

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21570103

研究課題名(和文) 分子系統に基づくスゲ属植物の生物地理学的研究

研究課題名(英文) Phylogeographical studies of the genus *Carex* based on DNA sequences

研究代表者

星野 卓二 (HOSHINO, Takuji)

岡山理科大学・生物地球学部・教授

研究者番号：10122392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：スゲ属植物は日本の顕花植物の中で最も属内の種数が多く、200種以上が報告されている。染色体は分散型動原体を持ち、 $2n=12$ から $2n=132$ までの連続した種内異数性が見られる。本研究に用いたヒメスゲには、 $2n=18, 20, 24, 26$ の種内異数体が見られ、北海道から分布が南に移行するにしたがい染色体数が増加する傾向があり、葉緑体遺伝子でハプロタイプIとハプロタイプIIの2型に分けられることが明らかになった。また、アキイトスゲやオムギスゲは、過去、朝鮮半島から九州北部、瀬戸内地域に広く分布していたが、その後の気候変動により島嶼部や沿岸地域に隔離され、遺存的に生き残ったことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：*Carex* L. is one of the largest genera of vascular plants and has more than 200 species in Japan. *Carex* has diffuse centromeric chromosomes and a remarkable aneuploid series ranging from $n = 6$ to $n = 66$. Four aneuploids ($2n=18, 20, 24, 26$) are reported in *C. oxyandra*. The phylogeographic pattern and genetic diversity of the widespread Japanese sedge were studied based on chloroplast DNA haplotypes and chromosomal variations. The geographical distribution of intraspecific aneuploids of *C. oxyandra* corresponded well with those of the haplotypes. The results of phylogeographical studies of *C. oxyandra*, *C. kamagariensis*, and *C. laticeps* suggest that the genetic diversity and chromosomal variations in these species may have originated from contractions and expansions of geographical ranges affected by Quaternary climatic oscillations.

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：スゲ属植物 分子系統 植物系統地理 染色体数 種内異数体

1. 研究開始当初の背景

カヤツリグサ科スゲ属植物は日本で300種が報告されており、日本に生育する高等植物の中で最も属内の種数が多い。日本の北海道から沖縄まで、さらに海岸から亜高山帯まで広く分布している。また、湿原から草原や林床まで生育しており多様な環境に適応し進化した分類群である。秋山(1955)によると約半数の種は日本特産であることを報告している。また、多くの種間および種内異数体があり、この異数性はスゲ属の種分化と関係があることが報告されている。

スゲ属植物の染色体数の変異に関しては、次の3グループに分けられることが報告されている。

(1) 種内異数性が見られない。

タガネソウ類 $2n=12$ (タガネソウ、ササノハスゲ、イワヤスゲなど)、アズマスゲ $2n=16$ 、コカンスゲ $2n=26$ 、オクノカンスゲ $2n=30$ 、カンスゲ $2n=38$ など。染色体数が少ないグループ。

(2) 種内異数性が見られるが、種内異数体は広い分布域を持っている。ヒメカンスゲ $2n=32, 34, 36, 38$ 、ヒメスゲ $2n=18, 20, 24, 26$ など。

(3) 連続した種内異数性が見られ、同一集団内でも異なる染色体数を持つ。ショウジョウスゲ $2n=26\sim 33$ 、ケスゲ $2n=74\sim 78$ 、ベニイトスゲ $2n=68\sim 71$ など。

申請者は、ヒメカンスゲ、ヒメスゲ、ショウジョウスゲの種内異数体の地理的分布を明らかにした。ヒメカンスゲは $2n=32$ が瀬戸内地域と宮崎県の沿岸に、 $2n=36$ が西日本の山地の広い地域に、 $2n=34$ が近畿地方から東日本および北海道の広い地域に、 $2n=38$ は栃木県に分布していた。さらに、葉緑体遺伝子 *trnT-L-F* および *atpB-rbcL* 領域を用いたハプロタイプ解析により、ヒメカンスゲは中国地方と近畿地方を境として2系統に分かれることが明らかになった(Yano and Hoshino 未発表)。また、ヒメカンスゲに近縁なトカラカンスゲとオオシマカンスゲの葉緑体遺伝子を統合した分子系統から、ヒメカンスゲは、レフュジアと推定された地域および島嶼部で独自に分化した系統があることがわかり、その地理的分化は、第四紀の氷期と間氷期の気候変動による影響を反映していることが示唆された。このように、スゲ属植物の系統地理学的解析には葉緑体遺伝子を用いた分子系統解析が有効であることが明らかになった。

スゲ属植物において分子系統に基づく生物地理学的解析は、国外では Waterway et al. (2008 in press) の北米産の例があるのみである。しかし、Waterway らの研究はスゲ属全体の種を生育環境と分子系統を比較したも

のであり、近縁種や種内異数体の生物地理学的な解析はまだない。

スゲ属植物の分子系統学的研究に関しては、平成20年度までに日本産スゲ属植物の160種の核リボゾーム遺伝子 ITS (Internal Transcribed Spacer)、ETS (External Transcribed Spacer) 領域の塩基配列を決定している。さらに、110種の葉緑体遺伝子 *trnT-L-F* 領域の塩基配列を決定している。また、*trnT-L-F*、*atpB-rbcL*、*rpL16*、*rpS16* 領域に関しては、種内異数体間で塩基配列に多型が見られることを発見している。

本研究では、種内異数体の分布に地理的なクラインが見られる、前記(2)のグループのヒメカンスゲとヒメスゲの系統地理学的な解析を行なった。また、近縁種間で連続した異数性が見られるカンスゲ類やホンモンジスゲ類の系統地理学的な解析を行なった。

2. 研究の目的

ヒメスゲの種内異数体の塩基配列の多型を明らかにし、種内異数体のハプロタイプと地理的分布を比較する。また、カンスゲ類やホンモンジスゲ類の核遺伝子と葉緑体遺伝子による系統解析から、第四紀の氷期と間氷期の気候変動によりスゲ属植物にどのような地理的分化が生じたかを明らかにする。これらの結果をもとに、異数性を伴う地理的分化に関する新しいモデルを提唱する。様々な生育環境に多様に分化したスゲ属植物を用いて、分子系統とその地理的分布を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) スゲ属植物の採集

本研究に使用するヒメスゲ、カンスゲ類、ホンモンジスゲ類を日本各地から研究分担者の協力を得て採集する。これらのスゲ属植物の採集は平成21年度から平成23年度まで3年間に渡って行なった。

(2) DNAの抽出および解析

抽出：生植物 0.1g または乾燥標本 0.03g から Amersham Biosciences Co. の Nucleon Phytopure plant and fungal extraction's kit を用いて DNA を抽出する。

遺伝子の塩基配列の決定：GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Co.) を用いて、核リボゾーム遺伝子 ITS、ETS および葉緑体遺伝子 *trnT-L-F*、*atpB-rbcL*、*rpL16 intron*、*rpS16* 領域を増幅する。PCR産物を精製後、ABI 3130 Genetic Analyzer によってダイレクトシーケンスを行い塩基配列を決定した。集団間で多型が少ない分類群があれば、公開されている葉緑体遺伝子をもとに新しいプライマーを作成し、上記以外の遺伝子の塩基配列を解析した。分子系統学的解析：核遺伝子の塩基配列の比較は CLUSTAL W

を用いてマルチプルアライメント解析を行った。得られたデータマトリックスから MEGA version 2.1 を用いて系統樹を作成する。系統解析には、申請者が解析済みのデータも加える。

葉緑体遺伝子は、アライメントを行った塩基配列を比較し、塩基配列中の何ヶ所が異なるのかを調べ、ハプロタイプを決定した。ハプロタイプ間の系統関係を調べるため、最節約法によって系統樹を構築した。

(3) 染色体の解析

根端の採取および前処理：根端を 0.002M 8-オキシキノリンで 16、5 時間処理する。

固定と染色：根端を固定し、フクシン亜硫酸液に根端を浸し、室温で 1 時間染色する。その後、2%ペクチナーゼ、2%セルラーゼの酵素混合液で 37、1 時間処理する。

プレパラート作成と顕微鏡写真撮影：1% アセトオルセインを加え押しつぶし法によりプレパラートを作成する。中期染色体の画像を、デジタルカメラを用いて取り込み、核型を解析する。

4. 研究成果

(1) ヒメスゲの系統地理学的研究

ヒメスゲには、 $2n=18, 20, 24, 26$ の種内異数体が見られ、北海道から分布が南に移行するにしたがい染色体数が増加する傾向があり、葉緑体遺伝子でハプロタイプ I とハプロタイプ II の 2 型に分けられることが明らかになった。本州では、染色体数 $2n=18$ と 20 のみが報告されていたが、広島県の深入山で $2n=24$ の九州地方と同一の染色体数が観察された。また、四国地方には $2n=24$ のみが報告されていたが、 $2n=20$ の異数体を高知県白髪山と徳島県次郎笈で確認した。葉緑体遺伝子の解析から、北方由来であるヒメスゲは中国地方から九州地方と四国地方から九州地方の 2 つのルートで分布を拡大したことが明らかになった。また、染色体数は、 $2n=20$ から $2n=24$ へ異数的に増加したことが明らかになった。

(2) アキイトスゲの系統地理学的研究

西日本および韓国で採集したアキイトスゲの葉緑体遺伝子を用いてハプロタイプの解析を行った。ヌカスゲ節のアキイトスゲは中国地方の瀬戸内沿岸地域や島嶼部に隔離分布する種であり、長崎県の対馬および佐賀県にも隔離分布することが明らかにされている。韓国に関しては京都大学の標本庫に木浦より採集されたものが 1 点のみ保管されているのみで、アキイトスゲの韓国での分布は不明であった。韓国の木浦周辺を調査し生育地の確認と葉緑体遺伝子の解析を行った。韓国の全羅南道白星山と佛甲山の 2 場所で

アキイトスゲの分布を確認した。葉緑体遺伝子 *trnT-L-F*、*rpL16*、*rpS16*、*atpB-rbcL* の 4 領域を解析した。アキイトスゲは韓国全羅南道白星山では日本と異なるハプロタイプが見られた。日本の個体は、瀬戸内島嶼部や沿岸地域で 3 種類のハプロタイプが、佐賀県唐津市と長崎県対馬の沿岸地域でそれぞれ 1 種類の合計 5 種類のハプロタイプが存在することを明らかにした。今回、韓国の個体で新しいハプロタイプが見られ、さらに、それぞれのハプロタイプは広い分布域を持っており、同一集団内では異なるハプロタイプは見られなかった。これらの結果から、アキイトスゲは過去、朝鮮半島から九州北部、瀬戸内地域に広く分布していたが、その後の気候変動により島嶼部や沿岸地域に隔離され、遺存的に生き残ったと考えられる。

(3) オオムギスゲの葉緑体遺伝子の解析

西日本と韓国で採集したオオムギスゲの葉緑体遺伝子を用いてハプロタイプの解析を行った。オオムギスゲは岡山県、広島県および香川県の小豆島に分布し、韓国にも生育するとされている。韓国の木浦周辺でオオムギスゲの生育地の確認と葉緑体遺伝子の解析を行った。全羅南道白星山、三岩峰、無等山の 3 場所で生育を確認した。採集したそれぞれの種における、葉緑体遺伝子 *trnT-L-F*、*rpL16*、*rpS16*、*atpB-rbcL* の 4 領域を解析した。

西日本産のオオムギスゲの葉緑体遺伝子に違いは認められなかった。また、韓国のオオムギスゲも、調べた遺伝子に関しては日本産と違いが認められなかった

(4) ヌカスゲ節における系統地理学的研究

ヌカスゲ節のオクノカンスゲ亜節とホンモンジスゲ類に属する 35 分類群の核リボソーム遺伝子 ITS と ETS-1f 領域を解析し、分子系統と染色体の変異との相関関係を調べた。スゲ属植物の分子系統に関する先行研究から、ヌカスゲ節は大きく 3 つのクレードに分けられることが明らかになっている。その 3 クレードの一つは、オクノカンスゲ亜節とホンモンジスゲ亜節であった。オクノカンスゲ亜節に属する分類群の染色体数は $2n=30 \sim 44$ に変異し、染色体も大型であった。一方、ホンモンジスゲ亜節に属する分類群の染色体数は $2n=56 \sim 80$ が観察され、染色体の大きさは、オクノカンスゲ亜節のものの半分以下であった。ヌカスゲ節の分子系統樹から、オクノカンスゲ亜節とホンモンジスゲ亜節は、それぞれ別のサブクレードに分かれ、染色体数や核型と一致していることが明らかになった。スゲ属植物の染色体は、異数的に染色体が増加するだけでなく、倍数性による染色

体の増加と、それに伴う染色体の小型化による分化もあることが明らかになった。

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12件)

Yano O., H. Ikeda, X.F. Jin, T. Hoshino, Phylogeny and chromosomal variations in East Asian *Carex*, Siderostictae group (Cyperaceae), based on DNA sequences and cytological data, *Journal of Plant Research*, 127, 99-107, 2014, 査読有

Masaki T., T. Hoshino, Kyong-Sook Chung and Hyoung-Tak Im, A new record of *Carex*, *C. taihokuensis* Hayata (Cyperaceae) from Korea, *Korean J. Pl. Taxon.*, 44, 1-3, 2014, 査読有

Yano O., T. Katsuyama, H. Ikeda, M. F. Watson & K. R. Rajbahndari, Nomenclature and lectotypification of *Carex henryi* (Cyperaceae) with a new record from Nepal., *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 63, 143-148, 2013, 査読有

高橋英樹, 北から来た植物、モーリー、26, 22-25, 2012, 査読無

正木智美・星野卓二・任炯卓、韓国南西部全羅南道および光州市のスゲ属植物、莎草研究、17, 35-44, 2011, 査読無

Katsuyama T., A New Species of the Genus *Carex* (Cyperaceae) from Amami-ohshima Island, the Ryukyus, Southern Japan. *Journal of Japanese Botany*, 86, 193-196, 2011, 査読有

Yano, O., Ikeda, H., Watson, M. F. & Rajibhandari, K. R., Dauciform roots in *Carex atrofusca* Schkuhr subsp. minor (Boott) T. Koyama (Cyperaceae) from the Manaslu Himalaya, Central Nepal. *Journal of Japanese Botany*, 86, 120-123, 2011, 査読有

Yano O., H. Ikeda, and T. Hoshino, Phylogeography of the Japanese common sedge, *Carex conica* complex (Cyperaceae), based on chloroplast DNA sequence data and chromosomal variation, *American Journal of Botany*, 97, 1365-1376, 2010, 査読有

Yano O., H. Ikeda, and T. Hoshino, Cytological study of *Carex omurae* and *C. phaeodon* (Cyperaceae), *Journal of Japanese*

Botany, 85, 370-373, 2010, 査読有

Yano O., H. Ikeda, Colin A. Pendry and Keshab R. Rajbhandari, Cytological study of Cyperaceae in the Nepal Himalaya II. Chromosome counts of four species collected from Far West Nepal, *Journal of Japanese Botany*, 85, 157-165, 2010, 査読有

正木智美・星野卓二、日本産スゲ属植物に 'dauciform root' を見出す植物研究雑誌、84, 184-185, 2009, 査読有

勝山輝男・織田二郎、コウヤハリスゲの屋久島産新変種、コケハリガネスゲ、植物研究雑誌、84, 191-193, 2009, 査読有

[学会発表](計8件)

Hoshino T., O. Yano, H. Ikeda, Xiao-Feng Jin, Phylogeny of East Asian Primitive *Carex* Section Siderostictae, Based on DNA Sequences and Cytological Data, 5th International Conference on Comparative Biology of Monocotyledons, 2013年7月11日, New York, Fordham Univ.

Marcia J. Waterway, Takuji Hoshino, Tomomi Masaki, Xiao-Feng Jin, Shuren Zhang, Roert Naczi, Wenli Ji, Evolution and Diversification in Primarily Forest Clades of *Carex* (Cyperaceae) from eastern north America and eastern Asia, 5th International Conference on Comparative Biology of Monocotyledons, 2013年7月11日, New York, Fordham Univ.

Hoshino T., Masaki T. and Yano O., Phylogeographical and cytological studies of eastern Asian *Carex*., International Botanical Congress 2011, 2011年7月28日, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Australia)

Waterway M., Bruhl J., Wilson K., Lange P., Hoshino T., Masaki T. and Ji W., Phylogeny and biogeographic patterns in Asian and Australasian sedges in tribe Cariceae. International Botanical Congress 2011, 2011年7月28日, Melbourne Convention and Exhibition Centre (Australia)

正木智美・星野卓二、スゲ属ホンモンジスゲ類4分類群の系統地理学的研究、生物系3学会中国四国大会、2010年5月、山口

星野卓二・菅原正夫・渡部浩一、葉緑体遺

伝子に基づくスゲ属植物ヒメスゲの種内異数体の系統地理学的研究、染色体学会、2009年11月13日、島根

星野卓二・正木智美・勝山輝男・Marcia J. Waterway、日本産スゲ属植物の分子系統と染色体の進化、日本植物学会、2009年9月19日、山形

渡部浩一・星野卓二、スゲ属植物アキトスゲの分布と系統地理学的研究、日本植物学会、2009年9月19日、山形

〔図書〕(計3件)

星野卓二・正木智美、日本カヤツリグサ科植物図譜、平凡社、778pp.2011

星野卓二・正木智美、日本の固有植物、(加藤雅啓・海老原淳編 分担執筆)、東海大学出版会、503pp.2011

加藤ゆき恵・高橋英樹、秋山茂雄「極東亜産スゲ属植物」図版標本目録、北海道大学総合博物館、122pp.2009

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://hos0.big.ous.ac.jp/~hoshino/Labo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 卓二(HOSHINO, Takuji)

岡山理科大学・生物地球学部・教授

研究者番号：10122392

(2)研究分担者

高橋 英樹(TAKAHASHI, Hideki)

北海道大学・総合博物館・教授

研究者番号：70142700

池田 博(IKEDA, Hiroshi)

東京大学・総合研究博物館・准教授

研究者番号：30299177

勝山 輝男(KATUSYAMA, Teruo)

神奈川県立生命の星・地球博物館・

学芸部長

研究者番号：20214356

(3)連携研究者

無し