

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18570089

研究課題名 (和文) ミヤマノコギリシダ複合体における浸透性交雑の解析

研究課題名 (英文) Introgressive hybridizations within the *Diplazium mettenianum* complex

研究代表者

高宮 正之 (TAKAMIYA MASAYUKI)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

70179555

研究成果の概要：

屋久島のミヤマノコギリシダ複合体 (ミヤマノコギリシダ、ホソバノコギリシダ、オオバミヤマノコギリシダ、ヒロハミヤマノコギリシダの4種とそれらの推定雑種) 集団について、外部形態、体細胞染色体数、減数分裂の挙動、孢子稔性、核と葉緑体遺伝子を用いた分子遺伝学的分析を行い、雑種形成と種分化について解析した。屋久島では、これら4種間で複雑な雑種形成や戻し交雑が繰り返されていることがわかった。これらの結果、シダ植物における初めての例となる倍数体複合体の浸透性交雑を実証し、複雑なミヤマノコギリシダ複合体の形態変異の一因を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	480,000	4,080,000

研究分野：植物系統分類学

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：シダ植物、雑種、種分化、浸透性交雑

1. 研究開始当初の背景

浸透性交雑は多くの植物で知られているが、シダ植物での研究例は極めて少ない。世界的に見ても10種は無く、分子遺伝的マーカーを用いた解析例はアメリカのイノデ属と私たちが見出した日本のカナワラビ属での2例しかない。これらは何れも二倍体であった。シダ植物には倍数体が多く、今回の対象は四倍体からなる複合体で、少なくとも3種間で複雑に交雑が起きていると予想され、世界的にも例が無かった。

これまでにシダ植物にはたくさんの推定自然雑種が知られていて、雑種形成がシダ植物の種分化において重要な役割を担っている。しかし、ほとんどの場合、雑種はF₁止まりで、雑種からの後代は生じないと考えられてきた。申請者はこれまで日本産のノコギリシダ属 *Diplazium* について細胞学的・分子遺伝学的・分類学的研究を進めてきた。その結果、新種・新亜種・新雑種など20分類群程度がまだ日本にあることが明らかとなったが、ノコギリシダ属でもこれまで検証された

雑種は全てF₁だった。ノコギリシダ属の1グループであるミヤマノコギリシダ複合体は、従来分類が極めて困難な分類群であったが、私たちの詳細な研究の結果、従来2種とされるものの中は5種（ミヤマノコギリシダ、ホソバノコギリシダ、ウスバミヤマノコギリシダ、ヒロハミヤマノコギリシダ、新種記載したオオバミヤマノコギリシダ）とそれらの間の複雑な雑種から構成されていることが判明した。また、本複合体の各種は、複合体外の各種と様々な雑種を形成し、ノコギリシダ属の中で中心的役割をはたしていることも判明した。

屋久島はミヤマノコギリシダ複合体のウスバミヤマノコギリシダ以外の4種全てが生育する唯一の場所である。その後、ミヤマノコギリシダ複合体の調査を続ける過程で、屋久島の集団には単純な中間型ではない形態が多数得られる集団があった。これより本複合体種間において様々な程度の稔性を持つ雑種が生じている可能性が考えられた。これまでシダ植物において浸透性交雑が知られているのはほんの僅かしかなく、四倍体種間では世界的にも例が無い。

本研究は、ミヤマノコギリシダ複合体をさらに詳細に解析するだけでなく、シダ植物では初めての例となる複数種が絡んだ浸透性交雑を、細胞学的・形態学的、分子遺伝学的に詳細に解明することで、シダ植物の種分化におけるまったく新しい事例となる。

2. 研究の目的

本研究では、屋久島集団における四倍体シダ植物のミヤマノコギリシダ *Diplazium mettenianum* 複合体において生じていると考えられる浸透性交雑を、細胞学、分子遺伝学などの点から明らかにすることを目的とする。具体的には、1集団あたり250個体程度について、核マーカーと葉緑体マーカーとの遺伝的マーカー及び形態の分析を行い、代表的な個体について体細胞及び減数分裂の染色体解析、孢子稔性を調査する。これらより、シダ植物における初めての例となる倍数体複合体の浸透性交雑を実証し、複雑なミヤマノコギリシダ複合体の形態変異の一因を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 調査と個体マーク

鹿児島県屋久町小瀬田愛子岳林道付近のミヤマノコギリシダ複合体集団について、調査した。外部形態、孢子稔性、核と葉緑体遺伝子を用いた分子遺伝学的分析によって雑種形成について解析した。ロープを地面に張り、ロープの両側1m以内をラインランゼクトした250個体について、全ての個体の個体マークを行い、3年間継続調査を行えるよ

うにした。本研究では計6回調査を行った。

(2) 外部形態と孢子稔性調査

全ての個体から葉を採集して乾燥標本とした。完成標本から孢子を採取し、顕微鏡下で各個体当たり500個の孢子について、正常形態の割合を調べ、孢子稔性を求めた。この調査は、マークした同一の株から2年間別々に標本を採集し比較検証した。

(3) 体細胞染色体及び減数分裂の調査

持ち帰って栽培管理した様々な形態の20個体について、体細胞染色体を算定した。また、現地で若い孢子囊群をつけた葉を固定し、減数分裂の観察を行った。

(4) 葉緑体分子マーカーを用いたPCR-SSCP分析

現地でシリカゲルに入れ持ち帰った乾燥材量を用い、葉緑体DNAの*psbC~trnS*(UGA)、*trnW*(CCA) ~ *trnP*(UGG)、*trnL*(UAA) ~ *trnF*(GAA)の3遺伝子間領域でPCR-SSCP分析を行った。

(5) アロザイム多型分析

TPI, PGI, AATの3酵素4遺伝子座を用いたアロザイム多型分析を行った。

4. 研究成果

(1) 外部形態と孢子の形状

形態からはミヤマノコギリシダ（以下ミヤマ）、ホソバノコギリシダ（ホソバ）、オオバミヤマノコギリシダ（オオバ）、ヒロハミヤマノコギリシダ（ヒロハ）の4種と様々な中間型が得られた（図1, 2）

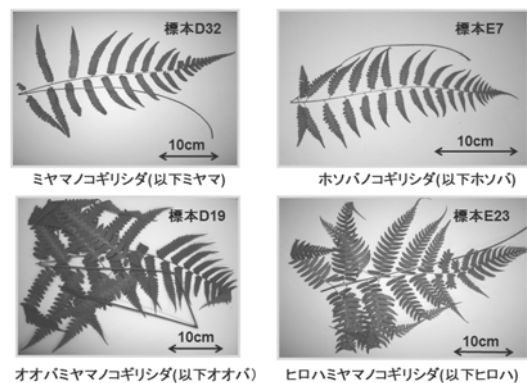


図1 種と思われる個体

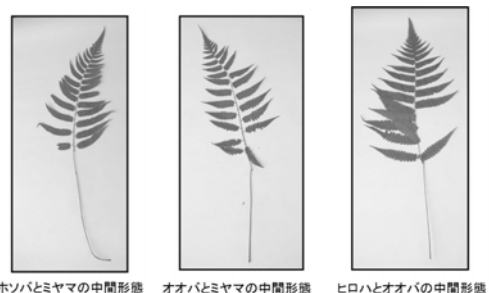


図2 雑種と思われる個体

(2) 胞子稔性

胞子稔性は胞子の形状から判断した(図3)。胞子表面が滑らかで、大きさが揃っているものが正常、いびつで様々な大きさのものを異常とした。2年間別々に採集した同一個体では、ほとんど稔性に差がなかった。

外部形態から判断した種(典型個体)あるいは雑種と胞子稔性との関係からは、種としたものは一般的に胞子稔性が高く雑種は低い。しかし雑種の中には胞子稔性が高いものも多くあり、雑種が後代を作る可能性が示唆された(図4)

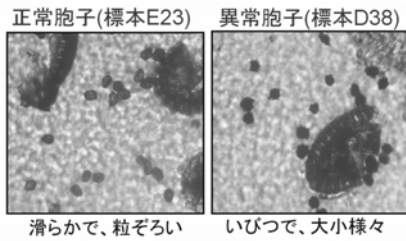


図3 胞子の形状

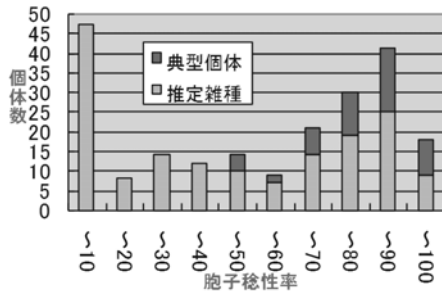


図4 胞子の稔性

(3) 体細胞染色体及び減数分裂

体細胞染色体数は $2n=164$ の四倍体であり、これまでの報告と一致した。雑種性のものが例えば八倍体であるならば、異質倍数体形成による稔性回復の1例だが、全て四倍体だった。これより本集団においては、同レベルの四倍体同士による雑種形成であることが確認された。

減数分裂では胞子稔性の高いものでは異常が見られず減数分裂は正常に進行していた。胞子稔性の低いものでは、第一分裂中期の一価染色体や後期での遅滞染色体が観察されるなど、減数分裂の様々な過程で異常が見られた。

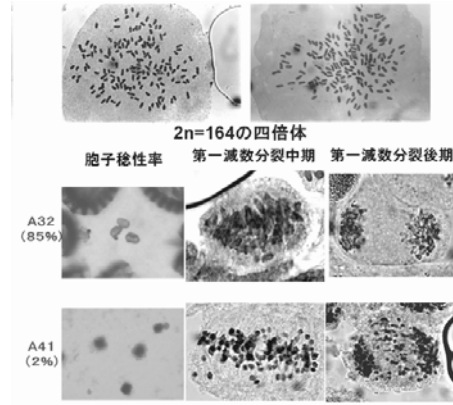


図5 体細胞と減数分裂染色体

(3) 核と葉緑体マーカー

正常な種と考えられる典型個体は、アロザイムマーカーと葉緑体 SSPC タイプから区別が可能であった(表1)。

表1 典型個体の核と葉緑体型

典型個体	核遺伝子型		葉緑体遺伝子型		
	<i>Tpi1</i>	<i>Tpi2</i>	<i>trnW-trnP</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbC-trnS</i>
ミヤマ	<i>aabb</i>	<i>bbcc</i>	B	B	A
			B	C	A
			A	C	A
ホソバ	<i>aabb</i>	<i>bbbb</i>	B	C	B
			B	B	B
オオバ	<i>aaaa</i>	<i>bbbb</i>	A	A	C
			A	B	D

(4) 雑種形成に関する考察

個体番号 A41 は、胞子稔性率 2%と極めて低い。この個体は葉緑体型はホソバと一致し、アロザイム型はオオバとホソバの間であった。つまりホソバが母親、オオバが父親で形成された雑種である。このことは外部形態からも推察されたものであった。同様に F₁ 雑種として認識できる個体が、4種全ての組み合わせで認められた。

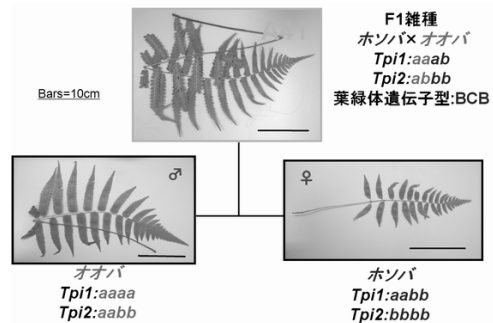


図6 F₁ 雑種の推定

次に F₁ 雑種では説明できなかった例をあげる。個体番号 B59 は、胞子稔性 13%と低く、雑種性を示す。この個体は外部形態からはオ

オバとヒロハの雑種と推定されていた。葉緑体型はヒロハと一致し、母親はヒロハと考えられる。ところがアロザイム型からは、オオバにもヒロハにもない対立遺伝子が見られた。このことは形態から判断して、オオバとミヤマの雑種が父親となれば納得いく。実際に、オオバとミヤマのF₁雑種は存在し、孢子稔性が高いものもみられた。このことからB59 個体は、2 種間の 1 回の雑種形成の結果ではなく、オオバ・ヒロハ・ミヤマ 3 種の間での 2 回の雑種形成によって生じたと推察された。その他にも同様な個体があった。

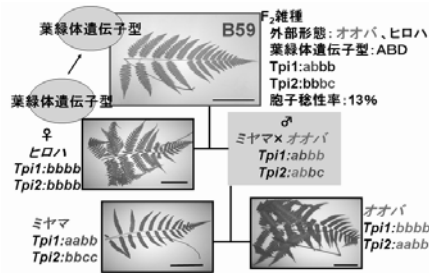


図7 F₂以降の雑種と推定

(5) 国内外の位置とインパクト

シダ植物で雑種が稔性を持ち次世代を形成することは極めてまれである。更に四倍体種での報告は世界的にみてもこれまで1例もなかった。本研究の成果により、ミヤマノコギリシダ複合体の形態的な多様性の一因が明らかとなった。また、シダ植物の種分化過程にさらに複雑な1例を加えることができた。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 野口拓矢 (発表者)、屋久島におけるミヤマノコギリシダ種複合体の浸透性交雑に関する形態学的、細胞学的、分子遺伝学的研究、日本植物学会第72回大会、2008年9月26日、高知大学

2. 坂田綾子 (発表者)、屋久島におけるミヤマノコギリシダ複合体の浸透性交雑に関する研究、日本植物学会九州支部他三学会合同大会、2007年5月20日、九州産業大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 正之 (TAKAMIYA MASAYUKI)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
70179555

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし