21	18	18	10

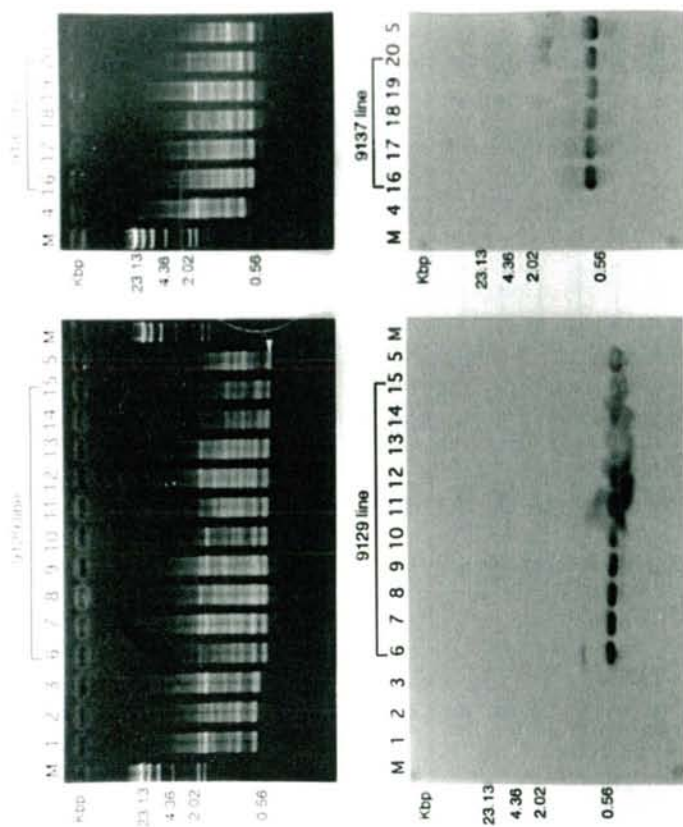
Z; 個体番号 (#) は第2-3表に対応

Y; バンドの有 (+), 無 (-) を示す



Primer OPK-11 ; 5' - AATGCCCCAG - 3'

第2-6図. '9129 (「ミヤマサツキ」No.1×キレンゲツジNo.1)' 系統および
 '9137 (「ミヤマサツキ」No.11×キレンゲツジNo.1)' 系統において
 プライマーOPK-11を用いた際に得られるRAPDパターン (上図) と
 RAPDバンドのサザン分析結果 (下図)
 レーン番号は第2-3表に対応する



Primer OPO-6 ; 5' - CCACGGGAAG - 3'

第2-7図. '9129 (「ミヤマサツキ」 No.1×キレンゲツジNo.1)' 系統および
 '9137 (「ミヤマサツキ」 No.11×キレンゲツジNo.1)' 系統において
 プライマーOPO-6を用いた際に得られるRAPDパターン (上図) と
 RAPDバンドのサザン分析結果 (下図)
 レーン番号は第2-3表に対応する

第2-5表. 交配系統各個体に各親から遺伝しているRAPDバンド数とその保有率

個体番号 (#)	個体名	バンド総数 (本)	各親からの遺伝RAPDバンド数とその保有率			
			「ミヤマサツキ」No.1	「ミヤマサツキ」No.11	キレンゲツツジNo.1	白花ミヤマキリシマ 「サツキ」 '博多白'
1	白花ミヤマキリシマ	14	—	—	—	—
2	「サツキ」 '博多白'	8	—	—	—	—
3	「ミヤマサツキ」No.1 (#1×#2)	16	—	—	—	13 (0.93)
4	「ミヤマサツキ」No.11(#1×#2)	13	—	—	—	12 (0.86)
5	キレンゲツツジNo.1	10	—	—	—	—
6	9129-1 (#3×#5)	18	9 (0.56) ^Z	—	9 (0.90)	7 (0.50)
7	9129-2 (#3×#5)	18	10 (0.65)	—	8 (0.80)	9 (0.64)
8	9129-3 (#3×#5)	21	12 (0.75)	—	9 (0.90)	9 (0.64)
9	9129-4 (#3×#5)	21	12 (0.75)	—	9 (0.90)	9 (0.64)
10	9129-5 (#3×#5)	17	9 (0.56)	—	8 (0.80)	8 (0.57)
11	9129-6 (#3×#5)	16	8 (0.50)	—	8 (0.80)	8 (0.57)
12	9129-7 (#3×#5)	20	12 (0.75)	—	8 (0.80)	10 (0.71)
13	9129-12 (#3×#5)	17	8 (0.50)	—	9 (0.90)	8 (0.57)
14	9129-14 (#3×#5)	19	11 (0.69)	—	8 (0.80)	8 (0.57)
15	9129-15 (#3×#5)	15	8 (0.50)	—	7 (0.70)	7 (0.50)
16	9137-1 (#4×#5)	16	—	7 (0.54)	9 (0.90)	6 (0.43)
17	9137-2 (#4×#5)	19	—	10 (0.77)	9 (0.90)	9 (0.64)
18	9137-3 (#4×#5)	21	—	12 (0.92)	9 (0.90)	11 (0.79)
19	9137-4 (#4×#5)	18	—	9 (0.69)	9 (0.90)	9 (0.64)
20	9137-5 (#4×#5)	18	—	9 (0.69)	9 (0.90)	8 (0.57)

Z ; 親からの遺伝バンドの保有率=各親からの遺伝バンド数/各親のバンド総数

第3節. 常緑性ツツジにおける葉緑体DNAマーカーの遺伝性の検討

植物において葉緑体DNAは、核ゲノムやミトコンドリアDNAに比べて一般的に保存性が高く構造が単純なために、系統進化等を調べる際に有力な情報を提供している（長谷部, 1990; Clegg and Zurawski, 1992; Downie and Palmer, 1992; Soltis et al., 1992）。したがって、常緑性ツツジの複雑な類縁関係を探る際にも有力なマーカーとなるものと考えられる。

被子植物では葉緑体は一般に母性遺伝することが知られている(Kuroiwa, 1991)。そのため、葉緑体DNAマーカーはツツジにおいても種間の自然雑種や人工交雑を介して発達した園芸品種の成立過程を推定する際に、その母系の起源を探るために有効であると考えられる。

ところが、Kuroiwa (1991)、内田・黒岩 (1992) は数種のツツジ属においてその葉緑体DNAは両性遺伝するとしている。しかしこの場合の両性遺伝とは、受精反応時の細胞学的な実験結果からの見解であるため、実際に生育している雑種の葉緑体がどのような構成をなしているかは分かっていない。

そこで本研究ではツツジ属数種の種間交雑を行い、得られた雑種について、葉緑体DNAマーカーの遺伝様式を調べた。

材料及び方法

材料として用いた交配親系統とその雑種を第2-6, 2-7表に示した。本章第1節で述べた改変CTAB法(第2-1図)によって、各親系統と雑種系統の新葉からDNAを抽出し、PCR-RFLP分析に供試した。

PCR-RFLP分析にはタバコの葉緑体DNAの塩基配列をもとに設計した41組合せのプライマー(森林総合研究所, 吉村氏より譲与)を用いた。PCR反応は熱変性94°C 4分の後に、熱変性94°C 30秒、アニーリング55°Cまたは57°C 40秒、

第2-6表. 本研究に用いた交配系統と雑種が示したPCR-RFLPパターン (野生種系統)

種子親系統	個体名	花粉親系統	個体名	雑種系統	雑種が示したPCR-RFLPパターン
(筑波大学交配系統)					
R. kaempferi	Y520-1	X	R. kiusianum	T1560-2	9601 1,2,3,4,5,6,7,8,9
R. kiusianum	T1560-2	X	R. kaempferi	Y520-1 (逆交配)	9602 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10
R. kaempferi	Y520-5	X	R. kiusianum	T1560-10	9603 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10
R. kiusianum	E1180-5	X	R. kaempferi	Y520-5	9604 1,3,4,5,6,8,9,10は種子親, 2,7は花粉親
R. obtusum	HC800-6	self-pollination			9606 1,2,3,4,5 親と同パターン
R. obtusum	HC800-11	self-pollination			9607 1,2,3 親と同パターン
R. obtusum	HS940-2	self-pollination			9608 1,2,3,4,5 親と同パターン
R. obtusum	HS940-13	self-pollination			9610 1,2,3 親と同パターン
(九州大学交配系統)					
A R. kiusianum	大箕柄No.11	X	B R. kaempferi	大箕柄No.2	AB 1
B R. kaempferi	大箕柄No.2	X	A R. kiusianum	大箕柄No.11 (逆交配)	BA 1,2
C R. kiusianum	大箕柄No.31	X	D R. kaempferi	大箕柄No.37	CD 1,2,3
D R. kaempferi	大箕柄No.37	X	C R. kiusianum	大箕柄No.31 (逆交配)	DC 1,2,3
E R. kiusianum	大箕柄No.18	X	D R. kaempferi	大箕柄No.37	ED 1
F R. kiusianum	仙酔峽No.26	X	G R. kaempferi	黒髪山No.30	FG 2,3,4,7,9
J R. kaempferi	国見岳	X	K R. tosaensis	フジツツジNo.7	JK 1,2,3,4,5,7,8,9,10, 12,13,14
J R. kaempferi	国見岳	X	L R. eriocarpum	諏訪之瀬島No.17	JL 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, 11,12,13,14,15
H R. kaempferi	九州大演習林C	X	I R. eriocarpum	諏訪之瀬島No.13	HI 4,6,8,12,15
I R. eriocarpum	諏訪之瀬島No.13	X	H R. kaempferi	九州大演習林C	IH 3,8,10は種子親, 1,6は花粉親

第2-7表. 本研究に用いた交配系統と雑種が示したPCR-RFLPパターン (品種系統)

種子親系統	品種名	花粉親系統	品種名	雑種系統	雑種が示したPCR-RFLPパターン
(久留米支場交配系統)					
M	サツキ	X	N クルメツツジ	MN	1,2,3 すべて種子親
M	サツキ	X	O クルメツツジ	MO	1,2,3 すべて種子親
P	アザレア	X	Q アザレア	PQ	1 (雲化粧) 両親とも同パターンのため判別不能
R	クルメツツジ	X	O クルメツツジ	RO(=N)	1 (筑紫紅) 花粉親
(赤羽氏交配系統)					
R. kiusianum	白花ミヤマキリシマ	X	サツキ	ミヤマサツキ	No.1,9,11 すべて種子親
ミヤマサツキ	No.1	X	R. japonicum	9129	1,2,3,4,5,6,7,12,14,15 すべて花粉親
ミヤマサツキ	No.11	X	R. japonicum	9137	1,2,3,4,5 すべて花粉親
ミヤマサツキ	No.11	X	R. japonicum	9142	1,2 すべて花粉親
サツキ	見雲	X	ミヤマサツキ	9046	1,2 すべて種子親
ミヤマサツキ	No.9	X	サツキ	9056	1,2 すべて種子親

伸長72°C 4分のサイクルを35回繰り返した。増幅したPCR産物は精製した後、制限酵素20種（4塩基認識：*Alu*I, *Hae*III, *Hha*I, *Mbo*I, *Msp*I, *Rsa*I, *Taq*I, *Tsp* 509 I；5塩基認識：*Hin*f I, 6塩基認識：*Bam*HI, *Bgl*II, *Dra*I, *Dde*I, *Eco*RI, *Hin*cII, *Hin*dIII, *Sac*I, *Scr*FI, *Sty*I, *Xba*I）を用いて処理し、2%アガロースの電気泳動で多型を検出した。両親と雑種のPCR-RFLPパターンの多型を比較することによって、各交配系統における葉緑体DNAの遺伝性を判断した。

結果及び考察

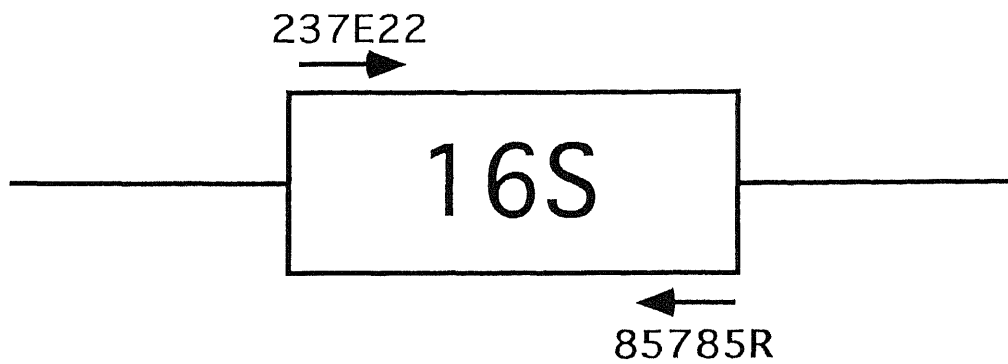
霧島山系のミヤマキリシマと、ヤマツツジ各3個体についてPCRを行った結果、葉緑体DNA上の41領域の内、16領域（第2-8表）で目的の領域として予想されるサイズの単一の増幅産物が得られた。また、各領域の増幅産物のサイズはミヤマキリシマとヤマツツジで同一であった。この16領域について、20種類の制限酵素で処理したところ、rRNA遺伝子の16S領域（1450bp）を第2-8図に示した2種のプライマーを用いてPCRにより増幅し、4塩基認識酵素の*Hha*Iで処理した場合にのみ、ミヤマキリシマとヤマツツジ間で制限断片長に差異が見られた。

第2-9図はrDNA16S領域の増幅産物と、その増幅産物を*Hha*Iで処理した時のPCR-RFLPパターンを示す。Aに示した約1450bpの増幅産物を制限酵素処理すると、Bのようにミヤマキリシマでは約1030と420bpに分かれるパターンが得られ、また、ヤマツツジでは、1030bpのバンドに制限サイト（制限酵素作用部位）が加わった950, 420, 80bpのパターンが得られた。このPCR-RFLPパターンの多型について、分析に用いた交配親系統とその雑種が、両親のどちらと同一なパターンを示したかを第2-6, 2-7表に示した。

第2-6表は野生種を用いた交配系統についてまとめたものである。自殖系統や、両親とも同じパターンを示した6組合せを除いた12組合せのうち、6組合せで花粉親と同じパターンを示す雑種がみられた。個体数でみると、74個体中10個体

第2-8表. 葉緑体DNAの多型検索に用いた領域

・ <i>trn</i> H- <i>psb</i> A	・ <i>psb</i> J- <i>trn</i> P
・ <i>rps</i> 16	・ <i>pet</i> B- <i>pet</i> D
・ <i>trn</i> S- <i>trn</i> R	・ <i>trn</i> L- <i>rps</i> 122
・ <i>trn</i> G- <i>atp</i> A	・ <i>rpl</i> 2
・ <i>rpo</i> C1- <i>rpo</i> C2	・ 16S
・ <i>psb</i> D- <i>psb</i> C	・ <i>trn</i> I-23S
・ <i>trn</i> G- <i>psa</i> B	・ <i>ndh</i> D
・ <i>trn</i> T- <i>psb</i> G	・ <i>ndh</i> H- <i>ndh</i> I



プライマー

237E22 ; 5' -ACGGGTGAGTAACGCGTAAG-3'

85785R ; 5' -CCAGTACGGCTACCTTGTTAC-3'

第2-8図. PCR増幅した葉緑体DNAのrDNA16S領域と
プライマーの塩基配列



ミヤマキリシマ型 (1030, 420bp)
 ヤマツツジ型 (950, 420, 80bp)

第2-9図. ミヤマキリシマおよびヤマツツジにおける葉緑体DNAの
 rDNA16S領域の増幅産物 (A) とその増幅産物を
*Hha*I で処理した際のPCR-RFLPパターン (B)

(13.5%) が花粉親と同じPCR-RFLPパターンを示していた。

一方、第2-7表は主に品種を用いた交配系統についてまとめたものである。常緑性ツツジ間の組合せでは「クルメツツジ」間の‘黒竜’×‘若楓’の雑種‘筑紫紅’が花粉親の‘若楓’と同じPCR-RFLPパターンを示したのを除き、他の組合せでは種子親と同じパターンを示していた。ところが、前節でも扱った「ミヤマサツキ」と落葉性のキレンゲツツジの亜属間の組合せでは、個体をかえた3組合せの雑種17個体のすべてが花粉親のキレンゲツツジと同じPCR-RFLPパターンを示した。

高等植物における細胞質遺伝の機構として、雄性の生殖細胞（花粉）の発達過程で、生殖細胞内の色素体やミトコンドリア核がヌクレアーゼによって選択的に消化されることが知られている。一方、ペラルゴニウム (*Pelargonium*) 属をはじめとして葉緑体が両性遺伝する植物においては、生殖細胞内のオルガネラ核DNAの選択的消化が起こらずに受精するため、両親の性質が子孫に伝達するとされている (Kuroiwa, 1991; 内田・黒岩, 1992)。この両性遺伝のタイプにはツツジ属の数種が含まれており、これまでにサツキ (*R. indicum*)、レンゲツツジ (*R. japonicum*)、ツクシシャクナゲ (*R. metternichii*)、北米産シャクナゲ (*R. maximum*) で花粉発達過程においてオルガネラ核の消失が起こらないことが報告されている (Miyamura et al., 1987; Corriveau and Coleman, 1988; Kuroiwa, 1991)。さらに、生殖細胞の細胞質内における葉緑体DNAのコピー数を調べたところ、母性遺伝と両性遺伝が混合して生ずるシロツメクサ (*Trifolium repens*) ではわずか24であり、常に両性遺伝が生ずるモンテンジクアオイ (*Pelargonium zonale*) では550に達するのに対し、サツキでは120のコピー数があることも分かっている (Kuroiwa, 1991)。このことから、ツツジ属においては両性遺伝の可能性が高いといえる。しかしながら、特にツツジ属におけるこれらの細胞質遺伝の機構は、生殖細胞の発達時や受精反応時における細胞学的な実験結果に基づく

見解であるため、実際に生育している雑種の葉緑体がどのような構成をなしているかは分かっていなかった。

これに対し本研究では人工交配により植物体となって生育している雑種実生を材料としているため、ツツジ属における葉緑体DNAの遺伝性について新たな知見を与えることができた。

まず、常緑性の野生種や園芸品種を用いた交配系統ではその雑種の多くが種子親と同じPCR-RFLPパターンを示した。このことは一般の高等植物同様にツツジ属植物の葉緑体DNAが母性遺伝していることを示している。なお、次章以降の研究で取り上げたミヤマキリシマとヤマツツジ間の組合せのほとんどにおいて葉緑体DNAが母性遺伝をしていることがわかった。PCRによって増幅した16S rDNA領域の制限酵素のサイトの変異によって、種子親と花粉親のマーカの区別を行っている今回の分析法の場合、理論上25サイクルでも1分子のDNAを 10^7 以上に増幅することが可能なPCRを介しているため、少量でも花粉親の葉緑体DNAが遺伝していれば、両親のパターンを共有したパターンが得られるはずである。しかしながら、今回の分析結果からはそのようなパターンは得られなかった。一方、逆にこれらの雑種の1割以上の個体では花粉親と同じPCR-RFLPパターンを示し、葉緑体DNAが父性遺伝していることを示唆した。これらの結果についてはさらに検証を重ねる必要があるが、近縁な種間交雑において葉緑体DNAの遺伝様式に母性遺伝と父性遺伝が混在するという報告はこれまで見当たらず、このツツジ属における遺伝様式は特殊な例として新たな発見であると考えられる。

また、「ミヤマサツキ」×キレンゲツツジの亜属間交配では、雑種の全個体が花粉親のキレンゲツツジと同じPCR-RFLPパターンを示し、葉緑体DNAの父性遺伝を示唆した。針葉樹のほとんどの種では、葉緑体が父性遺伝することが知られている (Ohba et al., 1971; Wagner et al., 1987; Neal et al., 1989;

Neal and Sederoff,1989) . この場合の細胞機構として父性の色素体は卵細胞に入るが、母性の色素体は消失することがわかっている。なお、この交配組合せにおける結果は前節で述べたようにこれらの亜属間雑種の形態形質が花粉親のキレンゲツツジに偏っていたことに関連があるとも考えられ興味深い。

以上のようなことから、ツツジ属における細胞質遺伝の機構として、精細胞の受精時には両性遺伝した葉緑体は、受精後から種子形成過程において種子親あるいは花粉親のどちらかが残り、実生はいずれかの葉緑体をもって生育すると考えられる。

なお、今回の研究結果より示唆されるツツジ属の葉緑体の遺伝様式については、今後、単離した葉緑体DNAを用いたRFLPや、蛍光標識を用いた細胞学的な観察によって裏付ける必要がある。

第2章の要約

ツツジにおけるDNA分析技術の確立を試み、DNA抽出法とDNAマーカーの適用法について検討した結果、以下の成果を得た。

1. 木本性植物であるツツジからは既存の方法ではDNA抽出が困難なものがあったが、既存の抽出法に改良を加え、ツツジ属だけでなく他の木本性植物からもDNA抽出が可能な改変CTAB法を確立した。
2. 改変CTAB法によって抽出したDNAを用い、PCRの応用であるRAPD法によって、常緑性ツツジ品種の同定ができることや、常緑性黄花ツツジ育成過程における遺伝解析への応用例を示した。このことから、RAPDマーカーが形質と関連性の強い遺伝マーカーとして、品種同定に利用できる可能性が示された。
3. 交雑実生を用いてツツジ属における葉緑体DNAマーカーの遺伝性を調べたところ、大半の常緑性ツツジの種間交配による実生では母性遺伝を示したが、なかには父性遺伝を示す個体もみられた。また、常緑性のミヤマサツキと落葉性のキレンゲツツジとの遠縁交雑実生はすべて父性遺伝を示すことがわかり、より詳細な細胞学的研究への新たな問題を提起した。

第3章 九州霧島山系における標高別野生ツツジ集団の解析

九州霧島山系の山頂域にはミヤマキリシマ（図版3-1）が、山麓域にはヤマツツジ（図版3-2）が分布し、その中間帯には両者の自然雑種とされ花色や形態の変異に富む野生ツツジ集団（図版3-3）が分布している。これらの集団は、「江戸キリシマ」のもととなった1品種‘キリシマ’の産地をめぐる問題を解明するために、牧野（1917）、宮澤（1918, 1940）、中井（1922）等により実地調査を中心に研究対象とされてきた。

また、これらの野生種については「江戸キリシマ」や「クルメツツジ」等の常緑性ツツジ園芸品種群の成立に深く関与したものと考えられていることから、これまでに形態や花色色素の分析が行われてきた（国重・田村，1961；有隅ら，1986；Sakata et al., 1993；横川・堀田，1995）。

本章では、園芸品種の成立において重要な存在であるこれらの霧島山系における標高別の常緑性の野生ツツジ集団について、第1節では形態学的調査について論じ（小林ら，1995）、第2節ではそのDNA分析について論述した（小林ら，1995, 1996a）。そして、第3節では第1節、第2節で得られたデータを多変量解析により総合的に評価し、これらの野生ツツジ集団の関係を明らかにしようとした。

第1節. 形態学的調査

霧島山系における野生ツツジ集団については、これまで形態調査を中心に多くの報告がある（国重・田村，1961；有隅ら，1986；宮島，1987, 1988；Sakata



図版3-1. 開花時のミヤマキリシマ（上図）と高千穂峰標高1300m
付近のミヤマキリシマの自生状況（下図）



図版3-2. 開花時のヤマツツジ（上図）と霧島神宮上標高600m付近
ヤマツツジの自生状況（下図）



図版3-3. 高千穂峰と霧島神宮の中間の標高800m付近における
ミヤマキリシマとヤマツツジの自然雑種（上図）と
開花時の自然雑種集団（下図）

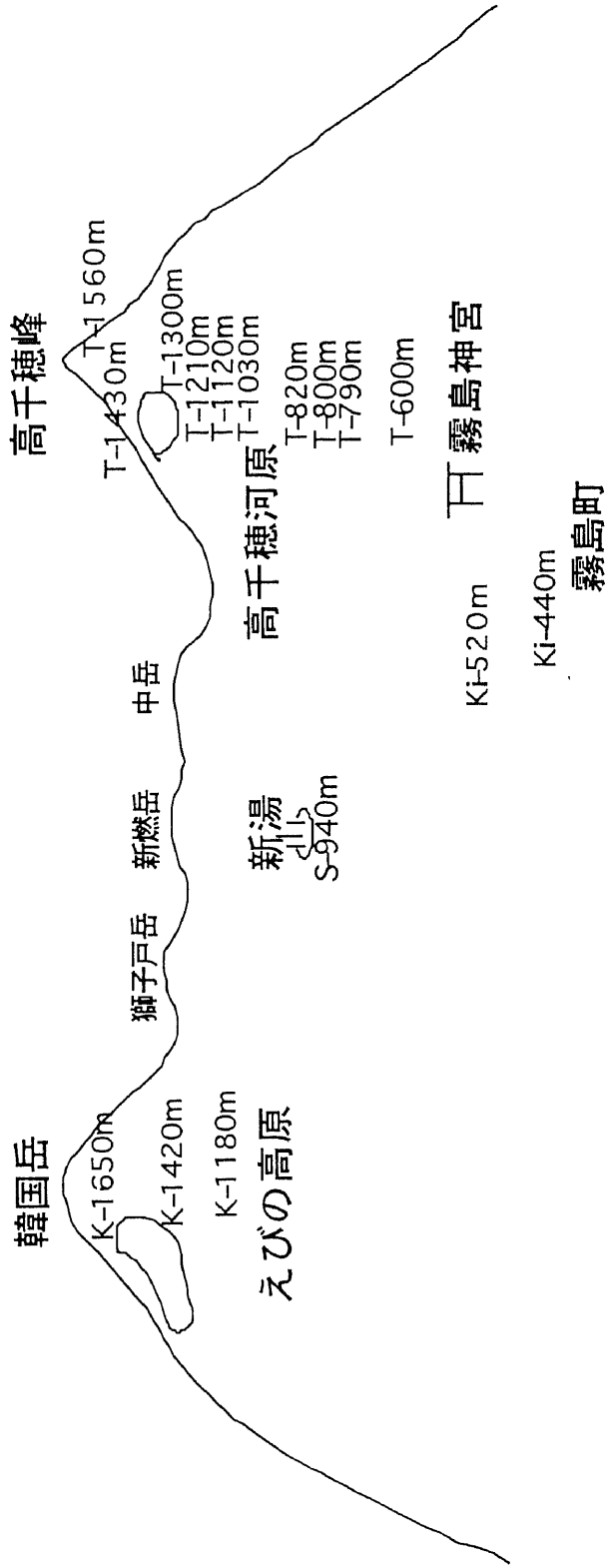
et al.,1993;横川・堀田, 1995)。本研究では形態調査からDNA分析までの一連の研究を通して行うために、まず現地踏査によって標高別野生ツツジ集団の各個体ごとの形態学的なデータを集積した。また、生物季節学的な観察も併せて行った(小林ら, 1995)。

材料及び方法

形態調査および材料採取は、1993～1995年の3年間の5月上旬から6月上旬にかけて行った。ミヤマキリシマが自生する高千穂峰(標高1574m)から御鉢、高千穂河原と、自然雑種とされる集団がみられる標高800m付近、さらにヤマツツジが自生する600m付近から霧島神宮(500m)、霧島町にかけての高千穂峰の南斜面で12地点、また、ミヤマキリシマが自生する韓国岳(1700m)からえびの高原(1180m)の3地点と、さらに花色変異がみられ自然雑種とされる新湯温泉付近(940m)の合計16の調査地点において、合計323個体の形態調査を行った。霧島山系の概略図と調査地点を第3-1図に示した。

形態については葉の大きさ、花冠径、花色、ブロッチの有無、前年枝長および樹高等を計測した。これらの形態調査は各個体の植物体の中央部に位置する、より平均的な器官を3つ抽出して行い、平均値を求めて各個体の代表値とした。花色はRHSカラーチャート(Royal Horticultural Society Colour Chart)を用いて測定し、花卉にみられるブロッチ(斑点)は明瞭なもの(3)、明瞭ではないが認められるもの(2)、わずかにみとめられるもの(1)、認められないもの(0)の基準を設けて分類した。なお、葉の大きさ、前年枝長についてはさく葉標本を作製し後ほど計測した。

また、調査時には各集団における展葉および開花時期の違い等についての生物季節学的観察も行った。



第3-1図. 霧島山系の概略図と野生ツツジ集団の調査地点

結果

形態調査の結果（第3-1表），山頂域のミヤマキリシマ集団（T-1560m～T-1030m）は小型で楕円形の葉と，小型でブロッチ出現率の低い，赤紫色の花冠を有しており，特にこの傾向は韓国岳からえびの高原の集団（K-1650m～K-1180m）でより顕著に現れていた．一方，山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）は大型で長楕円形の葉と，大型で明瞭なブロッチのある朱赤色の花冠を有しており，これらの値については標準誤差を考慮した上でも明らかに有意な差ををもっていった．また，これらの中間帯の集団（T-800m付近，S-940m）では花色の変異に富むとともに，各形質は中間的な数値を示し，山全体でみると標高毎に連続的な変異を示していた．

葉の形態についてまとめたグラフ（第3-2図）をみると，高千穂峰山頂域（T-1560m～T-1210m），韓国岳（K-1650m～K-1180m）のミヤマキリシマ集団では葉長，葉幅とも小さく，また，葉長分の葉幅で表される葉形比がヤマツツジに比べて大きな楕円形の葉を有するのに対し，山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）では葉長，葉幅とも大きく，葉形比が小さい長楕円形の葉を有していた．また，中間帯の自然雑種と思われるT-800m付近と新湯（S-940m）の各集団では中間的な値を示した．

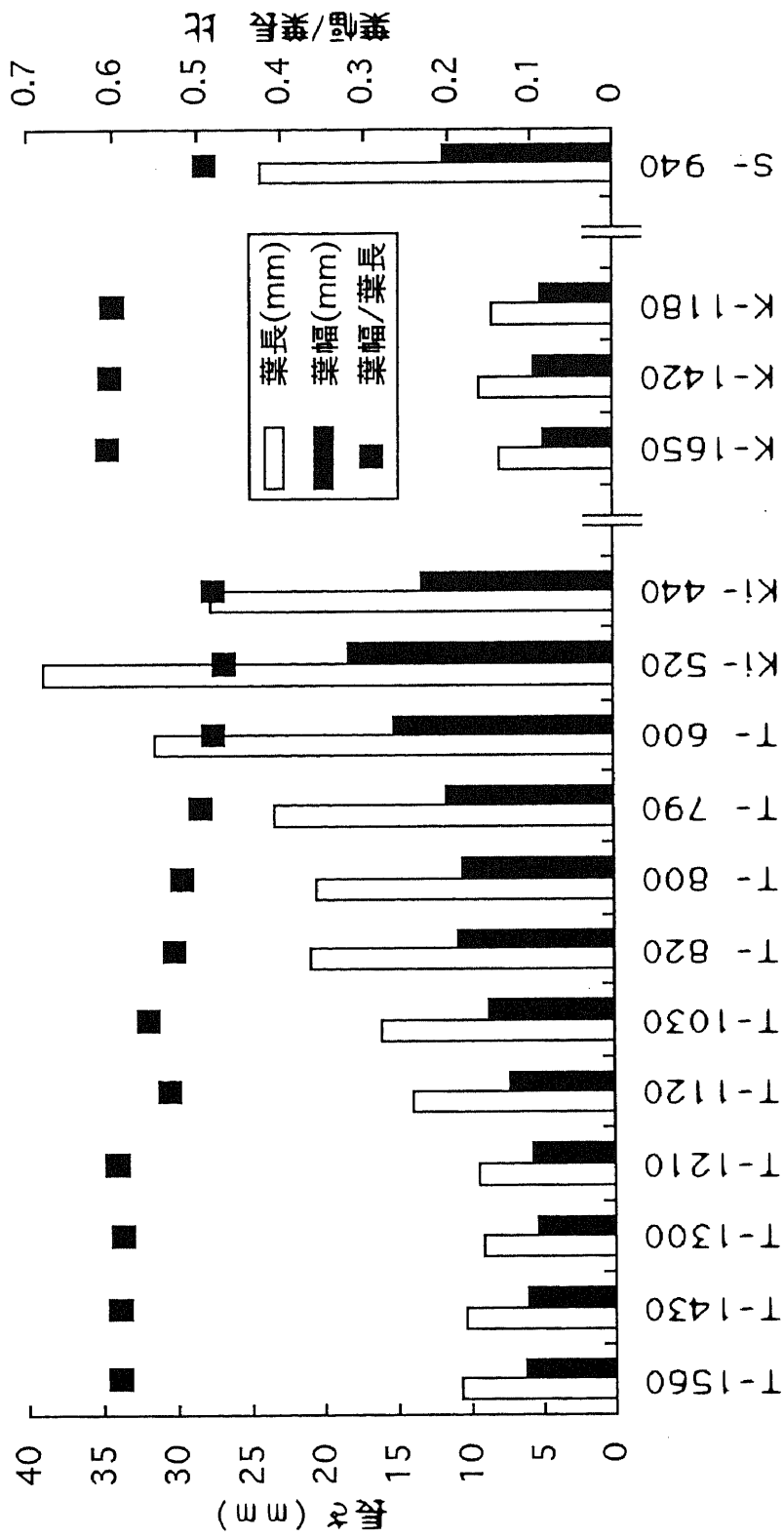
花冠径とブロッチの有無についてまとめてみると（第3-3図），ミヤマキリシマ集団では花冠は小さく，ヤマツツジ集団では大きい花冠を有すのに対し，中間帯の集団（T-800m付近，S-940m）では中庸な大きさを示した．また，ヤマツツジ集団ではほぼ100%ブロッチを有するのに対し，ミヤマキリシマ集団ではその出現率が低く，特に韓国岳からえびの高原のミヤマキリシマ集団（K-1650m～K-1180m）でその傾向は顕著であった．

次に第3-4図はRHSカラーチャートに基づいた花色の出現頻度についてまとめたもので，横軸の番号が大きくなるに従い，朱赤から赤紫色に変化することを示

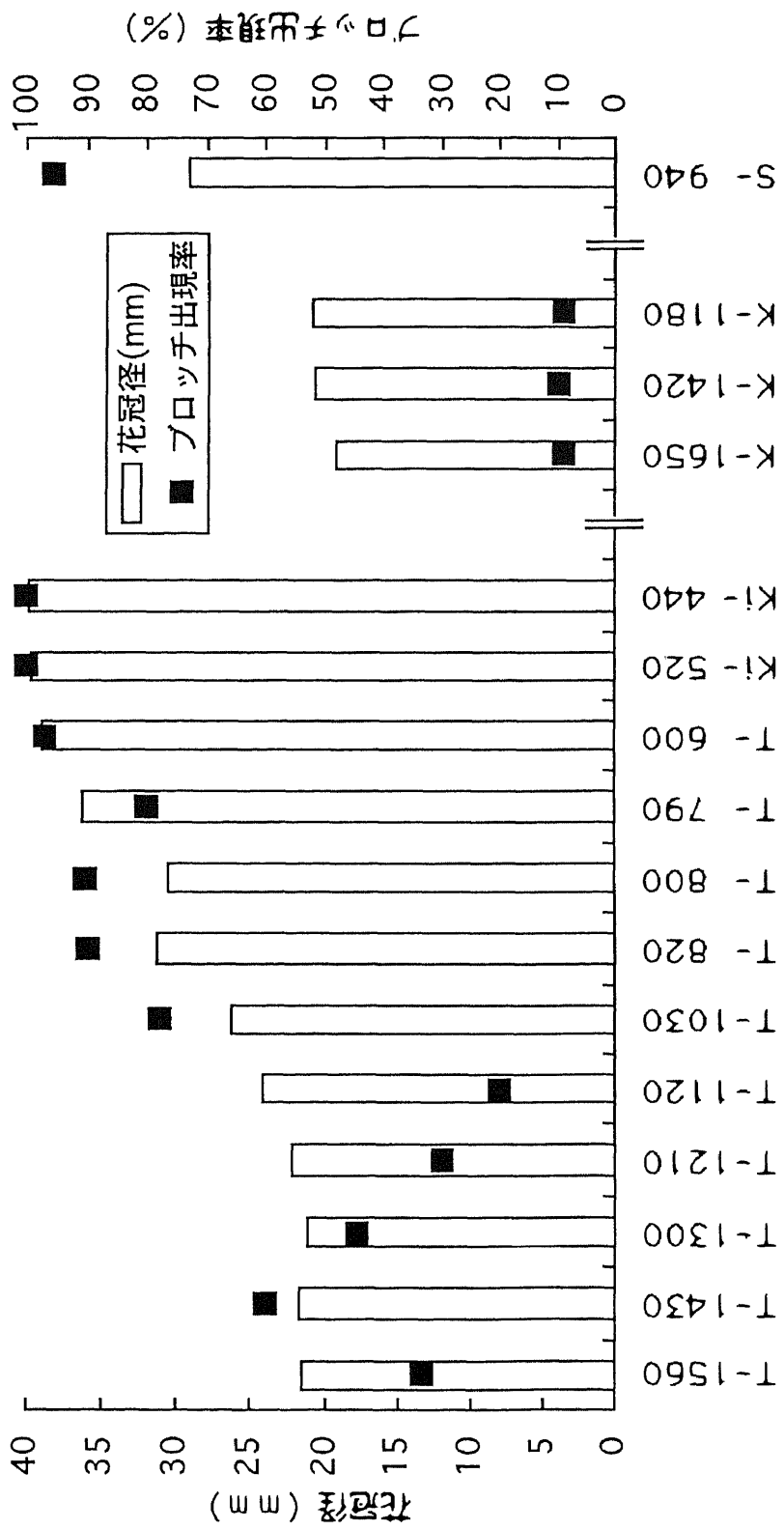
第3-1表．霧島山系における標高別ツツジ集団の形態的特徴

調査地点	個体数	葉長(mm)	葉幅(mm)	葉幅/葉長	花冠径(mm)	フロッチ出現率	前年枝長(mm)	樹高(cm)	
T-1560 ^z	高千穂峰頂上	23	10.6 ± 0.31 ^Y	6.2 ± 0.16	0.59 ± 0.01	21.5 ± 0.64	33.3%	12.3 ± 0.55	66.7 ± 3.54
T-1430		10	10.3 ± 0.57	6.1 ± 0.29	0.60 ± 0.02	21.7 ± 0.39	60.0%	21.2 ± 3.12	48.0 ± 8.14
T-1300	高千穂御鉢	23	9.1 ± 0.25	5.3 ± 0.13	0.59 ± 0.01	21.2 ± 0.62	44.4%	16.0 ± 0.98	8.3 ± 0.91
T-1210		10	9.5 ± 0.48	5.7 ± 0.35	0.60 ± 0.02	22.1 ± 0.53	30.0%	15.9 ± 0.82	28.7 ± 5.28
T-1120		10	14.0 ± 1.18	7.3 ± 0.48	0.54 ± 0.02	24.2 ± 0.92	20.0%	26.2 ± 0.96	126.5 ± 12.02
T-1030	高千穂河原	36	16.0 ± 0.88	8.7 ± 0.35	0.56 ± 0.01	26.3 ± 0.59	77.8%	38.9 ± 2.12	168.1 ± 7.51
T- 820		10	20.8 ± 0.82	11.0 ± 0.53	0.53 ± 0.02	31.2 ± 1.22	90.0%	30.1 ± 1.55	224.5 ± 10.94
T- 800		52	20.5 ± 0.58	10.6 ± 0.29	0.52 ± 0.01	30.6 ± 0.66	90.2%	40.2 ± 2.69	153.1 ± 5.80
T- 790		10	23.4 ± 1.22	11.5 ± 0.54	0.50 ± 0.02	36.3 ± 1.95	80.0%	45.4 ± 4.60	236.0 ± 18.25
T- 600	霧島神宮裏	34	31.4 ± 1.31	15.3 ± 0.76	0.48 ± 0.01	39.0 ± 0.85	96.8%	52.1 ± 2.69	253.5 ± 15.13
Ki- 520	霧島町	26	39.0 ± 2.35	18.3 ± 0.28	0.47 ± 0.01	39.6 ± 0.99	100.0%	54.4 ± 4.48	184.0 ± 9.06
Ki- 440		5	27.6 ± 0.62	13.3 ± 1.18	0.48 ± 0.03	39.8 ± 1.60	100.0%	58.9 ± 8.12	212.5 ± 16.55
K-1650	霧島岳頂上	26	7.9 ± 0.18	4.8 ± 0.12	0.61 ± 0.01	19.2 ± 0.40	8.7%	20.6 ± 0.95	32.8 ± 3.68
K-1420		10	9.3 ± 0.37	5.6 ± 0.24	0.60 ± 0.02	20.7 ± 0.63	10.0%	20.2 ± 0.58	87.5 ± 3.35
K-1180	えびの高原	27	8.5 ± 0.21	5.0 ± 1.12	0.60 ± 0.01	20.7 ± 0.38	8.7%	16.2 ± 1.64	55.6 ± 2.58
S- 940	新湯	22	24.3 ± 0.96	11.7 ± 0.45	0.49 ± 0.01	29.2 ± 0.79	95.5%	39.4 ± 2.21	219.3 ± 8.61

Z ; 数字は標高(m)を示す Y ; 平均±標準誤差

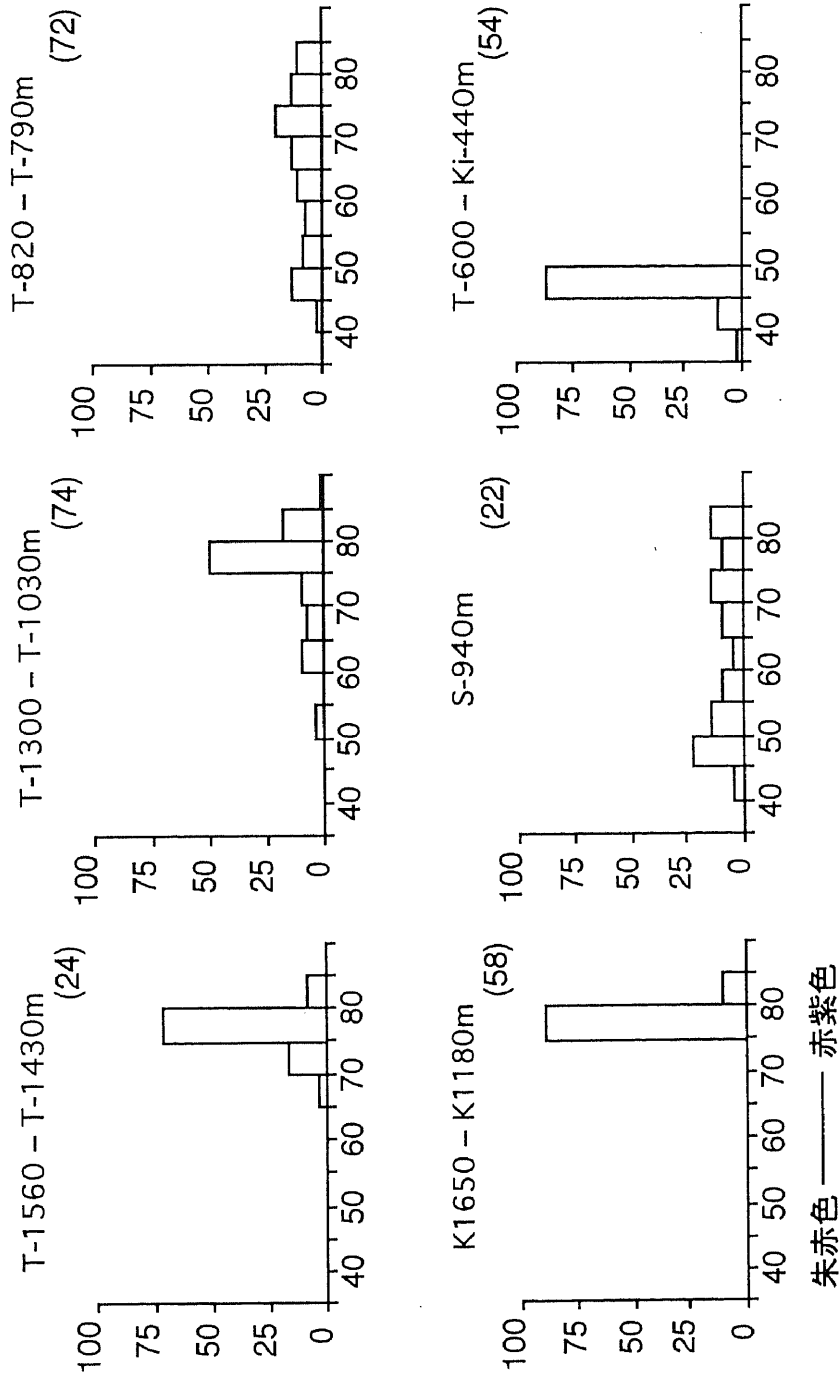


第3-2図. 霧島山系における標高別ツツジ集団の葉の形態的特徴



第3-3図. 霧島山系における標高別ツツジ集団の花の形態的特徴

花色の出現率 (%)



RHS カラーチャート番号

第3-4図. 霧島山系野生ツツジ集団における花色の出現頻度

() 内は個体数

している。これをみると山頂域のミヤマキリシマ、特に韓国岳からえびの高原の集団（K-1650m～K-1180m）ではいわゆる赤紫色の花色のみが出現し、一方山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）では朱赤色のみが出現しているのに対し、高千穂峰山頂域（T-1560m, T-1430m）から御鉢（T-1300m）、高千穂河原（T-1030m）にかけての集団では両種の間色が標高が低くなるにつれて徐々に出現し、特にT-800m付近の中間帯や新湯（S-940m）の集団では非常に花色の変異に富むことがわかった。

このほか、樹高や枝の伸長量は、山頂域の風衝地のミヤマキリシマ、特に御鉢周辺のT-1300m地点で小さく、対照的に山麓の林内のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）では顕著に大きく、また、中間帯の集団（T-800m付近, S-940m）では両種の間間的な値が得られていた（第3-1表）。

また、開花時における各集団の葉の状態を比べると、山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）では4月下旬から5月上旬にかけての開花期には、前年の葉が残存し、新葉（春葉）の展葉はほとんどみられないか、みられてもわずかであった。一方、山頂域のミヤマキリシマ集団（T-1560m～T-1030m）ではこの時期、すでに新葉（春葉）の展葉が開始しており、5月中旬から6月上旬の開花期には完全に新葉が展開していた。また、中間帯の集団（T-800m付近, S-940m）では5月上旬から下旬にかけて開花がみられたが、これらの開花時にはすでに新葉（春葉）が展開していた。

考察

霧島山系における野生ツツジ集団について、国重・田村（1961）は形態に関する現地調査を、有隅ら（1986）、宮島（1987, 1988）、Sakata et al.（1993）は花冠の形態と花色色素の分析を行っている。また、横川・堀田（1995）は葉および花器に関する形態調査と訪花昆虫に関して調査を行っている。これらの研究が

行われた地点はいずれも本研究での調査地点と同一ではないが、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり、それらの分布域の中間帯に分布するキリシマツツジは両種の自然雑種であろうという共通の考察を行っている。

本研究の調査地点は主に有隅ら（1986）、宮島（1987, 1988）、Sakata et al.（1993）の調査地域と共通するものであるが、これらの研究では葉および樹型に関する調査は行われていない。また、山麓より高千穂河原の下までは国重・田村（1961）の調査地点と共通しているが調査基準等の点で他報との比較が難しい。なお、宮澤（1940）は‘キリシマ’の産地探索の際、霧島神宮付近においてミヤマキリシマとヤマツツジの中間の形態を示すキリシマツツジと推定される野生種の存在をあげている。

そこで本研究では、これまでの研究を参考にした上で調査地点を設定し、多くの個体数を用いて形態調査、生物季節学的観察を行った。

葉の形態については、山頂域では小型で、やや丸形のミヤマキリシマの形質を示し、山麓域では大型で、長楕円形のヤマツツジの形質を示していたが、これらの形質はT-1030m地点の前後あるいはT-790m～T-600mの調査地点を境にして、中間的な形質を持つ集団に接していることがわかる。このことから葉の変異は標高に従ってクラインをなしているといえる。この傾向は、同地域における国重・田村（1961）の調査結果とも一致する。また、牧園町から霧島温泉さらに新湯にかけての南西斜面で調査を行っている横川・堀田（1995）の調査でも、ほぼ同じ標高で同様の形質の移行を示していることは興味深い。

小型でブロッコ出現率が低く赤紫色の花冠を有するミヤマキリシマと、大型で明瞭なブロッコを持ち朱赤色の花冠を有するヤマツツジの花の形質についても、葉の形質同様にT-1030m地点の前後あるいはT-790m～T-600mの調査地点を境にして、花冠の形質変異が大きく、非常に花色の変異に富んだ集団に移行する傾向

が見られた。これらのデータについては標準誤差を考慮した上でも有意な差を持っているといえる。このうち、花色の移行に関しては、ミヤマキリシマはデルフィニジン系の、ヤマツツジはシアニジン系のアントシアニンを持ち、中間帯の集団では両種の色素を持つことが報告されている（有隅ら，1986；宮島，1987,1988；Sakata et al., 1993）。本研究の結果，このような傾向も同地域における国重・田村（1961），有隅ら（1986），宮島（1987, 1988），Sakata et al.（1993）の報告と一致しており，別斜面の横川・堀田（1995）の報告とも一致した。

前年枝長や樹高はこれまでの報告にはない調査項目であったが，調査地点により種の特長や環境の影響によると考えられる変化がみられた。特に樹高について，疎林内に生育するヤマツツジでは大きく，アカマツを中心とした林床下に位置するT-600m地点では4 mを越える樹高の個体もみられた。一方，森林限界を超えた標高1200m以上の地点のミヤマキリシマの樹高は1 m以下で，特にT-1300m地点では樹高が5 cmという個体もあった。ミヤマキリシマは陽性植物で，活動終了後の火山性山岳に最初に侵入する植物の一つである（新，1973；稲森ら，1969）。特に風衝地である御鉢（カルデラ）の縁に位置するT-1300m地点の周辺のミヤマキリシマは，匍匐性でクッション型の樹型を示し，主茎は地中に埋もれて伸びていた。T-800m付近や新湯の調査地点の自然雑種と推定されている個体の樹高は，平均値では低山域のヤマツツジとほぼ同様であるが，葉や花の形質がミヤマキリシマ型に偏っている個体では樹高が比較的小さい傾向がみられた。また，このT-800m地点は道路脇の開けた場所であるが，これより50mほど離れ，アカマツの疎林に位置するT-790m地点ではヤマツツジの特徴が強いと思われる個体が多く，樹高も大きかった。なお，これまで筆者は調査個体の一部について挿し穂を採取し，筑波大学圃場にてこれらの野生種を栽培しながら観察を行ってきた。その結果，ヤマツツジの上伸性やミヤマキリシマのわい性の性質は，同環境下における栽培実験でも自生地と同様にみられた。このことから，樹型やシュートの伸長性の違

いは、遺伝的に支配されているものであり、また、それぞれの種の環境適応性の違いを反映しているものと考えられる。

山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）でみられた前年葉の残存性については、すでに宮澤（1940）や宮島（1988）が指摘している。一般にヤマツツジは、第1章第2節のつくばにおける観察で述べたように展葉後期から展葉後に開花し、その時点では前年葉は残存していない。霧島山系のヤマツツジ集団でみられた、開花時には前年葉が残存し、新葉（春葉）の展葉がみられない性質は、南九州型のヤマツツジ特徴的な性質であるといえる。また、このヤマツツジの前年葉の残存性や、ミヤマキリシマや中間帯の集団でみられた展葉後に開花する性質は、筑波大学圃場での栽培実験でも観察されていることから、遺伝的な性質であると思われる。

また、現地における標高別の集団の開花期を比較すると、山麓域のヤマツツジ集団（Y-600m～Ki-440m）では4月下旬から5月上旬、中間帯の集団（T-800m付近、S-940m）では5月上旬から下旬、山頂域のミヤマキリシマ集団（T-1560m～T-1030m）では5月中旬から6月上旬にかけて開花期が移行し、集団間に開花期の重なる時期があることが観察された。このことは集団間で訪花昆虫等による花粉の移行が起こりうる可能性を示唆する（横川・堀田，1995）。

以上の形態調査の結果から、山全体でみると山頂域のミヤマキリシマから山麓域のヤマツツジにかけて各調査項目について連続的な変異がみられ、特に高千穂峰の斜面では両種は標高800m付近を中心として自然雑種を形成していると考えられる。

本研究から得られた知見は、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり、それらの分布域の中間帯に分布するキリシマツツジは両者の自然雑種であるという、これまでの共通の見解をさらに裏付けるものである。

また横川・堀田（1995）は、南西に約10km離れた霧島温泉から新湯、中岳にかけての斜面のほぼ同標高における調査結果からも、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり、それらの分布域の中間帯に分布するキリシマツツジは両者の自然雑種であるという同様の結論に達している。このことから霧島山塊の南から南西の斜面においては標高800m～1000m付近に水平分布を保ってミヤマキリシマとヤマツツジの自然雑種が形成されているものと推察される。

第2節. ミトコンドリアおよび葉緑体のDNAマーカーによる解析

第1節では、形態調査の結果から、霧島山系山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり、それらの分布域の中間帯に分布するキリシマツツジは両者の自然雑種であろうという結果が得られた。第2節ではこれらの結果を裏付けるために、ミトコンドリアDNAのRFLPマーカーや、葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーを用いた分析を行った。特に、自然雑種とされる集団については一般に母性遺伝する葉緑体DNAマーカーを用いて、母系を確定することにより、集団間の関係を明らかにしようと試みた(小林ら, 1995, 1996a)。

材料及び方法

第1節で述べた、高千穂峰(標高1574m)から御鉢, 高千穂河原, 霧島神宮(500m)にかけて12地点, 韓国岳(1700m)からえびの高原(1180m)の3地点および新湯付近(940m)の合計16地点において採取した327個体の新葉を分析に用いた。なお、全DNAの抽出は第2章第1節で述べた改変CTAB法(第2-1図)によって、 -80°C で冷凍保存した約150mgのサンプルより行った。

1) ミトコンドリアDNAのRFLP分析

ミトコンドリアDNAの比較を行うために、ヤマツツジのDNAを鋳型として、エンドウ(*Pisum sativum*)のミトコンドリアの*cox I*および*cox III*由来のプライマー(森林総合研究所, 津村氏より譲与)を用いてPCR増幅した2種類のDNA断片をプローブとして使用した。制限酵素は8種類(*Bgl II*, *Bam HI*, *Dra I*, *Eco RI*, *Eco RV*, *Hae III*, *Hha I*および *Hin d III*)を用いてRFLPの検索を行った。なお、バンドの検出にはECLTMシステム(Amersham, USA)を使用した。

2) 葉緑体DNAのPCR-RFLP分析

PCR-RFLP分析の条件は第2章第3節に従い、葉緑体DNAのrRNA遺伝子の16S領域(16S rDNA; 1450bp)を2種のプライマー(第2-8図)によってPCR増幅し、制限酵素*Hha*Iで処理した際にミヤマキリシマとヤマツツジで多型が確認されているPCR-RFLPパターン(第2-9図)を検出した。

結果

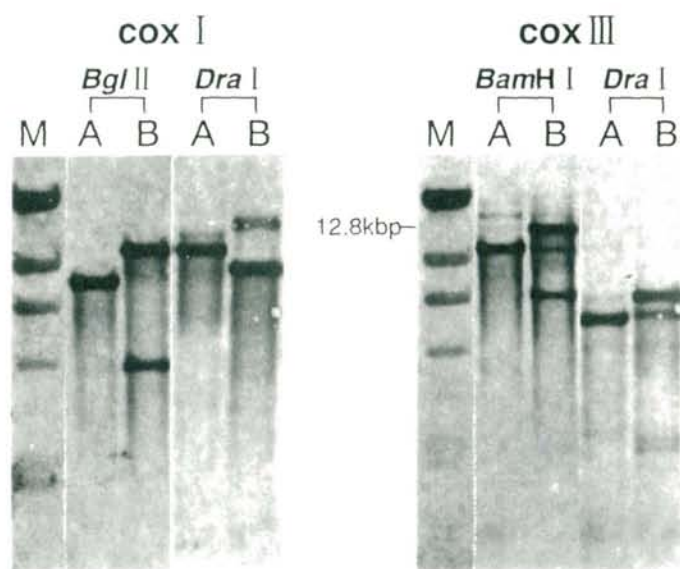
1) ミトコンドリアDNAのRFLP分析

RFLP多型の検索時において、プローブと制限酵素の合計16組合せのうち、*cox I*では*Bgl*IIと*Dra*Iで、*cox III*では*Bam*HIと*Dra*Iの計4組合せについて多型を示すバンドが得られた(第3-5図)。Aは600m地点のヤマツツジ、Bは520m地点のヤマツツジの分析結果を示しており、これらの多型は、制限酵素が異なっても*cox I*と*cox III*でそれぞれ対応したパターンを示すことがわかった。一般に植物では、*cox I*と*cox III*の遺伝子は近傍に位置し、ツツジでも同様に考えられることから、これらの対応した多型はミトコンドリアDNAにおけるその部位の構造変異を裏付ける可能性が考えられた。

そこで、今回は*cox III*と*Bam*HIの組合せにおける12.8kbpのマーカの有無に着目し、各集団について分析を行った。

第3-2表には、各調査地点における12.8kbpのマーカの出現頻度を示した。全体に12.8kbpのマーカを持つ個体が多い傾向があるが集団間において違いがみられ、調査地点によっては同数、あるいはT-600m地点のように全個体がこのマーカを持たない集団もみられた。

ここで、T-600m地点を例外として除き、高千穂峰山頂域(T-1560m, T-1430m)、御鉢から高千穂河原(T-1300m~T-1030m)、中間帯(T-820m~T-790m)、ヤ



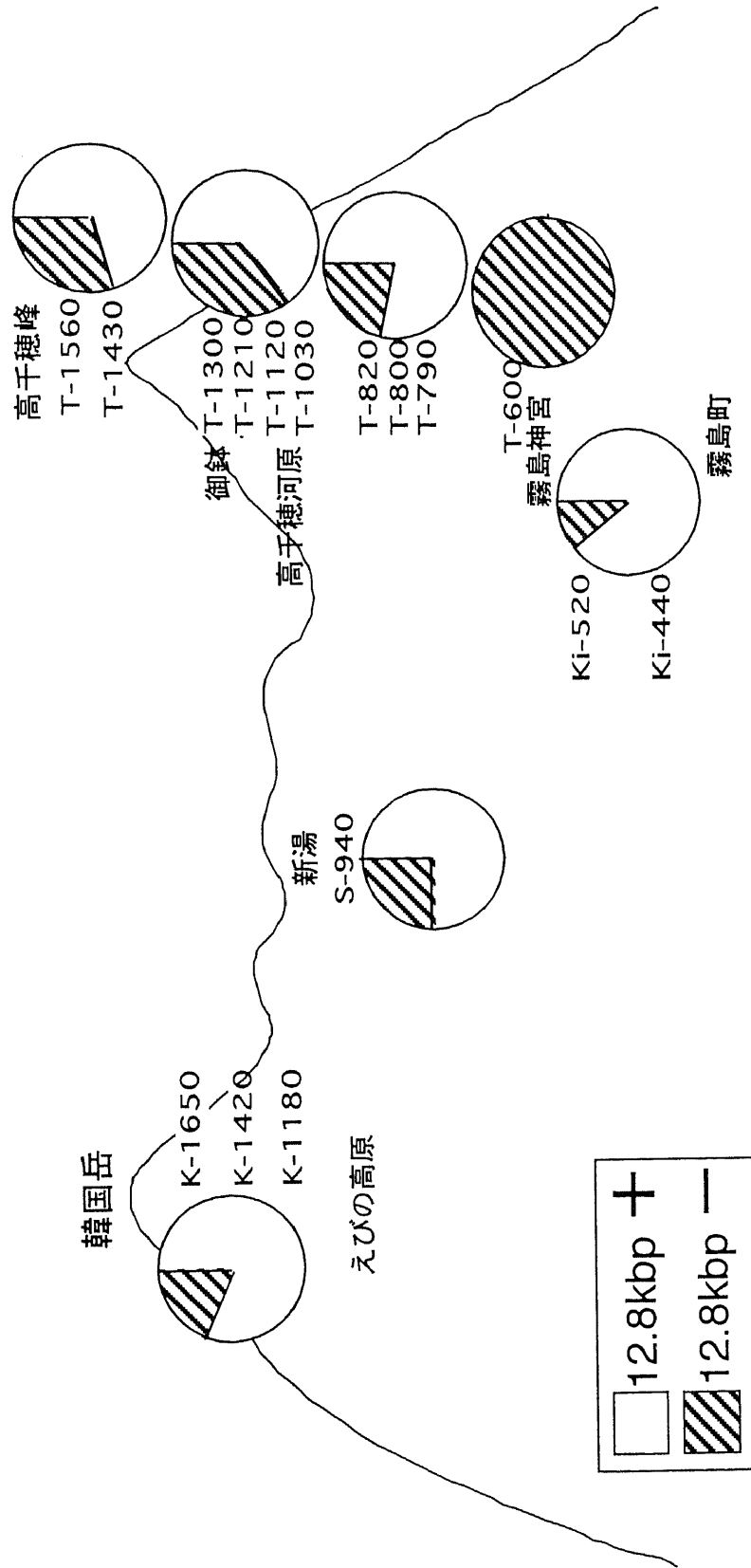
第3-5図. プローブ *cox I* および *cox III*, 制限酵素 *Bgl II*, *Dra I* および *BamH I* の組合せで得られるミトコンドリアDNAのRFLPパターン

A ; T-600m地点のヤマツツジ
 B ; Ki-520m地点のヤマツツジ

第3-2表. 霧島山系における標高別ツツジ集団のRFLP分析結果
 (制限酵素; *Bam* HI, プローブ; COXIII)

調査地点	個体数	12.8kbpマーカの有無	
		+	-
T-1560 ^z 高千穂峰頂上	13	12	1
T-1430	7	2	5
T-1300 高千穂御鉢	14	7	7
T-1210	4	4	0
T-1120	8	3	5
T-1030 高千穂河原	28	21	7
T- 820	10	7	3
T- 800	38	35	3
T- 790	8	2	6
T- 600 霧島神宮裏	22	0	22
Ki- 520 霧島町	15	13	2
Ki- 440	4	4	0
K-1650 韓国岳頂上	22	19	3
K-1420	5	2	3
K-1180 えびの高原	23	20	3
S- 940 新湯	8	6	2

Z ; 数字は標高(m)を示す。



第3-6図. 霧島山系野生ツツジのRFLP分析における
12.8kbp mt DNAマーカーの出現率

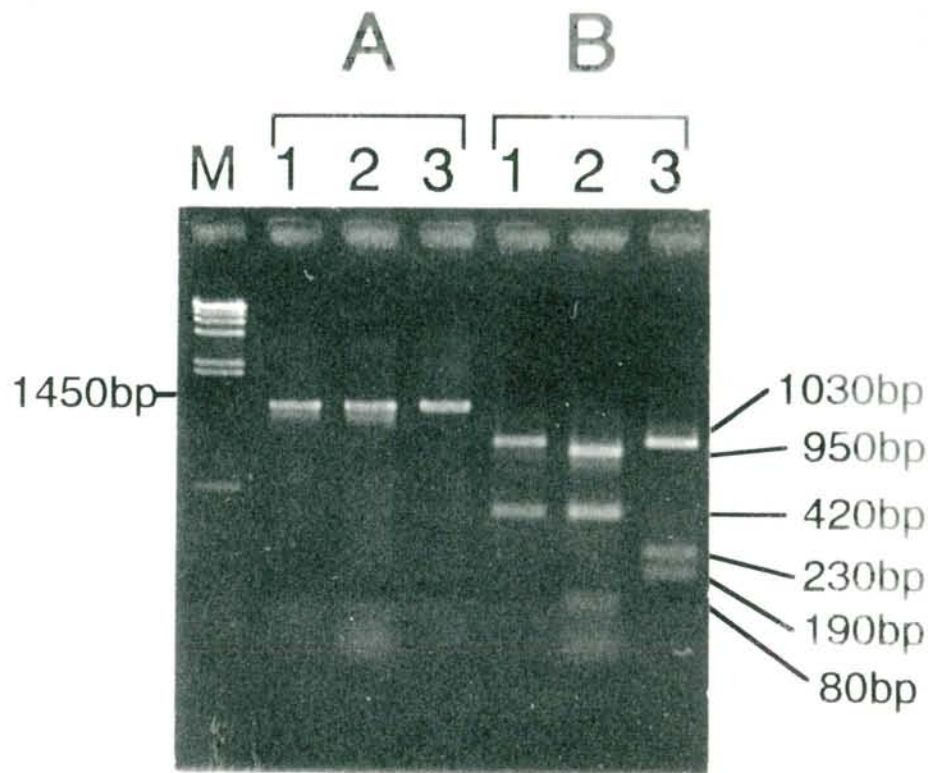
マツツジ (Ki-520m, Ki-440m), また, 韓国岳からえびの高原 (K-1650m~K-1180m) と, 新湯 (S-940m) に数集団をまとめてみると, 各調査地点で12.8kbpのマーカ―を持つ個体と持たない個体が明らかに混在した (第3-6図)。

2) 葉緑体DNAのPCR-RFLP分析

第3-7図は rDNA16S 領域の増幅産物と, その増幅産物を *Hha*I で処理した時の PCR-RFLP パターンを示す。A に示した約1450bp の増幅産物を制限酵素処理すると, B のようにほとんどのミヤマキリシマでは約1030と420bp に分かれるパターンが得られ, また, ヤマツツジでは, 1030bp のバンドに制限サイト (制限酵素作用部位) が加わった950, 420, 80bp のパターンが得られた。このほか, 少数だが, 420bp のバンドに制限サイトが加わり1030, 230, 190bp のバンドを持つパターンの全部で3種類の PCR-RFLP パターン (第3-8図) が得られた。

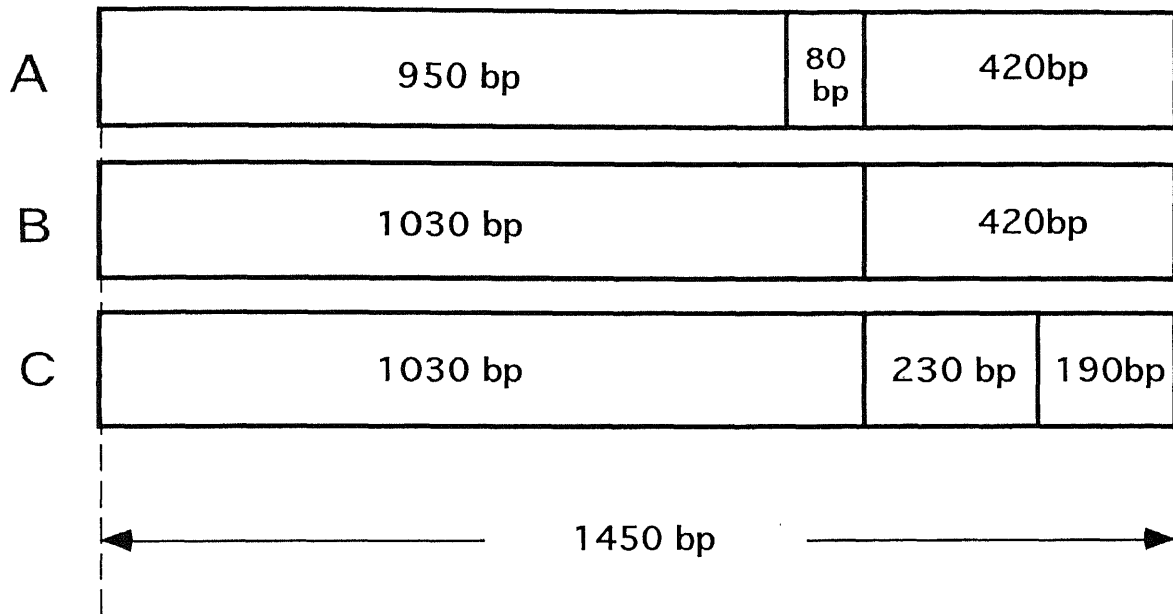
なお, 次の第3-9図は各集団の一部の個体を分析した際のバンドパターンである。本図のとおり, ミヤマキリシマ, ヤマツツジはそれぞれ特有のパターンを示すのに対し, 中間帯のT-800m地点の集団では両者のパターンをもつ個体が混在していることがわかる。

最終的に, 合計327個体について分析した結果 (第3-3表), 高千穂峰頂上 (T-1560m) からT-1120m地点までのミヤマキリシマ集団では大半が1030bp と420bp のパターンを示しており, また韓国岳からえびの高原の集団 (K-1650m~K-1180m) では全63個体がこのパターンを示した。一方, T-790m地点とT-600mからKi-440m地点のヤマツツジでは, ほとんどが950, 420, 80bp のパターンを示した。また, 一部で花色変異がみられる高千穂河原のT-1030m地点ではミヤマキリシマのパターンにヤマツツジのパターンが混在し, 形態や花色から自然雑種と推定されるT-800m地点と新湯 (S-940m) の調査地点では, 両種のパターンがほぼ同数混在していた。なお, 1030, 230, 190bp のパターンは数集団に低頻度で出現していた。



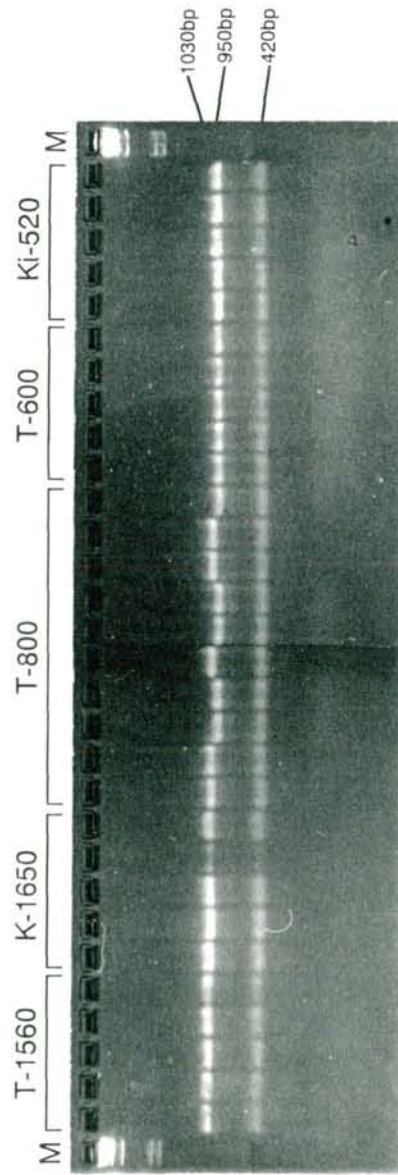
- 1 ; ミヤマキリシマ型 (1030, 420bp)
- 2 ; ヤマトツジ型 (950, 420, 80bp)
- 3 ; 少数出現型 (1030, 230, 190bp)
- M ; DNA分子量マーカー (λ DNA / *Hind*III)

第3-7図. 葉緑体DNAのrDNA16S領域の増幅産物 (A) と
その増幅産物を*Hha*Iで処理した際のPCR-RFLPパターン (B)



第3-8図. 制限酵素*Hha*Iによる葉緑体DNAのrDNA16S領域の制限サイト地図

- A ; ヤマツツジ型 (950, 420, 80 bp)
- B ; ミヤマキリシマ型 (1030, 420 bp)
- C ; 少数出現型 (1030, 230, 190 bp)



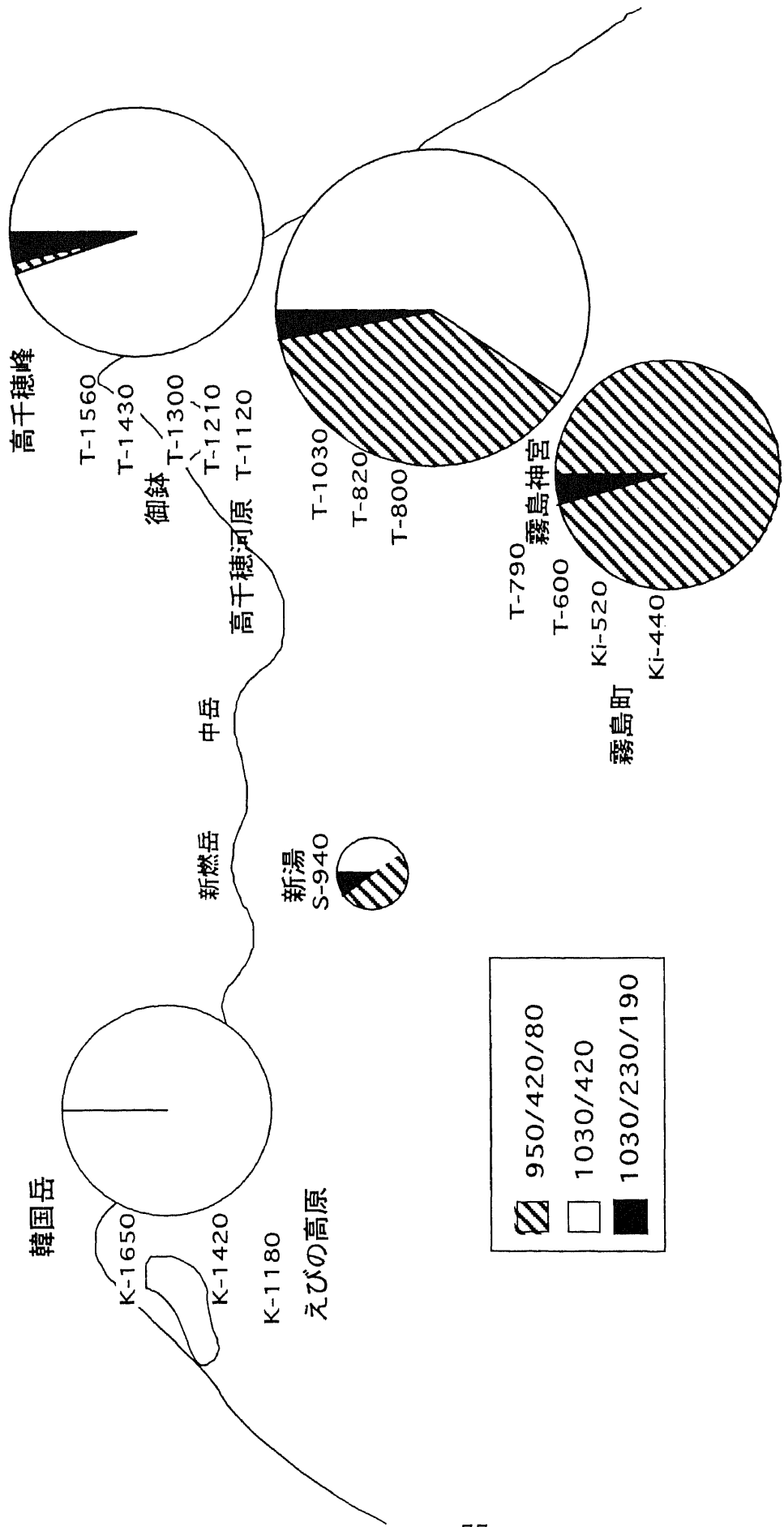
霧島山系の各ツツジ集団のPCR-RFLPパターン

第3-9図. 霧島山系の標高別野生ツツジ集団のPCR-RFLPパターン

第3-3表. 霧島山系における標高別ツジ集団のPCR-RFLP分析結果

調査地点	個体数	PCR-RFLPパターン (bp)			
		1030/420	950/420/80	1030/230/190	
T-1560 ^z	23	23	0	0	0
T-1430	10	7	1	2	0
T-1300	23	23	0	0	0
T-1210	10	10	0	0	0
T-1120	10	9	0	1	0
T-1030	35	28	7	0	0
T- 820	9	6	3	0	0
T- 800	52	23	26	3	0
T- 790	10	0	10	0	0
T- 600	29	0	29	0	0
Ki-520	26	0	23	3	0
Ki-440	5	0	4	1	0
K-1650	26	26	0	0	0
K-1420	10	10	0	0	0
K-1180	27	27	0	0	0
S- 940	22	9	11	2	0

Z ; 数字は標高(m)を示す。



第3-10図. 霧島山系野生ツツジ集団における葉緑体DNAのPCR-RFLPパターンの出現率

そこで第3-10図に、第3-4表の高千穂峰頂上 (T-1560m) からT-1120m地点、高千穂河原 (T-1030m) から中間帯 (T-800m), T-790mから霧島町 (Ki-440m), また、韓国岳からえびの高原 (K-1650m~K-1180m) と、新湯 (S-940m) ごとに各集団をまとめてデータを集計すると、高山域では明らかにミヤマキリシマ型のパターンが優先し76個体中の72個体 (94.7%) を占めるのに対し、山麓部のヤマツツジではヤマツツジ型のパターンが優先し70個体中の66個体 (94.3%) を占めていることが明らかとなった。また、自然雑種集団と推定されるT-800m地点とその上部および、新湯 (S-940m) の調査地点では両種のパターンが混在していた。

以上の結果より、本研究では霧島山系におけるミヤマキリシマとヤマツツジの種間での差異を示すPCR-RFLPマーカーが得られた。同時に、これら両種のマーカーが混在する集団における雑種性が示唆された。

考察

1) ミトコンドリアDNAのRFLP分析

植物のミトコンドリアDNAについては構造的に再編成しやすいことや、塩基置換率が低いことから、これまで植物の系統を論じる上でDNAマーカーとしてあまり用いられていない (Palmer, 1992) が、アブラナ (Palmer, 1992) やコムギ (Breiman, 1987) 等では系統分類や、種内あるいは種間の変異についての報告がみられる。これらの研究例でも、本研究で用いた *cox I* や *cox III* 遺伝子が構造的に安定しているため、マーカーとして用いられている。

今回、分類上同列に属すミヤマキリシマ集団とヤマツツジ集団、およびそれらの自然雑種と考えらる集団には、構造変異によると考えられる共通したミトコンドリアDNAの変異が存在することがわかった。変異の分布には、種あるいは調査地点の標高等による特定の傾向はみられなかったが、T-600m地点については供試した22個体のすべてが同一のRFLPパターンを示していた。この理由として

T-600m地点の環境条件が考えられる。中期の常緑樹が主体の植生であるT-600m地点は道路より入り込んでいる。このような林内では、飛行距離が比較的短いクロアゲハ等が主に花粉媒介をすることが知られており（横川・堀田, 1995）、花粉流動の範囲が狭く他地域の遺伝子の移入が起こりにくいために、同系統が安定して繁殖維持なされていることが考えられる。

2) 葉緑体DNAのPCR-RFLP分析

葉緑体DNAは多くの陸上植物について研究されており、タバコ（Shinozaki et al., 1986）、イネ（Hiratsuka et al., 1989）、ゼニゴケ（Ohyama et al., 1986）では全塩基配列が決定されている。これらの研究から、葉緑体DNAは、ゲノムサイズ、構造、遺伝子配列、塩基配列が変異を起こすことなく高度に保存されていることがわかっている。従って、この葉緑体DNAに遺伝子配列や構造の変異が検出された場合、それは変異を共有する群の共通派生形質として有力な系統学的情報となる（長谷部, 1990）。この理由から、植物の分子系統学的な研究において、葉緑体DNAの変異を扱った報告は多数みられ、総説もまとめられている（Clegg and Zurawski, 1992; Downie and Palmer, 1992; 長谷部, 1990）。

本研究では、PCRにより増幅した葉緑体DNA中の各領域について制限酵素断片長多型（RFLPs）によって検出される変異を調べた。その結果、第2章第3節で述べたように16領域のうち、リボゾームRNA遺伝子（rDNA）の16S領域だけに、しかも20種の制限酵素を用いたうち、4塩基認識酵素の*Hha*Iで処理した場合にのみ、ミヤマキリシマとヤマツツジ間で制限酵素断片長に差異が見られたので、これを2種間の識別マーカーとして用いることができた。このことから、両種は葉緑体DNAからみても非常に近縁であると考えられる。

リボゾームRNA遺伝子（rDNA）はタンパク合成を機能とするリボゾームRNAをコードする遺伝子であり、植物では核、葉緑体、ミトコンドリアのそれ

ぞれのゲノムの中に存在する。今回用いた rDNA16S 領域は、葉緑体ゲノム中に存在する rDNA の 1 種で、逆位反復配列 (inverted repeat) の中に位置している。これらの rDNA は一般に保存性が高いため、分類が複雑で進化速度が速い細菌では、この 16S rDNA が分子系統マーカーとして頻用されている (Hamby and Zimmer, 1992)。

木本性植物の葉緑体 DNA は、草本性植物より進化速度が遅いことから (長谷部, 1990)、分類上ごく近縁なミヤマキリシマとヤマツツジ間で 16S rDNA の遺伝子内に変異がみられたことは特異的であると考えられる。制限酵素による切断サイトは、それに必要とされる塩基置換数の違いから確率的にサイトの獲得に比べて損失の方が起こりやすい。また他のより遠縁な数種のツツジ属植物について分析したところ中之島産マルバサツキを除くすべてでヤマツツジ型を示していた。したがって、rDNA16S 領域に関して、950bp と 80bp のバンド間のサイトが損失し、1030bp のバンドを持つミヤマキリシマ型のパターンは、ヤマツツジ型 (950, 420, 80bp) から分化した特異的な変異であると考えられる。

このマーカーを用いて霧島山系のツツジ集団を分析したところ、大半のミヤマキリシマおよびヤマツツジはそれぞれミヤマキリシマ型 (1030, 420bp) およびヤマツツジ型 (950, 420, 80bp) の PCR-RFLP パターンを示し、中間帯の自然雑種とされる集団には両パターンが混在していた。この結果は、前節で示した、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した集団であるという形態調査の結果と完全に重なるものである。また、霧島山系の山腹に分布し、多様な花色や形態変異を持つ野生ツツジ集団は、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジのいずれかを母本とした雑種の混合集団であることを示している。しかも、この雑種集団が形態や花色について変異に富むということは、雑種間またはミヤマキリシマやヤマツツジとの交雑または戻し交雑が繰り返して行われた結果であり、ミヤマキリシマとヤマツツジとの間で浸透交雑が起こったことを示

しているものと考えられる。これまで形態学的あるいは、花色色素による化学的な分析により提唱されてきた推察（国重・田村，1961；有隅ら，1986；Sakata et al., 1993；宮島，1987，1988；横川・堀田，1995）に，DNA分析から裏付ける証拠を与えることができた。

本研究と近似した報告例として，Kron et al.（1993）による北米の落葉性ツツジに関する研究がある。アメリカ，ジョージア州のストーン・マウンテンの落葉性ツツジ2種（*R. flammeum*, *R. canescens*）の分布が重なる地域において，外観は*R. flammeum* あるいは両種の中間的な形態を示す個体の多くが*R. canescens* 型の葉緑体DNAのRFLPパターンを示すことから，*R. canescens* から*R. flammeum* への浸透交雑（introgression；遺伝子移入）が起こっていることを示唆している。

霧島山系の雑種集団では両種のパターンがほぼ同比率で混在したが，T-1030m地点等ではミヤマキリシマに偏った形態を持ちながら，ヤマツツジ型のパターンをしめす個体があることや，次章で述べる阿蘇山系等のミヤマキリシマの多くがヤマツツジ型のパターンを示していることから，ミヤマキリシマに対してヤマツツジからの遺伝子移入が起こっている可能性が高いものとする。

Anderson（1949）によって提唱された浸透交雑（introgression）の概念の骨子としては，第1にそれまで存在していた異種間の隔離障壁が壊れてF₁雑種が形成されること，第2に一方の種への反復した戻し交雑がおきること，そして第3に形成された雑種後代が淘汰圧のもとで固定し，新たな種形成へと導かれることが基礎に据えられている。本研究の霧島山系の場合，火山活動による環境変化によってミヤマキリシマとヤマツツジの雑種が形成された後，主にミヤマキリシマによる戻し交雑が起こっている状態にあると考えられる。しかし，これらの雑種集団はすでに安定した状態にあり，雑種集団のまま維持されている可能性もある。

浸透交雑に関する研究は，DNAマーカーの発達によって，ヒマワリの仲間

(*Helianthus*) を筆頭にして様々な植物で進展し、それらの植物間の浸透交雑が実証されてきた (Heiser, 1951, 1973; Wagner et al., 1987; Riesberg et al., 1988, 1990; Riesberg and Brunsfeld, 1992)。このうち、PCRを介した研究例として、Arnold et al.(1991)は、葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーとRAPDマーカーを用いて、アメリカ合衆国ルイジアナ州において2種のアヤメ属 (*Iris fulva*, *I. hexagona*) が接して分布する地点での浸透交雑を証明している。この研究では母性遺伝する葉緑体DNAマーカーと両性遺伝するRAPDマーカーによって浸透交雑の方向性を指摘している。

本研究では、第2章第3節で示したように、ツツジの場合おもに母性遺伝する葉緑体DNAマーカーを用い、先に述べたように形態的形質とDNAパターンとの関係から浸透交雑の方向性を推定した。織田ら(1995)は本研究で扱ったDNAサンプルの一部を用い、RAPD法によるバンドパターンから集団間の関係をクラスタ分析によって解析している。その結果、高千穂峰のミヤマキリシマとヤマツツジは標高別にクラスタに分かれるが、韓国岳のミヤマキリシマと一部のヤマツツジが一つのクラスタを形成するなど、本研究の結果からは説明できないところもあった。この理由として、個体間のゲノムの差異を検出することに特徴を持つRAPD法では、種や集団間でのゲノムの差異に比べて個体間差異が増長されたことが考えられる。そこで、現段階ではRAPD法による分析をあえて取り入れなかった。

なお、ミヤマキリシマとヤマツツジ、およびこれらの雑種形成を考える場合、環境適応性の違いによる影響も考慮する必要がある。ミヤマキリシマは陽生植物であるのに対し、ヤマツツジは林床下でも生育可能である。火山活動の終焉後、山麓部から森林植生が登っていく過程において、火山原に生育していたミヤマキリシマは徐々に高山域に追われていく。この際に森林性のヤマツツジとの交雑の機会が得られ、雑種集団を形成する。この後、新たな火山活動でもない限り、森

林が極相に向かって遷移することによって、これらの雑種もヤマツツジにとって代わられる可能性も考えられる。しかし、実際には九州の山岳における森林限界は1200m前後であり、そこにミヤマキリシマ集団が維持されることによって、同時に、その下の地域に雑種集団が維持されていくことが考えられる。

今後、さらに各種のDNAマーカーを用いた分析や環境適応性を解明するための栽培実験（Bennet and Grace, 1990）等によって、これらの野生ツツジ集団間あるいは集団内の構造がより明らかになって行くものと思われる。

第3節 多変量解析による総合的評価

多変量解析法を用いた数量分類学の特徴として、より多くの形質を用い、人間の主観を排除して客観的に植物個体間の関係を解析できることが挙げられる。このため、各種園芸作物においても多変量解析の適用例が報告されている（半田，1988；箱田・秋浜，1988；浜田ら，1989；時本，1991）。

本節では、第1章の形態調査で得られた各調査項目の結果について、多変量解析法のうちクラスター分析と主成分分析を用いて客観的に評価し、第2章で得られたDNA分析の結果を重ね合わせることによって、霧島山系における野生ツツジ集団の構造を総合的に評価しようとした。

材料及び方法

第1節の形態学的調査で得られた各集団の計測データから、おもに1993年に収集した欠損値のない165個体分（第3-4表）を抽出し多変量解析に用いた。解析に用いた個体は各調査地点ごとに基本的に10個体とし、形態変異が多いT-800m地点では21個体を用いた。

調査項目は本章第1節で述べた葉長、葉幅、葉形比、前年枝長、花冠径、樹高、花色（RHSカラーチャート番号）およびブロッチの程度（0～3）の8項目を用いた。分析法はクラスター分析および主成分分析を用い、各個体の計測データを標準化して用いた。

なお、得られた分析結果については、第2節で得られた葉緑体DNAのPCR-RFLPパターンと比較検討した。

1. クラスター分析

クラスター分析は、Systat-FPU-5.2.1 (Systat Inc.) のコンピュータプログラ

第3-4表. 多変量解析に用いた霧島山系野生ツツジの各個体のデータ

個体番号		葉長 (mm)	葉幅 (mm)	葉幅/葉長 比	前年枝長 (mm)	花冠径 (mm)	樹高 (cm)	花色 (RHS C.C.)	フロッチの程度 (0:無~3:強)	(16S/Hha l) ²
1	K1650-1	9.05	5.09	0.56	22.40	19.67	32.8	75	0	2
2	K1650-2	8.22	4.99	0.61	31.92	18.33	32.8	75	0	2
3	K1650-3	8.81	4.89	0.56	22.31	19.00	32.8	75	0	2
4	K1650-4	8.61	5.32	0.63	24.98	18.00	32.8	75	0	2
5	K1650-5	7.92	3.75	0.48	11.78	16.67	32.8	75	0	2
6	K1650-6	8.02	6.08	0.75	25.64	18.00	32.8	75	0	2
7	K1650-7	9.38	5.36	0.57	18.82	16.00	32.8	75	0	2
8	K1650-8	8.20	5.43	0.67	24.90	13.67	32.8	75	0	2
9	K1650-9	8.10	4.95	0.61	20.40	20.67	32.8	75	0	2
10	K1650-10	9.45	5.92	0.63	30.44	22.00	32.8	75	0	2
11	K1420-1	9.35	5.16	0.55	20.55	24.33	100.00	75	0	2
12	K1420-2	8.01	5.69	0.71	21.19	19.33	100.00	75	0	2
13	K1420-3	11.85	7.38	0.62	21.78	19.00	100.00	75	0	2
14	K1420-4	10.76	5.38	0.50	21.89	22.33	85.00	75	0	2
15	K1420-5	8.82	6.16	0.70	22.25	20.33	75.00	75	0	2
16	K1420-6	9.33	5.76	0.62	20.77	19.50	90.00	75	0	2
17	K1420-7	8.96	5.13	0.57	18.49	20.33	80.00	75	0	2
18	K1420-8	8.92	5.00	0.58	19.89	23.33	70.00	75	0	2
19	K1420-9	8.47	4.78	0.57	18.92	20.00	85.00	75	0	2
20	K1420-10	8.41	5.03	0.60	16.35	18.33	90.00	75	0	2
21	K1180-1	8.30	4.89	0.59	9.58	20.13	70.00	75	0	2
22	K1180-2	7.15	4.17	0.58	8.79	18.93	35.00	75	0	2
23	K1180-3	8.05	4.70	0.59	13.08	18.10	50.00	75	0	2
24	K1180-4	7.90	5.79	0.74	9.79	19.17	40.00	75	0	2
25	K1180-5	7.32	4.21	0.57	17.60	20.77	70.00	75	0	2
26	K1180-6	7.58	4.30	0.57	14.15	21.77	60.00	75	0	2
27	K1180-7	10.01	5.89	0.59	12.25	20.70	30.00	80	0	2
28	K1180-8	7.10	4.12	0.58	15.24	18.40	40.00	75	0	2
29	K1180-9	9.19	5.59	0.61	21.66	22.97	80.00	75	0	2
30	K1180-10	8.79	5.24	0.60	11.77	19.97	80.00	75	0	2
31	T1560-1	12.64	6.73	0.53	9.81	22.33	55.00	75	1	2
32	T1560-2	8.60	4.86	0.57	8.36	20.03	40.00	75	0	2
33	T1560-3	8.94	5.69	0.64	8.17	22.83	70.00	75	0	2
34	T1560-4	9.05	5.26	0.58	9.02	19.40	40.00	70	0	2
35	T1560-5	11.14	5.63	0.51	9.80	21.17	55.00	80	0	2
36	T1560-6	8.69	5.69	0.67	11.07	20.73	70.00	75	0	2
37	T1560-7	9.36	5.97	0.64	11.93	21.67	75.00	75	2	2
38	T1560-8	8.71	5.15	0.59	9.09	21.83	80.00	65	0	2
39	T1560-9	8.45	4.96	0.59	9.15	25.57	50.00	75	0	2
40	T1560-10	8.74	5.47	0.64	11.27	22.37	55.00	75	1	2
41	T1430-1	10.47	7.07	0.67	24.20	21.47	20.00	75	0	2
42	T1430-2	7.83	5.30	0.68	10.97	21.00	25.00	70	1	1
43	T1430-3	13.37	7.03	0.53	14.33	21.77	65.00	75	0	2
44	T1430-4	11.47	6.10	0.53	16.93	21.87	40.00	75	0	3
45	T1430-5	12.67	7.27	0.57	45.40	23.67	45.00	70	1	2
46	T1430-6	8.83	5.23	0.59	20.37	20.30	80.00	75	2	3
47	T1430-7	10.73	6.80	0.63	27.43	22.83	90.00	70	1	2
48	T1430-8	9.53	5.50	0.58	21.20	22.87	50.00	75	1	2
49	T1430-9	8.90	4.63	0.52	13.97	21.57	55.00	75	1	2
50	T1430-10	8.90	5.80	0.65	17.07	19.50	10.00	75	0	2
51	T1300-1	9.75	5.71	0.58	20.24	23.63	5.00	70	1	2
52	T1300-2	9.73	6.49	0.67	14.64	24.97	5.00	75	0	2
53	T1300-3	9.10	4.90	0.54	16.94	16.70	4.00	70	1	2
54	T1300-4	7.72	5.56	0.72	14.87	24.17	8.00	75	0	2
55	T1300-5	7.43	4.15	0.56	14.88	20.50	6.00	75	2	2
56	T1300-6	10.07	5.55	0.55	14.95	22.23	5.00	75	1	2
57	T1300-7	9.10	5.04	0.55	11.81	24.57	5.00	75	1	2
58	T1300-8	9.22	5.11	0.56	18.89	22.63	6.00	75	0	2
59	T1300-9	8.22	5.09	0.62	16.74	21.20	4.00	75	1	2
60	T1300-10	9.03	5.73	0.64	12.35	19.80	5.00	75	2	2
61	T1210-1	8.33	4.93	0.59	14.84	21.57	23.00	75	1	2
62	T1210-2	13.04	8.16	0.62	17.38	23.73	55.00	75	0	2
63	T1210-3	7.30	4.02	0.55	11.91	20.53	20.00	65	0	2
64	T1210-4	8.61	5.52	0.64	17.41	22.17	18.00	75	1	2
65	T1210-5	8.69	5.28	0.61	14.73	18.77	30.00	75	1	2
66	T1210-6	9.57	5.98	0.63	19.08	21.23	60.00	75	0	2
67	T1210-7	9.97	4.86	0.49	20.23	22.70	15.00	75	0	2
68	T1210-8	9.63	6.38	0.67	14.30	23.30	20.00	75	0	2
69	T1210-9	9.52	5.53	0.58	13.45	24.33	11.00	60	0	2
70	T1210-10	10.31	5.93	0.58	15.47	23.13	35.00	65	0	2
71	T1120-1	22.05	11.17	0.51	28.98	28.83	200.00	50	3	2
72	T1120-2	12.16	7.49	0.62	26.62	25.53	150.00	75	0	2
73	T1120-3	11.61	6.91	0.60	20.97	23.10	100.00	75	0	2
74	T1120-4	10.69	6.50	0.61	24.31	20.87	170.00	75	0	2
75	T1120-5	9.11	5.22	0.57	23.95	20.40	95.00	75	0	2
76	T1120-6	13.08	7.34	0.57	26.53	23.27	95.00	75	1	2
77	T1120-7	17.54	6.76	0.39	32.24	28.50	105.00	60	0	2
78	T1120-8	13.36	6.75	0.51	24.98	25.73	105.00	75	0	2
79	T1120-9	15.61	7.51	0.48	26.73	22.67	150.00	75	0	3
80	T1120-10	14.94	7.64	0.51	26.32	22.90	95.00	75	0	2

つづく

つづき

81	T1030-1	23.48	10.56	0.45	44.00	31.53	195.00	50	1	1
82	T1030-2	23.05	11.45	0.50	48.07	24.47	215.00	70	1	2
83	T1030-3	24.16	12.29	0.51	35.99	29.27	240.00	65	3	1
84	T1030-4	14.92	7.42	0.50	25.64	23.67	150.00	70	2	2
85	T1030-5	22.04	10.80	0.49	28.44	28.17	205.00	50	2	1
86	T1030-6	19.67	9.64	0.49	39.02	22.93	175.00	70	1	2
87	T1030-7	12.16	6.09	0.50	21.74	19.30	140.00	75	2	1
88	T1030-8	13.75	8.51	0.62	35.61	27.83	135.00	75	2	2
89	T1030-9	12.05	5.59	0.46	28.92	24.10	150.00	75	2	1
90	T1030-10	19.17	9.34	0.49	31.45	28.70	195.00	75	1	2
91	S940-1	18.48	10.03	0.55	33.91	31.57	190.00	65	3	2
92	S940-2	25.81	11.93	0.46	43.44	25.63	180.00	45	2	2
93	S940-3	21.96	12.29	0.56	42.77	29.90	185.00	55	1	2
94	S940-4	22.02	10.57	0.48	61.31	33.93	220.00	45	3	1
95	S940-5	24.14	11.62	0.48	20.89	32.80	270.00	60	3	1
96	S940-6	21.49	10.03	0.47	36.10	22.80	230.00	65	2	2
97	S940-7	24.77	11.49	0.46	35.28	29.33	195.00	50	3	2
98	S940-8	22.09	11.37	0.51	48.70	28.87	210.00	50	3	2
99	S940-9	27.64	14.30	0.52	35.04	25.73	210.00	70	2	1
100	S940-10	18.63	9.41	0.50	27.70	22.60	250.00	70	0	2
101	T820-1	17.95	9.36	0.52	23.36	28.53	250.00	60	2	1
102	T820-3	18.49	10.28	0.55	31.68	27.33	210.00	70	2	2
103	T820-4	20.83	12.46	0.60	30.63	34.53	195.00	45	3	1
104	T820-5	18.76	8.21	0.44	23.56	30.53	170.00	75	2	2
105	T820-6	21.28	10.32	0.48	31.53	33.73	240.00	55	3	1
106	T820-7	22.53	12.26	0.54	34.79	26.50	240.00	70	0	2
107	T820-8	26.56	12.71	0.48	39.36	33.80	205.00	70	3	2
108	T820-9	22.61	13.43	0.59	28.71	26.10	260.00	60	3	2
109	T820-10	20.28	11.09	0.55	31.06	36.20	280.00	70	1	2
110	T800-1	25.90	14.80	0.58	63.40	31.20	185.00	55	1	2
111	T800-2	18.07	9.83	0.55	13.27	32.17	130.00	70	3	2
112	T800-3	19.00	9.87	0.52	13.30	26.37	135.00	75	3	1
113	T800-4	19.03	10.67	0.56	23.17	28.27	138.00	65	2	1
114	T800-5	18.57	10.20	0.55	30.10	26.10	100.00	70	2	2
115	T800-6	18.84	10.01	0.54	22.87	29.53	105.00	45	3	1
116	T800-7	17.27	9.25	0.54	27.64	34.40	175.00	55	2	1
117	T800-8	22.77	13.32	0.59	39.63	31.67	115.00	75	3	2
118	T800-9	14.67	7.92	0.54	20.71	26.53	130.00	75	1	2
119	T800-10	20.44	10.08	0.49	21.72	39.07	175.00	45	3	1
120	T800-11	19.26	10.28	0.54	35.24	29.10	140.00	55	1	1
121	T800-12	15.73	8.40	0.53	19.61	29.33	135.00	70	1	2
122	T800-13	26.69	12.06	0.45	28.65	30.13	190.00	50	2	1
123	T800-14	14.46	7.39	0.51	16.61	28.13	170.00	60	0	1
124	T800-15	16.58	7.99	0.49	37.41	40.60	135.00	45	2	1
125	T800-16	17.90	10.30	0.64	23.22	30.27	125.00	70	2	1
126	T800-17	18.88	10.65	0.56	21.28	31.13	50.00	40	2	1
127	T800-18	16.47	8.75	0.54	30.28	31.03	125.00	75	2	1
128	T800-19	23.63	9.28	0.40	31.65	31.27	175.00	70	2	1
129	T800-20	19.47	9.53	0.49	26.76	26.73	125.00	75	2	2
130	T800-21	21.83	11.20	0.52	33.47	28.40	110.00	63		1
131	T790-1	20.50	10.57	0.52	69.92	39.53	180.00	45	3	1
132	T790-2	24.08	12.11	0.50	58.40	28.67	165.00	50	2	1
133	T790-3	26.31	10.61	0.40	55.15	42.50	210.00	45	2	1
134	T790-4	24.22	10.39	0.43	30.79	40.27	260.00	55	3	1
135	T790-5	20.65	11.67	0.57	23.61	27.93	165.00	70	2	1
136	T790-6	28.78	14.79	0.52	42.65	41.03	250.00	45	2	1
137	T790-7	17.72	9.20	0.52	52.57	26.90	250.00	70	0	1
138	T790-8	19.83	10.55	0.53	34.52	36.83	250.00	60	0	1
139	T790-9	22.36	11.22	0.50	52.29	42.43	280.00	40	2	1
140	T790-10	19.12	13.97	0.48	34.04	36.93	350.00	60	2	1
141	T600-1	22.40	10.33	0.46	51.02	35.93	295.00	45	3	1
142	T600-2	21.66	10.53	0.48	42.79	30.53	340.00	45	2	1
143	T600-3	26.13	11.53	0.44	39.03	34.13	245.00	45	2	1
144	T600-4	24.58	10.80	0.43	45.00	46.50	335.00	45	2	1
145	T600-5	24.88	11.62	0.47	40.84	34.43	240.00	45	2	1
146	T600-6	28.76	12.68	0.44	37.24	43.93	320.00	45	0	1
147	T600-7	33.00	12.91	0.39	45.25	36.13	430.00	45	3	1
148	T600-8	25.75	13.05	0.51	48.06	41.80	310.00	45	1	1
149	T600-9	21.06	9.39	0.45	30.05	35.77	430.00	45	3	1
150	T600-10	22.63	10.52	0.47	32.24	37.13	420.00	45	3	1
151	KI520-1	36.60	16.27	0.44	67.33	43.23	280.00	45	3	1
152	KI520-2	30.00	16.03	0.53	85.30	38.23	160.00	45	3	1
153	KI520-3	27.50	11.37	0.41	57.70	42.60	230.00	45	2	1
154	KI520-4	24.03	12.18	0.51	43.24	34.13	160.00	45	3	1
155	KI520-5	24.43	9.82	0.40	24.99	41.87	110.00	45	3	1
156	KI520-6	25.55	13.01	0.51	35.69	42.80	230.00	45	2	1
157	KI520-7	35.56	15.00	0.42	48.22	42.77	200.00	45	3	1
158	KI520-8	23.64	13.76	0.58	21.55	41.67	230.00	45	2	1
159	KI520-9	26.07	11.07	0.43	46.77	44.63	270.00	45	3	1
160	KI520-10	23.21	7.04	0.31	25.67	38.13	225.00	45	3	1
161	KI440-1	26.14	10.70	0.41	36.25	35.15	212.50	45	2	1
162	KI440-2	29.02	13.06	0.45	54.31	42.40	260.00	45	3	1
163	KI440-3	29.01	17.65	0.61	49.25	44.13	200.00	40	3	1
164	KI440-4	26.31	11.83	0.45	76.67	39.30	230.00	45	1	1
165	KI440-5	27.64	13.28	0.49	78.24	37.87	160.00	45	2	3

Z: 参照: 16S r DNA領域をHhaI処理した際のバンドパターン (1: ヤマトツジ型, 2: ミヤマキリシマ型, 3: 少数出現型)

ムを使用して行った。分析法としては群平均法を用い、個体間の非類似度はユークリッド平方距離で表した。

2. 主成分分析

主成分分析は、StatView-J 4.02 (Abacus concepts Inc.) のコンピュータプログラムを使用して行った。

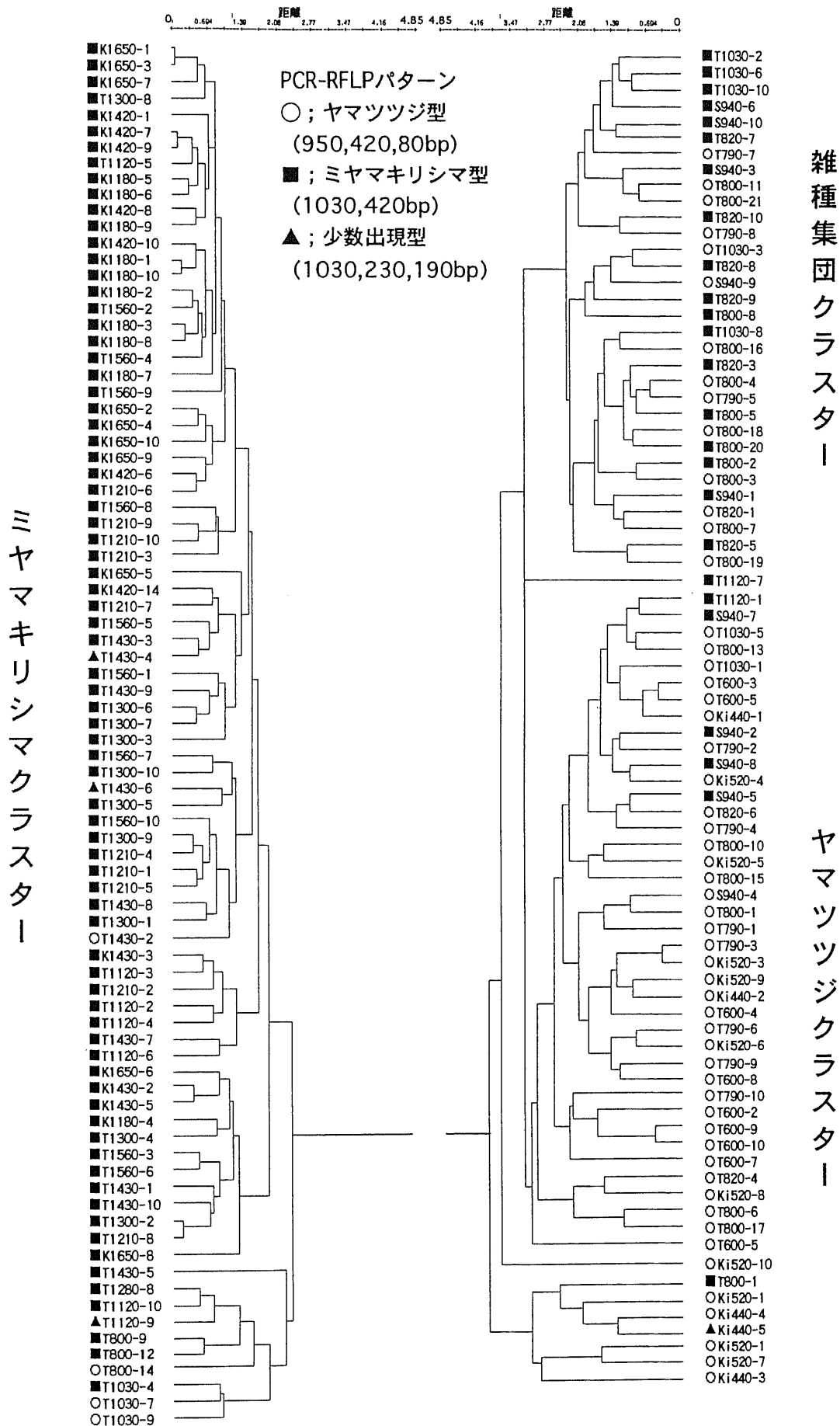
結果及び考察

1. クラスタ分析

クラスタ分析の結果より描かれる樹状図を第3-11図に示した。今回供試したツツジ集団は大きく3つのクラスタに分類されることがわかった。一つは高山域のミヤマキリシマを中心としたクラスタ、一つはヤマツツジを中心としたクラスタ、そして、もう一つは中間帯の自然雑種集団を中心としたクラスタを形成した。これらのことから霧島山系の野生ツツジ集団はミヤマキリシマ集団、ヤマツツジ集団そして両種の自然雑種からなる3集団に大別できることがわかった。

各個体番号に付加した記号は前節で得られたPCR-RFLPパターンを示したものである。これをみるとミヤマキリシマとヤマツツジのクラスタはそれぞれ両種のパターンで占められており、自然雑種のクラスタは両種のパターンが混在していることが確認できる(第3-11図)。

また、ミヤマキリシマを中心にして形成されているクラスタには、T1430-2, T1030-7,9およびT800-14のようにヤマツツジ型のパターンを持つ個体が混入している。これらの個体は、形態データのクラスタ分析からはミヤマキリシマ集団に分類されるが、ヤマツツジの葉緑体DNAを持っていることを意味しており、かつてヤマツツジとの交雑によって浸透交雑が起こっていることを示唆している



第3-11図. 霧島山系野生ツツジの形態形質について
クラスター分析を行った際に得られた樹形図
記号によって葉緑体DNAのPCR-RFLPパターンを付加した

ものと思われる。

2. 主成分分析

各調査項目間の相関行列を第3-5表に、得られた各主成分の固有値、寄与率、固有ベクトルを第3-6表に示した。

まず、調査項目間の相関を見ると、すべての項目間に0.48以上で、1%水準で有意な、正または負の高い相関があることがわかった。

各主成分の固有値の採用基準として1未満は打ち切りにすると、固有値5.904の第1主成分のみが採用されることになった。この第1主成分の寄与率は0.738で、一つの主成分のみで全データの分散の約74%を説明していた。

第1主成分における各調査項目の固有ベクトルをみると、正の方向には葉長、葉幅、前年枝長、花冠径、樹高、ブロッチの程度がそれぞれ0.3~0.4の値を示し、また、負の方向には葉形比、花色が-0.3前後を示しており、各調査項目が全体に高い値のベクトルを持っていた。

これらのことから、この第1主成分は霧島山系における野生ツツジ集団の形態的特性を表す値であると考えられる。ミヤマキリシマにおいて葉、花、樹高等が小さいとこの第1主成分の値は小さく、逆に全体に大きいヤマツツジではこの値が大きくなり、また、花色やブロッチの程度もこの値に連動して変化していることを示す値であるといえよう。

この第1主成分から描かれる主成分得点散布図を第3-12図に示した。横軸の正の方向に向かって、標高が高い調査地点から低い地点の個体を配置したところ、高山域のミヤマキリシマから中間帯の自然雑種集団、そしてヤマツツジにかけて、全体に正の相関をもって各集団が配置されることが明らかとなった。

また、ミヤマキリシマの集団ではこの第1主成分の値が比較的収束しているのに対し、雑種からヤマツツジの集団においては分散している傾向がみられた。形

第3-5表. 霧島山系の野生ツツジにおける各形態形質の相関行列^Z

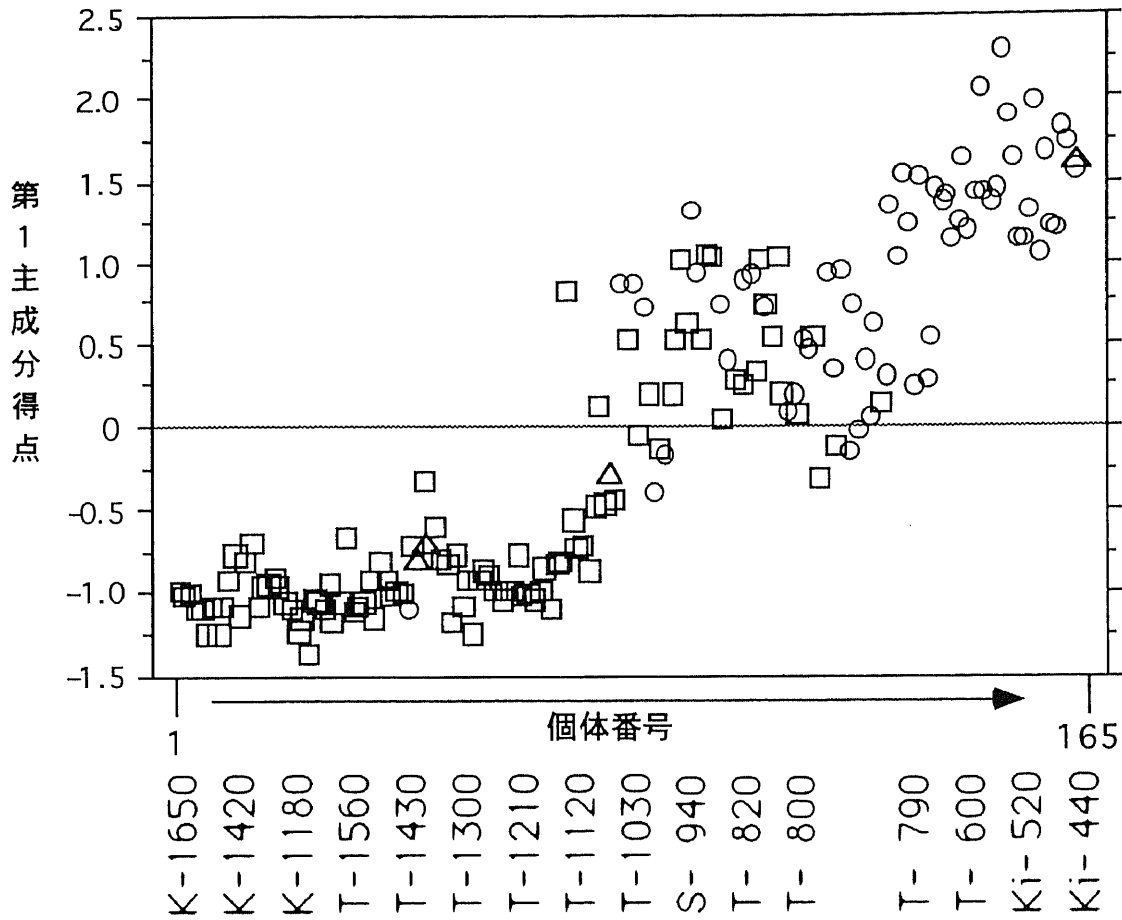
	葉長	葉幅	葉長/葉幅	前年枝長	花冠径	樹高	花色	ブロッチの程度
葉長	1.000							
葉幅	0.953	1.000						
葉長/葉幅	-0.695	-0.478	1.000					
前年枝長	0.770	0.753	-0.488	1.000				
花冠径	0.856	0.801	-0.620	0.680	1.000			
樹高	0.828	0.770	-0.638	0.627	0.755	1.000		
花色	-0.801	-0.742	0.593	-0.680	-0.843	-0.695	1.000	
ブロッチの程度	0.725	0.697	-0.516	0.502	0.679	0.604	-0.655	1.000

Z; すべての相関係数は1%水準で有意である

第3-6表. 霧島山系野生ツツジの形態形質について主成分分析を行った際の
第3主成分までの固有値と寄与率, 形態形質の固有ベクトル

	第1主成分	第2主成分	第3主成分
固有値	5.904	0.604	0.494
寄与率	0.738	0.075	0.062
累積寄与率	0.738	0.813	0.875

	固有ベクトル1	固有ベクトル2	固有ベクトル3
葉長	0.399	-0.052	-0.042
葉幅	0.375	-0.375	0.050
葉幅/葉長	-0.297	-0.832	0.239
前年枝長	0.331	-0.384	-0.523
花冠径	0.376	-0.015	0.044
樹高	0.356	0.124	-0.118
花色	-0.362	0.027	-0.025
プロッチの程度	0.322	0.038	0.805



PCR-RFLPパターン

- ; ヤマツツジ型 (950, 420, 80bp)
- ; ミヤマキリシマ型 (1030, 420bp)
- △ ; 少数出現型 (1030, 230, 190bp)

第3-12図. 霧島山系野生ツツジの形態形質について主成分分析を行った際の主成分得点の散布図

記号によって葉緑体DNAのPCR-RFLPパターンを付加した

態変異が少ない純系のミヤマキリシマ集団に対し、雑種集団やヤマツツジ集団では形態変異がみられるという各集団の形態形質からみた性状が推察される。

さらにPCR-RFLPパターンを示す記号の散布状況を見ると、第1主成分の0以下にはミヤマキリシマ型が、1.5以上にはヤマツツジ型が集中し、それらの間の領域には両型が混在していた。このことから、形態形質の総合的特性を表す第1主成分により、葉緑体DNAの変異が説明出来ることが示唆された。

以上のクラスター分析と、主成分分析によって、第1節で得られた形態調査の結果を客観的に評価することができ、また、第2節で得られたDNA分析の結果を併せてみることによって、霧島山系の野生ツツジ集団間の関係をより明らかにすることができた。

第3章の要約

常緑性ツツジの園芸品種「江戸キリシマ」や「クルメツツジ」の起源地として重要な九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団の形態学的分析，DNA分析を行い，集団間の形態形質やDNAパターンの差異から集団間の関係を明らかにした。

1. 形態調査の結果，山頂域のミヤマキリシマは小型で楕円形の葉と小型でブロッチ出現率の低い赤紫色の花冠を有するのに対し，山麓域のヤマツツジは大型で長楕円形の葉と大型で明瞭なブロッチのある朱赤色の花冠を有していた。これらの中間帯では花色の変異に富むとともに各形態は中間的な数値を示し，山全体でみると標高に沿ったクラインがあることがわかった。
2. DNA分析では，ミトコンドリアDNAについては両種を識別するRFLPマーカーが得られなかったが，葉緑体DNAのrDNA16S領域を*Hha*I処理した際に，ミヤマキリシマ型（1030，420bp）およびヤマツツジ型（950，420，80bp）のPCR-RFLPパターンの変異がみられ，これをDNAマーカーとして用いることができた。その結果，ミヤマキリシマ集団ではほとんどがミヤマキリシマ型のパターンを示すのに対し，ヤマツツジ集団ではほとんどがヤマツツジ型のパターンを示した。また，中間帯の集団には両種いずれかのパターンを有する個体が混在していた。このことから，山頂域のミヤマキリシマと，山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり，それらの中間帯に分布する花色や形態の変異に富む集団は両種のいずれかを母親とする自然雑種集団であるという形態学的分析とDNA分析の結果からの裏付けを得ることができた。また，標高に沿って，各集団間に認められたクラインはミヤマキリシマとヤマツツジ間の浸透交雑の影響によるものと考えられた。
3. さらに上記の1，2の結果はクラスター分析や主成分分析を用いた多変量解析によって総合的に評価した結果からも裏付けられるものであった。

第4章 常緑性ツツジの葉緑体DNA解析

本章では常緑性の野生ツツジ集団と園芸品種について葉緑体DNA分析を行った。前章の霧島山系の集団の解析で得られたDNAマーカーを用いて、園芸品種の母胎となった九州各地のミヤマキリシマやヤマツツジ等の常緑性野生ツツジについてDNA分析を行い、種間の関連と種分化について考察を加えた。また、「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」の園芸品種について、同様のDNAマーカーを用いて分析し、各園芸品種の起源について考察した。

第1節 九州各地における野生種の葉緑体DNA解析

九州には常緑性ツツジの野生種が数多く分布している。九州全域に分布するヤマツツジのほか、火山性の高山には九州固有種のミヤマキリシマ、大隅半島を中心に錦江湾を取り巻く一帯にはサタツツジ、大分県、宮崎県周辺の太平洋岸にはフジツツジ、屋久島、トカラ列島にはマルバサツキの分布があり、これらの野生種は常緑性ツツジの園芸品種の成立に大きく関与している（国重，1983；宮島，1987，1988；Sakata et al.，1991）。このうち、特にミヤマキリシマは「江戸キリシマ」や「クルメツツジ」の成立に深い関与が指摘されていると同時に、雲仙山系等においては霧島山系のようにヤマツツジとの雑種を形成していることが報告されている（油屋ら，1979；宮島，1987，1988；宮島ら，1995）。

そこで本節では常緑性ツツジの園芸品種の母種となったミヤマキリシマを中心とする野生種について、第3章で得られた九州霧島山系のミヤマキリシマ、ヤマツツジ間で差異を示す葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーが適用できるか

否かを確認し、その分析結果から各種間の類縁関係や個々の種の分化について考察した（小林ら，1996b）。

材料及び方法

分析に用いた合計838個体の野生種の新葉は九州各地の自生地，九州大学農学部，野菜茶試久留米支場，赤城自然園等において採取した（第4-1表），（第4-1図）。全DNAの抽出は，第2章第1節で示した改変CTAB法（第2-1図）によって行った。

PCR-RFLP分析は，第2章第3節と同様の操作により葉緑体DNAのrRNA遺伝子の16S領域（1450bp）をPCR増幅し，制限酵素*Hha*Iで処理後，多型を検出した。

結果

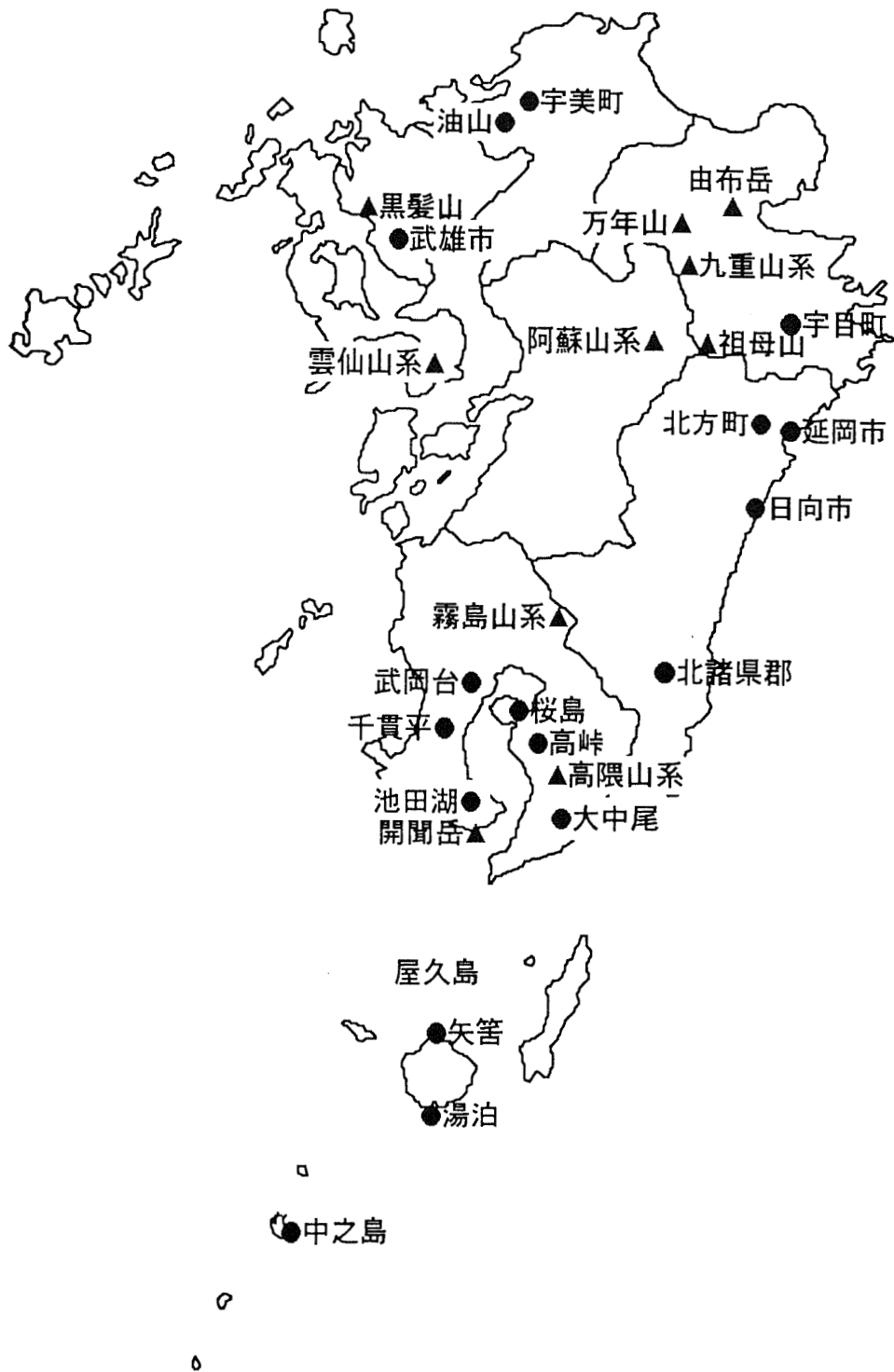
前章の霧島山系のサンプルも含めた全838個体の野生種についての分析結果を第4-2表に示した。

霧島山系では，前述のようにほぼ全てのミヤマキリシマおよびヤマツツジはそれぞれ1030,420bp（ミヤマキリシマ型）および950,420,80bp（ヤマツツジ型）のPCR-RFLPパターンを示し，中間帯の自然雑種集団には両型が混在していたが，同様の傾向が雲仙山系においてもみられた。すなわち，普賢岳，妙見岳のミヤマキリシマ集団ではミヤマキリシマ型のパターンを示す個体の頻度が高いのに対し，形態や花色から自然雑種とされるゴルフ場，仁田峠，眉山の集団においては両パターンが混在し，雑種性が示唆された。また，比較的低位ながら温泉噴出の見られる地獄地帯のミヤマキリシマは2個体ともミヤマキリシマ型のパターンを示した。

また，霧島山系に近接する高隈山系においては大籠柄岳山頂の限られた岩場に

第4-1表. DNA分析に用いた九州各地の野生ツツジ集団の原産地と採取地

	原産地	採取地	種名	個体数
雲仙山系	普賢岳	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	20
	妙見岳	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	11
	仁田峠	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	自然雑種	21
	ゴルフ場	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	自然雑種	22
	地獄	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	2
	眉山	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	自然雑種	22
	九重山系	大船山	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ
由布岳		農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	18
万年山		農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	9
阿蘇山系	根子岳	農林水産省野菜茶業試験場久留米支場	ミヤマキリシマ	6
	烏帽子岳	自生地にて採取	ミヤマキリシマ	15
	仙酔峡	九州大学農学部園芸学教室	ミヤマキリシマ	15
	祖母山	西武赤城自然園	ミヤマキリシマ	3
霧島山系	韓国岳・えびの高原	自生地にて採取	ミヤマキリシマ	63
	高千穂峰	自生地にて採取	ミヤマキリシマ	76
	高千穂河原・中間帯	自生地にて採取	自然雑種	96
	新湯	自生地にて採取	自然雑種	22
	霧島神宮・霧島町	自生地にて採取	ヤマツツジ	70
高隈山系	大篋柄岳	九州大学農学部園芸学教室	ミヤマキリシマ	45
	大篋柄岳	九州大学農学部園芸学教室	ヤマツツジ	26
	大篋柄岳	九州大学農学部園芸学教室	ウンゼンツツジ	10
福岡県	福岡市油山	九州大学農学部園芸学教室	ヤマツツジ	10
	糟屋郡宇美町	自生地にて採取	ヤマツツジ	18
佐賀県	武雄市	九州大学農学部園芸学教室	ヤマツツジ	9
	黒髪山	九州大学農学部園芸学教室	ヤマツツジ	10
大分県	南海部郡宇目町	九州大学農学部園芸学教室	ヤマツツジ	10
宮崎県	延岡市	九州大学農学部園芸学教室	フジツツジ	5
	日向市	九州大学農学部園芸学教室	フジツツジ	5
	東臼杵郡北方町	九州大学農学部園芸学教室	フジツツジ	5
	北諸県郡	自生地にて採取	フジツツジ	30
鹿児島県	鹿児島市武岡台	自生地にて採取	ヤマツツジ	13
	千貫平	自生地にて採取	ヤマツツジ	7
	池田湖畔	自生地にて採取	サタツツジ	6
	(桜島)	鹿児島郡桜島町	自生地にて採取	サタツツジ
(屋久島)	垂水市高峠	自生地にて採取	サタツツジ	25
	肝属郡佐多町大中尾	自生地にて採取	サタツツジ	13
	開聞岳	西武赤城自然園	マルバサツキ	2
	熊毛郡上屋久町矢筈	九州大学農学部園芸学教室	マルバサツキ	10
(屋久島)	熊毛郡屋久町湯泊	九州大学農学部園芸学教室	マルバサツキ	10
(中之島)	鹿児島郡十島村	九州大学農学部園芸学教室	マルバサツキ	10
東京都	大島町 (伊豆大島)	九州大学農学部園芸学教室	オオシマツツジ	10
茨城県	つくば市	自生地にて採取	ヤマツツジ	42
合計				838



第4-1図. 九州各地における野生ツツジの採取地

第4-2表. 九州各地の野生ツツジ集団の PCR-RFLP 分析結果

採取地点	種名	個体数	PCR-RFLPパターン (bp)			
			1030/420	950/420/80	1030/230/190	
雲仙山系	普賢岳	ミヤマキリシマ	20	18	2	0
	妙見岳	ミヤマキリシマ	11	9	2	0
	仁田峠	自然雑種	21	13	8	0
	ゴルフ場	自然雑種	22	12	9	1
	地獄	ミヤマキリシマ	2	2	0	0
	眉山	自然雑種	22	10	12	0
九重山系	大船山	ミヤマキリシマ	3	0	3	0
	由布岳	ミヤマキリシマ	18	3	15	0
	万年山	ミヤマキリシマ	9	0	9	0
阿蘇山系	根子岳	ミヤマキリシマ	6	1	5	0
	烏帽子岳	ミヤマキリシマ	15	0	15	0
	仙酔峡	ミヤマキリシマ	15	0	15	0
	祖母山	ミヤマキリシマ	3	0	3	0
霧島山系	韓国岳・えびの高原	ミヤマキリシマ	63	63	0	0
	高千穂峰	ミヤマキリシマ	76	72	1	3
	高千穂河原・中間帯	自然雑種	96	57	36	3
	新湯	自然雑種	22	9	11	2
	霧島神宮・霧島町	ヤマツツジ	70	0	66	4
高隈山系	大篋柄岳	ミヤマキリシマ	45	45	0	0
	大篋柄岳	ヤマツツジ	26	0	26	0
	大篋柄岳	ウンゼンツツジ	10	0	10	0
福岡県	福岡市油山	ヤマツツジ	10	0	10	0
	糟屋郡宇美町	ヤマツツジ	18	0	18	0
佐賀県	武雄市	ヤマツツジ	9	0	9	0
	黒髪山	ヤマツツジ	10	0	10	0
大分県	南海部郡宇目町	ヤマツツジ	10	0	10	0
宮崎県	延岡市	フジツツジ	5	0	5	0
	日向市	フジツツジ	5	0	5	0
	東臼杵郡北方町	フジツツジ	5	0	5	0
	北諸県郡	フジツツジ	30	0	30	0
鹿児島県	鹿児島市武岡台	ヤマツツジ	13	0	13	0
	千貫平	ヤマツツジ	7	0	7	0
	池田湖畔	サタツツジ	6	0	6	0
(桜島)	鹿児島郡桜島町	サタツツジ	13	0	13	0
	垂水市高峠	サタツツジ	25	0	25	0
	肝属郡佐多町大中尾	サタツツジ	13	0	13	0
	開聞岳	マルバサツキ	2	0	2	0
(屋久島)	熊毛郡上屋久町矢筈	マルバサツキ	10	0	10	0
(屋久島)	熊毛郡屋久町湯泊	マルバサツキ	10	0	10	0
(中之島)	鹿児島郡十島村	マルバサツキ	10	10	0	0
東京都	大島町 (伊豆大島)	オオシマツツジ	10	0	10	0
茨城県	つくば市	ヤマツツジ	42	0	42	0

のみ生育するミヤマキリシマ集団と山腹のヤマツツジ集団のすべてがそれぞれの型を示した。

一方、九州中北部の九重山系の大船山や、近接する万年山、由布岳、また、阿蘇山系の根子岳、烏帽子岳、仙酔峡と阿蘇山系に近接する祖母山のミヤマキリシマ集団ではほとんどがヤマツツジ型を示し、ミヤマキリシマ型を示したサンプルは由布岳の18個体中の3個体と根子岳の6個体中の1個体のみであった。

九州各地のヤマツツジ集団、鹿児島県下のサタツツジ集団、宮崎県下のフジツツジ集団、大籠柄岳のウンゼンツツジ集団のほか、オオシマツツジ (*R. obutusum* var. *macrogemma*) 集団や、筑波大学構内のヤマツツジ集団では全個体がヤマツツジ型を示した。

マルバサツキについては開聞岳と屋久島の集団はすべてヤマツツジ型を示したが、興味深いことにトカラ列島中之島の集団10個体はすべてミヤマキリシマ型を示した。

なお、霧島山系の集団の数個体で見られた1030,230,180bpのPCR-RFLPパターンは九州の他の地域の集団では、雲仙のゴルフ場の1個体で見られるのみであった。

考察

霧島山系のミヤマキリシマとヤマツツジで多型が得られたPCR-RFLPマーカーを用いて九州各地の野生ツツジを分析したところ、自生地により霧島山系同様にミヤマキリシマとヤマツツジの間で多型が得られた地点と得られない地点があった。そこで、ここでは各山系の集団あるいは集団間の関係や種分化の方向性について考察を試みる。

雲仙山系について

雲仙山系の野生ツツジ集団については、油屋（1979）が花および葉の詳細な形態調査を行った結果から、山腹部に見られる多彩な花色変異をもつ野生ツツジ集団は、山頂部のミヤマキリシマと山麓部のヤマツツジの自然雑種であると推定している。また、宮島（1987, 1988）や宮島ら（1995）は花器の形質と花弁内フラボノール構成からこれらの結果を支持している。

本研究の結果からも、純粋なミヤマキリシマが多いとされる普賢岳、妙見岳の集団ではミヤマキリシマ型のパターンを示す個体の頻度が非常に高いのに対し、形態や花色から油屋、宮島らが自然雑種と推定する仁田峠、ゴルフ場の集団および雲仙に隣接した、これらの集団と同様の形態と花色の眉山の集団においてはミヤマキリシマ型とヤマツツジ型の両パターンがほぼ同頻度で混在し、これらの集団はミヤマキリシマあるいはヤマツツジを母本とした雑種に由来することが示唆された。したがって、これまでの油屋、宮島らの報告とあわせ、形態、花色、そして葉緑体DNAの分析結果から、雲仙山系の山頂部にはミヤマキリシマ集団が、山麓部にはヤマツツジ集団が分布し、その中間帯に分布する花色や形態の変異に富む野生ツツジ集団は霧島山系と同様に両種の自然雑種であることが確定した。

なお、地獄地帯のミヤマキリシマ集団は、形態や花色調査の結果からも純系のミヤマキリシマ集団であるとされている（油屋, 1979; 宮島, 1988; 宮島ら, 1995）が、本研究で扱った2個体ともミヤマキリシマ型のパターンを示し、サンプルが少ないながらもこれらの結果を裏付けている。地獄地帯は自然雑種が形成されている仁田峠やゴルフ場よりも標高が低いが、火山性山岳の植生遷移の中で純系のミヤマキリシマ集団が維持されており、ミヤマキリシマで指摘される火山性ガス耐性や陽性植物であるという性質は生育環境との関連で興味深い。

九重山系について

九重山系の大船山のミヤマキリシマは3個体ともヤマツツジ型のパターンを示

したが、第5章で扱う大船山の野生個体からの選抜品種である‘霧の宵’はミヤマキリシマ型のパターンを示していた。また、近接する由布岳でもヤマツツジ型が多いが、ミヤマキリシマ型の個体もみられた。宮島（1987, 1988）は花色、花器の形態から九重山系、由布岳には純系のミヤマキリシマが分布するとしているが、これらの結果は、古い時代にヤマツツジが関与したことを示唆している。一方、万年山の集団は諸形質の変異の多様性からミヤマキリシマとヤマツツジの自然雑種集団であると指摘されているが、今回はヤマツツジ型のパターンしか検出されなかったことから、過去におけるヤマツツジの関与が大きいことを窺わせる。この点に関して、今回用いた九重山系の個体群は、野菜茶試久留米支場において本来育種素材として収集したと思われる個体を用いているため、収集時において人による選抜が加わっている可能性が考えられる。いずれにしろ、今後さらにサンプル数を増やし、本研究と同様の方法によって組織立った調査を行えば、その構成を明らかにすることが可能であると思われる。

阿蘇山系について

阿蘇山は外輪山と中央火口丘からなり、中央火口丘の各山に分布するミヤマキリシマ集団は花色、花器の形態の変異が乏しい純系の集団である。この理由として、外輪山に分布するヤマツツジは中央火口丘と外輪山の両地域が平野部で分断されているために、ミヤマキリシマへの浸透が出来ないことがあげられている（宮島, 1987, 1988）。

ところが今回の分析結果では、阿蘇山系に近接する祖母山も含めて、ミヤマキリシマ型のパターンを示したサンプルは、根子岳の1個体だけで他の38個体はヤマツツジ型のパターンを示した。最も標高が高く、切り立った岩場が多い根子岳では個体数を増やして分析を行うことにより、ミヤマキリシマ型のパターンが増える可能性が考えられるが、阿蘇山系のミヤマキリシマ集団はその大半がヤマツ

ツジ型の葉緑体DNAを持っていることが推測された。

この説明として以下の2つの仮説が考えられる。まず、一つはミヤマキリシマにおける種内分化である。今回用いたマーカーに関して、ヤマツツジとその近縁の野生種は、すべていわゆるヤマツツジ型(950,420,80bp)のパターンを示すことが分かっており、おもに霧島山系や雲仙山系のミヤマキリシマ集団のみが制限サイトの欠失によるミヤマキリシマ型(1030,420bp)のパターンを示した。これに対し、阿蘇山系に分布するミヤマキリシマ集団の多くはこの制限サイトの欠失がない系統、すなわちヤマツツジ型のパターンを示す祖先型のミヤマキリシマが残存しているという仮説が考えられる。地史的にも古く、大規模な火山である阿蘇山系(宮脇, 1981)においてミヤマキリシマが成立し、その一部は阿蘇山系の根子岳の一個体で見られたようなミヤマキリシマ型の葉緑体DNAパターンを持つ系統として分化した。その後、周囲の霧島、雲仙、九重山系等において、このミヤマキリシマ型のパターンを持つ系統が分布域を広げながら発達したとは考えられないだろうか。この説を支持するためには、さらに多くの地点のサンプルについて、多種のDNAマーカーを用いて分析する必要がある。

もう一つの仮説はヤマツツジからの浸透交雑である。現在の阿蘇山の地形ではミヤマキリシマとヤマツツジの交雑の機会が得られにくくなっているが、火山活動によりこの形状の地形が形成される以前には他の山系のようにミヤマキリシマとヤマツツジの交雑が起こっていたことは当然考えられる。その後、地形変動によりヤマツツジの分布域とは分断されても、細胞質遺伝の機構上、一度ヤマツツジの細胞質を取り込んだミヤマキリシマが継代されていくことは十分考えられるのではないだろうか。ただこの場合、当然ミヤマキリシマ型のパターンも混在してよいはずであるため、結論を下す前にさらに別の調査地点の集団についても分析を行うと同時に、核のDNAを分析する必要がある。

高隈山系について

地史的に古い高隈山系ではその山頂部まで森林植生が進出しているため、陽性植物であるミヤマキリシマが生育する余地はないが、大窠柄岳山頂の限られた岩場に限って、花色変異の多いミヤマキリシマの小群落が分布している。有隅ら（1986）はこのミヤマキリシマ集団について花色や色素構成から、ヤマツツジの血が入り込んだ可能性が高いとしている。しかし、本研究の結果では現地のほぼ全個体である45個体すべてがミヤマキリシマ型のPCR-RFLPパターンを示している。母性遺伝する頻度の高い今回のマーカーの結果のみからは、過去にヤマツツジとの交雑がなかったとは言えず、花粉親としてのヤマツツジからの浸透交雑が起こっている可能性もある。しかし、全個体がミヤマキリシマ型を示したことから、山頂部の岩場という特殊な環境において、ミヤマキリシマ型の細胞質をもった個体のみが淘汰されずに生存しているのではないかと推察される。

ヤマツツジと他の常緑性ツツジについて

九州各地におけるヤマツツジ集団については、九州南部の集団は花色、花器、色素分布に関して、九州中・北部の集団より変異が大きいこと（宮島，1987，1988；Sakata et al., 1991）や、冬季の落葉の程度が異なることが指摘されている（宮澤，1940；宮島，1988）が、今回用いたマーカーではそれらを区別できず、すべて同一のヤマツツジ型のパターンを示した。また、ウンゼンツツジ、フジツツジ、オオシヤマツツジおよび関東のヤマツツジの各集団についても同一のパターンしか得られなかった。今後、これらの関係を探るためには新たなDNAマーカーの検索が必要である。

高隈山系を含む大隅半島を中心に分布するサタツツジは、多彩な花色変異や形態的、生態的特性から、「クルメツツジ」の成立に深く関与したとされる。本種はその多様な花色や形態の変異から雑種起源と考えられるが、その成因について

は不明である。

有隅ら（1986）や宮島（1987, 1988）は、霧島山系における例と同様に、サタツツジはヤマツツジにミヤマキリシマが関与して成立したものと推定して花色色素構成を調べたところ、霧島山系のミヤマキリシマや自然雑種が持つ5-メチルフラボノールはサタツツジには検出されないことを明らかにしている。一方、宮原ら（1993）はサタツツジと分布域が近い常緑性の野生種についてアイソザイム分析を行い、サタツツジは九州南部産ヤマツツジと極めて近縁であり、ミヤマキリシマとも比較的近縁であると報告している。また、宮島（1988）が関与の可能性を指摘したマルバサツキとは、遠縁であることも明らかにしている。本研究では鹿児島県内の4地点のサタツツジ集団を分析したが、いずれもヤマツツジ型のパターンしか得られなかった。この結果はサタツツジがヤマツツジと近縁であることを支持するが、サタツツジの成因を調べるには、さらに複数のマーカーが必要である。

マルバサツキは鹿児島県南部、屋久島およびトカラ列島の火山性の岩場や海岸沿いに分布し、紫色系「サツキ」品種の原種として重要である。今回、開聞岳と屋久島の個体はヤマツツジ型のパターンを示したが、中之島集団の10個体はすべてミヤマキリシマ型のパターンを示した。宮島（1988）は、中之島のマルバサツキ集団は花色や花器等の形質に全く変異がない純系であるのに対し、開聞岳の集団には変異が認められ、これはヤマツツジの影響を受けたためであると推定している。また、国重（1973）は屋久島においてマルバサツキとサツキの自然雑種集団の存在を報告している。サツキもヤマツツジと同様にヤマツツジ型のPCR-RFLPパターンを示したことから、今回の結果はこれらの報告を裏付ける可能性が高い。なお、純系とされる中之島のマルバサツキ集団がミヤマキリシマと同一のパターンを示したことは、ともに耐乾性や火山性ガス耐性を持ち、同じ様な環境適応性を備えている点での関連性からみると興味深い。

第2節 園芸品種の葉緑体DNA解析

九州各地に自生する常緑性ツツジをもとにして発達した園芸品種群には、「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ヒラドツツジ」、「リュウキュウツツジ」、「ミヤマキリシマ」等が挙げられるが、これらの成立起源には不明な点が多い。本節では前節までの研究に最も密接に関連している「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」の品種群を取り上げ、DNA分析による解析を行った。

前節に引き続き、同様の葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーを用いてこれらの各品種を分析し、その結果と前節の野生種のDNAパターンの比較から、野生種から各園芸品種群が成立する過程と園芸品種の起源種について推察した（小林ら，1996b）。

材料及び方法

分析に用いた園芸品種（第4-3表）の新葉は野菜茶試久留米支場，赤城自然園，館林市躑躅ヶ岡公園（島野，1992）等において採取した。全DNAの抽出は、第2章第1節で示した改変CTAB法（第2-1図）によって行った。

PCR-RFLP分析は、第2章第3節と同様の操作により葉緑体DNA中のrRNA遺伝子の16S領域（1450bp）をPCR増幅し、制限酵素*Hha*Iで処理後、多型を検出した。

結果

「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」の大半の品種がヤマツツジ型（950,420,80bp）のパターンを示したが、一部にミヤマキリシマ型（1030,420bp）のパターンを示す品種もみられた。また、自生地より選抜された「ミヤマキリシマ」の園

第4-3表. 各園芸品種のPCR-RFLP分析結果

PCR-RFLPパターン (bp)	
園芸品種群	1030/420
江戸キリシマ	950/420/80
紫叢	紅霧島 大盃 紫霧島 桔梗咲き霧島
本霧島	千重霧島 白霧島 瑞光
紅の司	八重霧島 日の出霧島 輝姫
東錦	紅霧島 田無げら
曙	紅霧島 田無げら
君ヶ代	紅霧島 田無げら
呉服	紅霧島 田無げら
白妙	紅霧島 田無げら
初音	紅霧島 田無げら
簾の内	紅霧島 田無げら
養老	紅霧島 田無げら
小蝶の舞	紅霧島 田無げら
小壺	紅霧島 田無げら
若楓	紅霧島 田無げら
筑紫紅	紅霧島 田無げら
クルメツツジ	安斎高巻絵 麒麟 式部桜 高巻絵 花筏 村雨 乱曲
一天	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
暮の雪	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
静の舞	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
稚児遊	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
東山	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
大和錦	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
黒龍	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
稲妻	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
古金欄	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
東雲	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
練絹	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
二重常夏	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
雪の駒	吾妻鏡 桐壺 早乙女 高砂 花遊 宮城野 万代
ミヤマキリシマ	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
(雲仙産) 雲仙白	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
松月	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
昔賢の月	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
(九重大船山産) 霧の宵	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
(霧島中岳産) 高千穂	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
舞扇	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
(万年山産) 綾の誉	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
小夜姫	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
羽根乙女	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧
天使	(九重大船山産) 久住白 九重 春の宵 深山式部 深山の霞 夕霧

芸品種では野生集団と同様の傾向がみられ、雲仙、霧島山系産の品種はミヤマキリシマ型のパターンを示し、九重山系や由布岳、万年山産の多くはヤマツツジ型のパターンを示した（第4-3表）。

考察

今回の「江戸キリシマ」品種群の分析の結果、ミヤマキリシマ型のパターンを示したサンプルは‘紫蓑’の1品種のみで、他のすべては、ヤマツツジ型のパターンを示した。この中で江戸時代からの本来の‘キリシマ’品種とされる‘本霧島’がヤマツツジ型のパターンを示し、この品種をもとに他の多くの品種が発達したとされる故事（大石，1916；宮澤，1940；塚本，1976）と重ねると、これらの結果は納得できる。

濃紫色の花色をもつを‘紫蓑’は明らかにミヤマキリシマが関与している証拠を示した。「江戸キリシマ」と「クルメツツジ」の品種群の区分には不明瞭な点があり、現在の「クルメツツジ」は、明治期に「クルメツツジ」の名称が付けられる以前には、「キリシマツツジ（江戸キリシマ）」に対して、「小霧島」と呼ばれていたこと（赤司，1919），また現在でも造園業界では「クルメツツジ」を「キリシマツツジ」と称する場合もあることから、この‘紫蓑’は、ミヤマキリシマ型のパターンを示す数品種を包含する「クルメツツジ」品種群の一つである可能性が高い。

本研究に際し、筆者自身、3年間にわたる霧島山系の野生ツツジ集団の現地踏査や、「江戸キリシマ」品種群の古木が維持されている群馬県館林市の躑躅ヶ岡公園（島野，1992）において‘本霧島’をはじめとする品種を度々観察してきた。加えて、霧島山系の野生種や「江戸キリシマ」の品種を筑波大学圃場にて栽培もしてきたが、これらの形態学的、生物季節学的観察の結果から、‘キリシマ’の起源として、宮澤（1918，1940）による霧島地方におけるヤマツツジの一変形で

あるとする説を支持する。また、本品種群は‘白霧島’のようにサタツツジが起源であると考えられる品種も包含することから、今回の分析結果ともあわせ、「江戸キリシマ」品種群は、サタツツジを含む、多様な形質変異を持つ南九州型のヤマツツジ集団が起源であるとするのが妥当であろう。

「クルメツツジ」は天保年間（1830～1844）に久留米藩士の坂本元蔵氏が「キリシマツツジ（江戸キリシマ）」系ツツジの実生により始めたものとされ、現在でも当時からの品種を含め約300品種が現存している。この品種群の成立に対しては、霧島山産をはじめとするミヤマキリシマが深く関与していると言われてきた（牧野，1917；上原，1972；宮澤，1940）が、近年では形態的、生態的特性からサタツツジがこの起源に最も大きく関与したと考えられている（田村ら，1974；阿部，1969；国重；1979，1983）。

その後、小林（1980）は花卉中のアントシアニンの分析結果から、サタツツジが「クルメツツジ」成立のもとになったと推定しているが、一方、有隅ら（1986）や宮島（1988）は、花色の色素構成から「クルメツツジ」の成立にはサタツツジよりもむしろ霧島山系の自然雑種集団が大きく影響していると報告している。

今回の分析結果をみるとその品種の大半はヤマツツジ型のパターンを示していることから、「クルメツツジ」品種群の成立には、ミヤマキリシマに比べて、サタツツジ、あるいは「キリシマツツジ（江戸キリシマ）」系の品種等が大きく関与した傾向が窺われる。

しかし、始祖の坂本時代からの古品種である‘小壺’や‘若楓’あるいは、形態的にミヤマキリシマに非常に近似した‘小蝶の舞’がミヤマキリシマ型のパターンを示していることから、「クルメツツジ」の成立にはミヤマキリシマが関与したことも明らかである。

なお、実生播種による選抜育種が行われた過程において、形態からの人為的な

淘汰，選抜が加わったことも忘れてはならない。

以上のような結果とこれまでの報告から，「クルマツツジ」品種群は，霧島山系をはじめとするミヤマキリシマとその雑種に加えて，サタツツジが大きく関与し，人為的な選抜が加わって成立したと言えるであろう。

成立起源を江戸時代にまで辿らなければならない「江戸キリシマ」や「クルマツツジ」に対し，主に昭和期に野生個体より選抜された「ミヤマキリシマ」の品種群（油屋ら，1979；国重，1979）は，第4章第1節で得られた九州各山系の自生地のDNA分析結果を反映し，産地に応じた分析結果が得られた。

すなわち，九重山系と由布岳，万年山産の品種については，1品種を除いて，すべてヤマツツジ型のパターンを示した。本品種群の選抜基準として，主に花色変異により選抜されているものが多いが，前章で，由布岳，万年山の集団についてはヤマツツジ集団からの浸透交雑を受けたものが多いと推察している。したがって，これらの品種はヤマツツジの関与に起因する花色変異から選抜された個体であると考えられる。また，これらの山系から多くの「ミヤマキリシマ」品種が選抜されていることは，これらの山系の野生集団内における形態変異の多様性を裏付けているものと考えられる。

また，ミヤマキリシマ野生集団の種内変異については，これまで霧島山系の踏査においても数個体の白花個体が確認できたほか，変異が少ないとされてきた阿蘇山系のミヤマキリシマ集団からも白花，采咲き花，絞り花等の形態変異個体が見いだされている。今回，ミヤマキリシマ型のパターンを示した雲仙，九重，霧島山系産の品種は，第3章，第4章第1節の結果とも併せて，ミヤマキリシマ集団の種内変異の中から選抜された品種である可能性が高い。

以上のようなことから，「ミヤマキリシマ」の園芸品種群は，ヤマツツジの浸透交雑の影響によって生じた花色変異個体が選抜されたのものによって，その大

半が構成されていると言えよう。

本研究のこれらの結果は1種類のDNAマーカーより得られたものであり、「江戸キリシマ」や「クルメツツジ」品種群の起源種を特定することは困難であったが、これらの品種群に対する純粋なミヤマキリシマの関与に関しては従来考えられていたよりは少ない可能性が指摘できた。一方、「ミヤマキリシマ」の品種群では前節で述べた自生地における自然集団の葉緑体DNAパターンを反映し、各品種の原産地に応じたものとなっていた。これらのことから、今後はさらに多種のDNAマーカーを用いることによって各品種群の起源がより明らかになることが期待される。

第4章の要約

前章の霧島山系の集団解析で得られた葉緑体DNAのPCR-RFLPマーカーを用いて、常緑性ツツジ園芸品種の母胎となった九州各地のミヤマキリシマやヤマツツジ、またサタツツジ等の常緑性の野生種についてDNA分析を行い、以下のことを明らかにした。さらに「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」品種群の各品種についても同様に分析し、野生種から各園芸品種群が成立する過程と、その起源種について推察した。

1. 形態や花色から自然雑種とされている雲仙山系の山腹の集団は、霧島山系と同様に両種のDNAパターンが混在する雑種集団であることがわかった。
2. 花色変異が多く、園芸品種を輩出している万年山や由布岳のミヤマキリシマにはヤマツツジ型のDNAパターンを持つものが多く、それらの変異はヤマツツジの影響によるものと考えられた。
3. 形態変異が小さく純系とされてきた阿蘇山系のミヤマキリシマでは、ほとんどがヤマツツジ型のパターンを示し、種内分化あるいはヤマツツジからの浸透交雑の可能性が示唆された。
4. 霧島山系に近接する高隈山系大篁柄岳のミヤマキリシマは花色変異を持ちながら、全個体がミヤマキリシマ型のパターンを示した。
5. トカラ列島中之島産のマルバサツキがミヤマキリシマ型のパターンを示したことを除き、九州各地のヤマツツジやサタツツジをはじめとする他の野生種はすべてがヤマツツジ型のパターンを示した。
6. 大半の「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」の品種がヤマツツジ型のパターンを示し、これらの品種群の成立における純粋なミヤマキリシマの関与に関しては、従来考えられていたよりは少ない可能性が指摘できた。一方、「クルメツツジ」の一部にミヤマキリシマ型のパターンを示す品種もみられ、「ク

ルメツツジ」の成立にミヤマキリシマが関与していることの確証も得られた。

7. 自生地より選抜された「ミヤマキリシマ」の園芸品種では野生集団の分析結果を反映し、雲仙、霧島山系産の品種はミヤマキリシマ型のパターンを示し、九重山系や由布岳、万年山産の多くはヤマツツジ型のパターンを示した。自生地における花色変異個体が選抜された本品種群は、ヤマツツジの影響による花色変異個体によってその大半が構成されていることが考察された。

第5章 総合考察

本研究は、常緑性野生ツツジの類縁関係と園芸品種成立の起源を解明することを目的として行われた。

常緑性の園芸ツツジ品種の母胎となった九州各地の野生ツツジの類縁関係を探り、園芸品種の成立過程と起源を明らかにするために、従来より調査が行われてきた形態学的形質のほかにDNAマーカーの利用を考えた。そのためにまず、ツツジにおけるDNA抽出技術の確立を試み、DNA多型の検出法を検討した。そして、園芸ツツジの重要な起源地の一つである九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団の形態学的分析、DNA分析を行い、集団間の形態形質や葉緑体DNAパターンの差異から集団間の関係を明らかにした。さらにそこで得られたDNAマーカーを利用することによって、九州各地の野生ツツジ集団の構造や園芸品種との関係を解析し、野生種から園芸品種にまで至る成立過程と起源について推論しようとした。本論文では以上のような流れに沿って述べてきたが、ここでは各章で得られた知見とそれに対する総合的な考察を加えた。

はじめに第1章では、本研究の序章として、ツツジ属植物の分類体系における日本のツツジ属植物の位置づけとそのフェノロジー、園芸品種成立の沿革等、本研究の背景を概説し、本研究の目的と構成について述べた。

次いで第2章では、まずツツジからのDNA抽出法について検討した。木本性植物であるツツジからは既存の方法ではDNA抽出が困難であったが、抽出時に磨砕したサンプルをポリエチレングリコールやソルビトール等を加えたバッファ

ーを用いて洗浄することによって、DNA抽出を阻害している多糖類やポリフェノール類が除去でき、ツツジ属だけでなく他の木本性植物からもDNA抽出が可能な改変CTAB法を確立した。本法の確立は本研究のDNA解析を捗らせただけでなく、これまで困難とされてきた木本性植物からのDNA抽出の問題を解決するものであると思われる。

さらにここでは、本法によって抽出したDNAを鋳型として、任意のプライマーを用いたPCRによって得られるRAPDのバンドパターンによって、園芸ツツジの品種同定や常緑性黄花ツツジ育種における遺伝解析への応用例を示した。膨大な数にのぼるツツジの園芸品種には、江戸時代からの古品種や品種不明品も多数あるが、これらの品種同定においてRAPD法は画期的なDNA解析技術であると思われた。品種管理や遺伝資源としての品種保存の現場での活用が期待される。また、黄色花という新しい形質を持った常緑性ツツジの育種においても、RAPDマーカーが雑種判定や、形質と関連性の強い遺伝マーカーとして、利用できる可能性が示された。

さらに、葉緑体DNAマーカーの遺伝性を調べたところ、興味深い知見が得られた。すなわち、従来ツツジ属の葉緑体DNAは両性遺伝するのものとされているが、両親とその交雑実生の葉緑体DNAパターンを分析すると、大半の常緑性ツツジ同士の実生は母性遺伝を示したが、なかには父性遺伝を示す個体もみられた。また、常緑性のミヤマサツキと落葉性のキレンゲツツジとの遠縁交雑実生はすべて父性遺伝を示した。これらの知見は、これまで受精反応時の細胞学的実験を主としてきた細胞質遺伝学的な研究分野に新たな情報を与えるものであり、他の分析法により確証を得る必要性が出てきた。今後、より詳細な細胞学的研究への新たな問題を提起するものと思われる。

以上のことをふまえて第3章では、九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団につ

いて形態調査およびDNA分析により解析を行った。DNA分析については葉緑体DNAのrDNA16S領域のHhaIによる制限サイトにおいて、ミヤマキリシマ型(1030, 420bp)およびヤマツツジ型(950, 420, 80bp)のPCR-RFLPパターンの変異がみられ、これをDNAマーカーとして用いた。その結果、山頂域のミヤマキリシマと、山麓域のヤマツツジはそれぞれ独立した種であり、それらの中間帯に分布する花色や形態の変異に富む集団は両種の自然雑種であるというこれまでの定説に対して、形態学的分析とDNA分析の結果からもこれに裏付けを得ることができた。また、この雑種集団にはミヤマキリシマとヤマツツジのいずれか片方の葉緑体DNAを持つ個体がほぼ同頻度で混在していることが明らかとなった。ミヤマキリシマとヤマツツジが垂直分布する中間帯において、このような雑種集団が維持されている機構の解明についても今後検討を加える必要があると思われた。さらに、各集団間には標高に沿った形態形質のクラインがあることが認められ、これはミヤマキリシマとヤマツツジ間の浸透交雑の結果によるものと考えられた。加えて、以上の結果は、多変量解析によって総合的に評価した際にも裏付けられるものであった。

ここでは霧島山系の山腹に分布する花色や形態の変異に富む野生ツツジ集団の成立過程が明らかになった。これまでこの野生ツツジ集団は慣例的にキリシマツツジ(*R. obtusum*)の名で呼ばれてきたが、前述の通り*R. obtusum*の学名は本来、江戸キリシマ系の1品種‘キリシマ’(現在の‘本霧島’)に与えられたものであり、適当ではない。本研究により明らかとなったミヤマキリシマとヤマツツジの自然雑種としての的確な命名の必要性が示唆された。

また、この霧島山系のツツジ集団で用いた形態分析およびDNA分析による解析手法は、日本だけでなく世界各地の自生地でも報告されている自然雑種形成地域(山崎, 1976)においても適用が期待される。

さらに第4章では、霧島山系のミヤマキリシマとヤマツツジを区別する葉緑体DNAマーカーを用い、まず、常緑性ツツジの園芸品種の母胎となった九州各地のミヤマキリシマやヤマツツジ、またサタツツジ等の野生種についてDNA解析を行った。

従来より自然雑種の形成が報告されている雲仙山系においても、霧島山系と同様に両種のDNAパターンが混在して出現していることから、種間雑種形成時にミヤマキリシマとヤマツツジの両種が母本として関与したことが推察された。また、花色変異の多様性から多くの園芸品種を輩出している万年山や由布岳のミヤマキリシマにはヤマツツジ型のDNAパターンを持つものが多く、それらの花色変異はヤマツツジの影響によるものと思われた。一方、形態変異が小さいことから純系とされてきた阿蘇山系のミヤマキリシマでは、ほとんどがヤマツツジ型のパターンを示したことから、ここでも古い時代におけるヤマツツジからの浸透交雑か、またはミヤマキリシマの種内分化の可能性が示唆された。なお、トカラ列島中之島産のマルバサツキがミヤマキリシマ型のパターンを示したことを除き、九州各地のヤマツツジをはじめとする他の野生種はすべてがヤマツツジ型のパターンを示した。

雲仙山系では標高に沿って霧島山系と同じような集団の構成がなされていると考えられ、これら2つの山系のツツジ集団は、垂直分布によって住みわけているミヤマキリシマとヤマツツジ2種の集団とそれらの中間帯の自然雑種集団として生物学的な意義付けが可能だと思われる。また、九重や、阿蘇を中心とした山系のミヤマキリシマは、種内分化、あるいはヤマツツジの浸透交雑に由来すると考えられるDNAパターンを持つ個体が大半をしめた。これらの成因を探るためには、詳細な現地調査と、さらに多くの個体についてのDNA分析の必要がある。

雲仙、霧島山系のミヤマキリシマと、トカラ列島を中心に分布するマルバサツキではいずれも純系とされる集団でのみ、ミヤマキリシマ型の葉緑体DNAパタ

ーンが検出された。保存性が高い葉緑体DNAの遺伝子内に他の近縁種にはみられない共通の変異を有することは、平行進化とみるよりは、共通祖先を持つことの可能性が高いが、この議論にはさらに核DNAマーカー等による裏付けが必要とされる。しかし、ここで興味深いのは、前者は火山性山岳に、後者も火山性山岳あるいは海岸の岩場に自生し、ともに強い火山性ガス耐性や、耐酸性、耐乾性、耐暑性等を持つ点にある。両種の細胞質にこれらの耐性を備える機構があるかどうかは、遺伝子解析や生化学的な研究が必要である。ただ、雲仙地獄のような硫黄性温泉の噴出地帯や、活動停止後の火山火口を中心に、同心円状のサンプリングと生育環境の調査を併せて行った上で、今回用いた葉緑体DNAマーカーによる分析を行うことにより、それらの細胞質の持つ性質との関係がより明確になるものと思われる。また、同時に周囲のヤマツツジ等との浸透交雑についても解析できる可能性が高い。

引き続き、次に「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」の各園芸品種について、この葉緑体DNAのrDNA16S領域のPCR-RFLPマーカーを用いてDNA分析を行い、各園芸品種の起源について推察した。

「江戸キリシマ」と称する品種群は、江戸時代に鹿児島地方の野生種より選抜された1個体が、明暦2年（1658）に江戸へ運ばれて発達した品種群で、25年後の「花壇綱目」（延宝9年、1681）には15品種の記載があり、更に11年後の「錦繡枕」には20余品種の記載がある（塚本、1976）。この‘キリシマ’の由来は「続江戸砂子」（菊岡沾淳、享保20年、1735）の5巻に「霧島は薩摩國霧島山の産なれば此名あり正保年中薩州より大阪へ一本来る取木にわけて大阪より五本京都に登る」とある。これより‘キリシマ’の名称は本来、特定の1品種に与えられたものであることがわかり、その後これに類似した一連の品種の総称を「キリシマツツジ」としている（大石、1916；宮澤、1940）。なお現在ではこれらの品種群を「江戸キリシマ」と呼んでいる。

この‘キリシマ’の産地の問題については、これまで論議がなされてきた。大正時代以降、多くの研究者によって自生品の探索がなされたが、牧野（1917）は「きりしまつつじ霧島山ニ無クうんぜんつつじ温泉岳ニ産セズ」と名言を題した報文で、霧島山を踏査したところ「・・・きりしまつつじハ全ク霧島山ニハ之ナク・・・」と述べているが、その後、中井（1922）は霧島山麓と桜島産の自生キリシマの標本を入手したことから、自生地が明らかになったことを述べている。これらのことに対し、宮澤（1918, 1940）は霧島山諸地方における実地調査の結果、‘キリシマ’は霧島地方におけるヤマツツジの一変形であることことを細かな形態観察から述べている。また、近年、宮島（1988）は九州各地の常緑性ツツジの花冠の形態と色素の変異を調べ、南九州地方のヤマツツジは豊富な変異性を持ち、‘キリシマ’の形質はこの範疇に含まれることから宮澤の推論を裏付けるものであるとしている。

その後、錦江湾を取り巻く一円において、葉が丸形で照りがあり花色変異の多いサタツツジの分布が発見された（Nakai, 1949）ことによって、‘キリシマ’の起源をサタツツジに置き換える説もある（国重, 1983）。なお、「江戸キリシマ」の1品種‘白霧島’は外部形態等からこのサタツツジの白花変異品であるとも言われている。

今回の「江戸キリシマ」品種群の分析の結果では1品種を除き、すべてがヤマツツジ型のDNAパターンを示した。このことは、江戸時代からの本来の‘キリシマ’品種とされる‘本霧島’をもとに他の多くの品種が発達したとされる故事をもとに推察が行われてきたこれまでの報告と、霧島山系の現地踏査や「江戸キリシマ」品種群の観察からの筆者の考えが一致することを意味している。しかしながら、最終的に起源種を断定するまでには至らなかった。

また、「クルメツツジ」は江戸時代の天保年間（1830～1844）に久留米藩士の坂本元蔵氏が「キリシマツツジ（江戸キリシマ）」系ツツジをもとに、苔に播種

を行う播種法によって育成を行ったのが始まりとされている（赤司，1919；国重，1983）。この「クルメツツジ」では育成当初の江戸時代から伝わるとされる古品種を中心に分析を行った。その結果，この品種群の多くがヤマツツジ型のパターンを示したことから，近年，有力な起源種と考えられてきたサタツツジの関与（田村ら，1974；阿部，1969；国重，1979，1983）が大きく浮かび上がった。また，一部の古品種がミヤマキリシマ型を持っていたことにより，従来より提唱されてきた「クルメツツジ」の成立におけるミヤマキリシマの関与（牧野，1917；上原，1972；宮澤，1940）も明らかとなった。

この「クルメツツジ」品種群の成立においては，実生からの人為的な選抜に加え，場合によっては種間の交配が行われた可能性も考えられる。人の手による複雑な過程を経てこの品種群が成立したとすると，この起源解明にはさらに詳細で多面的な分析が必要であろう。

一方，近年の昭和期になって野生種より選抜された「ミヤマキリシマ」の品種群（油屋ら，1979；国重，1979）では第3章，第4章第1節で得られた自生地の葉緑体DNAパターンがそのまま反映しており，雲仙，霧島山系産の品種はミヤマキリシマ型を，九重山系，由布岳，万年山産の品種はヤマツツジ型を示した。主に自生地における花色変異個体が選抜された本品種群は，ヤマツツジの影響による花色変異個体によってその大半が構成されていることが，その産地における性状からも推察された。

「ミヤマキリシマ」の品種群は，自然において形成された種間雑種や変異個体がそのまま園芸品種として適用されている典型的な例といえよう。

以上の葉緑体DNAのPCR-RFLP分析のみによっては，特に「江戸キリシマ」や「クルメツツジ」の園芸品種群についての起源種を解明することは困難であった。しかし，これらの品種群の成立における純粋なミヤマキリシマの関与に関しては，従来考えられていたよりは可能性が低いことが指摘された。人による

選抜や、複数の種間交雑を介して成立した園芸ツツジの起源を解明するためには、さらに由来の異なる各種のDNAマーカーを用いて、ゲノムの構成を明らかにすることや、古文献によって品種由来の沿革を詳しく調査する必要がある。

本研究で得られたこれら一連の結果や確立した手法を適用することによって、今後、園芸ツツジのみならず、日本の野生種をもとに日本独自の園芸文化が生み出したサクラ、キク、ツバキ等をはじめとする様々な園芸品種の起源が解明されることを期待する。

摘要

ツツジ科ツツジ属植物は、わが国の山野に多く自生し、これらをもとに江戸時代より数多くの常緑性ツツジの園芸品種が作出されてきた。これらの園芸品種は我が国だけでなく欧米でも、園芸や造園の分野で幅広い利用がなされている重要な花木であり、日本が世界に誇る花木の一つでもある。

その常緑性ツツジの代表的な園芸品種群である「クルマツツジ」や「江戸キリシマ」の起源は江戸時代に遡り、九州の霧島山系をはじめとする野生種をもとに数多くの品種が作出されてきた。しかし、その成立過程や成立に関わった野生種には不明な点が多く、明確な起源・由来は未だはっきりと解明されていない。

そこで本研究は、常緑性ツツジの園芸品種のもととなった九州各地の野生ツツジの類縁関係を探り、園芸品種の成立過程と起源を明らかにすることを目的として行われた。そして、その手法として、従来より使われてきた形態学的形質のほかDNAマーカーの利用を考えた。

まず、DNA解析技術をツツジ属植物に適用するために、ツツジ属を含む木本性植物からもDNA抽出が可能な改変CTAB法を開発した。さらに、抽出したDNAを用い、RAPD法による常緑性ツツジ園芸品種の品種同定や常緑性黄花ツツジ育種における遺伝解析への適用例を示した。また、ツツジ属の葉緑体DNAマーカーの遺伝性についても調べ、新たな知見を得た。

そして、「江戸キリシマ」等の常緑性ツツジの園芸品種の代表的な起源地である九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団の形態学的分析とDNA分析を行い、集

団間の関係を明らかにした。DNA分析については葉緑体DNA内のrDNA16S領域(1450bp)の*Hha*Iによる制限サイトに、ミヤマキリシマ型(1030, 420bp)およびヤマツツジ型(950, 420, 80bp)のPCR-RFLPパターンの変異がみられ、これをDNAマーカーとして用いた。その結果、山頂域のミヤマキリシマと山麓域のヤマツツジの大半はそれぞれの種のパターンを示し、中間帯の集団ではいずれかのパターンを持つ個体が混在していた。このことは、ミヤマキリシマとヤマツツジの中間帯に分布する花色や形態の変異に富む集団は両種の葉緑体DNAパターンが混在する雑種集団であることを示している。また、標高に沿った各集団間に認められるクラインはミヤマキリシマとヤマツツジ間の浸透交雑の影響によるものと考えられた。さらにこれらの結果は、クラスター分析や主成分分析を用いた多変量解析によっても裏付けられた。

次に、この葉緑体DNAマーカーを用い、九州各地のミヤマキリシマを中心に、ヤマツツジ、サタツツジ等の常緑性の野生種についてDNA分析を行った。雲仙山系のミヤマキリシマとヤマツツジの雑種集団では霧島山系と同様に両種のDNAパターンが混在して出現した。また、花色変異が多い万年山や由布岳のミヤマキリシマにはヤマツツジ型のDNAパターンを持つものが多く、それらはヤマツツジの影響によるものと思われた。また、形態変異が小さく、純系とされてきた阿蘇山系のミヤマキリシマでは、ほとんどがヤマツツジ型のパターンを示したことから、種内分化、あるいは過去におけるヤマツツジからの浸透交雑の可能性が示唆された。なお、トカラ列島中之島産のマルバサツキがミヤマキリシマ型のパターンを示したことを除き、ヤマツツジをはじめとする九州各地の他の野生種はすべてがヤマツツジ型のパターンを示した。

さらに、「江戸キリシマ」、「クルメツツジ」、「ミヤマキリシマ」の園芸品

種群についても同様のDNAマーカーを用いて分析したところ、大半の「江戸キリシマ」、「クルマツツジ」の品種がヤマツツジ型のパターンを示した。一方、「クルマツツジ」の一部にミヤマキリシマ型のパターンを示す品種もみられ「クルマツツジ」の成立にミヤマキリシマが関与したことを示唆した。また、自生地より選抜された「ミヤマキリシマ」の園芸品種では野生集団の分析結果を反映し、雲仙、霧島山系産のものはミヤマキリシマ型のパターンを示し、九重山系や由布岳、万年山産の多くはヤマツツジ型のパターンを示した。

以上のように、本研究ではツツジにおけるDNA分析技術を確立した上で、葉緑体DNAのrDNA16S領域に見られた多型の分析により野生種の類縁関係や園芸品種の起源を解明してきた。今後、葉緑体DNAに加え、核のDNAを解析することによって、野生種から園芸品種までの成立過程がより明確になるものと期待される。

謝辞

本研究の遂行と本論文の取りまとめに当たり、御指導、御鞭撻を戴いた筑波大学農林学系教授 高柳謙治博士に、心より感謝の意を表する。

さらに、本論文の作成に当たり、御校閲の労を賜った筑波大学農林学系教授 岩堀修一博士、同大学同学系教授 生井兵治博士、ならびに同大学生物科学系助教授 鷲谷いづみ博士に深く謝意を表する。

また、本研究の遂行に当たり、終始御高配を賜った鹿児島大学農学部名誉教授 有隅健一博士に深く謝意を表する。

加えて、本研究の遂行と本論文の作成に当たり、終始御指導、御鞭撻を賜った筑波大学農林学系講師 半田 高博士に深く謝意を表する。

そして、本研究テーマの御教示と貴重な御助言を賜った元筑波大学農林学系教授 故岡田正順博士に深く謝意を表し、衷心より御冥福をお祈り申し上げる。

なお、本研究の遂行に当たっては、さらに多数の方々より、本研究に対する貴重な御指導と御助言、御激励を賜った。

元東京大学理学部教授 山崎 敬博士にはツツジ属の分類等に関する貴重な御助言を賜った。

元栃木県農業試験場 赤羽 勝氏には有益な御助言に加え、貴重な材料の提供を賜った。

九州大学農学部助手 宮島郁夫博士には有益な御助言に加え、貴重な材料の提供を賜った。

国立科学博物館筑波実験植物園 八田洋章博士にはフェノロジー研究を通し、植物観察の御指導を賜った。

館林市つつじ研究事務所所長 島野好次氏には有益な御助言に加え、貴重な材料の提供を賜った。

元農林水産省野菜・茶業試験場 国重正昭博士には、有益な御助言に加え、貴重な材料の御提供を賜った。

農林水産省野菜・茶業試験場久留米支場 岡本章秀氏ならびに野中瑞生氏には御助言に加え、貴重な材料の提供を賜った。

農林水産省森林総合研究所 津村義彦博士、吉村研介氏ならびに陶山佳久博士にはプライマーの提供と実験技術に関する御指導、御助言を賜った。

同省果樹試験場興津支場 大村三男博士ならびに同省野菜・茶業試験場 平井正志博士には実験技術に関する御指導、御助言を賜った。

ここに記して深く謝意を表する。

さらに以下の方々からも有益な御助言、貴重な材料や資料の提供を賜った。

東京都中野区	つつじ研究家	榎本一郎氏
日本つつじ・シャクナゲ協会	会長	鈴木英雄氏
日本つつじ・シャクナゲ協会	理事	佐々木幸雄氏
群馬県藤岡市	つつじ研究家	羽鳥 勝氏
栃木県都賀町	大出園芸	大出昌男氏
新潟県新津市	木口仙寿園	木口一二三氏
宮崎県三股町	しゃくなげの森	池辺紀典氏
愛媛大学農学部	助教授	山口 聡博士
鹿児島大学農学部	教授	坂田祐介博士
同大学農学部	高隈演習林講師	馬田英隆氏
筑波大学生物科学系	助手	内田英伸博士
熊本県農業研究センター		田中正美氏
平塚農業改良普及センター	所長	岡部 誠氏

神奈川県農業総合研究所	堀越禎一氏
鹿児島県果樹試験場	内野浩二博士
元東京大学理学部附属植物園	伊藤義治氏
同植物園日光分園	根元正一氏
西武赤城自然園	倉重祐二氏
国立科学博物館筑波実験植物園	遊川友久博士
農水省国際農林水産業研究センター	故増原 学博士

ここに記して深く感謝の意を表する。

また、本研究を行うにあたり、霧島神宮をはじめとして、環境庁、小林営林署、えびの営林署、加治木営林署には霧島山系への入山とツツジ新葉採取の便宜供与を戴いた。記して深く感謝の意を表する。

さらに、卒業研究を通して本研究に御協力戴いた竹内理恵子氏、丹野研一氏、川嶋師保子氏、峰 正樹氏ならびに統計解析等の御協力を戴いた森中洋一氏に深く感謝の意を表する。

加えて、筑波大学農林学系の前教授 渡部 弘先生、さらに、鈴木 徹先生、福田直也先生をはじめとする諸先生方、牛谷敦子氏、山崎順子氏をはじめとする技官の方々、ならびに学生各位の御協力を戴いた。深く感謝の意を表する。

最後に、日光千手ヶ浜の栃木県自然監視員 伊藤 誠氏と御仲間の皆様、そして、我が家族の惜しみない御協力を戴いた。

ここに記して心より感謝の意を表する。

平成9年1月

小林伸雄

引用文献

阿部定夫. 1969. サタツツジとキリシマツツジ. p.155-158. 『シャクナゲとツツジ』 誠文堂新光社. 東京.

油屋吉之助・山田才吉・野田 賢. 1979. 雲仙岳におけるミヤマキリシマの変異について. 長崎総農試研報. 7:227-250.

赤羽 勝. 1971. ロードデンドロン属の遠縁交雑 育種学最近の進歩 12:83-89.

赤羽 勝. 1988. Pp.94. 『皐月の発達史』 日本放送協会学園. 東京.

赤羽 勝. 1993. ミヤマキリシマとサツキのF₁植物とレンゲツツジの交雑和合性について. 園学雑. 62(別1):344-346

赤司喜次郎. 1919. p.1-13. 『久留米躑躅誌』 赤司廣樂園. 福岡.

Anderson, E. 1949. p.1-11. "Introgressive hybridization" Wiley and Sons. New York.

有隅健一・坂田祐介・桑原一幸. 1986. 霧島・高隈山塊産ツツジの花色分析に関する研究. 鹿大農学部観賞園芸学教室研報. 4:1-21.

Arnold, M.L., C.M. Buckner and J.J. Robinson. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:1398-1402.

Banks, J.A. and C.W. Birky, Jr. 1985. Chloroplast DNA diversity is low in

a wild plant, *Lupinus texensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:6950-6954.

Bennett, R.D. and J.B. Grace. 1990. Shade tolerance and its effect on the segregation of two species of Louisiana *Iris* and their hybrids. Amer. J. Bot. 77:100-107.

Breiman, A. 1987. Mitochondrial DNA diversity in the genera of *Triticum* and *Aegilops* revealed by southern blot hybridization. Theor. Appl. Genet. 73:563-570.

Carlson, J.E., L.K. Tulsieram, J.C. Glaubitz, V.W.K. Luk, C.Kauffeldt and R. Rutledge. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F₁ progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 83:194-200.

Castiglione, G.W., G. Wang, G. Damiani, C. Bandi, S. Bisoffi and F. Sala. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus* spp.) clones. Theor. Appl. Genet. 87:54-59.

Castillo, C.O., K.J. Chalmers, R. Waugh and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87:934-940.

Chamberlain, D.F. 1982. A revision of *Rhododendron* 2. Subgenus Hymenanthus. Notes RBG Edinb. 39:209-486.

Chamberlain, D.F. and S.J. Rae. 1990. A revision of *Rhododendron* 5. Subgenus Tsutsusi. Edinb. J. Bot. 47:89-200.

Clegg, M.T. and G. Zurawski. 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. p.1-13. ed. by P.S.

Soltis, D. E. Soltis and J.J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants"
Chapman and Hall. New York.

Corriveau, J.L. and A.W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* 75:1443-1458.

Cullen, J. 1980. A revision of *Rhododendron* 1. Subgenus *Rhododendron* sections *Rhododendron* & *Pogonanthum*. *Notes RBG Edinb.* 39:1-207.

De Loose, R. 1969. The Flower pigments of the Belgian hybrids of *Rhododendron simsii* and other species and varieties from *Rhododendron* subseries *obtusum*. *Phytochemistry* 8:253-259.

De Loose, R. 1970a. Flavonoid glycosides in the petals of some *Rhododendron* species and hybrids. *Phytochemistry* 9:875-879.

De Loose, R. 1970b. Flower pigment composition of natural bud-variants among hybrid Chinese azareas, *Rhododendron simsii* (planch.). *J. Hort. Sci.* 45:265-274.

De Loose, R. 1979. Characterization of *Rhododendron simsii* Planch. cultivars by flavonoid and isoenzyme markers. *Scientia Hortic.* 11: 175-182.

Demeke, T., R.P. Adams and R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84:990-994.

Downie, S.R. and J.D. Palmer.1992. Use of chloroplast DNA rearrangements

in reconstructing plant phylogeny. p.14-35. ed. by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants" Chapman and Hall. New York.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Greenwood, M. S., C. A. Hopper and K.W. Hutchison. 1989. Mutation in larch 1. Effect of age on shoot growth, foliar characteristics and DNA methylation. Plant Physiol. 90:406-412.

Halward, T., T. Stalker, E. LaRue and G. Kochert. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Mol. Biol. 18:315-325.

箱田直紀・秋浜友也. 1988. 主成分分析及びクラスター分析によるサザンカ品種の形態的分類. 園学雑. 57:233-242.

浜田守彦・細木高志・稲葉久仁雄. 1989. 多変量解析によるボタン品種の形態的分類. 園学雑. 58:697-704.

Hamby, R.K. and E.A. Zimmer. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematic tool in plant systematics. p.50-91. ed. by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J. J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants" Chapman and Hall. New York.

半田 高. 1988. ミカン亜科植物とくにカンキツ類の数量ならびに化学分類に関する研究. 筑大農林学研. 4:143-257.

原 襄. 1989. ツツジの類の葉の形. プランタ 3:15-19.

Harada, T., K. Matsukawa, T. Sato, R. Ishikawa, M. Niizeki and K. Saito. 1993. DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica* 65:87-91.

長谷部光泰. 1990. 葉緑体DNAを用いた陸上植物の分子系統学. 日本植物分類学会報 8:54-82

八田洋章. 1989. ツリー ウォッチング 1-11. 採集と飼育 50:172.

八田洋章. 1990. Tree watching 樹木賛歌⑩ アカヤシオ. 日本の生物 4:68-71.

Heiser, C.B., Jr. 1951. Hybridization in the annual sunflower: *Helianthus annuus* x *H. debilis* var. *cucumerifolius*. *Evolution* 5:42-51.

Heiser, C.B., Jr. 1973. Introgression re-examined. *Bot. Rev.* 39:347-366.

Heun, M. and T. Helentjaris. 1993. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85:961-968.

Heursel, J. 1975. Inheritance of the flavonols azaleatin and quercetin in *Rhododendron simsii* Planch. and *R. obtusum* Planch. *Z. Pflanzenzüchtg.* 74: 62-70.

Heursel, J. and W. Horn. 1977. A hypothesis on the inheritance of flower colours and flavonoids in *Rhododendron simsii* Planch. *Z. Pflanzenzüchtg.* 79:238-249.

Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y. Honji, C.R. Sun, B.Y. Meng, Y.Q. Li, A. Kanno, Y.

Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki and M. Sugiura. 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-194.

Honda, H. and A. Hirai. 1990. A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan. J. Breed.* 40:339-348.

堀越禎一・北浦健生・藤代岳雄・小林伸雄・高柳謙治. 1994. ハナモモの品種同定におけるRAPDマーカーの適用. *園学雑.* 63(別1):380-381.

Hu, J. and C.F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Reports* 10:505-511.

稲森兼治・荒木徳蔵・飛田博温・森下幸雄・戸田義宏・中山至大. 1969. ミヤマキリシマ. p.176-182. 『霧島山総合調査報告書』霧島山総合研究会編. 宮崎.

Iqbal, M.J., D.W. Paden and A.L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among *rhododendron* species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Scientia Hortic.* 63:215-223.

河原孝行. 1992. 林木におけるDNA多型マーカーの利用. 林木の育種「特別号」'92:16-23.

木村陽二郎. 1975. 江戸園芸家, 伊藤伊兵衛について(石井勇義氏講演用掛図に関連して). *植物研究雑誌* 50:209-222.

Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R.Weide, T.Liharska and P.Zabel. 1991.

Isolation of molecular markers for tomato(*L.esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 83:108-114.

小林伸雄. 1992. Pp.171. ツツジ属におけるフェノロジーとRAPD法の適用. 修士(農学)論文. 筑波大学大学院農学研究科.

小林伸雄・八田洋章. 1993. ツツジ属の類縁関係と園芸ツツジの起源解明に関する研究(第1報)つくばにおけるツツジ属植物のフェノロジー. 園学雑. 62(別2):410-411.

小林伸雄・丹野研一・竹内理恵子・半田 高・高柳謙治・有隅健一. 1995. ツツジ属の類縁関係と園芸ツツジの起源解明に関する研究(第4報)九州霧島山系の標高別野生ツツジ集団の形態変異とDNAマーカーの検索. 園学雑. 64(別2):456-457.

Kobayashi, N., R. Takeuchi, T. Handa and K. Takayanagi. 1995. Cultivar identification of evergreen azalea with RAPD method. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64:611-616.

Kobayashi, N., M. Akabane, T. Handa and K. Takayanagi. 1996. Inheritance of morphological characters and RAPD markers in intersubgeneric hybrids of azalea, (*Rhododendron kiusianum* Makino \times *R. indicum* (L.) Sweet) \times *R. japonicum* (A.Gray) Suringer. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65:145-153.

小林伸雄・吉村研介・津村義彦・半田 高・高柳謙治・有隅健一. 1996a. ツツジ属の類縁関係と園芸ツツジの起源解明に関する研究(第5報)九州霧島山系野生ツツジ集団の葉緑体DNAのPCR-RFLP分析. 園学雑. 65(別1):360-361.

小林伸雄・川嶋師保子・宮島郁夫・岡本章秀・半田 高・高柳謙治・有隅健一. 1996b. ツツジ属の類縁関係と園芸ツツジの起源解明に関する研究(第6報)九州

各地の野生ツツジ集団および園芸品種のPCR-RFLP分析. 園学雑. 65 (別2) :474-475.

小林泰生. 1978. ツツジ類の花色に関する研究 (第1報) アザレア園芸品種の成立について. 福岡園試研報. 16:6-12.

小林泰生. 1980. ツツジ類の花色に関する研究 (第2報) クルメツツジ園芸品種の成立について. 福岡園試研報. 18:33-40.

Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85:901-904.

Krahi, K.H., M.A. Dirr, T.M. Halward, G.D. Kochart and W.M. Randle. 1993. Use of single-primer DNA for the identification of red maple (*Acer rubrum* L.) cultivars. J. Environ. Hort. 11:89-92.

Kron, K.A., L.M. Gawen and M.W. Chase. 1993. Evidence for introgression in azaleas (*Rhododendron*; Ericaceae): chloroplast DNA and morphological variation in a hybrid swarm on Stone Mountain, Georgia. Amer. J. Bot. 80:1095-1099.

国重正昭・田村輝夫. 1961. 霧島地方に自生するつつじの変異について. 九州農業研究 23:157-158.

国重正昭. 1973. わが国のサツキ園芸品種 その来歴と特性. 農及園. 49:681-686.

国重正昭. 1979. クルメツツジ. p.111-160. ガーデンライフ編. 『日本の園芸ツツジ』 誠文堂新光社. 東京.

Kunishige, M. and Y. Kobayashi. 1980. Chromatographic identification of Japanese azalea species and their hybrids. In : J. L. Luteyn and M. E. O'Brien (eds.). Contributions toward a classification of *Rhododendron*. 277-287. New York Bot. Garden, New York.

国重正昭. 1983. ツツジ品種についての考察. 園芸学会昭和58年度秋季大会シンポジウム講演要旨:100-109.

国重正昭・竹内照雄・岩佐亮二. 1989. ツツジ属 *Rhododendron* L. p.221-264. 『園芸植物大事典』 小学館. 東京.

Kuroiwa, T.. 1991. The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. Int. Review Cytology 128:1-62.

Linne, C.von. 1753. Species of Plantarum. ed.1. Stockholm.

Liston, A., L.H. Rieseberg and M.A. Hanson. 1992. Geographic partitioning of chloroplast DNA variation in the genus *Datisca* (*Dastisceae*). Pl. Syst. Evol. 181:121-132.

Maguire, T.L., G.G. Collins and M. Sedgley. 1994. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family *Proteaceae*. Plant Mol. Biol. Repr. 12:106-109.

牧野富太郎. 1917. きりしまつつじ霧島山ニ無クうんぜんつつじ温泉岳ニ産セス. 植物研究雑誌 1:172-175.

宮原佳代・宮島郁夫・松尾英輔. 1993. アイソザイム分析によるサタツツジと他

の九州産野生ツツジ類との類縁関係. 園学雑. 62 (別2) :412-413.

宮島郁夫. 1987. 九州におけるツツジ属植物の分類と類縁関係. 園芸学会昭和62年度秋季大会シンポジウム講演要旨 : 114-121.

宮島郁夫. 1988. Pp.125. 九州における常緑性ツツジ類の形態変異に関する研究. 九州大学博士論文.

宮島郁夫・上本俊平・坂田祐介・有隅健一. 1995. 雲仙山系のミヤマキリシマ (*Rhododendron kiusianum* Makino) とヤマツツジ (*R. kaempferi* Planch.) における花器の形態と花色素の変異. 園学雑. 64:393-399.

Miyamura, S., T. Kuroiwa and T. Nagata. 1987. Disappearance of plastid and mitochondrial nucleoids during the formation of generative cells of higher plants revealed by fluorescence microscopy. Protoplasma 141:149-159.

宮脇 昭. 1981. I. 自然環境. p.37-52. 『日本植生誌 九州』 至文堂. 東京.

宮澤文吾. 1918. きりしまつつじノ起源. 植物学雑誌 32 : 318-331.

宮澤文吾. 1940. キリシマツツジ. p.149-181. 『花木園芸』 養賢堂. 東京.

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.

中井猛之進. 1922. きりしまノ産地. 植物学雑誌 36 : 104.

Nakai, T. 1949. Miscellaneous notes on Japanese plants. Bull. Nat. Sci. Mus. 27:33-34.

中尾佐助・和田弘一郎. 1970. *Rhododendron* L.(ロードデンドロン属). p.2320-2333.『最新園芸大辞典』 誠文堂新光社. 東京.

中尾佐助. 1986. Ⅲ. 日本の花の歴史. p.105-178.『花と木の文化史』 岩波書店. 東京.

Neal, D.B., K.A. Marshall and R.R. Sederoff. 1989. Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:9347-9349.

Neal, D.B. and R.R. Sederoff. 1989. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. Theor. Appl. Genet. 77:212-216.

Nilsen, E.K. 1986. Quantitative phenology and leaf survivorship of *Rhododendron maximum* in contrasting irradiance environments of the southern Appalachian mountains. Amer. J. Bot. 73:822-831.

野口弥吉. 1930. 如何にせば黄色躑躅は育成し得るか. 日本園芸雑誌 42:1-6.

Noguchi, Y. 1932. Studies on the species crosses of Japanese *Rhododendron*. 1. On the crossability between various species and the cotyledon color of F₁ seedlings. Japan. J. Bot. 6:103-126.

織田喜久・丹野研一・小林伸雄・鈴木 徹・半田 高・田部井豊・萱野暁明・有隅健一・高柳謙治. 1996. RAPD法を用いた霧島山系自生ツツジ集団の持つ遺伝的変異の評価. 育雑. (別1):124.

大場秀章. 1995. ツツジ科. 植物の世界 64:6-98.

Ohba, K., M. Iwakawa, Y. Okada and M. Murai. 1971. Paternal transmission of a plastid anomaly in some reciprocal crosses of sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don. *Silvae Genetica* 20:101-107.

大石 進. 1916. 躑躅栽培の略史. *日本園芸雑誌* 28:32-36.

Ohyama, H., H. Fukuzawa, T. Kohch, H. Shirai, T. Sano, S. Sano, K. Uemoto, Y. Shiki, M. Takeuchi, Z. Chang, S.-I. Aota, H. Inokuchi and H. Ozeki. 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchatia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572-574.

Palmer, J.D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. p.36-49. ed. by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants" Chapman and Hall. New York.

Petit, R.J., A. Kremer and D.B. Wagner. 1993. Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks. *Theor. Appl. Genet.* 77:212-218.

Rajora, O.P. and B.P. Dancik. 1995a. Chloroplast DNA variation in *Populus*. I. Intraspecific restriction fragment diversity within *Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. maximowiczii*. *Theor. Appl. Genet.* 90:317-323.

Rajora, O.P. and B.P. Dancik. 1995b. Chloroplast DNA variation in *Populus*. II. Interspecific restriction fragment polymorphisms and genetic relationships among *Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. maximowiczii*, and *P. x canadensis*. *Theor. Appl. Genet.* 90:324-330

- Rajora, O.P. and B.P. Dancik. 1995c. Chloroplast DNA variation in *Populus*. III. Novel chloroplast DNA variants in natural *Populus* x *canadensis* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 90:331-334.
- Rieseberg, L.H., D.E. Soltis and J.D. Palmer. 1988. A molecular reexamination of introgression between *Helianthus annuus* and *H. bolanderi* Compositae. *Evolution* 42:227-237.
- Rieseberg, L.H., S. Beckstrom-Sternberg, and K. Doan. 1990. *Helianthus annuus* ssp. *texasus* has chloroplast DNA and nuclear ribosomal RNA genes of *Helianthus debilis* ssp. *cucumerifolus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 593-597.
- Rieseberg, L.H. and S.J. Brunsfeld. 1992. Molecular evidence and plant introgression. p.151-176. ed. by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants" Chapman and Hall. New York.
- Roy, A., N. Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* 85:173-180.
- Sakata, Y., K. Arisumi and I. Miyajima. 1991. Some morphological and pigmental characteristics in *Rhododendron kaempferi* Planch., *R. kiusianum* Makino and *R. eriocarpum* Nakai in southern Kyushu. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 60:669-675.
- Sakata, Y., I. Miyajima and K. Arisumi. 1993. Variations in some morphological and pigmental characteristics in *Rhododendron kaempferi* Planch., *R. kiusianum* Makino and their natural hybrids on Kirishima mountain mass. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 61:925-932.

島地 謙・倉田 悟. 1978. 樹木の形態・形成. p.10-33. 『樹木 形態と機能』
文永堂. 東京.

島野好次. 1992. Pp.191. 『館林つつじ物語 世界にほこる館林のツツジ』
館林市. 群馬.

清水建美. 1991. 伝統的分類学とDNA分類学. J. Phytogeogr. Taxon. 39:41-
60.

新 敏夫. 1973. 南九州生物誌 (2). 遺伝 27:74-79.

Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida,
T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-
Shinozaki, C. Ohta, K. Torazawa, B.Y. Meng, M. Sugita, H. Deno,
T. Kamagashira, K. Yamada, J. Kusuda, F. Takaiwa, A. Kato, N. Tohdoh,
H. Shimada and M. Sugiura. 1986. The complete nucleotide sequence of the
tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J.
5:2043-2049.

Sleumer, H. 1949. Ein System der Gattung *Rhododendron* L. Bot. Jahrb.
Syst. 74:511-553.

Sleumer, H. 1978. Past and present taxonomic system of *Rhododendron*
based on macromorphological characters. p.19-26. ed. by J.L. Luteyn and
M.E. O'Brien. "Contribution toward a classification of the *Rhododendron*"
New York Bot. Garden, New York.

Soltis, D.E., P.S. Soltis, and B.G. Milligan. 1992. Intraspecific
chloroplast DNA variation: Systematic and phylogenetic implications.

p.117-150. ed. by P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle. "Molecular Systematics of Plants" Chapman and Hall. New York.

Spethmann, W. 1980. Flavonoids and carotenoids of rhododendron flowers and their significance for the classification of the genus *Rhododendron*. p.247-275. ed. by J.L. Luteyn and M.E. O'Brien. "Contributions toward a classification of *Rhododendron*" New York Bot. Garden. New York.

Stevenson, J.B. 1930. The species of *Rhododendron*. The Rhododendron society, London.

高田研一. 1981. ミツバツツジ類の地理分布と生態. 種生物学研究 V :19-32.

田村輝夫. 1963. 平戸ツツジに関する研究 その成立について. 園試報. D (久留米) 1:155-185.

田村輝夫・秦 四年・加藤 要・田村三良. 1974. ツツジ・アザレア. p.277-323. 『躑躅・皐月・石楠花』 講談社. 東京.

時本 巽. 1991. 外観的形質の多変量解析によるブドウの分類. 園学雑. 60:613-618.

Torres, A.M., T. Millan and J.I. Cubero 1993. Identification of rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. HortScience. 28:333-334.

塚本洋太郎監修. 1976. Pp.221. 日本皐月協会編. 『錦繡枕』 青青堂出版. 東京.

Tsumura, Y., H. Taguchi, Y. Suyama and K. Ohba. 1994. Geographical cline of chloroplast DNA variation in *Abies mariesii*. Theor. Appl. Genet. 89:

922-926.

上原敬二. 1972. 3. Ericaceae シャクナゲ科. p.413-574. 『樹木大図説』
有明書房. 東京.

内田英伸・黒岩常祥. 1992. 高等植物の細胞質遺伝子の細胞機構. 化学と生物
28:777-788.

Wade, L.K. 1976. A *Rhododendron* phenology study program. Davidsonia 7:
23-24.

Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Marooof, S.M. Williams, B.P.
Dancik and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole
and jack pines and their hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:2097-
2100.

渡辺隆一. 1988. 植物のフェノロジー① フェノロジー研究への招待. 日本の生
物 2:45-48.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey.
1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as
genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Wilson, E.H. and A. Rehder. 1921. The azaleas of the old world. p.1-105.
“A monograph of Azaleas: *Rhododendron* subgenus *anthodendron*” Harvard
University Press. Cambridge.

山崎 敬. 1976. ツツジの自然交雑種. 植物研究雑誌 51: 29-32.

山崎 敬・熊倉 弘・国重正昭 他. 1976. ツツジ栽培の歴史と分類他. p.41-

162. ガーデンライフ編. 『ツツジ その種類と栽培』 誠文堂新光社. 東京.

山崎 敬・熊倉 弘・国重正昭 他. 1979. オオヤマツツジ系, ヤマツツジ系, ハンノウツツジ系, ウンゼンツツジ, モチツツジ系, リュウキュウ系, オオキリシマ系, キシツツジ, 江戸キリシマ, ヒラドツツジ, ミヤマキリシマ他. p.2-110. ガーデンライフ編. 『日本の園芸ツツジ』 誠文堂新光社. 東京.

山崎 敬. 1989a. ツツジ科 ERICACEAE. p.122-156. 『日本の野生植物 木本Ⅱ』 平凡社. 東京.

山崎 敬. 1989b. 日本のツツジ属. プランタ 3:6-14.

横川水城・堀田 満. 1995. 西南日本の植物雑記. 霧島山系におけるミヤマキリシマ, キリシマツツジ, ヤマツツジ諸集団の形質変異. 植物分類, 地理 46:165-183.