

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770083

研究課題名(和文) 日本産シダ植物種形成ネットワークの包括的解明

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of speciation networks in Japanese ferns and lycophytes

## 研究代表者

海老原 淳 (EBIHARA, Atsushi)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号：20435738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：約700種ある日本産シダ植物の中には、交雑と倍数化が絡む「網状進化」を起こしている可能性の高い種群が多い。コケシノブ科、ヒメシダ科、ホングウシダ科、コバノイシカグマ科、イノモトソウ科、ナヨシダ科、チャセンシダ科、オシダ科から計20群を解析対象として選定し、倍数性解析と分子系統解析に基づいてそれらの生物学的実体を明らかにした。れた。現在の種の分類が実体と対応していないものについては、分類・学名を見直した。

研究成果の概要(英文)：A number of species complexes possibly originated from "reticulate evolution" which involves hybridizations and polyploidizations are present in the fern and lycophyte flora of Japan. We clarified biological entities of 20 complexes selected from Hymenophyllaceae, Thelypteridaceae, Lindsaeaceae, Dennstaedtiaceae, Pteridaceae, Cystopteridaceae, Aspleniaceae and Dryopteridaceae by ploidy and molecular phylogenetic analyses. Taxonomic and/or nomenclatural revisions were made for the complexes whose names did not correspond to their biological entities.

研究分野：植物分類学

キーワード：シダ植物 種分化 網状進化

#### 1. 研究開始当初の背景

約 700 種類ある日本産シダ植物は、分類・分布・染色体数等の研究が進んでおり、世界的に見てもこれほど豊富な情報を持つ生物群はあまり存在しない。さらに申請者は、日本産種の 95%を用いて葉緑体遺伝子による DNA バーコーディングの試みを行っており(業績 3) 遺伝子レベルでの情報収集も、他の生物群に比べれば著しく進んでいる。上記の研究は、いずれも「種(species)」を単位として用いて進められてきた。ところが、シダ植物の生物学的な特性を考慮した時、「種」は必ずしも適した単位ではない。現在最も広く用いられている種概念は生物学的種概念であるが、現在のシダ植物の分類では生物学的種概念に適合しないような「種」を多数認めてしまっている。シダ植物は種子植物に比べると、倍数体の割合が高いことが知られる。同一種に同定されているシダ植物では種内倍数性が発見されている例が多いが、例えば同種に同定される 2 倍体と 4 倍体を交配してできる F1 は奇数倍数体(3 倍体)であるため不稔になり、生物学的種概念に従うと両親の 2 倍体と 4 倍体を同種として扱うことはできない。シダ植物の倍数体の多くは異質倍数体であることが知られており、異種間の交雑と倍数化に起源したと考えられている。このような異質倍数体は、同じゲノム構成を持つ個体が複数回独立に起源している例が知られており、父親と母親の組み合わせが逆になった個体が見つかることも珍しくない。それらを「同一種」として一括りにしてしまうことは、実体を解明していく精神には矛盾する。さらにシダ植物を特徴づけるのは、高い割合で存在する「無配生殖種」である。有性生殖を行わないこれらの植物には、そもそも生物学的種概念を当てはめることは不可能であるので、現在定義されている「無配生殖種」は「形態的に良く似た特徴を持つ個体の集合」ということになる。こうした集合が遺伝的に均質である保証はなく、実際に無配生殖種では、1つの「種」内に、明らかに異なるゲノムの組み合わせを持つ個体が含まれることが判明している。

#### 2. 研究の目的

シダ植物はこれまで「種」という概念で実体が認識されてきたが、実際には1つの「種」が異なる複数の実体(=異なる生物学的種に由来するゲノムの組み合わせ)を包含している例が多いことが判明しつつある。本研究では、日本産シダ植物全体を対象に、「ゲノム構成(組み合わせ)」という観点から真の多様性を明らかにすることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

DNA バーコーディングの手法を拡張した遺伝子解析を行う。それらに倍数性の情報を加味した上で、各個体のルーツとなった 2 倍体種(のゲノム)を塩基配列から特定する。

(1) マーカー：複数核 DNA マーカーを新規開発して用いる。

(2) サンプル数：「種」内変異が飽和に近づくまで個体数を追加する。標本庫に収蔵されている標本の情報も可能な限り活用して、サンプル数を最大限増加させる。

(3) 倍数性：フローサイトメーターの利用。

#### 4. 研究成果

日本産シダ植物全体の中で、特に日本とその周辺地域で多様化を遂げ、形態に基づく種の同定が難しい複数の群について、その生物学的実体解明を行った。本研究期間中に主な研究対象として選択した群として、コケシノブ科(アオホラゴケ属、ハイホラゴケ属)、ヒメシダ科(ハリガネワラビ類、ニッコウシダ類、ハシゴシダ類、ミゾシダモドキ類、ミゾシダ類、ゲジゲジシダ類、コウモリシダ類)、ホングウシダ科(ホングウシダ属、エダウチホングウシダ属、ホラシノブ属)、コバノイシカグマ科(フジシダ属)、イノモトソウ科(イノモトソウ属ハチジョウシダ類、シシラン属)、ナヨシダ科(ウスヒメワラビ属)チャセンシダ科(チャセンシダ属)、オシダ科オシダ属(特にイワヘゴ類、イタチシダ類)、オシダ科ヤブソテツ属が挙げられ、分類学的に未解決の問題を含む群の多くをカバーすることができた。これらの種群について、標本庫に収められた標本を用いた形態・孢子形態と稔性の検討、野外現地調査による生材料の収集、染色体観察またはフローサイトメーターの使用による倍数性の判別、葉緑体 DNA マーカーと核 DNA マーカーを用いた分子系統解析を行い、それらの結果を組み合わせ、生物学的実体を総合的に考察した。新たな実体が認められた群については、分類学的な見直しを行い、新規分類群の記録・記載や、学名の見直しを発表した。

得られた成果のうち、学会発表あるいは論文として公表済みの具体的な成果を以下に挙げる。

##### (1) ヒメシダ科ハリガネワラビ類

日本、特に本州産のハリガネワラビ類については、Nakato et al. (2004)によって細胞分類学的に再検討が行われ、2 倍体のイワハリガネワラビと 4 倍体のハリガネワラビが認められた。ただし、3 倍体雑種(アイハリガネワラビ)及び葉柄が褐色を帯びないハリガネワラビの品種(アオハリガネワラビ)が存在することによって、本群植物の確実な同定のためには、孢子形態の観察が不可欠である。この他、八重山諸島西表島には、毛の量が多いタイワンハシゴシダが知られているが、台湾では本種をハリガネワラビの異名とする見解があるなど、種の認識がグローバルに統一されるには至っていない。本研究では、台湾や西表島産の個体を含めたハリガネワラビ類植物において、孢子形態の観察、染色体

観察による倍数性の解析、核 DNA マーカー (PgiC, gapCp)・葉緑体 DNA マーカー (rbcL) による系統解析を行うと共に、1700 点以上のさく葉標本を用いた孢子形態観察に基づいて国内における各分類群の詳細な分布状況を解明することを試みた。その結果、西表島と台湾のタイワンハシゴシダは 2 倍体であり、系統的にはハリガネワラビから明瞭に区別できることが明らかになった。台湾にはハリガネワラビに酷似した外部形態を示す個体があるものの、真の同種は見出せず、タイワンハシゴシダのみが分布する可能性が高い。また、日本国内での各分類群の分布状況が把握され、雑種アイハリガネワラビは少なくとも 29 都府県にまたがって広く分布することが明らかになった。

#### (2) ヒメシダ科ニッコウシダ類

ニッコウシダ *Thelypteris nipponica* は、北海道～本州の冷温帯域で湿原周辺や林床などに見られるシダである。ニッコウシダの種内分類群としてはメニッコウシダ (ケヒメシダ) var. *borealis* が区別されることがある。両者は典型的なものでは葉形などに大きな違いが見られるが、時として区別に困る個体も出現する。また、同属のハリガネワラビ類と雑種を形成することが報告されているが、十分な検証は行われていない。

本研究では各地から収集した約 25 個体について、核 DNA マーカー (gapCp) による解析を行うとともに、一部個体については体細胞染色体数、孢子の観察を行った。得られた結果から以下のような実体が考察された。

- ・ニッコウシダは 2 倍体 ( $2n = 64$ )・メニッコウシダは 4 倍体 ( $2n = 126$ )
- ・メニッコウシダはニッコウシダとイワハリガネワラビ (2 倍体,  $2n = 62$ ) の交雑に起源する複 2 倍体種
- ・メニッコウシダはニッコウシダ、イワハリガネワラビとそれぞれ再度交雑して 3 倍体雑種を形成している
- ・メニッコウシダとハリガネワラビ (4 倍体) の雑種が存在する

交雑と複 2 倍体形成の結果、ニッコウシダからイワハリガネワラビへと形態変異が連続する状態になっており、同定を困難にしている原因と考えられる。従来これらの識別に用いられてきた形質 (最下羽片の縮小の程度、葉の軸上に生じる毛の量、包膜の毛・大きさ) は、同定の参考としては利用可能であるが、明瞭な識別が難しい場合も多い。一方、染色体数の算定は、両者で基本数が異なるために、この群の同定に有効であることが示唆された。

#### (3) ヒメシダ科ハシゴシダ類

ヒメシダ科ハシゴシダ類はアジアの温帯～亜熱帯を中心に分布し、日本にはハシゴシダ・コハシゴシダ・ヒメハシゴシダ・リュウキュウハシゴシダの 4 種が認められている。

しかし、同定に悩むような中間型がしばしば出現し、奄美大島産コハシゴシダにおいては様々な染色体数を持つ個体が報告されている。

本研究では、日本産ハシゴシダ類の本質的な理解を目指して、各地の個体の倍数性と構成ゲノムを染色体観察と核 DNA マーカーを用いた解析を行った。1) 本州～屋久島にかけて知られる 4 倍体ヒメハシゴシダは、2 倍体ヒメハシゴシダと未知種との交雑に起源する複 2 倍体種の可能性が高い; 2) 四国・九州において見出された 5 倍性の不稔性個体は、4 倍体ヒメハシゴシダ × 6 倍体コハシゴシダの雑種と考えられる; 3) ハシゴシダは異質 4 倍体の可能性が高い。

なお、形態的にコハシゴシダと同定される植物には、多くの遺伝的変異が見出されたが、その生物学的実体を議論するためにはさらに広範な地域からのサンプリングが必要である。同様に 4 倍性の不稔性個体の起源についても、慎重な検討を要する。

#### (4) ヒメシダ科ミゾシダモドキ類

ミゾシダモドキ類 (*Cyclogramma*) は、包膜を欠く円形の孢子囊群・単条の小脈・羽辺基部の通気孔などの形質で特徴づけられる。日本にはミゾシダモドキ *C. omeiensis* が関東以南に、トサノミゾシダモドキ *C. flexilis* が高知県の限られた地点にそれぞれ知られているが、いずれも 8 倍体であることが報告されている。

高次倍数体である日本産 2 種の起源を解明するためには、中国産の近縁種との比較が欠かせない。中国産の生材料が得られなかったため、さく葉標本の孢子形態と DNA マーカーを用いた解析による比較を試みた。離れた 2 地点で採取した日本産ミゾシダモドキにおいて  $2n = 288$  をはじめて正確にカウントし、 $x = 36$  の 8 倍体であることを確認した。この基本数は高知県のトサノミゾシダモドキの  $x = 35$  とは明確に異なっている。中国産標本で計測した孢子サイズは、日本産とほぼ同じ個体の他、低次倍数体の存在を示唆する小型の孢子の個体も確認された。また異常型孢子を持つ不稔性個体も見出された。葉緑体 rbcL 遺伝子および核 PgiC イントロンに基づく系統樹では、*C. auriculata* が最基部にくる結果で一致した。しかしその他の本属の植物同士の関係は、形態に基づく同定と不一致が多く、日本産の 8 倍体は、中国にある多様な系統間での網状進化の結果形成されたものであることが強く示唆された。

#### (5) チャセンシダ科チャセンシダ属

中国 - ヒマラヤ地域からアフリカにかけて広域分布する *Asplenium varians* (和名新称: イノウエトラノオ) が、新たに日本で発見された。今回発見された宮崎県の 2 産地は、直線距離で互いに約 50km 離れている。この群では網状進化に対応して種が定義されて

おり、慎重な同定が求められたため、葉緑体 rbcL 遺伝子、染色体数及び形態形質を解析した。イノウエトラノオの周辺において2新雑種(コバノイノウエトラノオ=コバノヒノキシダ×イノウエトラノオ、イノウエイワトラノオ=イノウエトラノオ×イワトラノオ)も生育が確認された。

いわゆる「網状進化」による種形成ネットワークが存在している種群においては、分類群の認識に不統一や混乱が見られる例が多い。しかし、本研究で、より正確な実体の認識を解明し、さらに分類学的な立場からの再編が行われたことによって、生物学的に意味のある分類の単位が広く認識されるようになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Ebihara, A., N. Nakato and S. Matsumoto, 2015. Updates of Taxonomic Treatments for Ferns of Japan 1. Botrychium, Osmolindsaea and Pteris. Bull. Nat. Mus. Nat. Sci. B 41: 15-24. 査読有

Ebihara, A., N. Nakato, Y. Saito, T. Oka and T. Minamitani, 2014. New records of *Asplenium varians* (Aspleniaceae) and two new hybrids in Japan. Acta Phytotax. Geobot. 65: 53-65. 査読有

Ebihara, A., N. Nakato, S. Matsumoto, Y.-S. Chao and L.-Y. Kuo, 2014. Cytotaxonomic studies on thirteen ferns of Taiwan. Bull. Nat. Mus. Nat. Sci. B 40: 19-28. 査読有

Hori, K., A. Tono, K. Fujimoto, J. Kato, A. Ebihara, Y. Watano and N. Murakami, 2014. J. Plant Res. 126: 661-684. 査読有

Chen, C.-W., A. Ebihara, W.-L. Chiou and C.-W. Li, 2014. *Haplopteris yakushimensis* (Pteridaceae, Vittarioideae), a new species from Yakushima Island, Japan. Phytotaxa 156: 229-234. 査読有

Ebihara, A. and N. Nakato, 2013. Distribution of the *Thelypteris japonica* Complex (Thelypteridaceae) in Japan. Bull. Natn. Mus. Nat. Sci. B, 39: 61-85. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

海老原 淳・中藤成実, 日本産ハシゴシダ類の倍数性と分子系統, 日本植物学会第78回大会, 2014年9月12日~14日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

Ebihara, A., The Japanese endemic *Monachosorum arakii*

(*Dennstaedtiaceae*) is a relict hybrid, The 6th Asian Fern Symposium, 2014年8月26日~28日, インドネシア、バリ植物園

海老原 淳・中藤成実・宇野邦彦, 日本産ニッコウシダ類(ヒメシダ科)の生物学的実体, 日本植物分類学会第13回大会, 2014年3月20日~23日, 熊本大学(熊本県・熊本市)

堀清鷹・海老原 淳・中藤成実・村上哲明, イタチシダ類の新しい2倍体有性生殖種 *Motitachisida Dryopteris protobisstiana* (仮称), 日本植物分類学会第13回大会, 2014年3月20日~23日, 熊本大学(熊本県・熊本市)

海老原 淳・中藤成実, 雑種が優占する日本産シダ類とその要因, 日本植物学会第77回大会, 2013年9月13日~15日, 北海道大学(北海道・札幌市)

海老原 淳・中藤成実, 日本産の及び台湾産ハリガネワラビ類(ヒメシダ科)の再検討, 日本植物分類学会第12回大会, 2013年3月14日~17日, 千葉大学(千葉県・千葉市)

堀清鷹・戸野晶喬・富士本和人・海老原 淳・綿野泰行・村上哲明, DNA情報に基づく日本産イタチシダ複合体 *Dryopteris varia complex* の分類学的再検討, 日本植物分類学会第12回大会, 2013年3月14日~17日, 千葉大学(千葉県・千葉市)

海老原 淳・中藤成実, 高次倍数性を示す日本産ミゾシダモドキ属(ヒメシダ科)2種の起源, 日本植物学会第76回大会, 2012年9月15日~17日, 兵庫県立大学 姫路書写キャンパス(兵庫県・姫路市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

海老原 淳 (EBIHARA, Atsushi)

独立行政法人 国立科学博物館・植物研究部・研究主幹

研究者番号: 20435738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし