

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06408

研究課題名(和文) 咲かないランはいつから自殖だけなのか—ヤツシロラン類の比較遺伝解析による検証

研究課題名(英文) Genetic variation of complete cleistogamous species in *Gastrodia*

研究代表者

兼子 伸吾 (Kaneko, Shingo)

福島大学・共生システム理工学類・准教授

研究者番号：30635983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヤツシロラン属植物の完全閉花受粉植物2種と祖先種を対象に高精度の遺伝解析を実施した。その結果、閉鎖花を有するタケシマヤツシロランとクロシマヤツシロランの2種については、マイクロサテライト遺伝子座における多様性が失われており1種類の対立遺伝子に固定していること、開放花を有するハルザキヤツシロランとトカラヤツシロランは、種レベルあるいは集団レベルで複数の対立遺伝子を有するものの、その多様性は対立遺伝子、ヘテロ接合度ともに低く、開放花をもつものの主に自殖によって繁殖していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において対象とする完全閉花受粉植物は、開放花を全くつけないだけでなく、光合成を行わず、完全に菌類に寄生する絶対菌従属栄養植物でもある。完全閉花受粉植物の新種の発見は、学会はもちろん一般市民にも驚きをもって迎えられている。“植物”という言葉から通常想起される概念と矛盾する特色をもった植物に関する本研究は、その種についての理解を深めるだけでなく、生物の驚くべき生態や進化の可能性について示す格好の事例である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed genetic analysis on two complete cleistogamous species and their ancestral species using newly developed microsatellite markers. Microsatellite analysis suggested the loss their variation at the microsatellite locus and the fixation to one allele in two complete cleistogamous species *Gastrodia takeshimensis* and *G. kuroshimensis*. Their ancestral species with opened flowers, *G. nipponica* and *G. fontinalis*, showed multiple alleles at the species or population level in several microsatellite loci, but their allelic variation was low. It is suggested that they are mainly propagated by self-fertilization, although they have open flowers. Self-breeding may have been established before the cleistogamous flower evolution in *Gastrodia* species.

研究分野：分子生態学

キーワード：完全閉花授粉植物 ヤツシロラン 遺伝的多様性 自殖

1. 研究開始当初の背景

完全閉花受粉植物という不思議な存在
完全閉花受粉植物は開放花を全くつげず、閉鎖花による自家受粉のみを行う。その特性から、他殖によって遺伝的な変異を獲得することができないため、環境変動や病原菌との競合、有害遺伝子の蓄積等のデメリットが想定される。そのため、完全閉花受粉植物は、進化の袋小路にあり、絶滅前にたまたま観察されているに過ぎないと考えられてきた。このように一般的な植物とは対照的な繁殖戦略を有する完全閉花受粉植物は、これまでに約70種が報告されており、人々の注目を集めてきた。ただ、人工的に栽培された少数個体の観察に限られる種も多く、ダーウィン以来、野外に生育する完全閉花受粉植物を対象とした研究が望まれてきた(図1)。

新たな完全閉花受粉植物の発見とその意義
しかし、新種の発見と遺伝解析技術の発展は、完全閉花受粉植物の研究の閉塞を打破しつつある。末次健司(神戸大)らは、精力的なフィールド調査によって、開放花を一切持たないヤツシロラン属植物を次々に発見し、タケシマヤツシロラン *G. takeshimensis*、ヌカヅキヤツシロラン *G. flexistyloides*、クロシマヤツシロラン *G. kuroshimensis* として記載した。これらの植物は、現地で百個体以上が観察され、かつ開放花がまったく見られない完全閉花受粉植物である。

同時に、遺伝マーカーによる解析で、これらの植物の遺伝的・生態的な実態に迫ることも可能になってきた。種内の厳密なクローン個体数やゲノム内のわずかな遺伝的変異の検出等に加え、遺伝子型データの解析による分岐年代推定や遺伝子流動、繁殖実態の評価が、様々な生物で実現可能であることが、申請者らの多様な生物種を対象とした研究で実証されてきた。

2. 研究の目的

本研究は、完全閉花受粉植物の遺伝的多様性と種分化後の時間的スケールを検証するために、SSRマーカーによる高精度の遺伝解析を実施する(図2)。

“開花を完全にやめる”という特異な選択
本研究は、遺伝解析によって完全閉花受粉植物の遺伝的多様性、分岐年代やその持続性の解明に挑戦する初の研究である。また、完全閉花受粉植物は、ほとんどすべての被子植物が維持してきた開放花を捨てた特異な植物でもある。そのような植物を対象とした研究は、様々な花粉媒介と他殖による遺伝的多様性の獲得から自動自家受粉による繁殖補償に至るまで、被子植物において多様に進化した繁殖生態やその遺伝的な帰着を体系的に理解する上でも重要である。

3. 研究の方法

完全閉花授粉植物であるタケシマヤツシロラン *G. takeshimensis* とその推定祖先種であるハルザキヤツシロラン *G. nipponica*、完全閉花授粉植物であるクロシマヤツシロラン *G. kuroshimensis* とその推定祖先種である *G. fontinalis* 共通して使用することのできるマイクロサテライトマーカーを開発した。これらのマーカーを使っ

既知の完全閉花受粉植物

- ・ラン科などから約70種が確認
- ・多くが栽培下でのみ確認
- ・自生で多数個体の生育は稀

➤ 詳細な調査や比較研究は難しい

ヤツシロラン類の完全閉花受粉植物

- ・祖先種が異なる3種が新たに発見
- ・各種で、百個体以上が自生

➤ 詳細な調査や研究が可能

➤ 種間や種分化前後で比較可能

○ 遺伝的・生態的実体解明に効果的にアプローチできる

図1. 既知の完全閉花受粉植物の調査の難点およびヤツシロラン類の新種における利点



図2. 本研究の着目点

表1. 対象とした完全閉花受粉植物と推定祖先種

推定祖先種 (開放花)	完全閉花受粉植物
ハルザキヤツシロラン	→ タケシマヤツシロラン
トカラヤツシロラン	→ クロシマヤツシロラン

て各種の遺伝的多様性や遺伝的な分化について評価を行った。

4. 研究成果

これまでタケシマヤツシロランから 18 遺伝子座 (Kishikawa et al. 2019)、トカラヤツシロランから 12 遺伝子座のマーカを開発してきた (Ogaki et al. 2019)。これらのマーカを用い、これまでに収集した 4 種のヤツシロラン、計 350 サンプル以上について遺伝子型の決定を進めた。分析の結果、計 30 遺伝子座のうち 11 遺伝子座については、対象となる遺伝子座が明瞭に増幅しないサンプルや集団が存在した。残りの 19 遺伝子座については、350 サンプルすべてについて明瞭な増幅を示し、遺伝子型の決定が完了した。

その結果、閉鎖花を有するタケシマヤツシロランとクロシマヤツシロランの 2 種については、マイクロサテライト遺伝子座における多様性が失われており 1 種類の対立遺伝子に固定していること、開放花を有するハルザキヤツシロランとトカラヤツシロランは、種レベルあるいは集団レベルで複数の対立遺伝子を有するものの、その多様性は対立遺伝子、ヘテロ接合度ともに低く、開放花をもつものの主に自殖によって繁殖していることが示唆された (表 2)。ヤツシロラン類において閉鎖花進化する以前に、自殖による繁殖が確立されている可能性がある。

表 2. 4 種のヤツシロラン植物のマイクロサテライト遺伝子座における遺伝的多様性.

Locus	<i>G. takeshimensis</i> N = 27					<i>G. nipponica</i> N = 28				
	A	H_O	H_E	F_{IS}	Size of alleles	A	H_O	H_E	F_{IS}	Size of alleles
<i>Gfont013</i>	1	0.00	0.00	NA	202	1	0.00	0.00	NA	202
<i>Gfont017</i>	1	0.00	0.00	NA	200	1	0.00	0.00	NA	204
<i>Gfont021</i>	1	0.00	0.00	NA	166	1	0.00	0.00	NA	164
<i>Gfont022</i>	1	0.00	0.00	NA	250	2	0.14	0.24	0.43	244, 250
<i>Gfont027</i>	1	0.00	0.00	NA	231	1	0.00	0.00	NA	233
<i>Gfont028</i>	1	0.00	0.00	NA	163	1	0.00	0.00	NA	163
<i>Gfont034</i>	1	0.00	0.00	NA	185	1	0.00	0.00	NA	185
<i>Gfont035</i>	1	0.00	0.00	NA	165	1	0.00	0.00	NA	165
<i>Gfont038</i>	1	0.00	0.00	NA	170	1	0.00	0.00	NA	168
<i>Gfont043</i>	1	0.00	0.00	NA	234	2	0.04	0.04	0.00	237 , 240
<i>Gfont048</i>	1	0.00	0.00	NA	167	2	0.21	0.50	0.58	164 , 167
<i>Gfont049</i>	1	0.00	0.00	NA	166	1	0.00	0.00	NA	166

Locus	<i>G. kuroshimensis</i> N = 13					<i>G. fontinalis</i> N = 50				
	A	H_O	H_E	F_{IS}	Size of alleles	A	H_O	H_E	F_{IS}	Size of alleles
<i>Gfont013</i>	1	0.00	0.00	NA	184	2	0.04	0.30	0.87	164, 176*
<i>Gfont017</i>	1	0.00	0.00	NA	200	1	0.00	0.00	NA	206
<i>Gfont021</i>	1	0.00	0.00	NA	166	3	0.04	0.27	0.86	166, 168 , 170
<i>Gfont022</i>	1	0.00	0.00	NA	223	2	0.02	0.16	0.88	223, 225
<i>Gfont027</i>	1	0.00	0.00	NA	221	1	0.00	0.00	NA	225
<i>Gfont028</i>	1	0.00	0.00	NA	159	2	0.04	0.21	0.81	165, 171
<i>Gfont034</i>	1	0.00	0.00	NA	185	2	0.08	0.24	0.67	185 , 188
<i>Gfont035</i>	1	0.00	0.00	NA	165	1	0.00	0.00	NA	171
<i>Gfont038</i>	1	0.00	0.00	NA	185	2	0.02	0.28	0.93	187 , 191
<i>Gfont043</i>	1	0.00	0.00	NA	225	1	0.00	0.00	NA	228
<i>Gfont048</i>	1	0.00	0.00	NA	157	2	0.06	0.31	0.81	167, 173
<i>Gfont049</i>	1	0.00	0.00	NA	177	2	0.00	0.34	1.00	177 , 197

N, number of analyzed ramets; A, number of alleles; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient; NA, not available because locus was monomorphic. *Alleles in bold indicate dominant allele of the polymorphic locus.

また、タケシマヤツシロランは推定祖先種であるハルザキヤツシロランと共通の対立遺伝子を多く有するのに対し、クロシマヤツシロランは推定祖先種であるトカラヤツシロランと多くの遺伝子座において異なる対立遺伝子を有していた。これはタケシマヤツシロランが比較的最近種分化したのに対し、クロシマヤツシロランは種分化後より長い時間を経ている可能性をしめす。さらにこれらの選抜した 19 遺伝子座のマーカを用いて、その他の分類群についても解析を進めた結果、多くの種がハルザキヤツシロランを祖先種としている可能性が高いことが示唆された。

Kishikawa K, Suetsugu K, Kyogoku D, Ogaki K, Iga D, Shutoh K, Isagi Y, Kaneko S (2019) Development of microsatellite markers for the completely cleistogamous species *Gastrodia takeshimensis* (Orchidaceae) that are transferable to its chasmogamous sister *G. nipponica*. *Genes & Genetic Systems* 94:95-98.

Ogaki K, Suetsugu K, Kishikawa K, Kyogoku D, Shutoh K, Isagi Y, Kaneko S (2019) Newly developed microsatellite markers suggest the clear difference in tandem repeats among four related *Gastrodia* species (Orchidaceae) *Genes & Genetic Systems* 94: 225-229.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kenji Ogaki, Kenji Suetsugu, Keiju Kishikawa, Daisuke Kyogoku, Kohtaroh Shutoh, Yuji Isagi, Shingo Kaneko	4. 巻 94
2. 論文標題 New microsatellite markers recognize differences in tandem repeats among four related <i>Gastrodia</i> species (Orchidaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 225-229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.19-00025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suetsugu K, Hsu TC, Kaneko S	4. 巻 63
2. 論文標題 New natural hybrid in the genus <i>Gastrodia</i> : <i>Gastrodia</i> × <i>nippo-uraiensis</i> (Orchidaceae) from Yakushima Island, Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Taiwania	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6165/tai.2018.63.220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kishikawa K, Suetsugu K, Kyogoku D, Ogaki K, Iga D, Shutoh K, Isagi Y, Kaneko S	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Development of microsatellite markers for the completely cleistogamous species <i>Gastrodia takeshimensis</i> (Orchidaceae) that are transferable to its chasmogamous sister <i>G. nipponica</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1266/ggs.18-00057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kishikawa K, Suetsugu K, Ogaki K, Kaneko S
2. 発表標題 Genetic variation of newly described complete cleistogamous species I-Microsatellite allele fixation in <i>Gastrodia takeshimensis</i> -.
3. 学会等名 The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogaki K, Suetsugu K, Kishikawa K, Kaneko S
2. 発表標題 Genetic variation of newly described complete cleistogamous species II- Microsatellite allele difference between cleistogamous <i>Gastrodia kuroshimensis</i> and its sister species-
3. 学会等名 The 2nd International Academic Conference on the Formation Mechanism of Plant Diversity and Conservation of Endangered Plants in East Asia (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末次 健司 (Suetsugu Kenji) (70748839)	神戸大学・理学研究科・准教授 (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------