

2009 年度

霧多布湿原学術研究助成報告書

北海道野生集団におけるオオサクラソウの
葉緑体ゲノムの遺伝的変異

酪農学園大学大学院

酪農学研究科 飼料作物学専攻

我妻尚広・佐藤由佳

目 次

緒 言	1
第 I 章 SSR マーカーを用いた解析	
序 文	5
材料および方法	6
結果および考察	8
第 II 章 葉緑体ゲノム決定方法の検討	
序 文	9
材料および方法	
1. 供試材料	10
2. DNA の抽出と精製法の検討	10
3. PCR による DNA の増幅法の検討	12
4. PCR 産物の分離と精製法の検討	12
5. シークエンス法の検討	14
結果および考察	
1. 分布および花柱性	15
2. 葉緑体ゲノムの塩基配列決定法の確立	16
第 III 章 葉緑体ゲノムの遺伝的変異の検討	
序 文	18
材料および方法	

1. 供試材料	19
2. DNA 塩基配列の決定	19
3. 分子系統解析	22
結果および考察	23
考 察	25
要 約	28
謝 辞	30
引用文献	31
英文要約	41
図 表	43

結 言

近年，急激な開発にともない地球環境は悪化し，生物多様性の消失が危惧されている．生物多様性とは，すべての生物の間の変異性をいうものとし，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，地域の生物多様性を反映する特定の種を指標とし，それらの個体数や生育・繁殖状況，内包する遺伝的多様性の変化などを調査し，その種を絶滅させないような保全管理を行っていくことが有効である（鷲谷 1999）．その指標種には特定の生息・生育場所と結びつきの強い生態的指標種，絶滅危惧種，地理的固有性の高い種などを用い，その地域の生物多様性の指標にしている．鷲谷・矢原（1996）や鷲谷（1999）は個体数が極端に減少または絶滅した集団の再生を目的に，わずかに残された個体の増殖や，土壌中の埋土種子からの個体再生，あるいは別の生育地からの個体移動や，新たな場所への個体移動などの取り組みを報じている．一方，鷲谷・矢原（1996）や松田（2002）は個体を移動する場合には，地域集団の遺伝的構成を大きく変えるような移動は避ける必要があると指摘している．生物種は，同種であって

も地域的に固有の遺伝的変異を保有している場合があり，このような遺伝的分化が認められる場合には，それをもたらした歴史的背景の尊重や各場所の環境条件に適応した遺伝的構成の保全という視点から，各地域の遺伝的固有性を保全することが重要である．遺伝的に分化した個体間で交雑が起こると，その場所の環境に適応した遺伝子の割合が低下したり，遺伝子間相互作用の崩壊などによって適応的な遺伝子構成が壊れたりすることで交雑後代の適応度が低下する場合がある (Montalvo and Ellstrand 2001, Hufford and Mazer 2003) .

これらの観点から，我が国における生物多様性保全の指標種として，鷺谷を中心とした研究グループは，サクラソウ (*Primula sieboldii* E.Morren) に注目し，その保全方法や遺伝的多様性の把握を試みている．サクラソウの花柱性 (Washitani *et al.* 1994) や受粉 (Washitani *et al.* 1995) ，種子発芽 (Washitani and Kabaya 1988) ，繁殖 (Washitani *et al.* 1991, Washitani *et al.* 1994) などの研究を行い，サクラソウの保全には，生物間相互作用で結ばれた地域全体の生物多様性を保全していくことが不可欠であると報じている (鷺谷・大串 2004) . 一方，種内の集団間や集団内における遺伝的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. また, SSRマーカーは種内の集団間変異を把握する遺伝マーカーとしても有効であることが報告されるようになった (Demesure *et al.* 1995, Newton *et al.* 1999) . さらに, Honjo *et al.* (2008) はSSRマーカーや葉緑体ゲノムを用いて, サクラソウ集団の遺伝的多様性を評価している. このような研究を経てサクラソウは生物多様性保全の指標種として位置づけられ, 利用されている. しかし, 北海道ではサクラソウは道南から日高の限定的な地域にしか分布しておらず, 指標種としての利用地域は限られる. 北海道ではサクラソウに比較し, 近縁のオオサクラソウが広く分布している. オオサクラソウ (*Primula jesoana* Miq var. *jesoana*) は, サクラソウ科のサクラソウ属で, 北海道, 本州中部以北に分布する多年草で亜高山の林縁や谷沿いの湿気の多い場所にはえる (佐竹ら 1981). 北海道や朝鮮には, オオサクラソウの変種であるエゾオオサクラソウ (*Primula jesoana* Miq var. *pubescens* Takeda et Hara) が分布している. エゾオオサクラソウは, オオサクラソウに良く似ているが, 葉柄や花茎に縮れ毛が生えているため容易に区別がつく (佐竹ら 1981). また, オオサクラソウとエゾオオサクラソウは, 北海道のレッドデータブックに希少種として記載され (北海道 2001), 地域の生物多様性を反映する指標種として期待される.

そこで、本研究ではオオサクラソウとエゾオオサクラソウ集団の遺传的多様性を保全するための基礎的知見を得ることを目的に、SSR変異と葉緑体ゲノム変異を指標として、北海道のオオサクラソウとエゾオオサクラソウ野生集団が保有する遺传的多様性とその地理的分布の把握を試みた。

第I章では、サクラソウで開発されたSSRマーカーがオオサクラソウとエゾオオサクラソウで利用可能かを検討した。第II章では、葉緑体ゲノム変異の調査法を検討した。第III章では、葉緑体ゲノム変異を指標として、北海道のオオサクラソウとエゾオオサクラソウ野生集団における母系の地理的分布とそれらの系統関係を明らかにしようとした。

第 I 章 SSR マーカーを用いた解析

序 文

Simple Sequence Repeat (SSR) は 1-5 塩基を単位とする反復配列をもつ DNA 領域のことであり，真核生物のゲノムに普遍的に存在する (Tautz *et al.* 1986). SSR マーカーは共優性であり，集団内でのヘテロ接合度が高く，反復数に大きな変異性を持つことから種の同定，系統解析，遺伝的多様性の評価に有用であることが示唆された (Litt and Luty 1989). 植物では，熱帯樹林のいくつかの属のゲノム上に SSR が豊富に存在すること (Condit and Hubbell 1991) が明らかにされて以来，様々な植物の遺伝学的研究に SSR が有用であることが明らかにされてきた (Amos *et al.* 1993, Terauchi 1994). サクラソウでは，Ueno *et al.* (2003), Ueno *et al.* (2005) や北本ら (2005) により，多くの SSR マーカーが開発された. それらの SSR マーカーを用いて，花の形態と遺伝的多様性との関連 (Yoshida *et al.* 2008) やサクラソウ三倍体種の同定 (加藤ら 2008) などの研究がなされている. しかし，オオサクラソウではまだ SSR マーカーは開発されていない. SSR マーカーを新規に開発する際には，多くのコストと労力が必要である. 一方，Davierwala *et al.* (2000) は近縁の種であれば，別の種で開発された SSR マーカーを利用できる場合があると報じている. 仮に，近縁のサクラソウ SSR マーカーをオオサクラソウ

で利用することが可能であれば開発にかかるコストと労力を削減できる。

そこで、本実験ではサクラソウで開発された SSR マーカーがオオサクラソウやその変種であるエゾオオサクラソウで利用できるかを調べた。

材料および方法

2008 年に釧路地域で採取したエゾオオサクラソウ野生集団の位置および採取日を表 1 に示す。集団には採取した順に地域名と A, B, C…を、個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した。5 月 30 日に浜中町 3 番沢で 5 個体と浜中町 6 番沢で 5 個体採取した。5 月 31 日に浜中町 4 番沢で 5 個体、浜中町 3 番沢で 5 個体、浜中町藻散布で 5 個体、厚岸町末広で 5 個体と釧路町昆布森で 5 個体採取した。1 個体につき 3 枚の葉を採取した。採取した葉は、1 枚ずつ茶袋に入れ、シリカゲルを入れたポリエチレン製ジッパー付きの袋に入れて研究室に持ち帰った。葉は実験に供すまで -80°C の冷凍庫に入れ保存した。実験にはこれら保存した葉を用いた。

DNA 抽出は SDS 0.30%, NaCl 400mM, EDTA 5mM, Tris-HCl 20mM で構成される SNET と Proteinase K (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて加熱抽出法で行った。0.6ml マイクロチューブに SNET 50 μl と Proteinase K 1 μl

を添加し、 -80°C に保存した葉をアルコール消毒したハサミで $5 \times 5\text{mm}$ 程度の大きさに刻んだもの 3 枚程度を浸漬させ、アルミブロック恒温槽 (EYELA MG-2300 型) を用いて 57°C で 60, 90, 120, 150, 180 分と抽出時間を変えてインキュベートして DNA を抽出した。

PCR 反応液は表 2 のように調整し、プライマーには表 3 に示す Ueno *et al.* (2003), Ueno *et al.* (2005) と北本ら (2005) が開発したサクラソウの SSR プライマー組を用いた。PCR 反応にはサーマルサイクラー (ABI Veriti) を用いて、以下の条件で行った。つまり、 94°C で 10 分間熱変性によりポリメラーゼの活性化を行った後、 94°C で 30 秒間、プライマーごとにアニーリング温度を変え 55.5°C ~ 65.8°C で 1 分間、 72°C で 1 分間の反応条件で 40 サイクル行い、 72°C で 7 分間の伸張反応を追加した。反応後は 10°C で保存した。

PCR 産物はアガロースゲルを支持体として、電気泳動法により分離した。アガロースゲル板 (以下ゲル板) は、アガロース S (ニッポンジーン) 0.6g に TBE Buffer 30ml を加え、電子レンジで完全に溶解して型枠に移し、コームを差し込み、2.0%ゲル板を作成した。作成したゲル板は TBE Buffer を入れた電気泳動槽内に沈めた。PCR 産物 $10\mu\text{l}$ と Ez vision (コスモ・バイオ) $1\mu\text{l}$ を混合し、ゲル板のウェルにアプライした。その後、定電圧 100V、25 分間の通電により分離した後、ゲル板に 272nm の UV を照射して目的のバンドの有無

を確認することで DNA の増幅の可否を確認した。

結果および考察

DNA は 60, 90, 120, 150, 180 分のいずれの抽出時間でも同じように抽出された。

サクラソウの SSR プライマー組を用いて増幅された PCR 産物のアガロース電気泳動像を図 1 に示す。 ga0653 領域においてのみ DNA の増幅が確認されたが、他のプライマー組では増幅が認められなかった (表 3)。増幅が確認された ga0653 領域におけるエゾオオサクラソウ野生集団の遺伝的変異の把握を試みた。釧路地域の各集団ごとの PCR によって増幅した ga0653 領域のアガロースゲル電気泳動像を図 2 に示す。同じ個体であっても増幅される場合とされない場合があり、また同じ個体を供試しても多型が検出される場合とされない場合があった。

以上の結果から、サクラソウの SSR プライマー組はエゾオオサクラソウでは安定的な多型の検出が難しいことが明らかになり、エゾオオサクラソウの遺伝的多様性を調べるためには、エゾオオサクラソウで利用できる SSR マーカーの開発が必要であることが示唆された。

第Ⅱ章 葉緑体ゲノムの塩基配列決定方法の検討

序 文

葉緑体ゲノムは、二つの単一領域と1組の逆位反復配列からなる120~217kbp環状の構造をもつ (Palmer 1987). ほとんどの被子植物では母性遺伝するため、地理的変異を解明するのに適していると言われている (Amoatey and Tilney-Bassett 1994). イネやコムギ, タバコなどではその全塩基配列が解読されているため (Hiratsuka *et al.* 1989, Ogihara *et al.* 2002, Shinozaki *et al.* 1986), 比較ゲノムなどの研究も進んでいる. 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解明のための遺伝マーカーとして用いられている. Fujii *et al.* (2002) はブナで, Honjo *et al.* (2004) はサクラソウで系統地理学的解析などの研究を行い, 多く葉緑体プライマーが開発されている (Taberlet *et al.* 1991, 保田・芝山 2006). しかし, 葉緑体ゲノムは突然変異率が低く, いくつかの植物では種内変異が見出されなかったという報告もある (Fujii *et al.* 1996). そのため, 葉緑体ゲノムを用いた解析を行う際には種内変異が見出されるかどうかを検討することが重要である.

そこで, 本実験では Honjo *et al.* (2004) がサクラソウで多くの種内変異を検出した葉緑体ゲノムの非コード領域を増幅する5組のプ

ライマーを用いて、オオサクラソウおよびその変種であるエゾオオサクラソウの種内変異の検出方法を検討した。

材料および方法

1. 供試材料

2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ野生集団の位置と採取日を表4に示す。集団には採取した順に地域名とA, B, C…を、個体には採取した順に1, 2, 3…と付した。6月24日に北空知で3集団60個体、5月21日に日高で3集団60個体、5月28日に釧路で6集団118個体さらに根室では2集団40個体した。1個体ごとに3枚の葉を採取して1枚ずつ茶袋に入れ、シリカゲルを入れたポリエチレン製ジッパー付きの袋に入れて研究室に持ち帰った。葉は実験に供すまで-80℃の冷凍庫に入れ保存した。実験にはこれらの保存した葉を用いた。また、葉を採取する際に花柱性を確認し、記録した。

2. DNA抽出と精製法の検討

DNA抽出は前述のSNETとProteinase Kを用いて加熱抽出法と粉碎抽出法を比較した。

加熱抽出法では、0.6mlマイクロチューブにSNET 150 μ lと

Proteinase K 3 μ l を添加し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した葉 10 \times 10mm 程度の大きさをアルコール消毒したハサミで 1 mm 角に刻んだものを浸漬させ、アルミブロック恒温槽を用いて 57 $^{\circ}$ Cで 60, 90, 120, 150, 180 分と抽出時間を変えてインキュベートして DNA を抽出した。

粉碎抽出法では、0.6ml マイクロチューブに SNET 150 μ l と Proteinase K 3 μ l を添加し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した葉 10 \times 10mm 程度の大きさをそのまま浸漬させ、ホモジナイザーペッスル（アズワン株式会社）を用いて抽出液が薄い緑色になるまですり潰して DNA を抽出した。

抽出した DNA は、等量の中性フェノールを添加し、10 分間ボルテックスにかけた。マイクロ冷却遠心機（KUBOTA 3700）を用いて 10,000rpm, 室温で 10 分間遠心分離した。上層を回収し、新しい 0.6ml マイクロチューブに移し、上層が透明になるまで、中性フェノールで 2 回程度精製を繰り返した。上層に 1/10 容の pH5.2 に調整した 3M 酢酸ナトリウムと 2 倍容の 100%エタノールを添加し、完全に溶解し、-80 $^{\circ}$ Cで 15 分間以上凍結した。15,000rpm, 4 $^{\circ}$ Cで 10 分間遠心分離し、上層を取り除いた後に 200 μ l の 70%エタノールを添加した。15,000rpm, 4 $^{\circ}$ Cで 10 分間遠心分離し、上層を取り除き、0.6ml マイクロチューブの蓋を開けたままキムワイプ上に放置し、アルコールを揮発させた。適量の TE buffer を添加し 4 $^{\circ}$ Cで 1 晩溶解させた。

3. PCR による DNA の増幅法の検討

PCR 反応液は、2×Ampdirect Plus を用いる方法（表 2）と Amplitaq Gold PCR Master Mix を用いる方法（表 5）を比較した。

プライマーには Honjo *et al.* (2004) がサクラソウで多くの種内変異がみられたと報告した葉緑体ゲノムプライマー組を用いた（表 6）。PCR 反応にはサーマルサイクラーを用いて以下のような条件で行った。つまり、95℃で 10 分間熱変性によりポリメラーゼの活性化を行った後、94℃で 30 秒間、プライマーごとにアニーリング温度を変え 60.0℃～63.4℃で 1 分間、72℃で 1 分間の反応条件で 40 サイクル行い、72℃で 7 分間の伸張反応を追加した。反応後は 10℃で保存した。

4. PCR 産物の分離と精製法の検討

PCR 産物はアガロースゲルを支持体として、電気泳動法により分離した。ゲル板は、アガロース S 0.6g にオートクレーブ（アルプ KT2322）で滅菌した TBE Buffer 75ml を加え、電子レンジで完全に溶解し、型枠に移しコームを差し込み、0.8%ゲル板を作成した。作成したゲル板はオートクレーブで滅菌した TBE Buffer を入れた電気泳動槽内に沈めた。PCR 産物 20μl と Ez vision 2μl を混合し、ゲル板のウェルにアプライした。その後、定電圧 100V で 25 分間および 50V で 50 分間の通電により分離し比較した。その後、ゲル板に 272nm

の UV を照射して目的の PCR 増幅 DNA 断片を確認しメスで切り出した。

アガロースゲルからの DNA 断片の回収には、まず 1.5ml マイクロチューブの底に 18G の注射針で穴を開け、その中に切り出したゲルを入れ、穴を開けていないチューブの上に重ねた。その後、8,000rpm、室温で 5 分間ゲルが完全に落ちるまで遠沈を行い、等量の中性フェノールを添加して白濁色になるまで指で弾いてよく混合し、-80℃で 30 分間凍結した。その後、室温で解凍し、15,000rpm、室温で 5 分間遠沈して上清を他のチューブに移し、そこに等量のフェノール/クロロホルム等量混合液を添加して混合し、再び 15,000rpm、室温で 5 分間遠沈した。上清を他のチューブに移し、1/10 容の pH5.2 に調整した 3M 酢酸ナトリウムと 1 容のイソプロパノール (和光純薬) を添加して混合し、5 分間室温下に放置した。その後、15,000rpm、4℃で 30 分間遠沈後、底の白い沈殿物を残して上清を完全に捨てた。チューブに 70%エタノール 400 μ l を入れて沈殿物が動かないよう静かにチューブ内を洗浄し、15,000rpm、4℃で 10 分間遠沈後、上清を完全に捨て沈殿を真空乾燥後、100 μ l の TE Buffer で溶解した。

5. シークエンス法の検討

シークエンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems) を用いた。シークエンスでは、PCR 産物を精製して DNA template とした方法 (表 7) と PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template とした方法 (表 8) を比較した。シークエンス反応にはサーマルサイクラーを用いて、反応液を 95°C 1 分間を 1 サイクル、96°C 30 秒間、50°C 15 秒間、60°C 4 分間の反応条件で 25 サイクル行った。

その後、シークエンス反応液に 125mM EDTA を 2.5 μ l、100%エタノールを 30 μ l 添加して混合し、室温遮光条件下に 10 分間放置した後、15,000rpm で 30 分間遠沈を行った。遠沈後、直ちに上清を取り除き、70%エタノール 200 μ l を添加しチューブ内を洗浄し、15,000rpm で 10 分間遠沈を行った。直ちに上清を完全に取り除き、沈殿を 30 分間室温遮光条件下で風乾を行いサンプルとした。

遮光風乾を行ったサンプルにホルムアミドを 15 μ l 添加してボルテックスで混合した後、95°C で 2 分間加熱後、氷水で急冷し、ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

結果および考察

1. 分布および花柱性

日高で採取した個体は、すべてオオサクラソウであった。北空知、釧路、根室で採取した個体は、花茎や葉柄に縮れ毛が密生していたことから、すべてエゾオオサクラソウであった（佐竹 1981）。供試したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウの花柱性を表 9 に示す。北空知で採取したエゾオオサクラソウの花柱性は、採取日が遅くなり、花の時期が終わっていたため確認することはできなかった。日高で採取したオオサクラソウでは、短花柱花が 37 個体、長花柱花が 23 個体であった。釧路で採取したエゾオオサクラソウでは、短花柱花が 67 個体、長花柱花が 51 個体であった。根室で採取したエゾオオサクラソウでは、短花柱花が 13 個体、長花柱花が 27 個体であった。サクラソウ属の中には、おしべとめしべを同じ位置に持ち、自家和合性である等花柱花の個体も存在するが（Dowrick 1956）、今回調査した個体では見られなかった。また、サクラソウ属はクローン増殖し、その寿命も長いため、少数のクローンが完全に孤立していても、その衰退や変化に気づくのが難しい（大沢ら 1991）。つまり、集団内のすべての個体がクローンであった場合、寿命が来るとすべての個体が消失するという可能性がある。本研究で調査した集団は短花柱花と長花柱花が混在していたため、少なくとも一つのク

ローンからなる個体群ではなく，種子繁殖による正常な個体群であることが示唆された。

2. 葉緑体ゲノムの塩基配列決定法の確立

DNA は，加熱抽出法でも粉砕抽出法でも同じように抽出可能であった。粉砕抽出法では不純物が多く，精製に手間を要した。加熱抽出法での加熱時間は，60，90，120，150，180 分のいずれの抽出時間でも同じように抽出できた。

2×Ampdirect Plus と Amplitaq Gold PCR Master Mix を用いて PCR を行ったアガロース電気泳動像を図 3 に示す。2×Ampdirect Plus を用いた方法は，*trnH-psbA* 領域，*trnL* intron 領域，*trnL-trnF* 領域の 3 組のプライマーで増幅が確認できた。Amplitaq Gold PCR Master Mix を用いた方法は，5 組全てのプライマーで増幅が確認できた。そのうち安定的に増幅できたのは *trnH-psbA* 領域，*trnL* intron 領域の 2 領域であった。また，この 2 領域においてはどちらの調整液を使用しても安定的に増幅できた。一方，2×Ampdirect Plus を用いた方法より，Amplitaq Gold PCR Master Mix を用いた方が安価であった。

精製の際に行う電気泳動は，100V，25 分間の通電を行ったものでは，高電圧のため TBE Buffer が高温になっていた。また，その後のシーケンスで，塩基配列の解読が不可能であった。50V，50 分間

の通電を行ったものでは、その後のシーケンスで解読可能であった。

PCR 産物を精製して DNA template としてシーケンスを行い得られた波形を図 4 に、PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template としてシーケンスを行い得られた波形を図 5 に示す。PCR 産物を精製して DNA template とした方法では、ほとんどの領域を正確に解読することができた。PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template とした方法では、塩基配列の読み始めにノイズが現れることが多かったもののほとんどの領域は正確に解読できた。

以上の結果、DNA 抽出は、60 分間の加熱抽出法、PCR 反応液には、Amplitaq Gold PCR Master Mix が適していることが判明した。また、精製のために行う電気泳動は 50V、50 分間通電の条件で、バンドの確認のみの電気泳動は時間短縮のため 100V、25 分間通電の条件で行うことが可能であった。さらに、シーケンスは、PCR 産物を精製して DNA template とした方法と PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template とした方法を比較した結果、ある程度変異がある部分を限定できれば、PCR 産物を直接サンプルとして使用したもので十分変異を検出可能なことが判明した。

第Ⅲ章 葉緑体ゲノムの遺伝的変異の検討

序 文

葉緑体ゲノムは、保存性が高いためこれまでは主に種間や属間などの分類群間での変異を検出する遺伝マーカーとして用いられてきた (Newton 1999). しかし、近年の研究において葉緑体ゲノムの遺伝子間領域に変異が多く見られ、種内変異を把握する遺伝マーカーとして有効であることが報告された (Okuhara and Harada 2002, Honjo *et al.* 2004) また、葉緑体ゲノムは被子植物では母性遺伝するため地理的変異を解明するのに適していると言われている (Amoatey and Tilney-Bassett 1994). サクラソウでは、Honjo *et al.* (2004)により葉緑体ゲノムを用いた系統地理学的解析がなされた。しかし、筆者の知るかぎりオオサクラソウではまだこのような研究は見られない。

そこで、本実験では、第Ⅱ章において安定的に増幅し、かつ変異の見られた葉緑体ゲノムの *trnH-psbA* 領域と *trnL intron* 領域の 2 領域を用い、北海道野生集団におけるオオサクラソウの遺伝的変異の把握および地理的系統解析を試みた。

材料および方法

1. 供試材料

本実験は第Ⅱ章で述べた北海道の北空知，日高，釧路，根室の4地域から採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウを用いた。その中から，北空知の3集団で採取した10個体，日高の3集団で採取した20個体，釧路の6集団で採取した21個体そして根室の2集団で採取した8個体を供試した（表10）。

2. DNA塩基配列の決定

DNA抽出は前述のSNETとProteinase Kを用いて加熱抽出法で行った。0.6mlマイクロチューブにSNET 150 μ lとProteinase K 3 μ lを添加し，-80 $^{\circ}$ Cに保存した葉10 \times 10mm程度の大きさをアルコール消毒したハサミで1mm角に刻んだものを浸漬させ，アルミブロック恒温槽を用いて57 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートしてDNAを抽出した。抽出したDNAは，等量の中性フェノールを添加し，10分間ボルテックスを行った。マイクロ冷却遠心機（KUBOTA 3700）を用いて10,000rpm，室温で10分間遠心分離した。上層を回収し，新しい0.6mlマイクロチューブに移し，上層が透明になるまで，中性フェノールで2回程度精製を繰り返した。上層に1/10容のpH5.2に調整した3M酢酸ナトリウムと2倍容の100%エタノールを添加し，完全に溶

解し、 -80°C で15分以上凍結した。15,000rpm、 4°C で10分間遠心分離し、上層を取り除いた後に200 μl の70%エタノールを添加した。15,000rpm、 4°C で10分間遠心分離し、上層を取り除き、0.6mlマイクロチューブの蓋を開けたままキムワイプ上に放置し、アルコールを揮発させた。適量のTE bufferを添加し 4°C で1晩溶解させた。

PCR反応液はAmplitaq Gold PCR Master Mixを用いて調整した(表5)。プライマーにはHonjo *et al.* (2004)がサクラソウで多くの種内変異がみられたと報告した葉緑体ゲノムプライマー組のうち第II章において増幅が安定していることがわかった *trnH-psbA* 領域および *trnL intron* 領域を増幅する2組のプライマーを用いた(表6)。PCR反応にはサーマルサイクラーを用いて以下のような条件で行った。つまり、 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、 94°C で30秒間、プライマーごとにアニーリング温度を変え 60.0°C ~ 63.4°C で1分間、 72°C で1分間の反応条件で40サイクル行い、 72°C で7分間の伸張反応を行った。反応後は 10°C で保存した。

PCR産物はアガロースゲルを支持体として、電気泳動法により分離した。ゲル板は、アガロースS 0.6gにオートクレーブで滅菌したTBE Buffer 75mlを加え、電子レンジで完全に溶解し、型枠に移しコームを差し込み、0.8%ゲル板を作成した。作成したゲル板はオート

クレーブで滅菌した TBE Buffer を入れた電気泳動槽内に沈めた。PCR 産物 20 μ l と Ez vision 2 μ l を混合し、ゲル板のウェルにアプライした。その後、50V で 50 分間の通電により分離し、ゲル板に 272nm の UV を照射して目的の PCR 増幅 DNA 断片を確認しメスで切り出した。

アガロースゲルからの DNA 断片の回収には、まず 1.5ml マイクロチューブの底に 18G の注射針で穴を開け、その中に切り出したゲルを入れ、穴を開けていないチューブの上に重ねた。そして、8,000rpm、室温で 5 分間ゲルが完全に落ちるまで遠沈を行い、等量の中性フェノールを添加して白濁色になるまで指で弾いてよく混合し、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間凍結した。その後、室温で解凍させ、15,000rpm、室温で 5 分間遠沈して上清を他のチューブに移し、そこに等量のフェノール/クロロホルム等量混合液を添加して混合し、再び 15,000rpm、室温で 5 分間遠沈した。上清を他のチューブに移し、1/10 容の pH5.2 に調整した 3M 酢酸ナトリウムと 1 容のイソプロパノールを添加して混合し、5 分間室温下に放置した。その後、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠沈後、底の白い沈殿物を残して上清を完全に捨てた。チューブに 70%エタノール 400 μ l を入れて沈殿物が動かないよう静かにチューブ内を洗浄し、15,000rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠沈後、上清を完全に捨て沈殿を真空乾燥した後、100 μ l の TE Buffer で溶解した。

シーケンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems) を用いた。シーケンスでは、PCR 産物を精製して DNA template とした方法 (表 7) と PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template とした方法 (表 8) を併用した。シーケンス反応にはサーマルサイクラーを用いて、反応液を 95°C 1 分間を 1 サイクル、96°C 30 秒間、50°C 15 秒間、60°C 4 分間の反応条件で 25 サイクル行った。

その後、シーケンス反応液に 125mM EDTA を 2.5 μ l、100%エタノールを 30 μ l 添加して混合し、室温遮光条件下に 10 分間放置した後、15,000rpm で 30 分間遠沈を行った。遠沈後、直ちに上清を取り除き、70%エタノール 200 μ l を添加しチューブ内を洗浄し、15,000rpm で 10 分間遠沈を行った。直ちに上清を完全に取り除き、沈殿を 30 分間室温遮光条件下で風乾を行いサンプルとした。遮光風乾を行ったサンプルにホルムアミドを 15 μ l 添加してボルテックスで混合した後、95°C で 2 分間加熱後、氷水で急冷し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

3. 分子系統解析

分子系統解析は、MEGA4 を用いて行った (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。

葉緑体ゲノムの塩基置換，欠失・挿入から，近隣結合 (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987)，最尤 (ML) 法 (Felsenstein 1985, Kishino *et al.* 1990)，非加重平均結合 (UPGMA) 法 (Hillis *et al.* 1996) によって系統樹を作成した．系統樹の信頼性はブートストラップ値 (10,000 反復) によって評価した．

結果および考察

trnH-psbA 領域の塩基配列の変異を表 11 に，*trnL* intron 領域の塩基配列の変異を表 12 に示す．両領域の塩基配列を決定して比較したところ，オオサクラソウとエゾオオサクラソウには六つのハプロタイプが存在することが明らかになった．葉緑体ゲノムの 2 領域の塩基配列にもとづく各供試個体のハプロタイプを表 13 に，葉緑体ゲノムの 2 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプの地理的分布を図 6 に示す．北空知では，ハプロタイプ C, D, E が 1 : 1 : 1 の割合で混在する集団，ハプロタイプ C と D が 3 : 1 の割合で混在する集団およびすべての個体がハプロタイプ C である集団に分かれた．日高の個体はすべてハプロタイプ F であった．釧路では，4 集団がハプロタイプ A であり，内陸側の 2 集団で，ハプロタイプ A とハプロタイプ B が 1 : 3 の割合で混在する集団と，1 : 2 の割合で混在する集団が各 1 集団あった．また，根室ではすべての集団がハプロタイプ A

であった。一方、オオサクラソウとエゾオオサクラソウの葉緑体ゲノム 2 領域の塩基配列変異から得られた遺伝距離を表 14 に示す。オオサクラソウのハプロタイプ F とエゾオオサクラソウのハプロタイプ A, B, C, D, E 間の距離は最も遠く、それぞれ 0.002522, 0.002558, 0.002642, 0.003789, 0.002639 であった。次に、北空知に見られたハプロタイプ D とハプロタイプ A, B, C, E 間が遠く、それぞれ 0.001261, 0.001278, 0.001319, 0.001319 であった。その他のハプロタイプ間では、遺伝距離は 0.000000 と非常に近かった。また、2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプの近隣結合法により構築された系統樹を図 7 に、最尤法により構築された系統樹を図 8 に、非加重結合法により構築された系統樹を図 9 に示す。いずれの系統樹でも、ハプロタイプ F とハプロタイプ A, B, C, D, E のグループが分化し、次にハプロタイプ D とハプロタイプ A, B, C, E が分化し、ハプロタイプ A からハプロタイプ B が分化し、さらにハプロタイプ A からハプロタイプ C, E が分化したものと考えられた。

考 察

霞ヶ浦においてオオサクラソウと同じ異型花柱性を示すアサザの個体群では、異型花柱性崩壊の象徴とされる等花柱花が発見されている（丸井・鷺谷 1993）。また、正常花柱型間にも生理的不和合性が弱く、二型花柱性の崩壊が認められている（上杉ら 2009）。異型花柱性植物は、集団サイズが小さくなると和合性のある異花型の個体や花粉媒体者の訪花が減少するために種子生産率が著しく低下する（Washitani *et al.* 1991）。また、集団内に短花柱花と長花柱花の両花柱型を保持するためには、すくなくとも 20 ジェネット程度維持する必要があると推定されている（本城ら 2002）。本研究で調査したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウの野生集団は、短花柱花と長花柱花がほぼ 1:1 の割合で混在し、両花柱型がバランスよく集団内に分布していた。また、浜中町の 6 番沢では 10 個体しか自生していなかったが、他の地域はすべて 20 個体以上からなる集団であった。以上のことから考え、本研究で調査したほとんどの集団は両花柱型の比や個体数から安定的に正常な種子生産を行うことができる環境にあることが示唆された。

オオサクラソウとエゾオオサクラソウの *trnH-psbA* 領域や *trnL* intron 領域の塩基配列から、六つのハプロタイプが見出された。*trnH-psbA* 領域では二つの塩基置換と一つの挿入・欠失、*trnL* intron

領域では一つの塩基置換と一つの挿入・欠失が見出された。
trnH-psbA 領域は、これまでに 816 種の植物で塩基配列の決定がされており、そのうち 641 種で特異的な配列が認められている (松木ら 2008)。また、*trnL intron* 領域は、カヤツリグサ科で多くの多型が検出されている (Dhooge *et al.* 2003, Senni *et al.* 2005)。平原ら (2007) が行った研究では、10 種のカヤツリグサ科ビャッコイ属で 647bp 中 109bp もの変異が認められたと報告している。2 領域ともに種間や種内において多くの変異が認められ、多くの研究に用いられている (Fujii 2003, Kondo *et al.* 2007)。しかし、Honjo *et al.* (2004) が行ったサクラソウの 2 領域の葉緑体ゲノムの塩基配列では、*trnH-psbA* 領域に三つの塩基置換と一つの挿入・欠失、*trnL intron* 領域においても三つの塩基置換と一つの挿入・欠失が見出され、本研究の結果とそれほど差はなかった。本研究で見出された六つのハプロタイプは特異的な地域分布をしていており、北空知に三つ、日高に一つ、釧路と根室に二つのハプロタイプが存在した。しかし、Honjo *et al.* (2004) はさらに 3 領域の葉緑体ゲノム領域の塩基配列から 35 個のハプロタイプを見出した。このことは、本研究において同じハプロタイプであると判断された個体でも、さらに他の領域の塩基配列を比較することで異なるハプロタイプに位置づけられる可能性を示唆している。

一方、2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプから構築された系統樹の結果から、オオサクラソウとエゾオオサクラソウが分岐していることが判明したが、遺伝距離は 0.002522～0.003789 であった。Suyama *et al.* (1992) が解析したオオシラビソウの 3 地域間の遺伝距離は 0.007～0.012 を示し、これと比較すると、オオサクラソウとエゾオオサクラソウの遺伝距離は非常に近いものであることがわかった。しかし、葉緑体ゲノムは突然変異率が低く、いくつかの植物では種内変異が見出されなかったという報告もあることから (Fujii *et al.* 1996)、本研究で行った 2 領域の葉緑体ゲノム解析の結果のみでは、遺伝距離を過少に評価する可能性がある。オオサクラソウとエゾオオサクラソウのハプロタイプ間の遺伝距離は非常に近いものの、両種のハプロタイプは特異的に地域分布しており、環境に適応して遺伝子の分化も生じている可能性がある。今後は供試個体数や採取地域、比較領域を増やし、これらの関係や分化を明確にする必要がある。一方、本研究の結果、オオサクラソウやエゾオオサクラソウのハプロタイプは地域的に特異性を有することが明らかになった。このことから、保全や復元のためでも地域間で個体を移動する場合、慎重に検討を行う必要性が示唆された。

要 約

北海道に自生しているオオサクラソウの 2 変種は、北海道のレッドデータブックには希少種として記載されている（北海道 2001）。本研究では、北海道で採取したオオサクラソウの 2 変種の葉緑体ゲノムを調査し、自生地と分子系統樹との関連性を検討した。

その結果、オオサクラソウでは一つのハプロタイプであったのに対し、エゾオオサクラソウには五つのハプロタイプが見られた。特にエゾオオサクラソウで見られた五つのハプロタイプの出現頻度には、採取した集団と地域間に違いが認められた。すなわち、北空知で採取したエゾオオサクラソウにはハプロタイプ C, D, E が 1:1:1 の割合で混在する集団と、ハプロタイプ C, D が 3:1 の割合で混在する集団と、すべての個体がハプロタイプ C の集団が、それぞれ 1 集団ずつあった。日高で採取したオオサクラソウはすべてハプロタイプ F であった。また、釧路で採取したエゾオオサクラソウはハプロタイプ A が 4 集団、ハプロタイプ A とハプロタイプ B が 1:2 の割合で混在する集団と 1:3 の割合で混在する集団がそれぞれ 1 集団ずつあった。根室ではすべての個体がハプロタイプ A であった。

本研究で明らかにした六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、はじめに、ハプロタイプ A, B, C, D, E のグループからハプロタイプ F が分化し、次にハプロタイプ D

とハプロタイプ A, B, C, E の分化が起こり, その後, ハプロタイプ A からハプロタイプ B が分化し, さらにハプロタイプ A からハプロタイプ C, E が分化したものと考えられた.

謝 辞

終始熱心なご指導を頂いた資源植物学研究室の我妻尚広教授，家畜遺伝学研究室の上田純治教授，植物育種学研究室の岡本吉弘准教授に心より深く御礼申し上げます。

また，調査に際し，お忙しい中，本研究にご協力，ご助言して頂きました霧多布湿原センターの河原淳氏，高井文子女史，英文作成の際お世話になりました環境昆虫学研究室の佐々木均教授，実験方法のご指導を賜りました助廣那由女史大変ありがとうございました。

さらに，共に励み学んだ横田仁美女史，池田秀明氏，海富拓也氏，田口大剛氏，浅野翔太氏、東山幸介氏をはじめとする後輩の皆様，そして同輩達に心より感謝致するとともに皆様の各方面でのご活躍お祈り申し上げます。最後に温かく見守ってしてくれた家族に感謝致します。

なお，本研究の一部は平成 20，21 年度，霧多布湿原学術研究助成をうけて実施いたしました。

引用文献

- Amos, B., Schlottere, C. and Tautz, D. (1993) Social structure of pilot whales revealed by analytical DNA profiling. *Science* 260: 670-672.
- 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: 89-77.
- Condit, R. and Hubbell, S. P. (1991) Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genomics* 10: 874-881.
- Davierwala, A.P., W.Ramakrishna, P.K.Ranjekar (2000) Sequence variations at a complex microsatellite locus in rice and its conservation in cereals. *Theoretical and applied genetics* 101: 1291-1298.
- Demesure, B., Sodji, N. and Petit, R.J. (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- Dhooge, S., P.Goetghebeur and A.M.Muasya (2003) *Zameioscirpus*, a new genus of Cyperaceae from south America. *Plant Systematics and Evolution* 243: 73-84.

- Dowrick, V.P.J. (1956) Heterostyly and Homostyly in *Primula obconica*.
Heredity 10: 219-236.
- Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach
using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Fujii, N., Ueda, K., and Shimizu, T. (1996) Intraspecific sequence
variation of chloroplast DNA in Japanese alpine plants. Journal of
Phytogeography and Taxon 44: 72-81.
- Fujii, N., Tomaru, N., Okuyama, K., Koike, T., Mikami, T. and Ueda K.
(2002) Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata*
(Fagaceae) in Japan. Plant Systematics and Evolution 232: 21-33.
- Fujii, N. (2003) Chloroplast DNA Phylogeography of *Pedicularis*
resupinata (Scrophulariaceae) in Japan. Acta phytotaxonomica et
geobotanica 54: 163-175.
- Hillis, D.M., C. Moritz and B.K. Mable (1996) Molecular Systematics,
2nd edn. Sinauer, Sunderland, MA.
- 平原友紀・矢野興一・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. Bunrui 7:
23-30.
- Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori,
C. Kondo, Y. Honji, C. R. Sun, B. Y. Meng, Y. Q. Li, 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. *Molecular & general genetics* 217: 185-194.

北海道(2001)“北海道の希少野生生物 北海道レッドデータブック”,
北海道環境生活部環境室自然環境課, 北海道. 134-135 頁.

本城正憲・大澤良・鷺谷いづみ (2002) 岩手大学滝沢演習林における
サクラソウ個体群の現状とその保全に向けて。岩手大学農学部
演習林報告 33: 61-64.

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.

Honjo,M., Takashi Honda, Yoshihiro Tsumura, Izumi Washitani and Ryo
Ohsawa (2008) Origin of traditional cultivars of *Primula
sieboldii* revealed by nuclear microsatellite and chloroplast DNA
variations. *Breeding Science* 58: 347-354.

Hufford, K.M. and Mazer, S.J. (2003) Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 147-155.

加藤淳太郎・村田有紀・鈴木幹奈・池田真由子・吉田康子・上野真義・大澤良・三位正洋 (2008) SSR マーカーによる 3 倍体サクラソウ (*Primula sieboldii*) 種間雑種形成に寄与する非還元雌性配偶子タイプの推定. *育種学研究* 10 (別 2) : 249.

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.

Kishino, H., T. Miyata and M. Hasegawa (1990) Maximum likelihood estimate of the evolution method under a phylogeny and the origin of chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution* 31: 151-160.

北本尚子・上野真義・津村義彦・鷺谷いづみ・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.

- Kondo, K., Mao Shiba, Hiroki Yamaji, Takashi Morita, Cheng Zhengmin, Pan Huixia and Yukihiro Shoyama (2007) Species Identification of Licorice Using nrDNA and cpDNA Genetic Markers. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30: 1497-1502.
- Litt, M. and Luty, J.A. (1989) A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *American journal of human genetics* 44: 397-401.
- 丸井英幹・鷺谷いづみ (1993) 霞ヶ浦におけるアサザの異型花柱性と種子繁殖. *種生物学研究* 17: 59-63.
- 松田裕之 (2002) 野生生物を救う科学的思考とは何か?, “「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, 文一総合出版, 東京. 19-36.
- 松木史弓・阿部聖哉・島野光司・竹内亭・梨本真 (2008) 植物 *rbcL* 遺伝子データベースの構築と植食性動物の食性解析への適用. *日本生態学会誌* 58: 105-112.
- Montalvo, J.K. and Ellstrand, N.C. (2001) Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae) . *American Journal of Botany* 88: 258-269.
- Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. and Ennos, R.A. (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the

- conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140-145.
- 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 and K. Tsunewaki (2002) Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Molecular genetics and genomics* 266: 740-746.
- Okuhara, T., and Harada, K. (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 193-208.
- 大沢良, 津村義彦, 生井兵治, 鷺谷いづみ (1991) 田島ヶ原サクラソウ野生集団のアイソザイム変異, 育雑 41: 331-339.
- Palmer, J. D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *American Naturalist* 130: 6-29.
- 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・大井次三郎・北村四郎・亘理俊次・富成忠夫 (1981) サクラソウ属. “日本の野生植物 草本Ⅲ 合弁花類”, 平凡社, 東京. 21-23.

Senni, K., N. Fujii, H. Takahashi, T. Sugawara and M. 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 tobacco chloroplast genome. Its gene organization and
expression. *European Molecular Biology Organization Journal* 5:
2043-2049.

Suyama, Y., Yoshihiko Tsumura and Kihachiro Ohba (1992) Inheritance
of Isozyme Variants and Allozyme Diversity of *Abies mariesii* in Three
Isolated Natural Forests. *Japanese Forestry Society* 72: 65-73.

Taberlet, P., Ludovic Gielly, Guy Pautou and Jean Bouvet (1991)
Universal primers for amplification of three non-coding regions of
chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.

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.

- Tamura, K., Joel Dudley, Masatoshi Nei and Sudhir Kumar (2007)
Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.
- Tautz, D., Martin Trick and Gabriel A. Dover (1986) Cryptic simplicity
in DNA is a major source of genetic variation. Nature 322: 652-656.
- Terauchi, R. (1994) A polymorphic microsatellite marker from the
tropical tree *Dryobalanops lanceolate* (Dipterocarpaceae). Japan
journal of genetics 69: 567-576.
- 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., Tsumura, Y. and Washitani, I. (2003) Development of
microsatellite markers in *Primula sieboldii* E. Morren, a threatened
Japanese perennial herb. Conservation Genetics 4: 809-811.
- Ueno, S., Naoko Kitamoto, Ryo Ohsawa, Yoshihiko Tsumura & Izumi
Washitani (2005) Nine additional microsatellite markers for *Primula
sieboldii* E. Morren. Conservation Genetics 6: 1063-1064.
- 上杉龍士・西廣淳・鷺谷いづみ (2009) 日本における絶滅危惧水生植
物アサザの個体群の現状と遺伝的多様性. 保全生態学 14: 13-24.
- 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.

- Yoshida, Y., Masanori Honjo, Naoko Kitamoto and Ryo Ohsawa (2008)
Genetic variation and differentiation of floral morphology in wild
Primula sieboldii evaluated by image analysis data and SSR markers.
Breeding Science 58: 301-307.
- Washitani, I. and Kabaya, H. (1988) Germination responses to
temperature responsible for the seedling emergence seasonability of
Primula sieboldii E. Morren in its natural habitat. Ecological Research
3: 9-20.
- Washitani, I., Namai, H., Osawa, R. and Niwa, M. (1991) Species biology
of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat
population: I. Inter-clonal variations in the flowering phenology,
pollen load and female fertility components. Plant Species Biology 6:
27-37.
- Washitani, I., Osawa, R., Namai, H. and Niwa, M. (1994) Patterns of
female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe
pollinator limitation. Journal of Ecology 82: 571-579.
- Washitani, I., Kato, M., Nishihiro, J. and Suzuki, K. (1995) Importance of
queen bumble bees as pollinators facilitating inter-morph crossing in
Primula sieboldii. Plant Species Biology 9: 169-176.

鷺谷いづみ・矢原徹一（1996）種の機能と指標性，“保全生態学入門
—遺伝子から景観まで—”，文一総合出版，東京． 63-71.

鷺谷いづみ（1999）生物多様性保全のための管理と計画“生態保全
の生態学”，共立出版，東京， 122-161.

鷺谷いづみ・大串隆之（2006）サクラソウをめぐる生物間相互作用，
“サクラソウの分子遺伝生態学—エコゲノム・プロジェクトの黎明”，鷺谷いづみ編，東京大学出版会，東京． 84-96.

Genetic diversity of chloroplast genome *Primula jesoana*
in Hokkaido.

Yuka SATO

Summary

Two varieties of *Primula jesoana* inhabiting Hokkaido are described as rare species in Hokkaido in the Red Data Book of Hokkaido (Hokkaido 2001). The variation of chloroplast DNA (cpDNA) in the two varieties of *Primula jesoana* collected in Hokkaido were examined focusing on the relation between gene phylogeny and geographic distribution of the habitats in this study.

In *Primula jesoana* Miq. var. *jesoana* only one haplotype of cpDNA was found and in *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* five haplotypes of cpDNA, whose types varied with the collected population and the locality were found. *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* in Kita-sorachi district were classified into three groups according to the combination of the haplotypes: one had three haplotypes, C, D and E at a ratio of 1:1:1, one had two haplotypes C and D at a ratio of 3:1 and one had only one haplotype C. *Primula jesoana* Miq. var. *jesoana* collected in Hidaka had only one haplotype named F in this study. *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* collected in Kushiro consisted of four populations

having only one haplotype A, one populations having two haplotypes A and B at a ratio of 1:2 and one population having two haplotypes were A and B at a ratio of 1:3. Only one haplotype A was found in *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* collected in Nemuro.

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 F was specialized first, and then D was differentiated from A,B,C and E. After this, B differentiated from A and then C and E differentiated from A.

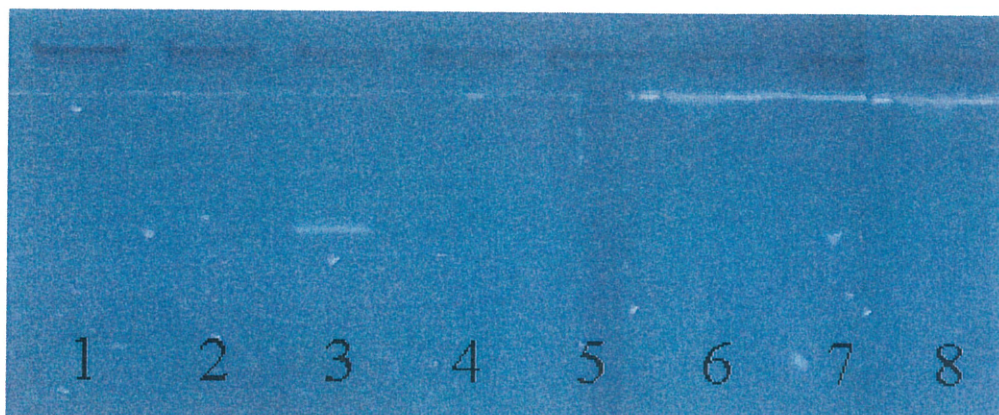


図 1. サクラソウの SSR プライマー組を用いて増幅された PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像。
図中の数字は下記の領域を増幅させる SSR プライマー組を表す。
1. ga0235, 2. ga0381, 3. ga0653, 4. ga0666, 5. ga0668, 6. gal277,
7. Pri0146, 8. Ps-2

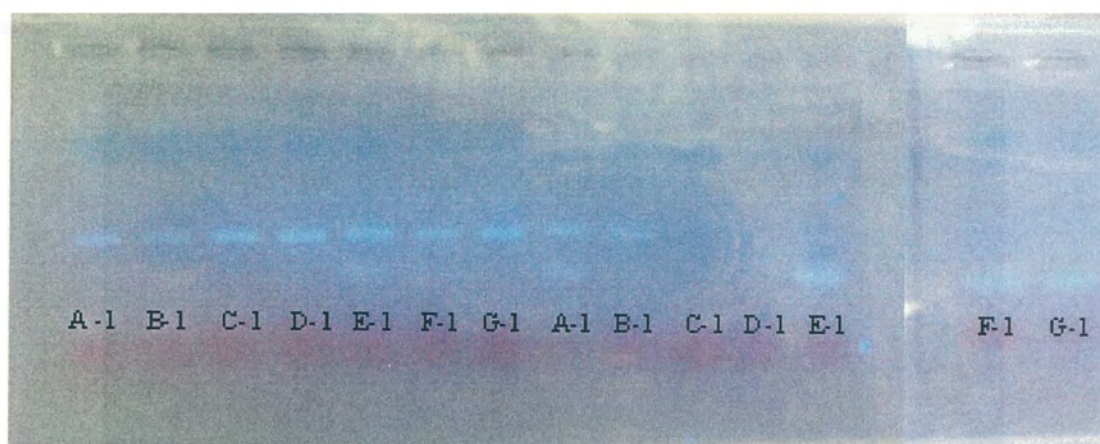


図 2. 釧路地域の各集団ごとの PCR によって増幅した ga0653 領域のアガロースゲル電気泳動像.

図中の表記は表 1 に示す集団 - 個体を表す.



図 3. 2×Ampdirect Plus と Amplitaq Gold PCR Master Mix を用いて PCR を行ったアガロース電気泳動像。

図中の数字は以下の葉緑体ゲノム領域を表す。

1. *trnH-psbA*, 2. *trnD-trnT*, 3. *trnT-trnL*, 4. *trnL* intron,
5. *trnL-trnF*

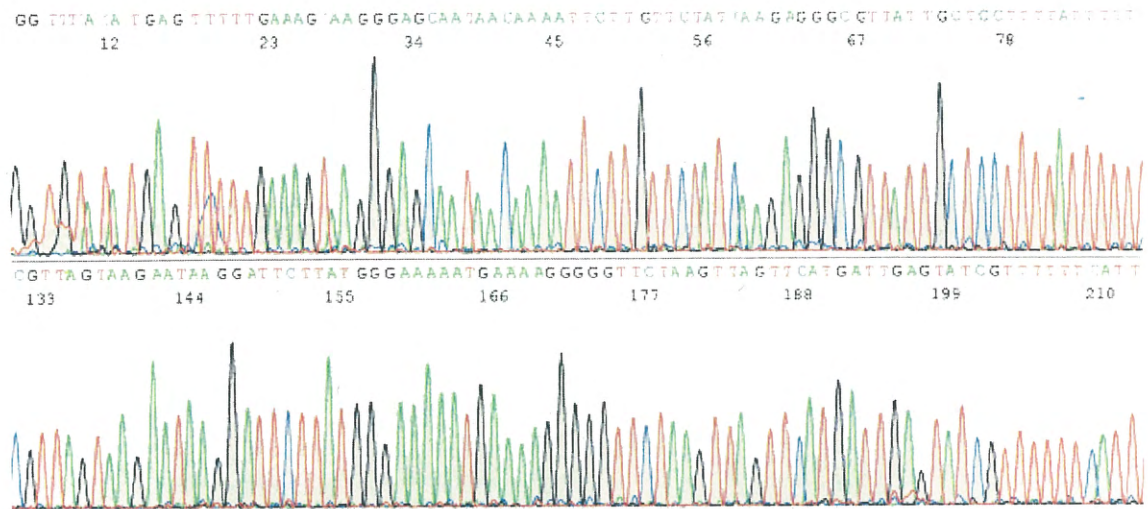


図 4. PCR 産物を精製して DNA template としてシーケンスを行い得られた波形.

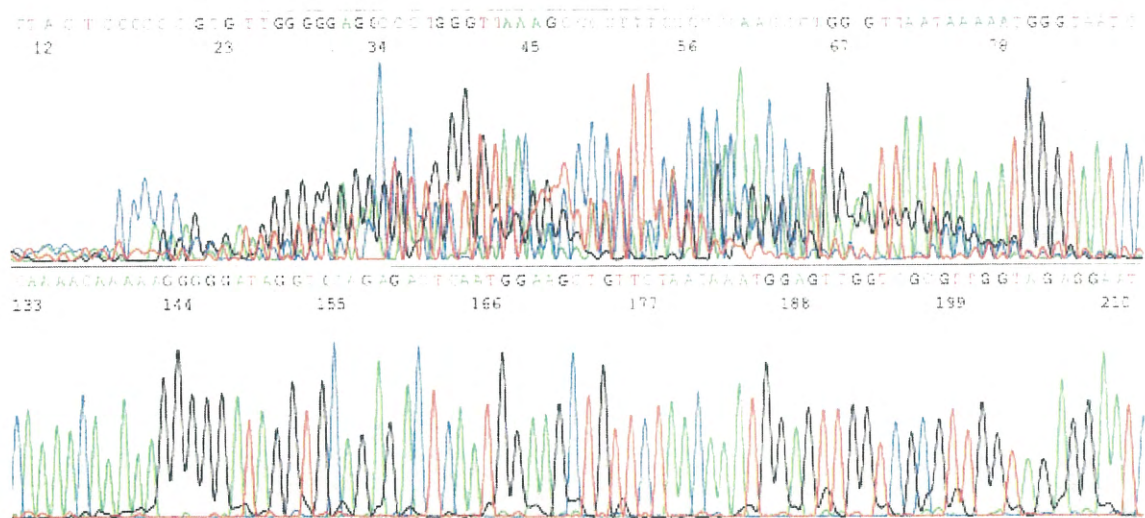


図 5. PCR 産物を 10 倍に希釈して DNA template としてシーケンスを行い得られた波形.

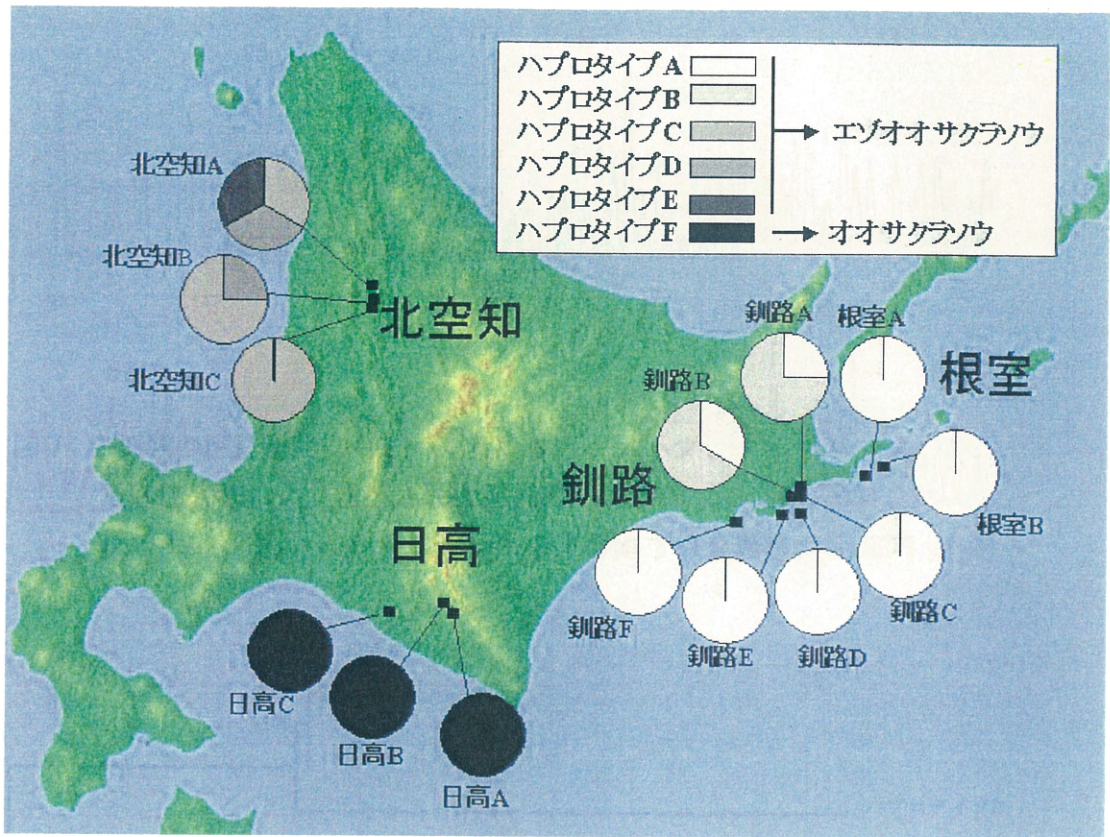


図 6. 葉緑体ゲノムの 2 領域の塩基配列にもとづくハプロタイプの地理的分布.

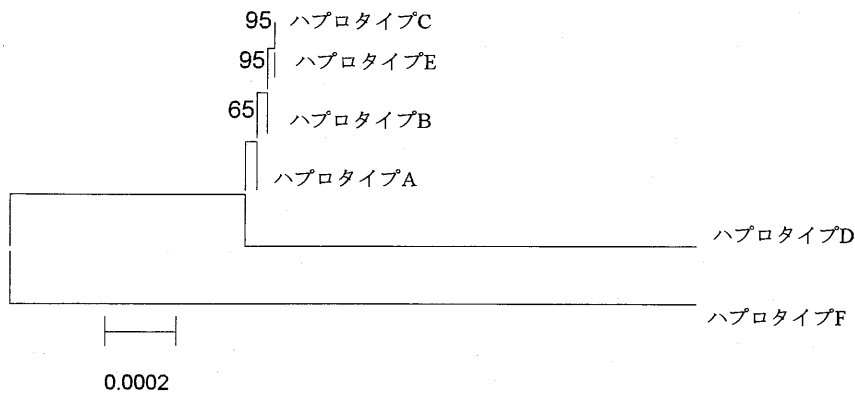


図 7. 2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプの近隣結合法により構築された系統樹。
枝の上の数字は 10,000 はブートストラップ値を表す。

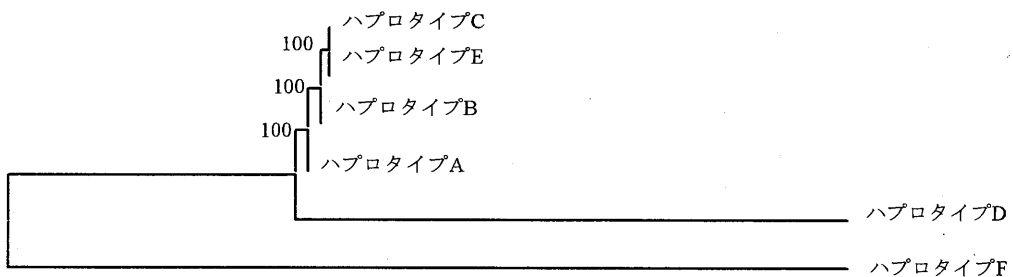


図 8. 2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプの最尤法により構築された系統樹。
枝の上の数字は 10,000 はブートストラップ値を表す。

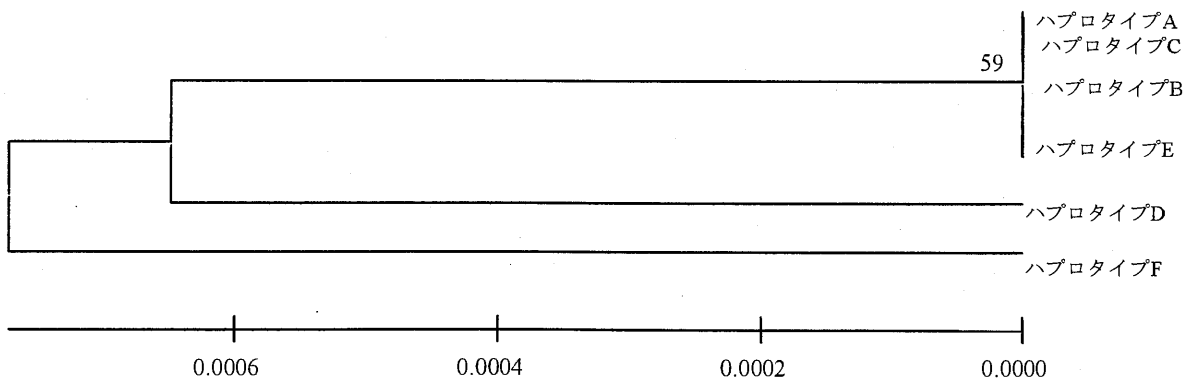


図 9. 2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプの非加重平均結合法により構築された系統樹。
枝の上の数字は 10,000 はブートストラップ値を表す。

表1. 2008年に釧路地域で採取したエゾオオサクラソウ野生集団の位置と採取日

集団・個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
釧路A-1	浜中町 3番沢1	145° 02'	43° 04'	17m	5月30日
釧路A-2	浜中町 3番沢1	145° 02'	43° 04'	17m	5月30日
釧路A-3	浜中町 3番沢1	145° 02'	43° 04'	17m	5月30日
釧路A-4	浜中町 3番沢1	145° 02'	43° 04'	17m	5月30日
釧路A-5	浜中町 3番沢1	145° 02'	43° 04'	17m	5月30日
釧路B-1	浜中町 6番沢	145° 03'	43° 05'	10m	5月30日
釧路B-2	浜中町 6番沢	145° 03'	43° 05'	10m	5月30日
釧路B-3	浜中町 6番沢	145° 03'	43° 05'	10m	5月30日
釧路B-4	浜中町 6番沢	145° 03'	43° 05'	10m	5月30日
釧路B-5	浜中町 6番沢	145° 03'	43° 05'	10m	5月30日
釧路C-1	浜中町 4番沢	144° 34'	42° 57'	99m	5月31日
釧路C-2	浜中町 4番沢	144° 34'	42° 57'	99m	5月31日
釧路C-3	浜中町 4番沢	144° 34'	42° 57'	99m	5月31日
釧路C-4	浜中町 4番沢	144° 34'	42° 57'	99m	5月31日
釧路C-5	浜中町 4番沢	144° 34'	42° 57'	99m	5月31日
釧路D-1	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 00'	10m	5月31日
釧路D-2	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 00'	10m	5月31日
釧路D-3	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 00'	10m	5月31日
釧路D-4	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 00'	10m	5月31日
釧路D-5	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 00'	10m	5月31日
釧路E-1	浜中町 3番沢2	145° 03'	43° 04'	17m	5月31日
釧路E-2	浜中町 3番沢2	145° 03'	43° 04'	17m	5月31日
釧路E-3	浜中町 3番沢2	145° 03'	43° 04'	17m	5月31日
釧路E-4	浜中町 3番沢2	145° 03'	43° 04'	17m	5月31日
釧路E-5	浜中町 3番沢2	145° 03'	43° 04'	17m	5月31日
釧路F-1	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	81m	5月31日
釧路F-2	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	81m	5月31日
釧路F-3	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	81m	5月31日
釧路F-4	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	81m	5月31日
釧路F-5	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	81m	5月31日
釧路G-1	釧路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	100m	5月31日
釧路G-2	釧路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	100m	5月31日
釧路G-3	釧路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	100m	5月31日
釧路G-4	釧路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	100m	5月31日
釧路G-5	釧路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	100m	5月31日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表2. PCR 反応液の調整

2×Ampdirect Plus	10.0μ l
Nova Taq	0.1μ l
F-Primer	0.5μ l
R-Primer	0.5μ l
DNA template	0.5μ l
滅菌水	8.4μ l
計	20.0μ l

表3. 実験に用いたサクラソウのSSRプライマー組

領域	開発者 ¹⁾	プライマー配列	アニーリング温度	増幅	変異
ga 0235	1	CATCTTGTGTACCACCTGTT CTGCGCTTCTCATTCTGTT	63.7°C	×	—
ga 0381	1	TCCTATCTGCAAATACCAAAGTCA AATTGGGATGCGGAAGAGT	63.3°C	×	—
ga 0653	2	ACCGAGAACTTGTACTTGGCACT GAATCACCAGTTTCAGTCCTCCAT	65.8°C	○	×
ga 0666	2	CTTCGCCGGAAGTGT AGAGGAGTGCTCCACTATCTC	59.0°C	×	—
ga 0668	1	TATCCCTCTTATCGAAATTCAAA GAAGCTCCTCCAAGTCCA	60.3°C	×	—
ga 1277	1	CCTCCCCGTCCTTTCTC GGATGATAGGCTGTGCTTACATT	62.9°C	×	—
Pri 0146	3	TACCGTTCGTACATTATTCA CTCGACAGCCAGCAG	55.5°C	×	—
Ps-2	3	ACCATCATTATCTCCCATTTCAA CGACGTCGTCCAGAACCTAT	63.0°C	×	—

¹⁾ 1. Ueno et al. (2003), 2. Ueno et al. (2005), 3. Kitamoto et al. (2005)

表4. 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
北空知A-1	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-2	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-3	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-4	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-5	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-6	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-7	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-8	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-9	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-10	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-11	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-12	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-13	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-14	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-15	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-16	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-17	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-18	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-19	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-20	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知B-1	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-2	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-3	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-4	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-5	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-6	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-7	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-8	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-9	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-10	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-11	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-12	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-13	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-14	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-15	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-16	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-17	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-18	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-19	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-20	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表4（続き）．2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
北空知C-1	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-2	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-3	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-4	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-5	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-6	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-7	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-8	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-9	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-10	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-11	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-12	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-13	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-14	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-15	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-16	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-17	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-18	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-19	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
北空知C-20	幌加内町 朝日林道	142° 08′	44° 01′	160m	6月24日
日高A-1	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-2	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-3	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-4	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-5	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-6	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-7	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-8	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-9	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-10	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-11	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-12	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-13	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-14	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-15	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-16	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-17	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-18	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-19	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日
日高A-20	新ひだか町 静内高見	142° 36′	42° 25′	142m	5月21日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表4 (続き) . 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
日高B-1	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-2	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-3	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-4	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-5	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-6	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-7	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-8	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-9	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-10	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-11	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-12	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-13	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-14	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-15	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-16	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-17	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-18	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-19	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-20	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高C-1	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-2	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-3	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-4	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-5	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-6	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-7	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-8	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-9	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-10	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-11	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-12	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-13	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-14	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-15	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-16	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-17	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-18	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-19	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-20	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表4（続き）. 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
鉏路A-1	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-2	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-3	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-4	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-5	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-6	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-7	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-8	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-9	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-10	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路B-1	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-2	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-3	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-4	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-5	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-6	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-7	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-8	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-9	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-10	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-11	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-12	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-13	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-14	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-15	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-16	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-17	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-18	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-19	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-20	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路C-1	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-2	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-3	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-4	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-5	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-6	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-7	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-8	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-9	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-10	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表4（続き）．2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエンゾオオサクラソウ野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
鉏路C-11	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-12	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-13	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-14	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-15	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-16	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-17	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-18	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-19	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-20	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-21	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-22	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路C-23	浜中町 茶内	145° 03' 43"	07'	68m	5月27日
鉏路D-1	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-2	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-3	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-4	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-5	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-6	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-7	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-8	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-9	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-10	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-11	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-12	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-13	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-14	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-15	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-16	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-17	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-18	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-19	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-20	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-21	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-22	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-23	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-24	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日
鉏路D-25	浜中町 藻散布	145° 01' 43"	01'	20m	5月27日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表4（続き）、2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
鉏路E-1	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-2	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-3	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-4	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-5	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-6	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-7	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-8	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-9	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-10	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-11	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-12	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-13	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-14	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-15	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-16	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-17	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-18	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-19	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-20	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路F-1	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-2	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-3	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-4	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-5	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-6	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-7	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-8	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-9	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-10	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-11	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-12	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-13	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-14	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-15	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-16	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-17	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-18	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-19	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-20	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を、個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した。

表4 (続き) . 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置と採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
根室A-1	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-2	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-3	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-4	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-5	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-6	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-7	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-8	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-9	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-10	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-11	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-12	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-13	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-14	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-15	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-16	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-17	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-18	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-19	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室A-20	根室市 別当賀	145° 28′	43° 13′	70m	5月27日
根室B-1	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-2	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-3	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-4	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-5	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-6	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-7	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-8	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-9	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-10	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-11	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-12	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-13	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-14	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-15	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-16	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-17	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-18	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-19	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日
根室B-20	根室市 昆布盛	145° 32′	43° 14′	30m	5月28日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表5. PCR 反応液の調整

Ampli Taq Gold PCR Master Mix	10.0 μ l
F-Primer	0.5 μ l
R-Primer	0.5 μ l
DNA template	0.5 μ l
滅菌水	8.5 μ l
計	20.0 μ l

表6. 実験に用いた葉緑体DNAプライマー組

領域	開発者 ¹⁾	プライマー配列	アニーリング 温度(°C)	増幅 ²⁾	
				Amp.	M.M
<i>t rn</i> H(GUG)	1	ACGGGAATTGAACCCGCGCA	63.4°C	○	○
<i>psb</i> A	2	CGAAGCTCCATCTACAAATGG			
<i>trn</i> D(GUC)	3	AGGGCGGTACTCTAACCAA	61.1°C	×	○
<i>trn</i> T(GGU)	3	TCTACCGATTTTCGCCATATC			
<i>trn</i> T(UGU)	4	CGAAATCGGTAGACGCTACG	60.3°C	×	○
<i>trn</i> L(UAA)5'exon	4	GGGGATAGAGGGACTTGAAC			
<i>trn</i> L intron F	4	CGAAATCGGTAGACGCTACG	61.3°C	○	○
<i>trn</i> L intron R	4	GGGGATAGAGGGACTTGAAC			
<i>trn</i> L(UAA)3'exon	4	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	60.2°C	○	○
<i>trn</i> F(GAA)	4	ATTTGAACTGGTGACACGAG			

¹⁾ 1. Demesure *et al.* (1995) 2. Hamilton (1999) 3. Yoshimura *et al.* (unpublished)

4. Taberlet *et al.* (1991)

²⁾ Amp は 2 × Ampdirect Plus を, M.M.は Amplitaq Gold Master Mix を用いて PCR を行ったことを表す.

表7. シークエンス 反応液の調整

Reaction Mix(Big Dye ver1.1)	1.0 μ l
5 \times Sequence Buffer	1.5 μ l
Primer(5倍希釈)	0.5 μ l
DNA template	0.2 μ l
滅菌水	6.8 μ l
計	10.0 μ l

表8. シークエンス 反応液の調整

Reaction Mix(Big Dye ver1.1)	0.5 μ l
5 \times Sequence Buffer	2.5 μ l
Primer(5倍希釈)	0.2 μ l
PCR産物(10倍希釈)	0.2 μ l
滅菌水	6.6 μ l
計	10.0 μ l

表9. 供試したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウの花柱性

所在	種名(変種名)	集団数	個体数	花柱性(個体数)	
				短花柱花	長花柱花
北空知	エゾオオサクラソウ	3	60	未確認	
日高	オオサクラソウ	3	60	37	23
釧路	エゾオオサクラソウ	6	118	67	51
根室	エゾオオサクラソウ	2	40	13	27

表10. 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置および採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
北空知A-1	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-2	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知A-3	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	167m	6月24日
北空知B-1	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-2	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-3	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知B-4	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	163m	6月24日
北空知C-1	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	160m	6月24日
北空知C-2	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	160m	6月24日
北空知C-3	幌加内町 朝日林道	142° 08'	44° 01'	160m	6月24日
日高A-1	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高A-2	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高A-3	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高A-4	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高A-5	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高A-6	新ひだか町 静内高見	142° 36'	42° 25'	142m	5月21日
日高B-1	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-2	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-3	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-4	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-5	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-6	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高B-7	新ひだか町 静内高見	142° 33'	42° 28'	477m	5月21日
日高C-1	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-2	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-3	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-4	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-5	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-6	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日
日高C-7	門別町 厚賀	142° 11'	42° 26'	20m	5月21日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表10 (続き) . 2009年に4地域で採取したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウ
野生集団の位置および採取日

集団-個体 ¹⁾	採取地	経度	緯度	標高	採取日
鉏路A-1	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-2	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路A-3	浜中町 六番沢	145° 03'	43° 04'	10m	5月27日
鉏路B-1	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-2	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-3	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-4	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路B-5	浜中町 二番沢	145° 02'	43° 04'	17m	5月27日
鉏路C-1	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-2	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-3	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路C-4	浜中町 茶内	145° 03'	43° 07'	68m	5月27日
鉏路D-1	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 01'	20m	5月27日
鉏路D-2	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 01'	20m	5月27日
鉏路D-3	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 01'	20m	5月27日
鉏路D-4	浜中町 藻散布	145° 01'	43° 01'	20m	5月27日
鉏路E-1	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路E-2	厚岸町 末広	144° 53'	42° 59'	41m	5月29日
鉏路F-1	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-2	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
鉏路F-3	鉏路町 昆布森	144° 36'	42° 57'	140m	5月29日
根室A-1	根室市 別当賀	145° 28'	43° 13'	70m	5月27日
根室A-2	根室市 別当賀	145° 28'	43° 13'	70m	5月27日
根室A-3	根室市 別当賀	145° 28'	43° 13'	70m	5月27日
根室A-4	根室市 別当賀	145° 28'	43° 13'	70m	5月27日
根室B-1	根室市 昆布盛	145° 32'	43° 14'	30m	5月28日
根室B-2	根室市 昆布盛	145° 32'	43° 14'	30m	5月28日
根室B-3	根室市 昆布盛	145° 32'	43° 14'	30m	5月28日
根室B-4	根室市 昆布盛	145° 32'	43° 14'	30m	5月28日

¹⁾ 集団には採取した順に地域名と A, B, C…を, 個体には採取した順に 1, 2, 3…と付した.

表11. *trnH-psb A*領域の塩基配列の変異

タバコゲノム上での位置	161-169	195-203	398-447
ハプロタイプA	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATGTAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA
ハプロタイプB	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATGTAATAAAAAACGACT-----ATAACTAATAA
ハプロタイプC	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATG-----TAA
ハプロタイプD	TTTAGTTCA	AATAGTAAG	TATGTAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA
ハプロタイプE	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATG-----TAA
ハプロタイプF	TTTAATTCA	AATATTAAG	TATGTAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA

表中の - は欠失を表す。

表12. *trnL intron*領域の塩基配列の変異

タバコゲノム上での位置	49593-49630
ハプロタイプA	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプB	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプC	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAA-GAGA
ハプロタイプD	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAA-GAGA
ハプロタイプE	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプF	CGCATGTACTGAAATACTATATCATCAAAATAAAATGTTTATTTTTCTATAAAAAAAGAGA

表中の - は欠失を表す。

表13. 葉緑体ゲノムの2領域の塩基配列にもとづく各供試個体の
ハプロタイプ

集団・個体番号	採取地		採取日	ハプロタイプ
北空知A-1	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知A-2	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	D
北空知A-3	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	E
北空知B-1	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	D
北空知B-2	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知B-3	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知B-4	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知C-1	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知C-2	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
北空知C-3	幌加内町	朝日林道	2009年6月24日	C
日高A-1	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高A-2	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高A-3	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高A-4	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高A-5	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高A-6	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-1	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-2	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-3	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-4	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-5	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-6	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高B-7	新ひだか町	静内高見	2009年5月21日	F
日高C-1	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-2	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-3	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-4	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-5	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-6	門別町	厚賀	2009年5月21日	F
日高C-7	門別町	厚賀	2009年5月21日	F

表13 (続き) . 葉緑体ゲノムの2領域の塩基配列にもとづく各供試個体のハプロタイプ

集団-個体	採取地		採取日	ハプロタイプ
鉤路A-1	浜中町	六番沢	2009年5月27日	B
鉤路A-2	浜中町	六番沢	2009年5月27日	B
鉤路A-3	浜中町	六番沢	2009年5月27日	A
鉤路B-1	浜中町	二番沢	2009年5月27日	A
鉤路B-2	浜中町	二番沢	2009年5月27日	A
鉤路B-3	浜中町	二番沢	2009年5月27日	A
鉤路B-4	浜中町	二番沢	2009年5月27日	A
鉤路B-5	浜中町	二番沢	2009年5月27日	A
鉤路C-1	浜中町	茶内	2009年5月27日	A
鉤路C-2	浜中町	茶内	2009年5月27日	B
鉤路C-3	浜中町	茶内	2009年5月27日	B
鉤路C-4	浜中町	茶内	2009年5月27日	B
鉤路D-1	浜中町	藻散布	2009年5月27日	A
鉤路D-2	浜中町	藻散布	2009年5月27日	A
鉤路D-3	浜中町	藻散布	2009年5月27日	A
鉤路D-4	浜中町	藻散布	2009年5月27日	A
鉤路E-1	厚岸町	末広	2009年5月29日	A
鉤路E-2	厚岸町	末広	2009年5月29日	A
鉤路F-1	鉤路町	昆布森	2009年5月29日	A
鉤路F-2	鉤路町	昆布森	2009年5月29日	A
鉤路F-3	鉤路町	昆布森	2009年5月29日	A
根室A-1	根室市	別当賀	2009年5月27日	A
根室A-2	根室市	別当賀	2009年5月27日	A
根室A-3	根室市	別当賀	2009年5月27日	A
根室A-4	根室市	別当賀	2009年5月27日	A
根室B-1	根室市	昆布盛	2009年5月28日	A
根室B-2	根室市	昆布盛	2009年5月28日	A
根室B-3	根室市	昆布盛	2009年5月28日	A
根室B-4	根室市	昆布盛	2009年5月28日	A

表14. オオサクラソウとエゾオオサクラソウの葉緑体ゲノム2領域の塩基配列変異から得られた遺伝距離

	1	2	3	4	5	6
1 ハプロタイプA	*					
2 ハプロタイプB	0.000000	*				
3 ハプロタイプC	0.000000	0.000000	*			
4 ハプロタイプD	0.001261	0.001278	0.001319	*		
5 ハプロタイプE	0.000000	0.000000	0.000000	0.001319	*	
6 ハプロタイプF	0.002522	0.002558	0.002642	0.003789	0.002639	*