

令和元年6月24日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07239

研究課題名(和文) ベトナム中部がツバキ属植物の新たな起源地か？その遺伝的多様性評価と保全

研究課題名(英文) Is central area of Vietnam a new center of genetic diversity for genus Camellia? Evaluate genetic diversity and attempt for conservation.

研究代表者

植松 千代美 (UEMATSU, CHIYOMI)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：30232789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ツバキ属植物は東アジアから東南アジアに約250種が分布するが、ベトナムでは分布の実態が明らかでなかった。3回の探索により記録・収集した62種598個体のツバキ属植物の内、中南部の25種29集団を13個のSSRマーカーで解析すると、各集団の遺伝的多様性は高かったが、アレルの豊富さに欠け、ホモ化が進んでいると考えられた。AMOVAの結果、集団間に遺伝的分化が生じていた。STRUCTURE解析の結果は従来の分類体系を支持しなかった。しかし花と葉のいくつかの形質と想定祖先集団の間に相関が認められ、これらの形質が種の識別に重要と考えた。自生地の3割は環境破壊のリスクにさらされており保全が急務である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ベトナム全土を網羅した学術調査は今回が初めてで、62種の分布を明らかにし、各集団の構造解析の結果に基づいて、保全が急務であることを示した。分子マーカーを用いた解析結果は従来の分類体系を支持しなかったが、葉と花のいくつかの形質が種の識別マーカーとなる可能性を示した点は、系統関係再考に重要な知見と考える。ツバキ属植物は主にチャ、ツバキ油、鑑賞用に利用されてきたが、黄花種の薬用利用など、あらたな利用が増えている。ベトナムではチャ以外の種を飲用に供している地域もあった。今後利用可能な遺伝資源として、早急な保全により絶滅を回避し、系統関係を明らかにすることが重要である。

研究成果の概要(英文)：In Genus Camellia, more than 250 species distribute in East and South-East Asia. But in Vietnam, number of species and its distribution were unclear because of war for a long time. By our 3 times explorations, 62 species, 598 individuals of wild Camellia were found and recorded from all over Vietnam. Among these accessions, 25 species, 29 populations originated from Southern area were analyzed using 13 SSR markers. Each population showed high genetic diversity, low allelic richness and thought to be highly homozygous. Result of AMOVA analysis indicated genetic differentiation among populations. Results of STRUCTURE analysis did not support the traditional taxonomic system. But some morphological traits in flower and leaf showed correlation with expected ancestral population. Thus these characteristics could be a key for species identification. More than 30% of habitats are facing to the risk of environmental destruction, therefore conservation is urgently required.

研究分野：植物遺伝資源学

キーワード：ツバキ属植物 ベトナム 遺伝的多様性 集団構造解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ツバキ属植物は日本には4種1変種が分布するのみだが、世界的には東アジアから東南アジアに250種以上分布することが知られている(箱田 2005¹、桐野 2013²)。中国南部からベトナム北部にかけての国境地帯周辺で多様性が高く起源地と考えられて来たが、1990年代以降ベトナム中南部で次々とツバキ属植物が見つかり、現在も新種の発見が続いている。その変異の多様さから起源地がこれまでの定説より南方である可能性が指摘されている(Orel 2006³、箱田 2008⁴)。

ベトナムは19世紀後半から長年フランスの支配下に置かれ、その間に多くの標本がヨーロッパに持ち出され欧米の植物園や標本館に保管されている(Sealy 1958⁵)。その後、第二次大戦やベトナム戦争で国土が荒廃し、多くのツバキ属植物が失われた可能性が高い。1975年にベトナム戦争が終結してからは近代化と開発の影響により、かつて標本として記載された種が、再確認されないまま失われる可能性や、未記載の種が失われる可能性が高まっている(箱田 2005¹)。

一方1965年に中国で黄花をつける金花茶(*Camellia chrysantha*)が発見され、花色の珍しさから注目を集めた。その後、中国、ベトナムの双方で黄花種が相次いで報告されたが、高値で取引されることから乱獲が進み、すでに自然界から失われた種もある。ベトナム全土におけるツバキ属植物の実態調査と保全が急務と考え本研究課題に着手した。

2. 研究の目的

本研究では探索調査によりベトナムにおけるツバキ属植物の分布の実態を明らかにする。形態ならびに分子マーカーを用い、集団遺伝学的解析により遺伝的多様性を評価し、ベトナム中南部がツバキ属植物の起源地である可能性を検証する。生息環境も含め保全の緊急度を評価し、緊急度の高い保全単位について生息地の保全と同時に、生息域外保全を進めることを目指す。

3. 研究の方法

(1) 探索調査

ベトナム全土を網羅するように南部から北部まで3回に分けて探索調査を行う。ベトナムのツバキ属植物の分類を専門とする研究協力者の協力を得て、ベトナム語による記載情報を収集するほか、地域の専門家や地元住民からツバキ属植物の自生情報を収集し、それらに基づいて探索地を選定する。個体を見いだした時にはまず種の同定を行う。次にGPSにより所在地の位置情報を記録、樹高、幹周りを計測・記録し、形態計測用ならびにDNA分析用の葉を採集する。花や果実が得られれば採集して形態形質を調査する。集団遺伝学的解析のために、各自生地から個体間距離5m以上で、10個体の採集を目指す。個体数が少ない場合には可能な限り採集する。

(2) 形態調査

葉については1個体10葉について葉身長、葉身幅、葉柄長、葉身長の中央部1cmにおける鋸歯の数、葉身基部の角度、葉身先端部の角度を計測し、10葉の平均値を個体の値とする。集団ごとに個体の値を平均して、集団の値とする。

花については各集団の開花個体から3花以上の計測を計画したが、集団が一斉に開花している事が無く、また1個体あたりの開花数も限られていたため、各集団に開花個体があれば、少なくとも1花について、計測と評価を行った。量的形質として花の直径と、花柄長、萼苞型であれば萼苞の数と大きさ、小苞型であれば小苞と萼の数と大きさ、花弁の枚数と大きさ、雄しべの本数と長さ、雌しべについては花柱の本数と長さ、子房室の数と子房室あたりの胚珠の数を計測したほか、花の着生する位置、毛の有無などについて評価した。形態形質と分子マーカーによる解析の結果との相関を調べる。

(3) 核のSSRマーカーを用いた解析

チャで開発された核のSSRマーカー(Tan et al 2013⁶、Taniguchi et al 2014⁷)から広範なツバキ属植物に適用できるマーカーを選抜する。収集個体からDNAを抽出し、これらのマーカーを用いてPCR反応を行う。PCR産物は共同研究者の片山が所属する神戸大学のGenetic Analyzerによりフラグメント解析を行い、アリルの分子量を決定する。得られた分子量データに基づきNa、Ne、Ho、He、Fis、Arを算出し集団の遺伝的多様性を評価する。AMOVA解析により集団内と集団間の遺伝的多様性を評価する。STRUCTURE解析を行い、集団構造を明らかにする。さらにNJ法により無根系統樹を作成し、集団間の系統関係を調査する。

(4) 保全の緊急度の評価とジーンバンク構築

前述の形態形質と分子マーカーを用いた各集団の多様性評価の結果に基づき、自生地を取り巻く環境条件、集団のサイズを加味して、早急に保全の必要な保全ユニットを選定する。選定された保全ユニットについてはベトナムの研究協力者とともに生息地の保全と生息域外保全の方法について検討する。

4. 研究成果

(1) 分布と自生地の状況

ベトナム西南端のフーコック島から北部まで全土をカバーすべく3回の探索調査を実施した結果、野生個体と考えられる62種598個体と人の管理下に置かれた83個体、合計681個体を収集・調査した。中南部で予想以上の個体が見つかり、北部の形態調査やDNA解析が遅れたため、先行して形態質と分子マーカーを用いた集団構造解析が終了した中南部の36種(未同定の10種を含む)53集団、329個体について結果を報告する。中南部の中でもラムドン省を中心とする中部高原地帯南部に多くの集団が分布していた。53集団の自生地のうち、6集団はコーヒー園などの農地拡大により、また12集団は森林伐採により、環境破壊が進行していた。

(2) 形態的特徴

葉も花も多様性に富んでいた。葉は長さ6~40cm、幅3~12cm、長さ/幅比が1.8~4.5と日本のヤブツバキからは想像できないほど多様だった。花色はピンクや濃いピンク、紫、淡いクリーム色から濃い黄色まで様々な黄色、赤みの強いオレンジ色、白色、覆輪の入るものなど多様だった。花の大きさは直径2.0~12.5cm、1花あたり花弁枚数は5~15枚と変異は小さかったが、雄しべの数は90~500本以上と変異の幅が大きかった。

(3) 核SSRマーカーの解析から明らかになったこと

一般にSSRマーカーは同種の集団間の解析に適用されることが多いが、本研究ではツバキ属4亜属の異なる種への適用を試みた。予備調査で葉緑体(cp)DNAの*matK*遺伝子を用いて系統関係を推定したところ、亜属レベルでも差違が得られず、種間の遺伝的多様性が低く、シノニムの可能性が示唆された。そこでSSRマーカーを適用した。ベトナム中南部から収集した329個体に対して107種類のSSRマーカーを用いて増幅と多型を調べた結果、17マーカーが適用可能だった。これらを用いてPCR反応を行い、1サンプルで3以上のアリルが検出された場合は高次倍数体と判断し、SSR解析から除外した。また複数の個体に対してヌルアリルとなったマーカーは除外した。最終的に25種、29集団、194個体について13種類のマーカーを用いてSSR解析を行った。なお供試した29集団には、*C. dormoyana*が3集団、*C. furfuracea*が3集団含まれたが、他は1種1集団だった。 H_o は0.341~0.764で平均0.533、 H_e は0.486~0.827で平均0.649だった。これまでに集団解析が行われた*C. nitidissima*(Wei et al 2008⁸)に比べると全体的に遺伝的多様性は高く、*C. sinensis*(Yao et al 2012⁹、Fang et al 2012¹⁰)の野生個体や栽培個体を解析した結果とも同程度が高く、ベトナム中南部のツバキ属植物は他のツバキ属植物に比べると遺伝的多様性が高かった。しかし既報のツバキ属以外の木本植物と比べると H_e は他の分類群の変異の幅に含まれるのに対し、 H_o がやや低かった。一方、 A_r の平均値1.559は他の木本植物に比べると非常に低かった(津村 2012¹¹)。この結果はアリルの豊富さに欠けることを示している。また F_{IS} は最大で0.387、2集団が負の値を示したが、平均0.193と、他の木本植物に比べると高く、多くの集団でホモ化が進んでいると考えられた。AMOVA解析の結果は遺伝的変異の37.5%が集団間に帰する事を示しており、Wei et al (2008⁸)も*C. nitidissima*で30%を報告している。これらは他の木本植物での割合に比べると高く、ツバキ属植物では集団間の分化が進んでいることが示された。

STRUCTURE解析の結果、Delta KならびにL(K)の値に基づき、K=3で得られたバーグラフをChang & Bartholomew (1984)¹²が提唱した系統樹にならって図示してみた(図1)。本来この系統樹は形態に基づき進化の方向性を節レベルで表したものだ、図1では便宜上、亜属ごとにまとめてバーグラフを示した。原始ツバキ亜属には2つの、チャ亜属には3つの想定祖先集団が関与していた。一方ヒメサザンカ亜属と、*C. yokdonensis*を除くツバキ亜属では、想定祖先集団が1つとなった。ただしこれは供試種数や個体数が少なかった事を反映している可能性がある。アドミクスチャーとなっている複数種については雑種由来の可能性が考えられた。

フラグメント解析の結果に

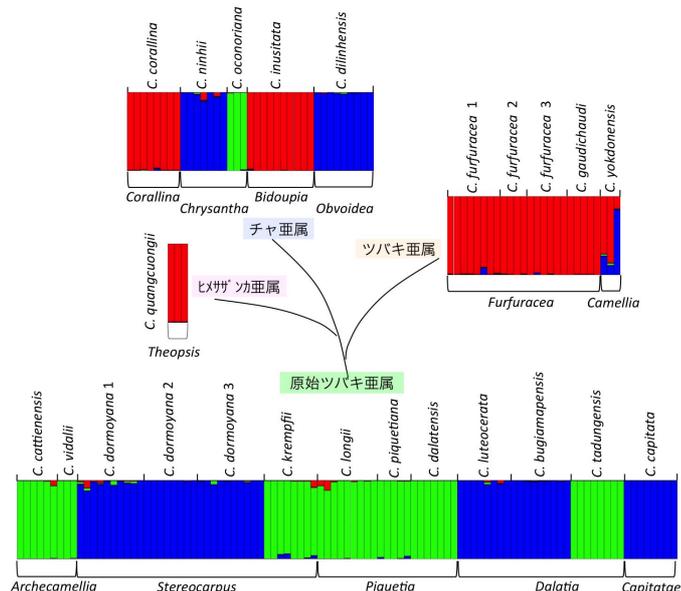


図1. 13個のSSRマーカーによるSTRUCTURE解析の結果を従来の系統樹にのせて示した。青、緑、赤はK=3に対応する想定祖先集団を表す。未同定の5集団、29個体のデータは表示していない。

Yao M Z, et al (2012) Diversity distribution and population structure of tea germplasms in China revealed by EST-SSR markers. *Tree Genetics & Genomes*, 8: 205-220.

Fang W, et al (2012) Genetic diversity and relationship of clonal tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China as revealed by SSR markers. *Plant Systematics and Evolution*, 298: 469-483.

津村義彦(2012) 4. 樹木の遺伝的多様性と遺伝構造. 「森の分子生態学2」文一総合出版, 東京, pp18-31.

Chang H T, Bartholomew B (1984) *Camellias*. B T Batsford LTD, London.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Lieu Thi Nguyen, Ninh Tran, Chiyomi Uematsu, Hironori Katayama, Dung Van Luong, Son Thanh Hoang, Ky Danh Nguyen, Hung Viet Nguyen, Toan Canh Thai (2018) Two new species of *Camellia* (Theaceae) from Vietnam. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 48(2): 115-122. (査読有り). DOI: <https://doi.org/10/11110/kjpt.2018.48.2.115>.
- (2) Ninh Nguyet Hai Le, Chiyomi Uematsu, Hironori Katayama, Lieu Thi Nguyen, Ninh Tran, Dung Van Luong and Son Thanh Hoang (2017) *Camellia tuyenquangensis* (Theaceae), a new species from Vietnam. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 47(2): 95-99. (査読有り). DOI: <https://doi.org/10/11110/kjpt.2017.47.2.95>.

〔学会発表〕(計3件)

- (1) T. L. Nguyen, K. Fukuyama, H. Katayama, C. Uematsu, Genetic relationships among *Camellia* species collected from Southern Vietnam. 日本育種学会, 岡山, 2018年9月.
- (2) 福山敬, 片山寛則, 植松千代美: ツバキ属遺伝資源の評価と系統関係の解明. 日本育種学会, 岡山, 2018年9月.
- (3) T. L. Nguyen, V. D. Luong, K. Fukuyama, H. Katayama, C. Uematsu, Description of wild *Camellia* genetic resources collected from Southern Vietnam. 日本育種学会, 盛岡, 2017年10月.

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 片山 寛則

ローマ字氏名: KATAYAMA Hironori

所属研究機関名: 神戸大学

部局名: 農学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 50294202

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 箱田 直紀

ローマ字氏名: HAKODA Naotoshi

研究協力者氏名: LUONG Van Dung

ローマ字氏名: LUONG Van Dung

研究協力者氏名: LE NGUYET Hai Ninh

ローマ字氏名: LE NGUYET Hai Ninh

研究協力者氏名: NGUYEN Thi Lieu

ローマ字氏名: NGUYEN Thi Lieu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。