

分子系統解析を用いたミヤマスマレ亜節の分類

－ コミヤマスマレの謎を追う －



実施担当者 兵庫県立小野高等学校
教諭 藤原 正人

グローバルサイエンティスト
アワード”夢の翼”「最優秀賞」
サイエンス・インカレ
論文審査通過

1 はじめに

本校スマレ班は、通学路に咲く可憐なスマレの花に興味を持ち、スマレ属を研究対象として6代目となった。初代はDNA抽出からPCR増幅に苦勞し、2代目はプライマーを工夫して分子系統解析を軌道に乗せた。3,4代目では、本校がある北播磨地方に独特の遺伝子を持つシハイスミレ (*Viola violacea*) が生育していることを明らかにした。

現在、5代目(2年生)と6代目(1年生)は北播磨地方で稀にみられるコミヤマスマレ (*V. maximowicziana*) と、園芸品種のパンジーやスマレ属外来種に興味を持ち、先輩たちが築いた実験テクニックを受け継いで研究を進めている。特にコミヤマスマレについては今までの文献にない結果が判明しつつあり、彼らは様々な発表会で成果を披露し、論文にまとめることを目指している。

2 コミヤマスマレの謎 (今年度の主テーマ)

2-1 奇妙な形態と稀な生育場所

5年間の調査で、北播磨地方には変種まで含めるとミヤマスマレ節 (Sect. Patellares) に属するスマレが17種生育していることが分かった。その中でコミヤマスマレは葉の質が大変軟弱で、多くの葉に白い斑が入り、かつ、多毛で他のミヤマスマレ節のスマレと異なった印象を受けた。また、他のスマレ属植物と比較して大変暗い場所に生育する陰生植物である。計測では裸地の20分の1~30分の1の光量しかない暗い場所で多く見られ、しばしばコケの中に群生していた(写真1)。そこでこのコミヤマスマレについて葉緑体DNAの *matK* 領域をPCR法で増幅、分子系統解析を行った。



写真1 コミヤマスマレ

2-2 実験方法

まず、個体から1枚の成葉をサンプリングし、その葉の5mm四方からCTAB法を用いてDNA抽出を行った。1つの群落からは5個体程度からサンプリング、実験にはその中から複数の個体を用いた。先輩方が植物バーコーディングで薦められている葉緑体DNAの *matK* 領域、*rbcl* 領域、

また、*trnL-F* 遺伝子間領域で予備実験を行い、どの領域でも PCR 法で DNA の増幅に成功、その後 *matK* 領域で日本産スミレ属の分子系統解析を行い、Yoo ら (2010) の論文¹⁾ と類似の結果が得られたので、まず *matK* 領域を PCR 法で増幅した。ただし、植物バーコーディングに上がっているプライマーでは主にタチツボスミレ節でプライマーの部分に変異があり、増幅できない種が多くあるため、*matK* 領域についてはスミレ班が設計したプライマーを使用している。電気泳動でバンドを確認後、DNA を clean-up、兵庫教育大学で DNA 濃度を測定、濃度調整後 macrogen-Japan にシーケンス解析を依頼、得られた

データを MEGA で分析して、分子系統樹を作成した。
 まず最初に本校校区に生育するスミレを各節からピックアップして予備実験を行った。その結果、コミヤマスミレとマルバスミレが系統樹の同じクレードに位置し、ミヤマスミレ節と異なったクレードにまとまった。そこで、Yoo ら (2010) や先輩たちの結果、図鑑を参考に、新たに入手したツクスミレ (*V. diffusa*) を一緒に解析したところ、ツクスミレがコミヤマスミレ、マルバスミレと同じクレードにまとまること分かった。

そこで新たにコミヤマスミレ、マルバスミレ、ツクスミレを中心にサンプルを採集、多くの人に協力してもらい遠方からもサンプルを入手、先輩たちのデータと併せて分子系統解析を行った。ツクスミレ、コミヤマスミレ、マルバスミレについては地域ごとの変異がある可能性も考え、生育地ごとにサンプルの解析をした。さらに現在、葉緑体 DNA の *trnL-F* 領域について実験を進めており、次年度からは葉緑体 DNA の *trnH-psbA* 領域、核 DNA の *its* 領域の分析を行い、ツクスミレ節の分類に関して新しい知見を得たい。

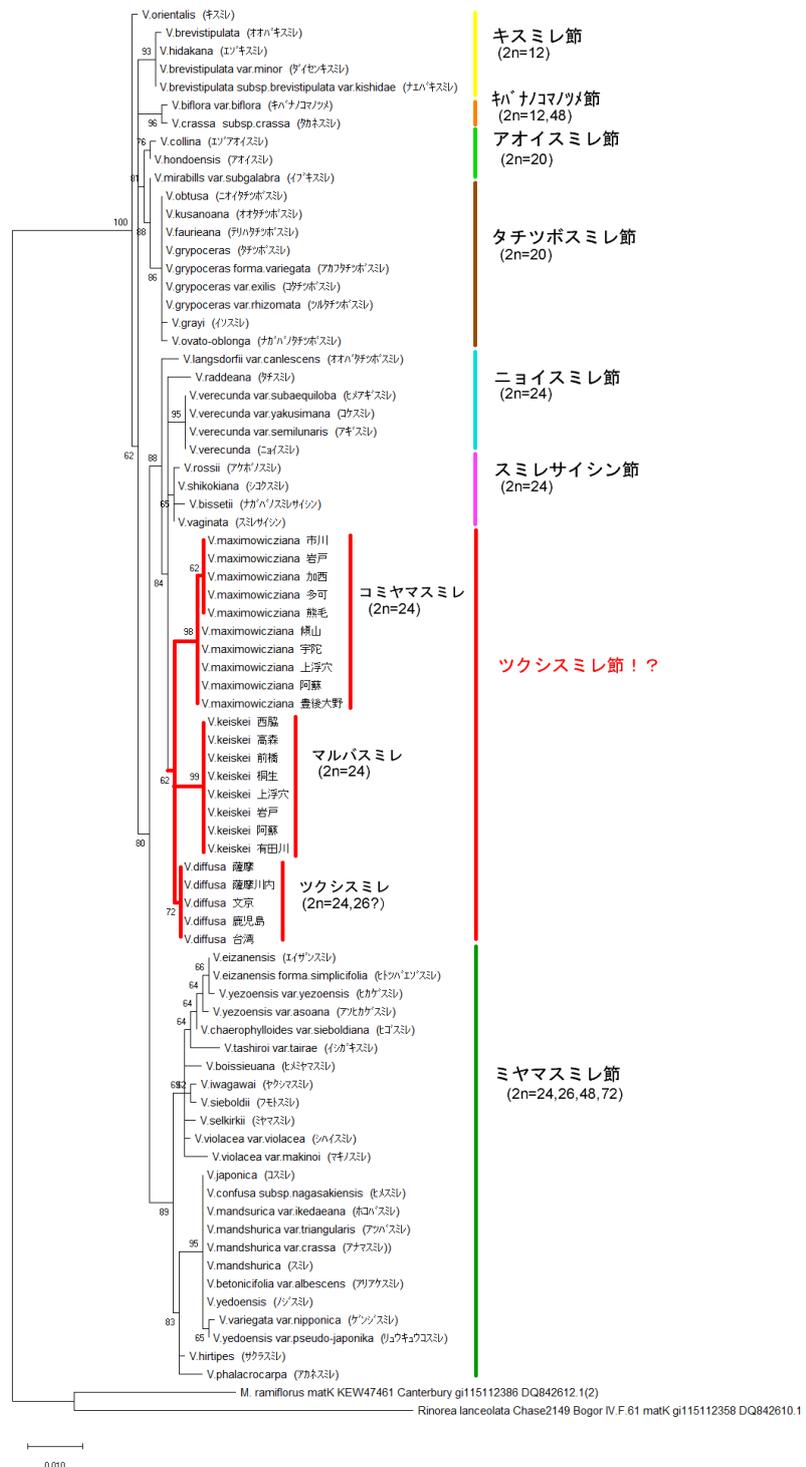
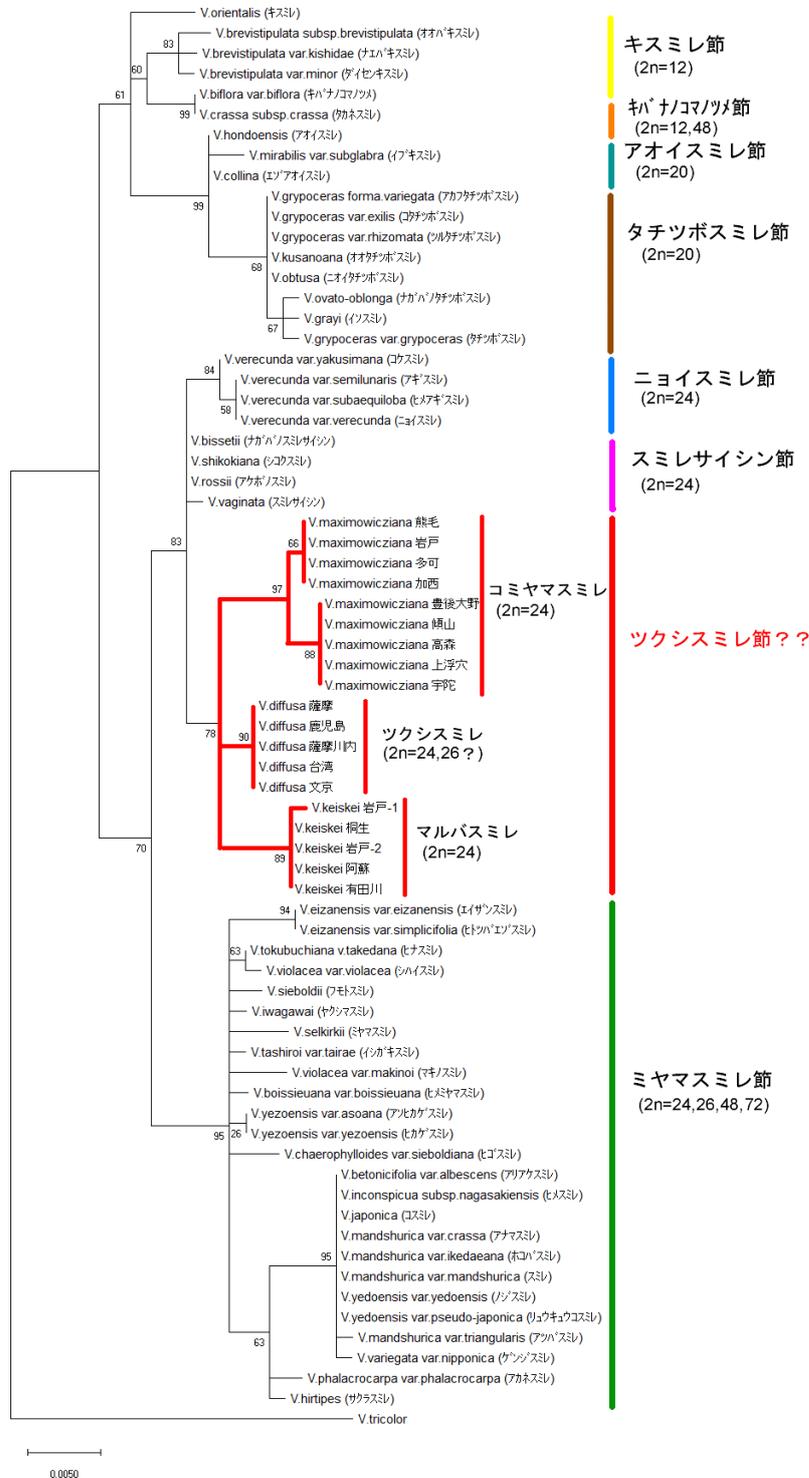


図 1 日本産スミレ属分子系統樹 (葉緑体 DNA *matK* 領域 (932b))

2-3 実験結果

葉緑体DNA、*matK*領域での分子系統樹を図1に、*trnL-F*領域の分子系統樹を図2に示す。

葉緑体DNAの *matK* 領域では、どの地方のコミヤマスミレもミヤマスマミレ節のクレードに存在せず、ツクシスマミレと同じクレードに位置した。コミヤマスミレだけでなく、ミヤマスマミレ節のマルバスマミレ (*V. keiskei*) も産地に関わらず、ミヤマスマミレ節ではなく、ツクシスマミレと同じクレードにまとまった。コミヤマ



ドにまとまった。コミヤマスマミレはサンプルの採集場所によって2つのタイプの塩基配列を示したが、その差は932塩基のうち1塩基であった。ツクシスマミレについては現在手元にある3か所のサンプルでは塩基配列に全く差が無く、同一であった。また、マルバスマミレについては、東は群馬県から西は熊本県まで8か所で採集したサンプルを用いたが、この種でも塩基配列に変異は全くなかった。ツクシスマミレ、マルバスマミレ、コミヤマスマミレの3種間でも塩基配列の違いは11塩基にとどまった。

trnL-F 領域でもコミヤマスマミレ、ツクシスマミレ、マルバスマミレは同じクレードにまとまった(図2)。コミヤマスマミレでは *matK* 領域と同様に2つのハプロタイプが確認された。ツクシスマミレはまったく同じ塩基配列を持ち、マルバスマミレでは兵庫県市川町の同じ生育地で2つのハプロタイプが見られた。

2-4 考察

葉緑体DNAの *matK* 領域は遺伝子をコードしている領域なので、もともと変異は少ない。生徒ら5代にわたるスミレ班の研究では、タチツボスマミレ節の多くは同じ塩基配列を示すなど、変異の少ない領域

図2 日本産スミレ属分子系統樹 (*trnL-F*領域(1151b))

である。にもかかわらず、コミヤマスミレ、マルバスミレが他のミヤマスミレ節のスミレと異なり、ツクシスミレと同じクレードにまとまることはこれらの3種が近縁であることを示している。

遺伝子間領域で塩基配列に変異が生じやすい *trnL-F* 領域でもツクシスミレ、コミヤマスミレ、マルバスミレの3種がまとまり、ミヤマスミレ節のクレードから外れることは興味深い。この結果からもコミヤマスミレ、マルバスミレはミヤマスミレ節のスミレではないと考えられる。

スミレ属は形態的にはまず地上茎が発達するものを有茎種、発達しないものを無茎種と2つに大別される。さらに柱頭の形で13節に分類されてきた(浜 1975)²⁾。最新のAPG IIIによる「改訂新版 日本の野生植物 3」(2016)³⁾でも、スミレ属は13節に分類され、コミヤマスミレ、マルバスミレはミヤマスミレ節に分類されている。コミヤマスミレはミヤマスミレ節のスミレのうち、どちらかというところに見られるシハイスミレ、フモトスミレに形態的に近いが、この2種は雑木林の林縁など比較的明るい場所に生育し、葉に光沢がある。コミヤマスミレは生育地が暗所に限られるだけでなく、局所的に分布し、葉は有毛で毛が多く、また、しばしば斑紋が入る。葉質が大変軟弱でよく見ないとスミレと判断しにくい独特の形態を持っている。マルバスミレは東日本ではよく見られるスミレだが、私たちの北播磨では珍しい種である。今年に彼らがコミヤマスミレの調査でコミヤマスミレと同じ谷筋で発見した。このスミレも葉に毛が多く生える。ツクシスミレは北播磨に生育地はなく、分布は九州南部に限られる。南方系のスミレで、有茎種である。葉全体に毛が密に生え、葉質も薄く、生育状態は彼ら素人が見るとコミヤマスミレとよく似ている。しかし、多くのスミレが葉の基部が心形であるのに対し、ツクシスミレは葉の基部がくさび形で特異的である。

マルバスミレ、コミヤマスミレはともに無茎種、ツクシスミレは有茎種であるが、ツクシスミレは他の有茎種のように立ち上がり、ほふく茎で横に這う。コミヤマスミレは無茎種であるがしばしば根の先に新個体を作る。スミレの特徴である距の形はコミヤマスミレ、ツクシスミレが丸く短い点は似ているが、この3種の中でマルバスミレは他の2種と似ている点は少ない。形態的にはこの3種が近縁とは判断しにくいのが現状である。



3 まとめ

近年、植物の分類はAPG III、IV体系に基づいて大きく変わってきている。核DNAや葉緑体DNAの分子系統解析が簡単に行えるようになり、分類は遺伝子解析で行われるようになった。本校スミレ班は身近な植物であるスミレ属に興味を持ち、分子系統解析に取り組んだ。Yooらの研究で韓国産スミレ属は詳しく研究されているが、日本産スミレ属についてはそれほど詳しく研究されていない。特に日本にしか見られない種についてはあまり論文が見つからなかった。スミレ科スミレ属内の分類であるが、生徒たちの興味関心から始まったスミレ属の研究が、日本にしか生育しないスミレ属の分類に貢献し、スミレ属の分類・進化を明らかにできればと思う。

謝 辞

本研究に当たり、兵庫教育大学理数系教科マネジメントコース笠原恵教授、神奈川大学理学部特別助教岩崎貴也先生をはじめ多数の先生方に指導・助言いただきました。深く感謝いたします。また、本校スミレ班の研究に際し、公益財団法人 中谷医工計測技術振興財団より科学教育振興助成金をいただきました。お礼申し上げます。

参考文献

- 1) Ki-Oug Yoo, Su-Kil JANG (2010) Infrageneric relationships of Korean Viola based on eight chloroplast markers JSE 48 (6): 474-481 (2010)
- 2) 浜栄助(1975) 原色 日本のスミレ 誠文堂新光社
- 3) 大橋広好 門田裕一他 編 改訂新版(2016) 日本の野生植物 3 pp209-227