

# 和歌山県固有植物 キイシモツケ の蛇紋岩土壌への適応と 分子系統学によるイワシモツケおよびトサシモツケとの比較

明 渡 絵里朱<sup>1</sup>、平 田 智 子<sup>1</sup>、上 井 和 幸<sup>1</sup>、高 木 祐 子<sup>2</sup>、  
水 野 隆 文<sup>3</sup>、水 野 直 治<sup>4</sup>、小 林 真<sup>5</sup>、小 池 孝 良<sup>5</sup>、  
大 和 勝 幸<sup>1,2</sup>、秋 田 求<sup>1,2</sup>、泉 井 桂<sup>1,2</sup>

## 要 旨

バラ科シモツケ属のキイシモツケ (*Spiraea nipponica* Maxim. var. *ogawae* (Nakai) Yamanaka) は、蛇紋岩地帯にて自生する和歌山県固有の植物である。県北部に位置する龍門山の山頂付近の群落は県の天然記念物に指定されている。キイシモツケは、かつては新種とされ *Spiraea ogawai* Nakai と命名され登録されていた。しかし近年は形態学的比較に基づいて、高知県に自生するトサシモツケ (*Spiraea nipponica* Maxim. var. *tosensis* (Yatabe) Makino) と共に、近畿以北に自生するイワシモツケ (*Spiraea nipponica* Maxim.) の変種とされ、学名も上記のように改められている。

本研究では、キイシモツケがトサシモツケおよびイワシモツケなどの近縁種とは顕著に異なるのかどうかを初めて分子系統分類学の立場から検討した。同時に、キイシモツケの蛇紋岩土壌との関わりについて若干の検討を行った。

まず、3種類それぞれに特徴的な葉の形態は、種子から同一の環境条件下で生育させても再現され、生来の形質であることがわかった。次に、龍門山の土壌の交換性金属イオンの元素組成を調べ、蛇紋岩土壌特有の組成をもつことが確かめられた。キイシモツケの植物体について、金属イオンの元素分析を行った結果、蛇紋岩土壌の元素の中で最も植物に対する毒性が強いとされるニッケル (Ni) が植物体内に取り込まれていることを認めた。さらにキイシモツケの種子は発芽時に3者の中で最も強い Ni 耐性を示し、若い苗では 10 mmol L<sup>-1</sup> の Ni<sup>2+</sup> に対しても耐性を示した。

葉緑体 DNA の tRNA の *trnL-trnF* 領域および核ゲノム DNA の 5S RNA 遺伝子とその両端のスペーサー配列を含む ITS 領域の塩基配列を解析した。その結果、葉緑体の tRNA 領域 (約 1000 塩基対) は完全に一致し、ITS 領域 (約 640 塩基対) では3種は互いに数塩基 (1%以下) 異なるのみであり、分子系統学的比較においてもキイシモツケはイワシモツケおよびトサシモツケと極めて近縁であることが証明された。したがって、キイシモツケは日本の近畿以北に広く分布するイワシモツケを起源とし、和歌山の限られた蛇紋岩地帯に適応して、地理的に隔絶して自生するにいたったエコタイプであると推測された。

キーワード：キイシモツケ、*Spiraea nipponica* Maxim. var. *ogawae* (Nakai) Yamanaka、分子系統学、シモツケ属、蛇紋岩土壌

## 1. 緒 論

キイシモツケは、和歌山県固有の植物で、生育地は県北部の3か所の蛇紋岩土壌地帯に限られており、

原稿受付 2016年2月20日

1. 近畿大学生物理工学部 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1
3. 三重大学大学院生物資源学研究所 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577
4. 酪農学園大学獣医学科 〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582
5. 北海道大学大学院農学部 〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

中でも龍門山（紀の川市）（図 1 a）の標高 600 m 以上の頂上付近のキイシモツケ群落は、和歌山県天然記念物に指定されている。バラ科シモツケ属のこの植物は、高さ 2m 以下の低落葉性灌木で、葉は楕円形、初夏 5～6 月に咲かせる多数の白い花は両性で、散房花序をつくる（図 1 b, c）。和歌山県の 2012 年のレッドデータブックでは準絶滅危惧種とされている。

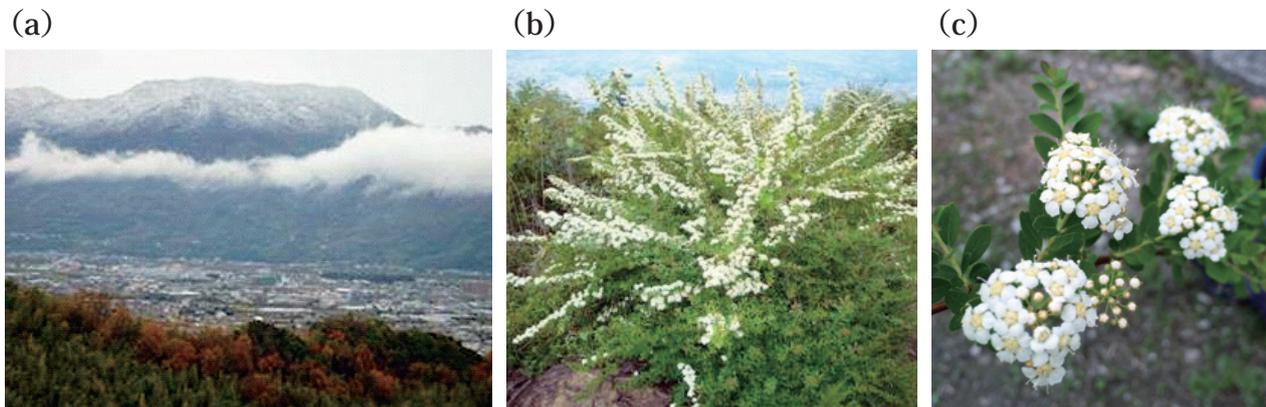


図 1. (a) 龍門山。和歌山県紀の川市杉原に位置し、紀州富士ともいわれる。標高は 756 m。  
 (b) 龍門山頂上付近の自生のキイシモツケ（5 月下旬）。  
 (c) 播種から 3 年目に開花したキイシモツケ。本研究所にて露地栽培。

キイシモツケは岩出市出身の教育者である小川由一氏<sup>(1)</sup>によって発見され、龍門山で採取された標本を植物分類学者の中井猛之進氏の協力のもとに 1928 年に新種として *Spiraea ogawai* Nakai と命名されたものである<sup>(2)</sup>。キイシモツケがイワシモツケおよびトサシモツケとよく似ていることは、発見後間もない頃から指摘されていたが、北村四郎はこれら 3 つの植物は葉の形態から識別可能であると主張した<sup>(3)</sup>。しかし、1972 年と 1973 年には山中二男は、キイシモツケがイワシモツケおよびトサシモツケとそれぞれ別にするのが適当であるが、これは種として区別すべきではないと指摘した<sup>(4), (5)</sup>。その理由として、キイシモツケの葉の大きさと形は個体によってかなり変異に富むが、平均するとちょうど、イワシモツケとトサシモツケの中間の大きさに収まり、3 者は連続的となり、互いに独立とは認めがたいということが挙げられた。現在、北村四郎と村田源の植物図鑑<sup>(6)</sup> および大橋広好らの植物図鑑<sup>(7)</sup> においてキイシモツケは独立種ではなく、トサシモツケとともに、イワシモツケの変種 (variety, var. と略) あるいはエコタイプ (ecotype) として扱われている。現在は、イワシモツケの学名は *Spiraea nipponica* Maxim、キイシモツケの学名は *Spiraea nipponica* Maxim. var. *ogawae* (Nakai) Yamanaka、トサシモツケの学名は *Spiraea nipponica* Maxim. var. *tosaensis* (Yatabe) Makino とされ、分布域の狭いキイシモツケとトサシモツケはイワシモツケの変種とされている。

本研究は、上記 3 種類の植物間で、同じ機能に關与する遺伝子領域の DNA 塩基配列がどのように異なっているかを調べることによって、3 者の分子系統学的な近縁関係を明らかにしようとするものである。3 者は形態的によく似ているがその自生地が互いに隔絶している。イワシモツケは近畿以北の通常土壌に加えて、蛇紋岩地帯および石灰岩地帯に自生し（図 2 a）、もう一つのトサシモツケは、高知県の狭く限られた石灰岩地帯の川岸に自生する（図 2 b）。

遺伝情報を担う DNA の塩基配列の比較によって、生物間の近縁関係を明らかにする研究分野は 1985 年以降に急速に発達し、分子系統学 (Molecular Phylogenetics) とよばれて、現在では代表的な手法とされている。形態的に似ていても、DNA からみれば全く別の系統の生物であることが明らかになった例も多い<sup>(8)</sup>。

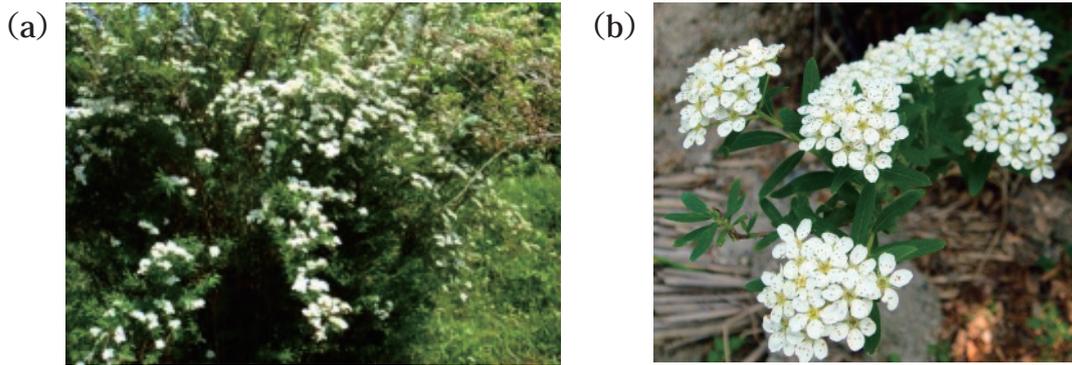


図2. (a) イワシモツケ（東京大・日光植物園にて）。(b) トサシモツケ（大阪市立大・植物園にて）。

本研究は、これら3種類のシモツケについて、DNA塩基配列の比較を初めて行ったものである。分子系統学的解析の対象としては、突然変異によってもその生物の生存に影響のない、いわゆる「中立」の部分がよく用いられる。本研究においても、機能的制約がない領域で、系統や種の識別に有効な配列である葉緑体のDNAの *trnL-trnF* 領域および核ゲノム由来のリボソームRNA遺伝子 (rDNA) の5S RNAコード領域を含むITS (Internal Transcribed Spacer) 領域（以下では単にITSと簡略化することあり）の塩基配列を対象として、3種類のシモツケの配列比較を行い、キイシモツケが独立種であるかどうかを検討した。折しもわれわれが本研究に着手したところに、Potterら (2007)<sup>(9)</sup> は広範囲のシモツケ属植物について分子系統分類学的な研究成果を発表した。これにはキイシモツケやトサシモツケは含まれていなかったため、彼らに倣ってプライマーを設計し、DNAの相同領域の塩基配列を決定することとなった。

キイシモツケは、和歌山県の蛇紋岩土壌地帯にのみ自生するが、一般にこの土壌は植物の生育にとっては好ましくないものである。この土壌にキイシモツケがどのように適応して生育を可能にしているのかについても他の2種類のシモツケと比較しながら検討した。蛇紋岩土壌は数種類の有毒な重金属イオンを含むが、中でもニッケルイオン ( $\text{Ni}^{2+}$ ) が特に有害であることが水野直治によって主唱されて以来<sup>(10,11)</sup>、蛇紋岩植物がいかにしてNi耐性を獲得しているかが注目されてきた。本研究でもNiの植物体への蓄積や耐性について調べた。本稿では、まず蛇紋岩土壌植生について報告したのち、分子系統学的知見を報告する。

## 2. 材料と方法

### 2.1 植物の栽培実験

3種類のシモツケの種子の発芽実験は、人工気象器および屋内恒温室において行った。室温は23°Cから25°C、蛍光灯を光源として、12時間点灯/12時間消灯した。通常の土壌としては、市販のプランター用培養土（花と野菜の培養土（プロトリーフ）など）を使用した。灌水は、1/1000希釈した液肥（ハイポネックス）を用いて2日おきに行った。

栽培が長期間（約5か月）に及ぶときには、戸外の制御ガラス温室において栽培した。温度は、昼間25°C、夜間20°Cに調節し、肥料は上記と同様に与えた。種々の濃度の硫酸ニッケル ( $\text{NiSO}_4$ ) を与えるときには、上記の肥料水に硫酸ニッケルを所定量加えたものを、毎回ポットの体積の2倍量程度与えて、底から溢れさせできるだけ所定の濃度に近くなるようにした。

## 2.2 植物材料

各植物の入手先については、表 1 に示した。

表 1. 各植物材料の入手先

植物名	入手先	用途 <sup>(a)</sup>
キイシモツケ	龍門山ハンググライダーテイクオフ地点（標高 約 600m） 大阪市立大学理学部附属植物園	A, B, D B, C, D
イワシモツケ	東京大学大学院理学系研究科附属日光植物園 東北大学学術資源研究公開センター植物園	A, B, C, D D
トサシモツケ	高知県立牧野植物園 大阪市立大学理学部附属植物園	A, D B, C, D
コデマリ	近畿大学生物理工学部内	D

<sup>(a)</sup> A, 種子発芽と生育実験； B, 元素分析実験； C, *trnL-trnF* 領域塩基配列解析；  
D, ITS 領域塩基配列解析、

## 2.3 土壌および植物体の金属分析

植物地上部の試料は、葉、花、種子、枝に分離後、72°Cで2日間乾燥し、ミルで粉末試料とした。水野ら（2000）<sup>(12)</sup> および Shi ら（2007）<sup>(13)</sup> の方法に従って硝酸-過塩素酸による湿式分解の後、各種金属濃度を原子分光光度計（パーキンエルマー AA800、パーキンエルマー ジャパン、横浜、神奈川）で測定した。また植物採取地の土壌については3週間の風乾の後、1 mol L<sup>-1</sup> 酢酸アンモニウムによる抽出を行い、ICP 発光分光機（IRIS, Thermo Jarrell Ash Co. Franklin, MA）による交換性イオンの測定に供した。土壌中に含まれる Mg、Co、Cr、および Ni の含量の測定は、土壌を硝酸-過塩素酸による湿式分解の後、原子分光光度計により行った。

## 2.4 植物体からのゲノム DNA の調製と目的とする DNA 断片の調製とクローニング

液体窒素で凍結させた約 100 mg の葉を破砕機（ボールミル、Retsch 社）を用いて、frequency 20-30、30 sec 破砕し、粉末状にした。その後、DNeasy Plant Mini Kit 250（QIAGEN）を用いて付属プロトコールにしたがってトータル DNA（ゲノムおよび葉緑体の DNA を含む）を抽出した。

PCR による DNA 断片の増幅には、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase（TaKaRa）を用いた。トータル DNA をテンプレートとして、葉緑体 DNA の *trnL-trnF* 領域の増幅には、*trnc*（5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'）と *trnf*（5'-atttgaactggtgacacgag-3'）をプライマーとして用いた。また、ゲノム DNA の 5S RNA を含む ITS 領域の増幅には、ITS6（5'-tcgtaacaaggtttccgtagtgga-3'）と ITS9（5'-ccgcttattgatatgcttaaac-3'）を用いた。これらの配列は、Potter ら<sup>(8)</sup> の報告に依った。DNA 断片の分離は、0.7%のアガロースゲルを用いて電気泳動により行い、増幅断片を QIAquick Gel Extraction Kit 250（QIAGEN）を用いて回収した。精製 DNA 断片は Mighty TA-cloning kit（TaKaRa）を用いて pMD20-T vector（TaKaRa）のマルチクローニングサイトに導入した。プラスミドは大腸菌を宿主とする系を用いて調製した。

## 2.5 塩基配列の決定

プラスミドに挿入された DNA の塩基配列の決定は、通常の dideoxy 法によった。*trnL-trnF* 領域に

については、増幅に用いたプライマーに加えて、kiiF440 (5'-ggacgagaataaagatagag-3') および kiiR505 (5'-ctaaagtcgacggattttcc-3') も設計・合成して DNA ポリメラーゼ反応のプライマーとした。また、ITS 領域については、増幅用プライマーに加えて、R320 (5'-ggattctgcaattcacacc-3')、M13R (5'-gtttcccagtcacgac-3') も設計・合成して用いた。塩基配列はシーケンサー CEQ2000XL (Beckman Coulter) により決定し、1 サンプルにつき 5 つのシーケンスデータを得た。

また、ITS 領域については、精製 DNA 断片をテンプレートとしてダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定も行ってさらに確認した。このとき、新たに本研究で設計したプライマーは、ITS5pAk (5'-cgcatttcgctactgttcttc-3')、ITS3pAk (5'-gttgcccaaataccgagtc-3')、ITS5pIz (5'-atttcgctactgttcttcacg-3')、ITS3pIz (5'-ttggcccaaataccgagtc-3') であった。各試料について、5～10 個のシーケンスデータを得、それらをアラインしてコンセンサス配列を決定した。

## 2.6 系統樹作成

決定した配列情報をもとにして MAFFT version 6 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) を使用し、近接接合法による系統樹を作製した。系統解析のアウトグループとして、*Petrophyton hendersonii* を用いた。

## 3. 結 果

### 3.1 表現型の比較

キイシモツケ、イワシモツケおよびトサシモツケの 3 種類について、蛇紋岩土壌ではない市販のプランター用土壌において、全く同じ条件下で、種子から育てた若い苗の表現型を比較した (図 3)。キイシモ

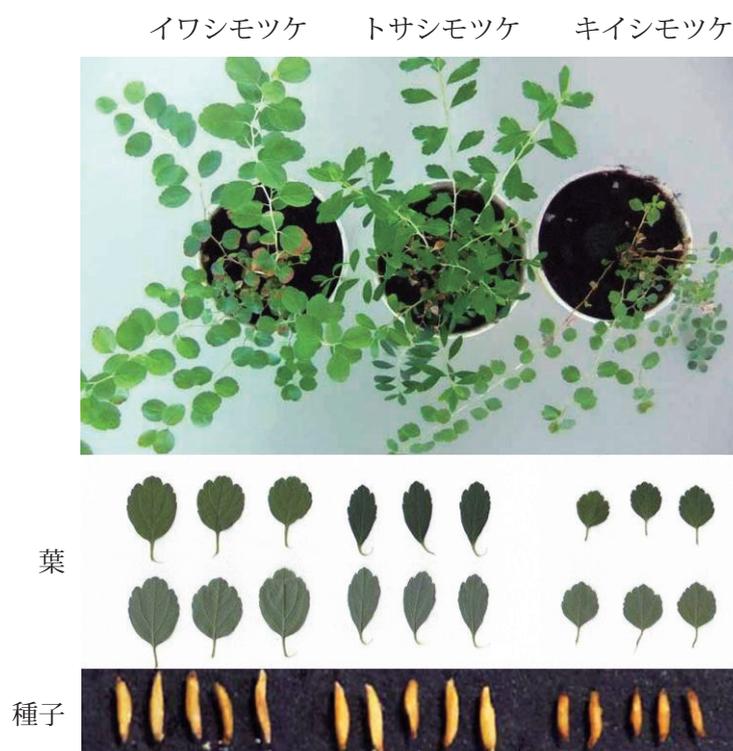


図 3. シモツケ 3 種の表現型比較

上から全体、葉、種子の比較画像。植物体は播種後 3 ヶ月。

ツケの生長が他の2種類のシモツケより若干遅いようであった。トサシモツケに特徴的な葉序も保たれていた。すなわち、葉の2列互生性が高度に保たれていた。イワシモツケとキイシモツケは丸葉でキイシモツケの葉の方が比較的小さく、トサシモツケは縦に長い楕円形の葉であった。また、種子は3種類共に形態は同じであるが、キイシモツケの種子が他2種よりも若干小さいことがわかった。これらのことから葉の形態の違いは生育環境によるのではなく、遺伝的なものであることが示された。またどのシモツケも生育に蛇紋岩土壌を絶対的に要求することはなかった。

### 3.2 龍門山の蛇紋岩土壌の元素組成

和歌山県の蛇紋岩土壌地域は非常に狭く、龍門山、黒沢山、生石山のほぼ3か所に限られる。これら3つの互いに離れた地域においてキイシモツケの自生が報告されているが、実際に踏査してみると、龍門山地域の群落が最大で、その他では個体数が少なかった。その他の地域には、自生していないので、キイシモツケは蛇紋岩土壌に依存していると推測されるがその理由は不明である。植物園などで人為的に非蛇紋岩土壌に生育させることは可能で、和歌山県岩出市の植物公園緑花センターにおいてはキイシモツケとトサシモツケが露地で良好に栽培されている。

蛇紋岩 (Serpentine rock) はマグマが冷えて固まったかんらん岩が地下深部で水分の作用を受けて変質してできる岩石で、Fe および Mg の多さから超苦鉄質岩 (Ultramafic rock)、もしくは SiO<sub>2</sub> 含量の少なさ (45%以下) から超塩基性岩 (Ultrabasic rock) に分類される変成岩の一種である。われわれはまず、蛇紋岩の風化によって生成したと考えられる土壌の元素組成を龍門山の土壌について調べた (表 2 a)。交換性イオン態として 1 mol・L<sup>-1</sup> の酢酸アンモニウムで溶出されるイオンの種類と量は、Mg、Mn、Ni が通常の土壌 (表 2 a の万燈山) に比べて 5-50 倍多く、逆に Al、Fe、P は 1/5 - 1/10 と少なかった。また、土壌中の全 Mg は約 3.2% (w/w) であり、一般土壌にほとんど含まれない Ni 含量も高いことが判明した (表 2 b)。特筆すべきこととして、龍門山の蛇紋岩土壌は日本の同土壌に比較して Co の量が約 2 倍高かった。

表 2. 蛇紋岩土壌の元素分析結果  
(a) 土壌中の交換性イオン態の元素 (mg・kg<sup>-1</sup>)

	Al	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na
龍門山 1 <sup>(a)</sup>	15.82	608.6	0.11	0.29	4.53	42.00	470.8	189.76	0.07	1.33
龍門山 2 <sup>(a)</sup>	17.20	746.0	0.10	0.32	7.52	72.92	974.6	470.60	0.08	1.51
龍門山 3 <sup>(a)</sup>	23.66	416.4	0.07	0.30	4.38	45.12	476.8	427.40	0.22	1.37
龍門山 4 <sup>(b)</sup>	23.06	302.0	0.09	0.28	14.57	64.48	1012.8	542.40	0.05	1.56
万燈山 <sup>(c)</sup>	193.88	472.0	ND	0.32	53.14	112.78	91.6	32.04	0.07	2.29

(次ページへつづく)

	Ni	P	Pb	Rb	S	Sc	Sr	Ti	Zn
龍門山 1 <sup>(a)</sup>	23.56	0.68	11.26	324.4	2278	62.96	10194	0.07	ND
龍門山 2 <sup>(a)</sup>	36.94	0.66	14.98	436.6	3876	105.22	18384	0.08	ND
龍門山 3 <sup>(a)</sup>	47.20	ND	35.44	372.8	2972	192.84	11900	0.03	ND
龍門山 4 <sup>(b)</sup>	45.80	3.99	37.30	446.8	4416	70.98	14444	0.12	ND
万燈山 <sup>(c)</sup>	0.45	5.02	50.34	931.0	3222	23.94	27340	0.44	0.58

(b) 土壌中の 4 種類の元素量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

	Co	Ni	Mg	Cr
龍門山 <sup>(a)</sup>	60.0	532.0	32,400	110.0

- <sup>(a)</sup> ハンググライダーテイクオフ地点付近 (標高 600 m)、<sup>(b)</sup> 頂上付近、  
<sup>(c)</sup> 非蛇紋岩土壌。近畿大・生物理工学部キャンパス内、ND は検出限界以下を示す。

### 3.3 蛇紋岩土壌および非蛇紋岩土壌に生育した植物体内の Ni 含量

龍門山で採取したキイシモツケの地上部を乾燥したのち、葉、花・種子、小枝、大枝などに分けて、それぞれの Ni、Fe、Mn の含量を測定した (表 3)。Ni は葉における値が最も高く、大枝の含量が最も低かったが、その差は大きくなかった。Fe の含量は大枝においてもっとも多く、葉より 8 倍以上高かった。また同時に、非蛇紋岩土壌の生育した、キイシモツケ、トサシモツケおよびイワシモツケについても調べたところ、これらにおける Ni の含量は 1/10 以下と低かった。このことは、キイシモツケが、蛇紋岩土壌で生育したときには、Ni を蓄積する能力を有することを示している。

表 3. 植物体中における金属元素含量 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )

	分析部位	採取場所	Ni	Fe	Mn
キイシモツケ	葉	龍門山	16.35	65	53.4
キイシモツケ	花・種子	龍門山	13.82	152	58.6
キイシモツケ	小枝	龍門山	11.21	175	63.6
キイシモツケ	大枝	龍門山	7.98	547	44.0
キイシモツケ	葉	大阪市立大・植物園	0.64	37	126.1
トサシモツケ	葉	大阪市立大・植物園	1.51	74	296.3
イワシモツケ	葉	東京大・日光植物園	0.70	457	93.4

### 3.4 各植物体の Ni 耐性能

蛇紋岩土壌は一般に植物の生育に適さないとされているが、3種類のシモツケについて Ni 耐性能を比較した。

まず、各植物体の発芽時における Ni の影響を確認した (図 4)。0、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol L<sup>-1</sup> の Ni 含有培地に、シロイヌナズナ (比較対照植物)、キイシモツケ、イワシモツケ、トサシモツケ (高知県牧野植物園) を無菌播種した。キイシモツケは Ni 濃度が 1.0 mmol L<sup>-1</sup> においても通常に生育したが、シロイヌナズナ、イワシモツケは 0.2 mmol L<sup>-1</sup> で、トサシモツケは 0.5 mmol L<sup>-1</sup> で生育不良の形質が現れた。この結果より、キイシモツケは発芽時から幼苗期における Ni 耐性能が高いことが示唆された。タバコについても同様の実験を行ったが、0.05 mmol L<sup>-1</sup> mM で生育不全となり、シロイヌナズナより Ni 耐性は低かった (データ省略)。

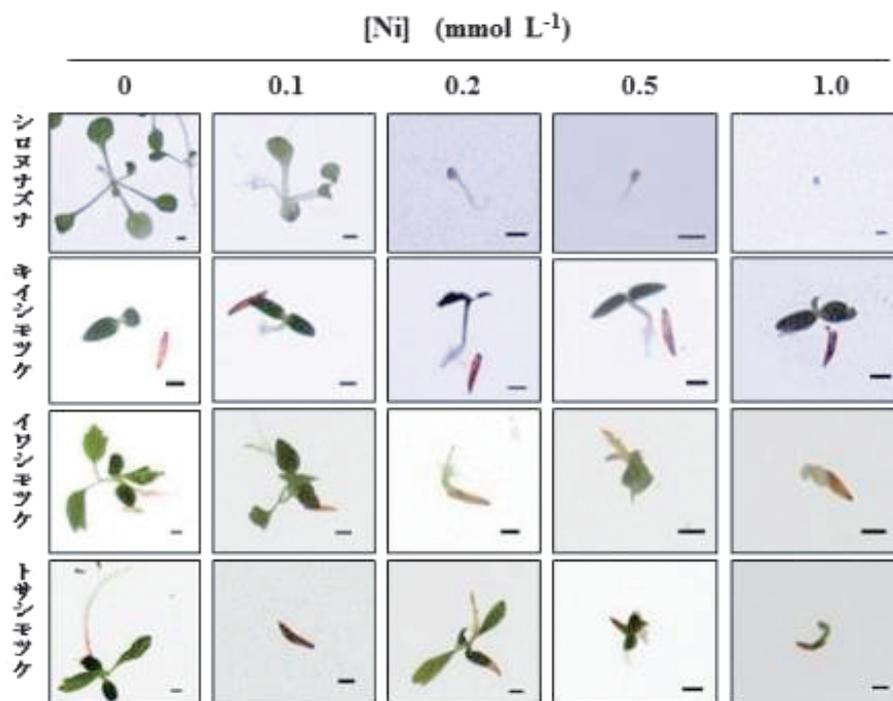


図 4. 各植物体の発芽時における Ni 耐性能比較

播種後 14 日の植物写真。スケールバーは 1 mm を示す。

次に、播種後 3 か月のキイシモツケの幼苗に 1 か月間、週 2 回ずつ、0、0.2、0.5、1.0 mmol L<sup>-1</sup> の Ni を投与し続けたところ、1.0 mmol L<sup>-1</sup> まで生長は阻害されなかった。このとき、投与した Ni 濃度依存的に植物体中に Ni が蓄積していることがわかった (表 4)。以上のことから、キイシモツケは体内に Ni を隔離または無毒化して蓄積する機構を備えることで、Ni 耐性を獲得していることが示唆された。また、Ni 濃度が 0 mmol L<sup>-1</sup> のときにも Ni の含量が高い値を示したことは、用いたプランター用の土やハイポネックスからとりこまれた可能性が考えられたが、詳細は不明である。1.0 mmol L<sup>-1</sup> の水溶液中の Ni の換算濃度は 59 mg · kg<sup>-1</sup> となること、および葉の水分含量は乾燥重量の約 9 倍あることを考慮すると、キイシモツケは Ni を取り込むことはできるが、能動輸送などによって高濃度に蓄積するわけではないと推測される。

表4. Ni 投与によるキイシモツケの葉への取り込み。

Ni<sup>2+</sup> は NiSO<sub>4</sub> 水溶液として与えた。

給水液の Ni <sup>2+</sup> 濃度 (mmol L <sup>-1</sup> )	植物体中の Ni 含量 (mg kg <sup>-1</sup> )
0	11.52 ± 3.20
0.2	20.70 ± 5.45
0.5	25.17 ± 12.78
1	43.42 ± 5.00

(n = 3)

さらに、高濃度の Ni を与えて耐性を調べた (図 5)。発芽後 3 か月のキイシモツケの幼苗に、1 か月間、週 2 回ずつ、0、1、5、10 mmol L<sup>-1</sup> の Ni を投与した結果、10 mmol L<sup>-1</sup> でも生長を続け Ni 耐性を示した。キイシモツケは非常に高い Ni 耐性を有することが示された。また、トサシモツケの幼苗も、高い耐性能を示した (データ省略)。このことは自生地が蛇紋岩土壌ではない植物であるにも関わらず、Ni 耐性を有しているかまたは発揮できることを示している。

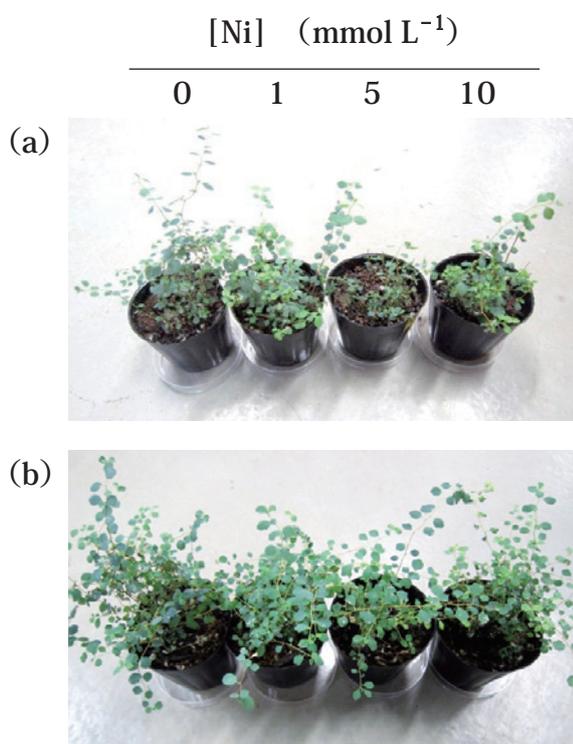


図 5. キイシモツケの Ni 耐性。

(a) 発芽後約 3 か月の幼苗の Ni 添加開始時の様子。

(b) Ni 添加を開始後 1 か月の様子。

各ポットには週に 2 回、種々の濃度の Ni 溶液を 60 mL ずつ散布した。Ni 溶液は肥料として 1000 倍希釈のハイポネックスを含む。Ni は NiSO<sub>4</sub> 溶液として与えた。

### 3.5 分子系統学的分類による比較

分子系統学的な調査ために、葉緑体ゲノムの *trnL-trnF* 間の配列と核ゲノムの rDNA ITS 領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。まず、3 種のシモツケの *trnL-trnF* 間の約 1 kbp の配列を比較した結果、3 つのシークエンスデータは完全に同じであった (図 6)。

キイシモツケ	1	CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACCAGTGAAACCTTCAAAATCAGAGAAACCTGGAATTAATAAT	100
イワシモツケ	1	CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACCAGTGAAACCTTCAAAATCAGAGAAACCTGGAATTAATAAT	100
トサシモツケ	1	CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACCAGTGAAACCTTCAAAATCAGAGAAACCTGGAATTAATAAT	100
キイシモツケ	101	GGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTATGAAAACAAGCAAGGGTTTCATAAACTCATAAACCGAGAATAAAAGAGGATAGTGCAGAGACTCAATGGAA	200
イワシモツケ	101	GGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTATGAAAACAAGCAAGGGTTTCATAAACTCATAAACCGAGAATAAAAGAGGATAGTGCAGAGACTCAATGGAA	200
トサシモツケ	101	GGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTATGAAAACAAGCAAGGGTTTCATAAACTCATAAACCGAGAATAAAAGAGGATAGTGCAGAGACTCAATGGAA	200
キイシモツケ	201	CTGTTCCTAACAAATGGAGTTGACTGCATTGTGTTAGTAAAGGAATCCTCCATCGAAACTTCAGAAAGTATGAAGGATAAACTTATAGACATACATATA	300
イワシモツケ	201	CTGTTCCTAACAAATGGAGTTGACTGCATTGTGTTAGTAAAGGAATCCTCCATCGAAACTTCAGAAAGTATGAAGGATAAACTTATAGACATACATATA	300
トサシモツケ	201	CTGTTCCTAACAAATGGAGTTGACTGCATTGTGTTAGTAAAGGAATCCTCCATCGAAACTTCAGAAAGTATGAAGGATAAACTTATAGACATACATATA	300
キイシモツケ	301	GTACTGAAATCTACTATCTCAAATGATTAATGACGACCCGAATCTGTATTTTTATATTTATATGAAAAATGAAAGAAATGTTGTGAATCGATTCAAATTT	400
イワシモツケ	301	GTACTGAAATCTACTATCTCAAATGATTAATGACGACCCGAATCTGTATTTTTATATTTATATGAAAAATGAAAGAAATGTTGTGAATCGATTCAAATTT	400
トサシモツケ	301	GTACTGAAATCTACTATCTCAAATGATTAATGACGACCCGAATCTGTATTTTTATATTTATATGAAAAATGAAAGAAATGTTGTGAATCGATTCAAATTT	400
キイシモツケ	401	GAAAAAGAAATCGACTATTCAATGATCAAATCATTCACTCCATCATAGTCTGATAGATCTTTTTAAGAATTAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGT	500
イワシモツケ	401	GAAAAAGAAATCGACTATTCAATGATCAAATCATTCACTCCATCATAGTCTGATAGATCTTTTTAAGAATTAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGT	500
トサシモツケ	401	GAAAAAGAAATCGACTATTCAATGATCAAATCATTCACTCCATCATAGTCTGATAGATCTTTTTAAGAATTAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGT	500
キイシモツケ	501	CCCATTTATACATGTCAATACCGACAACAAATGAAATTTTACTAAGAGGAAATCCCGTGCAGTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAA	600
イワシモツケ	501	CCCATTTATACATGTCAATACCGACAACAAATGAAATTTTACTAAGAGGAAATCCCGTGCAGTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAA	600
トサシモツケ	501	CCCATTTATACATGTCAATACCGACAACAAATGAAATTTTACTAAGAGGAAATCCCGTGCAGTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAA	600
キイシモツケ	601	ACGACCTGGTTGACTCCCTAAATTTTACTTTATCATTTTGTAGGGATCAAATTCGTTATGTTTCTCATTCATTCTCATTATACTCTTCCACAACCG	700
イワシモツケ	601	ACGACCTGGTTGACTCCCTAAATTTTACTTTATCATTTTGTAGGGATCAAATTCGTTATGTTTCTCATTCATTCTCATTATACTCTTCCACAACCG	700
トサシモツケ	601	ACGACCTGGTTGACTCCCTAAATTTTACTTTATCATTTTGTAGGGATCAAATTCGTTATGTTTCTCATTCATTCTCATTATACTCTTCCACAACCG	700
キイシモツケ	701	TATCTGAGCGTAAATTTTTTTCTTATCACAAGCCTTGTGTATGATATATATGATACAGCTACAAATGAACAGCGTTGAGCAAGGAATCCCCAATTAATA	800
イワシモツケ	701	TATCTGAGCGTAAATTTTTTTCTTATCACAAGCCTTGTGTATGATATATATGATACAGCTACAAATGAACAGCGTTGAGCAAGGAATCCCCAATTAATA	800
トサシモツケ	701	TATCTGAGCGTAAATTTTTTTCTTATCACAAGCCTTGTGTATGATATATATGATACAGCTACAAATGAACAGCGTTGAGCAAGGAATCCCCAATTAATA	800
キイシモツケ	801	TTTGAATAAATTAACAATACATACCATTACTGTACTGAAACTTTAAAAATAAATTTTTAAAGATCTAAGAAATCCTATCAGGGACTGTATAATACTTTGT	900
イワシモツケ	801	TTTGAATAAATTAACAATACATACCATTACTGTACTGAAACTTTAAAAATAAATTTTTAAAGATCTAAGAAATCCTATCAGGGACTGTATAATACTTTGT	900
トサシモツケ	801	TTTGAATAAATTAACAATACATACCATTACTGTACTGAAACTTTAAAAATAAATTTTTAAAGATCTAAGAAATCCTATCAGGGACTGTATAATACTTTGT	900
キイシモツケ	901	AATACCTTTTTCATTTTTGTAATGACATAGATCCAACTCCTATATTAATAAATAAATTTAGGATGATGCGTCGTGAATGGTCGGGATAGCTCAGCTGGTAG	1000
イワシモツケ	901	AATACCTTTTTCATTTTTGTAATGACATAGATCCAACTCCTATATTAATAAATAAATTTAGGATGATGCGTCGTGAATGGTCGGGATAGCTCAGCTGGTAG	1000
トサシモツケ	901	AATACCTTTTTCATTTTTGTAATGACATAGATCCAACTCCTATATTAATAAATAAATTTAGGATGATGCGTCGTGAATGGTCGGGATAGCTCAGCTGGTAG	1000
キイシモツケ	1001	AGCAGAGGACTGAAAACTCCGTGTCACCAGTTCAAAT	1038
イワシモツケ	1001	AGCAGAGGACTGAAAACTCCGTGTCACCAGTTCAAAT	1038
トサシモツケ	1001	AGCAGAGGACTGAAAACTCCGTGTCACCAGTTCAAAT	1038

図6. 葉緑体ゲノムの *trnL-trnF* 間の塩基配列の比較。5'端と3'端の各20残基はPCRによる増幅に用いたプライマーの配列であるためデータベースにはこの部分を除いて登録した。

次に、rDNAのITS領域の配列を比較した結果、キイシモツケは1か所、イワシモツケで4か所、トサシモツケで1か所の置換を確認することができた(図7)。

キイシモツケ	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTCCGTAATCCCGCGGGTCCGCGCCGCTCGCGTTCCGCTGGTCCCCATGCG	80
イワシモツケ	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTCCGTAATCCCGCGGGTCCGCGCCGCTCGCGTTCCGCTGGTCCCCATGCG	80
トサシモツケ	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTCCGTAATCCCGCGGGTCCGCGCCGCTCGCGTTCCGCTGGTCCCCATGCG	80
キイシモツケ	81	GGACTAGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCATACAAACGAAAAACCGCGCGAAACCGCGCAAGGAACCCCTTAA	160
イワシモツケ	81	GGACTAGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCATACAAACGAAAAACCGCGCGAAACCGCGCAAGGAACCCCTTAA	160
トサシモツケ	81	GGACTAGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCATACAAACGAAAAACCGCGCGAAACCGCGCAAGGAACCCCTTAA	160
キイシモツケ	161	GAATAGGCGCGCTCCCGGAGCCCGGAAAGCGGTGCGCGGACGGGATGCGTGTCCGAATTCATTACTATGTCAAAACGAC	240
イワシモツケ	161	GAATAGGCGCGCTCCCGGAGCCCGGAAAGCGGTGCGCGGACGGGATGCGTGTCCGAATTCATTACTATGTCAAAACGAC	240
トサシモツケ	161	GAATAGGCGCGCTCCCGGAGCCCGGAAAGCGGTGCGCGGACGGGATGCGTGTCCGAATTCATTACTATGTCAAAACGAC	240
キイシモツケ	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGGATACCTGGTGTGAATTCAGAAATCCC	320
イワシモツケ	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGGATACCTGGTGTGAATTCAGAAATCCC	320
トサシモツケ	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGGATACCTGGTGTGAATTCAGAAATCCC	320
キイシモツケ	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAAGCGGTGAGGCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGCGTCAACGCGC	400
イワシモツケ	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAAGCGGTGAGGCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGCGTCAACGCGC	400
トサシモツケ	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAAAGCGGTGAGGCGAGGGCAGCCCTGCCTGGGCGTCAACGCGC	400
キイシモツケ	401	TTGCTCCCCCGCGCCCGCTCCCTTTACTTGGGAGCGACCCGCGGGCGGGCTGATGATGGCTCCCGTGCCTCCGCGG	480
イワシモツケ	401	TTGCTCCCCCGCGCCCGCTCCCTTTACTTGGGAGCGACCCGCGGGCGGGCTGATGATGGCTCCCGTGCCTCCGCGG	480
トサシモツケ	401	TTGCTCCCCCGCGCCCGCTCCCTTTACTTGGGAGCGACCCGCGGGCGGGCTGATGATGGCTCCCGTGCCTCCGCGG	480
キイシモツケ	481	CGGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGCGACGTGCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGTGG	560
イワシモツケ	481	CGGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGCGACGTGCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGTGG	560
トサシモツケ	481	CGGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGCGACGTGCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGTGG	560
キイシモツケ	561	GCGCCGTCGCGTCAACGCGGGCTCGCTTAGCGCCTCGCGACGACCTAGTGCAGGCTTTCAACGCGACCCAGGT	637
イワシモツケ	561	GCGCCGTCGCGTCAACGCGGGCTCGCTTAGCGCCTCGCGACGACCTAGTGCAGGCTTTCAACGCGACCCAGGT	637
トサシモツケ	561	GCGCCGTCGCGTCAACGCGGGCTCGCTTAGCGCCTCGCGACGACCTAGTGCAGGCTTTCAACGCGACCCAGGT	637

図7. 3種類のシモツケの核ゲノムrDNA ITS領域の配列比較。配列が異なる部位を丸印で示した。キイシモツケは龍門山由来、イワシモツケは東北大・植物園由来、トサシモツケは牧野植物園由来。

われわれが得た3種類のシモツケのITS領域の配列情報を、2007年Potterら<sup>(9)</sup>によって報告されたより広汎なシモツケ類のITS配列を加えて、MAFFTを用いて近接接合法による分子系統樹を作製した(図8)。

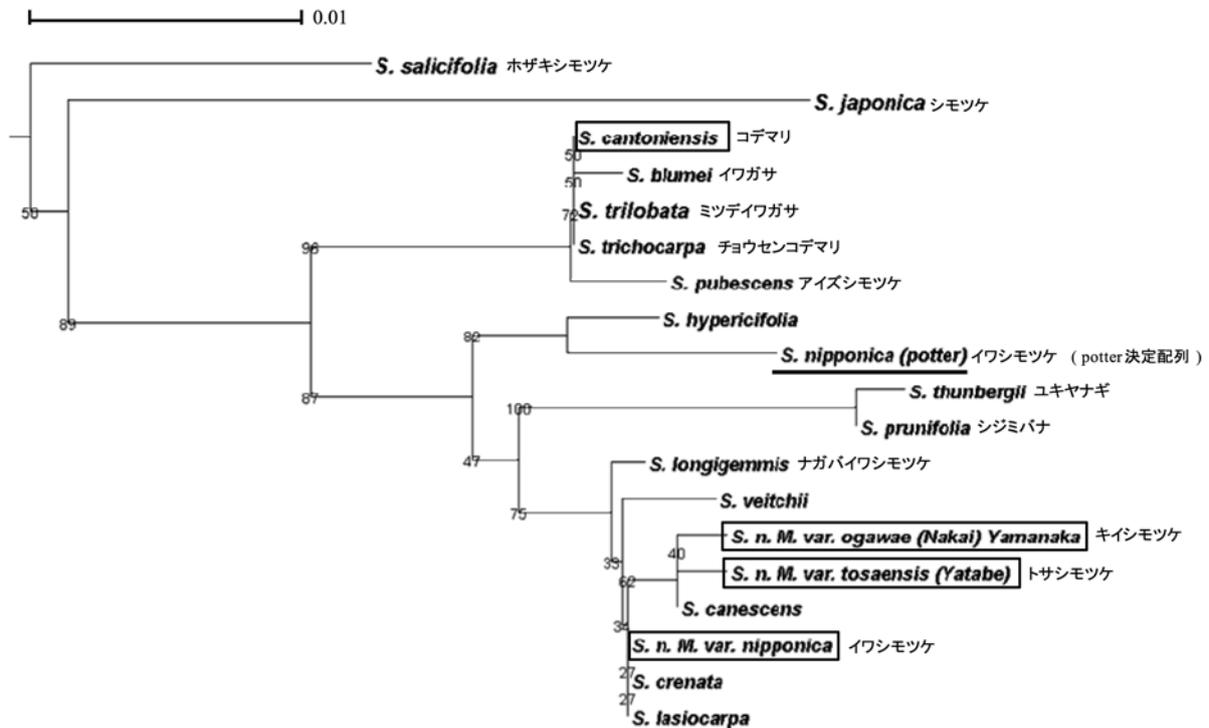


図8. ITS領域の配列をもとに作成したシモツケ類の分子系統樹。*Petrophyton hendersonii*をアウトグループにした近接接合法による系統樹。分岐点の数値はブートストラップ値を示す。四角で囲ったものは本研究で配列決定したものである。

得られた系統樹では、3種類のシモツケを分けるブートストラップ値が低く、分岐の詳細については明確な推定はできなかったが、イワシモツケ、キイシモツケおよびトサシモツケは、分子系統学的にも互いに極めて近縁な種であることが示された。

#### 4. 考 察

本研究では、和歌山県天然記念物のキイシモツケ群落を形成するキイシモツケが分子系統学的にも他の2種類のシモツケと近縁であるか否かを検討した。キイシモツケは発見当初は葉の形態学的知見から独立した新種とみなされたが、その後イワシモツケとトサシモツケとの中間的な形態をもつことが指摘され、変種とされるに至っていた。本研究によって、分子系統学的にも3者の近縁性が明らかとなり、キイシモツケはイワシモツケの変種と考えるのが妥当であることが明らかとなった。同時に生理形態学的な性格付けも行い、いくつかの新知見を得た。

同一環境下においてキイシモツケ、イワシモツケ、トサシモツケを種子から生育させたことで、3種は葉の形態において環境要因ではなく遺伝的に異なる特徴をもつことがわかった。形態的な相違にもかかわらず遺伝子DNAの配列から推定された分子系統樹上での顕著な近縁性は、形態的な相違がごく少数の突

然変異によるのか、もう少し広汎な変異導入の手段によるのか、あるいはエピジェネティックな制御によるのかなど興味深い。

キイシモツケの Ni 耐性に関して、各植物体の葉における金属元素の蓄積量の比較結果より、龍門山の蛇紋岩土壌に自生しているキイシモツケは、葉に Ni を蓄積しながら生存することのできる Ni 耐性能を有することが示された。このような能力を獲得するに至った過程として、考えられる可能性は環境変化と天敵の存在である。蛇紋岩植物の由来に関するこれまでの考え方<sup>(14)</sup>をあてはめると、氷河期と間氷期ないし温暖期が波状的に繰り返されることで、寒帯のイワシモツケが南下と北上を繰り返し、徐々に特定の環境に適応していくことで一部はキイシモツケやトサシモツケのような隔離された地域に適応する固有種になったと考えられる。さらに、バラ科を食草とするタテハチョウ科に属するフタスジチョウやホシミスジの幼虫は、シモツケ属も食する。このような天敵の被害から逃れるためにキイシモツケは、体内に生物にとって有毒な Ni を蓄積する能力を獲得し、虫害抵抗性を有することを選択したのではないかと考えられる。これに加えて、植物にとっては過酷な環境である蛇紋岩地帯で生育することによって、他植物との生存競争を避け、自生することができたのではないかと推測された。

キイシモツケの Ni 耐性能という特異な性質が確認されたものの、キイシモツケ、イワシモツケ、トサシモツケの核ゲノム rDNA の ITS 領域の塩基配列は、99%以上の塩基が一致し、これらの高い近縁性が示された。キイシモツケとは種が異なるが、よく似た花序をもつコデマリ (*Spiraea cantoniensis*) との比較では、ITS 領域の配列における塩基の置換が 29 残基すなわち 4.6%もみられることから (図 9)、3 種のシモツケの近縁性が強く支持された。

コデマリ	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCCACAAACGCTCCCTTGAATCCC CGGGGTCGCGGCCGC	CGCGTTCGCTGGTCCCTTGGC	80
キイシモツケ	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCCACAAACGCTCCCTTGAATCCC CGGGGTCGCGGCCGC	CGCGTTCGCTGGTCCCTTGGC	80
コデマリ	81	GGACTGGCTGCGCGCGCTCCGTCCTCCCGGGGCTACAAACGAAAAACCGCGCGAACCGCGCCAAAGGATCCCTCAAC	160	
キイシモツケ	81	GGACTGGCTGCGCGCGCTCCGTCCTCCCGGGGCTACAAACGAAAAACCGCGCGAACCGCGCCAAAGGATCCCTCAAC	160	
コデマリ	161	GAATAGGCGCGCTCCCGCGAGCCCCGGAACGGTGC CGCGGACGGGCTGCGTCCCGAATTCATTACTATGTCAAACCGAC	240	
キイシモツケ	161	GAATAGGCGCGCTCCCGCGAGCCCCGGAACGGTGC CGCGGACGGGCTGCGTCCCGAATTCATTACTATGTCAAACCGAC	240	
コデマリ	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCAGAAATCCC	320	
キイシモツケ	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTCAGAAATCCC	320	
コデマリ	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCCTGCCTGGGCGTCAACACGCC	400	
キイシモツケ	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCCTGCCTGGGCGTCAACACGCC	400	
コデマリ	401	TTGCCCCCCCGCGCCCGCTCCCTTTTGGGAGCGAATCGGGGCGGGCTGATGTTGGCTCCCCTGCGCTCCGCGCG	480	
キイシモツケ	401	TTGCTCCCCCGCGCCCGCTCCCTTTTGGGAGCGAATCGGGGCGGGCTGATGTTGGCTCCCCTGCGCTCCGCGCG	480	
コデマリ	481	GCGGTTGGCCCAAATACCGAGTCCCCGGCGAGTGCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTGTGCGTGTAGTCGTGC	560	
キイシモツケ	481	GCGGTTGGCCCAAATACCGAGTCCCCGGCGAGTGCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTGTGCGTGTAGTCGTGC	560	
コデマリ	561	GCTCCCGTCGCGTCACGCGGGCTCGGATAGCGCCTCGCGCGCACAGTGC GGAGCTTCAACGCGACCCCA	633	
キイシモツケ	561	GCTCCCGTCGCGTCACGCGGGCTCGGATAGCGCCTCGCGCGCACAGTGC GGAGCTTCAACGCGACCCCA	633	

図 9. キイシモツケとコデマリの ITS 領域の配列比較

また、図 10 に示すように、イワシモツケの ITS 領域配列について、Potter らの決定配列 (DQ897622) を、東北大学植物園由来のものおよび東京大日光植物園由来のものと比較すると、約 4%の不一致な塩基のあることがわかった。図 7 のイワシモツケの ITS 領域の配列は、東北大学のイワシモツケ由来の配列である。東北大学の試料植物は採集地 (東北地方) の記録もあり、標準木とみなせるほど信頼性の高いものである。

図 8 の分子系統樹において、アンダーラインで示された Potter らのイワシモツケは、われわれの 3 種類シモツケよりかなり離れた場所に位置し、われわれの 3 種類シモツケからはかなり系統的に遠い

別の種ということになる。しかし、*trn* 領域の配列においては、Potter らのイワシモツケの配列はわれわれのシモツケの配列と 1 残基しか違わなかったが、系統樹上で近傍に位置する彼らの *S. canescens* の配列は 5-6 残基の置換があった。Potter らの試料とわれわれの試料を直接比較して検討する必要があると思われる。

図 10 に示すように、東北大学由来のイワシモツケと東京大学由来のイワシモツケの双方の ITS 領域配列も一致しなかった。東北大のイワシモツケの方が、キイシモツケおよびトサシモツケとの一致度が低く、東京大学のイワシモツケとキイシモツケおよびトサシモツケとでは 1 塩基ずつしか違わなかった。日光植物園のイワシモツケが関東地方に由来するとすれば、こちらはイワシモツケの自生地南限により近いことから植物地理学的な相違を反映しているのかもしれない。

Potter	1	ACGGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTTTGGAATCCCGGGGTCGCGGCCGTCGCGTTTCGCTGGTCCCTTTGCG	80
東北大	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTTTGGAATCCCGCGGGTTCGCGGCCGTCGCGTTTCGCTGGTCCCTTTGCG	80
日光	1	AACGACCCGAGAACCGATTTCACAAACGTCCTTTGGAATCCCGCGGGTTCGCGGCCGTCGCGTTTCGCTGGTCCCTTTGCG	80
Potter	81	GGACTGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCGTACAAACGAAAAACCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACCCCTTAAAC	160
東北大	81	GGACTAGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCGTACAAACGAAAAACCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACCCCTTAAAC	160
日光	81	GGACTAGCTGCGCGCGCTCCGTCGTCTCCGCGGGCGTACAAACGAAAAACCGGCGCAACCGCGCCAAGGAACCCCTTAAAC	160
Potter	161	GAATAGGCGCGCTCCCGCGAGCCCCGGGAAACCGTGC CGGACGGGCTGCGCTCCCGAATTCATTACTATGTCAAACGAC	240
東北大	161	GAATAGGCGCGCTCCCGCGAGCCCCGGGAAACCGTGC CGGACGGGCTGCGCTCCCGAATTCATTACTATGTCAAACGAC	240
日光	161	GAATAGGCGCGCTCCCGCGAGCCCCGGGAAACCGTGC CGGACGGGCTGCGCTCCCGAATTCATTACTATGTCAAACGAC	240
Potter	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC	320
東北大	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC	320
日光	241	TCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCC	320
Potter	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCGCG	400
東北大	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCGCG	400
日光	321	GTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTCAGGCCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACACGCGCG	400
Potter	401	TTGCTCCCCCGCGCCCCGACCCAACTCTTTGGGAGCGCCGCGGGGCGGGCTGATGATGGCCTCCCGTGGCGTCCGCG	480
東北大	401	TTGCTCCCCCGCGCCCCGACCCAACTCTTTGGGAGCGCCGCGGGGCGGGCTGATGATGGCCTCCCGTGGCGTCCGCG	478
日光	401	TTGCTCCCCCGCGCCCCGACCCAACTCTTTGGGAGCGCCGCGGGGCGGGCTGATGATGGCCTCCCGTGGCGTCCGCG	478
Potter	481	CGCGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGGACGTCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGT	560
東北大	479	CGCGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGGACGTCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGT	558
日光	479	CGCGGTTGGCCAAATACCGAGTCCCGGGGACGTCGCCACGACGATCGGTGGTTGAGAGACCTCTGTGCGAAGTCGT	558

図10. 各イワシモツケの ITS 領域の配列比較

Potter、Potter ら（2007）が決定した配列<sup>(8)</sup>。

東北大、本研究で解析した東北大学植物園の試料の配列。

日光、本研究で解析した東大日光植物園の試料の配列。

本研究において、キイシモツケは葉の形態、発芽時の Ni 耐性などにイワシモツケやトサシモツケとの相違が認められたが、塩基配列情報からはキイシモツケは独立種とは言えず、エコタイプであることが示唆された。キイシモツケとトサシモツケの何らかの共通祖先が、通常土壌と蛇紋岩土壌といった生育環境の違いで葉の形態や Ni 耐性などを獲得し、2 種がイワシモツケの変種として誕生したのではないかと考えられた。一般に蛇紋岩土壌や石灰岩土壌に適応して生育する植物では、種や変種の数一般土壌におけるより多いことが知られているが、特殊土壌が進化の選択圧として重要なものの一つとなっているとされている。そして、およそ 10 万年の周期で訪れる氷期と間氷期による生育環境の温度変化や水不足などが作用したためであろうと考えられている。このように見てくると、蛇紋岩植物の研究は、地理的に隔絶して自生する多数種の植物とその起源となった種の両方が現存し、生きた状態で比較研究が可能であるという点で、植物の進化の要因を解明するうえで絶好の手がかりを与える可能性があるといえよう<sup>(15, 16)</sup>。今後

分子レベルで研究を進めていくうえでは、カギとなる機能分子を見出していくことが必要になるが、鉄イオンのトランスポーターのNi耐性とのかかわりを明らかにするなど先駆的な研究も報告されている<sup>(17)</sup>。今後この分野の研究は、新しいDNA解析技術の出現と相俟ってますます大きな発展を遂げるものと期待される。

本研究において新たに決定した塩基配列はDNAデータベース(DDBJ)に登録した。：キイシモツケ、イワシモツケ(東大日光植物園)およびトサシモツケ(大阪市大植物園)の葉緑体ゲノムの

## 5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、下記の方々には多大の技術的支援やご助言をいただきましたことを、厚く御礼申し上げます。大阪市立大学理学部附属植物園・園長・教授 岡田博氏並びに飯野盛利氏、東京大学大学院理学系研究科附属日光植物園・技術職員 綾部充氏、柴田久仁子氏、高知県立牧野植物園・園芸部長 松本満夫氏、東北大学植物園・助教 大山幹成氏、和歌山県立自然博物館・学芸員 内藤麻子氏、有限会社 鉦石 和歌山営業所・所長 宮田尚武氏、生石山の草原保存会、岩瀬匠氏、丸谷榮彦氏および藤田光宏氏、知人の本田利幸氏。

## 6. 参考文献

1. 小川 由一、紀の国の先人たち、<http://wave.pref.wakayama.lg.jp/bunka-archive/senjin/ogawa.html>
2. Nakai, T. (1928) Notulae and Plantas Japoniae & Koreae XXXVI. Botanical Magazine Tokyo 42, 451-479.
3. 北村四郎 (1952) 日本及び其の付近のシモツケ属、Acta Phytotax. Geobot. 14 (5), 149-159.
4. 山中二男 (1972) イワシモツケ類について、高知大学学術研究報告 21 (10), 自然科学
5. 山中二男 (1973) Notes on *Spiraea ogawae* Nakai、植物研究雑誌 48 (3), 30-32.
6. 北村四郎、村田源 (1979) 原色日本植物図鑑 木本編 (II), pp. 93-94 保育社、
7. 大橋広好、初山泰一、大場秀章 (1989) 日本の野生植物 木本 I, (佐竹義輔、原寛、亘理俊次、富成忠夫 編) pp. 184, 平凡社、東京
8. 長谷部光泰 (1994)。(分担執筆) 分子データからみた陸上植物の系統、「植物の自然史」(岡田博、植田邦彦、角野康郎編), pp. 211-227 北海道大学図書刊行会.
9. D. Potter, S. M. Still, T. Grebenc, D. Ballian, G. Božič, J. Franjič, H. Kraigher (2007) Phylogenetic relationships in tribe Spiraeae (Rosaceae) inferred from nucleotide sequence data. Plant Systematics and Evolution 266 (1), 105-118.
10. Mizuno, N. (1968) Interaction between iron and nickel and copper and nickel in various plant species. Nature 219, 1271-1272.
11. 水野直治 (1979) 蛇紋岩質土壌の化学的特性と農作物の生理傷害に関する研究. 北海道立農業試験場報告 第 29 号, 1-79.

- 
12. 水野直治、堀江健二、野坂志朗（2000） 穂別町坊主山における超塩基性岩， 土壌および超塩基性岩特生植物の化学的特性、日本土壌肥料学雑誌 71, 816-825.
  13. Shi, C., Kitao, M., Agathokleous, E., Watanabe, M., Tobita, H., Yazaki, K., Kitaoka, S., and Koike, T. (2016) Foliar chemical composition of two oak species grown in a free-air enrichment system with elevated O<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub>. *Journal of Agricultural Meteorology* 72 (1), 50-58.
  14. 佐藤謙（2007） 第5章 高山植物に特有な分布型組成、「北海道高山植生誌」 pp.569-580, 北海道大学出版会.
  15. Brady, K. U., Kruckeberg, A. R., and Bradshaw Jr, H. D. (2005) Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils, *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36, 243-266.
  16. Armbruster, W. S. (2014) Multiple origins of serpentine-soil endemism explained by preexisting tolerance of open habitats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 14968-14969.
  17. Nishida, S., Chisato Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. and Mizuno, T. (2011) AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52 (8): 1433-1442.

## 英文抄録

A Study on Kiishimotsuke, an Indigenous Plant to Wakayama Prefecture:  
Adaptation to Serpentine Soil and Molecular Phylogenetic Comparison  
with Iwashimotsuke and Tosashimotsuke

Erika Akedo<sup>1</sup>, Satoko Hirata<sup>1</sup>, Kazuyuki Uwai<sup>1</sup>, Yuko Takagi<sup>2</sup>,  
Takafumi Mizuno<sup>3</sup>, Naoharu Mizuno<sup>4</sup>, Makoto Kobayashi<sup>4</sup>, Takayoshi Koike<sup>5</sup>,  
Kazuyuki T. Yamato<sup>1,2</sup>, Motomu Akita<sup>1,2</sup> and Katsura Izui<sup>1,2</sup>

A plant called Kiishimotsuke (in Japanese) is indigenous to Wakayama prefecture in Japan. The plant vegetates only in the three narrow mountain areas consisting of serpentine soils. The largest colony of this plant in the area of Mt. Ryumon higher than 600 m above sea level had been designated as a prefectural natural treasure since May 1971. The plant was first discovered by Y. Ogawa, a botanist in Iwade city, and registered as a new species with a name of *Spiraea ogawai* Nakai in 1928. However, the validity of this registration was questioned later, because there were two kinds of plants, called Iwashimotsuke and Tosashimotsuke, which were morphologically similar to Kiishimotsuke except for the shape of leaves. Iwashimotsuke is vegetating in northern area than Kinki district, and Tosashimotsuke indigenously in Kochi prefecture. Thus at present Iwashimotsuke is named as *Spiraea nipponica* Maxim, Tosashimotsuke as *S. nipponica* Maxim var. *tosaensis* (Yatabe) Makino, and Kiishimotsuke as *S. nipponica* Maxim var. *ogawae* (Nakai) Yamanaka. In view of recent progress of molecular phylogenetics, the conventional method was employed to examine whether Kiishimotsuke is a species intimately related to the other two plants or not. The nucleotide sequences were determined for the regions of *trnL-trnF* of chloroplast DNA and ITS (Internal Transcribed Spacer) of 5S RNA coding region of nuclear DNA. The results showed that the differences in the sequences were less than 1% among the three, demonstrating their close evolutionary relationships. Thus it is reasonable to conclude that Kiishimotsuke is a variety or ecotype of *S. nipponica* based not only on morphological comparison but also on molecular phylogenetic analysis.

Unexpectedly significant difference in the sequence of the ITS for Iwashimotsuke (*Spiraea nipponica* Maxim) was found between the one published by Potter et al. (DQ897622) and ours (LC133174 and LC13375). The difference remains to be elucidated.

Since Kiishimotsuke is endemic to serpentine soils in Wakayama, the interaction of the plant with serpentine soils was also studied. When these three plants were raised from seeds on non-serpentine cultivation soils, all of them grew normally and the differences in the shape of the leaves were retained, indicating the shapes of leaves were not affected by the kind of soil but determined inherently. Nickel ion is known to be one of the most toxic metal ions in serpentine soils. When the effects of increasing concentrations of Ni<sup>2+</sup> on the sprouting of seeds were tested, Kiishimotsuke was most tolerant among others. In the aboveground parts of Kiishimotsuke plants grown on serpentine soils of Mt. Ryumon, accumulation of Ni<sup>2+</sup> was confirmed and its possible significance of the plant survival was discussed.

Key words: Kiishimotsuke, *Spiraea nipponica* Maxim. var. *ogawae* (Nakai) Yamanaka, Molecular phylogenetics, Spiraeaceae, Serpentine soils

1. School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, 930 Nishimitani, Kinokawa, Wakayama 649-6493 Japan  
2. Institute of Advanced Technology, Kindai University, 14-1 Minamiakasaka, Kainan, Wakayama 642-0017 Japan  
3. Graduate School of Bioresources, Mie University, Tsu 514-8507, Japan  
4. School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkiyodai-Midorimachi. Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan  
5. Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan