

**2014 年度生物多様性学術研究等奨励金成果報告**

**ユキツバキの系統地理解析  
～ 佐渡のユキツバキの由来～**

**新潟大学 自然科学研究科 環境科学専攻流域環境学コー  
ス 博士前期課程 1 年 三浦 弘毅**

# 目次

．はじめに	3
．調査地	4
1. 花採集地	
2. DNAサンプリング地域	
．調査方法	5
1 . 花形態計測	
2 . DNA抽出	
3 . 解析	
．結果	7
1 . 花形態計測	
2 . 遺伝解析	
．考察	10
引用文献	13

## 1.はじめに

佐渡島の植物は暖温帯、冷温帯、太平洋側、日本海側の種が複雑に生育し、本州では考えられない分布をしていることも珍しくない(北見 1963)。また、大佐渡と小佐渡では植生が異なり、例えば、大佐渡には天然スギや亜高山帯性の植物が分布するのに対し、小佐渡には暖温帯性の植物が偏って分布している(石沢 1983)。これらの要因を解明するに当たり、佐渡島の植生の成り立ちを考える必要がある。成り立ちを考える上で、近年ではDNAを利用した系統地理解析から植物の由来を推測できるようになってきている(Sakaguchi et al 2012)。しかし、小笠原諸島などでは系統地理解析の研究が進んでいる一方、佐渡での検証はほとんど行われていない。佐渡において興味深い分布をしているものの一つにユキツバキ(*Camellia rusticana*)がある。ユキツバキは本土では秋田県から滋賀県の多雪地に分布する(石沢 2001)。佐渡では気候条件、積雪量、積雪期間を見ると、大佐渡に分布しているもおかしくないが、小佐渡のみに存在する。この原因を理解するために、本研究では花形態と遺伝情報を用いて、本土のユキツバキと佐渡の比較を行う。また、近縁なヤブツバキとの比較も行い、佐渡のユキツバキについて考察する。

## .調査地

### 1. 花採集地

ヤブツバキの花は 2014 年の 4 月～5 月の間で行った。採取した場所は新潟県内の 5 集団である（表 1）。佐渡島内では 3 集団から採取した。採取した花数は 1 集団平均 24.6 個合計 123 個である。

ユキツバキの花は 2014 年の 4 月～6 月の間で行った。採取した場所は新潟県を含む近県 6 集団である（表 1）。佐渡島内では 1 集団から採取した。採取した花数は 1 集団平均 12.5 個。合計 95 個である。

両種において、花は 1 個体から 1 個採取。個体間の距離は約 20m 以上離れた場所とした。

### 2. DNA サンプルング地域

DNA を抽出するために葉を採取した地域は全部で 65 集団である。葉は 1 集団平均 23.9 個で、合計 1555 個である。また、葉は 1 個体から 1 枚、個体間の距離は約 20 m 以上離して採取した。採取した葉はクーラーボックスで保管ののち、冷凍庫-30 の冷凍庫で保存した。

## .調査方法

### 1. 花形態計測

花形態は採取してきた花について花糸長(やくの先端から、根元まで)、めしべ長(柱頭の先端から子房の根元まで)、花弁縦横比(花弁を垂直に交わるように計測し縦/横)、花糸合着幅長、花糸合着率(花糸が根元でつながっている長さ/花糸長)をノギスを用いて計測した。

### 2. DNA抽出

日本全国から採取した葉 1555 個体について、葉を約 1 c m 四方にカットし、C T A B( Cetyltrimethylammoniumbromide )法( Murray&Thompson 1980 )を用いて抽出を行った。

### 3. 解析

#### 3-1 花形態計測解析

花形態計測は定量的に計測できた花糸長、めしべ長、花弁縦横長の比較についてヤブツバキとユキツバキそれぞれにおいて、ANOVA を行った後、有意な差( $p < 0.05$ )があったものについて、Tukey の多重比較を行った。また、PCA 解析も行った。これらの解析は R 3.0.2 を用いた。

#### 3-2 cpDNA 解析

ポリメラーゼ連鎖反応( polymerase chain reaction; PCR )で増幅するためのプ

ライマーとして、設計されている cpDNA のマイクロサテライト領域 8 座 ( Ueno 2015 ) を用いた。PCR は反応液量 2  $\mu$  L : DNA テンプレート 1  $\mu$  L ( インキュベーター 60 で蒸発 )、各プライマー 0.02  $\mu$  L、GoTaq Green Master Mix ( Promega ) 1  $\mu$  L、蒸留水 0.96  $\mu$  L とした。PCR の時間および温度条件は、95 15 分の後、94 ( 30 秒 )、55 ( 1.5 分 )、72 ( 1 分 ) のサイクルを 38 サイクル、最後に 60 ( 30 秒 )、4 ( 保温 ) とした。得られた PCR 産物は泳動試料として 1 サンプル当たり、10  $\mu$  L の Hi-Di™ Formamide ( Applied Biosystems ) と 0.25  $\mu$  L の GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard ( Applied Biosystems ) を入れ、95 3 分のヒートショックした後、3130 x1 Genetic Analyzer ( Applied Biosystems ) を用いて泳動を行った。得られたサイズデータは Geneious を用いてサイズの決定を行った。

### 3-3 遺伝解析

得られたサイズデータを用いて、遺伝構造の解析を行った。ハプロタイプネットワークの構築には Network を、集団遺伝構造の解析には BAPS を、系統解析には Population を用いた。

## .結果

### 1. 花形態計測

花形態計測のうち、定量的なデータを得られた花糸長、めしべ長、花弁縦横比、花系合着率を地域ごとに比較した。花糸長ではヤブツバキとユキツバキでは有意な差があり ( $p < 0.01$ )、ヤブツバキの方が長かった(図1)。地域別の比較ではユキツバキで只見町が他のユキツバキの地域とで有意な差があり ( $p < 0.05$ ) 長い傾向にあった。めしべ長ではヤブツバキとユキツバキで有意な差があり ( $p < 0.01$ ) ヤブツバキの方が長かった(図2)。地域別の比較ではユキツバキ地域で只見町が月山と二王子岳で有意な差があり ( $p < 0.01$ ) 只見町が長い傾向となった。花弁縦横比ではヤブツバキとユキツバキで有意な差が見られ ( $p < 0.01$ ) ヤブツバキの方が丸い花弁、ユキツバキの方が細長い形をしている傾向にあった(図3)。地域別の比較ではヤブツバキ、ユキツバキ両種ともに有意な差は見られなかった。花系合着率ではヤブツバキとユキツバキで有意な差があり ( $p < 0.01$ )、ヤブツバキの方が高く、筒状になっていた(図4)。地域別の比較ではヤブツバキで大佐渡と佐渡市二見神社で有意な差があり ( $p < 0.05$ )、二見神社が合着率が高くより筒状になっていた。

花糸長、めしべ長、花系合着率を説明変数として PCA 解析を行い、ヤブツバキとユキツバキ及び、地域ごとに傾向が見られるか比較を行った。花弁縦横比は説明変数からはずしても結果が変わらなかったため、今回は除外した。PCA 解析の結果(図5)、ヤブツ

バキとユキツバキで大きく 2 グループに分かれた。唯一、大佐渡のヤブツバキの 1 個体がユキツバキグループに入る結果となった。地域ごとに見ると、只見町がよく地域としてまとまっていた。佐渡島では小佐渡、大佐渡ともに特有の傾向は見られず、他の地域集団と変わらない結果となった。

## 2. 遺伝解析

日本全国 65 集団の cpDNA による遺伝集団構造解析の結果、ツバキは 2 集団に分けるのが最適となった( 図 6 )。大きくヤブツバキ分布域とユキツバキ分布域に分かれる結果となった。しかし、ヤブツバキ分布域である柏崎市がユキツバキの遺伝集団、ユキツバキ分布域であるはずの月山と佐渡市国見山上部ユキツバキ集団はヤブツバキの遺伝集団となった。また、花形態の PCA 解析と遺伝構造解析の結果を照合したものを図 7 に示す。その照合の結果から、柏崎市の集団はヤブツバキの花形態であるが、遺伝集団はユキツバキ、月山、国見山上部の集団はユキツバキの花形態であるが、遺伝集団はヤブツバキであった。

また、系統解析の結果( 図 8 )国見山上部は比較的ユキツバキ集団に近い系統を示した。また、国見山下部( ヤブツバキ )は国見山上部( ユキツバキ )と近い系統にあった。佐渡市二見神社( ヤブツバキ )は新潟市( ヤブツバキ )に近い系統を、大佐渡( ヤブツバキ )は粟島浦村( ヤブツバキ )と近い傾向であった。佐渡島内は全体的にまとまる傾向になった。



ハプロタイプネットワーク解析の結果、33 個のハプロタイプが見つかった( 図 9 )。

佐渡市に着目してみると、国見山上部で主要なハプロタイプは山形県と福島県、静岡県と共有していた。国見山下部は固有のハプロタイプであった。二見神社のハプロタイプは南のヤブツバキ集団で見られる主要なハプロタイプを所持していた。大佐渡では北で主要なハプロタイプを所有していた。また、国見山下部と二見神社のハプロタイプは近い遺伝子型を示していた。

## .考察

ヤブツバキとユキツバキより花系の合着率が高く筒状になっていること及び、葉の毛の有無等で識別可能であることがわかっている(Hagiya&Ishikawa1961、石沢 2005、折川ら 1998)。本研究では花系合着率がヤブツバキの方が高くなっていることに加え、ヤブツバキの方が花系、めしべが長かった。また、花弁縦横比が低く、ヤブツバキで丸い花弁形状になっていると考えられる。それら花形態の PCA 解析の結果、2 グループに分かれ、これがヤブツバキ分布域とユキツバキ分布域とで合致していることから、ヤブツバキ型とユキツバキ型の花形態を示していると考えられる。

一方で、ヤブツバキとユキツバキは葉緑体マイクロサテライト領域において、識別可能であることが示唆されている(上野未発表)。今回の結果においても集団遺伝構造解析の結果から集団数が 2 を支持し、それが、以前から言われているヤブツバキ分布域とユキツバキ分布域に合致していることから、2 種が遺伝的に分かれると考えられる。しかし、この結果は花形態ほど明確ではなく、今回、山形県の月山の集団と佐渡市国見山上部の集団は花形態がユキツバキでありながら、遺伝型はヤブツバキ、新潟県柏崎市の集団は花形態がヤブツバキでありながら、遺伝型はユキツバキという結果になった。このことは、形態では遺伝的な系統を識別できないことを示している。佐渡市国見山上部のユキツバキと言われていた集団がヤブツバキとユキツバキのどちらであるかの議論については、今回の研究では明確にはならなかった。また、PCA 解析の結果から、花形態から佐

渡島のツバキ集団の由来を推定することは困難であると考えられる。

ハプロタイプネットワークの結果を見ると、佐渡市国見山上部の集団と山形県、福島県、静岡県とのハプロタイプに一致が見られた。この結果は間瀬集団が国見山に種子を供給、またはその反対の可能性が考えられる。ヤブツバキ、ユキツバキの種子は堅果である。このことは海を渡りそれが発芽、定着することを考えると、山形県由来である可能性が高い。しかし、国見山上部という標高が高いところへの、重力かネズミ散布と考えられ(Abe 2006)、ツバキ種子が移動するとは考えにくく、竜巻のような、カタストロフィックな事象か、または、たまたま、ハプロタイプが一致した可能性も考えられる。

佐渡市二見神社のハプロタイプは南集団の主要なハプロタイプと一致していた。このことは南の集団からの由来である可能性が高い。また、国見山下部の集団と二見神社のハプロタイプはマイクロサテライト 1 座の 1 繰り返し数しか遺伝的に異なっておらず、また、国見山下部集団のハプロタイプは二見神社以外の集団と遺伝的に離れていることから、二見神社集団由来であると考えられる。佐渡島の小佐渡を大佐渡を隔てる境には国仲平野が走る。二見神社と国見山下部集団はこの国仲平野を横断し二見神社から国見山下部に行ったと考えられる。最後に大佐渡集団を見ると、大佐渡集団は北ヤブツバキのハプロタイプとほぼ一致している。また、少ないながらも所持しているハプロタイプ 11 は石川県の集団と一致している。このことから、大佐渡の集団は南の北ヤブツバキ集団由来のツバキであることが示唆された。系統樹では粟島浦村の集団とも近い関係にある

が、海の流れから考えると、南から来たと考えるのが妥当であると推察される。

佐渡島の系統地理解析はほとんど行われていない。現在では小笠原諸島などの固有種の多い島で多くされている。しかし、佐渡島は大変興味深い植生をしており、その植生の成り立ちを考える上で系統地理解析を行うことは大変重要であると考えられる。今回の結果から、大佐渡と小佐渡において、ツバキの由来が異なることが示唆された。また、国見山上部においては興味深い結果となった。このことは大佐渡と小佐渡という2つの枠組みでかんがえるのではなく、佐渡島において様々な由来の植生を考える必要がある。このことが、佐渡島の生物多様性にもつながっている可能性がある。

## 引用文献

- ・ Abe, H., Matsuki, R., Ueno, S., Nashimoto, M., Hasegawa, M. ( 2006 ) Dispersal of *Camellia japonica* seeds by *Apodemus speciosus* revealed by maternity analysis of plants and behavioral observation of animal vectors. *The Ecological Society of Japan*, 21:732-740
  
- ・ Hagiya, K., Ishizawa, S. ( 1961 ) Studies on Snow-Camellia (*Camellia rusticana*) I: On Variation and Distribution of Native and Domesticated Camellia in Niigata Prefecture. *園芸学会雑誌*, 30(3):270-290
  
- ・ 石沢進 ( 1983 ) 離島の植物 3(3)大佐渡・小佐渡のフロラの退避. *新潟県植物分布図集* 4:432-440 植物同好じねんじょ会、新潟.
  
- ・ 石沢進編 ( 2001 ) Newton 植物の世界樹木編、ユキツバキの生活史. *ニュートンプレス社*, 49-77
  
- ・ 石沢進 ( 2005 ) ユキツバキの樹形・外部形態および結実. *プラント*, 99:22-32
  
- ・ 北見秀夫 ( 1963 ) 佐渡の植物. *佐渡博物館研究報告*, 5:50-133
  
- ・ 折川武司, 岩坪美兼, 太田道人 ( 1998 ) 2 倍体ユキバタツバキの形態変異. *富山市科学文化センター研究報告*(21):2-8
  
- Sakaguchi, S., Qiu, Y.X., Liu, Y.H., Qi, X.S., Kim, S.H., Han, J., Takeuchi Y., Worth, JR., Yamasaki, M., Sakurai, S., Isagi, Y. ( 2012 ) Climate oscillation during the Quaternary associated with landscape heterogeneity promoted allopatric lineage divergence of a temperate tree *Kalopanax septemlobus* (Araliaceae) in East Asia. *Molecular Ecology*, 21:3823-3838
  
- ・ Ueno, S., Taguchi, U., Tsumura, Y. ( 2015 ) Development of chloroplast markers for Japanese and snow camellias. *Plant Species Biology*.

表1. ツバキ花サンプリング地域

種	場所	花数
ヤブツバキ	佐渡市国見山下部	15
	佐渡市二見神社	14
	新潟県柏崎市宮川神社	10
	新潟県新潟市間瀬	30
	新潟県村上市勝木神社	27
	佐渡市大佐渡	27
ユキツバキ	福島県只見町	30
	佐渡市国見山上部	30
	岩手県奥州市カヌマ沢	7
	山形県月山	9
	新潟県新発田市二王子岳	8
	新潟県上越市	2
	新潟県長岡市守門岳	9

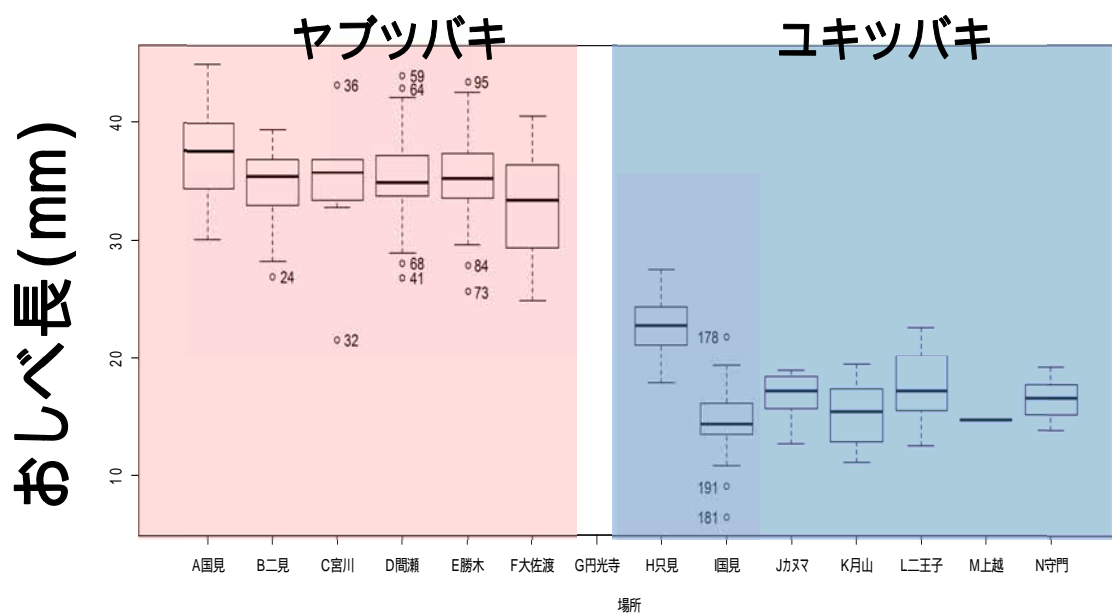


図1. ツバキ花糸長

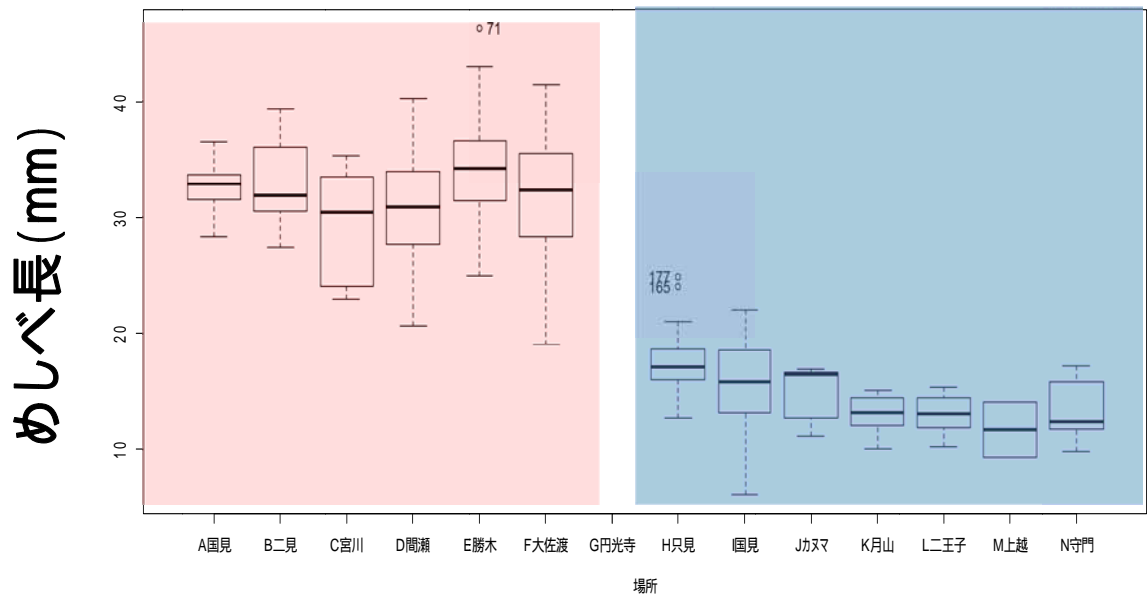


図 2.ツバキめしべ長

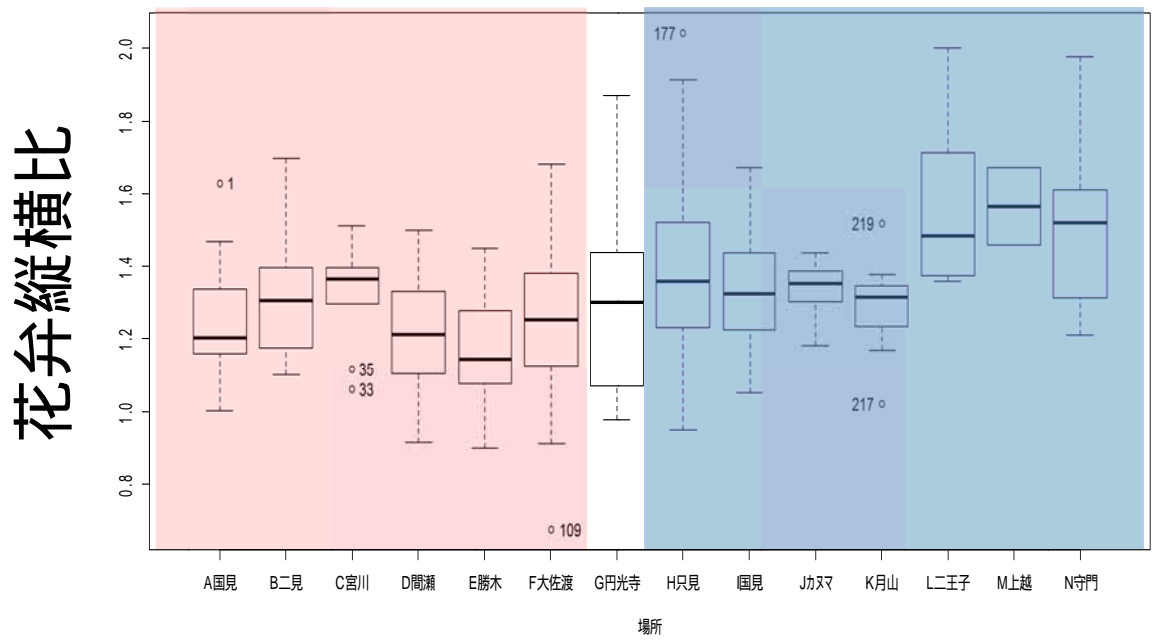


図 3.ツバキ花卉縦横比

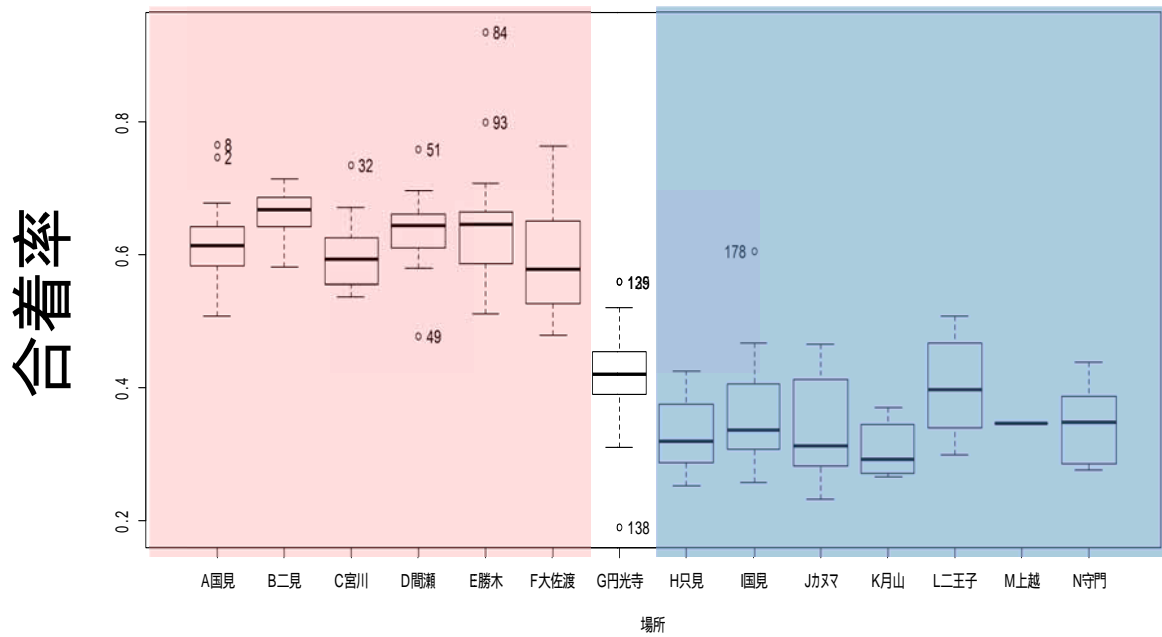


図 4.ツバキ花糸合着率

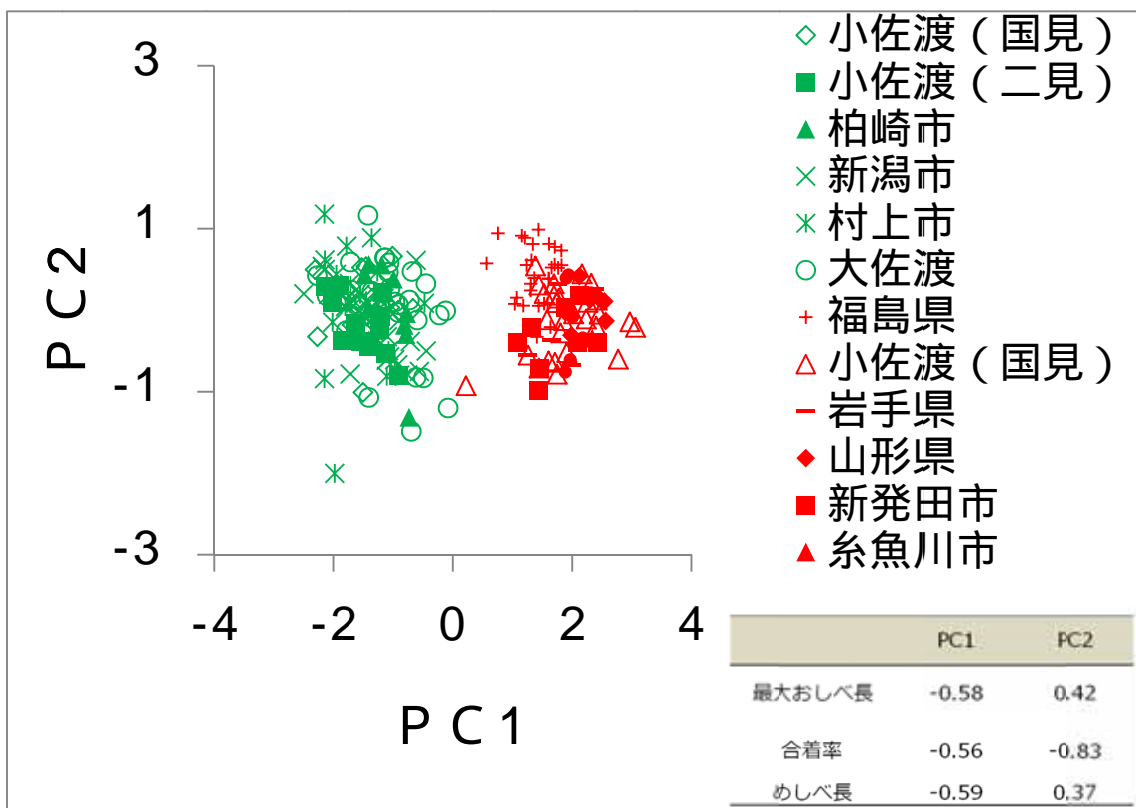


図 5.ツバキ花形態 PCA 解析  
 緑 ヤブツバキ、赤 ユキツバキ



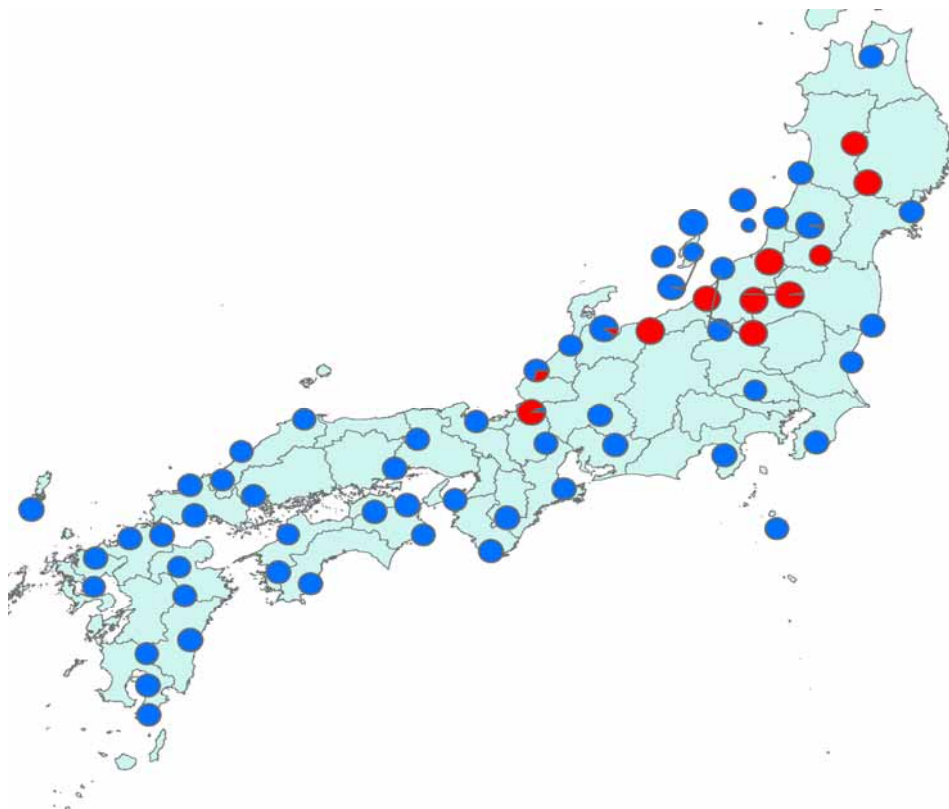


図 6.ツバキ集団構造解析 K = 2

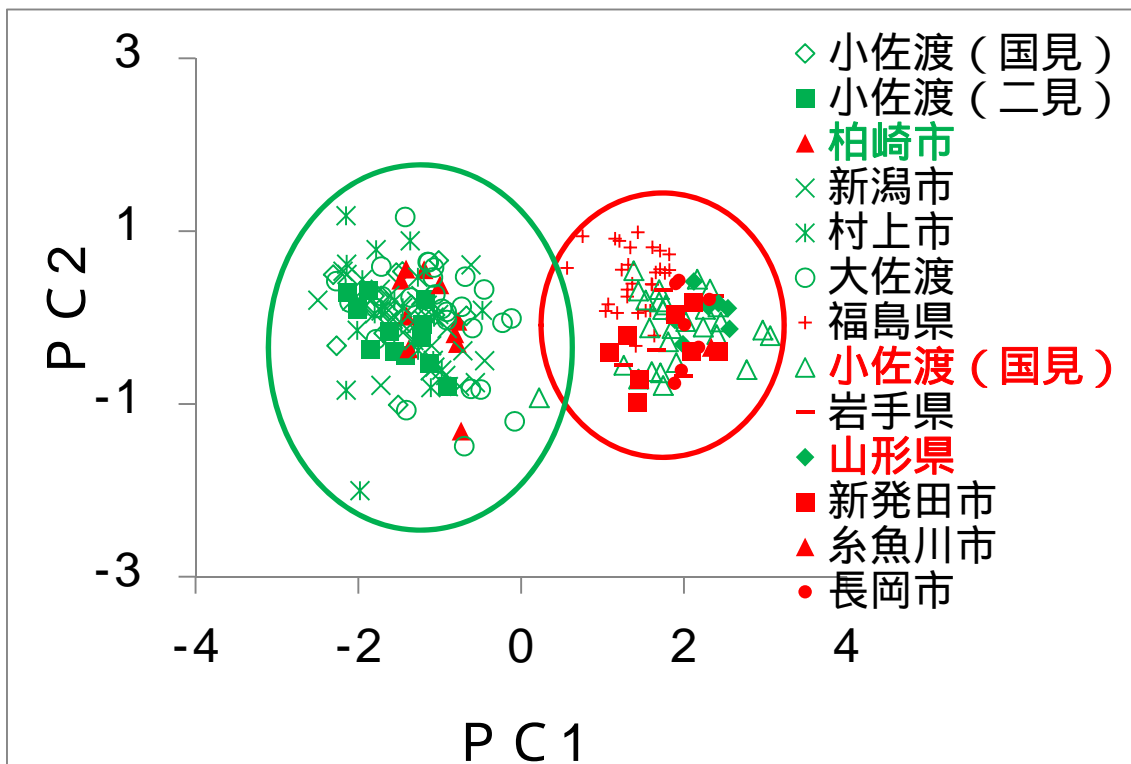


図 7.花形態と葉緑体 S S R によるグループ分け照合

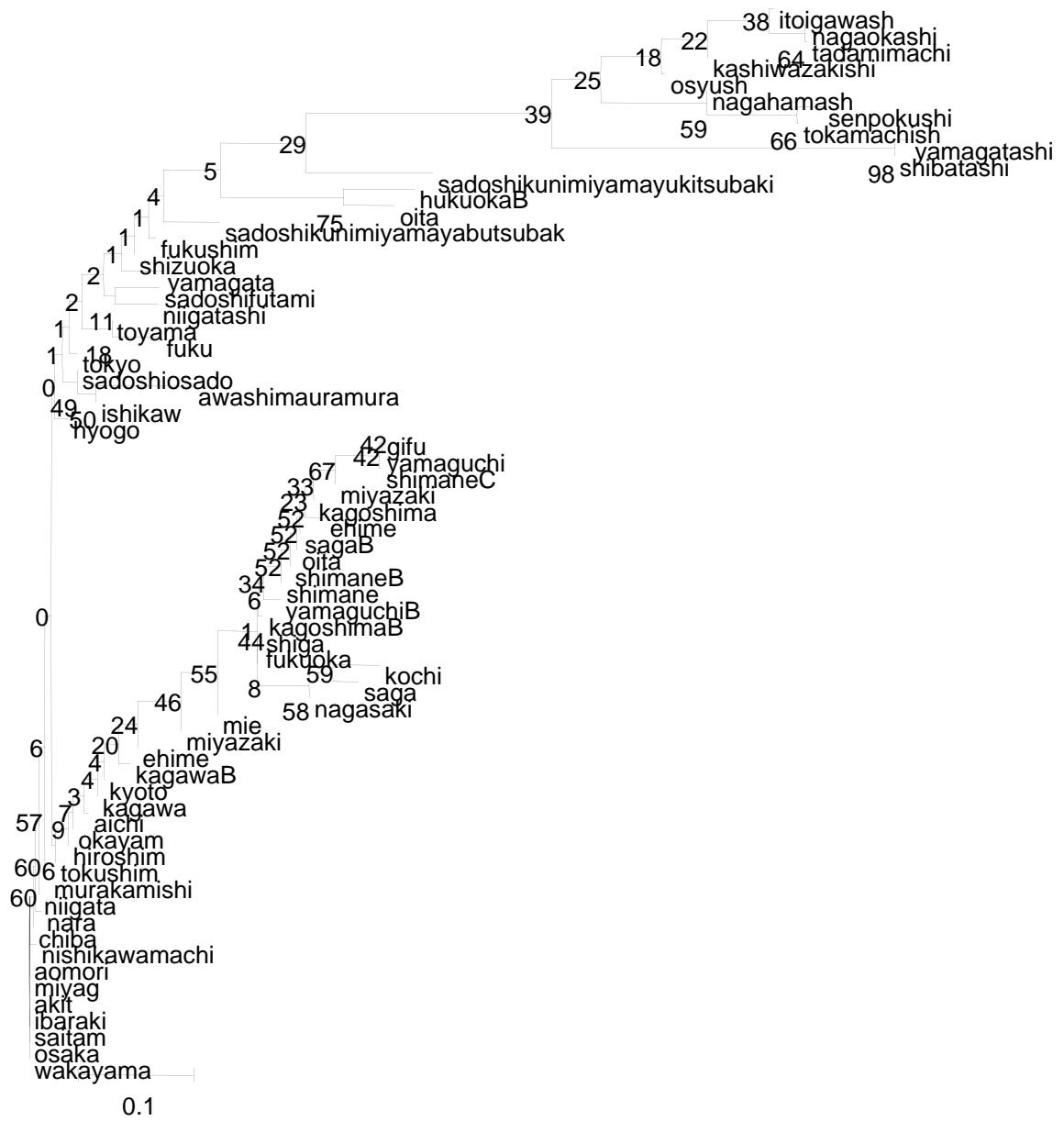


図 8.ツバキ系統解析

遺伝距離は Nei の遺伝距離を用い、NJ法により行った

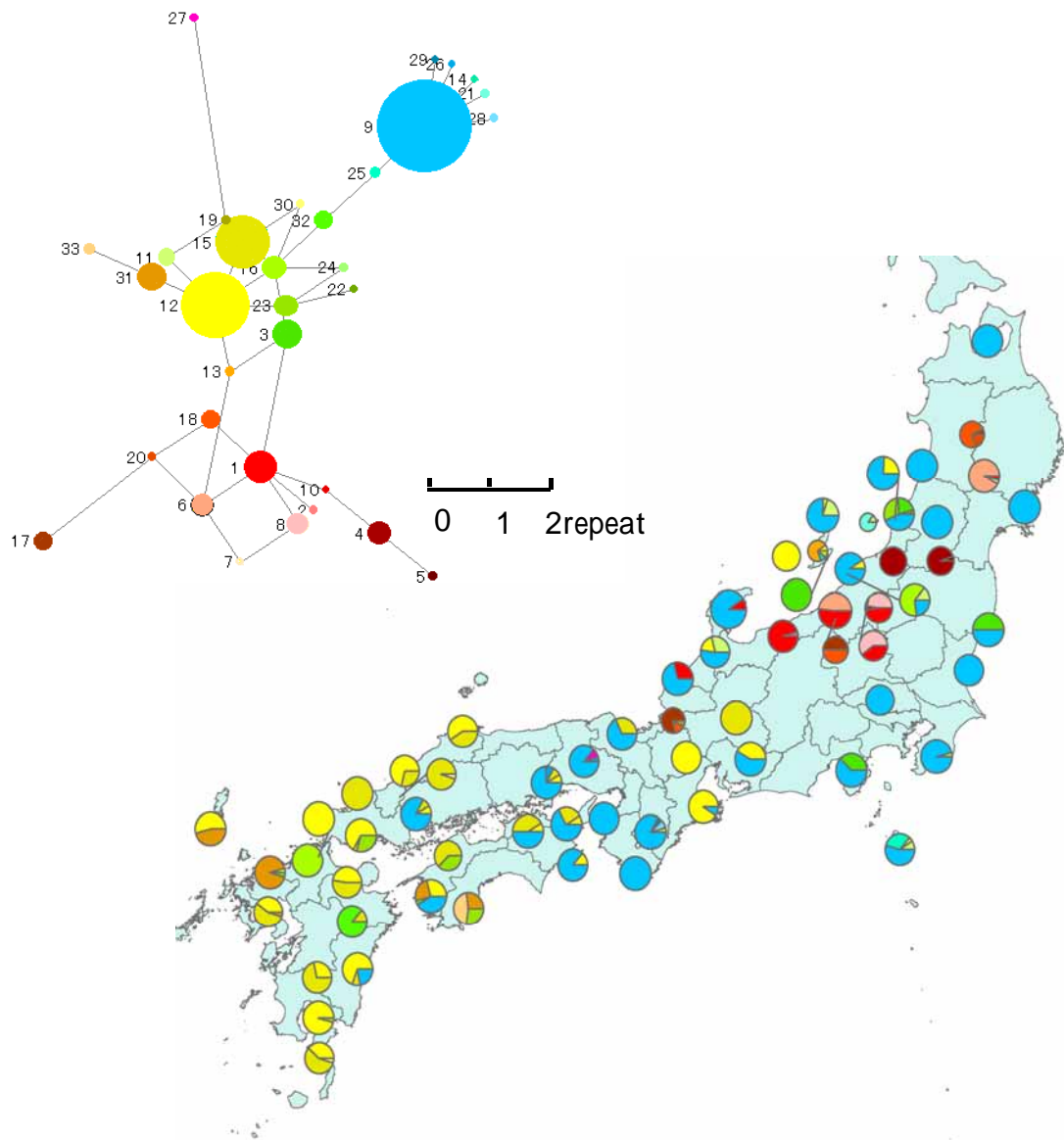


図 9.ツバキハプロタイプネットワーク