

持続性の高い緑化のための ノリウツギの遺伝的地域性の検出

渡邊 敬太*¹・屋柙下 亮*¹・陶山 佳久*²・津村 義彦*³

Keywords : biodiversity, nature positive, symbiosis with nature, greening

生物多様性, ネイチャーポジティブ, 自然共生, 緑化

1. はじめに

生物が持つ遺伝子は地域ごとの異なる環境に適応した変異を持つことが知られる。このことはすなわち、緑化対象の地域に由来する緑化植物の利用が、緑化対象地の環境に適した持続性の高い緑化につながることを意味する。

生物多様性国家戦略 2023-2030 が 2023 年に閣議決定されたが、その基本戦略に「遺伝的多様性の保全等を考慮した施策を実施する」が行動目標として設定されている。ここでは、希少種の遺伝的多様性の維持・確保や、遺伝資源の収集・保全・利用などが具体的施策として示されている。一方で、遺伝子解析において 1 塩基を読み取るためのコストは、ここ 20 年間で約 90 万分の 1 と著しく減少しており¹⁾、今後は大規模な遺伝情報をもとに、農作物などの品種改良や医薬品の開発をはじめとした様々な技術開発が加速することが予想される。加えて、野生生物が持つ遺伝情報を潜在的な遺伝資源ととらえ、現段階では価値が明確でない場合であっても将来の利用に向けて保全していくことが重要とされる²⁾。

2. 緑化における遺伝的多様性への配慮

緑化においては、これまで「生物多様性保全のための緑化植物の取り扱いに関する提言」、「生物多様性緑化ハンドブック」、「広葉樹の種苗の移動に関する遺伝的ガイドライン」、「地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン」、「生物多様性保全のための緑化植物の取り

扱いに関する提言 2019」などによって遺伝的多様性への配慮の重要性が示されている^{3) -7)}。これらは共通して、遺伝的多様性への配慮の手法として、植栽地域の系統の緑化植物の利用を推奨している。植栽地域の系統の緑化植物は「地域性種苗」と呼ばれ、地域固有の遺伝的特徴の保全や、地域の気候に適応した持続性の高い緑化を目的として、緑化工事での利用が進みつつある。

地域性種苗を適切に供給、使用するためには遺伝的な地域差である「遺伝的地域性」の検出が不可欠であり、これまでに国内では多くの種に関して遺伝的地域性が明らかになっている⁶⁾。

3. 緑化植物の遺伝的地域性の評価

遺伝的地域性の判別においては、様々な遺伝情報が用いられているが、植物では片親から受け継ぐ葉緑体 DNA と、両親から受け継ぐ核 DNA が多く用いられている。葉緑体 DNA は一部の植物を除いて母親から受け継がれるため、主に種子によって運ばれる。花粉と種子の両方で運ばれる核 DNA と比べて移動距離が短く、遺伝的な地域差を生じやすい特徴を持つ。一方、核 DNA は遺伝子量が葉緑体 DNA と比較して多く、適応形質に関わる遺伝子を多く含んでいるため、遺伝的地域性の評価に有用である。このように、遺伝的地域性の評価には、特徴の異なる葉緑体 DNA と核 DNA 両方を用いた評価が必要とされる⁵⁾。例えば、「広葉樹の種苗の移動に関する遺伝的ガイドライン」では、葉緑体 DNA と核 DNA に共通して認められる有意な遺伝的な境界を、

* 1 技術センター 都市基盤技術研究部 空間研究室

* 2 東北大学

* 3 筑波大学

種苗の移動を強く制限する境界とし、葉緑体 DNA と核 DNA のどちらか一方に認められる有意な遺伝的な境界を種苗の移動をなるべく避ける境界とする基準を設けている⁵⁾。

核 DNA による遺伝的地域性の評価に影響を与える要素として、植物では同じ種であっても染色体数が異なる種内倍数性が知られている。植物の 24% は倍数体であることが知られ⁸⁾、緑化に多用されるヤブランや、ケヤマハンノキなど、緑化植物においても種内倍数性は一般的である。染色体は核 DNA が折りたたまれた構造体であり、染色体数が増加すると核 DNA のコピー数が増加する。核 DNA のコピー数の増加に伴って似通った遺伝子を識別して比較することが困難であることから、種内倍数性を持つ植物の核 DNA 解析は農作物を中心とした少数の事例に限られている。加えて、種内倍数性は核 DNA のコピー数だけでなく、植物の有性生殖にも影響を与える。異なる染色体数を持つ個体間の交配では、減数分裂が正常に行われず、子孫を残せない個体が生じることから、長期に安定した緑化を実現するためには、染色体数の異なる個体を緑化に用いることは避けるべきである。

よって、種内倍数性を持つ緑化植物の遺伝的地域性は、葉緑体 DNA、核 DNA に加え、染色体数の情報に基づいて評価する必要がある。葉緑体 DNA、核 DNA、染色体数の解析は異なる手法で行われるため、種内倍数性を持つ緑化植物は、遺伝的地域性の検出が困難な植物と言え、遺伝的地域性についての知見が不足している。そこで、著者らは種内倍数性を持つ緑化植物の遺伝的地域性に関する知見の蓄積を目的に、これまで、二倍体、三倍体、四倍体、六倍体が報告され、複雑な種内倍数性を持つノリウツギを対象とした遺伝的地域性の検出を実施してきた。本報では、ノリウツギ *Hydrangea paniculata* の①倍数体の分布、②葉緑体 DNA の遺伝構造、③核 DNA の遺伝構造を示し、これらの解析結果に基づくノリウツギの遺伝的地域性とノリウツギの地域性種苗の供給について報告する。

4. 材料とサンプリング

ノリウツギ(写真-1)は温帯性の落葉低木で、サハリン、南千島、北海道から屋久島までの国内と、中国中南部、台湾に分布する。これまでに二倍体(2n=36)、三倍体(2n=54)、四倍体(2n=72)、六倍体(2n=108)が報告されている⁹⁾。同属中最も耐寒性が強く花の鑑賞価値が高いことから冷温帯の園芸種として国外でも

利用される。国内では砂防用、緑化、園芸で用いられている。国内の倍数体の分布は Funamoto and Ogawa (2002) によって詳細に調査されており、中国、四国の高標高地に二倍体が局所的に分布し、近畿地方を境界として、西は四倍体、東は六倍体が分布する。また、四国地方と中国地方では 2n=54 の三倍体が報告されている¹⁰⁾。

サンプリングは北海道から九州までの 38 の天然集団から 629 個体を採集した。個体間の距離は 50m 以上を基準に採集し、個体数が限られる場合を除き、近距離からの採集を回避した。また、中国雲南省で 1985 年に採集されて圃場に植栽された 1 個体から採集を行った(表-1)。



写真-1 ノリウツギ(高知県のいの町)

Photo.1 *Hydrangea paniculata* in Ino Town, Kochi Pref.

表-1 ノリウツギ採集地と解析個体数

Table 1 Plant materials and localities used in this study

No.	採集地	採集個体数	解析個体数		
			染色体	葉緑体DNA	核DNA
1	北海道 猿払村	20	20	4	20
2	北海道 網走市	20	20	4	19
3	北海道 根室市	20	20	4	18
4	北海道 広尾町	20	20	4	18
5	北海道 余市町	20	20	-	17
6	北海道 札幌市	6	3	3	6
7	青森県 青森市	14	2	4	14
8	岩手県 久慈市	20	20	4	20
9	秋田県 男鹿	20	20	4	14
10	岩手県 宮古	20	20	4	17
11	宮城県 大崎	17	10	4	16
12	山形県 鶴岡市	20	20	4	17
13	新潟県 胎内市	20	20	4	20
14	福島県 双葉町	5	5	4	5
15	福島県 いわき市	20	20	4	19
16	新潟県 妙高市	26	26	4	24
17	栃木県 日光市	12	11	5	11
18	石川県 白山市	20	20	4	20
19	茨城県 つくば市	12	11	3	8
20	長野県 南牧村	20	20	4	20
21	長野県 富士見市	9	-	-	9
22	静岡県 井川町	15	6	-	15
23	静岡県 伊豆市	20	20	4	20
24	京都府 宮津市	5	5	4	5
25	兵庫県 養父市	20	20	4	18
26	兵庫県 朝来市	10	8	4	10
27	大阪府 和泉市	3	3	3	3
28	和歌山県 葛城市	21	17	4	20
29	鳥取県 大山町	19	19	19	19
30	徳島県 美馬市	20	20	20	20
31	愛媛県 新居浜市	15	13	4	4
32	高知県 いの町	15	15	4	14
33	高知県 越知町	17	17	4	15
34	福岡県 添田町	20	20	4	19
35	大分県 九重町	19	19	4	19
36	熊本県 阿蘇市	20	20	4	19
37	長崎県 雲仙市	9	9	4	9
38	宮崎県 えびの市	20	20	4	20
39	中国 雲南省	1	1	1	1

5. 倍数性の推定

5.1 方法

38 集団 580 個体についてフローサイトメーター (株) サイトテックス : Quantum P) を用いて核酸蛍光量を測定して倍数性を推定した。ノリウツギの葉 1 cm² と植物 DNA 分析用 DAPI 単液試薬 (株) サイトテックス) 100 μl をシャーレ上でカミソリを用いて刻み、1 分程度染色したのちに FiltriX フィルター 50 μm (黄) でろ過した後、冷蔵で最長 1 日間保存した。冷蔵保存した溶液の核酸蛍光量を Quantum P を用いて計測した。

5.2 結果と考察

倍数体の分布を図-1 に示す。38 集団 580 個体のうち、二倍体は 29 個体推定され、鳥取県と四国に分布した。四倍体は 148 個体推定され、中国地方、四国、九州に分布した。六倍体は 402 個体で近畿より東に分布した。四国の 2 集団で二倍体と四倍体が同所的に出現した。図の範囲外で中国湖南省の 1 個体は二倍体であった。

ノリウツギは国内において、近畿を境界とし、南西二倍体と四倍体、北東に六倍体が分布する構造を持ち、Funamoto and Ogawa (2002) の結果と一致した。

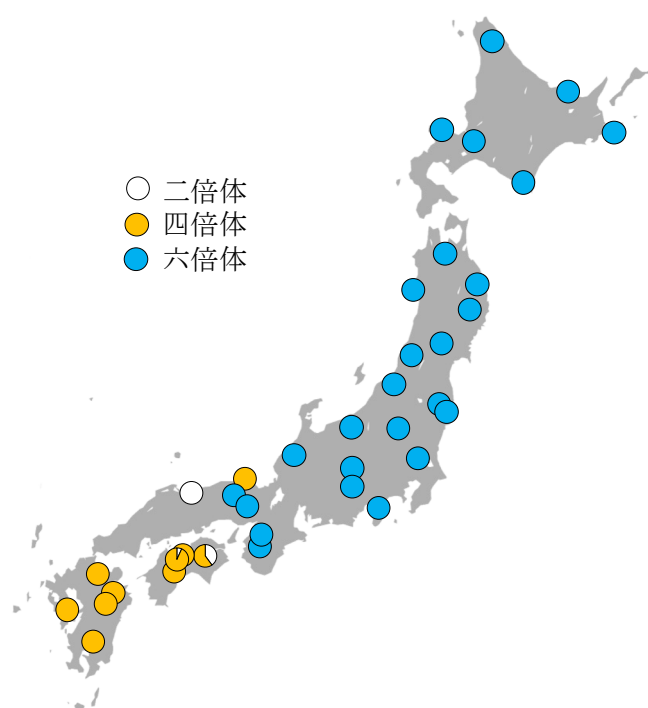


図-1 ノリウツギ倍数体の分布

Fig. 1 Geographic distributions of polyploids

6. DNA 抽出

39 集団 582 個体について、多糖類を除去した後、CTAB 法¹¹⁾に従って全 DNA を抽出した (表-1)。

7. 葉緑体 DNA 解析

7.1 方法

36 の天然集団 170 個体について、葉緑体 DNA の *atpB-rbcL*, *trnL-trnF*, *psbA-trnK-matK* の 3 領域の塩基配列を決定した。使用したプライマーを表-2 に示す。

表-2 葉緑体 DNA の PCR プライマー

Primer name		Sequences (5'-3')
<i>atpB-rbcL</i>	<i>atpB2F</i>	5'-ACTTAGAGGAGCTCCCGTGTCAATC-3'
	<i>rbcL1R</i>	5'-GAGTTACTCGGAATGCTGCC-3'
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL(c)</i>	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'
	<i>trnF</i>	5'-ATTTGAAGTGGTGACACGAG-3'
<i>psbA-trnK-matK</i>	<i>matK8F</i>	5'-TCGACTTCTTGTGCTAGAACTTT-3'
	<i>psbA5'R</i>	5'-AACCATCCAATGTAAAGACGGTTT-3'

PCR 反応は、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TAKARA BIO Inc.) を用いて、標準プロトコルに従って PCR 反応時の溶液量を 20 μl に調整した。サーマルサイクラー SP (TAKARA Co. Ltd.) を用いて、予備の熱変性を 98°C で 1 分間行い、増幅反応は、熱変性を 98°C で 10 秒、アニーリングを 60°C で 15 秒、伸長反応を 68°C で 1 分に設定し、30 サイクルで実施した。その後、68°C で 7 分間予備の伸長反応を行い、4°C で保存した。

塩基配列決定は SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co. Ltd.) を用いて行った。得られた 3 領域の塩基配列を結合し、MEGA X を用いて葉緑体 DNA の遺伝子型 (以下ハプロタイプ) を検出し分布図を作成した (図-2a)。ハプロタイプの類似性を示すハプロタイプネットワークは、PopART 1.7 の TCS ネットワークを使用して作成した (図-2b)。挿入欠失は TCS ネットワーク上の解析から除外されるため、挿入欠失を塩基置換に置き換え、変異の相同性が不明な配列の挿入欠失の繰り返しは全て解析から除外した。

7.2 結果と考察

ノリウツギの葉緑体 DNA ハプロタイプの分布には緩やかな地理的構造が認められる。ハプロタイプ全体の 95% 以上を占め、出現頻度がほぼ同等である二つのハプロタイプ hp01 と hp02 のうち、hp01 が北方で高頻度に、hp02 が南方で高頻度になること、少数の派生的なハプロタイプ hp03, hp04, hp05, hp06 が局所的に分布

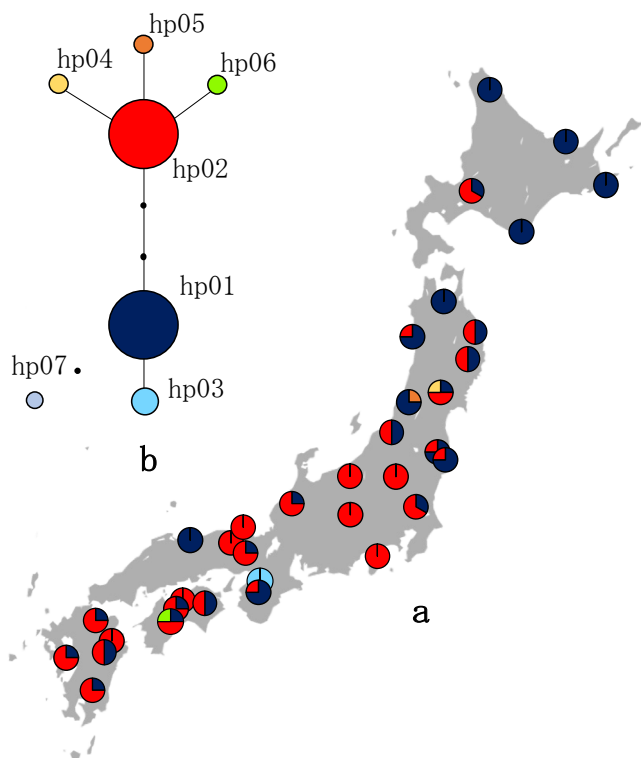


図-2 ノリウツギのハプロタイプの分布 a と類縁関係 b
 Fig. 2 Geographic distribution of cpDNA haplotypes a and TCS Network b

する遺伝構造が確認された。中国湖南省の二倍体は葉緑体 DNA ハプロタイプが hp07 であり、hp01 と近縁であることが示された。ハプロタイプ hp01 と hp02 に共通して見られる広域に分布し、ネットワーク図で中心的かつ頻度で優占する特徴は、これらの二つのハプロタイプが古くから存在していた祖先的なハプロタイプであることを示すと考えられる。解析領域の追加によってハプロタイプの地理的な構造が検出される可能性があるが、ノリウツギの葉緑体 DNA ハプロタイプの分布は、二つの祖先的なハプロタイプの南北分布と、それを起点とした派生的なハプロタイプの分化で特徴付けられる。

8. 核 DNA 解析

8.1 塩基配列の決定

39 集団 582 個体について、MIG-seq 法¹²⁾を用いて核 DNA の塩基配列を決定した。MIG-seq の標準プロトコルに従って 1stPCR では、Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 (TAKARA BIO Inc.)を用いて、単純反復配列に挟まれた複数領域を増幅した。単純反復配列に設定した 16 のプライマーを混合して 1stPCR で複数領域を増幅した

(表-3)。反応条件は、予備の熱変性を 94℃で 1 分、その後、熱変性を 30 秒、アニーリングを 38℃で 1 分、伸長反応を 72℃で 1 分間に設定し、25 サイクルで増幅したのち、72℃で 10 分間予備の伸長反応を行った。2ndPCR は、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (TAKARA BIO Inc.)を用いて、熱変性 98℃で 10 秒、アニーリングは 54℃で 15 秒、伸長反応は 68℃、1 分に設定し、12 サイクルで個体ごとにインデックス配列を付加した。2ndPCR 後のインデックス配列が付加された PCR 産物を、MiSeq Reagent Kit v3 (150cycle)(Illumina, San Diego, California, USA)を使用して次世代シーケンサー-MiSeq(Illumina, San Diego, California, USA)を使用して塩基配列を決定した。得られた読み取り配列を Trimmomatic 0.39 を用いて解析に不要なアダプター配列と低品質な読み取りを除外し、最終的な読み取り配列を 78 塩基に調整した (Trimmomatic 0.39 の設定: SLIDINGWINDOW:4:15, CROP:78)。

表-3 MIG-seq の 1stPCR プライマー¹²⁾

Table 3 Sequences of MIG-seq primer for the 1st PCR¹²⁾

Primer Name	Sequences (5'-3')
Forward primers:	(Tail + anchor: CTG) + SSR + anchor
(ACT) ₄ TG-f	CGCTCTCCGATCTCTGACTACTACTACTTG
(CTA) ₄ TG-f	CGCTCTCCGATCTCTGCTACTACTACTATG
(TTG) ₄ AC-f	CGCTCTCCGATCTCTGTTGTTGTTGTTGAC
(GTT) ₄ CC-f	CGCTCTCCGATCTCTGGTTGTTGTTGTTCC
(GTT) ₄ TC-f	CGCTCTCCGATCTCTGGTTGTTGTTGTTTC
(GTG) ₄ AC-f	CGCTCTCCGATCTCTGGTGGTGGTGGTGAC
(GT) ₆ TC-f	CGCTCTCCGATCTCTGGTGGTGGTGGTGTTC
(TG) ₆ AC-f	CGCTCTCCGATCTCTGTGTGTGTGTGTGAC
Reverse primers:	(Tail + anchor: GAC) + SSR + anchor
(ACT) ₄ TG-r	TGCTCTCCGATCTGACACTACTACTACTTG
(CTA) ₄ TG-r	TGCTCTCCGATCTGACCTACTACTACTATG
(TTG) ₄ AC-r	TGCTCTCCGATCTGACTTGTGTTGTTGAC
(GTT) ₄ CC-r	TGCTCTCCGATCTGACGTTGTTGTTGTTCC
(GTT) ₄ TC-r	TGCTCTCCGATCTGACGTTGTTGTTGTTTC
(GTG) ₄ AC-r	TGCTCTCCGATCTGACGTTGGTGGTGGTGAC
(GT) ₆ TC-r	TGCTCTCCGATCTGACGTTGTGTGTGTGTTC
(TG) ₆ AC-r	TGCTCTCCGATCTGACTGTGTGTGTGTGAC

8.2 一塩基多型 (SNP) の検出

個体間の遺伝的な違いである一塩基多型 Single Nucleotide Polymorphism (以下 SNP) を検出するため、Trimmomatic 0.39 による品質調整後の MIG-seq データに対して、Seqkit の sample コマンドを用いて、1 個体あたりの読み取り配列数を 100000 (Seqkit の sample コマンドの設定: -n 100000) に調整した。その後、倍数体の SNP 探索に対応した NGSEP の DeNovoGBS コマンドを用いた。ただし、コピー数の多い倍数体の対立遺伝子

頻度の推定には多くのデータ量が必要であり¹³⁾、MIG-seq で得られるデータ量から推定することは難しいことから、DeNovoGBS コマンドで得られた、倍数体の対立遺伝子の存在を表す、対立遺伝子の表現型を下流の解析に使用した。一定量の情報が失われるものの、対立遺伝子頻度の不確実性に伴う誤りの低減が期待される¹⁴⁾。DeNovoGBS コマンドは六倍体に設定し (-ploidy 6) 残りは初期設定で実行した。エラー読み取りと欠損データの影響を除外するため、NGSEP の VCFFilter コマンドを使用して、低品質な読み取りデータ、5%未満の低頻度な遺伝子座、解析個体全体での共有率が70%未満の遺伝子座を除外した (NGSEP の VCFFilter コマンドの設定: -q 30, -minMAF 0.05, -maxOH 0.7)。

最尤法を用いて集団の表現型対立遺伝子によって個体の対立遺伝子頻度を補正することで、対立遺伝子頻度の欠落から生じる結果の偏りを低減することが報告されている^{15,16)}。そこで、DeNovoGBS コマンドで得た、集団の表現型対立遺伝子頻度をもとに、GENODIVE3.05 を用いて個体の対立遺伝子頻度の補正を行った。

8.3 核 DNA に基づく遺伝構造の検出

核 DNA の遺伝構造を明らかにするために、連鎖した SNP を除外した 183 の SNP について、補正した個体の対立遺伝子頻度を用いて STRUCTURE 解析を実行した。STRUCTURE 解析は下記設定で 10 回実行し (STRUCTURE の設定: ADMIXTURE model used, RECESSIVE ALLELES model used, LOCPRIOR model used, RANDOMIZE turned off, 200k burn in, 200k MCMC, $K=1-10$)、遺伝構造を検出するための推定集団数である K の値は最適な K の指標である ΔK を用いて推定した。推定された K で実行した 10 回の解析のうち、最大の対数尤度 $\ln Pr(X/K)$ を持つ解析データに基づいて集団に割り当てた推定集団の分布図を作成した。

地理的な距離と遺伝的な距離の関係を調査するために距離による隔離を評価した。天然集団の個体を対象に各倍数体で、Mash 距離および地理的距離について GenAlex 6.502 でマンテル検定を実施した。Trimmomatic 0.39 による品質調整後の配列データをもとに、Mashtree を用いて、二倍体、四倍体、六倍体それぞれについて個体間の遺伝距離に相当する Mash 距離を計算した (Mashtree の設定: --kmerlength 21, --sketchsize 30,000, -mindepth 2)。Mash 距離は遺伝子のコピー数に依存しないため、種内倍数性を持つノリウツギの遺伝子コピー増加の影響を緩和することが知られる¹⁷⁾。

8.4 結果と考察

MIG-seq 解析に使用した 582 個体では、Trimmomatic 0.39 による核 DNA の低品質読み取り配列の除去後、個体の最大読み取り配列数は 316193、最小読み取り配列数は 100402、平均は 155606.2 となった。合計 90562799 読み取り配列を下流の解析に用いた。408 個体 (全体の 70%) 以上で確認された遺伝子座によるフィルター処理で、欠損率の高い遺伝子座を削除し、最終的に 582 個体から 237 の SNP が得られ、全ての個体と遺伝子座を合わせた欠損率は 17%以下となり、経験的な品質調整の目安である欠損率 20%以下を満たした。

STRUCTURE 解析の最適な推定集団数 K (以下クラスター) は ΔK により、 $K=2$ と推定された。2つのクラスターの分布を図-3 に示す。2つのクラスターは近畿地方を境界として南西と北東に分かれる明瞭な地理的構造を持つことが明らかとなった。

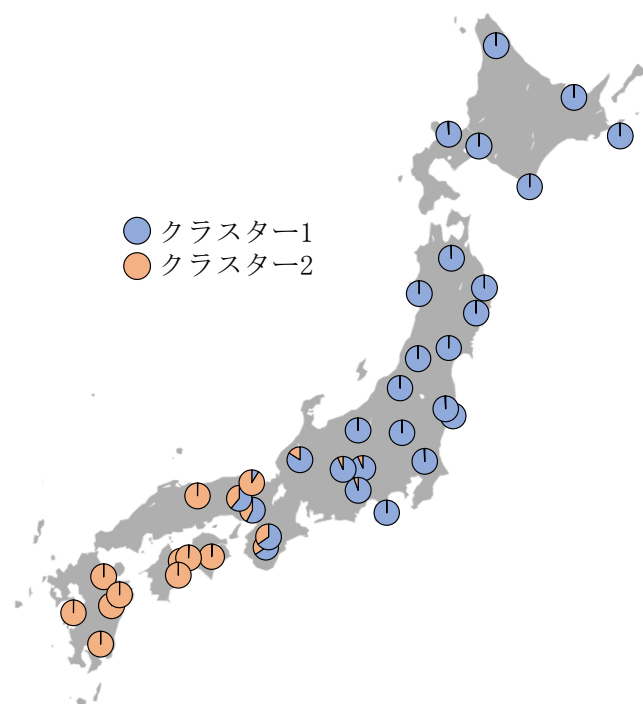


図-3 ノリウツギの核 DNA の遺伝構造

Fig. 3 Genetic structure of nuclear DNA

9. ノリウツギの遺伝的地域性

核 DNA で認められた、近畿を境界とした南西クラスターと北東クラスターに分かれる地理的構造は、倍数性の違いに関連し、南西に分布する二倍体と四倍体と、北東に分布する六倍体の分布によって形成されている (図-2, 図-4)。近畿地方における四倍体と六倍体の分布の境界は不明瞭であり、近畿地方を中心に東西の約 300km にわたり四倍体と六倍体が混在する¹⁰⁾。葉緑体

DNA では核 DNA と倍数体の分布で示された近畿地方境界とした地理的構造が認められなかったものの、南北でハプロタイプの頻度が異なる緩やかな南北の遺伝構造が認められた。

倍数体ごとの遺伝距離に相当する Mash 距離と地理的距離の相関を見ると (図-4)、二倍体、四倍体、六倍体それぞれで P 値は 0.001 となり、有意な相関が示された。出現した個体数が少ないことから比較が困難な二倍体を除き、四倍体の回帰線の傾きが大きく、六倍体と比較してより顕著な距離による隔離が認められた。ノリウツギは冷温帯落葉広葉樹林の構成種であり、四倍体が分布する中国地方、四国、九州では高標高地に隔離分布し、中国地方、四国、九州は海域で隔離されている。このような気候的、地理的要因は、現在の四倍体のより大きな集団分化に寄与したと考えられる。

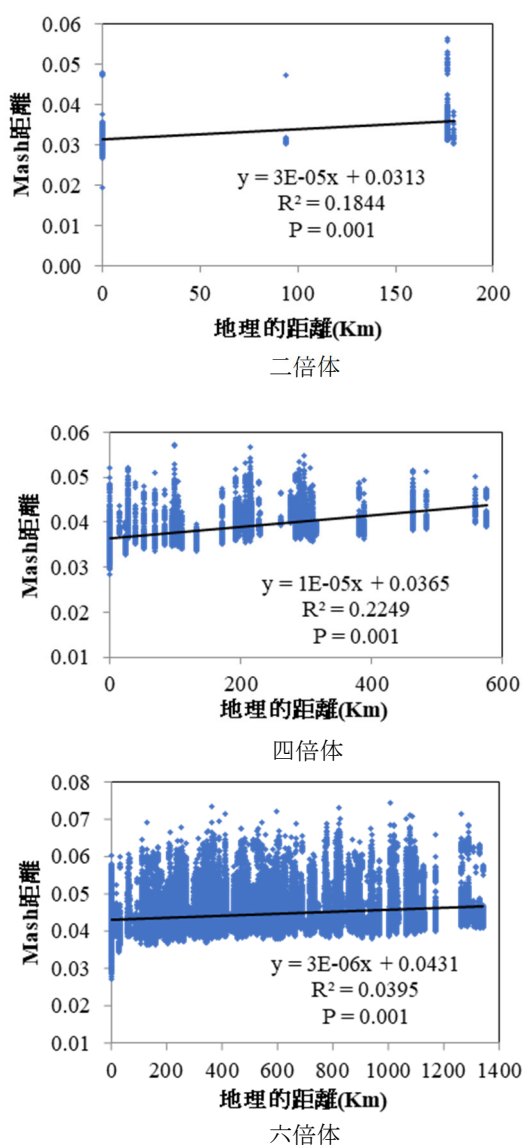


図-4 倍数体ごとの Mash 距離と地理的距離の相関

Fig. 4 Correlation between Mash distance and geographic distance

10. ノリウツギの地域性種苗の供給

ノリウツギは近畿地方を境界として、南西に四倍体と二倍体、北東に六倍体が分布し、核 DNA でも南西、北東構造に対応した境界が支持される。したがって、地域性種苗を供給するための種子と種苗の移動範囲として、近畿地方を境界とした南西エリアと北東エリアに区分することが有効と考えられる。南西エリアの二倍体は分布が限られることから、二倍体の分布域内で緑化する場合を除いて、一般的には生産、流通に適していないと考えられる。したがって、南西エリアでは四倍体、北東エリアでは六倍体の地域性種苗の生産と使用が有効である。四倍体と六倍体の両方で距離による隔離が認められるため、南西と北西の両エリア内でも地理的に近い場所から地域性種苗を供給することで、より遺伝的に近縁な地域性種苗を供給できる。

南西エリアと北東エリアの境界である近畿は、四倍体と六倍体が混在しているため、種子と種苗の採取には適していない。近畿地方ではノリウツギの緑化による使用についても回避することが望ましいと考えられる。緑化により近畿にノリウツギを持ち込む際は、周辺の倍数体と同じ倍数体を用いることが有効である。

参考文献

- 1) The Cost of Sequencing a Human Genome. Genome.gov., <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>, accessed 2023.
- 2) 加藤辰巳, 太田英利: エコロジーガイド日本の絶滅危惧生物, 保育社, pp.163-165, 1993.
- 3) 亀山章, 倉本宣, 小坂橋延弘, 小林達明, 中野裕司, 則久雅司, 藤原宣夫, 森本幸裕, 山田一雄: 生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言, 日本緑化工学会誌, Vol.27, No.3, pp.481-491, 2002.
- 4) 小林達明: 生物多様性保全に配慮した緑化植物の取り扱い方法-「動かしてはいけない」という声に応えて, 生物多様性緑化ハンドブック, 地人書館, pp.13-57, 2006.
- 5) 津村義彦: 広葉樹の種苗の移動に関する遺伝的ガイドライン, 森林総合研究所第2期中期計画成果, Vol.20, 2011.
- 6) 津村義彦, 陶山佳久: 地図でわかる樹木の種苗移動ガイドライン, 文一総合出版, p.170, 2015.
- 7) 緑化植物問題検討委員会: 生物多様性保全のための緑化植物の取り扱い方に関する提言 2019, 日本緑化工学会誌, Vol.44, No.4, pp.622-628, 2019.
- 8) Barker, M. S.; Arrigo, N.; Baniaga, A. E.; Li, Z.; Levin, D. A.: On the Relative Abundance of Autopolyploids and Allopolyploids, *New Phytologist*, Vol.210, No.2, pp.391-398, 2016.
- 9) Nishikawa: CHROMOSOME ATLAS OF FLOWERING PLANTS IN JAPAN, National Museum of Nature and Science monographs, Vol.37, pp.1-461, 2008.

- 10) Funamoto, T.; Ogawa, M.: A Cytogeographical Study in *Hydrangea Paniculata* Sieb.(Saxifragaceae S1) in Japan, *Chromosome science*, Vol.6, No.3, pp.73-82, 2002.
- 11) Doyle, J. J.; Doyle, J. L.: A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue, *PHYTOCHEMICAL BULLETIN*, Vol.19, No.1, pp.11-15, 1987.
- 12) Suyama, Y.; Hirota, S. K.; Matsuo, A.; Tsunamoto, Y.; Mitsuyuki, C.; Shimura, A.; Okano, K.: Complementary Combination of Multiplex High-Throughput DNA Sequencing for Molecular Phylogeny, *Ecological Research*, Vol.37, No.1, pp.171-181, 2022.
- 13) Wang, L.; Yang, J.; Zhang, H.; Tao, Q.; Zhang, Y.; Dang, Z.; Zhang, F.; Luo, Z.: Sequence Coverage Required for Accurate Genotyping by Sequencing in Polyploid Species, *Molecular Ecology Resources*, Vol.22, No. 4, pp.1417-1426, 2022.
- 14) Blischak, P. D.; Kubatko, L. S.; Wolfe, A. D.: Accounting for Genotype Uncertainty in the Estimation of Allele Frequencies in Autopolyploids, *Molecular Ecology Resources*, Vol.16, No.3, pp.742-754, 2016.
- 15) Meirmans, P. G.; Liu, S.; van Tienderen, P. H.: The Analysis of Polyploid Genetic Data, *Journal of Heredity*, Vol.109, No.3, pp.283-296, 2018.
- 16) De Silva, H. N.; Hall, A. J.; Rikkerink, E.; McNeilage, M. A.; Fraser, L. G.: Estimation of Allele Frequencies in Polyploids under Certain Patterns of Inheritance, *Heredity*, Vol.95, No.4, pp.327-334, 2005.
- 17) VanWalleendael, A.; Alvarez, M.: Alignment-Free Methods for Polyploid Genomes Quick and Reliable Genetic Distance Estimation, *Molecular Ecology Resources*, Vol.22, No.2, pp.612-622, 2022.