

ミゾソバ (*Persicaria thunbergii*(Siebold et Zucc.)H. Gross.) における 葉緑体ゲノムの遺伝変異

横田 仁美¹⁾・我妻 尚広²⁾・岡本 吉弘³⁾

Genetic diversity of chloroplast genome *Persicaria thunbergii* (Siebold et Zucc.) H. Gross.

Hitomi YOKOTA, Takahiro WAGATSUMA and Yoshihiro OKAMOTO
(Accepted 25 July 2011)

緒 言

近年、地球の自己修復機能や浄化作用を上回る開発や汚染で、地球環境は悪化している。中でも、熱帯林の減少や砂漠化、温暖化などにより生物の消失が危惧されている。これらを受けて1992年に「生物の多様性に関する条約」が成立した。生物多様性とは、すべての生物（陸上生態系、海洋その他の水界生態系、これらが複合した生態系、その他の生息または生育の場のいかんを問わない）の間の変異性であり、種内の多様性、種間の多様性および生態系の多様性を含むものであると定義されている（高橋2004）。生物多様性は人間生存の基盤であり、現存する生物多様性の保全に加えて、失われた自然の再生を積極的に推進していく必要がある。現存する生物多様性の保全を図り、失われた自然を再生するためには、生態系の多様性の基盤である種の多様性、さらには種内の遺伝的多様性への配慮が必要となる。遺伝的多様性は地理的に隔たった集団間の変異（地理的変異）と単一の集団内に見られる変異（集団内変異）の2つの面が指摘されている（小池・松井2003）。地理的変異は、集団が変遷を繰り返すなかで独自に獲得してきた変異であると考えられる。この地理的変異の解析は Senni *et al.* (2005) が高山植物で、白石ら (1996) がカラマツで起源や分布の変遷過程を探るために行なっている。また、集団内変異の研究は、近交弱勢を防ぐため、サクラソウなど保全を求められている植物で多く行なわれている（北

本ら2005）。

地理的変異および集団内変異は、植物が長年をかけて集積した遺伝情報であり、それを人間の活動により破壊すると修復が難しい。津村 (2008) は広葉樹について、自然が長い時間をかけて築き上げた遺伝構造を人為的に攪乱する（人為的攪乱）と集団や種の衰退につながるとしている。しかし、人為的攪乱はいたる所で起こっている。人為的攪乱の影響は、希少種（山口ら2010）や緑化（津村・岩田2003）、植林（津村2008）などで研究されているが、十分とは言えず、農耕に関する研究は少ない（保田ら2003）。

種内の集団間や集団内における遺伝変異を把握するうえで、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マーカーを開発している（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ことやほとんどの被子植物では母性遺伝するため、種間の系統関係の解明（宮村ら1995）や遺伝的多様性の解明に適していた（Amoatey and Tilney-Bassett 1994）。また、葉緑体ゲノムは2つの単一領域

¹⁾ 2010年度酪農学園大学大学院酪農学研究科酪農学専攻修士課程修了生
Forage Feed Crops Science, Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan
²⁾ 酪農学園大学短期大学部酪農学科資源植物学研究室
Plant Genetics and Physiology, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan
³⁾ 酪農学園大学短期大学部酪農学科植物育種学研究室
Plant Breeding, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

(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 2002) 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。系統解析に関する研究では広範な種を材料に, それらの分子系統関係を明らかにして, 形態による系統関係と比較している (白石ら 1996)。遺伝的多様性の把握に関する研究では, 対象となる植物はそのほとんどが希少種であり, その保全を目的として, 集団内変異を明らかにするものが多く (Honjo *et al.* 2004), 地理的変異を明らかにする中で, 遺伝子的人為的攪乱を検討する研究は少ない (津村・岩田 2003)。遺伝子的人為的攪乱を検討するためには全国に分布し, 採取が容易で, 人間活動に関係の深い植物を指標種とする必要がある。そこで, 河岸, 湿った林床や湿原などのほか, 水田や畑の排水などの農耕地周辺に生育するミゾソバに注目した。ミゾソバは, アジア北東部に分布し, 日本国内では沖縄を除き全国の水湿地に生育するタデ科の一年生草本であり (北川 1982), 形態的変異が大きく, 種内に形態の異なる単位群の存在を明らかにしている (花井ら 2004, 2006, 2007)。また, 近縁種では, ヤマミゾソバ (*Persicaria oreophila* (Makino) Hiyama), オオミゾソバ (*Persicaria thunbergii* (Siebold et Zucc.) H. Gross var. *stolonifera* (F. Schmidt) Nakai ex H. Hara) などが存在し形態的研究も進んでいる。近年, 小河川の富栄養化診断の指標 (大塚・根本 1999) やカドミウムのハイパーアキュムレーター (九万田ら 2001) として注目されている。しかし, ミゾソバでの遺伝的多様性の把握に関する研究はなされていない。

そこで, 本実験ではミゾソバの遺伝変異を解明すれば, 地理的変異や人為的攪乱を研究するための, モデル植物になるのではないかと考え, 北海道を中心にミゾソバにおける遺伝変異の把握を試み, 地理的変異や分布変遷過程を検討した。

材料および方法

材料は 2009 年と 2010 年の 8~10 月に, 浜中町, 幌加内町, 倶知安町, 厚沢部町, 北斗市, 江別市, 羽幌町, 北見市と積丹町の耕地排水の周辺から, 別海町, 稚内市と浜頓別町の河川や沢から, 新ひだか町と占冠村の湿った林床からミゾソバの葉を採取した。また, 比較のため福島県, 秋田県, 大阪府・京

都府・奈良県から採取した。採取したミゾソバの葉は DNA 抽出まで -80°C で保存した。DNA 抽出は SDS 0.3%, NaCl 400 mM, EDTA 5 mM, Tris-HCl 20 mM で構成される SNET と Proteinase K を 50:1 の割合で混合した溶解液を用い, 55°C 1 時間の加熱抽出法で行った。抽出した DNA はフェノール抽出とエタノール沈殿によって精製し, PCR 法によって葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) と *trnG* (UCC) の遺伝子間領域を増幅した (表 1)。PCR 反応は 2 × Ampdirect Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) と Nova Taq (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて行なった。PCR 反応の条件は 95°C で 10 分間熱変性により DNA ポリメラーゼの活性化を行った後, 熱変性を 94°C で 30 秒間, アニーリングを 1 分間, 伸長反応を 72°C で 1 分間行なうサイクルを 40 回繰り返した。その後, 72°C で 7 分間の伸長反応を行った。PCR によって得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法により分離し, 目的の DNA 断片を回収し, スピニング法で DNA を精製した。この精製 DNA をシーケンスのテンプレートとして使用した。シーケンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems, Foster City, WI) を用いた。タバコ葉緑体ゲノムでは *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC) 領域が 843 塩基であり, 1 回のダイレクトシーケンスではすべての塩基配列を決定できないため, *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC) 領域の間にシーケンスプライマーを作成し, *trnSw* とした (表 1)。*trnSw* を用い, *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC) 領域の塩基配列を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, WI) で決定した。また, 本実験では多検体を扱うにあたり *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC) 領域の前半領域である, *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列を決定し, 解析を行なった。分子系統解析は, MEGA4 を用いて行なった。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) によって作成した。系統樹の信頼性はブートストラップ値 (1,000 反復) によって評価した。また, 分子系統樹の精度を高めるため NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC)

表 1 葉緑体ゲノムの領域とプライマー配列

領域	プライマー配列
<i>trnS</i> (GCU)	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC
<i>trnG</i> (UCC)	GAACGAATCACACTTTTACCAC
<i>trnSw</i>	CAACGGGTCGTAGATAGAAA

領域の塩基配列が登録されている、ミゾソバと同じタデ科であるダイオウ属のルバーブ (*Rheum moorcroftianum*) とジンヨウスイバ属のジンヨウスイバ (*Oxyria digyna*) をアウトグループとした。

結果および考察

ミゾソバにおける *trnS* (GCU) -*trnG* (UCC) 領域は 734 塩基 (AB618623; DDBJ) であり、多型が見られた。*trnS* (GCU) -*trnSw* 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列を表 2 に示す。*trnS* (GCU) -*trnSw* 領域には 5 箇所の変異が検出された。そのうち 3 箇所は 1 または 5 塩基の挿入であり、2 箇所は一塩基置換であった。これらの変異の組み合わせから、6 つのハプロタイプ (A~F) の存在が確認された。

北海道におけるミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづく採取環境ごとのハプロタイプ出現割合を図 1 に示す。北海道内で確認されたハプロタイプは採取環境を耕地排水 (排水路, 側溝, 明渠)・河川・林床に区分すると、その出現割合に違いはあったが、どの環境でもすべ

てのハプロタイプが検出された。このことから、これらのハプロタイプ間には、環境との関連性はないことが明らかとなった。また、ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプの地理的変異を図 2 に示す。浜中町では、8 地点から採取した 50 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ B : D : F が 25 : 13 : 12 となった。幌加内町では、2 地点から採取した 20 個体すべてがハプロタイプ B であった。倶知安町では、1 地点から採取した 20 個体すべてがハプロタイプ B であった。厚沢部町では、2 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : B が 11 : 9 となった。北斗市では、1 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : B : F が 3 : 4 : 13 となった。江別市では、4 地点から採取した 20 個体すべてがハプロタイプ B であった。羽幌町では、5 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : B : D が 4 : 15 : 1 となった。北見市では、5 地点から採取した 20 個体すべてがハプロタイプ B であった。積丹町では、5 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタ

表 2 *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域で検出されたハプロタイプとその塩基配列

	121-131									137-147											
ハプロタイプ A	T	A	T	-	-	-	-	-	T	A	T	T	T	A	-	-	-	-	T	T	T
ハプロタイプ B	·	·	·	A	A	T	G	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ C	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ D	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ E	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	A	T	T	A	·	·	·	·
ハプロタイプ F	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·

	258-264						271-277						393-399								
ハプロタイプ A	A	A	A	-	T	T	G	A	A	A	T	A	A	A	G	G	C	G	T	G	G
ハプロタイプ B	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ C	·	·	·	A	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·
ハプロタイプ D	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·
ハプロタイプ E	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·
ハプロタイプ F	·	·	·	·	·	·	·	·	·	·	G	·	·	·	·	·	·	T	·	·	·

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。

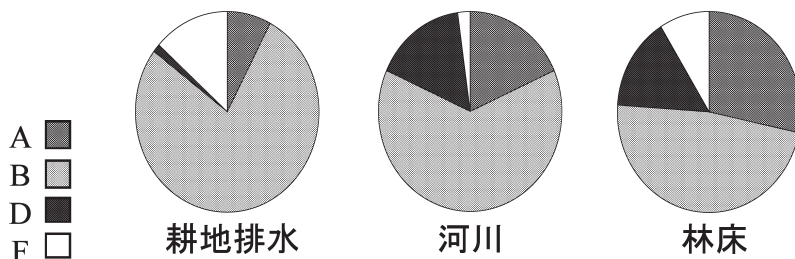


図 1 北海道におけるミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづく採取環境ごとのハプロタイプ出現割合

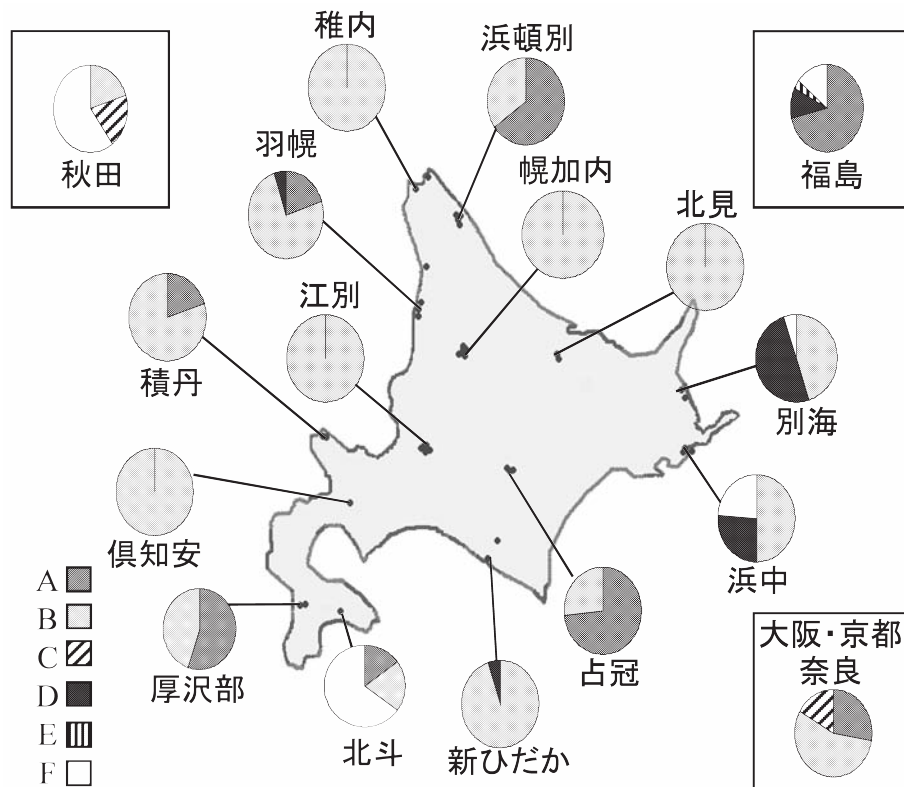


図2 ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプの地理的変異

イブ A : B が 1 : 4 となった。別海町では、3 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ B : D : F が 9 : 10 : 1 となった。稚内市では、2 地点から採取した 10 個体すべてがハプロタイプ B であった。浜頓別町では、4 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : B が 13 : 7 となった。新ひだか町では、2 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ B : D が 19 : 1 となった。占冠村では、3 地点から採取した 15 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : B が 11 : 4 となった。福島県では、9 地点から採取した 35 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : D : E : F が 25 : 4 : 1 : 5 となった。秋田県では、5 地点から採取した 20 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ B : C : F が 1 : 1 : 3 となった。大阪府では、2 地点から採取した 10 個体すべてがハプロタイプ B であった。京都府では、1 地点から採取した 6 個体のハプロタイプ割合は、ハプロタイプ A : C が 1 : 1 となった。奈良県では、1 地点から採取した 2 個体すべてがハプロタイプ A であった。北海道では、浜中町、北斗市、羽幌町と別海町で、3 つのハプロタイプの混在が確認でき、これらの地点の多様性が高いことが示唆された。また、北海道ではハプロタイプ B が 295 個体中 198 個体と非常に多

く検出された。一方、ハプロタイプ C, E は本州でしか確認できなかった。このことから、ハプロタイプの出現頻度は地域的に特異性のあることが示唆された。

ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 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を図 3 に示す。6 種類のハプロタイプはクレード I (A, B, C), クレード II (D, E) とクレード III (F) の 3 つのクレードに分けられた。まず、ハプロタイプ F とハプロタイプ A, B, C, D, E が分化し、次にハプロタイプ D, E とハプロタイプ A, B, C が分化したと考えられた。ミゾソバ葉緑体ゲノム *trnS* (GUC) -*trnSw* 領域の塩基配列の変異から得られたハプロタイプ間の遺伝距離を表 3 に示す。クレード III とクレード I 間の距離は最も遠く、0.006 であった。クレード III とクレード II 間の距離は、0.003 であった。クレード I とクレード II 間の距離は、0.003 であった。また、クレード内でのハプロタイプ間では、遺伝距離は非常に近いことが明らかになった。一方、ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプを遺伝距離により構築した系統樹を図 4 に示す。この図からクレード II からクレード I とクレード III に分化したことが考えられ、クレード II が

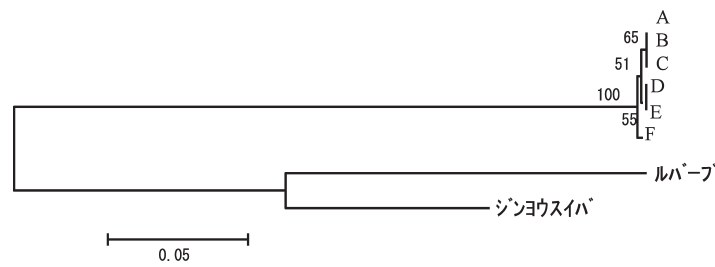


図3 ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプを近隣結合法により構築した系統樹

表3 ミゾソバ葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列の変異から得られたハプロタイプ間の遺伝距離

	1	2	3	4	5	6
1 ハプロタイプA	*					
2 ハプロタイプB	0.000	*				
3 ハプロタイプC	0.000	0.000	*			
4 ハプロタイプD	0.003	0.003	0.003	*		
5 ハプロタイプE	0.003	0.003	0.003	0.000	*	
6 ハプロタイプF	0.006	0.006	0.006	0.003	0.003	*

祖先型ではないかと思われた。

高等植物の葉緑体ゲノムは、2つの単一領域(LSCとSSC)と1組の逆位反復配列(IR)からなる120~160 kbpの環状構造をもつとされる(Shinozaki *et al.* 1986)。また、イネ(*Oryza sativa*)ではHiratsuka *et al.* (1989)が、トウモロコシ(*Zea mays*)ではMaier *et al.* (1995)が、パンコムギ(*Triticum aestivum*)ではOgihara *et al.* (2002)が、タバコ(*Nicotiana tabacum*)ではShinozaki *et al.* (1986)がその全塩基配列を解読しているため、増幅プライマーの開発や比較ゲノムなどの研究も進んでいる。ほとんどの被子植物では葉緑体が母性遺伝するため(Amoatey and Tilney-Bassett 1994)、地理的変異を解明するのに適している。また、葉緑体ゲノムは単一領域内の塩基配列の解読にクローニング作業が不要であるという実験操作上の利点から、科や属、種間の系統解析と種内の遺伝的多様性を解明するための遺伝マーカーとして用いられてきた(保田・芝山 2006)。本実験では、19地点371個体のミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域の塩基配列を決定し、5箇所の変異を検出した(表2)。これらの変異から、6つのハプロタイプ(A~F)の存在を明らかにした。また、各採取地点で出現するハプロタイプやその出現比率に違いが認められた(図1)。國分(2006)は葉緑体ゲノムにも変化の早い領域と遅い領域があると指摘している。藤井(2008)は、進化の早いとされる非翻訳領域の塩基配列情報を利用し、ハプロタイプの偏りから高山

植物の分布変遷過程を解明している。藤井(2001)はヨツバシオガマ(*Pedicularis chamissonis* Steven)で葉緑体ゲノムの *trnT* (UGU) -*trnF* (GAA) 領域の解析を行ない、本実験に比較し17種類と多くのハプロタイプを検出している。本実験で塩基配列を決定した *trnS* (GCU) -*trnSw* 領域は、藤井(2001)が解析した *trnT* (UGU) -*trnF* (GAA) 領域に比べ、検出できたハプロタイプの種類が6つと少ないため、変化が遅い領域であると考えられた。しかし、保田ら(2003)は、チガヤ(*Imperata cylindrica*)の *psbA-matK*, *trnV* 第1イントロンと *psaC-ndhE* の3つの領域から検出された6つのハプロタイプでも十分に地理的変異を解析できている。これらのことから、本実験で得られた各採取地点のハプロタイプの偏りをもとに、地理的変異や分布変遷過程を明らかに出来るものと考えた。本実験でのハプロタイプの系統解析の結果、検出したハプロタイプは3つのクレードに分かれ、遺伝距離からクレードIIが祖先型だと考えられた(図4)。このことから、北海道におけるクレードIIは、浜中町、羽幌町、別海町と新ひだか町から検出されており、ミゾソバはこれらの地域から広がったことが示唆された。また、ミゾソバが北海道へ一元的に伝播したのではなく、太平洋側(浜中町、別海町、新ひだか町)と日本海側(羽幌町)の二つの方向から伝播したことを示唆した。また、クレードの出現割合は浜中町や別海町と福島県の太平洋側と北斗市と秋田県の日本海側でほぼ一致している。これらの結果は前

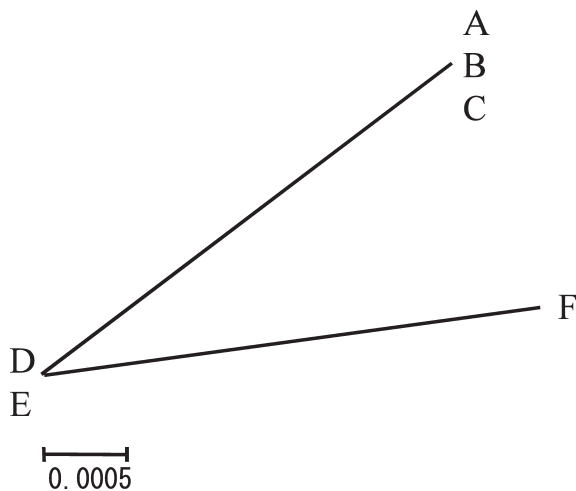


図4 ミゾソバの葉緑体ゲノム *trnS* (GCU)-*trnSw* 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプを遺伝距離により構築した系統樹

述の考察を支持している。しかし、本実験は、北海道と本州の限られた地域のミゾソバでしか解析していないため、対象とする地域を全国に広げ、調査地点や個体数を増やし、さらに詳しく遺伝変異を把握することが必要である。

以上の結果、ミゾソバは人為攪乱が植物集団内の遺伝的多様性におよぼす影響や遺伝変異の地理的分化を解明するためのモデル植物になるものと考えられ、今後の研究の進展が期待される。

謝 辞

調査に際し、ご協力、ご助言を頂きました大阪府立大学の中山祐一郎博士に心より深く感謝いたします。

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 biparental plastid inheritance in zonal pelargoniums. *Heredity* 72: 69-77.
- 藤井紀行 (2001) 日本の高山植物の系統地理. *Bunrui* 1: 29-34.
- 藤井紀行 (2008) 日本産高山植物における本州中部地域の系統地理学的重要性. *日本植物分類学会誌* 8: 5-14.
- Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y. Honji, C. Sun, B. Meng, Y. Li, A. Kanno, Y. Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki, and M.

Sugiura (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217: 185-194.

花井隆晃, 渡邊幹男, 芹沢俊介 (2004) ミゾソバ(タデ科) の分類学的再検討: (1)愛知県および岐阜県南東部における単位群の識別. *植物地理・分類研究* 52: 167-174.

花井隆晃, 渡邊幹男, 芹沢俊介 (2006) ミゾソバ(タデ科) の分類学的再検討: (2)滋賀県浅井町および東京都高尾山における群構成. *植物地理・分類研究* 54: 7-14.

花井隆晃, 渡邊幹男, 芹沢俊介 (2007) ミゾソバ(タデ科) の分類学的再検討: (3)愛知県瀬戸の集団で区別された2型の関係. *植物地理・分類研究* 55: 77-83.

Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation* 120: 211-220.

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.

北川政夫 (1982) タデ科, “日本の野生植物 草本II 離弁花”, 佐竹義輔・大井次三郎・北野四郎・巨理俊次・富成忠夫 (編), 平凡社, 東京, 14-26.

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 (監修), 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.

- 小池裕子, 松井正文 (2003) 生物多様性と保全遺伝学, "保全遺伝学", 小池裕子・松井正文 (編), 東京大学出版会, 東京, 10.
- 國分尚 (2006) 最近の植物系統分類学の研究手法. 花葉 25 : 8-10.
- 九万田有希, 長谷川功, 野口章, 矢崎仁也 (2001) 重金属集積植物ミゾソバにおけるカドミウムの移行と集積. 日本土壤肥料学会講演要旨集 47 : 92.
- Maier, M. R., N. Kai, G. L. Igloi and H. Kössel (1995) Complete Sequence of the Maize Chloroplast Genome: Gene Content, Hotspots of Divergence and Fine Tuning of Genetic Information by Transcript Editing. *Journal of Molecular Biology* 251: 614-628.
- 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.
- Ogihara, Y., K. Isono, T. Kojima, A. Endo, M. Hanaoka, T. Shiina, T. Terachi, S. Utsugi, M. Murata, N. Mori, S. Takumi, K. Ikeo, T. Gojobori, R. Murai, K. Murai, Y. Matsuoka, Y. Ohnishi, H. Tajiri, K. Tsunewaki (2002) Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Genet Genomics*. 266: 740-746.
- Okaura, T. and K. Harada (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 322-329.
- 大塚俊之, 根本正之 (1999) ミゾソバ (*Persicaria thunbergii* (Sieb. et Zucc.) H. Gross) を利用した小河川の富栄養化診断. 雑草研究 44 : 19-28.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Senni, Kei, Noriyuki Fujii, Hideki Takahashi, Takashi Sugawara, Michio Wakabayashi (2005) Intraspecific Chloroplast DNA Variations of the Alpine Plants in Japan. *Acta phytotaxonomica et geobotanica*. 56: 265-275.
- 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.
- 白石進, 磯田圭哉, 渡辺敦史, 河崎久男 (1996) 蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツの DNA 分類学的解析. *日本林學會誌* 78 : 175-182.
- 高橋進 (2004) 国際環境政策としての生物多様性概念の変遷. *共栄大学研究論集* 3 : 81-105.
- 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.
- 津村義彦 (2008) 広葉樹の植栽における遺伝子攪乱問題. *日本林学会会報* 54 : 26-29.
- 津村義彦, 岩田洋佳 (2003) 遺伝的変異性を考慮した緑化とは. *Journal of the Japanese Society of Revegetation Technology* 28(4) : 470-475.
- 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.
- 山口正樹, 杉阪次郎, 工藤洋 (2010) 琵琶湖東岸における絶滅危惧植物タチスズシロソウ大群落の出現とその保全. *保全生態学研究* 15 : 111-119.
- 保田謙太郎, 中山祐一郎, 柴山秀次郎 (2003) 日本に分布するチガヤ (*Imperata cylindrica*) の葉緑体 DNA 変異. *雑草研究* 48 (別) : 168-169.
- 保田謙太郎, 芝山秀次郎 (2006) イネ科植物における葉緑体ゲノムの非コード領域の DNA を増幅するプライマー. *雑草研究* 51 : 146-151.

Summary

The genetic diversity of *Persicaria thunbergii* chloroplast DNA (cpDNA) region of *trnS* (GCU) - *trnG* (UCC) was examined to determine whether the genetic differences among the populations can be used as the anthropogenic disturbance index. Analyses were performed for 371 individuals sampled from the 19

populations collected in Hokkaido, Akita, Fukushima, Osaka, Kyoto and Nara.

The populations were classified in to six groups (A to F) according to the haplotype on the basis of two nucleotide substitutions and three deletions in the *Persicaria thunbergii* cpDNA region of *trnS* (GCU) - *trnG* (UCC). Haplotypes varied with the collected population and the locality. *Persicaria thunbergii* in Horokanai, Kucchan, Ebetu, Wakkanai and Kitami had only haplotype B. Hamanaka had three haplotypes, B, D and F at a ratio of 25:13:12. Fukushima had four haplotypes, A, D, E and F at a ratio of 25:4:1:5. Assabu had two haplotypes, A and B at a ratio of 11:9. Hokuto had three haplotypes, A, B and F at a ratio of 3:4:13. Sinhidaka had two haplotypes, B and D at a ratio of 19:1. Simukappu had two haplotypes, A and B at a ratio of 11:4. Bekkai had three haplotypes, B, D and F at a ratio of 9:10:1. Haboro had three haplotypes, A, B and D at a ratio of 4:15:1. Hamatonbetu had two haplotypes, A and B at a ratio of 13:7. Akita had three haplotypes, B, C, and F at a ratio of 1:1:3. Syakotan had two haplotypes, A and B at a ratio of 1:4. Osaka had only haplotype A. Kyoto had two haplotypes, A and C at a ratio of 1:1. Nara had only haplotype A. Haplotypes A, B, D and F were discovered from Hokkaido populations, whereas haplotypes C and E were distributed in Akita, Fukushima, Osaka, Kyoto and Nara populations.

The results of neighbor joining analysis of the six cpDNA haplotypes (A, B, C, D, E, F) of *Primula jesoana* found in this study showed that the six haplotypes were classified into three clades. A, B and C were classified into clade I, D and E into clade II and F into clade III. Clade III differentiated first, and then clade I differentiated from clade II.