

2013 年度
修士論文

北海道におけるゼンテイカの
葉緑体ゲノムの遺伝的多様性

21231003 石田 光

指導教員 植物遺伝学 教授 我妻尚広

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

目 次

緒 論	1
材料および方法	5
結 果	10
考 察	13
摘 要	17
謝 辞	19
引用文献	21
Summary	27
図 表	28

緒 論

全国的なシカの急増に伴い、シカは農林業に大きな被害をもたらしている。平成 23 年度におけるシカによる農作物の被害額は北海道では 63 億円で（北海道 2013）、全国でも 83 億円を上っている（農林水産省 2013）。また、シカによる被害は農林業だけでなく、希少種や高山植物が食害され、希少種の減少やその群落が消失している（藤木ら 2011）。さらに、エゾシカの不嗜好植物の増加（助野・宮木 2007）や植生の多様性の長期保存に悪影響を及ぼす可能性があるなど（Pellerin *et al.* 2006）、シカによる植生への被害は多く報じられている。本研究では道東や亜高山帯で急増したエゾシカにより、個体数の減少や地域的絶滅が危惧されるゼンテイカ（*Hemerocallis dumortieri* C.Morren var. *esculenta* (Koidz.) Kitam. ex M.Matsuoka et M.Hotta）に注目した（図 1）。

ゼンテイカはユリ科ワスレグサ属に分類され、中部地方以北の本州および北海道全域に分布し、高山や低地の湿原や海岸の岩場や草地に群生する多年生草本である（佐竹 1982）。北海道におけるゼンテイカは原生花園の初夏を彩る植物として重要な観光資源の一つと位置付けられている（駒井 2011）。厚岸郡浜中町の霧多布湿原では、近年このゼンテイカの花やつぼみがエゾシカに食害されるようになった（図 2）。エゾシカの食害を受けてもゼンテイカは多年生草本で

あるため、現在のところ霧多布湿原ではゼンテイカの個体数の急激な減少は認められていない。しかし、このまま高い採食圧を受け続ければ、個体数の減少や個体群の消失が危惧される（田村 2010）。一方、上川郡上川町の高層湿原である雲井ヶ原湿原では 1990 年頃にはゼンテイカ（エゾカンゾウ）の群生が確認できた（梅沢・菅原 1990）。しかし、2010 年から開始された北海道上川総合振興局南部森林室による雲井ヶ原湿原の開花調査では調査対象にゼンテイカの表記は見られず（北海道 2010）、2012 年には全く確認できなかった（図 3）。また、湿地内にはシカの足跡が多数見られた。これらのことから、一部地域のゼンテイカは復元を視野に入れた対策が必要であると考えられる。

シカによる農林業や植生への被害の軽減には害獣の捕獲や植生保護柵の設置が農産物、樹木や希少種の保護に効果がある。さらに、保護柵の設置は希少種などの自然回復に有効な手段である（田村ら 2005）。一方、シカの食害により自然回復が難しいほど希少種の個体群や個体数の減少が起こった場合、その個体群の復元を検討しなければ、いずれその個体群は消失する。それらの復元には個体数が減少した個体群に別の個体群から種子や個体を移動させることが多い（大澤 2001）。しかし、このような移動は遺伝的多様性の観点から、遺伝子攪乱の危険性があり、わずかに残った個体群の価値まで失う

可能性がある。また、それぞれの個体群にはその地域に適応した遺伝子やその組合せがあり、地域間での植物移動がその地域の個体群の存続に悪影響をおよぼすおそれもある（松田 2002）。一方、長期的な生物多様性の保全にとって、地域間の隔離など、種が分化する条件を維持することが重要であり、地域間での移植は遺伝的な交流の機会が増え、多様性の減少に繋がる（矢原 2002）。そのため、遺伝的多様性に配慮した復元を行うには個体数が減少する前に、その個体群や周辺の個体群の遺伝的多様性を把握しておくことが重要である。

種内の集団間や集団内における遺伝的多様性を把握するうえで、環境変異の影響を受けづらい分子マーカーの利用は有効であるとの報告から（津村 2001）、北海道や長野県のサクラソウ野生集団由来の DNA から多数の SSR マーカーが開発され（Ueno *et al.* 2003, 北本ら 2005）、北本・本城（2007）はそれらを利用し、サクラソウの遺伝的多様性の把握を行っている。一方、葉緑体ゲノムを用いた研究は 1986 年にタバコの葉緑体ゲノムの全塩基配列が発表されたことから飛躍的に発展した（Shinozaki *et al.* 1986）。葉緑体ゲノムは構造遺伝子配列などが核ゲノムと比べ、系統発生的に安定しているため、種間の系統関係の解明に適していた（宮村ら 1995）。さらに、ほとんどの被子植物では母性遺伝するため、遺伝的多様性を解明す

るのに適していた (Amoatey and Tilney-Bassett 1994). また, 葉緑体ゲノムは 2 つの単一領域 (LSC: large single copy と SSC: small single copy) と 1 組の逆位反復配列 (IR: inverted repeat) からなる 120~160 kbp の環状構造をもつことから (Shinozaki *et al.* 1986), ダイレクトシーケンスによる塩基配列の決定が可能で分析が容易であった. このことから, 系統解析 (Okaura and Harada 2002a) や遺伝的多様性の把握 (小林ら 2008) に広く用いられるようになった. これまでに, オオサクラソウ (佐藤ら 2009), ミゾソバ (横田ら 2010) やワレモコウ (佐伯ら 2012) などで利用されている. また, 葉緑体ゲノムは遺伝子間領域に変異が多く見られることから, 種内変異を把握する遺伝子マーカーとして有効であることが報告されている (Okaura and Harada 2002b). その中でも葉緑体ゲノムの *trn H - psb A* 領域は, 変異に富んだ領域として DNA バーコードの候補として提案されている (Kress *et al.* 2005). また, *trn L (UAA) intron* 領域はいくつかの植物で遺伝変異が報告されている (平原ら 2007, Kawase *et al.* 2009). ワスレグサ属ではこれまでに全国的な視点で葉緑体ゲノムを用い遺伝的変異を調べた例は 1~2 見られる (野口 1988, Noguchi *et al.* 2004). しかし, 北海道に分布するゼンテイカの詳細な遺伝的多様性に関する研究は見られない.

そこで, 本研究では復元の観点から遺伝的多様性に関する基礎的

知見を得るため、北海道に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn H* - *psb A* 領域および *trn L* (UAA) intron 領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、遺伝的多様性を調べた。

材料および方法

採取したゼンテイカ集団の位置、採取日、緯度、経度および採取個体数を表 1 に示す。2011 年 6 月 16 日に爾志郡乙部町の海岸線沿いの岩場の群生地 (図 4) から 9 個体、2011 年 7 月 13 に厚岸郡浜中町の霧多布湿原に設置された木道沿い (図 5) から 14 個体、同年 7 月 14 日に霧多布岬の海岸段丘の上部草原 (図 6) から 14 個体、2012 年 6 月 21 日に積丹郡積丹町積丹岬の岩場 (図 7) から 17 個体と神威岬の岩場 (図 8) から 6 個体、2012 年 6 月 22 日に岩内郡共和町神仙沼に設置された木道沿い (図 9) から 18 個体、同年 7 月 19 日に紋別市オムサロ原生花園付近の湿地 (図 10) から 15 個体、天塩郡豊富町サロベツ湿原に設置された木道沿い (図 11) から 13 個体、同年 8 月 14 日に雨竜郡雨竜町雨竜沼湿原に設置された木道沿い (図 12) から 5 個体、2013 年 6 月 12 日に函館市恵山町恵山岬の岩場 (図 13) から 20 個体、同年 6 月 26 日に中川郡豊頃町湧洞沼の湿地 (図 14) から 17 個体と晩成の海岸線付近の草原 (図 15) から 7 個体、

同年 6 月 27 日新冠郡新冠町判官館森林公園の遊歩道沿い（図 16）から 12 個体，同年 7 月 17 日に上川郡上川町浮島湿原に設置された木道沿い（図 17）から 15 個体，同年 7 月 18 日に上川郡上川町黒岳のリフトのりば付近（図 18）から 14 個体，同年 7 月 25 日に上川郡旭岳旭岳の第一天女が原・第二天女が原に設置された木道沿い（図 19）から 16 個体，同年 8 月 8 日に大雪高原温泉の沼めぐりコースに設置された木道沿い（図 20）から 18 個体のゼンテイカを選び，葉を採取した（図 21）。また，比較対象として近縁種のエゾキスゲを 2013 年 6 月 27 日に浦河郡浦河町の道路沿い（図 22）から，ヤブカンゾウを 2013 年 8 月 8 日に上川郡上川町の道路沿い（図 23）の個体から葉を採取した。採取した葉は茶袋に入れ， -80°C で保存した。

DNA 抽出は SDS 0.3%，NaCl 400 mM，EDTA 5mM と Tris-HCl (pH8.0) 20 mM を調合した SNET と Proteinase K を用いて加熱抽出法で行なった。0.6 ml マイクロチューブに SNET 100 μl と Proteinase K 2 μl を添加し， -80°C で保存していた葉をエタノールで消毒したハサミで 3 mm 角に切り取り，浸漬させた。チューブをアルミブロック恒温槽に入れ， 55°C で 60 分間加熱して DNA を抽出した。

抽出した DNA は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて，製品のプロトコールに従って精製した。チューブ内の葉を取り除き，Membrane Binding Solution を 100 μl 添加し，ボルテックスで

混合した。Collection Tube に SV Minicolumn を挿入し、混合液を SV Minicolumn に添加後、室温で 1 分間インキュベートして DNA をフィルターに吸着させた。インキュベートした SV Minicolumn assembly を 13,000 rpm で 1 分間遠心し、Collection Tube 内の液体を除去した。SV Minicolumn に Membrane Wash Solution を 700 μ l 添加し、SV Minicolumn assembly を 13,000 rpm で 1 分間遠心して洗浄を行ない、Collection Tube 内に振り落とされた液体を除去した。Membrane Wash Solution の添加を 500 μ l , 遠心を 5 分間としてもう一度行なった。洗浄を終えた SV Minicolumn を取り外し、新しい 1.5 ml チューブに移し、Nuclease-Free Water を 30 μ l 添加し、1 分間インキュベートして DNA を溶出させた。その後、13,000 rpm で 1 分間遠心し、1.5 ml チューブに振り落とされた DNA 溶出液に TE Buffer を 20 μ l 添加し、DNA テンプレートとした。

爾志郡乙部町、厚岸郡浜中町の霧多布湿原と霧多布岬は *trn H-psb A* 領域と *trn L (UAA) intron* 領域の 2 領域を、それ以外の採取地は *trn L (UAA) intron* 領域を前述の DNA テンプレートを用い、PCR 法で増幅した。PCR 反応に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列を表 2 に示す。増幅には 2 \times Ampdirect Plus 10 μ l, F-Primer または R-Primer 0.5 μ l, DNA テンプレート 0.5 μ l, BIOTAQ 0.1 μ l と滅菌水 8.4 μ l に調合した PCR 反応液を用いた。PCR 反応プログラムを

表3に示す.反応にはサーマルサイクラーを用いて,95℃で10分間, DNAポリメラーゼの活性化を行なった後,熱変性を94℃で30秒間, アニールリングを60℃で1分間,伸長反応を72℃で1分間行なうサイクルを40回繰り返した.その後,72℃で7分間の伸長反応を追加した.増幅したPCR産物は4℃で保存した.

増幅したPCR産物は0.8%アガロースゲルを用い,電気泳動法により分離した.泳動は100Vで20分間とした.目的のDNA断片を回収し,Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systemを用いて精製し,シーケンスのDNAテンプレートとした.

シーケンス反応にはBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems)を用い,表4に示す反応液を調整した.シーケンス反応プログラムを表5に示す.シーケンス反応にはサーマルサイクラーを用い,反応条件は,96℃で10分間,DNAポリメラーゼの活性化を行なった後,熱変性を96℃で30秒間,アニールリングを50℃で15秒間,伸長反応を60℃で4分間行なうサイクルを25回繰り返し,その後,72℃で7分間の伸長反応を追加した.増幅したシーケンス反応液は10℃で保存した.

増幅後のシーケンス反応液に125 mM EDTAを2.5 μ lと99.5%エタノールを30 μ l添加して混合し,室温遮光条件で20分間放置した後,12,000 rpmで20分間遠心を行ない,DNAを沈殿させた.遠

沈後，直ちに上澄みを取り除き，70%エタノールでチューブ内を洗浄し，再び 12,000 rpm で 10 分間遠沈させ，直ちに上澄みを完全に取り除いた．その後，沈殿を一晚室温で乾燥させ，サンプルとした．乾燥後のサンプルに Hi-Di formamide を 20 μ l 添加しボルテックスで混合した後，95°C で 2 分間加熱し，氷水中で急冷した．ABI 310 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した．

分子系統解析には MEGA4 を用いた (Tamura *et al.* 2007)．分子系統樹は遺伝距離として Kimura (1980) の二変数法を用いた近隣結合 (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作成した．系統樹の作成にはエゾキスゲ (*Hemerocallis flava* L. var. *yezoensis* (H.Hara) M.Hotta)，ヤブカンゾウ (*Hemerocallis fulva* L. var. *kwanso* Regel) の塩基配列も合せて解析した．また，遺伝的多様性は Arlequin ver 3.5.1.2 を用いて，ハプロタイプ多様度および塩基多様度を算出した．以上の解析を行う際，霧多布湿原と霧多布岬，積丹岬と神威岬および湧洞沼と晩成はそれぞれ浜中町，積丹町および豊頃町とした．

結 果

ゼンテイカの葉緑体ゲノムにおける *trn H - psb A* 領域の塩基配列を決定した結果、624 塩基 (AB716413) を決定できた (表 6)。しかし、この領域から多型は検出されなかった。

trn L (UAA) intron 領域の塩基配列を決定した結果、591 塩基を決定できた (表 7)。*trn L (UAA) intron* 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列を表 8 に示す。*trn L (UAA) intron* 領域には 6 箇所が多型が検出でき、その多型のうち 5 箇所は 1 塩基の挿入であり、1 箇所は 1 塩基置換であった。これらの遺伝変異の組合せから、8 つのハプロタイプ (A~H) の存在が確認された (AB727660 – AB727665, ハプロタイプ G と H は登録申請中)。北海道におけるゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn L (UAA) intron* 領域の塩基配列にもとづく採取地ごとのハプロタイプ出現割合を図 24 に示す。乙部町で採取した 9 個体のハプロタイプ割合は A : C : D : E : F が 3 : 1 : 3 : 1 : 1 となった (表 9)。浜中町で採取した 28 個体のハプロタイプ割合は A : B : D が 25 : 2 : 1 となった (表 10)。紋別市で採取した 15 個体のハプロタイプ割合は A : D が 14 : 1 となった (表 11)。函館市で採取した 20 個体のハプロタイプ割合は A : H が 19 : 1 となった (表 12)。豊頃町で採取した 24 個体のハプロタイプ割合は A : G が 23 : 1 となった (表 13)。新冠町で採取した 12 個体のハプロタイプ割合は A :

H が 11 : 1 となった (表 14). 積丹町 (表 15), 共和町 (表 16), 豊富町 (表 17), 雨竜町 (表 18), 上川町浮島湿原 (表 19), 黒岳 (表 20), 旭岳 (表 21), 高原温泉 (表 22) で採取した個体はすべてハプロタイプ A であった. ハプロタイプ A はいずれの採取地でも確認できたが, ハプロタイプ B は浜中町でしか確認できなかった. また, ハプロタイプ D は浜中町と乙部町で, ハプロタイプ H は函館市と新冠町で確認できた. 一方, ハプロタイプ C, E, F は乙部町, ハプロタイプ G は豊頃町でしか確認できず, 地域間で出現するハプロタイプやその出現割合に差が生じた.

一方, 近縁種のエゾキスゲおよびヤブカンゾウの *trn L* (UAA) intron 領域の塩基配列を決定した結果, エゾキスゲは 591 塩基 (表 23), ヤブカンゾウは 591 塩基 (表 24) を決定できた. エゾキスゲはゼンテイカのハプロタイプ A の塩基配列と一致し, ヤブカンゾウはゼンテイカのハプロタイプ A の一塩基置換であった.

得られた塩基配列を, 木村の二変数法を用いた近隣結合法で系統解析した. エゾキスゲ, ヤブカンゾウの塩基配列も合せて解析した. その結果, 確認されたゼンテイカの 8 つのハプロタイプはクレード I (E, F) とクレード II (A, B, C, D, G, H) に分けられた (図 25). 乙部町ではクレード I : II の割合が 2 : 7 となり, その他の採取地では全個体がクレード II であった. クレード I は乙部町でしか

確認できなかった（図 26）。また，エゾキスゲはクレードⅡに分類され，ヤブカンゾウは別クレードとなった。

また，算出したゼンテイカのハプロタイプ多様度，塩基多様度を表 25 に示す。乙部町のハプロタイプ多様度は 0.8333 で塩基多様度は 0.001967 となった。浜中町のハプロタイプ多様度は 0.2037 で塩基多様度は 0.000352 であった。紋別市のハプロタイプ多様度は 0.1333 で塩基多様度は 0.000225 であった。函館市のハプロタイプ多様度は 0.1000 で塩基多様度は 0.000169 であった。豊頃町のハプロタイプ多様度は 0.0833 で塩基多様度は 0.000281 であった。新冠町のハプロタイプ多様度は 0.1667 で塩基多様度は 0.000282 であった。積丹町，共和町，豊富町，雨竜町，浮島湿原，黒岳，旭岳および高原温泉のハプロタイプ多様度と塩基多様度は 0 であった。また，北海道においてのハプロタイプ多様度は 0.1023 で塩基多様度は 0.000202 であった。算出したハプロタイプ多様度と塩基多様度のどちらも最も高かったのはハプロタイプが多く検出された乙部町であった。

考 察

本研究の結果, *trn H - psb A* 領域には多型が見られなかったが, *trn L (UAA) intron* 領域には 6 箇所が多型が検出できた. その多型のうち 5 箇所は 1 塩基の挿入であり, 1 箇所は 1 塩基置換であった. これらの多型の組合せから, 8 つのハプロタイプ (A~H) の存在が確認された. また, これらのハプロタイプの分布は採取地間で異なり, 乙部町など海岸部で出現するハプロタイプ数の多い採取地が多かった (図 24). さらに, 浜中町の霧多布湿原と霧多布岬という非常に近い場所でも, 両個体群は異なる遺伝変異を有していることが明らかとなった. この結果は佐藤ら (2009) がオオサクラソウで, 横田ら (2010) がミゾソバで, 葉緑体ゲノムの塩基配列の解析を行ない隣接する個体群であっても異なる遺伝変異を有する可能性があるとした報告に一致した. また, 山城・山城 (2008) がアロザイム分析によってキレンゲショウマの遺伝的多様性を検討した報告も同様の結果であった. 松田 (2002) が無計画な植物の移動は遺伝子攪乱の危険性があり, わずかに残った個体群の価値まで失う可能性や移動先の個体群の存続に悪影響をおよぼす恐れを指摘していることから, 地理的に近い個体群であっても種子や個体の移動は遺伝子攪乱を引き起こす可能性がある. これらのことから, 異なる個体群へ種子や個体を移動するには, 個体群の遺伝変異や遺伝的多様性を考慮した

移動計画の立案が必要であることを示唆している。

ゼンテイカの採取時の開花状況を見ると、海岸部では開花個体が多く群生し、1個体の葉数は10~20枚程度であったが、内陸部では開花個体が少なく点在し、1個体の葉数は5~10枚程度と少なく、開花個体の割合が低かった(データ省略)。このことから、海岸部では内陸部に比べて開花周期が早いことが伺え、海岸部では内陸部に比べて世代交代が早いことを示唆している。このことは海岸部で遺伝変異の多い要因の一つと推測された。また、開花個体の多い海岸部はエゾシカによる採食の機会が多く、開花個体の少ない内陸部では採食の機会は少ないことが予想される。しかし、採食の悪影響は海岸部に比べ内陸部で大きいことが伺える。このことは地域絶滅した可能性のある雲井ヶ原湿原の事例からも推測できる。これらのことから、北海道に分布するゼンテイカの場合、内陸部と海岸部では遺伝変異や生態特性が大きく異なり、種子や個体の移動には一層の注意が必要と考えられた。

本研究では近縁種のエゾキスゲとヤブカンゾウの解析を行った。エゾキスゲはゼンテイカのハプロタイプ A の塩基配列と一致し、ヤブカンゾウはゼンテイカのハプロタイプ A の一塩基置換であった。本研究ではエゾキスゲとゼンテイカを葉緑体ゲノムの *trn L* (UAA) intron 領域の塩基配列では区別できなかった。ゼンテイカとエゾキ

スゲは花色と開花時刻で分類される。しかし、花色はエゾキスゲの黄色、ゼンテイカの橙黄色とされ、両者の個体変異は連続的である（佐竹 1982）。また、開花時刻は重複する時間帯もあり明確に両者を分類することは非常に難しい。本研究に供試したエゾキスゲは浦河郡浦河町に自生している個体を花色によってエゾキスゲと判断した。しかし、明確な同定には至っていない。この点から考え、本研究結果は明確に同定されたエゾキスゲの個体を用いて再解析し、ゼンテイカの *trn L (UAA) intron* 領域との区別が可能か否かを判断すべきである。また、ヤブカンゾウは北海道上川町層雲峡付近と酪農学園大学実験圃場の側溝から採取した個体を用いた。ヤブカンゾウはノカンゾウの変種であると考えられている。しかし、本研究の結果、ヤブカンゾウの塩基配列はゼンテイカの塩基配列に酷似し、差異は一塩基置換のみであった。このことから、北海道に自生するヤブカンゾウはゼンテイカが八重化した突然変異系統である可能性が示唆され、ヤブカンゾウの分類学的位置を明確にするには、これらの視点に立った詳細な分子生物学的手法を用いた解析を行なう必要がある。

一方、本研究では、*trn H - psb A* 領域と *trn L (UAA) intron* 領域の2領域を用いて遺伝変異の検討を行い、いくつかの変異を確認することができた。Noguchi *et al.* (2004) の報告ではゼンテイカの *trn*

L (UAA) intron 領域に全国で 8 箇所が多型が検出され 8 種のハプロタイプが報告され、北海道では 3 箇所が多型が検出され 3 種のハプロタイプが報告されている。しかし、これらの多型は本研究で検出された多型とはいずれも一致しなかった。また、釧路と江差は同じハプロタイプであったと報じたが、本研究ではこれらの採取地に近い浜中町と乙部町で大きな違いが見られた。本研究と先行研究では多くの点で結果が異なった。今後、各採取地で採取個体を増やし解析精度を高めるほか、再分析をする必要があるものと考えられた。さらに、復元の観点からゼンテイカの遺伝的多様性について検討したが、地域の植生復元を考える場合、本研究の結果だけでは不足する部分が多々ある。採取地や対象植物を増やすことで基礎的知見を集積し、個体数の減少や個体群の消失が危惧される個体群を復元する指針を構築する必要がある。

被子植物であるワレモコウでは、他領域ではあるが遺伝的多様性が検討されており（佐伯ら 2012）、ハプロタイプ多様度は 0.81 で塩基多様度は 0.0014 であった。本研究の北海道におけるゼンテイカのハプロタイプ多様度は 0.10 で塩基多様度は 0.000202 であり、ワレモコウ比べてはるかに低かった。このことから、ゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn H - psb A* 領域と *trn L (UAA) intron* 領域の 2 領域における遺伝的多様性は極めて低いことが示唆された。

摘 要

本研究では復元の観点から遺伝的多様性に関する基礎的知見を得るため、北海道に分布するゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn H - psb A* 領域および *trn L (UAA) intron* 領域に注目し北海道の 14 地点 230 個体の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、遺伝的多様性を調べた。

その結果、*trn H - psb A* 領域では 624 塩基を決定できたが、多型は検出されなかった。*trn L (UAA) intron* 領域の塩基配列を決定した結果、591 塩基を決定できた。5 箇所の 1 塩基の挿入と 1 箇所の 1 塩基置換の多型から、8 つのハプロタイプ (A~H) の存在が検出された。乙部町では A : C : D : E : F が 3 : 1 : 3 : 1 : 1、浜中町では A : B : D が 25 : 2 : 1 となった。紋別市では A : D が 14 : 1 となった。函館市では A : H が 19 : 1 となった。豊頃町では A : G が 23 : 1 となった。新冠町では A : H が 11 : 1 となった。積丹町、共和町、豊富町、雨竜町、上川町浮島湿原、黒岳、旭岳、高原温泉ではすべてハプロタイプ A であった。ハプロタイプ A はいずれの採取地でも確認できたが、ハプロタイプ B は浜中町でしか確認できなかった。また、ハプロタイプ D は浜中町と乙部町で、ハプロタイプ H は函館市と新冠町で確認できた。一方、ハプロタイプ C, E, F は乙部町、ハプロタイプ G は豊頃町でしか確認できず、地域間で出現するハプロ

タイプやその出現割合に差が生じた。

本実験で明らかにし 8 つのハプロタイプを近隣結合法により分子系統樹を作成した。その結果、クレード I (E, F) とクレード II (A, B, C, D, G, H) に分けられた。

また、ハプロタイプ多様度と塩基多様度を算出した結果、どちらもハプロタイプが多く検出された乙部町が最も高かった。

謝 辞

本研究を遂行および取りまとめるにあたり，資源植物学研究室の我妻尚広教授，植物育種学研究室の岡本吉弘准教授，園芸学研究室の森志郎准教授には，終始熱心なご指導とご助言を頂きました。

そして，北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園の東隆行助教には本研究の遂行や植物の分類にご助言をいただきました。心より感謝の意を表します。

さらに，国立・国定公園および道立自然公園内等における，植物採取許可申請ならびにそれにともなう国有林および道有林等への入林承認申請にともない，稚内自然保護官事務所の水野様，上川自然保護官事務所の大澤様ならびに野川様，東川自然保護官事務所の佐藤様，上川中部森林管理署の村上様，石狩森林管理署の松坂様，後志森林管理署の中島様，桧山森林管理署の小林様，上川総合振興局環境生活課の佐藤様，上川総合振興局南部森林室の奥山様，空知総合振興局環境生活課の藤本様，空知総合振興局森林室の藤田様，後志総合振興局環境生活課の斉藤様，渡島総合振興局環境生活課の熊中様，新冠町産業課の岡井様、大樹町商工観光課の清原様、浜中町商工観光課の越田様、雨竜町教育委員会の柿崎様，上川町教育委員会の塚田様，東川町教育委員会の佐藤様，豊頃町教育委員会の佐藤様には数々のご助言をいただきました。心より感謝の意を表します。

なお、本研究の一部は平成 23 年度、霧多布湿原学術研究助成をうけて実施しました。

また、ともに勉学に励み、貴重な学生生活を送った植物遺伝学専攻の小林幹仙氏、ならびに資源植物学研究室の後輩の皆様、先に社会に出た先輩・同輩の皆様に、深くお礼申し上げます。

最後に、私生活と学業を続けることを支えてくれた家族に心から感謝致します。

引用文献

- Amoatey, H. M. and R. A. E. Tilney-Bassett. (1994) A test of the complementary gene model for the control of iparental plastid inheritance in zonal pelargoniums. *Heredity* 72:69- 77.
- 藤木大介, 岸本康誉, 坂田宏志 (2011) 兵庫県氷ノ山山系におけるニホンジカ *Cervus nippon* の動向と植生の状況, 保全生態学研究 16 (1) :55-67.
- 平原友紀, 矢原興一, 星野卓二 (2007) 絶滅危惧種ビャッコイ (*Isolepis crassiuscula* Hook. f.) の染色体と葉緑体遺伝子の分析, 日本植物分類学会誌 7 (1) :23-30.
- 北海道 (2010) 「森林の活用促進」 <<http://www.kamikawa.pref.hokkaido.lg.jp/sr/nsr/kannri/rikatu/syoukai/sinrinkatuyounosokusin/sinpezi.htm>> (最終アクセス日 2014 年 1 月 21 日)
- 北海道 (2013) 「平成 23 年度エゾシカによる農林業被害金額の推移」 < <http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ks/est/> > (最終アクセス日 2014 年 1 月 21 日)
- Kawase, D. , Yumoto, T. and Sato, K. (2009) Phylogeography of a Rare Serpentine Plant, *Arenaria katoana* Makino (Caryophyllaceae). *Acta phytotaxonomica et geobotanica* : APG 60 (1) :19-25.
- Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of

base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

北本尚子, 上野真義, 津村義彦, 鷲谷いづみ, 大澤良 (2005) 絶滅危惧植物サクラソウ (*Primula sieboldii*) におけるマイクロサテライトマーカーの開発. *保全生態学研究* 10: 47-51.

北本尚子, 本城正憲 (2007) サクラソウの保全と集団遺伝学, “植物の進化 基本概念からモデル生物を活用した比較・進化ゲノム学まで”, 清水 健太郎・長谷部 光泰 慣習, 秀潤社, 東京. 44- 47.

小林伸雄, 應地信宏, 嬉野健次, 中務明, 細木高志 (2008) 山陰地域を中心としたキシツツジ *Rhododendron ripense* Makino の形態的調査と葉緑体 DNA 分析による遺伝資源評価. 7: 181- 187.

駒井千恵子 (2011) 「原生花園の主役たち 海岸草原を彩る 6~7月の花々」 *faura* 32, 有限会社ナチュラルー, pp.14-17.

Kress, W. J. , K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weigt and D. H. Janzen (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8369-8374.

松田裕之 (2002) 「保全と復元の生物学」野生生物を救う科学的思考, 種生物学会編, 野生生物を救う科学的思考とは何か?, 文一総合出版, pp. 19-36.

宮村由美, 沖垣達, 星野卓二 (1995) スゲ属シバスゲ節における葉

- 緑体 DNA を用いた分子系統学的研究. University of Science 31: 187-194.
- 野口順子 (1988) 異質染色質の変異よりみた日本列島におけるゼンテイカ群の変遷史と分化, 植物分類・地理 39 (1~3) :25-36.
- Noguchi, J, D. -Y. Hong, and W. F. Grant (2004) The historical evolutionary development of *Hemerocallis middendorffii* (Hemerocallidaceae) revealed by non-coding regions in chloroplast DNA. Plant Systematics and Evolution 247:1-22.
- 農林水産省 (2013) 「全国の野生鳥獣による農作物被害状況について(平成 23 年度)」 < <http://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/index.html> > (最終アクセス日 2014 年 1 月 21 日)
- Okaura, T. and Harada, K.(2002a) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) , Heredity 88 :193-208.
- Okaura, T. and K. Harada (2002b) Phylogeographical structure revealed by chloroplastDNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata*Blume). Heredity 88: 322–329.
- 大澤雅彦 (2001) 生態学からみた身近な植物群落の保護, 日本自然保護協会編, 1.3 植物群落保護の考え方, 講談社, pp. 58-68.
- Pellerin, S. , Huot, J. , Côté, SD (2006) Longterm effects of deer

browsing and trampling on the vegetation of peatlands. *Biological Conservation* 128 :316-326.

佐伯いく代, 飯田晋也, 小池文人, 小林慶子, 平塚和之 (2012) 里山の指標種ワレモコウの遺伝的変異. *日本緑化工学会誌* 38(1):115-120.

Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

佐竹義輔 (1982) 日本の野生植物草本 I 単子葉類, 佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・亙理俊次・富成忠夫編, ユリ科 LILIACEAE, 平凡社, pp. 30-31.

佐藤由佳, 我妻尚広, 岡本吉弘 (2009) 北海道野生集団におけるオサクラソウの葉緑体ゲノムの遺伝的変異, *日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報* (50) :23-24.

Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, J. Obokata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, 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. *The EMBO Journal* 5: 2043-2049.

助野実樹郎, 宮木雅美 (2007) エゾシカの増加が洞爺湖中島の維管束植物相に与えた影響, *Wildlife Conservation Japan* ,11 (1) :43-66.

田村淳, 入野彰夫, 山根正伸, 勝山輝男 (2005) 丹沢山地における植生保護柵による希少植物のシカ採食からの保護効果, *保全生態学研究*,10 :11-17.

田村淳 (2010) ニホンジカの採食により退行した丹沢山地冷温帯自然林における植生保護柵の設置年の差異が多年生草本の回復に及ぼす影響, *保全生態学研究*,15 (2) :255-264.

Tamura,K., Joel Dudley, Masatoshi Nei and Sudhir Kumer (2007)
Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

津村義彦 (2001) プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド, “森の分子生態学” ,種生物学会編, 文一総合出版, 東京.158-169.

Ueno, S., Y. Tsumura and I. Washitani (2003) Development of microsatellite markers in *Primula sieboldii* E.Morren, a threatened Japanese perennial herb. *Conservation Genetics* 4: 809-811.

梅沢俊, 菅原靖彦 (1990) 「雲井ヶ原」北海道夏山ガイド② 表大雪の山々, 北海道新聞社, pp. 142-145.

矢原徹一 (2002)「保全と復元の生物学」野生生物を救う科学的思考,

種生物学会編，保全生物学における生物地理学の役割，文一総合出版，pp. 199 -201.

山城考，山城明日香 (2008) キレンゲショウマ (ユキノシタ科) の遺伝的多型と遺伝的分化に関する解析，阿波学会紀要 第 54 号:45-48.

横田仁美，我妻尚広，岡本吉弘 (2010) ミゾソバにおける葉緑体ゲノムの遺伝変異，日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報 (51) :95-96.

Genetic divergence of chloroplast genome *Hemerocallis dumortieri* var. *esculenta* in Hokkaido.

Hikari ISHIDA

Summary

The genetic diversity of *Hemerocallis dumortieri* var. *esculenta* chloroplast DNA (cpDNA) region of *trn* H - *psb* A and *trn* L (UAA) intron was examined to obtain the fundamental knowledge of reconstruction. In this study, 230 individuals sampled from the 14 populations collected in Hokkaido were used.

The populations were classified into eight groups (A to H) according to the haplotype on the basis of five deletions and one nucleotide substitution in the *Hemerocallis dumortieri* var. *esculenta* cpDNA region of *trn* L (UAA) intron. Haplotypes varied with the collected population and the locality. *Hemerocallis dumortieri* var. *esculenta* in Shakotan, Kyouwa, Toyotomi, Uryuu, Ukishima, Kurodake, Asahidake and Kougenonnsen had only haplotype A. Otobe had five haplotypes, A, C, D, E and F at a ratio of 3:1:3:1:1. Hamanaka had three haplotypes, A, B and D at a ratio of 25:2:1. Monbetsu had two haplotypes, A and D at a ratio of 14:1. Hakodate had two haplotypes, A and H at a ratio of 19:1. Toyokoro had two haplotypes, A and G at a ratio of 23:1. Niikappu had two haplotypes, A and H at a ratio of 11:1. Haplotypes C, E and F were discovered from Otobe populations, whereas haplotypes G were distributed in Toyotomi populations.

Consequently, these results will provide a foundation for the reconstruction of *Hemerocallis dumortieri* var. *esculenta*.



図1. 北海道に自生するゼンテイカ.



図2. 霧多布湿原におけるゼンテイカのエゾシカによる食害の様子.



図3. 2012年7月18日(ゼンテイカの開花期)の雲井ヶ原の様子.



図4. ゼンテイカを採取した乙部町の海岸線沿いの岩場の様子.



図5. ゼンテイカを採取した浜中町霧多布湿原に設置された木道沿いの様子。



図6. ゼンテイカを採取した浜中町霧多布岬の海岸段丘の上部草原の様子。



図7. ゼンテイカを採取した積丹町積丹岬の岩場の様子.



図8. ゼンテイカを採取した積丹町神威岬の岩場の様子.



図9. ゼンテイカを採取した共和町神仙沼に設置された木道沿いの様子.



図10. ゼンテイカを採取した紋別市オムサロ原生花園付近の湿地の様子.



図11. ゼンテイカを採取した豊富町サロベツ湿原に設置された木道沿いの様子.



図12. ゼンテイカを採取した雨竜町雨竜沼湿原に設置された木道沿いの様子.



図13. ゼンテイカを採取した恵山町恵山岬の岩場の様子.



図14. ゼンテイカを採取した豊頃町湧洞沼の湿地の様子.



図15. ゼンテイカを採取した豊頃町晩成の海岸線付近の草原の様子.



図16. ゼンテイカを採取した新冠町判官館森林公園の遊歩道沿いの様子.



図17. ゼンテイカを採取した上川町浮島湿原に設置された木道沿いの様子.



図18. ゼンテイカを採取した上川町黒岳のリフトのりば付近の様子.



図19. ゼンテイカを採取した東川町旭岳の第一天女が原・第二天女が原に設置された木道沿いの様子.



図20. ゼンテイカを採取した上川町高原温泉の沼めぐりコースに設置された木道沿いの様子.



図21. DNA抽出の材料となる葉の採取の様子。



図22. 浦河郡浦河町の道路沿いから葉を採取したエゾキスゲ。



図23. 上川郡上川町の道路沿いから葉を採取したヤブカンゾウ.

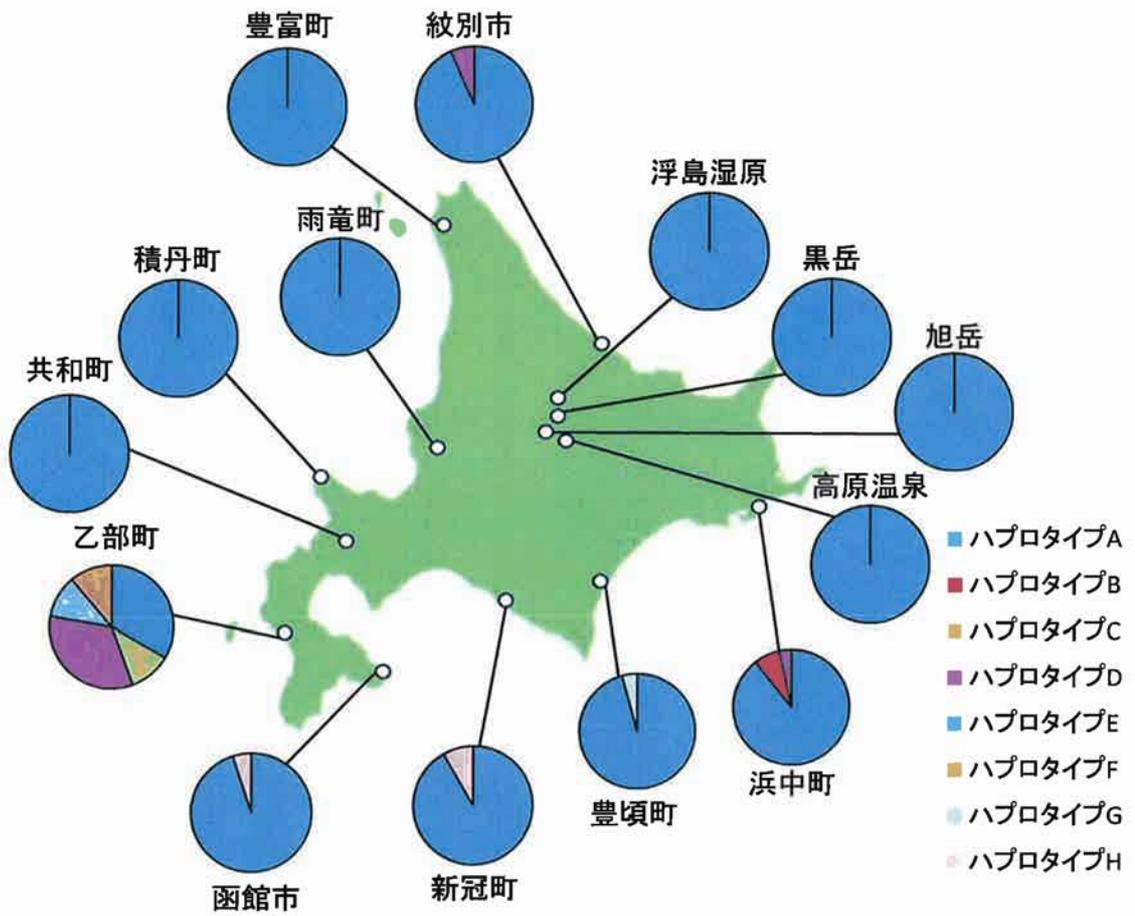


図24. 北海道におけるゼンテイカの葉緑体ゲノム*trnL* (UAA) intron領域の塩基配列にもとづく採取地ごとのハプロタイプ出現割合.

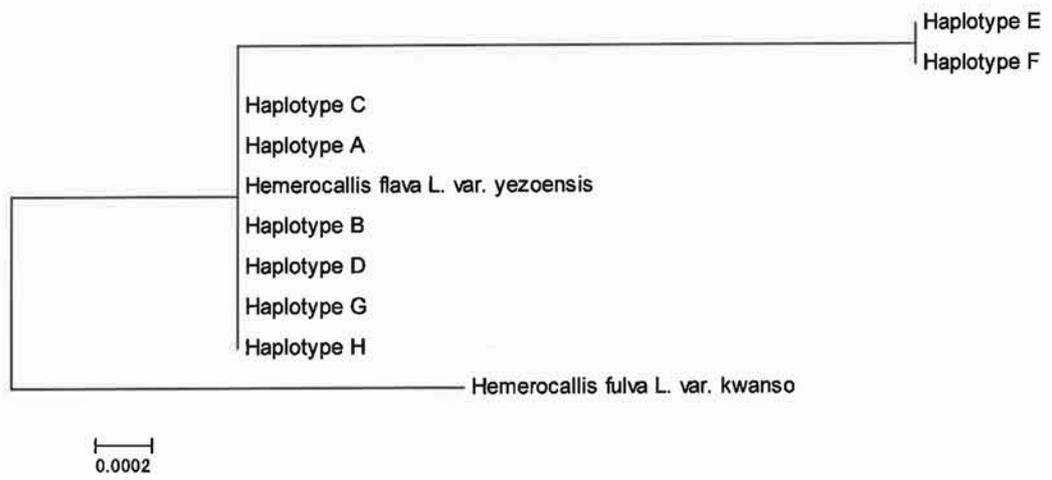


図25. ゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn* L (UAA) intron 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプを近隣結合法により構築した系統樹.

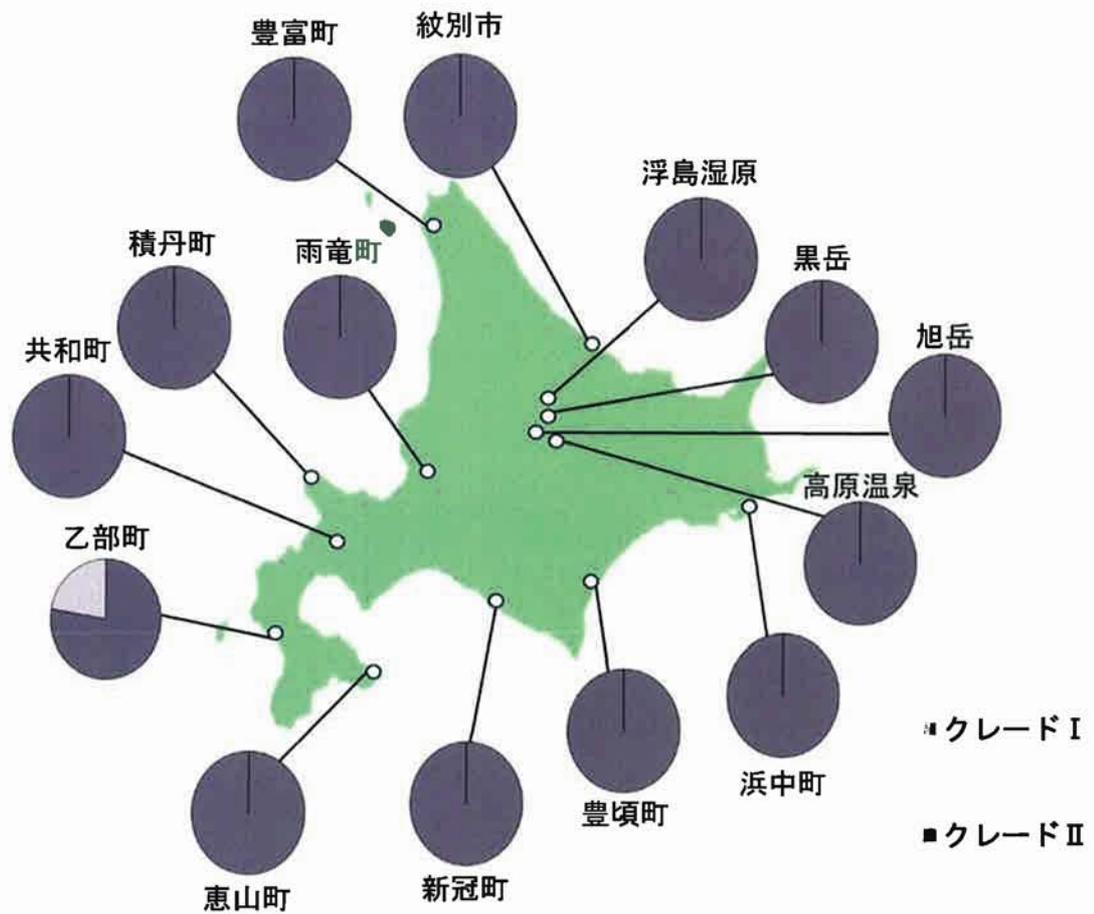


図26. 北海道におけるゼンテイカの葉緑体ゲノム *trn L* (UAA) intron 領域の塩基配列にもとづく採取地ごとのクレード出現割合.

表1. 採取したゼンテイカ集団の位置, 採取日, 緯度, 経度および採取個体数.

採取地点	採取日	緯度	経度	採取個体数
乙部町	2011年6月16日	42° 3′	140° 4′	9
浜中町霧多布湿原	2011年7月13日	43° 3′	145° 5′	14
浜中町霧多布岬	2011年7月14日	43° 4′	145° 9′	14
積丹町積丹岬	2012年6月21日	43° 22′	140° 29′	17
積丹町神威岬	2012年6月21日	43° 19′	140° 21′	6
共和町	2012年6月22日	42° 54′	140° 35′	18
紋別市	2012年7月19日	44° 23′	143° 17′	15
豊富町	2012年7月19日	45° 6′	141° 41′	13
雨竜町	2012年8月14日	43° 41′	141° 36′	5
函館市	2013年6月12日	41° 48′	141° 11′	20
豊頃町湧洞沼	2013年6月26日	42° 36′	143° 33′	17
豊頃町晩成	2013年6月26日	42° 31′	143° 28′	7
新冠町	2013年6月27日	42° 21′	143° 28′	12
上川町浮島湿原	2013年7月17日	43° 55′	142° 57′	15
上川町黒岳	2013年7月18日	43° 42′	142° 56′	14
東川町旭岳	2013年7月25日	43° 38′	142° 48′	16
上川町高原温泉	2013年8月 8日	43° 37′	142° 54′	18

表2. PCR反応に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列

葉緑体ゲノム領域	プライマー配列 (5' to 3')
<i>trn</i> H (GUG)	ACGGGAATTGAACCCGCGCA
<i>psb</i> A	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
<i>trn</i> L (UAA) intron F	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trn</i> L (UAA) intron R	GGGGATAGAGGGACTTGAAC

表3. PCR反応プログラム

予備加熱	95°C	10min	} 40サイクル
熱変性	94°C	30s	
アニーリング	60°C	60s	
伸長反応	72°C	60s	
反応停止	72°C	7min	
冷却	4°C	∞	

表4. シークエンス反応液の調整

Reaction Mix (Big Dye ver1.1)	1.0μl
5× Sequence Buffer	1.5μl
Primer (5倍希釈)	0.5μl
DNA テンプレート	0.5μl
滅菌水	6.5μl
計	10.0μl

表5. シークエンス反応プログラム

予備加熱	96°C	10min	} 25サイクル
熱変性	96°C	30s	
アニーリング	50°C	15s	
伸長反応	60°C	4min	
冷却	10°C	∞	

表6. ゼンテイカ葉緑体ゲノム *trnH-psbA* 領域の塩基配列 (624bp).

1	TGGTGGATTC	ACAATCCACT	GCCTTGATCC	ACTTGGCTAC	ATCGCCCT
51	TATCTAGCTA	AAGGATTTTC	TCTTTTTTCC	ATTCATCATT	ATTGTATATT
101	CATCATTATT	GTAATTGTAT	TTATTCTTAC	TTTCATACTT	AGATCGAGAT
151	ATTCTATTAG	ACGTAGAATG	CCAATCTTTA	AAAGAAAATG	TAAAAAAAAG
201	GAGTAATCAG	CTGTGACACG	TTCACTAAAA	AAAAATCCTT	TTGTAGCTAA
251	TCATTTAGCA	GGAAAAATGG	AAAACTCAA	CATGAGGGAG	GAGAAAGAAA
301	TAATAGTAAC	TTGGTCTCGG	GCATCTACCA	TTATACCCAC	AATGATTGGC
351	CATACAATCG	CTATTCATAA	TGGAAAAGAA	CATTTACCTA	TTTATATAAC
401	GGATCGTATG	GTAGGTCACA	AATTGGGAGA	AGTCGCGCCT	ACTCTGACTT
451	TCGCGAGACA	TGCGAGAAAC	GATAATAAAT	CTCGTCGTTA	AGTCGTTAAT
501	TTGGCGGAAT	CAAAAAAGAA	TAGAATAAAT	CATTCAAAGC	AAAGAAGGGG
551	ATATGCCCAT	ACATATCTTT	CTAAAGGAAG	ATACATATGG	GTATAGCCCC
601	TTTACCATT	CTTAATGTAT	TAAG		

表7. ゼンテイカ葉緑体ゲノム *trn L* (UAA) intron領域の塩基配列 (591bp; ハプロタイプA).

1	GGTCCCAAAA	GTACGGACCT	CCCGTAGACG	GATTGGGTTT	AGCCCTAGTA
51	TGGAAACCCG	GTAAATGGTA	ACTTCCCAAA	TCAGAGAAAC	CCCGGAACTT
101	AAAATGGGCC	ATCCTTAGCC	CAATTTTTTT	TTTTTCAAAA	AAGGTTTTTT
151	TTTTGAAACT	CGAATAAAAA	AAGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTG
201	TTCTAACGAA	TGGAGTTGAC	TACGTTGTGT	TGGTAGCCGG	AATCCTTCTA
251	TCGAAATTCA	AAAAAGGATG	ACTATATATC	TAATACATAC	GTATACATAC
301	TGACATATCA	AACGATTAAT	CATGACCCGA	ATTAGTATTA	TATATATGAA
351	AAATTCAGAG	TTATTGTGGA	TCTATTCCAA	TCGAAGTTGA	AGGAAGAACA
401	GAATATTTAA	TGATCAAATC	ATTCATTCCA	GGGTTTGATA	GGCCTTTACT
451	TTTTTTTGAC	AAACTGATTA	ATCGGACGAG	AATAAAGAGA	GAGTCCCATT
501	CTACATGTCA	ATACCGACAA	CAATGAAATT	TATAGTAAGA	GGAAAATCCG
551	TCGACTTTAA	AAATCGTGAG	GGTTCAAGTC	CCTCTATCCC	C

表8. *trn* L (UAA) intron領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列.

	152-163									170-176									
ハプロタイプ A	T	T	T	-	G	A	A	A	-	C	T	C	A	A	A	-	G	A	T
ハプロタイプ B	A	.	.	.
ハプロタイプ C
ハプロタイプ D
ハプロタイプ E
ハプロタイプ F
ハプロタイプ G	A	A	.	.	.
ハプロタイプ H	.	.	.	T

201-207				429-435					503-509											
G	T	T	-	C	T	A	T	C	C	-	A	G	G	T	C	T	A	C	A	T
.	
.	.	.	T	
.	C	
.	C	C	.	.	.	
.	
.	

表中の・はハプロタイプAと同一の配列であることを示し、-は欠失していることを示す

表9. 乙部町豊浜における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
乙部町1	豊浜	A	海岸岩場
乙部町2	豊浜	A	海岸岩場
乙部町3	豊浜	C	海岸岩場
乙部町4	豊浜	F	海岸岩場
乙部町5	豊浜	E	海岸岩場
乙部町6	豊浜	A	海岸岩場
乙部町7	豊浜	D	海岸岩場
乙部町8	豊浜	D	海岸岩場
乙部町9	豊浜	D	海岸岩場

表10. 浜中町における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
浜中町1	霧多布湿原	A	湿原
浜中町2	霧多布湿原	A	湿原
浜中町3	霧多布湿原	A	湿原
浜中町4	霧多布湿原	B	湿原
浜中町5	霧多布湿原	A	湿原
浜中町6	霧多布湿原	A	湿原
浜中町7	霧多布湿原	A	湿原
浜中町8	霧多布湿原	D	湿原
浜中町9	霧多布湿原	A	湿原
浜中町10	霧多布湿原	A	湿原
浜中町11	霧多布湿原	A	湿原
浜中町12	霧多布湿原	A	湿原
浜中町13	霧多布湿原	A	湿原
浜中町14	霧多布湿原	A	湿原
浜中町15	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町16	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町17	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町18	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町19	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町20	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町21	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町22	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町23	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町24	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町25	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町26	霧多布岬	A	海岸岩場
浜中町27	霧多布岬	B	海岸岩場
浜中町28	霧多布岬	A	海岸岩場

表11. 紋別市オムサロ原生花園付近における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
紋別市1	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市2	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市3	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市4	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市5	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市6	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市7	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市8	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市9	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市10	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市11	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市12	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市13	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市14	オムサロ原生花園付近	A	海岸湿地
紋別市15	オムサロ原生花園付近	D	海岸湿地

表12. 函館市恵山岬における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
函館市1	恵山岬	A	海岸岩場
函館市2	恵山岬	A	海岸岩場
函館市3	恵山岬	A	海岸岩場
函館市4	恵山岬	A	海岸岩場
函館市5	恵山岬	A	海岸岩場
函館市6	恵山岬	A	海岸岩場
函館市7	恵山岬	A	海岸岩場
函館市8	恵山岬	A	海岸岩場
函館市9	恵山岬	A	海岸岩場
函館市10	恵山岬	A	海岸岩場
函館市11	恵山岬	A	海岸岩場
函館市12	恵山岬	A	海岸岩場
函館市13	恵山岬	A	海岸岩場
函館市14	恵山岬	A	海岸岩場
函館市15	恵山岬	A	海岸岩場
函館市16	恵山岬	A	海岸岩場
函館市17	恵山岬	A	海岸岩場
函館市18	恵山岬	H	海岸岩場
函館市19	恵山岬	A	海岸岩場
函館市20	恵山岬	A	海岸岩場

表13. 豊頃町における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
豊頃町1	湧洞沼	A	沼地
豊頃町2	湧洞沼	A	沼地
豊頃町3	湧洞沼	A	沼地
豊頃町4	湧洞沼	A	沼地
豊頃町5	湧洞沼	A	沼地
豊頃町6	湧洞沼	A	沼地
豊頃町7	湧洞沼	A	沼地
豊頃町8	湧洞沼	A	沼地
豊頃町9	湧洞沼	G	沼地
豊頃町10	湧洞沼	A	沼地
豊頃町11	湧洞沼	A	沼地
豊頃町12	湧洞沼	A	沼地
豊頃町13	湧洞沼	A	沼地
豊頃町14	湧洞沼	A	沼地
豊頃町15	湧洞沼	A	沼地
豊頃町16	湧洞沼	A	沼地
豊頃町17	湧洞沼	A	沼地
豊頃町18	晩成	A	海岸草原
豊頃町19	晩成	A	海岸草原
豊頃町20	晩成	A	海岸草原
豊頃町21	晩成	A	海岸草原
豊頃町22	晩成	A	海岸草原
豊頃町23	晩成	A	海岸草原
豊頃町24	晩成	A	海岸草原

表14. 新冠町判官館森林公園における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
新冠町1	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町2	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町3	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町4	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町5	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町6	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町7	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町8	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町9	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町10	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町11	判官館森林公園	A	海岸林床
新冠町12	判官館森林公園	H	海岸林床

表15. 積丹町積丹岬における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
積丹町1	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町2	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町3	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町4	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町5	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町6	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町7	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町8	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町9	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町10	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町11	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町12	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町13	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町14	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町15	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町16	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町17	積丹岬	A	海岸岩場
積丹町18	神威岬	A	海岸岩場
積丹町19	神威岬	A	海岸岩場
積丹町20	神威岬	A	海岸岩場
積丹町21	神威岬	A	海岸岩場
積丹町22	神威岬	A	海岸岩場
積丹町23	神威岬	A	海岸岩場

表16. 共和町神仙沼における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
共和町1	神仙沼	A	高層湿原
共和町2	神仙沼	A	高層湿原
共和町3	神仙沼	A	高層湿原
共和町4	神仙沼	A	高層湿原
共和町5	神仙沼	A	高層湿原
共和町6	神仙沼	A	高層湿原
共和町7	神仙沼	A	高層湿原
共和町8	神仙沼	A	高層湿原
共和町9	神仙沼	A	高層湿原
共和町10	神仙沼	A	高層湿原
共和町11	神仙沼	A	高層湿原
共和町12	神仙沼	A	高層湿原
共和町13	神仙沼	A	高層湿原
共和町14	神仙沼	A	高層湿原
共和町15	神仙沼	A	高層湿原
共和町16	神仙沼	A	高層湿原
共和町17	神仙沼	A	高層湿原
共和町18	神仙沼	A	高層湿原

表17. 豊富町サロベツ湿原における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
豊富町1	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町2	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町3	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町4	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町5	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町6	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町7	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町8	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町9	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町10	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町11	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町12	サロベツ湿原	A	湿原
豊富町13	サロベツ湿原	A	湿原

表18. 雨竜町雨竜沼湿原における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
雨竜町1	雨竜沼湿原	A	高層湿原
雨竜町2	雨竜沼湿原	A	高層湿原
雨竜町3	雨竜沼湿原	A	高層湿原
雨竜町4	雨竜沼湿原	A	高層湿原
雨竜町5	雨竜沼湿原	A	高層湿原

表19. 上川町浮島湿原における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
上川町1	浮島湿原	A	高層湿原
上川町2	浮島湿原	A	高層湿原
上川町3	浮島湿原	A	高層湿原
上川町4	浮島湿原	A	高層湿原
上川町5	浮島湿原	A	高層湿原
上川町6	浮島湿原	A	高層湿原
上川町7	浮島湿原	A	高層湿原
上川町8	浮島湿原	A	高層湿原
上川町9	浮島湿原	A	高層湿原
上川町10	浮島湿原	A	高層湿原
上川町11	浮島湿原	A	高層湿原
上川町12	浮島湿原	A	高層湿原
上川町13	浮島湿原	A	高層湿原
上川町14	浮島湿原	A	高層湿原
上川町15	浮島湿原	A	高層湿原

表20. 上川町黒岳における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
上川町16	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町17	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町18	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町19	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町20	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町21	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町22	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町23	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町24	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町25	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町26	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町27	黒岳	A	亜高山帯岩場
上川町28	黒岳	A	亜高山帯岩場

表21. 東川町旭岳における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
東川町1	旭岳	A	高層湿原
東川町2	旭岳	A	高層湿原
東川町3	旭岳	A	高層湿原
東川町4	旭岳	A	高層湿原
東川町5	旭岳	A	高層湿原
東川町6	旭岳	A	高層湿原
東川町7	旭岳	A	高層湿原
東川町8	旭岳	A	高層湿原
東川町9	旭岳	A	高層湿原
東川町10	旭岳	A	高層湿原
東川町11	旭岳	A	高層湿原
東川町12	旭岳	A	高層湿原
東川町13	旭岳	A	高層湿原
東川町14	旭岳	A	高層湿原
東川町15	旭岳	A	高層湿原
東川町16	旭岳	A	高層湿原

表22. 上川町高原温泉における個体記号, 採取地, ハプロタイプおよび採取環境.

個体記号	採取地	ハプロタイプ	採取環境
上川町29	高原温泉	A	高層湿原
上川町30	高原温泉	A	高層湿原
上川町31	高原温泉	A	高層湿原
上川町32	高原温泉	A	高層湿原
上川町33	高原温泉	A	高層湿原
上川町34	高原温泉	A	高層湿原
上川町35	高原温泉	A	高層湿原
上川町36	高原温泉	A	高層湿原
上川町37	高原温泉	A	高層湿原
上川町38	高原温泉	A	高層湿原
上川町39	高原温泉	A	高層湿原
上川町40	高原温泉	A	高層湿原
上川町41	高原温泉	A	高層湿原
上川町42	高原温泉	A	高層湿原
上川町43	高原温泉	A	高層湿原
上川町44	高原温泉	A	高層湿原
上川町45	高原温泉	A	高層湿原
上川町46	高原温泉	A	高層湿原
上川町47	高原温泉	A	高層湿原

表23. エゾキスゲ葉緑体ゲノム *trnL* (UAA) intron領域の塩基配列(591bp).

1	GGTCCCAAAA	CCCGTAGACG	GTACGGACCT	GATTGGGTTT	AGCCCTAGTA
51	TGGAAACCCG	GTAAATGGTA	ACTTCCCAAA	TCAGAGAAAC	CCCGGAACTT
101	AAAATGGGCC	ATCCTTAGCC	CAATTTTTTT	TTTTTCAAAA	AAGGTTTTTT
151	TTTTGAAACT	CGAATAAAAA	AAGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTG
201	TTCTAACGAA	TGGAGTTGAC	TACGTTGTGT	TGGTAGCCGG	AATCCTTCTA
251	TCGAAATTCA	AAAAAGGATG	ACTATATATC	TAATACATAC	GTATACATAC
301	TGACATATCA	AACGATTAAT	CATGACCCGA	ATTAGTATTA	TATATATGAA
351	AAATTCAGAG	TTATTGTGGA	TCTATTCCAA	TCGAAGTTGA	AGGAAGAACA
401	GAATATTTAA	TGATCAAATC	ATTCATTCCA	GGGTTTGATA	GGCCTTACT
451	TTTTTTTGAC	AAACTGATTA	ATCGGACGAG	AATAAAGAGA	GAGTCCCATT
501	CTACATGTCA	ATACCGACAA	CAATGAAATT	TATAGTAAGA	GGAAAATCCG
551	TCGACTTTAA	AAATCGTGAG	GGTTCAAGTC	CCTCTATCCC	C

表24. ヤブカンゾウ葉緑体ゲノム *tm L* (UAA) intron領域の塩基配列(591bp).

1	GGTCCCAAAA	CCCGTAGACG	GTACGGACCT	GATTGGGTTT	AGCCCTAGTA
51	TGGAAACCCG	GTAATGGTA	ACTTCCCAAA	TCAGAGAAAC	CCCGGAACTT
101	AAAATGGGCC	ATCCTTAGCC	CAATTTTTTT	TTTTTCAAAA	AAGGTTTTTT
151	TTTTGAAACT	CGAATAAAAA	AAGATAGGTG	CAGAGACTCA	ATGGAAGCTG
201	TTCTAACGAA	TGGAGTTGAC	TACGTTGTGT	TGGTAGCCGG	AATCCTTCTA
251	TCGAAATTCA	AAAAAGGATG	ACTATATATC	TAATACATAC	GTATACATAC
301	TGACATATCA	AACGATTAAT	CATGACCCGA	ATTAGTATTA	TATATATGAA
351	AAATTCAGAG	TTATTGTGGA	TCTATTCCAA	TCGAAGTTGA	AGGAAGAACA
401	GAATATTTAA	TGATCAAATC	ATTCATTCCA	GGGTTTGATA	GGCCTTTACT
451	TTTTTTTGAC	AAACTTATTA	ATCGGACGAG	AATAAAGAGA	GAGTCCCATT
501	CTACATGTCA	ATACCGACAA	CAATGAAATT	TATAGTAAGA	GGAAAATCCG
551	TCGACTTTAA	AAATCGTGAG	GGTTCAAGTC	CCTCTATCCC	C

表25. 北海道におけるゼンテイカの葉緑体ゲノム *trnL(UAA)* intron領域における遺伝的多様性.

	ハプロタイプの数	ハプロタイプ多様度	塩基多様度
乙部町	5	0.8333	0.001967
浜中町	3	0.2037	0.000352
積丹町	1	0.0000	0.000000
共和町	1	0.0000	0.000000
紋別市	2	0.1333	0.000225
豊富町	1	0.0000	0.000000
雨竜町	1	0.0000	0.000000
函館市	2	0.1000	0.000169
豊頃町	2	0.0833	0.000281
新冠町	2	0.1667	0.000282
浮島湿原	1	0.0000	0.000000
黒岳	1	0.0000	0.000000
旭岳	1	0.0000	0.000000
高原温泉	1	0.0000	0.000000
北海道	8	0.1023	0.000202