

的場英行\* 長野克也\*\*

DNA analysis to assess the interspecific hybridization in a new population of  
*Polemonium kiushianum* in Japan

Hideyuki MATOBA, Katsuya Nagano

Abstract

*Polemonium kiushianum* is a critically endangered species of which only eight populations exist in semi-natural grasslands of the Mt. Aso area of Kyushu, Japan. Habitat modification caused the declining of this species. Additionally, the risk of hybridization with non-indigenous horticultural congeners, such as *P. caeruleum* subsp. *caeruleum* and *P. caeruleum* subsp. *yezoense* var. *yezoense*, threatens the genuine lineage of *P. kiushianum*. In 2012, we found a new population of *P. kiushianum* out of the area of known populations. In this study, no signature of hybridization was detected in the new population of *P. kiushianum*.

1. 緒言

阿蘇山周辺の半自然草原に生育するハナシノブ *Polemonium kiushianum* Kitam. は絶滅危惧 IA 類に指定され、種の保存法では国内希少野生動植物種としても指定されている。近年の野焼きの減少や植林事業などによって阿蘇原産の植物の生育環境は劇的に変化しており、現在では推定 8 個体群（1 個体群は絶滅と考えられる）、400 個体が残っているのみである。生育環境の変化に加えて、セイヨウハナシノブ *P. caeruleum* L. subsp. *caeruleum* やエゾハナシノブ *P. caeruleum* subsp. *yezoense* (Miyabe et Kudô) H.Hara var. *yezoense* Miyabe et Kudô などの近縁園芸種や外来種がハナシノブの自然個体群の近



Fig. 1 *Polemonium kiushianum* in a new population.

\* 経営学部経営学科准教授

\*\* 農学部応用植物科学科教授

**Table 1** *Polemonium* species used in this study and their sources

Taxa	Previous study	Present study	Sources
<i>Polemonium kiushianum</i>	10		Kyushu: Kumamoto (population A)
	264	1	Kyushu: Kumamoto (population B)
	93		Kyushu: Kumamoto (population C)
	31		Kyushu: Kumamoto (population D)
	25	1	Kyushu: Kumamoto (population E)
	4		Kyushu: Kumamoto (population F)
	79		Kyushu: Kumamoto (population G)
		22	Kyushu: Kumamoto (new population)
	3		Akasaka Imperial Gardens
<i>P. caeruleum</i> subsp. <i>caeruleum</i>	6	1	Ogihara Shokubutuen, Ltd.
<i>P. caeruleum</i> subsp. <i>laxiflorum</i>	5	1	Alm Alpine plant nursery (originally from Hokkaido: Rebun)
<i>P. caeruleum</i> subsp. <i>yezoense</i> var. <i>yezoense</i>	25	1	Hokkaido: Sapporo
<i>P. caeruleum</i> subsp. <i>yezoense</i> var. <i>nipponicum</i>	5		Iwasaki engei, Ltd. (originally from Hokkaido: Hidaka)
<i>P. caeruleum</i> subsp. <i>campanulatum</i>	5	1	Iwasaki engei, Ltd. (originally from Hokkaido: Kuishiro)
Artificial hybrids between <i>P. kiushianum</i> (♀) x <i>P. caeruleum</i> subsp. <i>yezoense</i> (♂)	48	2	-

辺に観賞植物として栽培され、種間雑種の可能性が生じている。つまり、セイヨウハナシノブなどのより一般的な外来園芸種と極少数のハナシノブの雑種形成によって、遺伝的に純系なハナシノブの存在が脅かされるという問題が生じてきたのである。ハナシノブ以外の日本産ハナシノブ属にはクシロハナシノブ *P. caeruleum* subsp. *campanulatum* Th.Fr.、カラフトハナシノブ *P. caeruleum* subsp. *laxiflorum* (Regel) Koji Ito、ミヤマハナシノブ *P. caeruleum* subsp. *yezoense* var. *nipponicum* (Kitam.) Koji Ito、エゾハナシノブ *P. caeruleum* subsp. *yezoense* が知られ、いずれもセイヨウハナシノブの亜種とされている。セイヨウハナシノブは種内変異が大きく、形態的特徴に基づく同定や識別がしばしば困難とされている。筆者らはこれまでに、ハナシノブの染色体数 ( $2n = 18$ ) と核型を報告し、ハナシノブとエゾハナシノブの核型にほとんど違いがみられないことを明らかにした (1)。また、2011年には交雑識別プライマー (H11F/R) を開発し、日本産4亜種を含むセイヨウハナシノブとハナシノブを識別することに成功した (2)。本研究では、2012年に発見された阿蘇カルデラ床におけるハナシノブの新規自生地について、2015年まで安定的な開花個体を観察した。また、この新規に発見された個体群におい

て、H11F/R プライマーを用いた PCR 解析を行い、交雑の有無を遺伝的に検証した。

## 2. 材料および方法

2015年の夏に環境庁の許可を得て、新規個体群から22個体のハナシノブの葉のサンプリングを行った。これに加え、先行研究 (1) に使用した2個体群2個体のハナシノブと4個体のハナシノブ属4分類群、および2個体のハナシノブ (♀) x セイヨウハナシノブ (♂) の人工 F1 雑種を使用した (Table 1)。

CTAB 法により葉から DNA の抽出を行った後、ハナシノブのみに非特異的なプライマーである H11F (5'-CTCTGAATGCAGGAGATATAATT-3') と H11R (5'-CTTGTTATTGGGAATTTTGAGATTAA-3') プライマーを用いて PCR 反応 (4 min at 94°C, 40 cycles of 20 s at 94°C - 20 s at 47°C - 10 s at 72°C, and final 5 min at 72°C) を行った後、電気泳動を行った。

## 3. 結果および考察

2015年に採取した新規個体群のハナシノブ22個体と、過去の研究で採取された別個体群のハナシノブ2個体、4個体のハナシノブ属分類群、2個体の

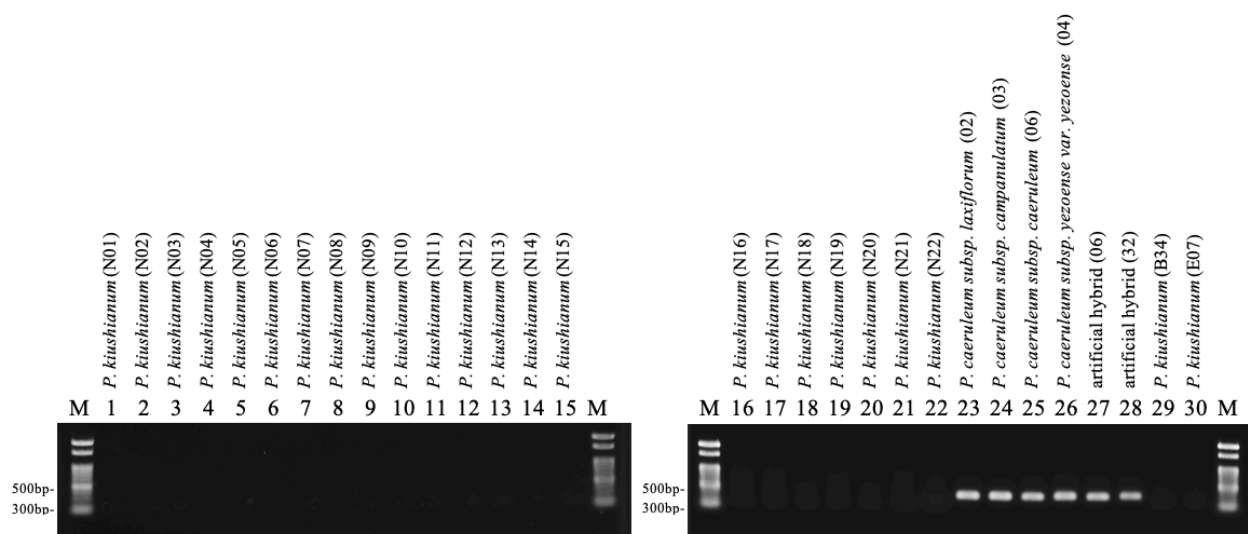


Fig. 2 Detection of ca. 300 bp DNA fragments after PCR amplification using primer pair H11F/R. *Polemonium caeruleum* subsp. *yezoense* var. *yezoense* (lane 26), *P. caeruleum* subsp. *caeruleum* (lane 25), *P. caeruleum* subsp. *campanulatum* (lane 24), *P. caeruleum* subsp. *laxiflorum* (lane 23), *P. kiushianum* (lanes 1–15 and 29–30), and artificial hybrids (lane 27–28). Lane M indicates a molecular size marker

ハナシノブ (♀) x エゾハナシノブの F1 雑種を材料として H11F/R プライマーを用い PCR を行った。その結果、4 個体のハナシノブ属分類群と 2 個体の F1 雑種では約 300 bp の PCR 増幅断片が検出されたが、今回調査した全てのハナシノブで PCR 増幅断片は検出されなかった (Fig. 2)。新規個体群の 2 2 個体のハナシノブには近縁園芸種との交雑による遺伝子導入が確認されなかったことになる。2004 ~ 2011 年の先行研究の結果では、7 つの自然個体群の 508 個体のハナシノブが純系であることが確認されている。本研究では、今回新たに発見された 22 個体も純系のハナシノブであることが示唆された。しかしながら、新規個体群はこれまでに確認されている他の個体群の自生地と距離が離れており、本来の自生地から人為的に持ち込まれた個体である可能性がある。今後はこの個体群が独立した自然個体群なのかどうかを調べる必要がある。ところが、2012 年に新規個体群が発見された後、2016 年に開花個体が全て盗掘された。2017 年には 1 個体の開花が認められたが、それ以降ハナシノブの開花は見られていない。しかし、開花前のハナシノブの実生は多数確認されており、引き続き調査を行う予定である。

#### 4. 要旨

阿蘇山周辺に生育するハナシノブは、絶滅危惧 I A 類、および種の保存法による希少種に指定された植物であり、約 8 個体群 400 個体が残存しているのみである。観賞用採取や阿蘇山草地の植生遷移による減少に加え、植栽されたセイヨウハナシノブなどの近縁園芸種との交雑による遺伝子攪乱が危惧されている。我々は、2012 年にハナシノブの新規自生地を発見し、2015 年まで安定的に開花個体が観察されたことを環境省に報告し、葉の採取許可を得て開花している 22 個体より葉のサンプルを採集し DNA を抽出した。ハナシノブを含む日本産ハナシノブ属 5 分類群とセイヨウハナシノブ及びハナシノブ x エゾハナシノブの人為交配種を用いて、既に設計されているハナシノブのみに非特異的なプライマー (H11F/R) を用いて PCR を行った。その結果、全てのハナシノブで PCR 増幅断片は検出されず、新規個体群のハナシノブは純系であることが示された。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、新規ハナシノブ個体群の葉

のサンプリングの許可（環九地野許第 1507072 号）を迅速に行なっていただいた環境省九州地方環境事務所野生動物課の方々に感謝します。本研究は、(独)環境再生保全機構の環境研究総合推進費（SII-5-2）により実施されました。

#### 引用文献

- 1) Inaba K, Matoba H, Nagano K, Uchiyama H (2010) Cytological study of the critically endangered plants in Japan. (1) *Polemonium kiushianum*. The Journal of Japanese Botany 85 (2): 118-121
- 2) Matoba H, Inaba K, Nagano K, Uchiyama H (2011) Assessing the threat from hybridization to the critically endangered *Polemonium kiushianum* in Japan. Journal of Plant Research 124 (1): 125-130