

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570086

研究課題名（和文） トケイソウ亜目における種皮の解剖学とその進化の解明

研究課題名（英文） Seed coat anatomy and its evolution of suborder Passiflorineae

研究代表者

徳岡 徹 (TOKUOKA TORU)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：90303792

研究成果の概要（和文）：スミレ科と広義トケイソウ科における *rbcl*, *atpB*, *matK* 遺伝子と 18S rDNA の塩基配列を用いた分子系統解析を行った。この配列を用いた解析の結果、ただ一つの最節約系統樹が得られ、この2つの科の属間の類縁関係が明らかになった。また、スミレ科の種皮の解剖学的特徴を観察した。その結果、内種皮外層に3つの形態が見られ、仮導管型の内種皮外層がトケイソウ亜目における原始形質であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Phylogenetic analyses of Violaceae and Passifloraceae sensu lato are presented using sequences from *rbcl*, *atpB*, *matK* and 18S rDNA. The combined analysis resulted in only one most parsimonious tree, and most of the nodes within the two families are strongly supported. And, Violaceae are investigated with respect to the seed coat structure. The three types of the exotegmen are distinguished, and the trecheoidal exotegmen is a plesiomorphy within the suborder Passiflorineae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究代表者の専門分野：植物系統分類学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：種子、解剖学、形質進化、トケイソウ亜目

## 1. 研究開始当初の背景

トケイソウ亜目は被子植物キントラノオ目 (Malpighiales) に含まれ、6科140属、約2800種からなる分類群である。本研究の研究代表者は研究開始当初までにキントラノオ目内（29科約720属）における科間の系統関係を明らかにする目的で研究を行ってきた (Tokuoka and Tobe 2006)。キントラノオ目に含まれる24科106属における葉

緑体 *rbcl*, *atpB*, *matK* 遺伝子、核18SrDNAの4つのDNA配列を用いた最節約法による解析の結果、ただ一つの最節約系統樹が得られ、科レベルの単系統群の多くは統計学的な支持がなかったが、いくつかの統計学的に支持される単系統群を見いだした。トケイソウ亜目はその中の一つであり、広義ヤナギ科（狭義ヤナギ科と広義イイギリ科の一部）、ラキステマ科、広義トケイソウ科（狭義トケイソウ科、

ツルネラ科、マレシエルビア科)、スミレ科、広義アカリア科(狭義アカリア科と広義イイギリ科の一部)、グーピア科からなる。この6科の間の系統関係は広義ヤナギ科とラキステマ科が姉妹群であることが強く支持される以外は統計学的な支持は得られず、今後の課題として残った。

一方で、研究代表者はキントラノオ目に含まれるトウダイグサ科およびその近縁科(エノキグサ科、ツゲモドキ科、パンダ科)における種皮の解剖学的研究を行ってきた(Tokuoka and Tobe 1995, 1997, 1998, 1999a, b, 2001, 2002, 2003)。その結果、種皮の解剖学的形質の中でも特に内種皮外層の構造、内種皮および外種皮の維管束の有無、種衣の有無が目内の科のグループを特徴づける有用な形質であることが示唆された。この3つの形質の中でも特に内種皮外層の構造において柵状の内種皮外層はペラ亜科を除く狭義トウダイグサ科(22属; キントラノオ目の31%に当たる)の共有派生形質であり、コミカンソウ科の一部とトケイソウ科に見られる柵状の内種皮外層はこれとは独立に進化してきたものであること、仮道管状の内種皮外層が共有原始形質であることが示唆された。しかし、キントラノオ目における科間の分子系統解析では多くの初期の分岐が統計学的に支持されておらず、また、内種皮外層の構造を含む種皮の解剖学的研究例はトウダイグサ科とその近縁科以外ではほとんど無く(一つの科あたり2, 3種)、上述の議論は実は非常に脆弱な証拠に立脚したものである。一方、目をトケイソウ亜目に移してみると、トケイソウ亜目には柵状、リボン状、仮道管状の3種類の内種皮外層が報告されており、トウダイグサ科およびその近縁科の種皮の研究と同様の議論が成り立つ可能性があり、種皮のデータの蓄積が待たれていた。

## 2. 研究の目的

本研究ではこのトケイソウ亜目における科および属間の系統関係を完全に解明し、その系統関係に重要な形態形質(共有派生形質)であると予想される種皮の解剖学的形質の進化を明らかにするものである。具体的には、トケイソウ亜目に含まれる最も主要な科であるトケイソウ科とスミレ科のそれぞれについて属間の系統関係を明らかにし、その種皮の構造も詳細に観察する。この結果を統合してトケイソウ亜目における種皮の形態形質の進化を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究ではトケイソウ科とスミレ科を対象として、分子系統解析と種皮の解剖学的特徴の観察を行った。その具体的方法は以下にまとめる。

### (1) スミレ科の分子系統解析:

スミレ科に含まれる19属、39種を研究に用いた。これらの材料について葉緑体上の*rbcL*, *atpB*, *matK*遺伝子および核18S rDNAの塩基配列を読み取った。Munzinger and Ballard (2003)の定義によるスミレ科は23属を含むが、そのうち未発表の新属2属と*Hekkingia*属、*Schweiggeria*属の材料は入手できなかった。外群にはトケイソウ科3属(*Adenia*, *Passiflora*, *Piriqueta*)を用いた。主に標本庫に収蔵されている標本から葉の一部を採取し材料として用いたが、一部は野外に自生しているものも材料として用いた。葉からのDNA抽出法はCTAB法によっておこなった。塩基配列の読み取りにはDye Terminator法を用いた。BigDye ver. 3.1を用い、ABI 3100シーケンサーで塩基配列を読み取った。塩基配列はプライマーの部分を取り除いた後、目視でアライメントした。アライメント後、*rbcL*遺伝子は1331bp、*atpB*遺伝子は1469bp、*matK*遺伝子は1485bp、18S rDNAは1736bpになり、合計6021bp

を系統解析に用いた。*matK*遺伝子と18S rDNAの配列には一部挿入欠損が見られたが、系統解析では無視した。4つの配列を用いる系統解析の前に、4つの配列間に矛盾が無いかを個々の配列によるブーツストラップ解析を行うことで確認した。系統解析には最節約法とベイズ法を用いた。最節約法ではPAUP ver. 4.0b10を用いてアイランドサーチを行った後、TBRにより網羅的に系統樹を作製して最節約系統樹を探索した。得られた系統樹は5000回のブーツストラップ反復により評価した。ベイズ法ではまず、MrModeltest 2.2を用いて適当な進化モデルを探索した。その結果、GTR+I+Gモデルが最適である事が分かった。このモデルを基にMrBayes ver. 3.1.2を用いて解析を行った。解析ではマルコフ連鎖を2000000世代繰り返し、最初の1000000世代を破棄して残った系統樹の50%多数決合意樹を作製した。以上の方法で得られた系統樹を基に形質進化を明らかにした。形質進化の解析にはMacClade4.06を用い、形質進化をACCTRANとDELTRANを両方含む方法で系統樹上に示した。

#### (2) 広義トケイソウ科の分子系統解析：

広義トケイソウ科に含まれる25属、42種を研究に用いた。塩基配列の読み取りや系統解析はスマレ科の分子系統解析と全く同じ方法で行った。

#### (3) スマレ科の種皮の比較解剖学：

スマレ科に含まれる18属、49種を研究に用いた。研究に用いた種子は主にミズーリ植物園標本庫に収蔵されている標本から採取したが、一部（スマレ属）は野外で採集し、FAAで固定したものを用いた。標本から採取した種子は一度3%アンモニア水で形態を戻した。これらの種子はまず外部形態の観察（種子の

大きさ、種子の付属物の有無）をおこなった。種皮の解剖学的形質はマイクロームによる切片を用いて観察した。材料の種子はt-ブチルアルコールシリーズで脱水した後、パラフィン（融点56-59°C）に包埋した。通常のパラフィン法によって切片を作製した。種皮が堅く切片を作製するのが困難な場合は軟化剤（界面活性剤とグリセリンを含む）に材料を一週間程度浸してからマイクロームで切片を作製した。切片は6ミクロンの厚さで作製した。作製した切片はヘマトキシリン、サフラニン、ファストグリーンで染色した。

#### 4. 研究成果

本研究ではスマレ科およびトケイソウ科内の属間の系統関係とその形態の進化についての考察を行った。また、スマレ科の種皮の比較解剖学ではスマレ科に含まれる属の内種皮外層の構造を詳細に明らかにし、その形質の進化についての考察を行った。詳しくは以下に述べる。

##### (1) スマレ科の分子系統解析：

スマレ科に含まれる19属、39種における4つのDNA領域（合計6021bp）の塩基配列を系統解析に用いたところ880塩基が最節約法において情報があるものであった。最節約法による系統解析の結果、ただ一つの最節約系統樹が得られ、樹長が3022、CI=0.615、RI=0.709であった。ベイズ法による系統解析で得られた50%多数決合意樹は1つのノードを除き最節約系統樹と全く同じ樹形であった（図1）。この系統樹から以下の点が明らかになった。スマレ科の単系統性は強く支持された（100%ブーツストラップ（以下BP）、事後確率1.00（以下PP））。スマレ科のなかの最初の分岐は*Fusispermum*属であり、続いて*Rinorea*属、*Decorsella*属と分岐し、この系統関係は全て強く支持された（100%BS, 1.00PP）。次に

*Rinoreocarpus*属が分岐したが、この系統関係は弱くしか支持されなかった (59%BS, 0.91PP)。残りのスマレ科は2つのサブクレードに分かれた。一つは*Amphirrhox*, *Gloeospermum*, *Leonia*, *Mayanaea*, *Orthion*の5属からなる単系統群であり、その系統関係は概ね強く支持された。もう一つのサブクレードは*Agatea*, *Corynostylis*, *Anchietea*, *Hybanthus*, *Isodendron*, *Melicytus*, *Allexis*, *Noisettia*, *Paypayrola*, スマレ属の10属からなる単系統群であり、このそれぞれの単系統群もブーツストラップが50%以上で支持された。複数の種を調べた属は全て単系統群になったが、*Hybanthus*属だけは多系統となり、今後の属内の分類の再検討が必要である。以上の系統関係からスマレ科内の分類学的な再検討と花の形態形質についての考察を行った。まず、これまでの分類体系によるとスマレ科は3つの亜科に分類されており、その一つである*Fusispermum*属のみからなるFusispermoideaeは花卉が片巻であること、花糸が合着していること、葯の付属物が雄蕊の腹側にあること、果実が小さなさく果であることなどから他の2亜科と異なっており、分子系統解析による結果もスマレ科で最初に分岐したクレードであり、このまま亜科として取り扱うべきであることが分かった。一方、*Leonia*属のみからなるLeonioideaeはスマレ亜科内に含まれてしまい、亜科として扱うべきではないことが分かった。花の形態の進化については、これまでは花卉の配列はquincuncial型からapotact型、片巻型の順に進化したと考えられてきたが、分子系統の結果を見ると、その逆で片巻型、apotact型、quincuncial型の順に派生したことが分かった。また、心皮の数は3心皮が原始形質であり、5心皮が派生形質であることが分かった。花卉の対称性はこれまでの科内の分類に重視

されてきた特徴であるが、放射相称から左右相称への変化はスマレ科内で何度もおこった進化であることが分かった。

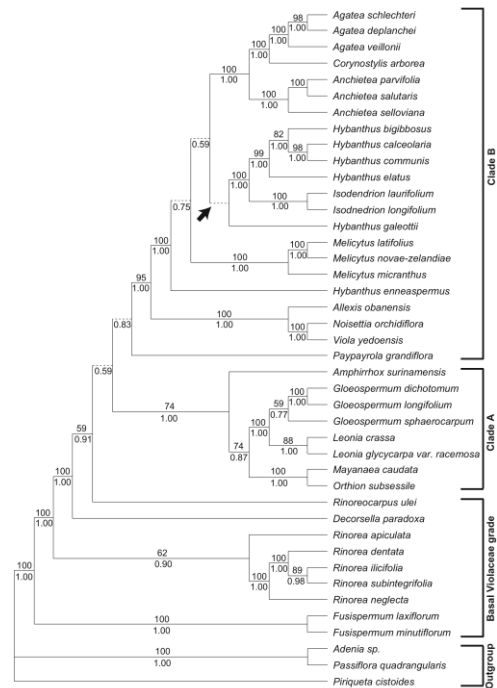


図1 4つの塩基配列を用いたスマレ科の系統

## (2) 広義トケイソウ科の分子系統解析：

広義トケイソウ科に含まれる25属、42種における4つのDNA領域(合計6021bp)の塩基配列を系統解析に用いたところ1115塩基が最節約法において情報があるものであった。最節約法による系統解析の結果、ただ一つの最節約系統樹が得られ、樹長が3470、CI=0.602、RI=0.754であった。ベイズ法による系統解析で得られた50%多数決合意樹は3つのノードを除き最節約系統樹と全く同じ樹形であった(図2)。この系統樹から以下の点が明らかになった。広義トケイソウ科の単系統性は強く支持された(100%BS, 1.00PP)。広義トケイソウ科に含まれる狭義トケイソウ科、旧ツルネラ科、旧マレシエルビア科もそれぞれ単系統であることが強く支持された(100%BS, 1.00PP)。また、狭義トケイソウ科と旧ツルネラ科が姉妹群を形成しその単系統群は強く支持された(100%BS, 1.00PP)。狭義トケイソウ

科内では、トケイソウ連とパロプシア連がそれぞれ単系統であることが強く支持された(98%BS, 100%BS, 1.00PP)。トケイソウ連内では *Adenia* 属が最初に分岐し、それ以外のトケイソウ連の単系統性は強く支持された(100%BS, 1.00PP)。残りのトケイソウ連は2つのサブクレードに分かれた。一つは *Hollrungia*, *Mitostemma*, *Dilkea*, *Ancistroghyrsus*、トケイソウ属の5属からなり、その属間の類縁関係は50%BS以上で支持された。もう一つは *Crossostemma*, *Schlechterina*, *Deidamia*, *Efulensia*, *Basananthe* の5属からなり、この属間関係も良く支持された。旧ツルネラ科はまず2つのサブクレードに分かれる。一つは *Piriquieta*, *Turnera* の2属からなり、この単系統群は強く支持された(100%BS, 1.00PP)。もう一つは残りの6属(*Erblichia*, *Mathurina*, *Tricliceras*, *Loewia*, *Streptopetalum*, *Stapfiella*) からなり、この属間の類縁関係もよく支持された。旧マレシエルビア科は *Malesherbia* 属のみからなる科であり、*Malesherbia* 属4種を解析したが、その種間関係は明らかにならなかった。以上の系統解析から、これまで形態による分類や分子系統による結果から、その系統関係が分からなかった3つの旧科の関係が明らかになった。また、狭義トケイソウ科内の系統関係はこれまでの形態による分類と殆ど矛盾が無く、その分類に用いてきた形態形質はそれぞれの単系統群の派生形質となっていることが分かった。また、旧ツルネラ科内においても同様に形態による分類と殆ど矛盾が無いことが分かった。また、これまでの分類に重要視されてきた Androgynophore/Gynophore の形質はその形質の定義の仕方によりその極性が変化し、発生学的な研究などからその定義を再検討する必要があることが示唆された。また、副花冠の

有無は旧ツルネラ科内において副花冠の喪失が2回生じたことが示唆された。

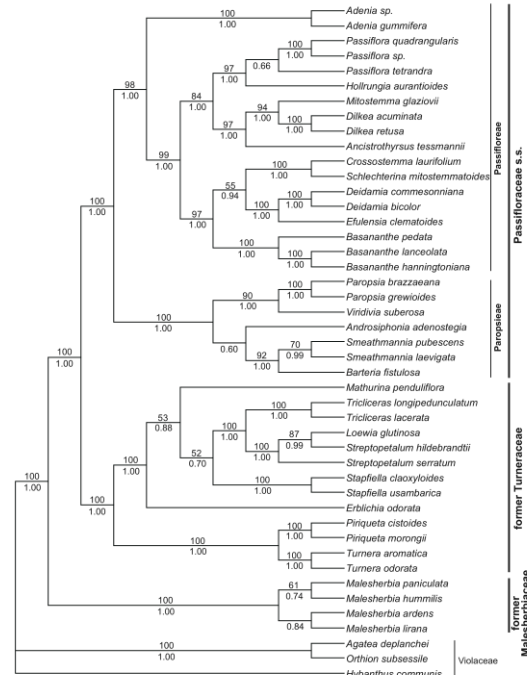


図2 4つの塩基配列を用いた広義トケイソウ科の最節約系統

### (3) スミレ科の種皮の比較解剖学：

スミレ科の種子の外部形態の観察では、種子に翼があるもの、種衣があるもの、種子に付属物が全くないものの3つの形態が見られた。翼があるものは3属 (*Agatea*, *Anchietea*, *Corynostylis*)、種衣のあるものは8属 (*Allexis*, *Amphirrhox*, *Hybanthus*, *Isodendrion*, *Melicytus*, *Noisettia*, *Orthion*, *Paypayrola*) に見られた。切片の観察の結果では、観察したスミレ科は全て内種皮外層が厚壁化し、種子に機械的強度を与える、内種皮外層型種子であることが分かった。しかし、内種皮外層の構造には3つの形態があることが分かった。つまり、内種皮外層の細胞が種子の長軸方向にのみ伸長する①仮導管型、内種皮外層の細胞が更に多層化して厚壁化する②多層型、内種皮外層の細胞が長軸方向と放射方向の両方に伸長する③リボン型、の3つであった。これらの形態形質を分子系統解析により得られた系統樹上に配置すると、

外部形態については種子に付属物がないことが原始形質であり、種衣を付けるものが派生した。更に、種衣を付けるものから翼を付けるものが派生し、この形質状態が3属 (*Agatea*, *Anchietea*, *Corynostylis*) の共有派生形質であることが分かった。*Gloeospermum*属と *Leonia*属は二次的に種衣を失ったものと考えられる。内種皮外層の構造については、*Fusispermum*属に仮導管型の種皮が見られており、おそらく仮導管型の内種皮外層が原始形質であり、それ以外の形態が派生形質であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①Tokuoka, T. 2011. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. J. Plant Res. (inpress) (査読有り)

②Tokuoka, T. 2008. Molecular phylogenetic analysis of Violaceae (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. J. Plant Res. 121:253-260 (査読有り)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

徳岡 徹 (TOKUOKA TORU)  
静岡大学・理学部・准教授  
研究者番号：90303792