

日本の中部山岳域におけるナギナタコウジュの分子系統: 高山生態型の発見とユーラシア大陸産ナギナタコウジュとの遺伝的差異

田路翼¹, 市野隆雄¹

¹信州大学理学部

Molecular phylogeny of *Elsholtzia ciliata* in Japanese alps: Discovery of the alpine ecotype and genetic differences from the Eurasian continental *E. ciliata*

Tsubasa Toji¹ & Takao Itino¹

¹Faculty of Science, Shinshu University.

Abstract:

We report molecular phylogeny of *Elsholtzia ciliata* collected in the Japanese alps. We collected DNA samples from nine *E. ciliata* populations in Japanese alps and constructed phylogenetic trees based on nuclear ITS region and chloroplast DNA (*trnH-psbA*) sequences. As a result, the relatively large-sized *E. ciliata* which is widely distributed in Nagano Prefecture, Japan was placed in a different DNA phylogenetic lineage from the Korean *E. ciliata*. The plant specimens collected at 1900 m a.s.l. in Japanese alps were small-sized and was phylogenetically distinct from other, larger *E. ciliata* from Nagano. Larger *E. ciliata* from Nagano grows in grasslands, whereas the smaller ‘alpine ecotype’ grows in gravelly rocky areas. Our results suggest that the Japanese *Elsholtzia* species contains ‘alpine ecotype’.

キーワード: 高山, エコタイプ, ナギナタコウジュ属, 分子系統

Keywords: Alpine, Ecotype, *Elsholtzia*, Molecular phylogeny

1. はじめに

ナギナタコウジュ属植物は全世界で43種が記載されており, その大部分は東アジアの山岳地帯であるヒマラヤ周辺に分布している(Li et al. 2017). 日本在来産のナギナタコウジュはナギナタコウジュ *E. ciliata*, フトボナギナタコウジュ *E. argyi nipponica*, ニシキナギナタコウジュ *E. splendens* の3種が知られている(Kitamura & Murata 1957, 清水 & 今井 1994).

我々は長野県松本市美ヶ原思い出の丘標高1900m地点において, 今まで日本産として知られていたナギナタコウジュ属植物とは異なる小型化した個体を多数発見した(Fig. 1). そこで本研究では, 分子系統解析によって小型化個体と長野県内に広く分布するナギナタコウジュ *E. ciliata* の塩基配列を比較し, さらに大陸産のナギナタコ

ウジュ属植物で行われていた分子系統解析の結果を参照して, 長野県産のナギナタコウジュ属植物の系統的位置づけについて議論する.

2. 方法

2-1. サンプリング

長野県中部山岳域の9つのナギナタコウジュ集団(標高860–1900m)において葉サンプルの採取を行った(Fig. 2, Supplementary Table S1). 採取したサンプルは持ち帰り次第ただちにシリカゲルの入った袋に小分けして乾燥標本にした. 8つの集団は林縁の草地に位置し, ここで採取された個体はいずれも草丈が最大1mほどに達する大型の個体であった(Fig. 1a). 一方で, 美ヶ原の思い出の丘(1900m a.s.l.)の集団は中礫の入り混じった砂地に位置し, 風当たりが激しく, 木本および草



Fig. 1 (a) Japanese *Elsholtzia ciliate* in Asamaonsen 860m (a.s.l.) (b) *Elsholtzia* flower (alpine ecotype) in Omoidenooka 1900m (a.s.l.). White scale bars indicated 10cm.

本の少ない立地であった。ここで採取された個体 (Alpine ecotype) は草丈が最大 20cm ほどと小型であった (Fig. 1b)。

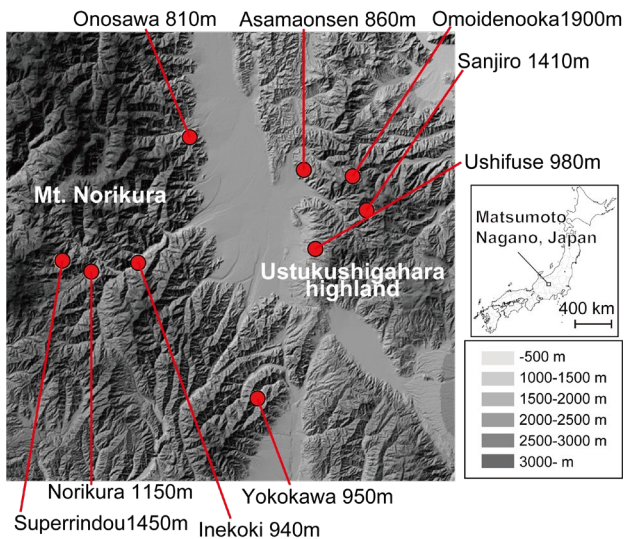


Fig. 2 Location of the studied *Elsholtzia* populations. Population name and altitude (a.s.l.) are indicated.

2-2. 分子系統解析

CTAB 法 (Doyle & Doyle 1990) により採取した葉サンプルから DNA を抽出した。核および葉緑体のシーケンス解析を行った。韓国のナギナタコウジュ属植物の分子系統解析 (Lee et al. 2011) で用いられた 2 プライマーセット (ITS4-5, 5'-TCC TCC

GCT TAT TGA TAT GC-3', 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'; trnH-psbA, 5'-CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC-3', 5'-GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3') を PCR に用いた。これらのプライマーは核 ITS 領域、葉緑体 *trnH-psbA* のスペーサー領域を増幅させる (White et al. 1990, Sang et al. 1997)。これらのプライマーを用いて、先行研究 (Lee et al. 2011) の手法に従って PCR を行った。得られた PCR 産物を ExoSap-IT (USB, Cleveland, OH, USA) により精製した。塩基配列は BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Weiterstadt, Germany) の標準的なプロトコルに従い、ABI 3130 Genetic Analyzer (ABI, Weiterstadt, Germany) により決定した。

得られた ITS 領域 470bp および葉緑体 *trnH-psbA* のスペーサー領域 383bp のデータセットを用いて、maximum likelihood (ML) 法による系統樹作成を行った。系統樹作成は核領域のみの場合と葉緑体領域のみの場合は MEGA7 software (Kumar et al. 2016) を使用し、核と葉緑体領域を組み合わせた場合は TREEFINDER (Jobb et al. 2004) を使用した。系統樹作成の際、先行研究 (Lee et al. 2011, Li et al. 2017) で解析された配列を GenBank データベースから参照することによって、我々の得た塩基配列と相同性の高い配列を得た。これらを含めて系統樹作成を行った

(Supplementary Table S1). 系統樹作成の際, 1000 回のブートストラップ計算によりクレードサポートが与えられた.

3. 結果と考察

核 ITS 領域のみに基づいた系統樹では日本産ナギナタコウジュ (Japanese *E. ciliata*) と高標高タイプ (Alpine ecotype), 韓国産ナギナタコウジュ (Korean *E. ciliata*) は遺伝的に区別された (Fig. 3). 葉緑体領域のみに基づいた系統樹では, 本研究で採取した日本産ナギナタコウジュ (Japanese *E. ciliata*) と高標高タイプ (Alpine ecotype) は遺伝的に区別されなかった (Fig. 4). 核 ITS 領域および葉緑体領域の両方に基づいた系統樹では日本産ナギナタコウジュ (Japanese *E. ciliata*) と高標高タイプ, 韓国産ナギナタコウジュ (Korean *E. ciliata*) は遺伝的に区別された (Fig. 5).

いずれの系統樹パターンにおいても韓国産の *E. ciliata* と今回の研究で採取された日本の *E. ciliata* は異なるクレードに位置していた. *E. ciliate* のタイプ産地は日本であり, 韓国産のナギナタコウジュ *E. ciliata* とされている種は日本で採取されたナギナタコウジュ *E. ciliata* とは遺伝的には遠く離れていたことから, 分類学的な検討の余地がある.

今回, 美ヶ原思い出の丘 (1900m a.s.l.) にて採取した個体 (Alpine ecotype) は非常に小型化していた. このような高地における植物体の小型化は多くの研究例が知られている (Körner et al. 1989, Kappelle et al. 1995, Wilcke et al. 2008). また, 高標高タイプは生育するハビタットが岩や礫の多い環境であることも特徴的であった. 高標高タイプと思われる個体は思い出の丘 (1900m a.s.l.) 以外でも地理的に近い霧ヶ峰の車山 (1920m a.s.l.) で発見することができた (田路 個人観察). 残念ながら発見当時に花期は過ぎており, 植物体が枯れかけている時期に発見したため, DNA による解析は行えなかった. しかし, 植物体の小ささと岩の多いガレ場に生育していたことから, 霧ヶ峰車山で発見した個体も高標高タイプと考えるとよさそうだ. 少なくとも美ヶ原においては低標高では草丈の大きなタイプが生育し, 高標高では小型化したタイプが生育していることが示された. このような標高間のエコタイプの分化パターンはサラシナショウマで同様に観察されており, この

種では少なくとも 3 つのエコタイプが花期や訪花昆虫の違いによって遺伝的分化が維持されている可能性が示唆されている (Kuzume & Itino 2013, Toji & Itino 2020, Toji et al. 2020). 美ヶ原におけるナギナタコウジュの標高間遺伝的分化も何らかの要因によって維持されている可能性がある.

日本産のナギナタコウジュ属植物 3 種のうちナギナタコウジュ *E. ciliata* は日本全国に広域分布し, この研究の調査地である長野県内で最も多くみられる種である (清水 1997). フトボナギナタコウジュ *E. argyi nipponica* は小花序の数が多く花序が太いため, 今回採取したナギナタコウジュ属植物 2 種とは異なる形質を持つ. ニシキナギナタコウジュ *E. splendens* は日本において自生地が非常に限られており, 長野県内でも数地点のみが産地として報告されているのみである (清水 & 今井 1994). また, 本研究ではデータベースから韓国産のニシキナギナタコウジュ *E. splendens* 2 亜種の塩基配列を得て, これが本研究で採取されたものと別の遺伝子型を持っていることを示している (Fig. 3-5).

以上の結果から本研究は, 高標高の岩場に生育する小型のナギナタコウジュ属植物を発見し, 長野県産のナギナタコウジュ *E. ciliata* は少なくとも大陸産のナギナタコウジュ *E. ciliata* とは別の系統であることを示した. 今後はサンプリングスケールを広げ, 今回の研究で扱わなかった他の日本産ナギナタコウジュ属植物を含めて解析することにより, 日本列島におけるナギナタコウジュ属植物の多様化の実態を明らかにすることができるだろう.

謝辞

本研究の着想は長野祐介氏 (当時信州大学) の観察記録より得られました. 系統樹作成については山本哲也氏 (信州大学) にアドバイスを頂きました. 植物の調査および採取許可を頂いた環境省松本自然環境事務所, 林野庁中信森林管理署に感謝します. 本研究は JSPS 科研費 19J22443, 19H03300 の助成を受けたものです.

【参考文献】

- 1) Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(13): 39-40.

- 2) Jobb G, Von Haeseler A, Strimmer K (2004) TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionally Biology* 4–18.
- 3) Kappelle, M., Van Uffelen, J. G. and Cleef, A. M. (1995) Altitudinal zonation of montane *Quercus* forests along two transects in Chirripó National Park, Costa Rica. *Vegetatio* 119(2): 119–153.
- 4) Kitamura, S. and Murata G. (1957) New names and new conceptions adopted in our coloured illustrations of herbaceous plants of Japan (Sympetalae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica* 17(1): 5–13.
- 5) Körner, C., Neumayer, M., Menendez-Riedl, S. P. and Smeets-Scheel, A. (1989) Functional morphology of mountain plants. *Flora* 182(5-6): 353–383.
- 6) Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870–1874.
- 7) Kuzume, H. and Itino, T (2013) Congruence between pollination morphs and genotypes based on Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences of Nuclear Ribosomal DNA in *Cimicifuga simplex* (Ranunculaceae). *Journal of Japanese Botany* 88:176–181.
- 8) Lee, C. S., Hwang, K., Kim, J. O., Suh, H. M. and Lee, N. S. (2011) Taxonomic status of three taxa of *Elsholtzia* (*E. hallasanensis*, *E. springia*, and *E. splendens* var. *fasciflora*) (Lamiaceae) based on molecular data. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 41(3): 259–266.
- 9) Li, P. et al. (2017) Molecular phylogenetics and biogeography of the mint tribe Elsholtzieae (Nepetoideae, Lamiaceae), with an emphasis on its diversification in East Asia. *Scientific reports* 7(1): 1–12.
- 10) Sang, T., Crawford, D. J. and Stuessy, T. F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American journal of Botany* 84(8): 1120–1136.
- 11) 清水建美, 今井建樹 (1994) 長野県で発見されたニシキナギナタコウジュ. 植物地理・分類研究 *The journal of phytogeography and taxonomy* 42(1): 39–41.
- 12) 清水建美 (1997) 長野県植物誌. 信濃毎日新聞社, 長野.
- 13) Toji, T. and Itino, T. (2020) Differences in sex expression and mating systems in three pollination morphs of *Cimicifuga simplex*. *Plant Species Biology* 35:112–119.
- 14) Toji, T., Ishimoto, N. and Itino, T. (2020) Seasonal change of flower sex ratio and pollinator dynamics in three reproductive ecotypes of protandrous plant. *Ecosphere* 11(9): e03251.
- 15) White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York.
- 16) Wilcke, W., Oelmann, Y., Schmitt, A., Valarezo, C., Zech, W. and Homeier, J. (2008) Soil properties and tree growth along an altitudinal transect in Ecuadorian tropical montane forest. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171(2): 220–23.

(原稿受付 2021. 2. 19)

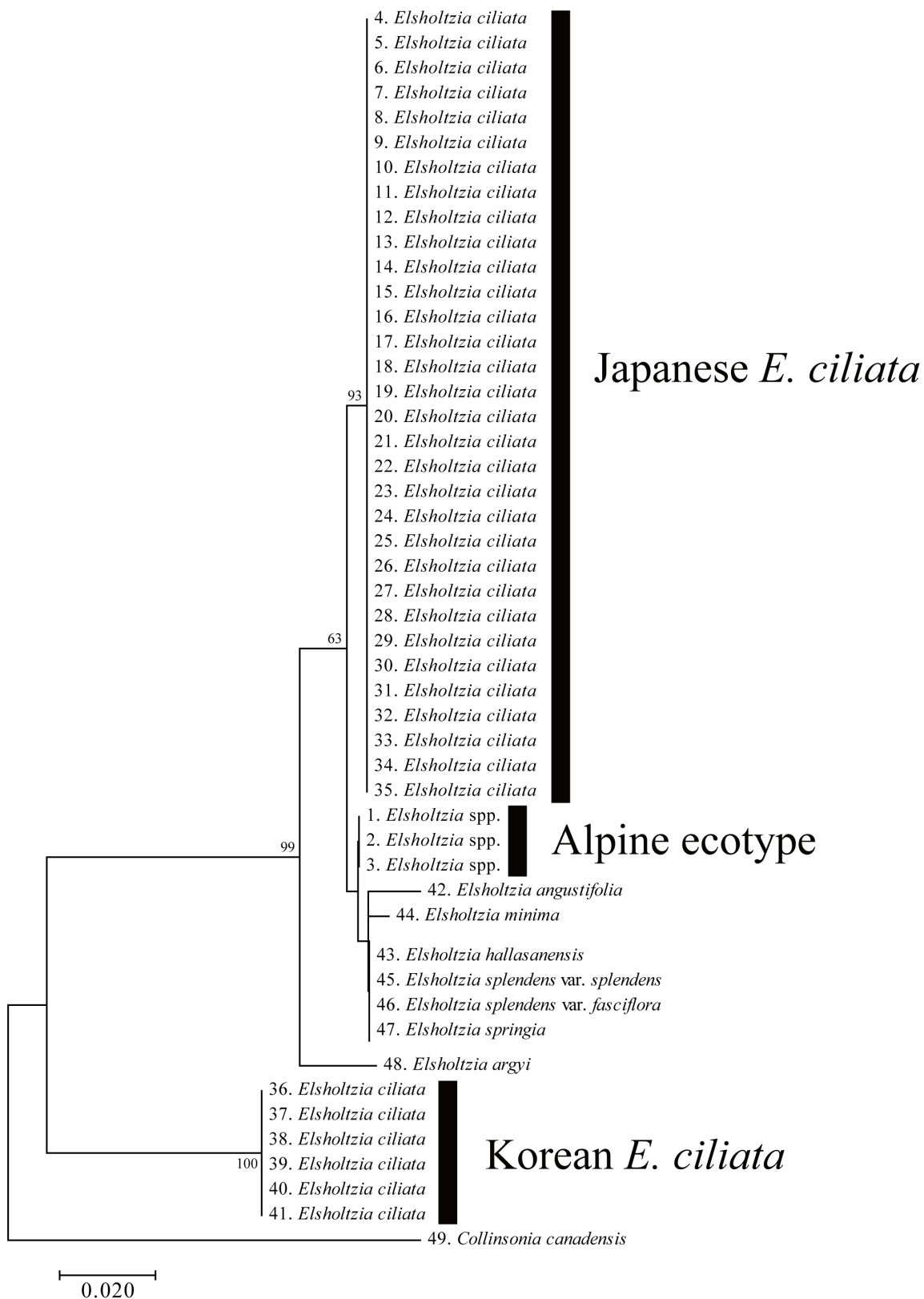


Fig. 3 Phylogenetic tree using maximum likelihood method analysis of *Elsholtzia* species ITS (470bp) sequences. Bootstrap values at major nodes are attached. Scale bar indicates a nucleotide substitution rate.

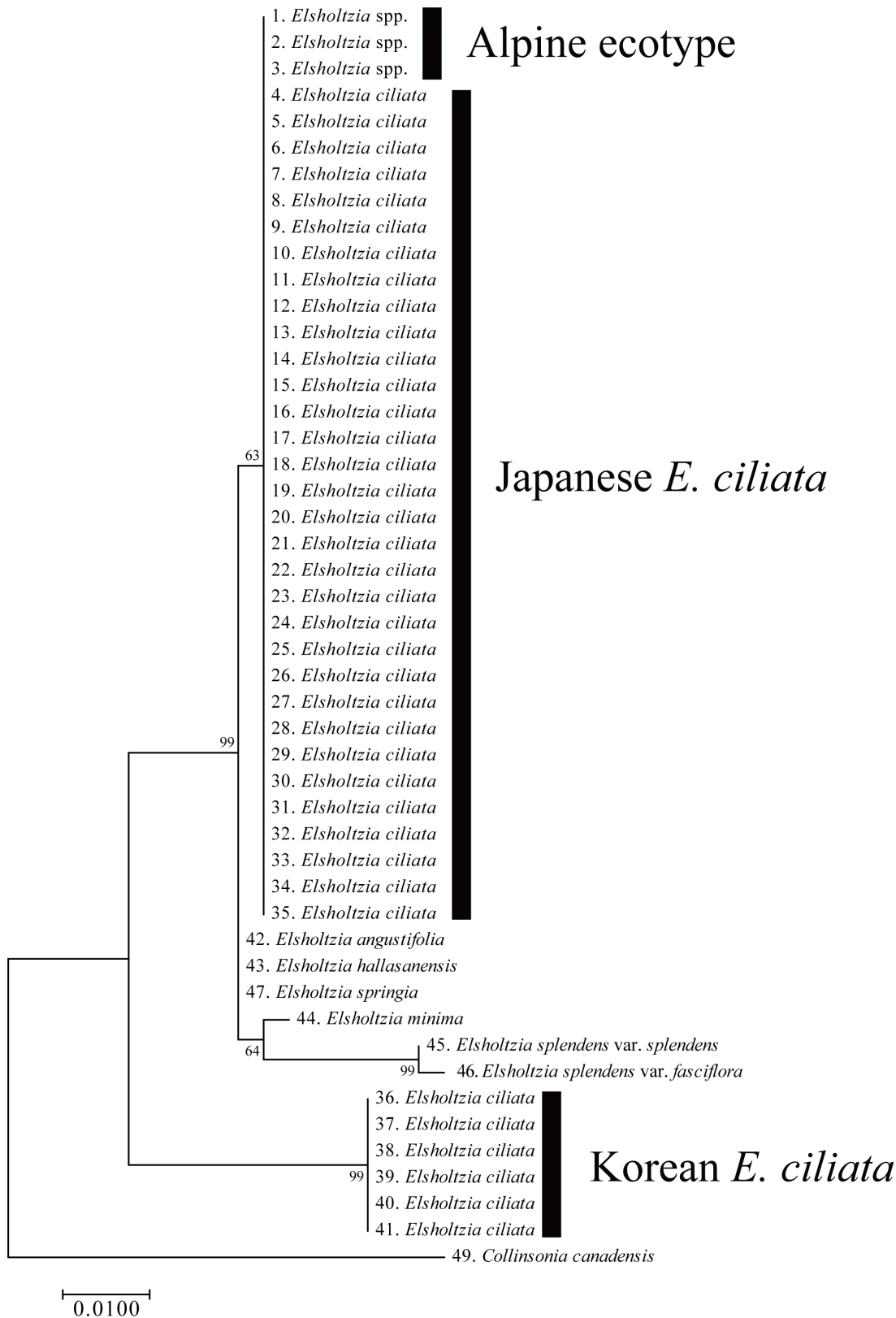


Fig. 4 Phylogenetic tree using maximum likelihood method analysis of *Elsholtzia* species noncoding chloroplast DNA (*trnH-psbA*, 383bp) sequences. Bootstrap values at major nodes are attached. Scale bar indicates a nucleotide substitution rate.

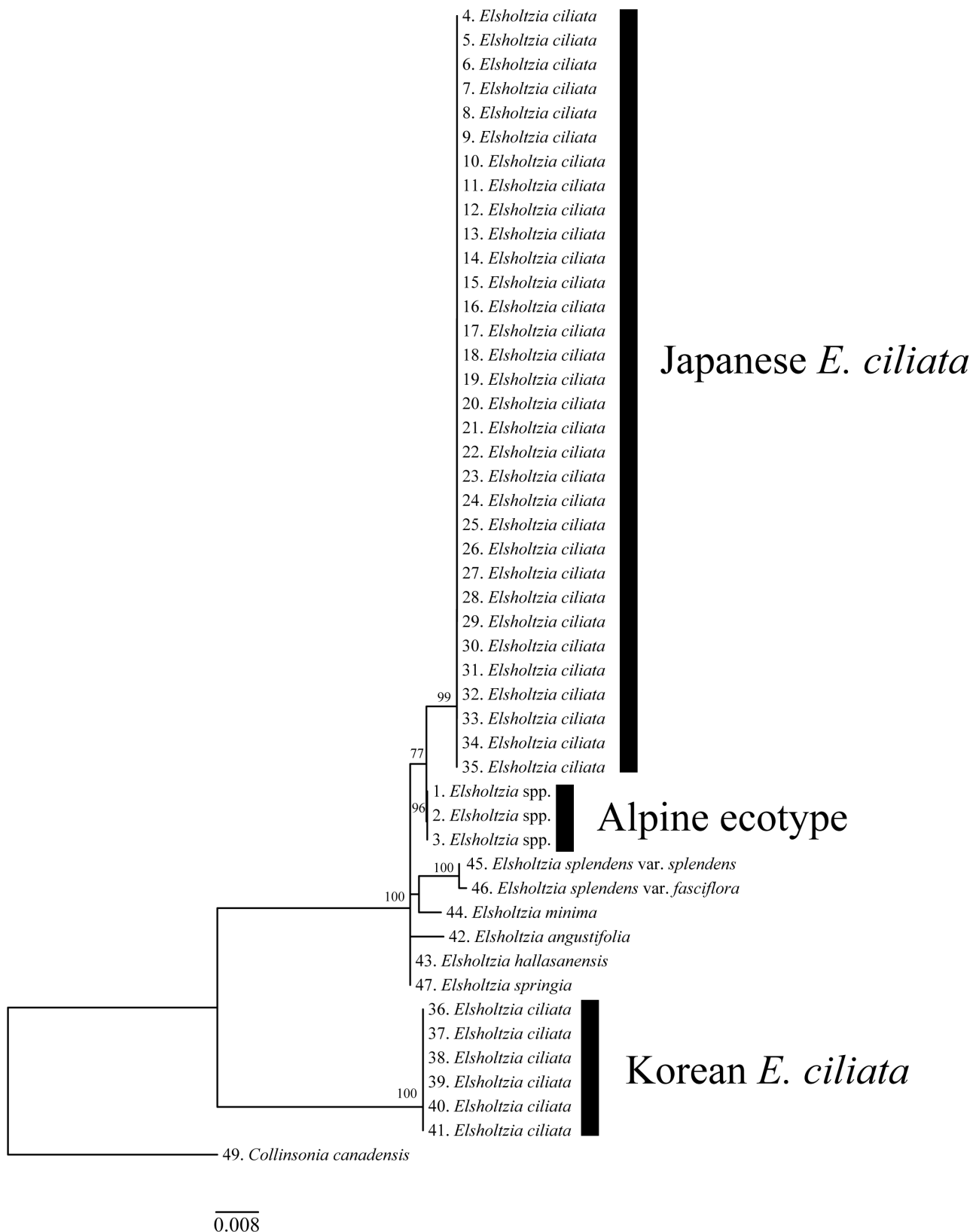


Fig 5. Phylogenetic tree using maximum likelihood method analysis of *Elsholtzia* species ITS (470bp) and noncoding chloroplast DNA (*trnH-psbA*, 383bp) sequences. Bootstrap values at major nodes are attached. Scale bar indicates a nucleotide substitution rate.

Supplementary Table S1. List of sample details and GenBank accession numbers for all sequences.

Sample No.	Taxon	Sampling location (m a.s.l.)	Country	ITS	<i>trnH-psbA</i>	Reference
1	<i>Elsholtzia</i> spp.	Omoidenooka (1900)	Japan	LC605832	LC605867	This study
2	<i>Elsholtzia</i> spp.	Omoidenooka (1900)	Japan	LC605833	LC605868	This study
3	<i>Elsholtzia</i> spp.	Omoidenooka (1900)	Japan	LC605834	LC605869	This study
4	<i>E. ciliata</i>	Onosawa (810)	Japan	LC605843	LC605878	This study
5	<i>E. ciliata</i>	Onosawa (810)	Japan	LC605844	LC605879	This study
6	<i>E. ciliata</i>	Onosawa (810)	Japan	LC605845	LC605880	This study
7	<i>E. ciliata</i>	Onosawa (810)	Japan	LC605846	LC605881	This study
8	<i>E. ciliata</i>	Asamaonsen (860)	Japan	LC605839	LC605874	This study
9	<i>E. ciliata</i>	Asamaonsen (860)	Japan	LC605840	LC605875	This study
10	<i>E. ciliata</i>	Asamaonsen (860)	Japan	LC605841	LC605876	This study
11	<i>E. ciliata</i>	Asamaonsen (860)	Japan	LC605842	LC605877	This study
12	<i>E. ciliata</i>	Inekoki (940)	Japan	LC605855	LC605890	This study
13	<i>E. ciliata</i>	Inekoki (940)	Japan	LC605856	LC605891	This study
14	<i>E. ciliata</i>	Inekoki (940)	Japan	LC605857	LC605892	This study
15	<i>E. ciliata</i>	Inekoki (940)	Japan	LC605858	LC605893	This study
16	<i>E. ciliata</i>	Yokokawa (950)	Japan	LC605859	LC605894	This study
17	<i>E. ciliata</i>	Yokokawa (950)	Japan	LC605860	LC605895	This study
18	<i>E. ciliata</i>	Yokokawa (950)	Japan	LC605861	LC605896	This study
19	<i>E. ciliata</i>	Yokokawa (950)	Japan	LC605862	LC605897	This study
20	<i>E. ciliata</i>	Ushifuse (980)	Japan	LC605835	LC605870	This study
21	<i>E. ciliata</i>	Ushifuse (980)	Japan	LC605836	LC605871	This study
22	<i>E. ciliata</i>	Ushifuse (980)	Japan	LC605837	LC605872	This study
23	<i>E. ciliata</i>	Ushifuse (980)	Japan	LC605838	LC605873	This study
24	<i>E. ciliata</i>	Norikura (1150)	Japan	LC605851	LC605886	This study
25	<i>E. ciliata</i>	Norikura (1150)	Japan	LC605852	LC605887	This study
26	<i>E. ciliata</i>	Norikura (1150)	Japan	LC605853	LC605888	This study
27	<i>E. ciliata</i>	Norikura (1150)	Japan	LC605854	LC605889	This study
28	<i>E. ciliata</i>	Sanjiro (1410)	Japan	LC605863	LC605898	This study
29	<i>E. ciliata</i>	Sanjiro (1410)	Japan	LC605864	LC605899	This study
30	<i>E. ciliata</i>	Sanjiro (1410)	Japan	LC605865	LC605900	This study
31	<i>E. ciliata</i>	Sanjiro (1410)	Japan	LC605866	LC605901	This study
32	<i>E. ciliata</i>	Superrindou (1450)	Japan	LC605847	LC605882	This study
33	<i>E. ciliata</i>	Superrindou (1450)	Japan	LC605848	LC605883	This study
34	<i>E. ciliata</i>	Superrindou (1450)	Japan	LC605849	LC605884	This study
35	<i>E. ciliata</i>	Superrindou (1450)	Japan	LC605850	LC605885	This study
36	<i>E. ciliata</i>	Taebaeksan	Korea	JN578057	JN577989	Lee et al. 2011
37	<i>E. ciliata</i>	Samcheok, Odujae	Korea	JN578058	JN577990	Lee et al. 2011
38	<i>E. ciliata</i>	Taebaeksan	Korea	JN578059	JN577991	Lee et al. 2011

39	<i>E. ciliata</i>	Gwangju	Korea	JN578060	JN577992	Lee et al. 2011
40	<i>E. ciliata</i>	Gwangju	Korea	JN578061	JN577993	Lee et al. 2011
41	<i>E. ciliata</i>	Chuncheon	Korea	JN578062	JN577994	Lee et al. 2011
42	<i>E. angustifolia</i>	Munbyeong, Joryeong	Korea	JN578052	JN577984	Lee et al. 2011
43	<i>E. hallasanensis</i>	Hallasan	Korea	JN578063	JN577995	Lee et al. 2011
44	<i>E. minima</i>	Hallasan	Korea	JN578069	JN578001	Lee et al. 2011
45	<i>E. splendens</i> var. <i>splendens</i>	Samcheong, Baekbyeongsan	Korea	JN578073	JN578005	Lee et al. 2011
46	<i>E. splendens</i> var. <i>fasciflora</i>	Seogwipo-si, Daepodong	Korea	JN578065	JN577997	Lee et al. 2011
47	<i>E. springia</i>	Seogwipo-si, Doneorioreum	Korea	JN578084	JN578016	Lee et al. 2011
48	<i>E. argyi</i>	Lin'an, Zhejiang	China	KY552491	-	Li et al. 2017
49	<i>Collinsonia canadensis</i>	West Virginia	USA	JN578085	JN578017	Lee et al. 2011