シハイスミレとその狭葉変種マキノスミレの分子系統解析とその分布

－ 形態、遺伝子、その生育環境から －

実施担当者　兵庫県立小野高等学校
教諭　藤原　正人

京都サイエンスフェスティバル 2017
～科学の頭脳戦～「京都大学総長賞」
甲南大学リサーチフェスタ 2017
審査員特別賞　受賞

１　はじめに

本校科学総合コーススミレ班では、身近な植物であるスミレ科(Violaceae)スミレ属(*Viola*)について３年にわたって研究している。昨年度のまでの結果から、ミヤマスミレ亜節のシハイスミレ(*V. violacea* var. *violacea*)とその狭葉変種マキノスミレ(*V. violacea* var. *makinoi*)において種を超えた多数の塩基配列の変異が認められた。そこで、本年度はシハイスミレとその狭葉変種マキノスミレについてより詳しく、形態、生育分布、生育環境及びＤＮＡの *matK* 領域について研究を行った。

２　実験方法

２－１　サンプルの採集と生育地調査、形態分析

浜(1975)[1]によるとシハイスミレは西日本、マキノスミレは東日本を中心に分布し、マキノスミレは兵庫県内では東端にしか分布しない。本校の校区である三木市や、六甲山系に分布するという報告があり、本校校区の加西市、小野市、三木市から神戸北区で両種の生育場所を調査した。サンプルは５月～11 月に個体群から成熟した個体の一番大きな成葉を一枚採集し、吉田ら（2012）[2]を参考に、それぞれの葉の長さ、最大幅、その位置を測定した（図１）。　測定したデータはフリーソフトＲを用いて、箱ひげ図を作成、主成分分析を行った。また、QGIS を用いて平均気温（最高気温）と生育地の関係を調べた。

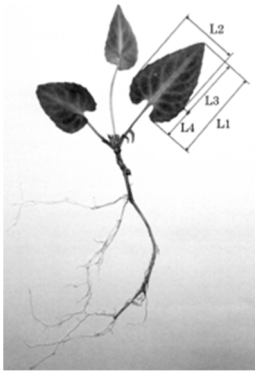


図１　葉の測定部位

２－２　分子系統解析

各個体群から数個体抽出し、葉から５mm 角の切片を切り取り、CTAB 法でＤＮＡを抽出した。PCR 法を用いて葉緑体 DNA の *matK* 領域を増幅し、精製後 macrogen-Japan にシーケンス解析を依頼、塩基配列を明らかにした。ＰＣＲ条件は以下の通りである。得られたシーケンス結果はフリーソフト MEGA7.0 を用いて塩基配列の解析と系統樹の作成を行った。また、DnaSP で

ハプロタイプの分析を行い、Network でハプロタイプネットワーク図を作成し、さらに QGIS で地域ごとの遺伝子集団構造図を作成した。

ＰＣＲ条件　酵素：ExTaq(TAKARA)

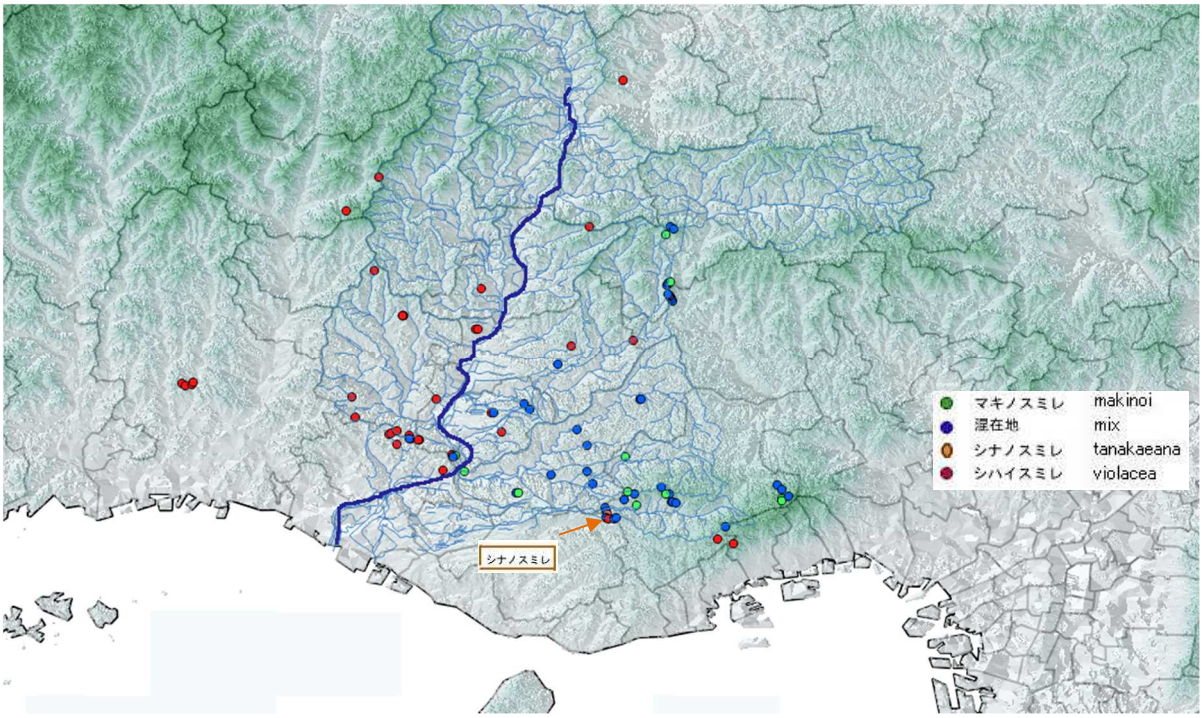
プライマーの塩基配列
f　5´ AAATACCAAACCCGCCCCTT 3´
r　5´ GGGGGATTGCAGTCATTGTAGA 3´

PCR 条件　94℃　1min　1cycle
94℃　30sec　55℃ 20sec
72℃ 80sec　35cycle
94℃　5min　1cycle

3　結　果

３－１　生育地調査結果

図２　各スミレの生育地（青い線は加古川水系）



マキノスミレは神戸北区から三木市、小野市内まで分布が広がっていた。しばしばシハイスミレとマキノスミレは同じ個体群に混在した。また、信州に分布するマキノスミレの一品種シナノスミレ(*V.violacea* var.*makinoi* f.*tanakaeana*)が神戸市北区と三木市の境で見つかった。マキノスミレの分布は現在のところ図２の青い太線で示す加古川本流まで広がった。混在地では変異が連続しており、シハイスミレともマキノスミレとも判別しがたい個体が多数生育していた。

調査の結果、シハイスミレはアカマツーモチツツジ群集の比較的明るい林床、尾根筋などの灌木林林床などに多く、マキノスミレは急峻な谷の底やスギ植林の林縁など、陽があまり当たらない暗い場所に多く生育していた。そこで私たちは分布が東日本であるマキノスミレは寒冷地に適応したシハイスミレの１タイプではないかと考え、QGIS を用いて最高気温の年平均気温と関係を調べた。

その結果、マキノスミレ、及びマキノスミレーシハイスミレの混在地はシハイスミレのみの成育場所より平均気温が低い傾向が見られた。

３－２　形態の測定結果分析

私たちは両種が混在する場所が多かったので、葉の形態を測定し、フリーソフトＲで箱ひげ図を作成、また、主成分分析を行った。

箱ひげ図では、L1 から L4 でシハイスミレの値が小さくなった。これはこの地方ではシハイスミレは葉が小型のものが多いからである。マキノスミレはシハイスミレの狭葉変種であるので、L1/L2 も大きくなった。L4/L1 の値はマキノスミレが小さく、このことから葉の最大幅の位置がマキノスミレは下部に寄っていることがわかった。

主成分分析の結果からも両種を分けるポイントは葉の細長さ、最大幅の位置であることがわかる。両種はおおよそ形態的に分けられそうであるが、形態的に中間型が多数存在することが示されている。これらから混在地では雑種が生じていることが考えられる（図３）。

３－３　葉緑体 DNA の *matK* 領域における解析結果

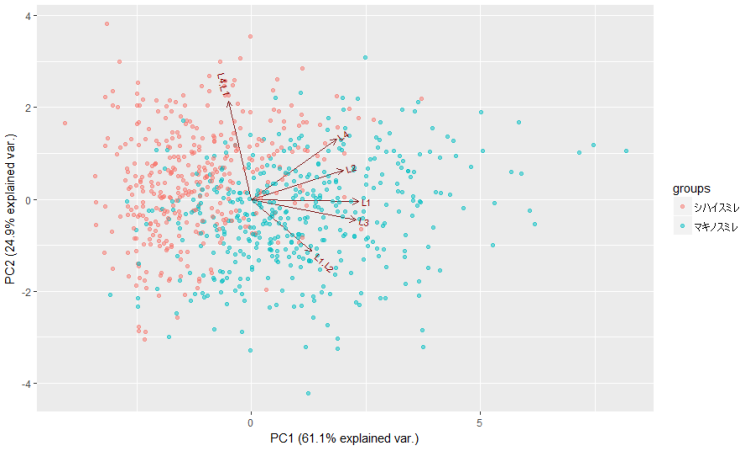


図３　主成分分析
（L4,L1 は L4/L1 を、L1,L2 は L1/L2 を示す）

MEGA７による分子系統樹を図４に、DnaSP によるハプロネットワーク図を図５、フリーソフト QGIS を用いて各ハプロタイプが各生育場所にどれくらいの割合で存在するかを表した遺伝子集団構造図を図６に示す。分子系統樹では多数のハプロタイプが見られ、同じハプロタイプを持つ個体の中にシハイスミレ、マキノスミレ、中間型が存在し、*matK* 領域ではこれらのスミレは区別できなかった。変種を問わず、むしろ個体群ごとに近い塩基配列を持つ傾向が見られた。

図５のハプロタイプネットワーク図では、個体数の多いハプロタイプ H2 は私たちの学校の周辺である小野市、三木市に多く見られ、塩基配列の１つ異なる H6 もほとんどが学校の周辺に生育している個体群のものである。それに対して H17 は和歌山県、H32 は新潟県と遠い地方のもので、よりたくさんの塩基配列に変異が見られる傾向があった。図６は私たちの校区である加西市、小野市、三木市と神戸北区におけるハプロタイプの割合を表したものであるが、図５と同様に H2、H6 が私たちの校区の両方のスミレに多く、北部へ行くと H28 のタイプが増え、塩基配列に違いが生じていることがわかった。

４　まとめ

私たちは前年度までの先輩の結果で、種を超えた塩基配列の変異が見られたことからシハイスミレとマキノスミレが別種である可能性を探った。しかし、葉の形態の変異は連続しており、両種は形態的に明瞭に区別できない。また、分子系統樹でもたくさんのハプロタイプが存在し、シハイスミレ、マキノスミレ、中間的な個体が *matK* 領域では区別できなかった。当地方では同じ個体群に両種が混在し、かつ、これらは種間で頻繁に交雑をして遺伝子を交換している可能性が推測される。これらの２種は品種程度の分化しておらず、生殖的な隔離はないと考えられる。生育地の調査結果や QGIS による最高気温の平均気温との分析から、当地方では日当たりが良く、夏に暑い場所にシハイスミレが生育し、日射量が少ない常緑樹の林縁や暗い谷筋で、夏に気温があまり上がらない場所にマキノスミレが分布している。気温や光の強さの影響で形態に変化が生じ、形態的に２つのタイプが生じたのではないかと推定する。

吉田ら(2012)によると核ＤＮＡの *its* 領域では両種は区別できるとの報告もあり、今後、*its* 領域で詳細に分析を試みたい。また、さらに北や西の市町村でも詳しく分布を調査し、県内のシハイスミレとマキノスミレの分布を詳しく調べてみたいと考えている。

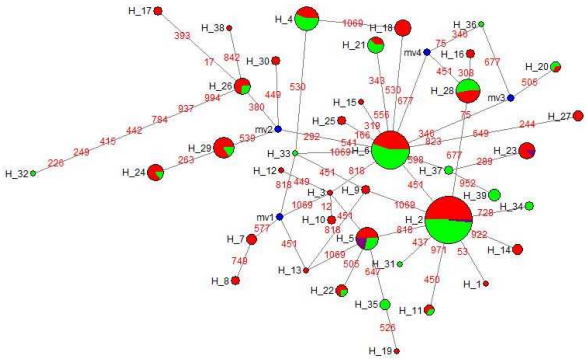


図５　ハプロタイプネットワーク図

謝　辞

ご指導いただいた兵庫教育大学認識形成系教育コース自然系教育分野（理科）准教授笠原恵先生、神奈川大学特別准教授岩崎貴也先生、山形大学理学部生物学科教授横山潤先生、首都大学東京田村浩一郎先生、関西学院大学古澄英男先生、県立博物館三橋弘宗先生をはじめ多数の先生方に指導していただきました。深く感謝します。なお，本研究に際し，中谷医工計測技術振興財団より科学教育振興助成金を、兵庫教育大学より研究助成金を頂きました。厚くお礼申し上げます。

参考文献

1) 浜栄助(1975)　原色日本のスミレ　誠文堂新光社

2) Masataka Yoshida,Hiroshi Hayakawa,Tatsuya Fukuda and Jun Yokoyama(2012) Incongruence between Morphological and Molecular Traits in Populations of Viola violacea (Violaceae) in Yamagata Prefecture Northern Honshu, Japan

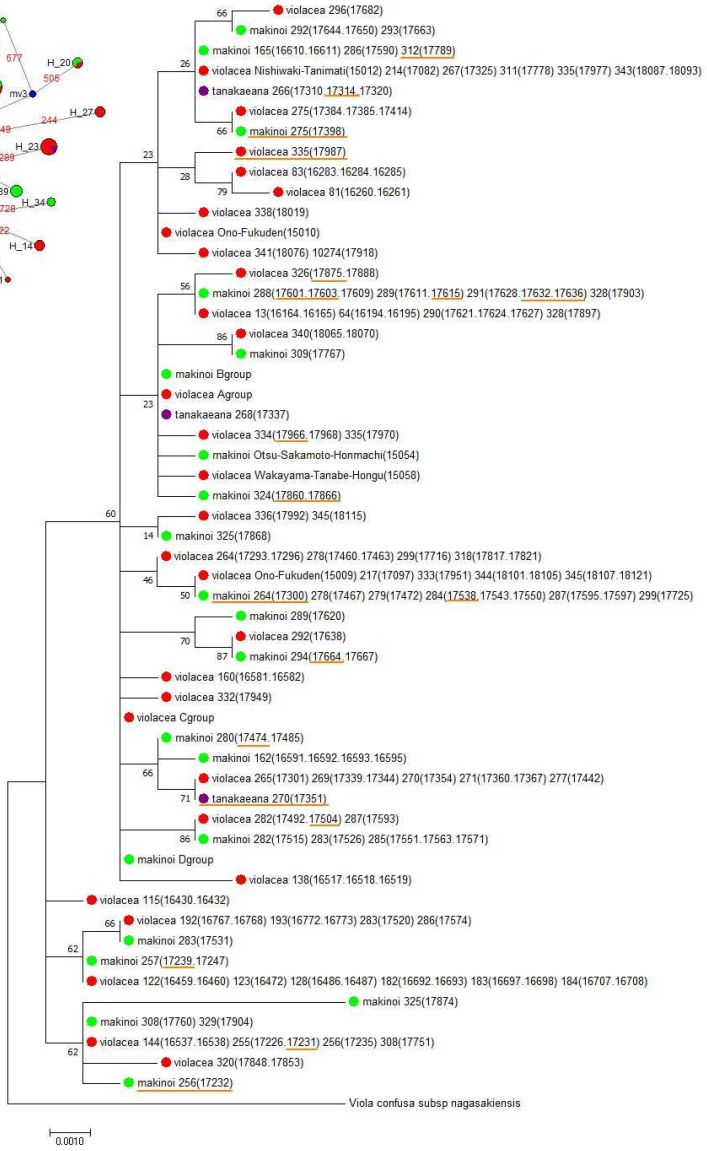


図４　分子系統樹（A～D は同じ塩基配列の個体をまとめた)
５桁：個体番号、
３桁：場所番号

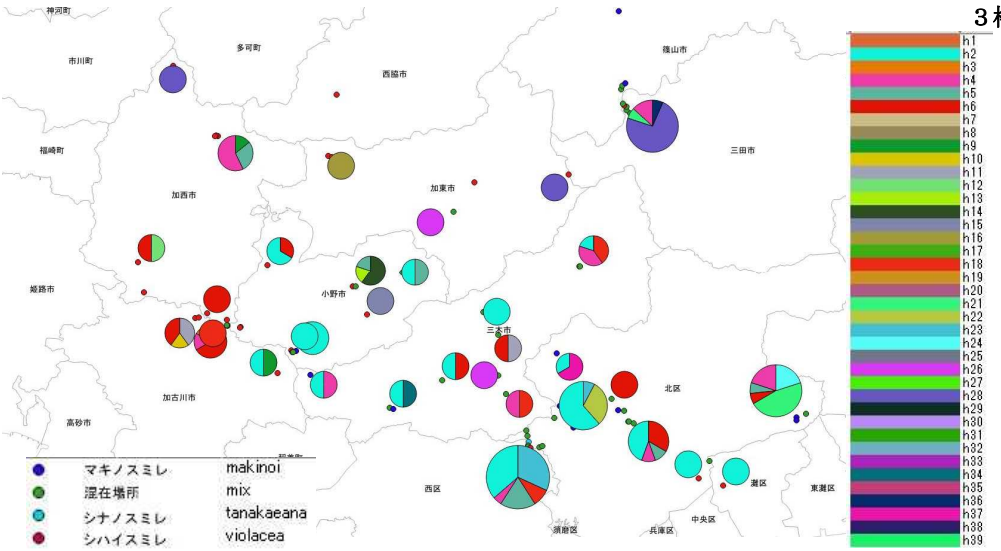


図６　遺伝子集団構造図