

造園・園芸利用種アオキにおける 異なる葉緑体ハプロタイプ間の交雑

矢野初美*¹・後藤晋*²

Hybridization between two different chloroplast DNA haplotypes of *Aucuba japonica*, a landscaping and horticultural species

Hatsumi YANO*¹ and Susumu GOTO*²

はじめに

近年、都市域における生物多様性の豊かさが注目され、人里離れた場所における野生生物集団だけでなく、都市域に生息する集団も保全対象として認識されるようになってきた (MILLER and HOBBS, 2002; ANGOLD *et al.*, 2006)。都市域に植栽する植物については、外来種による生態系攪乱や、地域景観保全への意識の高まりとともに、在来植物種の利用が増加するようになった (WHELAN *et al.*, 2006)。しかし、同じ在来種であっても、都市域周辺に自生する自然集団とは遺伝的に異なる個体や集団が用いられることも多く (MONTALVO *et al.*, 1997)、植栽という行為を通じて自生集団にない新しい遺伝子が都市域の植物集団に導入されている可能性もある。このことは、都市域における植物集団の遺伝的多様性を高めるというメリットを持つ一方、種によっては、新しく導入された個体による遺伝的な置き換わり (Genetic swamping) (SALTONSTALL, 2002) や種内交雑 (Intraspecific hybridization) (MCKAY *et al.*, 2005) を通じて、自生集団本来の遺伝構造が攪乱されるというデメリットもある (WHELAN *et al.*, 2006)。

林業種では、古くから異なる産地由来の種苗を利用することの影響が検討され、スギ、ヒノキ、クロマツ、アカマツなどでは、種苗法により各樹種の種苗配布区域が定められている。最近では、人為的土地改変後の自然再生緑化事業で用いる植物材料についても、別の場所から採取した種子や苗木を用いることに対する議論が盛んになり、日本でも植物地理的データに基づく地域性区分なども検討されている (小林・倉本, 2006)。しかし、造園や園芸などの商業分野では、植物材料の種子・苗木産地に注意が払われることが少なく、起源が不明な材料や地域的に異なる産地の材料が利用される場合も多い。造園・園芸利用種において、周辺に自生する自然集団と遺伝的に異なるタイプ (非自生タイプ) の利用が自生集団に及ぼす影響を調べた研究は未だ限定的であり (WHELAN *et al.*, 2006; JOHNSON and GALLOWAY, 2008)、非自生タイプの植栽量、それらの植栽後の生育状況、非自生タイプと自生集団との交雑可能性など、基礎的な実態を把握することが都市域における造園・園芸利用植物のあり方を考える上で重要な課題となっている。

*¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科生園システム学専攻緑地創成学研究室

*¹ Laboratory of Landscape Ecology and Planning, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

*² 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地

*² Experimental Station at Tanashi, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

アオキ (*Aucuba japonica*) は造園や園芸で広く利用される種で、倍数性と葉緑体ハプロタイプに明瞭な地理的構造があることが知られている (OHI *et al.*, 2003)。このため、倍数性と葉緑体 DNA を調べることで、対象地域における自生・非自生の区分を容易に行うことができる。筆者らは、アオキにおいて特定の非自生タイプが全国的に流通し (矢野ら, 2005)、それらが植栽された後、種子が鳥被食散布により逸出し、そのタイプが自生しない地域に自然定着していることを明らかにした (YANO *et al.*, 投稿準備中)。これらの研究を通じて、自然定着した非自生タイプが自生タイプと交雑している可能性が指摘されたが、地理的構造を持つ異なるハプロタイプ間の交雑が実際に起こるかどうかが確認する必要があった。

そこで本研究では、造園・園芸利用種アオキについて、異なる葉緑体ハプロタイプを持つ個体間の相互交雑実験を行い、花粉親ハプロタイプの違いが受粉成功率に与える影響を評価した。

研究の方法

植物材料

アオキは、我が国では北海道から沖縄地方まで自然分布する雌雄異株の常緑広葉低木で、4月から5月に開花する。円錐花序を持ち、1花序につき、雄では10~300個、雌では30個以内の4弁花をつける。これらの花は小型のハチ、ハエ、甲虫を含む様々な昆虫に訪花される (ABE, 2001)。種子を含む果実は冬季に赤熟し、主にヒヨドリなどの大型の鳥によって被食散布される。アオキの自然集団は、葉緑体 DNA ハプロタイプ (6タイプ) と倍数性 (2倍体/4倍体) によって8タイプ (ハプロタイプ-倍数性の順で B1-4x, B2-4x, B3-4x, B4-4x, Ja-4x, Ja-2x, Ov-4x, Ov-2x と表記) に分類され、関東地方に位置する西東京市、つくば市のいずれも Ja-4x が自生タイプである (OHI *et al.*, 2003)。

人工授粉実験は、東京都西東京市にある東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地 (以下、田無試験地) の長期生態系研究サイト (梶, 2000) のそばで行った。本サイトの下層には多数のアオキが自生しており、林床の主要な植物種となっている。授粉実験では、母親として田無試験地に自然定着した6個体 (ap01~06)、花粉親として同じ田無試験地の1個体 (ap07) と茨城県つくば市の (独) 農業環境技術研究所内に自然定着した2個体 (No.140とNo.181) の計3個体を用いた (表-1)。

実験対象個体の倍数性と葉緑体 DNA ハプロタイプの決定

田無試験地に自然定着した7個体とつくば市で採集した2個体について、OHIら (2003) の研究を参考に、倍数性と葉緑体 DNA のハプロタイプを決定した。まず、フローサイトメーターを利用し、核内の2本鎖 DNA を DAPI 染色し、その蛍光強度を検出することで、相対的に倍数性を判別した。なお、基準試料にはミヤコグサ (*Lotus corniculatus* var. *japonicus*) を用いた。次に、葉緑体 DNA の *atpB-rbcL* 領域 (forward: 5'-CGAAGCTCCATCTACAAATGG-3') と (reverse: 5'-ACTGCCTTCATCCACTTGGC-3')、および *psbA-trnH* 領域 (forward: 5'-AATGTCCGATAGGACGTTTCAT-3') と (reverse: 5'-ATGAATTAGCGTTAATG-3') (HAMILTON, 1999) を設定し、塩基変異によるタイプ分けを行った。これにより、葉緑体 DNA のハプロタイプ6種類のうちのどのタイプかを識別し、関東地方に自生するタイプ (Ja)、あるいは非自生タイプ (B1, B2, B3, B4, Ov) を判別した。

表-1 授粉実験における交雑タイプと受粉成功率

Table 1. Crossing type and pollination success rate obtained by hand-pollination experiments.

交雑タイプ	個体ID		袋数	花序数	花序ごとの花数 ¹		受粉成功率 ¹ (%)
	母親	花粉親			初期	受粉成功	
Ja × Ja	ap02	140	3	4	12.3	10.0	81.6
	ap03	140	3	3	10.0	8.3	83.3
	ap04	140	1	1	8.0	7.0	87.5
	ap06	140	2	2	27.0	19.5	72.2
Ja × B1	ap02	181	3	4	11.5	5.5	47.8
	ap03	181	3	3	14.0	11.7	83.3
	ap04	181	1	1	12.0	12.0	100.0
	ap06	181	2	2	43.5	30.5	70.1
Ja × Op ²	ap02	-	-	5	10.8	10.0	92.6
	ap03	-	-	5	7.8	5.4	69.2
	ap04	-	-	5	4.0	4.0	100.0
	ap06	-	-	5	28.4	26.2	92.3
Ja × Cont ³	ap02	-	1	2	7.0	0.0	0.0
	ap03	-	1	2	12.5	0.0	0.0
B1 × Ja	ap01	140	3	7	14.6	12.4	85.3
B1 × B1	ap01	181	3	8	16.4	12.6	77.1
	ap05	ap07	1	2	7.5	6.0	80.0
B1 × Op ²	ap01	-	-	5	15.2	11.6	76.3
	ap05	-	-	5	5.0	4.6	92.0
B1 × Cont ³	ap01	-	1	3	13.0	0.7	5.1

¹: 平均値を示した。Op²: 自然受粉, Cont³: 無受粉処理を意味する。

授粉実験の手順

田無試験地におけるアオキ個体群が開花する直前の2008年4月2日に母親6個体について、1袋あたり1~3個の花序が入るように、それぞれ2~7個の交配袋をかけた。次いで、4月7日と11日に室内で水挿しして開花させたつくばの花粉親(No.140とNo.181)の雄花と野外で自然開花した田無の花粉親(ap07)の雄花を各母親の雌花に直接につけて人工授粉させた(図-1-a)。4月11日に袋内の開花数を記録し、これを初期花数とした。周辺個体の開花期が終了したのを確認した後で交配袋を外し、6月24日に受粉に成功した花数(受粉成功花数)を記録した(図-1-b)。また、比較対照として、各母親につき5花序の自然受粉についても初期花数と受粉成功花数を記録した。さらにap01, ap02, ap03の母親3個体には袋がけを行った後、受粉を行わない無受粉処理を設定した(表-1)。石田・大橋(2006)は、アオキでは6月中旬までは全く肥大化せずに

脱落する胚珠が多く見られることを指摘し、受粉成功率 (Pollination success rate) を初期花数に対する受粉成功花数の割合で求めている。本研究でもこの定義に従い、花序ごとに受粉成功率を求めた。

データ解析

本研究では、母親ごとに、花粉親のタイプ (各ハプロタイプ、もしくは自然受粉) が受粉成功率に与える影響について一般化線形モデルを用いて検討した。これらの解析では、対照とした無授粉処理のデータは除外した。一般化線形モデルでは、花序ごとの初期花数に対する受粉成功花数の割合を応答変数とし、花粉親のタイプを説明変数とした。応答変数は二項分布に従うとし、ロジスティック回帰を行った (R Development Core Team, 2008)。

結 果

花粉親として用いたつくばの2個体のうち、No.140は自生タイプ (Ja-4x)、No.181は非自生タイプ (B1-4x) と判別された。なお、このB1-4xは東北、北陸、中国地方の日本海側、紀伊半島と四国東部の太平洋側に自然分布するタイプである (OHI *et al.*, 2003)。田無試験地に自然定着した7個体については、母親のうち4個体 (ap02, ap03, ap04, ap06) が自生タイプ (Ja-4x) であり、他2個体 (ap01, ap05) と花粉親1個体 (ap07) が非自生タイプ (B1-4x) であった (表-1)。本研究の対象個体からは2倍体は検出されなかったことから、以後、本論文ではJa-4xをJa、B1-4xをB1と略すこととする。

母親個体ごとの平均受粉成功率を表-1に示す。Ja × Jaでは72.2～87.5%、Ja × B1では47.8～100.0%、Jaの自然受粉 (以下、×Opと表記) では69.2～100.0%、Jaの無受粉処理 (以下、×Contと表記) では0%であった。一方、B1 × Jaでは85.3%、B1 × B1では77.1～80.0%、B1 × Opでは76.3%～92.0%、B1 × Contでは5.1%であった。無受粉処理のデータを除外し、母親個体ごとに花粉親タイプ (Ja, B1, Op) 別の受粉成功率 (平均値 ± 標準誤差) を図-2に示した。

一般化線形モデルで花粉親タイプが受粉成功率に及ぼす影響を母親ごとに調べた結果、母親6個体のうち、5個体 (ap01, ap03, ap04, ap05, ap06) では、葉緑体ハプロタイプ間 (Ja/B1) で受

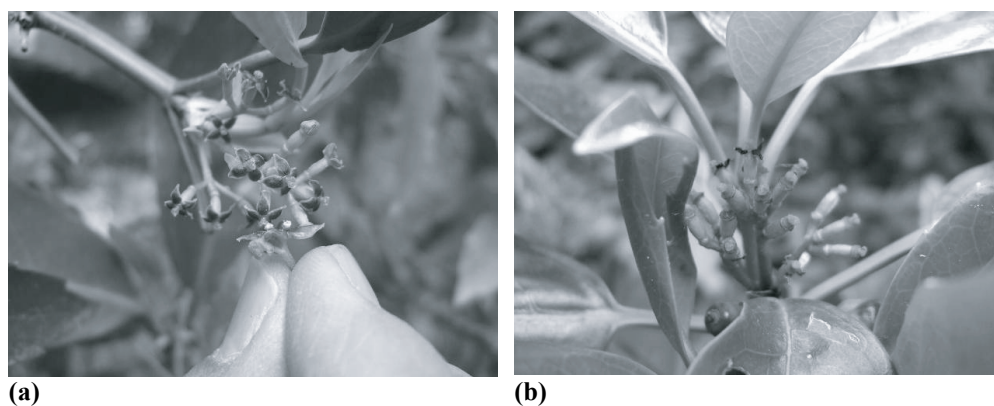


図-1 人工授粉実験(a)と受粉に成功した花(b)の様子

Fig. 1. Photos of hand pollination experiments (a) and fertilized female flowers (b)

粉成功率の有意な違いは認められなかった。一方、母親個体 ap02 では、B1 との交雑では、Ja や Op に比べて受粉成功率が有意に低かった ($p < 0.001$)。また、ap06 では、葉緑体ハプロタイプ間の違いは見られなかったが、Ja と B1 の両方が Op よりも有意に粉成功率が低かった ($p < 0.05$)。

考 察

人工交雑実験では、受粉適期に花粉を交雑させ、交配時期が終わるまで自然受粉を排除する必要がある。しかし本研究では、個体 ap01 の無受粉処理で 5.1% の受粉が見られた (表-1)。無受粉処理を行った袋の中には 3 つの花序があったが、それぞれの受粉成功率 (受粉成功花数 / 初期花数) は 9.1% (1/11), 5.6% (1/18), 0.0% (0/10) であった。この理由としては、受粉した 2 つの花は、袋がけ前に既に受粉していたか、袋がけ後にポリネータが袋内に混入して受粉したかのいずれかだと考えられる。また、母親個体 ap06 においては、人工授粉処理が自然受粉処理よりも受粉成功率が低かった (図-2)。この個体では、受粉実験時につぼみが複数認められたことから、受粉実験を行う時期が少し早かった可能性がある。しかし、その他の場合では無受粉処理では全く受粉せず、人工授粉と自然受粉で受粉成功率に有意な差がなかったことから、受粉実験そのものに大きな問題はなかったと考えられる。

本研究では、母親 ap02 で同ハプロタイプ間交雑 (Ja × Ja) より異なるハプロタイプ間交雑 (Ja × B1) の受粉成功率が低かったことを除けば、異なるハプロタイプ間交雑と同ハプロタイプ間交雑で受粉成功率に有意な違いが認められなかった (図-2)。ここで、母親 ap02 における Ja × B1 の受粉成功率を花序ごとに詳しく検討する。B1 と交雑させた 4 花序は、3 つの袋にそれぞれ 1, 1, 2 花序ずつ入り、花序ごとの受粉成功率 (受粉成功花数 / 初期花数) は、袋 No.1 で 30.8% (4/13), 袋 No.2 で 0.0% (0/11), 袋 No.3 で 91.7% (11/12) と 70.0% (7/10) と、袋 No.1 と袋 No.2 の受粉成功率が袋 No.3 よりも大きく低下していた。袋 No.3 の受粉成功率は花粉親が Ja (平均 81.6%) や Op (平均 92.6%) の時と同程度であり、母親 ap02 個体において、異なるハ

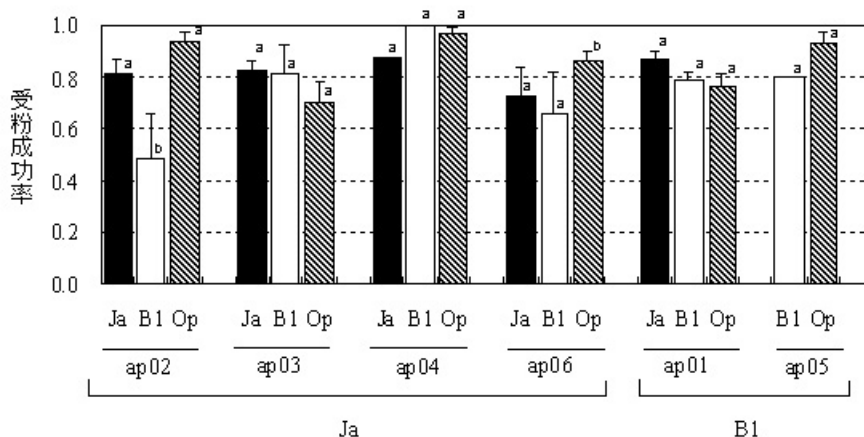


図-2 各母樹における花粉親タイプごとの受粉成功率 (平均値 ± 標準誤差)。異なるアルファベットは統計的に有意な違いを示す。

Fig. 2. The pollination success rates for each maternal plants (Average ± S.E.). Different alphabets indicate significant difference among the paternal types.

プロタイプ間の交雑による受粉成功率が全ての花序で低いわけではなかった。受粉成功率が低かった2袋は、ap02個体の最上端部に突き出た枝に位置しており、他の袋に比べて風による影響を強く受けたことが考えられる。すなわち、交配袋を設置していた期間に雌花が物理的な障害を受け、結果的に受粉成功率が低下した可能性がある。以上の結果から、アオキにおいては、個体によってハプロタイプ間の交雑阻害が生じる可能性は否定できないものの、全体的には大きな交雑阻害は働いておらず、ハプロタイプ間の交雑は起こりえることが示された。

筆者らは、つくば市に自然定着した成木90個体（自生タイプ43個体、非自生タイプ47個体）について AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) 分析を行い、遺伝子型データに基づいて主座標分析を行ったが、葉緑体 DNA ハプロタイプにおいて2つに判別される自生タイプと非自生タイプの遺伝組成には明瞭な違いが認められなかった (YANO *et al.*, 投稿準備中)。葉緑体 DNA は母性遺伝するのに対し、AFLP 分析で主な解析対象となる核 DNA は両性遺伝することを考慮すると、つくばでは自生タイプと非自生タイプの間で既に交雑が起こっており、交雑個体が分析対象に含まれていたために両者間で明瞭な違いが見出せなかったことが考えられる。この結果は、庭に植栽された低木種 *Grevillea macleayana* の園芸個体と自然集団内自生個体を SSR (Simple Sequence Repeat) 分析し、その遺伝子型データに基づいて同様に主成分分析を行い、両者の遺伝組成に明瞭な違いを見出した WHELAN ら (2006) の結果とは異なっていた。アオキの種子はヒヨドリなどの鳥に被食散布される (ITOU *et al.*, 1993) ため、重力散布様式を持つ *Grevillea macleayana* よりもある程度両親から離れた場所での定着が可能であると考えられる。つくばの調査では、野外で自然定着し、成熟した種子をつけた雌、開花した雄の非自生タイプ (B1) が観察されていることから、植栽された非自生タイプから鳥被食散布により逸出した種子が自生集団の生育する樹林内に定着し、非自生タイプの分布拡大の新たな起点となると同時に、樹林内の自生集団と交雑している可能性がある。

近年、造園・園芸利用種における栽培集団から野生集団間への遺伝子流入が注目されており、いくつかの種で人工交雑実験が試みられている。低木種 *Grevillea macleayana* では、庭に植栽された園芸品種と周辺自然集団の間で人工授粉を行い、結実することが示された (WHELAN *et al.*, 2006)。また、草本種 *Lobelia cardinalis* では、自生タイプの花粉と非自生タイプの花粉を異なる割合で混合した花粉を用いて自生花粉と非自生花粉の受粉能力の差を検討し、個体差はあるものの、非自生花粉は自生花粉の競合相手になりうることが指摘されている (JOHNSON and GALLOWAY, 2008)。本研究で研究対象としたアオキでも地理的構造を持つハプロタイプ間での交雑は十分に起こりえることが示された。造園・園芸利用種では、非自生タイプが無意識のうちに植栽され、それらが自生タイプと交雑することにより、本来自生集団が持つ遺伝的組成とは異なるものになっている可能性がある。これらはその分布拡大が顕著な外来種とは異なり、目に見えない形で遺伝的な構造が変化するため注意を払う必要がある。

謝 辞

授粉作業にあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林田無試験地の鶴見康幸技術主任に協力していただいた。ここに記して感謝の意を表したい。

要 旨

都市における造園や園芸による在来植物種導入は、自生集団との間の遺伝子交流によって都市における植物集団全体の遺伝的多様性を高める一方、非自生タイプによる置き換わりや自生集団との交雑による遺伝子攪乱を起こす可能性がある。本研究では、造園や園芸でよく利用されるアオキについて、地理的構造を持つ葉緑体 DNA ハプロタイプ (Ja・B1) 相互に人工交雑を行い、初期花数に対する受粉成功花数の割合 (受粉成功率) を調べた。各交雑組合せの平均授粉成功率 (%) は、Ja×Ja が 81.2, Ja×B1 が 75.3, B1×Ja が 85.3, B1×B1 が 78.6 であった。一般化線形モデルで解析した結果、1 個体を除いて、受粉成功率は葉緑体ハプロタイプ間で有意な違いが認められなかった。以上の結果から、アオキでは導入されたハプロタイプと自生ハプロタイプの交雑により、自生集団の遺伝的組成が目に見えないかたちで変化する可能性が示唆された。

キーワード：園芸・種内交雑・人工受粉実験・都市域・葉緑体 DNA ハプロタイプ

引用文献

- ABE, T. (2001) Flowering phenology, display size, and fruit set in an understory dioecious shrub, *Aucuba japonica* (Cornaceae). *American Journal of Botany*. 88:455-461.
- ANGOLD, P. G., SADLER, J. P., HILL, M. O., PULLIN, A., RUSHTON, S., AUSTIN, K., SMALL, E., WOOD, B., WADSWORTH, R., SANDERSON, R., and THOMPSON, K. (2006) Biodiversity in urban habitat patches. *Science of the Total Environment*. 360:196-204.
- HAMILTON, M. B. (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*. 8:521-523.
- 石田千香子・大橋一晴 (2006) 雌雄異株植物アオキ (*Aucuba japonica*) の空間分布と開花量が繁殖に与える影響. つくば生物ジャーナル. 5. (オンラインジャーナル <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/tjb/Vol5No1/TJB200601200200722.html>)
- ITOU, K., ITO, S., and GYOKUSEN, K. (1993) The characteristics of seed dispersal and germination of *Aucuba japonica*. *Transactions of the Japanese Forestry Society Kyusyu division*. 46:109-110.
- JOHNSON, K. M. L., and GALLOWAY, F. L. (2008) From horticultural plantings into wild populations: movement of pollen and genes in *Lobelia cardinalis*. *Plant Ecology*. 197:55-67.
- 梶幹男 (2000) 長期生態系プロットによる森林生態系の解明. 平成 10～平成 11 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書. 124-130. 東京大学大学院農学生命科学研究科.
- 小林達明・倉本宣 (2006) 生物多様性保全に配慮した緑化植物の取り扱い方法. (生物多様性緑化ハンドブック. 亀山章編, 地人書館, 東京). 13-58.
- MCKAY, J. K., CHRISTIAN, C. E., HARRISON, S., and RICE, K. J. (2005) "How local is local?" - A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology*. 13:432-440.
- MILLER, J. R., and HOBBS, R. J. (2002) Conservation where people live and work. *Conservation Biology*. 16:330-337.
- MONTALVO, A. M., WILLIAMS, S. L., RICE, K. J., BUCHMANN, S. L., CORY, C., HANDEL, S. N., NABHAN, G. P., PRIMACK, R., and ROBICHAUX, R. H. (1997) Restoration biology: A population biology perspective. *Restoration Ecology*. 5:277-290.
- OHI, T., KAJITA, T., and MURATA, J. (2003) Distinct geographic structure as evidenced by chloroplast DNA haplotypes and ploidy level in Japanese *Aucuba* (Aucubaceae). *American Journal of Botany*. 90:1645-1652.
- R Development Core Team. (2008) R: A language and environment for statistical computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- SALTONSTALL, K. (2002) Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:2445-2449.
- WHELAN, R. J., ROBERTS, D. G., ENGLAND, P. R., and AYRE, D. J. (2006) The potential for genetic contamination vs. augmentation by native plants in urban gardens. *Biological Conservation*. 128:493-500.
- 矢野初美・小沼明弘・芝池博幸・井手任 (2005) アオキ (*Aucuba japonica* Thunb.) の遺伝的解析を通してみた緑化植物の流通の現状. *環境情報科学論文集*. 19:291-296.

(2008年8月29日受付)

(2008年11月17日受理)

Summary

The introduction of native plant species through landscaping and horticulture can enhance the genetic diversity of plant populations in urban areas, but it can also disturb the genetic structure of the remaining native populations. We hand-pollinated two chloroplast DNA haplotypes (Ja/B1) of *Aucuba japonica*, a landscaping and horticultural plant species. The pollination success rate was calculated as the percentage of fertilized flowers to the total number of pollinated flowers. The average pollination success rate was 82.1% for Ja (female) × Ja (male), 75.3% for Ja × B1, 85.3% for B1 × Ja, and 78.6% for B1 × B1. A generalized linear model revealed no significant effects of paternal haplotype on the pollination success rate, except in the case of one maternal plant. Thus, natural hybridization between an introduced haplotype and a native haplotype can occur and the genetic composition of local populations of *Aucuba japonica* would cryptically be changed in this way.

Key words: horticulture, intraspecific hybridization, hand pollination experiment, urban area, chloroplast DNA haplotype