

ナカガワノギクの分布,形態的変異および葉緑体DNAのPCR-RFLP分析

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者名	深井,誠一 上ヶ市,洋子 山崎,教道 張,偉 五井,正憲
発行元	園藝學會
巻/号	71巻1号
掲載ページ	p. 114-122
発行年月	2002年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ナカガワノギクの分布, 形態的変異および葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析

深井誠一^{1*}・上ヶ市洋子¹・山崎教道²・張 偉¹・五井正憲¹

¹香川大学農学部 761-0795 木田郡三木町池戸

²高知県農業技術センター山間試験場 789-0315 大豊町中村大王

Distribution, Morphological Variations and cpDNA PCR-RFLP Analysis of *Dendranthema yoshinaganthum*

Seiichi Fukai^{1*}, Yoko Kamigaichi¹, Norimichi Yamasaki², Wei Zhang¹ and Masanori Goi¹

¹ Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-0795

² Highland Experimental Station, Kochi Agricultural Research Center, Ohtoyo-cho, Kochi 789-0315

Summary

Dendranthema yoshinaganthum is an endemic species found along the Naka-river in Tokushima Prefecture, Japan. The habitat area has narrowed, compared to that reported in the 1950s. Thirty-six individuals of this species were collected from the habitat and from two institutes. There were considerable variations in leaf and flower morphology and flowering time among the specimen. Three lines with large plants obtained from two institutes were found to be octoploid ($2n=72$), whereas all others were tetraploid ($2n=36$). PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA gene, *trnK*, showed that this species could be divided into two groups.

Key Words: cpDNA, *Dendranthema yoshinaganthum*.

緒 言

わが国に自生する *Dendranthema* 属 (狭義のキク属, 以下野生ギク) 植物は約 18 種で, 内陸性と海岸性の種に大別され, 倍数性は二倍体から十倍体の種まで変化に富んでいる (中田ら, 1987; 柴田, 1995). 野生ギクの多くは栽培ギクと容易に交雑し (Fukai ら, 2000a), それらのもつ多様な形質は栽培ギクにとって貴重な遺伝資源と考えられている. ところが現在までに野生ギクの評価ならびに栽培ギク育種への利用は限られており (柴田ら, 1988; Douzono・Ikeda, 1998), その一方で自生地における野生ギクの減少と栽培ギクによる遺伝的汚染が問題となっている (中田, 1989, 1999; 中田・竹内, 1998).

ナカガワノギク (*D. yoshinaganthum* Kitam. syn. *Chrysanthemum yoshinaganthum* Makino) は, 徳島県那賀川流域のみに自生する野生ギクの一種である. 白色舌状花の比較的大きな頭状花序と背面に毛茸が密生する流線形の葉を持つ草姿は美しく, それ自体でも園芸的価値が高い. 自然日長下では茎は直立し, 比較的上位の分枝が発達してその先に花をつける (Fukai ら, 1998). 開花に対する

日長および温度反応はほぼ秋ギクタイプである (Fukai ら, 2000c). これらのことから, 未利用の野生ギクの中でナカガワノギクが有望な遺伝資源であると考えられる.

1950 年代に Tanaka (1960) がナカガワノギクの分布, 形態的変異, 核型を調査し報告しているが, 以降本種に関する報告はない. 本研究では改めて本種の分布状況を確認した上で, 栽培ギクの遺伝資源として活用するための基礎データを得ることを目的として, 形態的変異と自然開花日を調査し, さらに葉緑体 DNA の PCR-RFLP 解析による遺伝的変異を明らかにした.

材料および方法

1. 植物材料

1996 年から 1998 年の 3 年間徳島県那賀川流域におけるナカガワノギクの分布を調査した. 那賀川流域の 9 ヶ所の地点, 長安口ダム下 (a), 小浜上那賀町東体育館下 (b), 桜谷小下 (c), 蛇ヶ淵 (d), 川口ダム下 (e), 丹生谷橋下 (f), 鶯敷温泉遊歩道 (g), 鶯敷町役場下 (h), 細野橋下 (i) (第 1 図, 第 1 表) から, 31 系統のナカガワノギクが挿し穂の形で集められた. その他農林水産省野菜・茶業試験場 (現独立行政法人農業研究技術機構花き研究所) から 4 系統 (j), 香川県園芸総合センターから 1 系統 (k) のナカガワノギクの譲渡を受けた. 全ての系統の母株は, 暗期光中断を加えた無

2000 年 11 月 20 日 受付. 2001 年 6 月 1 日 受理.

本研究は文部省科学研究費 (09660031) の助成を受けて行われた.

*Corresponding author.

加温室内で維持され、必要に応じて採穂され実験に供した。

さらに後述の葉緑体 DNA の分析のため、上記の系統とは別に a, c, e, g, i の 5ヶ所から改めてそれぞれ 30 個体ずつの葉を採取して実験に供した。

2. 形態観察

1996 年は各系統の挿し芽苗を 6 号鉢に定植、6 月 20 日に 5 節でピンチ、その後 1 本仕立てとした。1997, 1999 両年は、株分け移植後冬至芽由来のシュートをノーピンチで伸長させた。いずれの年も自然日長下で栽培し、3 年間の開花時期を調査した。1997 年の開花時に各系統から 3 本のシュートを採取し、上位 5-10 節に着生している葉を合計 10 枚および頂部の頭状花序について形態を調査した。

葉の構造ならびに気孔を観察するため、二つの系統 (e1, j3) について採取した葉を FAA で固定した。その後葉の中央部を 5 × 5 mm に切り出し、エタノールアセトンシリーズで脱水、酢酸イソアミル置換、臨界点乾燥、Pt 蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡 (日立, S-2150) で観察した。

3. 染色体数

各系統の若いシュートを発根剤を用いずに鹿沼土に挿し芽、発根させた。旺盛に伸長中の根の先端部を採取し、0.05% コルヒチン水溶液で 2.5 時間以上前処理した。その後ファーマー液 (酢酸:無水アルコール=1:3, v/v) で 2 時間以上固定し、根端分裂組織を酢酸オルセインで染色した後、押しつぶして観察した。染色体数は、各系統とも分裂

中期像 3 細胞を観察し決定した。また、染色体数に変化のみられた個体を含むいくつかの系統について、キメラの有無を確認するため、フローサイトメーター (池田理化, PA) により葉の核 DNA 量を測定し、倍数性を比較した。測定は若い葉の一部を用い、Mishiba ら (2000) の方法に従い、4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色して計測した。

4. 葉緑体 DNA の PCR-RFLP

若いシュートの先端部位 (2-3 g) から CTAB 法により (Doyle・Doyle, 1987) 全 DNA を抽出し、RNase 処理後 TE に溶かし、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ となるよう調整して -20°C で保存した。葉緑体 DNA の二つの領域、*rbcL*-ORF106 と *trnK* をそれぞれプライマー 5'-ATGTCACCACAAAC-AGAAACTAAAGCAAGT-3', 5'-ACTACAGATCT-CATACTACCCC-3' (Arnold ら, 1991) と 5'-AACCCGGAAGTAGCTGGATG-3', 5'-TCAATGG-TAGAGTACTCGGC-3' (Tsumura ら, 1995) により増幅した。反応液は 0.1mM dNTPs mix, 10mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.2U Taq ポリメラーゼ (Takara), 64ng template DNA, 0.8 μM 両プライマーを含む合計 50 μl とした。PCR には Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 を用い、増幅プログラムは $94^\circ\text{C}-5\text{min}$ を 1 サイクル、 $92^\circ\text{C}-1\text{min}$, $61^\circ\text{C}-1\text{min}$, $70^\circ\text{C}-4\text{min}$ を 35 サイクル、最後に $70^\circ\text{C}-7\text{min}$ を 1 サイクルとした。増幅産物の一部をミュージック電気泳動装置 (コスモバイオ) を用いて 1% アガロースゲル

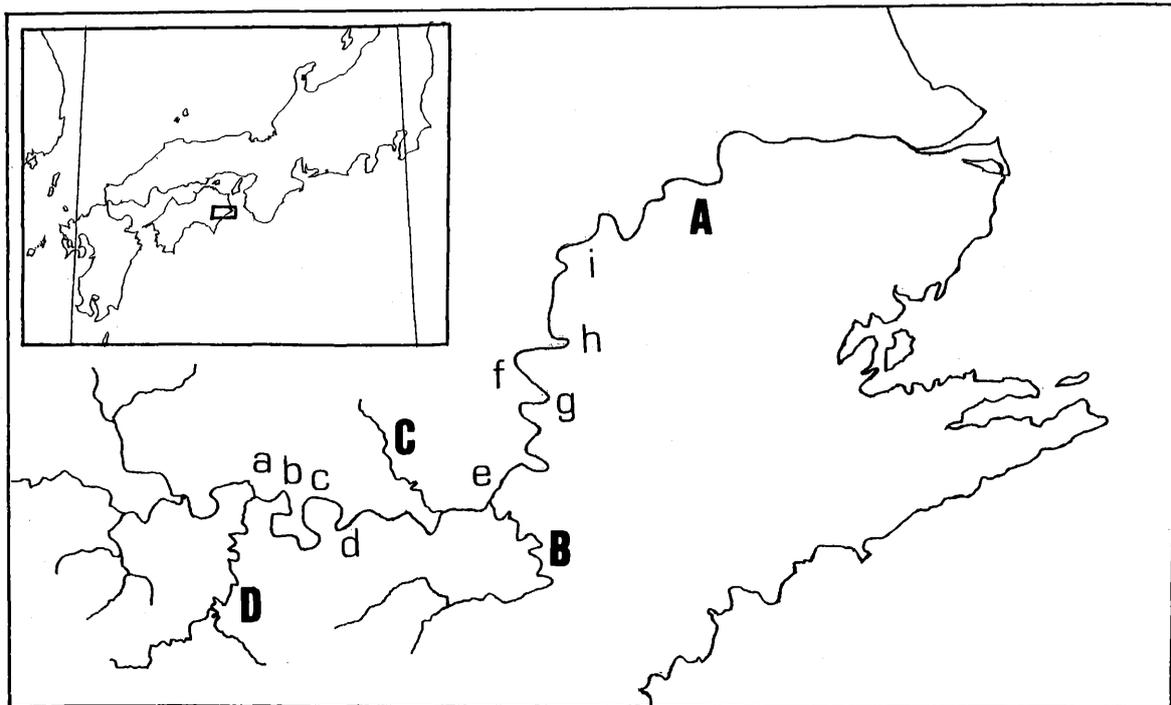


Fig. 1. Collection sites of *D. yoshinaganthum*.

A; Naka River, B; Akamatsu River, C; Momizi River, D; Furuya River, a; Nagayasuguchi Dam, b; Kohama, c; Sakuradani, d; Abugafuchi, e; Kawaguchi Dam, f; Niudani Bridge, g; Wajiki Onsen, h; Wajiki Town hall, i; Hosono Bridge.

(Takara, LO3)で50V, 40分間電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色後UVイルミネータで観察した. 増幅が確認されたものは, 第2表に示した15種類の制限酵素で切断を行い, 再び上記の条件で電気泳動の後, 観察した.

結 果

1. 分布

那賀川の中流域の内, 下流の方から深瀬町, 十八女町, 大井町付近(第1図i地点より下流域)では川沿いの土手

および道路の法面で生育が確認されたが, 河原は砂地で大型の多年生植物, つる性植物が茂り, ナカガワノギクは見られなかった. 更に上流の細野町(第1図i地点付近), 鷺敷町(第1図f, g, h地点付近)では, 岩場や石の多い河原で自生が確認されたが, 流れが緩やかとなり, 細かい砂地で形成された河原では全く自生は認められなかった. さらに相生町(第1図g地点より上流域)より上流でも同様に河原の石の間, 大きな岩の割れ目等に多くの自生がみられたが, 川から離れて他の植物が旺盛に生育する土手に

Table 1. Characteristics of 36 lines of *D. yoshinaganthum*.

Lines ^z	Leaf (mm)			Flower			Flowering date ^y			Chromosome No.	PCR-RFLP pattern ^u
	Length	Width	Thickness	No.s.l ^x	ϕ (cm) ^w	No.r.f ^v	1996	1997	1998		
a1	62.8	18.8	0.46	48.7	4.4	27.5	- ¹	-2	-2	36	B
a2	60.2	13.7	0.46	32.4	4.4	22.8	-	+7	+1	36	B
a3	74.5	23.7	0.24	35.7	5.2	23.0	-	-2	+5	36	B
a4	52.8	14.8	0.29	27.5	4.2	24.2	-	0	-	-	B
a5	66.2	21.7	0.26	39.2	5.7	36.0	-	+8	+2	36	B
a6	54.3	14.8	0.30	45.7	3.8	23.7	-	+3	-	-	B
b1	45.2	12.8	0.39	44.7	4.5	21.2	-	-5	-5	36	B
b2	57.3	16.0	0.42	35.3	5.4	22.3	-	-2	+4	36	B
b3	58.2	16.0	0.33	38.3	4.5	20.7	-	-6	-5	36	B
c1	54.0	14.8	0.67	53.5	4.8	25.0	-	-8	-5	36	A
c2	72.0	21.7	0.33	19.8	3.9	23.5	-	-5	-6	36	A
c3	62.2	16.3	0.33	21.7	5.1	22.0	-	+1	+1	36	B
d1	39.5	11.2	0.22	42.0	3.5	22.7	-	-2	+1	36	B
d2	38.8	14.3	0.30	21.3	3.9	22.3	-	-5	+1	36	B
d3	54.0	20.8	0.36	25.0	3.2	21.0	-	+1	-3	36	B
e1	65.2	16.8	0.44	21.3	4.5	20.3	-2	+1	-2	36	B
e2	60.2	17.5	0.62	34.5	4.8	23.7	-4	-5	-8	36	A
e3	65.3	16.2	0.50	44.7	5.0	16.7	-9	-5	-8	36	B
f1	71.2	17.7	0.38	48.8	4.6	22.0	+3	+4	+6	36	B
f2	56.8	18.0	0.41	45.2	5.6	30.8	+5	-5	+9	36	B
f3	51.3	12.0	0.45	48.8	4.7	24.8	-1	+3	+1	36	B
f4	49.3	15.8	0.47	23.5	3.5	21.0	-	+18	+9	36	B
g1	80.8	20.0	0.37	45.0	4.8	22.3	-7	-6	-8	36	B
g2	55.7	18.7	0.38	52.2	4.4	26.0	-8	-10	-10	36	B
g3	51.5	16.7	0.53	30.8	3.3	23.8	-2	+1	0	36	B
h1	47.8	19.1	0.41	45.7	5.2	20.8	0	+1	-2	36	B
h2	48.0	13.2	0.43	34.0	4.8	22.2	+1	+3	+4	36	B
h3	42.3	18.0	0.36	26.2	4.2	27.0	+6	+9	+4	36	B
i1	45.7	21.5	0.38	16.0	4.5	20.0	+6	+8	+1	36	B
i2	39.0	16.7	0.33	29.8	3.5	25.0	+4	+2	+2	36	B
i3	39.2	12.2	0.31	39.8	3.4	33.5	-6	-8	-5	36	B
j1	63.3	23.3	0.34	43.2	5.7	28.2	+6	+4	+2	36	B
j2	55.8	17.0	0.37	32.5	3.3	18.7	-	+13	+5	36	B
j3	67.7	21.3	0.69	15.8	4.0	21.0	+7	+9	+3	72	A
j4	49.3	13.8	0.62	11.3	3.3	21.7	+7	+9	+3	72	A
k	60.3	19.5	0.61	9.0	3.8	21.8	+7	+9	+3	72	A
av.	56.0 ± 1.8 ^s	17.1 ± 0.5	0.40 ± 0.02	34.1 ± 2.0	4.4 ± 0.10	23.6 ± 0.63	31/Oct	1/Nov	14/Nov		

^z Line a-k indicate collection sites, refer to Fig.1.

^y +and- figures indicate the number of days after and before average flowering date respectively.

^x Number of scaly leaves (see Fig.3).

^w Diameter of capitulum.

^v Number of ray florets.

^u Banding pattern of PCR-RFLP (see Fig.5).

¹ Not tested.

^s Average ± SE.

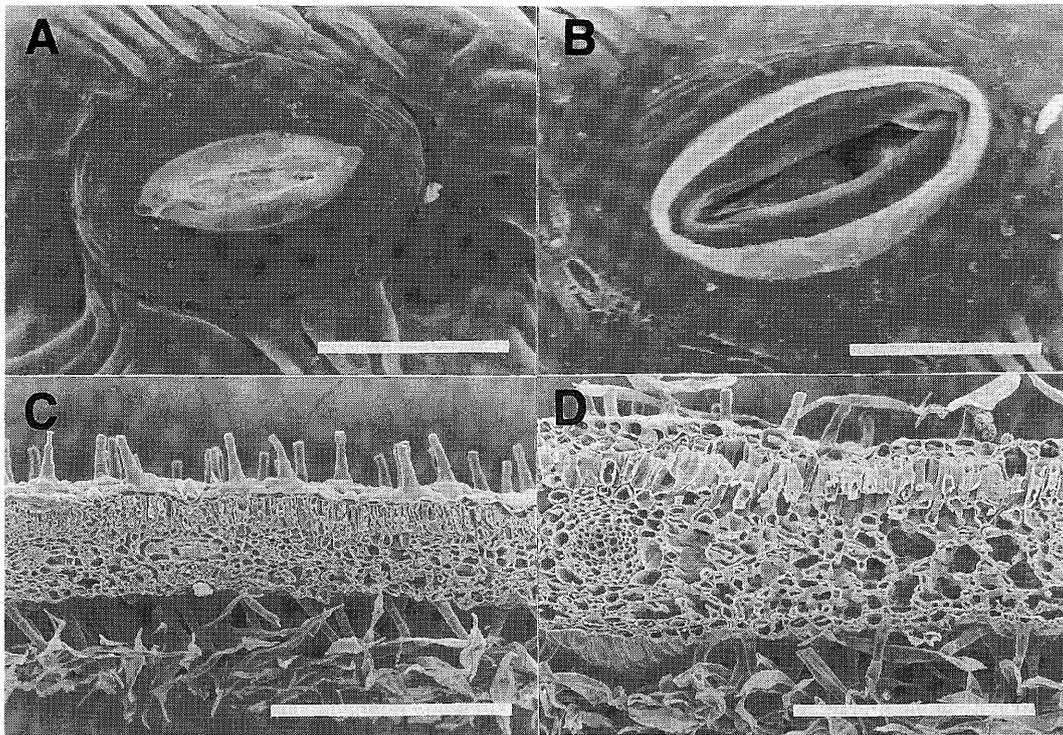


Fig. 2. Morphological comparison of stomata and cross section of leaf.

A, C and B, D represent lines e1 and j3, respectively, on Table 1. A, B = $\times 200$, C, D = $\times 100$ magnification. Bars in A and B = $20 \mu\text{m}$, bars in C and D = $500 \mu\text{m}$.

はほとんどみられなかった。川口(第1図e地点), 長安口(第1図a地点)両ダムの上流は広範囲にわたってダム湖となっており, その土手には全く自生は認められなかった。一方, 両ダムの直下には水位が低下した岩の多い河原が広くひろがり, 多くの自生が確認された。また自生の確認された範囲の那賀川本流に流れ込む支流に関しては, 赤松川の河原で自生が確認されたが, それより上流の古屋川, 紅葉川の河原にはみられなかった。

2. 形態的変異と自然開花日

葉はいずれの系統も基部は楔形で葉身部は3裂し, 葉の背軸面には毛茸(trichome)を有したが, その密度は系統により異なり, 密生しほとんど灰白色を呈するものから, やや粗で淡緑色を呈するものまで変異が見られた。葉の長さは8.1 cmから3.9 cm(最大値-最小値, 以下同じ)で, 幅は2.4 cmから1.1 cmで, 葉長/葉幅比が4.4から2.1と細長いものから丸みを帯びたものまでかなりの変異が認められた。また葉の厚みも0.6 mmから0.3 mmまで変異がみられた(第1表)。調査した系統の中でj3, j4, kの3系統は葉に厚みあり, 植物全体が他系統より大きく, 明らかに大型の草姿を有していた。このため以下j3, j4, kの3系統を大型系統, 他の自生地から採取したものを野生系統と呼ぶ。

これら大型系統と代表的な野生系統の葉の形態を走査型電子顕微鏡で比較すると, 明らかに大型系統の気孔は大きく葉肉組織が発達していた(第2図)。

花序にもまた大きな形態的変異が認められた。頭状花序



Fig. 3. Inflorescence of *D. yoshinaganthum*.

Arrows indicate scaly leaves. See Table 1 for variations.

径は5.7 cmから3.2 cm, 舌状花数は36枚から17枚であり, 舌状花の花弁の先端の形にも尖ったもの, 丸いもの, 切れ込みのあるものなどの変異がみられ, f4はさじ弁であった。舌状花の花色は全体に白色であったが, a2がやや桃色を呈した。また, 最上位普通葉(欠刻を有する葉)から頭状花序の総苞りん片の間にやなぎ葉様の形態を示すりん片葉(第3図)を形成する事が本種の特徴であるが, そ

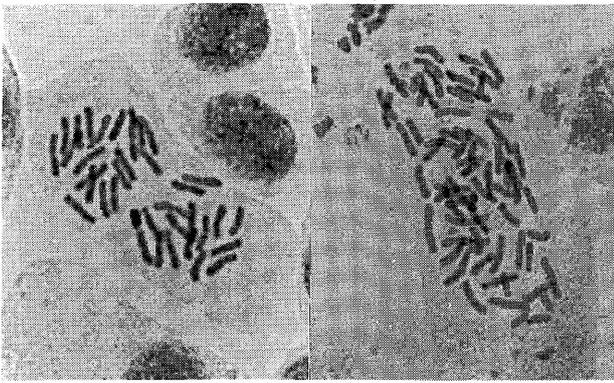


Fig. 4. Photomicrographs of chromosomes from two types of *D. yoshinaganthum*.
Left; line f2 ($2n=36$), right; line j3 ($2n=72$), refer to Table 1.
Original magnification is $\times 500$.

Table 2. Polymorphism in two amplified fragments of cpDNA digested by fifteen restriction enzymes.

Restriction enzymes	Amplified fragments	
	<i>rbcL</i> -ORF106	<i>trnK</i>
<i>Ava</i> I	×	×
<i>Bgl</i> I	×	×
<i>Dra</i> I	×	○
<i>Hha</i> I	×	×
<i>Hind</i> III	×	×
<i>Hinf</i> I	×	△
<i>Kpn</i> I	×	×
<i>Mob</i> II	-	△
<i>Msp</i> I	×	×
<i>Pst</i> I	×	×
<i>ScrF</i> I	×	○
<i>Sty</i> I	×	×
<i>Taq</i> I	×	-
<i>Xba</i> I	×	×
<i>Xho</i> I	×	×

×; No polymorphism exists.

○; clear cut polymorphism exists.

△; polymorphism unclear.

-; Not tested.

の数は系統によって53枚から9枚と大きく異なった。

自然日長下での全系統の開花日を平均すると、調査した3年間で約2週間異なった。全系統の年ごとの平均開花日より1週間以上早く開花する早生系統および1週間以上遅く咲く晩生系統がみられ、これらの早晩の傾向は毎年ほぼ安定していた。また開花の早晩性と採取地との特別の関係は認められなかった。

3. 染色体数

自生地から採取された株はすべて36本の染色体を持っていた。キク属の染色体数の基本数が9であることより、これらは四倍体であると考えられた。一方、前節で述べた大型の3系統はすべて72本であった(第4図)。これら大

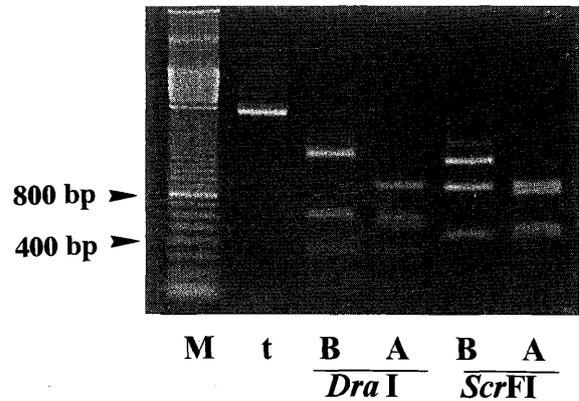


Fig. 5. RFLP patterns of specific PCR-amplified *trnK* gene of *D. yoshinaganthum* chloroplast DNA.
M; molecular size marker, 100bp ladder (Pharmacia Biotech). t; PCR-amplified 2.5 Kbp of *trnK* gene. Two types of RFLPs (A and B pattern, see Table 1) were obtained by digestion with both *Dra*I and *Scr*FI.

型系統と野生系統の葉を用いたフローサイトメーターによる核DNA量の相対的な量の比較の結果、大型系統が野生系統のほぼ2倍の値を示した(データ省略)。先に述べた気孔および葉の形態、根端分裂組織の染色体数およびフローサイトメーターの結果を総合して、大型系統は $2n=72$ の八倍体、すなわち倍加個体と判断された。

4. 葉緑体DNAのPCR-RFLP

用いた36系統のナカガワノギクの全DNAからは、*rbcL*-ORF106、*trnK*領域ともに予想されたサイズのバンド(約3.2 kbp, 2.5 kbp)がPCRで増幅された。*rbcL*-ORF106領域のPCR産物は第2表に示した15種類いずれの制限酵素で処理しても多型は観察されなかった。一方、*trnK*領域では*Dra*I、*Scr*FIで処理すると明確な多型が、*Hinf*I、*Mbo*IIにおいてはやや不鮮明な多型が得られたが、他の制限酵素では多型は観察されなかった。

*trnK*領域を*Dra*Iで処理すると1400 bp付近にもっとも大きなサイズのバンドがみられるBタイプと、950 bp付近にもっとも大きなサイズのバンドがみられるAタイプに識別された。*Scr*FIで処理すると、Bタイプでは1300 bp付近にもっとも大きなサイズのバンドがみられたがAタイプではそのバンドはみられなかった(第5図)。この二つの制限酵素処理による多型をもとに、36系統のナカガワノギクをA、Bの2タイプに大別することが可能であった。前節で述べた八倍体の3系統とc地点とe地点から得た3系統(c1, c2, e2)がAタイプで、残りはすべてBタイプとなった。Aタイプの3系統(c1, c2, e2)は、同地点から採取されたBタイプを示す系統と花序や葉の形態的特性に顕著な差はなく、染色体数にも変化はなかった。野生系統の中に多型がみられたので、改めてa, c, e, g, iの5ヶ所からそれぞれ30個体の葉を採取し、再び*trnK*領域について同様のPCR-RFLP分析を行った。なおa, e, jの3ヶ所では、それぞれ1サンプルのDNA純度が低く、残り

Table 3. Distribution of *D. yoshinaganthum* polymorphism.

Collection ^z sites	No. plants tested	No. plants showing pattern ^y	
		A (%)	B (%)
a	35	0 (0)	35 (100)
b	3	0 (0)	3 (100)
c	33	16 (48.5)	17 (51.5)
d	3	0 (0)	3 (100)
e	32	1 (3.1)	31 (96.9)
f	4	0 (0)	4 (100)
g	33	0 (0)	33 (100)
h	3	0 (0)	3 (100)
i	32	0 (0)	32 (100)

^z see Fig. 1, ^y see Fig. 5.

29 サンプルについて PCR-RFLP 解析に供した。その結果、c 地点で新たに採取した 30 個体中 14 個体が A タイプ、残り 16 個体は B タイプであり、その他 4 地点で新たに採取した 117 個体はすべて B タイプであった。この結果を初めに行った a から i の 9 地点での結果と合計すると、分布域の中では比較的上流の C 地点で A タイプが約 50% を占め、そこからかなり下った e 地点でもわずかに A タイプが出現したが、その他の地点ではすべてが B タイプであった (第 3 表)。以上の結果、自生地の特定の場所で葉緑体 DNA の多型が存在することが明らかとなった。

考 察

ナカガワノギクの分布は 1950 年代に調査した Tanaka (1960) の報告とほぼ一致した。しかし、1956 年に長安口ダムが、1961 年には川口ダムが相次いで建設され、多くの河川数が水没し自生地は全体として減少したと考えられる。現在ナカガワノギクの自生はダム湖の岸にはみられないが、両ダムの直下は広い石河原が形成され、そこに多数の自生が確認された。また主な支流では、赤松川の河原にのみナカガワノギクの自生が確認できた。森本ら (1998) は、赤松川とは近接するが、那賀川水系とは異なり太平洋側に注ぐ日和佐川の上流の一部にナカガワノギクが分布していると報告している。これは過去に現在と異なる水系が存在したことによるのか、その他の人為的な影響であるのかは不明である。

Tanaka (1960) は、那賀川におけるナカガワノギクの分布域中の上流域に自生する典型的なナカガワノギクと比較して、分布域中の中流、下流域には形態の異なる二つのグループの個体が散在する事を報告している。これらの個体群は核型分析により中流、下流域のシマカンギクとの自然交雑種であろうとしている。北村 (1983) もナカガワノギクとシマカンギクとの自然雑種を認め、ワジキギク [*D. cuneifolium* (Kitam.) Kitam. syn. *C. cuneifolium* Kitam.] の学名を与えている。さらに Akasawa (1988) は、

ナカガワノギクとワジキギクの交雑と考えられる個体群の存在を報告している。しかしナカガワノギクの葉の形態は多様で連続的に変化しており、葉型のみから種を細かく分けるのは適当ではないと考えられる。本調査での採取地点を Tanaka (1960) の分布図と比較すると同報告にある典型的なナカガワノギクの分布域にほぼ相当する。なお本調査では河原の中のみを対象としたためシマカンギクは確認されなかった。また現在も驚敷町氷柱観音付近の山側ではシマカンギクが存在し自然交雑種が確認できたとされる (小川私信) が、今回の調査では確認できなかった。

現在的那賀川の流域には多くの民家が存在し栽培ギクが庭先で多数栽培されており、これら栽培ギクによる遺伝的汚染も徐々に進んでいる可能性がある。本調査で確認されたさじ弁という形質は栽培ギクの影響をうかがわせるものである。これまでナカガワノギクの中に栽培ギクとの交雑と考えられる個体の存在が、断片的に私的な資料として報告されているが、まとまった学術的調査資料はない。このさじ弁個体は、開花期の現地調査中に発見し供試材料に加えたものであるが、自生地におけるさじ弁の出現頻度は極めて低いものと考えられた。この個体は、舌状花弁の下部より約 1/2 が筒状となるさじ弁形質が毎年安定して現れるが、花以外は形態的に他系統と変わりなく、染色体数の上では明確な変化を捉えられなかった。中田 (1989, 1999) は、ワカサハマギクの調査で五倍体、七倍体およびその異数体を見出し、これらは四倍体のワカサハマギクと六倍体をモードとする栽培ギクとの交雑種であろうとした。四倍体のナカガワノギクにおいても栽培ギクとの交雑が頻繁に起こっているのであれば、明らかに染色体数が異なる個体が出現していることが予想される。以上の結果より、このさじ弁の出現は、種内変異によるものか、もしくは栽培ギクとの交雑後何度もナカガワノギクと戻し交雑され、形態的にも染色体数にも差がみられなくなったもののいずれかであると考えられる。その他のキクにおいて、イソギク、シオギクと栽培ギクとの交雑種の存在は古く、江戸時代に出版された草木図説 (1862) ほかに記載が見られるとされる (北村, 1983)。中田・竹内 (1998) はサンインギクについて自生地の集団の形態的変異、花色、染色体数などから栽培ギクによる遺伝的汚染を指摘している。著者ら (Fukai ら, 2000a) も、野生ギクは容易に栽培ギクと交雑することを確認しており、遺伝的汚染に関する早急な調査と対策が必要である。

本研究で調査したナカガワノギクの系統の中だけでも、葉および花序などの形態にかなりの変異がみられ、ある程度の早晩性の存在が認められた。野生ギクと栽培ギクを交雑した場合、栽培ギクの早晩性のみならず、用いた野生ギクの早晩性もまた後代に影響することが明らかとなり (Fukai ら, 2000b)、ナカガワノギクの種内における早生系統は育種素材として有用である。またナカガワノギクは、秋ギクと同様に夏の高温を経た後に低夜温下で開花

しにくくなる性質がみられ(深井ら, 1997), 育種素材として利用する際に考慮する必要がある。

葉緑体 DNA の PCR-RFLP 法または RFLP 法による類縁関係の議論は, 園芸植物だけに限っても数多くの植物群で報告されている (Isshiki ら, 1998; Kanzaki ら, 1998; Rahman ら, 1997; Raina・Ogihara, 1994; Yamamoto・Kobayashi, 1996; Yonemori ら, 1996)。これらの議論は被子植物における葉緑体 DNA の母系遺伝を前提とするが, 一部には父系の関与を示す報告もある (Cipriani ら, 1995; Ureshino ら, 1999)。本研究で結果を議論するにあたり, 著者ら (Fukai ら, 2000a) により作出されたアズリノジギク, コハマギク, イソギク, サツマノギクと栽培ギクの正逆交雑の F_1 個体について本研究と同様の葉緑体 DNA の PCR-RFLP 解析を試みた。その結果, 全ての実生が子房親と同一の多型を示した (データ省略)。このことからキク属の葉緑体 DNA は母系遺伝と考え, 以下の議論を進める。

本研究で検討した *rbcL*-ORF106 領域は, いくつかの植物群で同じ科内の植物種間で多型が得られ, それに基づいた系統類縁関係の議論がなされている (Isshiki ら, 1998; Rahman ら, 1997; Yonemori ら, 1996)。一方, *trnK* 領域は大きなイントロンを含み変異に富んでいることが報告されている (Tsumura ら, 1995)。岸本ら (1997) はキク属野生種ならびに栽培ギクの葉緑体 DNA の PCR-RFLP 解析を行い, 本研究で認められた *trnK* 領域を *Dra*I, *Scr*FI で処理して得られた多型を含む複数の多型を報告している。彼らの一連の研究 (Kishimoto ら, 1998; 岸本ら, 1998, 1999; 岸本, 2000) で, 本研究で示したところの A タイプがごく一部の懸崖ギクおよび盆栽ギクを除く栽培ギクで広く認められること, 一方, 他の野生ギクでは B タイプが広く確認されること, さらに A タイプはナカガワノギク以外ではリュウノウギク, ノジギク, アズリノジギク, シオギク, イソギクのごく一部の個体で認められたが, 中国産のキクには認められなかったことを報告している。以上のことより, 本研究で一部に認められたナカガワノギクの A タイプの存在は, 一つには栽培ギクの遺伝的汚染によるものか, 他方には A タイプがわが国の野生ギクの中にもともと存在していたものかの二つの可能性を示唆している。上述のようにキクの葉緑体 DNA が母系遺伝であることを前提とするなら, この A タイプの存在を栽培ギクによる汚染に帰するためには, ナカガワノギクの集団に栽培ギク種子が偶然混入し何代かの交雑を経て形態的にも染色体数もナカガワノギクと区別がつかなくなったと説明することになるが, この可能性は必ずしも高くはないと考えられる。一方, ナカガワノギクの成立に関与するとされるリュウノウギク (田中・下斗米, 1978) の一部の個体にも A タイプが認められた (岸本ら, 1998) ことは, この A パターンがもともとわが国の野生ギクの一部に存在するという考えを支持している。なお本研究で A タイプが認めら

れた c 地点は, Tanaka (1960) が報告したシマカンギクとの交雑が見られる地点からは遠く離れており, さらにシマカンギクがキクタニギク由来であるとされる (田中・下斗米, 1978) ことから, この A タイプの存在にシマカンギクが関与したとは考えにくい。なぜ特定の場所のみで A タイプが 50% という高い頻度で出現するのかは不明であり, 今後更に細かく c 地点付近の調査をする必要がある。本報告のように限られた自生地をもつ種内で葉緑体 DNA の多型が得られた報告はなく, さらに同じ属内に同様な多型が種横断的にみられることはキク属の成立を考える上で新たな視点を提供していると考えられる。また本研究の結果は, 他の種においてもある程度の規模で調査を行えば, 自生地の集団内に葉緑体 DNA の多型の存在が見つかる可能性を示している。著者らは, 四国に自生する他の種においても同様の調査を進めつつあり, 今後より多くの野生ギクの葉緑体 DNA 多型に関する調査結果の蓄積を待って, 栽培ギクの起源も含めたキク属植物の系統類縁関係を議論する必要がある。

本研究で扱われた系統の内, 大型の草姿を示す個体は八倍体であった。Tanaka (1960) は, 自生地での系統の染色体を詳しく報告しているが, 八倍体の存在を認めていない。また, 本研究でも自生地から採取された系統からは八倍体はみられなかった。本研究で認められた八倍体はいずれも公設機関の保存系統で, その由来は不明である。これは, 何かの原因で倍加した個体が出現し, それが旺盛な生育と美しい草姿を備えていることから保存個体として選ばれた可能性がある。八倍体の系統が葉緑体 DNA の多型において A タイプである原因は, この元となった四倍体ナカガワノギクが偶然に A タイプあったと考えるのが現在のところ妥当な解釈と考えられる。なお結果では述べていないが, 四倍体と八倍体の正逆交雑を試みると, 四倍体×四倍体, 四倍体×八倍体, 八倍体×四倍体の組合せでは交配後柱頭の短縮がみられた。四倍体×四倍体ではすべての組み合わせで発芽力ある種子が得られ, 四倍体×八倍体, 八倍体×四倍体の組合せでは数は少ないが発芽力ある種子が得られた。一方, 八倍体×八倍体では受粉後の柱頭の短縮は観察されず, 発芽力のある種子も得られなかった。著者らは四倍体ナカガワノギクの人為的倍加も含め更に詳しくこの問題に関して検討を続けており, 別の機会に報告する。なお著者らの以前の研究 (Fukai ら, 1998, 2000a, 2000b, 2000c; Zhang ら, 1998) で用いたナカガワノギクの染色体数は従来の報告 (Tanaka, 1960; 中田ら, 1987) にある $2n=36$ ではなく, 第 1 表の j3 にあたる八倍体ナカガワノギクであったことを記し正式の訂正としたい。

以上のことより, ナカガワノギクの現存個体群の中には, 葉および花序などの形態にかなりの変異がみられ, 開花時期にも早晩性が存在すること, また葉緑体 DNA レベルで少なくとも異なる二つのグループが存在することが

明らかとなった。これらのことは、今後、本種を栽培ギクの遺伝資源として活用するに際し重要な情報となる。

摘 要

徳島県那賀川流域にのみ自生する *Dendranthema* 属植物の1種であるナカガワノギクの分布、形態の変異および葉緑体 DNA の変異について調査した。

1. 自生地での分布は Tanaka (1960) の報告とほぼ一致した。調査された 36 系統には、葉および花序の形態に大きな変異があり、開花期の早晩性も認められた。

2. 特に大型の草姿をした 3 系統は、気孔の形態、根端分裂組織の染色体数、フローサイトメーターによる核 DNA 量の相対値などから $2n=72$ の八倍体であることが明らかとなった。

3. 葉緑体 DNA を PCR で増幅したところ、*trnK* 領域で多型を示す二つの集団が自生地の中にみられた。

謝 辞 本研究をまとめるにあたり、農林水産省野菜・茶業試験場(現独立行政法人農業研究技術機構花き研究所)岸本早苗氏、柴田道夫氏、徳島県立博物館小川 誠氏に貴重な助言を賜った。記して感謝の意を表す。

引用文献

- Akasawa, Y. 1988. Four new natural hybrids of *Dendranthema cuneifolium* (Compositae, Sympetalae). *Naturalists* 2: 1-4.
- Arnold, M., S. M. Buckner and J. J. Robinson. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana irises*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1398-1402.
- Cipriani, G., R. Testolin and M. Morgante. 1995. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments. *Mol. Gen. Genet.* 247: 693-697.
- Douzono, M. and H. Ikeda. 1998. All year round productivity of F_1 and BC_1 progenies between *Dendranthema grandiflorum* and *D. shiwogiku*. *Acta Hort.* 454: 303-310.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19: 11-15.
- Fukai, S., T. Nagira and M. Goi. 2000a. Cross compatibility between chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) and *Dendranthema* species native to Japan. *Acta Hort.* 508: 337-340.
- Fukai, S., T. Nagira and M. Goi. 2000b. Characteristics of F_1 progenies between chrysanthemum and *Dendranthema* species. *Acta Hort.* 541: 1-5.
- Fukai, S., W. Zhang and M. Goi. 1998. Some *Dendranthema* species native to Japan. *Acta Hort.* 454: 85-90.

- Fukai, S., W. Zhang and M. Goi. 2000c. Effect of photoperiod and temperature on flowering in some *Dendranthema* species native to Japan. *Acta Hort.* 515: 167-171.
- 深井誠一・張 偉・五井正憲・竹内英雄. 1997. 数種の野生ギクの短日処理条件下での開花反応. 園学雑. 66(別2): 562-563.
- Isshiki, S., T. Uchiyama, Y. Tashiro and S. Miyazaki. 1998. RFLP analysis of PCR amplified of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Euphytica* 102: 295-299.
- Kanzaki, S., K. Yonemori, A. Sugiura and S. Subhadra-bandhu. 1998. Phylogenetic relationship of the common durian (*Durio zibethinus* Murray) to other edible fruits *Durio* spp. by RFLP analysis of an amplified cpDNA. *J. Hort. Sci. Biotech.* 73: 317-321.
- 岸本早苗. 2000. 葉緑体遺伝子から見た栽培ギクの起原. 園学雑. 69(別2): 78-79.
- 岸本早苗・柴田道夫・間竜太郎. 1997. キク属植物における葉緑体 DNA 遺伝子の PCR-RFLP 分析. 園学雑. 66(別2): 484-485.
- Kishimoto, S., M. Shibata and R. Aida. 1998. PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA genes in *Dendranthema*. 2. Further investigation of polymorphisms in chrysanthemum cultivars. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67 (Suppl.1): 228.
- 岸本早苗・柴田道夫・間竜太郎. 1999. キク属植物における葉緑体 DNA 遺伝子の PCR-RFLP 分析. 第4報. 中国栽培種およびシヤスターデージーの解析. 園学雑. 68(別2): 365.
- 岸本早苗・柴田道夫・間竜太郎・谷口研至. 1998. キク属植物における葉緑体 DNA 遺伝子の PCR-RFLP 分析. 第3報. 中国産野生種および日本産野生種の解析. 園学雑. 67(別2): 366.
- 北村四郎. 1983. 日本の野生ギク. *新花卉.* 119: 54-59.
- Mishiba, K., T. Ando, M. Mii, T. Watanabe, H. Kokubun, G. Hashimoto and E. Marches. 2000. Nuclear DNA content as an index character discrimination taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann. Bot.* 85: 665-673.
- 森本康滋・鎌田磨人・友成孟宏・西浦宏明・井内久利・石井愷義. 1998. 日和佐町の植生とナカガワノギクの分布. 阿波学会紀要. 43: 21-41.
- 中田政司. 1989. $2n=62$ の染色体をもつワカサハマギクとキク(栽培菊)との推定自然雑種. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B.* 15: 143-149.
- 中田政司. 1999. ワカサハマギクの自生地とその現状. 富山中央植物園研報. 4: 47-58.
- 中田政司・竹内 基. 1998. 氷見市大境産サンインギク個体

- 群の変異. 富山中央植物園研報. 3: 1-16.
- 中田政司・田中隆荘・谷口研至・下斗米直昌. 1987. 日本産キク属の種:細胞学および細胞遺伝学から見たその実体. *Acta Phytotax Geobot.* 38: 241-259.
- Rahman, M. S. M., M. Yamada and M. Yoshida. 1997. Relationship of *Annona* species as revealed by PCR-RFLP analysis. *Breed. Sci.* 47: 335-339.
- Raina, S. N. and Y. Ogihara. 1994. Chloroplast DNA diversity in *Vicia faba* and its close wild relatives: implication for reassessment. *Theor. Appl. Genet.* 88: 261-266.
- 柴田道夫. 1995. キクの原産地と野生種. P.9-15. 農業技術体系花卉編 6 クリサンセマム. 農文協. 東京.
- 柴田道夫・川田穰一・天野正之・亀野 貞・山岸 博・豊田努・山口 隆・沖村 誠・宇田昌義. 1988. イソギク (*Chrysanthemum pacificum* Nakai) とスプレーギク (*C. morifolium* Ramat.) との種間交雑による小輪系スプレーギク品種 'ムーンライト' の育成経過とその特性. 野菜試報 A. 2: 257-277.
- Tanaka, R. 1960. On the speciation and karyotypes in diploid and tetraploid species of *Chrysanthemum*. V. *Chrysanthemum yoshinaganthum* (2n=36). *Cytologia* 25: 43-58.
- 田中隆荘・下斗米直昌. 1978. 日本産野生菊の種類. 植物と自然. 12: 6-11.
- Tsumura, Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K. Ohba. 1995. Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1222-1236.
- Ureshino, K., I. Miyajima, Y. Ozaki, N. Kobayashi, A. Michishita and M. Akabane. 1999. Appearance of albino seedlings and pt DNA inheritance in interspecific hybrids of azalea. *Euphytica* 110: 61-66.
- Yamamoto, M. and S. Kobayashi. 1996. Polymorphism of chloroplast DNA in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65: 291-296.
- Yonemori, K., D. E. Parfitt, S. Kazaki, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhadrabandhu. 1996. RFLP analysis of an amplified region of cpDNA for phylogeny of the genus *Diospyros*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64: 771-777.
- Zhang, W., S. Fukai and M. Goi. 1998. Morphology of capitulum initiation and floret development of *Dendranthema* species native to Japan. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 347-351.