

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370032

研究課題名(和文) 隔年開花種コダチスズムシソウと毎年開花種オキナワスズムシソウの一方交雑の解析

研究課題名(英文) Analysis of unidirectional hybridization between supra-annual flowering species, *Strobilanthes glandulifera*, and annual flowering species, *S. tashiroi*

研究代表者

邑田 仁 (MURATA JIN)

東京大学・大学院・理学系研究科・教授

研究者番号：90134452

研究成果の概要(和文)：沖縄本島と周辺離島に分布し、毎年開花するオキナワスズムシソウ *S. tashiroi* (オキナワ) と沖縄本島、八重山諸島、台湾島に分布し、6年に一度一斉開花するコダチスズムシソウ *S. flexicaulis* (コダチ) の分布が重なる沖縄島本部半島に見られる推定雑種の詳細な形成プロセスを明らかにし、形成された雑種が独立種として確立する雑種分化が生じているのかどうか明らかにするため、推定両親種の分布範囲において野外調査を行い、1) 生活史、2) 外部形態、3) 訪花昆虫などを観察・比較した。また、4) 葉緑体・核DNA系統解析、5) CAPS解析を行った。この結果、推定雑種は実際の交雑により生じたもので、形態的にも遺伝的にも一様ではなく、コダチからの花粉が交配することにより、雑種第1代およびその後代が形成されており、オキナワからの花粉はほとんど貢献していないことが明らかとなった。これについて、現地調査にもとづき、一斉開花の時にのみ十分なポリネーターが活動し、その際に圧倒的に大量な花粉がコダチから提供されることが主な理由であると推定した。また、雑種後代が存在することから、推定雑種が独立種として分化する方向に向かっているとは言えないと考えた。

研究成果の概要(英文)：In the Motobu Peninsula of Okinawa Island, the present situation of *Strobilanthes tashiroi*, *S. flexicaulis* and their putative hybrids are observed and examined ecologically, morphologically and genetically. Ecologically, *S. tashiroi* and *S. flexicaulis* in the Motobu Peninsula are confirmed to be polycarpic perennial and monocarpic and periodical mass-flowering species, respectively. The putative hybrids, including F1, F2 ... and following back-cross generations are also confirmed to derive from hybridization between *S. tashiroi* and *S. flexicaulis* with the latter species as major pollen donor. As the pollinators were scarcely found in non-mass-flowering years, it is deduced that hybridization occurs only in the mass-flowering years when the flowers of *S. flexicaulis* are overwhelming so that the *S. flexicaulis* acts as major pollen donor in any level of hybridization. Isolation has not been established at least between the hybrids and *S. flexicaulis*.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,800,000  | 2,640,000 | 11,440,000 |
| 2009年度 | 3,300,000  | 990,000   | 4,290,000  |
| 2010年度 | 2,200,000  | 660,000   | 2,860,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 14,300,000 | 4,290,000 | 18,590,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：イセハナビ属、キツネノマゴ科、種間交雑、一斉開花、生活史、花粉形態、

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物では、いったん分化した種の間で交雑が生じ雑種が形成されることが広く知られている。しかし多くの場合、雑種は稔性を持たないか、もしくは両親種との間における生殖的隔離が不完全なために、雑種が種として確立される「雑種分化」の頻度はそれほど多くはないと考えられてきた。一方で、近年の遺伝学的解析技術の進歩に伴い、これまで解析が困難であった核 DNA の複数遺伝子を用いた系統解析に基づき、雑種由来の種の存在が確かめられるようになってきた。最近では、雑種分化は我々の認識以上に多く生じており、植物多様性の創出の原動力の1つになっていると考えられている。詳細な遺伝学的解析の導入により、雑種由来の種とその両親種をかなりの精度で推定することが可能となってきたが、どのような状況下において両親種の間で交雑が生じ、雑種がどのように種として確立し、維持されているのかという雑種分化に至るプロセスを含めて詳細に検証した研究は限られている。今後の雑種分化の研究においては、個体レベルでの系統学的・集団遺伝学的解析に加え、繁殖生態学的な観点も含めた総合的な解析が必要である。

キツネノマゴ科イセハナビ属 (*Strobilanthes*) およびその近縁群は世界の主に熱帯、亜熱帯に広く分布する多年草あるいは亜低木で約 400 種があり、暗い林床を大面積で覆うことが多く、熱帯・亜熱帯林の重要な構成要素である。その中には種あるいは集団が周期的 (3-16 年) に同調して開花する一回繁殖型植物があり、生活史の多様性の点でも特徴的な植物群である。

研究代表者の研究室では、主に南西諸島から台湾にかけて分布するイセハナビ属の *Parachampionella* 群の分類学的な研究を進めてきた。その過程で、沖縄本島の本部半島に、オキナワスズムシソウ *S. tashiroi* (以下オキナワ) とコダチスズムシソウ *S. flexicaulis* (以下コダチ) の交雑由来と思われる個体 (推定雑種) があることが明らかとなった。オキナワは沖縄本島と周辺離島に分布し、コダチは沖縄本島、八重山諸島、台湾島に分布しており、本部半島付近で分布が重なっている。両種は花粉形態と開花周期の違いで区別され、オキナワは球形で乳状突起のある花粉をもち、毎年開花する多年草であるのに対し、コダチは俵型で梯子状模様のある花粉をもち、6 年周期で一斉開花する 1 回繁殖型の植物である。推定雑種は、俵型で乳状突起のある花粉 (両種の間接的花粉形態) により認識され、予備的観察から、稔性を持ち、複数回繁殖を行な

う多年草であると推定された。また、葉緑体 DNA と核 DNA・ITS 領域を用いた予備的解析によると、これらの個体はオキナワを胚珠親、コダチを花粉親とする一方向性の交雑で生じた雑種であると推定された。しかし、1) 雑種性を推定する根拠となっている系統推定が十分説得力のあるレベルに達していないこと、2) 調べられた範囲が局所的であり、交雑がこれら 2 種の間でどの程度の地域的広がりを持っているかが明らかにされていないこと、3) 推定雑種が自殖繁殖能力をもつことは確認しているがどの程度の繁殖能力であるか、推定両親種との交配が生じるのかを確認していないこと、4) 雑種個体群が現在進行中の交雑によって維持されているのか、それとも雑種として確立したものなのか明らかでないこと、5) 交雑の一方向性 (母親種と父親種が限定される) が一般的であるかどうか、もしそうだとすればその理由は何かについて検討されていないこと、6) 推定雑種の根拠の 1 つとした花粉形態は、イセハナビ属ではしばしば属レベルの識別形質とされるが、中間的形態が現れることについて実験的な検証がなされていないこと、7) 外部形態変異の解析が十分ではなく、開花特性と花粉形態以外に明瞭な識別形質が発見されていないこと、など多くの問題点が未解決であった。

## 2. 研究の目的

前述の問題点をふまえ、オキナワとコダチの交雑で生じたと考えられる推定雑種の詳細な形成プロセスを明らかにし、形成された雑種が独立種として確立する雑種分化が生じているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 野外調査

推定雑種の発見された沖縄本島の本部半島を中心に、沖縄本島北部、久米島、伊平屋島、沖永良部島、徳之島、石垣島、西表島、与那国島、台湾島でサンプルを採取した。その際、花や葉の外部形態の測定、DNA 多型解析用の葉の採取、花粉観察用のさく葉標本の作成を行なった。また、生活史の比較のため、沖縄本島、石垣島、西表島、与那国島、台湾島において、コダチの開花個体数を数えるとともに、開花個体にラベルし、継続して観察を行なった。

### (2) 外部形態比較

コダチとオキナワの測定データをもとに比較を行ない、両種の新たな識別点を追求した。さらに、推定雑種をコダチやオキナワと

比較した。

### (3) 葉緑体・核 DNA 系統解析

葉緑体 DNA の *trnSG*、*trnGR*、*matK* の 3 領域合計約 3000bp と、核 DNA の *PHOT2* 遺伝子の一部約 2300bp の塩基配列を決定し、コダチとオキナワを含む *Parachampionella* 群の代表個体を用いて、系統関係を推定した。この系統推定からコダチとオキナワで分化していると予測された葉緑体 DNA の *trnSG* 領域と核 DNA の *PHOT2* 遺伝子の部分配列を、沖縄本島でサンプリングしたコダチ、オキナワ、推定雑種の合計約 400 個体について決定した。

### (4) CAPS 解析

ジーンバンクのキツネノマゴ科の配列情報をもとにプライマーを設計し、コダチとオキナワで分化した SNP をスクリーニングした。SNP が制限酵素部位と一致したものを CAPS マーカーとした。開発した CAPS マーカー 10 遺伝子座について、約 400 個体全てについて解析した。

### (5) 訪花昆虫観察

コダチ、オキナワの訪花昆虫相を明らかにするとともに、一斉開花年とそれ以外の年での訪花昆虫の種類や個体数の変動を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 生活史の比較

沖縄本島におけるコダチの開花個体数調査の結果、調査した 6 集団全てで、一斉開花が予測された 2010 年に開花個体数が最も多かった (表 1)。しかし、一斉開花年に咲く個体の割合は集団により大きく異なり、98%以上の個体が同調的に咲いた集団が 4 カ所ある一方で、残り 2 集団は一斉開花年以外の年も比較的多くの個体が咲いていた。また、開花個体のうちラベルした個体について継続観察したところ、一部の枝しか咲かなかった 4 個体を除いて、237 個体全てが枯死していた (表 1)。枯死しなかった個体も開花した枝は枯れていたことから、沖縄本島のコダチは基本的に一回繁殖型であることが確認できた。一方で、八重山諸島の 3 集団ではいずれの集団でも明確な一斉開花は見られず、ラベルした 139 個体中 9 個体が開花した翌年まで生き残り再び開花していた。さらに、台湾島の 2 集団における 2 年間の観察では、大型の個体は全て開花しており、ラベルした 37 個体中 25 個体が翌年も開花していたことから、台湾島のコダチは複数回繁殖の多年草であることが明らかとなった。これらの結果は、コダチの種内で地域的に生活史が分化していることを示している。

沖縄本島のオキナワについて、2009 年に開花していた 108 個体にラベルし、継続観察したところ、2010 年には 76 個体が生き残り、31 個体が再び開花していた。さらに、2011 年には 36 個体が生き残り、14 個体が開花していた。この結果から、オキナワは複数回繁殖の多年草であることが確かめられた。

表 1. 沖縄本島におけるコダチスズムシソウの生活史

| 集団   |       | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 |
|------|-------|------|------|------|------|
| 伊湯岳  | 開花個体  | –    | 0    | 15   | 0    |
|      | ラベル個体 | –    | –    | 15   | –    |
|      | 生存    | –    | –    | 0    | –    |
| 嘉津宇岳 | 開花個体  | 0    | 11   | 1882 | 0    |
|      | ラベル個体 | –    | 11   | 21   | –    |
|      | 生存    | –    | 0    | 0    | –    |
| 八重岳  | 開花個体  | 0    | 9    | 1043 | 1    |
|      | ラベル個体 | –    | 9    | 102  | –    |
|      | 生存    | –    | 4    | 0    | –    |
| 乙羽岳  | 開花個体  | –    | 1    | >50  | 0    |
|      | ラベル個体 | –    | –    | 18   | –    |
|      | 生存    | –    | –    | 0    | –    |
| 名護岳  | 開花個体  | 13   | 6    | 484  | 45   |
|      | ラベル個体 | 13   | 6    | 30   | –    |
|      | 生存    | 0    | 0    | 0    | –    |
| 安和   | 開花個体  | –    | 0    | 34   | 31   |
|      | ラベル個体 | –    | –    | 16   | –    |
|      | 生存    | –    | –    | 0    | –    |

### (2) 外部形態比較

外部形態の観察から、コダチとオキナワは、花粉形態の他に、苞葉の形態と二強雄蕊の長さの違いが異なっていることが予測された。そこで、苞葉の長さとの比、長い雄蕊の長さから短い雄蕊の長さを引いた値、の 2 項目について比較した。その結果、この 2 つの特徴でコダチとオキナワは識別可能であることが明らかとなった (図 1)。さらに、花粉形態から認識した推定雑種について比較したところ、推定雑種の形態はコダチとオキナワの中間的か、ややコダチに似た形態であることが明らかとなった (図 1)。また、測定した 18 形質全てを用いた主成分分析の結果も同様であった。

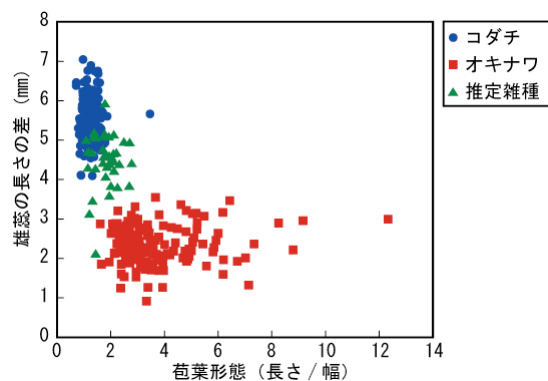


図 1. 苞葉の形態と雄蕊の長さの差の比較

### (3) 葉緑体・核 DNA 系統解析

葉緑体 DNA 3 領域の塩基配列による *Parachampionella* 群の系統推定の結果をネットワークで示した (図 2 A)。オキナワは単系統にまとまる一方で、コダチは *S. rankanensis* とハプロタイプを共有していた。また、沖縄本島や八重山諸島のコダチは台湾島のコダチのハプロタイプの1つと完全に一致していた。核 DNA *PHOT2* 遺伝子の塩基配列による系統推定の結果、葉緑体 DNA と同様、オキナワは単系統にまとまっていた (図 2 B)。台湾島のコダチには多くのハプロタイプが存在し、そのうちの最も祖先的なハプロタイプを沖縄本島や八重山諸島のコダチが持っていた。また、葉緑体 DNA と異なり、*S. rankanensis* は単系統となり、コダチとは分化していた。これらの結果から、*Parachampionella* 群では、オキナワとコダチが分化した後、台湾周辺で地域的に他の 2 種類が種分化してきたことが推定された。

花粉形態から同定したコダチ、オキナワ、推定雑種の、葉緑体および核 DNA の塩基配列を決定したところ、コダチとオキナワの間には遺伝子浸透は見られなかった。推定雑種はほとんどの個体がオキナワの葉緑体 DNA ハプロタイプを持ち、核 DNA の *PHOT2* 遺伝子はコダチの配列をホモに持つか、コダチとオキナワの配列をヘテロに持っていた。

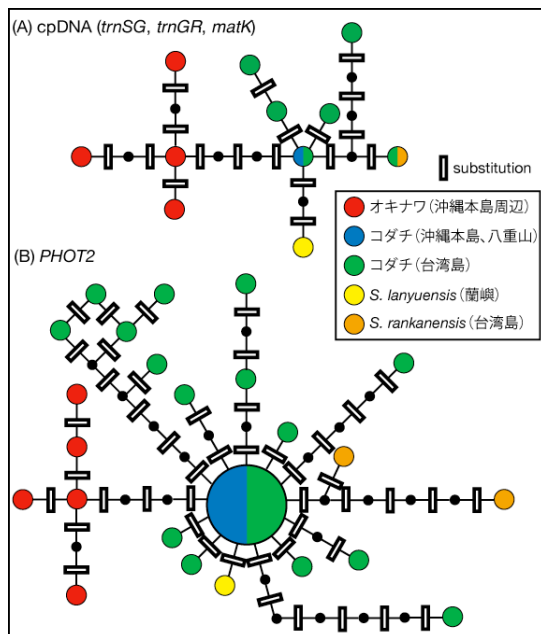


図 2. *Parachampionella* 群のネットワーク。  
(A) 葉緑体 DNA (*trnSG*, *trnGR*, *matK*)。  
(B) 核 DNA (*PHOT2*)。

### (4) CAPS 解析

CAPS マーカー 10 遺伝子座のデータと *PHOT2* の塩基配列タイプをもとにソフトウェア HINDEX (Buerkle, 2005) を用いて遺

伝的な交雑指数を算出した。推定雑種の各個体の交雑指数は、コダチとオキナワの中間的な値だったが、平均はややコダチよりの値であった。これは、外部形態比較の結果と同じ傾向であった。また、コダチとオキナワの間にわずかに遺伝子流動が存在することが明らかとなった。

さらに、ソフトウェア NewHybrids (Anderson and Thompson, 2002) を用いて、雑種クラスの割り当てテストを行なった。その結果、推定雑種には F1 雑種、F2 雑種、F1 雑種がコダチと戻し交雑した個体、雑種後代が存在する一方で、オキナワと戻し交雑した個体は存在しないことが示唆された。また、F1 雑種、F2 雑種は必ずオキナワタイプの葉緑体 DNA ハプロタイプを持つことが明らかとなった。この結果はコダチとオキナワの交雑は必ずコダチが花粉親、オキナワが胚珠親で生じていることを示している。また、コダチと戻し交雑した個体の多くはオキナワタイプの葉緑体 DNA ハプロタイプを持っていたが、一部の個体はコダチハプロタイプを持っていた。この結果は、雑種は基本的にコダチとのみ戻し交雑し、その際、コダチの花粉が雑種に運ばれるケースが多数派を占めていることを示している。

### (5) 訪花昆虫観察

コダチ、オキナワ、推定雑種の訪花昆虫として、セイヨウミツバチ、オキナワクロホウジャク、ジャコウアゲハの 3 種が記録できた。一斉開花年には 3 種全てが記録されたが、一斉開花年以外ではオキナワクロホウジャクのみが記録された。また、一斉開花年には多くのセイヨウミツバチと複数のオキナワクロホウジャクが観察されたが、一斉開花年以外では通算でオキナワクロホウジャクが 1 例観察されたのみであった。

### (6) 推定雑種の形成プロセスの推定

本研究の結果、推定雑種はコダチとオキナワの交雑起源であることが明らかとなり、その詳細な形成プロセスが解明された (図 3)。①コダチの花粉がオキナワの花に運ばれ、F1 雑種が生じる。②F1 雑種の自花受粉により F2 雑種が生じるとともに、主にコダチの花粉が F1 雑種に運ばれることにより、コダチと戻し交雑した個体が生じる。③F2 雑種の自花受粉により F3 雑種 (ここでは雑種後代と区別できない) が生じるとともに、F2 雑種がコダチと戻し交雑するなどして雑種後代が生じる。

全ての段階でコダチが主に花粉親となっていることが明らかとなり、コダチとオキナワ、コダチと雑種間には非対称な生殖隔離機構が存在することが示唆された。その候補として、一斉開花年においてコダチはオキナワ

や雑種より圧倒的に花数が多いために、訪花

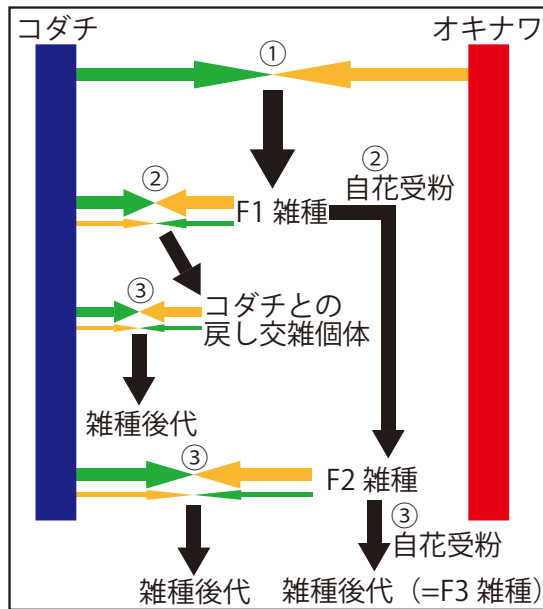


図 3. コダチとオキナワの雑種の形成プロセス。緑色矢印は雑種の個体数から推測された花粉の運ばれる方向と量。

昆虫に付着した花粉がほとんどコダチのものであるという仮説が考えられた。また、一斉開花年以外年には雑種とオキナワしか開花しないにもかかわらず、オキナワとの戻し交雑が存在しないのは、一斉開花年以外の年は、ほとんど訪花昆虫が存在しないため、ほぼ自花受粉のみで繁殖し、外交配がまれであることが要因であると推定された。これらの結果から、コダチとオキナワには生活史の違いが非対称な生殖隔離を産み出す大きな原因であることが明らかとなった。New HybridテストでF2の存在が示唆されたことから、雑種内での交配は可能と考えられる。また、雑種とオキナワはほぼ交配することはないことから、現実に強い生殖隔離が存在すると考えられる一方で、コダチとは頻繁に交配することが推定され、生殖隔離が弱いと考えられる。このことから、現状では雑種と片親（コダチ）との間で生殖隔離が成立していないため、雑種種分化に向かっているとは考えられないが、現在の訪花昆虫の中心が移入種のセイヨウミツバチであることから、今後の環境の変化などにより訪花昆虫相が変わることで親種との生殖隔離が成立し、雑種種分化に進行する可能性もある。

#### 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0件)

[学会発表] (計3件)

① Satoshi Kakishima, Jin Murata. Asymmetrical hybridization between monocarpic mass-flowering shrub and polycarpic perennial herb in *Strobilanthes*. East Asian Botany: International Symposium 2011. March 19, 2011. Tsukuba, Japan.

② 柿嶋 聡, 東馬 哲雄, 邑田 仁. 一斉開花一回繁殖型植物コダチスズムシソウと多回繁殖型植物オキナワスズムシソウの交雑現象の解析. 日本植物学会. 2010年9月19日. 春日井.

③ 柿嶋 聡, 東馬 哲雄, 邑田 仁. 生活史の異なる植物種間における非対称な交雑. 日本進化学会. 2010年8月3日. 東京.

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

邑田 仁 (MURATA JIN)

東京大学・大学院・理学系研究科・教授  
研究者番号：90134452

##### (2) 研究分担者

東馬 哲雄 (大井 哲雄) (TOMA TETSUO  
(OOI TETSUO))

東京大学・大学院・理学系研究科・助教  
研究者番号：10376527

##### (3) 連携研究者

なし