静岡県沼津市戸田の自生タチバナ群落の多様性解析とその維持機構の推定

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	清水,徳朗 長倉,建治 奥田,薫樹 稲木,博文 奥田,勇 遠藤,重由
発行元	園芸学会
巻/号	19巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 141-149
発行年月	2020年4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

AgriKnowledge

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 19 (2) : 141–149. 2020.
doi: 10.2503/hrj.19.141

原　著

静岡県沼津市戸田の自生タチバナ群落の多様性解析とその維持機構の推定

清水徳朗[1]*・長倉建治[2,3]・奥田薫樹[2,3]・稲木博文[3]・奥田　勇[3,4]・遠藤重由[5]

[1]農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶研究部門カンキツ研究領域　422-8092　静岡市清水区
[2]戸田森林組合　410-3402　静岡県沼津市戸田
[3]戸田タチバナの会　410-3402　静岡県沼津市戸田
[4]井田神社総代　410-3401　静岡県沼津市井田
[5]沼津市役所　410-8601　静岡県沼津市御幸町

Evaluation of Genetic Diversity in Wild Tachibana Population of Heda, Shizuoka, Using DNA Marker Analysis, and Stable Maintenance of the Population

Tokurou Shimizu[1]*, Kenji Nagakura[2,3], Masaki Okuda[2,3], Hirofumi Inagi[3], Isamu Okuda[3,4] and Shigeyoshi Endo[5]

[1]Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO, Shimizu, Shizuoka 424-0292
[2]Heda Forestry Cooperative, Numazu, Shizuoka 410-3402
[3]Heda Tachibana Club, Numazu, Shizuoka 410-3402
[4]Ida Shrine, Numazu, Shizuoka 410-3401
[5]Numazu City Hall, Numazu, Shizuoka 410-8601

Abstract

Tachibana (*Citrus tachibana* (Makino) Tanaka) is a citrus species indigenous to Japan. It has been known since before the Nara period (~800 AD), and several wild populations are present in forests along the Pacific coast, from Tokai to Kyushu Island. Although tachibana was previously regarded as consisting of a single genotype, recent research with DNA markers suggested there are at least three different genotypes. Previous work was carried out across different wild populations, but little is known about the genetic diversity within each population, or among populations. In this study, wild tachibana trees of a population in Heda, Shizuoka (n = 64; 24 in Ida area and 40 in Kamiya area) were sampled to explore the population's genetic diversity and promote utilization and conservation. Using DNA marker analysis for both nuclear and organelle genomes, we confirmed that, in total, 60 plants (22 in Ida and 38 in Kamiya) had a tachibana-A strain genotype. Four unidentified citrus plants in the sample were genotyped as Natsudaidai (*C. natsudaidai* Hayata). No selfed or hybrid offspring were found in either area. The observations suggest that it may be difficult to obtain hybrids from tachibana-A as seed parents, and another DNA marker analysis of open-pollinated seeds showed similar results. The survey revealed several young tachibana trees in the population, and we suggest that vegetative propagation by polyembryonic seeds may facilitate asexual maintenance of this tachibana population.

Key Words：Citrus, DNA marker, genetic diversity, nucellar seedling, plant population

キーワード：DNA マーカー，群落，遺伝的多様性，カンキツ，珠心胚実生

緒　言

タチバナ（橘）は古くから日本国内に存在したカンキツ種の一つで，葉腋に5 mmほどの棘を有し，果実は横径3 cm程度で種子は多胚である．果実は11月頃から着色を開始し，果皮，果肉ともに橙色を呈する．果皮は薄く，比較的なめらかであるが，着色開始と並行して浮皮が進行し，年末にはほぼすべての果実が浮皮となるため，剥皮は容易である．花は甘く強い芳香を持ち，葉にも他の寛皮性カンキツにはみられない香気が感じられる（吉武，2008）．果実も好ましい芳香を備えているが，果肉は酸含量が高く，多くの種子を含み，可食部が少ないため経済栽培は行われていない．国内では静岡県東部から愛知県，三重県，高知県，愛媛県，宮崎県の温暖な太平洋岸沿いの急傾斜地に野生タチバナの自生地が知られており，沼津市戸田に自生するタチバナは，現在国内に存在するタチバナの北限として知られている．しかしタチバナは個体数の減少や生育条件の悪化などが懸念され，環境省レッドリストでは存続基盤が脆弱で生育条件の変化によっては絶滅危惧に移行する可能性のある「準絶滅危惧（NT）」に分類されている（環境省，2019）．

Tanaka（1954）やSwingle（1967）は，タチバナを古くから日本に自生する寛皮性カンキツの1つとみなし，*Citrus*

2019年7月23日　受付．2019年9月26日　受理．
* Corresponding author. E-mail: tshimizu@affrc.go.jp

tachibana（Makino）Tanakaの学名を付与した．日本書紀に記述のある，田道間守が西暦70年に常世国から持ち帰ったとされる「非時香菓（ときじくのかぐのこのみ）」がタチバナであるとされており，延喜式（927年）には駿河国や相模国から「橘皮」が朝廷に献上されたとの記述もある．一方，牧野（1955）や田中（1926）らは，田道間守が持ち帰ってきたものはキシュウミカンもしくはダイダイであったとする説を唱えている．このように，タチバナは古くから知られていたにもかかわらず，「常世国」から持ち帰ったとされる時期やその後の国内の伝達過程だけでなく，そもそもタチバナがどこからもたらされてきたのかという根源的な問いは現在も解決を得ておらず，多くは特性の記述にとどまってきた．

井手ら（1989）は1987年から1988年にかけて日本国内の野生果樹自生地の分布状況に関する包括的な調査を実施し，この中で日本各地のタチバナについても詳しく取り上げた．この調査の過程で，Hiraiら（1990）は静岡県伊豆半島から宮崎県の南部までの19地点でタチバナ遺伝資源113点を収集し，アイソザイム分析からそれらが4つのアイソタイプに分類されることを示し，さらに高知県土佐清水と宮崎県石波海岸の2地点ではタチバナ群落内に2つのアイソタイプが存在することを報告した．この研究は，それまでの形態的特徴に基づく品種同定から分子マーカーに基づくタチバナ同定への端緒となったが，当時分析に使用されたアイソザイムは3つのみで，4つのアイソタイプ間の関係性や群落内の多様性は不明であった．

タチバナを含む，現在知られているカンキツ種が多様性を拡大した過程の詳細は長らく不明であったが，清水らは高精度DNAマーカー解析に基づき，キシュウミカン，タチバナ，ユズ，コウジ，ダイダイやクネンボなどの少数の基幹品種が交配を繰り返していくことで徐々に多様化したことを具体的に示した（Shimizuら，2016b，2019）．また，国内のタチバナには3つの遺伝的に異なる系統（タチバナ-A，タチバナ-B，タチバナ-C）が存在することを報告するとともに，核ゲノムと細胞質ゲノムの比較から，これら3つの系統は親が共通の同祖系統である可能性も示唆した（Shimizuら，2016b）．さらに，各系統の後代品種として花柚（ハナユ，*C. hanayu* Sieb. ex Shirai；ユズ×タチバナ-A），ギリミカン（*C. tardiva* hort. ex Shirai；不明品種×タチバナ-B），ヒュウガナツ（*C. tamurana* hort. ex Tanaka；不明品種×タチバナ-B），オウゴンカン（*C.* spp.；不明品種×タチバナ-C）を見いだし，タチバナがカンキツ在来種の遺伝的多様性に重要な役割を果たしてきたことがはじめて確認された．

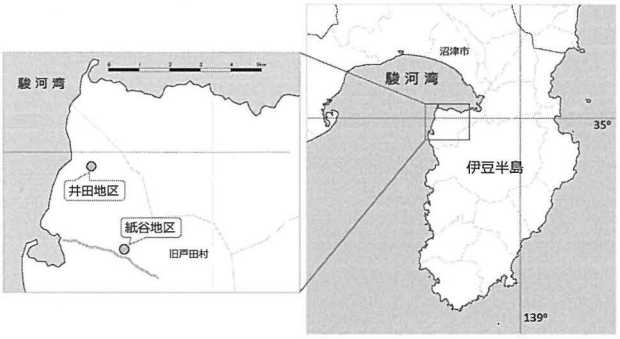
このような研究とは別に，カンキツ在来品種のゲノム解析と品種間多型の相同性に基づく進化論的研究から，カンキツ類は今から約900万年前の中新世後期に現在のカンキツ属の祖先植物がカラタチ属と分化し，その後800万～600万年前にかけて現在のカンキツ栽培品種の祖先種を含む10種が分化したと推定されている（Wuら，2018）．そのうち，マンダリンとシトロン，ブンタンの3つを主な基本祖先種として，それらが交雑を繰り返すことで多くの栽培種が生み出されたとされる（Wuら，2018）．祖先種となったマンダリンはブンタン祖先種と交雑することでブンタンのゲノムが徐々に移入され，それがマンダリンやブンタンとさらに交雑を繰り返すことでポンカンやスイートオレンジ，クネンボ，ウンシュウミカン，グレープフルーツやクレメンティンなどの主要な栽培種が生み出されたと考えられている．ゲノムレベルの解析から，タチバナは，ブンタンなど他の祖先種に由来するゲノムをほとんど含まない，現在残っている最も起源の古いマンダリンの1種とされた（Wuら，2018）．一方，Tanaka（1931）は台湾の山岳地帯にも野生タチバナが存在することを報告しているが，これが日本のタチバナと同一であるかどうかは確認されておらず，現在知られている3系統のタチバナとの関連も不明である．祖先種の1つとしてのタチバナの遺伝的多様性を解明することは，日本国内へのタチバナとカンキツの伝来過程やタチバナ系統とカンキツ類の多様性拡大の過程を考察するための重要な知見となる．さらに，国内のタチバナ自生地には未同定のタチバナ系統やその後代個体が残されている可能性もある．

国内の自生地のうち，日本最北部に存在する静岡県戸田村（当時）のタチバナについて，井手ら（1989）は現地の山林は溶岩のために植林に適さず，主に30～40年の周期でクヌギ薪炭林として利用されてきたこと，その際にタチバナも良質な炭材として他の樹と同様に伐採・再生させていたと報告している．関係者への聞き取りから，同地は第二次世界大戦までは人為的な伐採を受けつつもその後は伐採などは行われていないことから，自生のタチバナが長期間に渡り個体と群落を維持してきた機構を推定することで，国内のタチバナの多様性や伝搬を理解するだけでなく，今後現地の保全を図るうえでも多くの示唆が得られるものと期待される．そこで本研究では，Hiraiら（1990）が調査したタチバナ自生地のうち，静岡県沼津市の2か所に自生するタチバナに注目し，自生地内の全個体を対象に高精度DNAマーカー分析を実施し，遺伝的多様性の把握と自生地内での群落の維持機構，および，戸田にタチバナがもたらされた経緯を考察することを目的とした．

材料および方法

1. 植物材料

本研究では，静岡県沼津市戸田（旧戸田村）の2か所のタチバナ自生地（紙谷地区および井田地区，第1図）において維持されているタチバナ樹を対象とした．現地の状況を確認するため，まず2012年12月13日に紙谷地区を，また2017年6月30日に井田地区をそれぞれ予備調査して対象樹の植生場所と樹高，樹勢を調査した．確認できた樹は主幹をテープで標識した．分析用の試料採取は2017年7



第1図 静岡県沼津市戸田のタチバナ自生地

月31日と2017年12月7日の2回に分けて行った．2017年7月31日の試料採取では予備調査の情報をもとに個体を確認し，春枝に着生している健全な生葉を採取して分析試料として持ち帰った．2017年12月7日の試料採取では，初回の調査で見落とされていたものを追加採取して初回と同様に生葉を採取するとともに，着生果実を一部採取してその重量を計測した．採取した生葉はShimizuら（2016a）の方法に従い100 mgを凍結して振盪破砕し，0.1%ポリビニルピロリドンを含む50 mMトリス緩衝液（pH 8.0）で数回洗浄後，Nucleon Phytopureキット（GEヘルスケアジャパン(株)）でDNAを抽出した．得られたDNAはリボヌクレアーゼ処理でRNAを分解後，フェノール・クロロホルム抽出し，DNAをエタノール沈殿で回収した．得られたDNAは少量の1×TE 0.2（10 mMトリス塩酸緩衝液，0.2 mM EDTA，pH 8.0）溶液に溶解し，Qubitアッセイ（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）で定量して一定濃度に調整した．

2. Simple sequence repeat（SSR）マーカー遺伝子型分析

核ゲノムの遺伝子型分析には，Shimizuら（2016b）が報告したカンキツのSSRマーカーから，判別性が高く，かつ複数の既知の親子品種間で遺伝子型に矛盾がないもののうち，タチバナでヘテロ遺伝子型となるものを中心に76マーカーを選定した（第1表）．核ゲノムのSSRマーカー分析は，Shimizu・Yano（2011）およびShimizuら（2016b）の方法に従い，5 ngの全DNAをPCR増幅し，その後barcoded split tag（BStag）を用いる蛍光マルチプレックスポストラベル法で4マーカーずつ同時に蛍光標識した．蛍光標識後，反応液を2倍希釈してGeneScan 600LIZ（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）を添加し，ホルムアミドで95°C，4分間加熱変性後，DNAシーケンサ（ABI 3130xl，POP-7，36 cmキャピラリ，サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）で泳動した．細胞質の遺伝子型分析には，Shimizuら（2016b）が報告した葉緑体ゲノム用SSRマーカー8種，およびミトコンドリアゲノム用SSRマーカー3種（第2表）を使用し，核ゲノムの遺伝子型分析と同様の方法で分析した．

第2表 解析に供試したオルガネラSSRマーカー

葉緑体ゲノムSSRマーカー	CSS03	ccmp 2.2
	CSS04	ccmp 6.2
	CSL01	ccmp 7.2
	CSL09	ccmp 10.2
ミトコンドリアゲノムSSRマーカー	*rrn5*/*rrn*18-1	
	*nad*2/4-3	
	*nad*7/1-2	

3. 遺伝子型データ解析

核およびオルガネラゲノムの遺伝子型解析にはGeneMapper 4.0（サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)）を使用し，泳動結果をサイズコール後，各マーカー，サンプルのアリルをコールした．分析対照には，農研機構果樹茶部門カンキツ研究領域内で保存している，遺

第1表 解析に供試したSSRマーカー

CiBE0246.1	CTVR01.1	CUBER410.1	CUBER918.1	CUBER925.1
CX2004.2[z]	CX3005.1	CX5019.3	CX6037.3	F02.2
GRW3011.1	GSR10S17.1	GSR10S29.1	GSR3121.1	GSR3136.1
GSR6101.1	GSR6133.1	NSX118.1	NSX121.1[z]	NSX132.1[z]
NSX145.1	NSX153.1	NSX156.1[z]	NSX161.1	NSX165.1
NSX187.1	NSX82.1	SRPE02.1	SRPE05.1	SSR07A05.3[z]
SSR07A07.2	SSR07A20.1	SSR07A21.3	SSR07A24.3[z]	SSR07B05.1
SSR08A06.2	SSR08A07.2	SSR08A09.2[z]	SSR08A14.2	SSR08A16.2[z]
SSR08B05.2	SSR08B15.2[z]	SSR08B21.2[z]	SSR08B25.2[z]	SSR08B29.2[z]
SSR08B31.2[z]	SSR08B40.2[z]	SSR08B54.2	SSR08B60.1	SSR08B64.1
SSR08B78.1	SSR08B82.1[z]	SSR08B85.2	SSR08B88.2	SSR08B92.2
SSR08C05.1	SSR11A06.1[z]	SSR11A27.1[z]	TSGR264.1	TSGR265.1
TSR8EM24.2[z]	TSRA101.1[z]	TSRA107.1	TSRB09.2[z]	TSRB11.2[z]
TSRB39.2	TSRF101.1	TSRF157.1	TSRF162.1	TSRF164.1
TSRF195.1	TSRF211.1	TSRF229.1[z]	TSRF234.1[z]	TSRF237.1
TSRP07.2[z]				

[z] タチバナ-A種子の交雑胚検定に供試したSSRマーカー

第3表　供試した対照品種一覧

品種・系統名	学名	アクセッションID
タチバナ-A	*Citrus tachibana* (Makino) Tanaka	168872
タチバナ-B	*C. tachibana* (Makino) Tanaka	117880
タチバナ-C	*C. tachibana* (Makino) Tanaka	117882
ハナユ	*C. hanaju* Siebold ex Shirai（ユズ×タチバナ-A）	117378
ギリミカン	*C. tardiva* hort. ex Shirai（不明品種×タチバナ-B）	117404
ヒュウガナツ	*C. tamurana* hort. ex Tanaka（不明品種×タチバナ-B）	117317
オウゴンカン	*C.* spp（不明品種×タチバナ-C）	172148

伝子型が既知のタチバナ3系統（タチバナ-A, -Bおよび-C）とその後代品種（ハナユ，ギリミカン，ヒュウガナツ，およびオウゴンカン）を供試した（第3表）．得られた遺伝子型をもとに，同時に分析した対照品種との遺伝子型の一致を確認するとともに，遺伝子型が既知の在来品種101点（Shimizuら，2016b）との同一性を検証した．

4. 自然交雑種子の交雑胚の検証

農研機構果樹茶研究部門カンキツ研究領域（静岡市清水区）に植栽されているタチバナ-A（ID 168872）の放任受粉樹より採取した果実を利用した．胚数の調査には，9月初めに採取した果実から取り出した，十分に成長している未熟種子を20粒供試した．発芽試験には1月に採取した果実から取り出した完全種子を供試した．種子をジフィーセブン（42 mm,（株）サカタのタネ）に置床し，28°C, 16時間明／8時間暗環境下で維持して発芽させた．1か月後に発芽したものの割合を発芽率として求め，発芽種子当たりの新梢数を発芽平均新梢数，および，その長さを新梢長とした．発芽した各新梢は次に示す簡易DNAマーカー分析に供試した．展開した第3葉から約1 mm^2 の葉片をカミソリで切り出し，マイクロチューブに分注した100 μLのCS25混合液（6%（w/v）Chelex-100（Bio-Rad），4%（w/v）Sephadex G-25 Fine（GEヘルスケアジャパン（株））を含む50 mM Tris-HCl, pH 8.0）中に浸した．ペレットペッスル（1.5 mL，サーモフィッシャーサイエンティフィック（株））を用いて室温で手早く葉片を磨砕し，蓋をして10秒間振盪撹拌後，100°C, 5分間加温し，その後氷上に1分間放置した．10秒間再度振盪撹拌し，氷上で5分間静置してから4°Cで10,000×g, 5分間遠心し，上清を新しいチューブに回収してそのうち0.5 μLをSSRマーカー分析に使用した．分析には選抜した24種のSSRマーカー（第1表）を供試し，Shimizuら（2016b）の方法に従い，始めのPCRを38サイクルに変更して行った．

5. データ解析

データ解析にはR（ver. 3.61；https://www.r-project.org/）およびRStudio（Version 1.2.1335；https://www.rstudio.com/）を使用した．グラフ作成にはRのggplot2パッケージを使用し，有意差検定にはggsignifパッケージのwilcox.testを利用した．

結　果

1. 静岡県戸田地区におけるタチバナの自生状況と分析試料の採取

本研究では，静岡県沼津市戸田（2005年4月1日の沼津市との合併前は静岡県戸田村）の紙谷地区（北緯34°58.08.9，東経138°48.08.8，標高125 m）と井田地区（北緯34°59.56.0，東経138°47.04.4，標高29 m）の2か所で採取したタチバナを対象とした（第1図）．紙谷地区の自生地は戸田大川沿いの静岡県道18号線脇から急峻な崖を100～200 mほど登った山林内にあり，現地は火成岩を含む火山灰土壌や溶岩を主体としてクヌギなどの落葉樹が林床を形成する急傾斜地である（第2図）．2012年および2017年の現地調査では，井手ら（1989）の報告と同様の，露出した岩盤付近や傾斜変換線上に分布している37樹を確認した．各樹の生育場所は高木の樹冠下で直達光が乏しく，立地危険のために樹高を調査できなかった1樹を除き，調査時点で樹高が4 m以上のものが20樹認められた（第4表）．一方，群落内には樹高が1 m以下の若木も3樹確認された．2017年8月の再調査では2012年に確認した37樹のうち2樹が枯死していたため対象外とし，それとは別に2樹を新たに確認してラベルを付け，分析用試料を採取した．調査時に樹姿や葉の性状から，タチバナとは異なるカンキツ樹も複数認めたが，これらがタチバナの自然交雑実生である可能性を考慮し，調査対象地域内で確認されたカンキツ樹すべてを採取して以後の解析対象とした．

戸田紙谷地区では，タチバナの穂木採取用として利用されている，自生地で採取した種子に由来する実生樹（樹高約5 m）が同地区内の民家にあり，この樹からも試料を合わせて採取した．さらに2017年12月にも追加の現地調査を行い，その際にラベルのついていない新たなカンキツを3樹確認した．自生地内の落葉樹はほぼ落葉しており，常緑樹の確認は容易であった．これらについても試料を採取し，合計で42点の試料を紙谷地区で採取した．採取時の株元の観察から，これらはいずれも実生であることを確認した．もう1つの自生地である井田地区は，紙谷地区から北西方向に直線距離で約3.6 km離れた井田神社の東側に位置する（第1図）．現地は細かな起伏のある平坦地で，

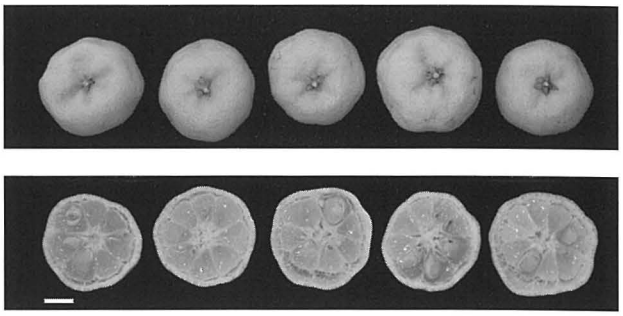


第2図 静岡県沼津市戸田自生地におけるタチバナの生育環境
上：紙谷地区，下：井田地区
調査対象のタチバナ樹を白三角形で示す
バーは約1mに相当

第4表 収集したタチバナ樹の樹高分布

樹高	紙谷地区[z]	井田地区[y]
<1m	3	0
1～2m	3	1
2～4m	11	3
4～6m	16	2
6～8m	3	11
>8m	0	3
未調査	1	0
計樹本数	37	20

[z] 調査時期：2012年12月13日
[y] 調査時期：2017年6月30日



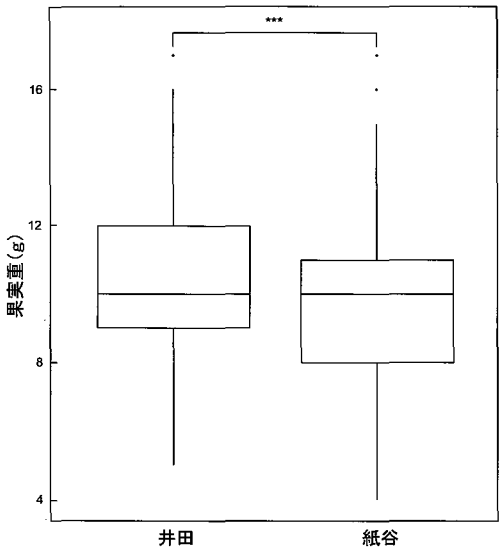
第3図 タチバナ-Aの果実外観と赤道部切断面
農研機構果樹茶研究部門カンキツ研究領域（静岡市清水区）に植栽されているタチバナ-Aの果実
バーは1cmを示す

上部は樹高10m以上の高木が密生し，林床は灌木や草で被覆されている．時期や経緯については不明であるが，Hiraiら（1990）は井田地区のものが人為的に移植されて管理されたものであるとしており，関係者への聞き取りでも同様であった．2017年6月の調査時点で20本のカンキツ樹を確認し，いずれも実生であった．このうち樹高が4m以下のものは計4樹で2m以下の若木も1樹確認されたが，現地は直達光の乏しい低日射量環境のため，樹高が6mを超えるものが14樹と徒長した個体が多かった．2017年7月31日採取時点でも20樹を確認し，すべての個体から試料を採取した．

これとは別に，井田神社前の市道沿いの石垣に沿って人為的に植えられたタチバナの接木樹が5樹確認された．現地関係者への聞き取りから，詳しい経緯は不明であるものの，紙谷地区から持ち込まれたと言われており，2地区間で遺伝子型が共通する個体の有無を確認して人為的な関与の可能性を検証するために，こちらについても合わせて採取した．2017年12月の現地調査の際に，未標識の新たなカンキツ若木を1樹確認し，最終的に計26樹を井田地区で収集した．2017年12月に着果状況についても調査するとともに一部の果実を収集し，紙谷内区では対象とした42点中24点（うち1点は同地区の民家のもの），井田地区で対象とした26点中20点（うち外周の接木樹は4点）で果実の着生を確認し，合計でそれぞれ456点および333点の果実を収集した．果実の形態は農研機構果樹茶研究部門カンキツ研究領域に植栽されているタチバナ-Aのものと同じであったが（第3図），収集した果実の平均重は9.6±2.6g（紙谷地区）と10.6±2.3g（井田地区）で，紙谷地区のものが井田地区のものよりもやや小さい傾向が認められた（第4図）．

2. 遺伝子型の比較解析

紙谷地区で収集した42点，および，井田地区で収集した26点（うち5点が接木樹），計68点の核ゲノム遺伝子型を，76のSSRマーカーで評価した．同時に分析した既知のタチバナ-A，タチバナ-B，タチバナ-Cとの比較から，紙谷地区で収集した39点（2017年12月に追加採取した3点を含む）と，対照として収集した紙谷地区の民家のタチバナ樹1点の計40点はいずれもタチバナ-Aとすべての SSRマーカーで遺伝子型が一致した．これらのオルガネラゲノムの遺伝子型分析結果もタチバナ-Aと同じタチバナ型と完全に一致したことから，これらはすべてタチバナ-Aであると結論づけた（第5表）．井田地区で収集したタチバナのうち，自生地で採取した20点（2017年12月に追



第4図　井田地区および紙谷地区で収集した果実の重量分布
紙谷地区の24樹および井田地区の20樹から収集した456，および333個の果実の重量の分布を示す（2地区の果実の平均重はWilcoxonの順位和検定で0.1%水準で有意差あり）

加採取した1点を含む）と，接木樹から採取した4点の計24点も，核およびオルガネラの遺伝子型がタチバナ-Aのものと完全に一致し，これらのいずれもタチバナ-Aと結論づけた．

収集したサンプルのうち，紙谷地区の2点と井田地区の2点（うち1点は外周の接木樹）は既知の3種のタチバナ（タチバナ-A，タチバナ-B，タチバナ-C）のいずれとも遺伝子型が一致しなかった．これら4点は調査した核およびオルガネラのマーカー遺伝子型が完全に一致し，クローン増殖された同一個体と考えられた．マーカー遺伝子型を報告されている在来カンキツ品種の遺伝子型と比較した結果，ナツミカン（*C. natsudaidai* Hayata）と全マーカーで一致し，オルガネラ遺伝子型もナツミカンのものと同じポメロ型（C04；Shimizuら，2016b）であったことから，これらはナツミカンであると結論された（第5表）．

3. タチバナ-A自然交雑種子の交雑胚の検証

タチバナ-Aを種子親とする交雑胚の出現頻度を推定する目的で，タチバナ-A自然交雑種子の芽生えを対象にSSRマーカー分析を行った．分析には農研機構の傾斜地圃場で保存されているタチバナ-A樹を利用した．供試樹と隣接する他のカンキツ樹はすべてタチバナであり，授粉樹となる可能性のあるナツミカン樹からはおよそ6m離れて，戸田自生地のタチバナの生育状況に近いものとなっている．タチバナ-Aは多胚性を有しており，採取した種子の平均胚数は10.95±2.42（n=20）であった．2019年に播種した完全種子の発芽率は59.3%（N=54），発芽平均新梢数は1.72で，播種後1か月の新梢長は53.2±24.8mmと大きな変異幅を示した．出現した55本の新梢から簡易法で抽出したDNAはDNAマーカー分析で良好な増幅を示し，24種のSSRマーカー分析から，全個体がタチバナ-Aと同じ遺伝子型を示したことから，これらはすべて珠心胚実生と判定された．

考　察

日本国内で発見されたカンキツ在来種の多くは，10世紀以前に日本国内に導入された少数の品種が交雑を繰り返すことで15世紀以降に出現，発見されてきたことが近年具体的に示されてきた（Shimizuら，2019）．タチバナはこのうち最も古い時代から国内に存在したと考えられ，野生状態で自生する複数の群落が長期間に渡って維持されている数少ないカンキツ種の一つである（Hiraiら，1990; 井手ら，1989; 田中，1926）．カンキツ類の多様性拡大過程を理解することは，利用価値の高い新品種の開発や，育種親としての価値の高い品種を特定するなど，在来品種の保全やカンキツ産業への貢献が期待される．国内のタチバナが国内各地に伝搬して定着した経緯の多くは不明だが，タチバ

第5表　収集したタチバナ樹の遺伝子型比較解析結果

収集地	収集個体数	遺伝子型分析結果[z]		
		核遺伝子型[y]	オルガネラ遺伝子型[x]	該当個体数
紙谷地区	実生　42	タチバナ-A	タチバナ（C14）[w]	40
		ナツミカン	ポメロ（C04）	2
	接木樹　0	−	−	0
井田地区	実生　21	タチバナ-A	タチバナ（C14）	20
		ナツミカン	ポメロ（C04）	1
	接木樹　5	タチバナ-A	タチバナ（C14）	4
		ナツミカン	ポメロ（C04）	1

[z] 核およびオルガネラ遺伝子型がShimizuら（2016b）の結果と完全に一致した品種名とオルガネラ遺伝子型を示す
[y] 核遺伝子型分析には第1表に示したDNAマーカーを使用した
[x] オルガネラ遺伝子型分析には第2表に示したDNAマーカーを使用した
[w] 括弧内の記号はShimizuら（2016b）のオルガネラ遺伝子型記号

ナは多くのカンキツ品種と同様に多胚性を有することから，遺伝的に同質なクローンとして維持，伝搬されてきたものとみなされてきたものの，科学的に検証された例は皆無であった．一方，Hirai ら（1990）は国内各地で収集した自生タチバナ系統間にアイソザイム多型を確認し，その後の高精度 DNA マーカーを用いた核およびオルガネラゲノムの多型解析から，国内のタチバナには 3 つの遺伝的に異なる系統が存在し，それらが同一家系由来である可能性も示された（Shimizu ら，2016b）．国内の自生地におけるタチバナの多様性を明らかにし，長期間に渡り群落がどのように維持されているのかを解明することは，各系統の発生と来歴を理解するための重要な知見をもたらすと期待される．

本研究から，静岡県沼津市戸田の 2 か所（紙谷地区，井田地区）に自生するタチバナ群落の全個体の核，およびオルガネラゲノム分析から，各群落内にそれぞれ 2 個体のナツミカン樹が認められたものの，それ以外はすべてタチバナ-A 型の個体であることが確認された．Hirai ら（1990）は紙谷地区，井田地区で収集した 23，および 11 点のタチバナ個体のアイソザイム遺伝子型がすべて同一であったと報告しており，今回得られた結果もその報告と一致した．本研究で収集，分析された個体数は Hirai ら（1990）の分析個体数よりも多いが，これは，本研究では複数回の調査を実施することで自生地内の全個体をほぼ網羅できたことが主な理由と考えられる．一方，群落内には樹高 1 m 以下のタチバナの若木が複数認められたことから，自生地内では珠心胚実生由来の個体が定期的に供給されることで群落内の個体数が維持されてきたことが強く示唆され，Hirai ら（1990）の調査後に新たな実生が発生したことで群落内の個体数が増加したことも理由と考えられた．群落内には花粉稔性の高いナツミカン樹が複数確認されたことから，他殖もしくは自殖由来の個体の存在も期待されたが，複数の SSR マーカー分析から交雑個体は確認されなかった．ナツミカンは 1700 年頃に山口県で発見された偶発実生に由来し（梶浦，2008），静岡県中部地域には 1888 年に，伊豆半島南部には 1893 年に苗木が導入されて生産が開始されている（静岡県柑橘販売農業協同組合連合会，1959）．1936 年の柑橘生産統計では戸田でのナツミカンの栽培面積は 2 反（19.8 a）とあり（静岡県柑橘販売農業協同組合連合会，1959），80 年以上に渡りタチバナとナツミカンが近隣の地区内で栽培されていたと考えられる．しかし今回の調査で交雑個体は確認されなかったことから，タチバナ-A の交雑個体の獲得は容易ではないことが推測された．井手ら（1989）は戸田のタチバナのアイソザイム分析の結果から，この地区のタチバナでは有性的繁殖の割合が低いことを示唆しており，本研究における現地調査結果と実生の DNA マーカー分析の結果からもその推論が裏付けられた．

伊豆地域には古くから野生のタチバナやクネンボ，ダイダイ，アマダイダイ，トウス，相模コウジなどのカンキツ類があまり利用されることなく存在していたとされるが（静岡県柑橘販売農業協同組合連合会，1959），これまでに国内で発生したカンキツ品種の中にタチバナ-A とこれらのカンキツとの交雑品種は確認されていない．ナツミカン樹と隣接するタチバナ-A 樹の自然交雑種子由来の 55 個体の DNA マーカー分析でも交雑個体は検出されなかったことや，これまでに見いだされたタチバナ 3 系統の後代品種（ハナユ，ヒュウガナツ，ギリミカン，オウゴンカン）はすべてタチバナを花粉親としていることから，タチバナを種子親とする交雑胚は珠心胚よりも生育が劣るために交雑個体が認められないのかもしれない．一方で，タチバナのこのような特性は，種子繁殖により同一遺伝子型の個体を長期間に渡り安定して維持するうえで有利に機能してきたと考えられる．Katayama ら（2007）は国内のイワテヤマナシ遺伝資源の DNA マーカー分析から幅広い多様性を観察しており，長期間に渡りクローンとして維持されてきた戸田のタチバナとは対照的である．

翻って，現在戸田で見られるタチバナの自生はいつ頃，どのようにして成立したものであろうか．現在までに同定された 3 系統のタチバナが同祖系統であり，現在沼津市戸田に自生するタチバナが，同地，もしくは近隣地域で未知の親品種の交雑から生まれたものと仮定すると，静岡県東部ないしは東海地方で複数のタチバナ系統が自生することが想定される．しかし今回戸田の 2 地区で確認されたものはすべてタチバナ-A であり，近隣を含め国内ではタチバナの親品種とみなされるものは同定されておらず，またこれまでにタチバナ-A は静岡県と三重県で，タチバナ-B は愛知県，三重県，宮崎県で，タチバナ-C は宮崎県で見いだされている（Shimizu ら，2016b）．井手ら（1989）が報告したように，定期的に伐採される過程でタチバナ-A 以外の系統や交雑実生，親品種が淘汰された可能性は否定できないものの，タチバナ系統の国内の分布から，タチバナ-A は国内の別の場所で生まれ，その後沼津市戸田に伝来した可能性が高いと考えられる．

では，タチバナはどのようにして戸田に到達して群落を形成するに至ったのであろうか．沼津市戸田は伊豆半島の西北部に位置し，伊豆半島は静岡県東部から南に約 50 km にわたって太平洋側に突き出し，海岸部は温暖で降水量，日射量ともに多い（年間降水量 1976 mm，日平均気温 16.6°C，日照時間 2060.8 h；松崎 2008～2018 年アメダス観測値より）．静岡県東部は本州側のアムールプレートとオホーツクプレートが南からのフィリピン海プレートと接触し，伊豆半島はその北端に位置して本州側にゆっくりと移動している（小山，2010）．現在の伊豆地域は今から 2,000 万～1,000 万年前にフィリピン海プレートの海底火山の活動により隆起し始め，その後 200 万～100 万年前に本州側と衝突を開始しつつ火山が出現して陸地を形成し，60 万年前頃に本州から突き出た現在の伊豆半島の原型が形作られたとされる．戸田および井田を含む伊豆半島の北西部で

は，現在の戸田港から修善寺をまたぐ大型火山である達磨山が100万～50万年前の噴火で作られ，それに接するように井田火山，大瀬崎火山が80万～40万年前の噴火で出現した．箱根火山を除くすべての火山は20万年前に活動を停止しており，現在見られる植物群はそれ以降に伝搬または持ち込まれたものとなる．

現時点で紙谷および井田地区以外の近隣地域でタチバナの自生は確認されておらず，なぜこの地域にのみタチバナが生育しているのかという点に疑問が残る．戸田への伝来を考えるうえで，ヒトが持ち込んだ可能性と，動物などヒト以外のものにより持ち込まれた可能性の2つが想定される．前者に関して，戸田にタチバナが持ち込まれた年代を推測する手がかりは今のところ見つかっていないが，紙谷地区のものは時折伐採されることがあったものの野生状態を維持しており，一方で井田地区に現在群生するタチバナは人家に近く，人工的に移植されたものであると考えられている（Hiraiら，1990; 井手ら，1989）．静岡県東部の富士市から沼津市にかけては浅間古墳（4世紀頃）や高尾山古墳（3世紀頃），神明塚古墳（3世紀後半）など数多くの前方後円墳や円墳，定住跡が残されており，伊豆半島の沼津市井田には古墳時代後期（6世紀頃）のものとされる“井田松江古墳群”が知られていることから，少なくとも1,400年前には既にヒトが戸田に定住していたと考えられる．延喜式（927年）第37巻で述べられている典薬の生産地には伊豆国に関する記述はないものの，近隣の駿河國と相模国の産物として「橘皮」が示されており，既に10世紀には静岡県中部から神奈川県に至る地域の特産物としてタチバナまたはその近縁種が朝廷に献上されていたと考えられる．また，江戸時代には駿河国の5つの郡でタチバナの生産が記録されている（静岡県柑橘販売農業協同組合連合会，1959）．伊豆半島北西部では紙谷地区自生地から西北西におよそ1.7 kmほどの山中にある通称「井田峠」にかつてタチバナの古木が生育していた記録が残されており（沼津市教育委員会，2014; 静岡県柑橘販売農業協同組合連合会，1959），また戸田の南部，土肥との境は「タチバナ沢」と呼ばれ（沼津市教育委員会，2014），現在の紙谷，井田地区以外の複数の地域にもかつてタチバナが点在していたことをうかがわせる．これらの知見から，少なくとも10世紀には静岡県の東中部でタチバナが存在し，いつかの時代に伊豆半島に持ち込まれたものの，その多くは消失し，現在では戸田の紙谷地区と井田地区にのみ残るようになったのではないかと推測される．日本国内で接木の技術が広まったのは安土桃山時代以降とされており（梶浦，2008），10世紀頃に戸田に伝来していたのであれば，種子として持ち込まれた可能性が高い．これとは別に，ヒト以外のものが戸田にタチバナを伝搬した可能性も想定され，サルやシカ，果実食鳥などの動物による種子散布は多くの地域や植物種で観察されている（佐藤，2007; Wehncke, 2010）．しかし現時点ではタチバナを含むカンキツ類の動物による長距離の伝搬を裏付ける研究は乏しく，推測の域を出ていない．一方で，戸田港御浜岬の諸口神社（1402年再建）は弟橘姫命を祭神としていること（諸口神社由緒より）から，海上交通の要所としての戸田港に海路で直接タチバナがもたらされた可能性についても，今後検討する価値がある．

以上のように，国内のタチバナ自生地の北限である静岡市沼津市戸田の群落内の個体はすべて既知のタチバナ-A型であると確認され，自殖，もしくは同一地域内で確認されたナツミカンとの交雑個体は見いだされなかったことから，戸田では多胚種子を介したクローン増殖により長期間に渡ってタチバナ-Aの群落が維持されてきたと考えられた．戸田にタチバナ-Aが持ち込まれた経緯は明らかではないが，かつて静岡県東部から神奈川県にかけてタチバナが生産されてきた複数の記録が認められることから，伊豆半島に人為的に持ち込まれて戸田に定着した可能性が考えられた．戸田のタチバナ自生地は時折人手による管理が行われてきたが，これは脆弱な生育基盤を安定化する効果があったとも考えられ，今後国内のタチバナ自生地の保全を図るうえでの参考となろう．

摘　要

タチバナ（*Citrus tachibana*（Makino）Tanaka）は奈良時代以前から日本に存在していたと考えられる在来カンキツ種の1つで，東海から九州にかけての太平洋岸側の山中に複数のタチバナ自生地が存在する．従来，タチバナは1種とみなされてきたが，高精度DNAマーカーによる解析から，少なくとも3つの遺伝的に異なる系統が存在することが示されている．しかしこれまでの解析は各地域で採取された一部の個体を対象としており，種としてのタチバナ，および自生地の群落内の遺伝的多様性に関する知見に乏しかった．我々はタチバナの群落内の遺伝的多様性を把握し，将来の利用や保全に役立てる目的で，静岡県沼津市戸田に自生するタチバナに注目し，自生地内の全個体（井田地区24点，紙屋地区40点）を収集した．核とオルガネラの高精度DNAマーカー分析の結果，井田地区の22点と紙谷地区の38点はすべて既知のタチバナ-A型と遺伝子型が完全に一致した．また，井田および紙谷地区の由来不明のカンキツ個体各2点は遺伝子型からナツミカンと判定された．群落内にはタチバナ-Aの自殖もしくはナツミカンとの交雑個体は確認されず，タチバナ-Aを種子親とする交雑実生の獲得は困難であることが想定され，自然交雑実生のDNAマーカー分析でも同様の結果が示された．群落内に若木も確認されたことから，戸田タチバナ自生地では珠心胚実生を介して無性的に個体が維持されてきたと推定された．

謝　辞　本研究を実施するに当たり，タチバナ自生地内に関する試料ならびに資料提供にご協力いただいた監物規敏氏，野田重信氏，金田茂樹氏に感謝申し上げます．また，本稿の取りまとめに際してご助言いただいた吉武利文

氏，ならびに試料の分析にご協力いただいた平野千秋氏，大石尚子氏に感謝申し上げます.

引用文献

Hirai, M., S. Mitsue, K. Kita and I. Kajiura. 1990. A Survey and isozyme analysis of wild mandarin, tachibana (*Citrus tachibana* (Mak.) Tanaka) growing in Japan. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 59: 1–7.

井手久登・武内和彦・梶浦一郎. 1989. 野生果樹自生地の分布・構造と保全に関する応用植生学的研究. p. 84. 昭和62–63年度科学研究費補助金一般研究（B）研究成果報告書. 研究課題番号（62480038）.

梶浦一郎. 2008. 日本果物史年表. p. 31–35, 51. 養賢堂. 東京.

環境省. 2019. 環境省レッドリスト2019. 〈http://www.env.go.jp/nature/kisho/hozen/redlist/index.html〉.

Katayama, H., S. Adachi, T. Yamamoto and C. Uematsu. 2007. A wide range of genetic diversity in pear (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) genetic resources from Iwate, Japan revealed by SSR and chloroplast DNA markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 1573–1585.

小山真人. 2010. 伊豆の大地の物語. p. 10–13. 静岡新聞社. 静岡.

牧野富太郎. 1955. 牧野　日本植物図鑑. p. 337. 北隆館. 東京.

沼津市教育委員会. 2014. 戸田村史　民俗編—暮らしの伝承—. p. 8. 沼津.

佐藤重穂. 2007. 森林生態系における果実食鳥類群集の動態と樹木種子の散布. 森林応用研究. 16: 37–42.

Shimizu, T., E. Kaminuma, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Goto, T. Matsumoto, Y. Katayose, T. Mochizuki, Y. Tanizawa, A. Toyoda, A. Fujiyama and Y. Nakamura. 2016a. A genomic approach to selecting robust and versatile SNP sets from next-generation sequencing data for genome-wide association study in citrus cultivars. Acta Hortic. 1135: 23–32.

Shimizu, T., A. Kitajima, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Ohta, S. Goto, E. Kaminuma and Y. Nakamura. 2019. A model for the domestication and diversification processes of modern citrus cultivars in Japan. Acta Hortic. 1320: 7–14.

Shimizu, T., A. Kitajima, K. Nonaka, T. Yoshioka, S. Ohta, S. Goto, A. Toyoda, A. Fujiyama, T. Mochizuki, H. Nagasaki, E. Kaminuma and Y. Nakamura. 2016b. Hybrid origins of citrus varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes. PLoS ONE 11: e0166969. 〈https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166969〉.

Shimizu, T. and K. Yano. 2011. A post-labeling method for multiplexed and multicolored genotyping analysis of SSR, indel and SNP markers in single tube with bar-coded split tag (BStag). BMC Research Notes 4: 161. 〈https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-161〉.

静岡県柑橘販売農業協同組合連合会. 1959. 静岡県柑橘史. p. 114–195, 1015–1024. 清水.

Swingle, W. T. 1967. The botany of citrus and its wild relatives. p. 190–430. In: W. Reuther, H. J. Webber, L. D. Batchelor (eds.). The citrus industry. University of California Press, Berkeley, California.

田中長三郎. 1926. 日本領土の野生柑橘に就て. 九州帝國大學農學部學藝雑誌. 2: 51–58.

Tanaka, T. 1931. The discovery of *Citrus tachibana* in Formosa, and its scientific and industrial significance. Studia Citrologica 5: 1–20.

Tanaka, T. 1954. Species problem in citrus: a critical study of wild and cultivated units of citrus, based upon field studies in their native homes (Revisio Aurantiacearum IX). p. 42–50. Japanese Society for the Promotion of Science, Tokyo.

Wehncke, E. V. 2010. Seed dispersal and conservation. p. 119–124. In: M. D. Breed and J. Moore (eds.). Encyclopedia of animal behavior. Academic Press, Amsterdam.

Wu, G. A., J. Terol, V. Ibanez, A. López-García, E. Pérez-Román, C. Borredá, C. Domingo, F. R. Tadeo, J. Carbonell-Caballero, R. Alonso, F. Curk, D. Du, P. Ollitrault, M. L. Roose, J. Dopazo, F. G. Gmitter, D. S. Rokhsar and M. Talon. 2018. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. Nature 554: 311–316.

吉武利文. 2008. 橘の香り—古代日本人が愛した香りの植物—. p. 13–21. フレグランスジャーナル. 東京.