

倍数性種や種内倍数性を示す種を含むツバキ属植物の系統関係の解明

【代表者】

植松千代美 大阪市立大学 理学研究科 准教授

【共同研究者】

岡崎純子 大阪教育大学 教育学部 准教授

【研究概要（申請書より抜粋）】

ツバキ属はツバキ科の中で最も大きな属で、チャや椿油を産する資源植物を含み、東南アジア一帯に 4 亜属 20 節 250 種以上が分布している（桐野、2013）。Chang & Bartholomew(1984)が形態形質に基づいて提唱した分類体系と、Vijayan ら(2009)が分子マーカーを用いて構築した系統樹の間には齟齬が生じている。またベトナムの約 70 種（Tran Ninh 2002, Orel 2006, Hakoda 2008）を含むツバキ属全体の系統関係は未だ明らかでない。

申請者らは昨年度、本助成を得て、ベトナムの種を含む 88 種について、SSR マーカーを用いた系統樹を構築した。その結果、50%以上の種が高次倍数性である可能性、種内倍数性が存在すること、形態分類との間に矛盾があることを明らかにした。倍数性は属内の系統関係の推定を難しくしているが、倍数性出現のメカニズムを解明できれば、ツバキ属における種分化の仕組みを明らかにし、より正確な系統関係の推定が可能になる。そこで今年度は倍数性の調査と、倍数体種に適用できる分子マーカーを開発し、ツバキ属全体の系統関係を再検討する。被子植物の約 50%が倍数体と推定されており、倍数性種を含む植物の進化を考える上でも有用と考える。

【研究成果（報告書より抜粋）】

＜本研究課題の背景＞

ツバキ属には4亜属20節250種以上が含まれる（桐野、2013）が、形態形質に基づいて提唱された分類体系（Chang & Bartholomew, 1984）と、分子マーカーを用いて構築した系統樹（Vijayan ら, 2009 など）の間に齟齬が生じている。申請者らは昨年度、本助成を得て、88種について、SSRマーカーを用いて系統樹を構築したところ、形態分類との矛盾もさることながら、50%以上の種が高次倍数性である可能性や、種内倍数性が存在することが明らかになった。被子植物の約50%が倍数体と推定されており、倍数性が系統関係の推定を難しくしていることから、倍数体種に適用できる分子マーカーの開発が望まれる。本研究課題では（1）ツバキ属植物の倍数性を網羅的に調査し、（2）倍数性の影響を受けない分子マーカーを探索し、（3）これらの結果に基づき倍数体種を含むツバキ属植物の系統関係の再検討を試みた。

＜供試材料＞

当初、久留米市世界のつばき館が所有する73種の解析を予定していたが、ツバキ属全体の系統関係再検討のため、ツバキ属4亜属を可能な限り網羅することを目指して、久留米市世界のつばき館、南砺市いのくち椿館、ベトナムや中国のサンプル、日本の大島ならびに岩手県の自生のヤブツバキなどを含む129種187個体を供試した。これはツバキ属4亜属20節のうち4亜属19節を網羅し、全種数の約50%を占める。なお中国のサンプルについては中国の共同研究者による分析結果を共有し、解析に加えた。

＜得られた成果＞

1. 倍数性解析の結果

フローサイトメーターで倍数性を測定できた147個体中、2倍体が107個体、4倍体が23個体、6倍体が13個体、8倍体が2個体であった。また半数体が2個体確認された。同種でも採取地の違いにより、倍数性が異なることがあったので、種数ではなく、個体数で結果を示した。

供試サンプルのうち、約25%が高次倍数体であったが、これは昨年度、SSR解析のピーク数から推定した50%以上という値の約半分だった。SSR解析では本来のターゲット以外のDNA領域も増幅していた可能性が考えられる。

2. 染色体観察方法の確立

今回は染色体観察方法を確立するに至らなかった。これについては2019年度に改めて観察方法の確立を試みる。

3. 分子マーカーの探索

（1）一般に母系遺伝するため、倍数性に影響されず、母系の推定も可能となる葉緑体DNA（以下 cpDNA）の *matK* 遺伝子（1500bp）のうち717bpの領域について塩基配列を決定して系統樹の構築を試みた。その結果、供試個体は亜属ごとにクレードを形成することなく、系

統関係を解明できるだけの分岐が得られなかった。これはツバキ属植物においては *matK* 遺伝子領域に十分な変異が無かったためと考えられた。そこで次に示す方法を検討した。

(2) cpDNA の構造変異の利用

保存性が高いとされる cpDNA であるが、挿入や欠失などの構造変異は節や亜属単位などの高次の進化を跡づけるのに有効なマーカーとして利用できる (Palmer, 1985)。ツバキ属 6 種 7 個体の cpDNA の全塩基配列の比較 (Yang et al., 2013) に基づき、*atpH* 遺伝子と *atpI* 遺伝子の間の領域を増幅するプライマーを設計し PCR を行うと、種により 600bp または 200bp の DNA 断片が増幅した。この挿入または欠失の構造変異をマーカーとして利用できると考え、187 個体中 180 個体について解析したところ、114 個体で 600bp の、66 個体で 200bp の断片が増幅した。現在、これ以外にもマーカーとして利用できる構造変異の探索を続けている。

<まとめと考察>

ベトナムには長くて大きな葉をつけるツバキ属植物が分布している。一般に倍数性が高くなると細胞や個体が大型化すると言われており、長く大きな葉をつける種が高次倍数体である可能性を予想していた。しかし葉の長さとの関係を調べると、2 倍体種に変異が大きく、葉の長い種が含まれていた (図 1)。高次倍数体種はむしろ短かった。

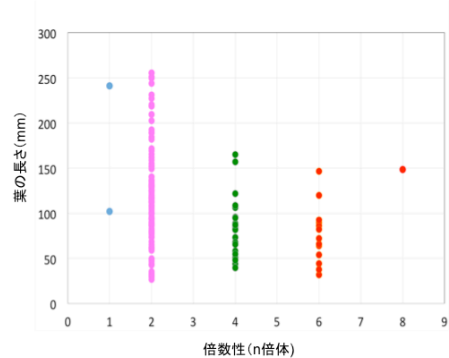


図 1. 供試個体ごとの倍数性と葉の長さの関係

また 4 倍体、6 倍体、8 倍体はツバキ亜属のツバキ節とパラカメリア節、ヒメサザンカ亜属のヒメサザンカ節、ヤナギバサザンカ節に多く、一方チャ亜属では出現頻度は非常に低かった。原始ツバキ亜属では古ツバキ節に 4 倍体が、またピクエチア節に半数体が確認された。今回解析できたのはツバキ属植物の約 50%に過ぎないが、倍数体の出現頻度は分類群によって大きな偏りがあった。なぜ特定の節や亜属に倍数体が多いのか、今後の課題である。

cpDNA の構造変異に関しては、供試 180 個体中 114 個体が 600bp 型を示した。200bp 型の出現が一部の分類群に限られていたことから、欠失により 200bp 型が生じたと考えた。今後、この構造変異近傍の塩基配列を決定し欠失が生じるメカニズムを解明したい。

本研究の成果として、*matK* 遺伝子の塩基配列比較では多型が少なく系統関係の推定は困難だったが、構造変異はツバキ属植物の高次の進化を跡づけるのに有効と考えられた。マーカーとして利用できる構造変異が増えれば、ツバキ属の系統関係の再検討や、倍数体種の母系推定が可能になると考える。今後は染色体観察方法を確立し、核型分析を行い、倍数体の起源を明らかにしたい。

研究業績

※助成期間中に本研究課題を基に発表した著書、学術論文、学会発表、報告書等

著書名/論文名/発表タイトル 等	発表年	出版社名/掲載雑誌名/学会名等
ツバキ属遺伝資源の評価と系統関係の解明.	2018	日本育種学会
Description of wild <i>Camellia</i> genetic resources collected from Southern Vietnam.	2018	日本育種学会
Phylogenetic relationships in the genus <i>Camellia</i> inferred from cpDNA markers.	2018	VNU ハノイ自然科学大学 ジョイントセミナー
Population structure of wild <i>Camellia</i> species distributing in Southern Vietnam inferred from SSR analysis.	2018	VNU ハノイ自然科学大学 ジョイントセミナー