

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570101

研究課題名(和文) 交雑集団を利用した近縁種間における異なる花冠長への分化過程および維持機構の解析

研究課題名(英文) Morphological and genetic analysis on isolation and maintain mechanisms of different corolla tube length using interspecific hybrid population

研究代表者

山城 考 (Yamashiro, Tadashi)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・准教授

研究者番号：50380126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アキチョウジとヤマハッカの交雑集団について遺伝的・形態的構成、訪花昆虫の訪花行動を調査し、異なる花冠形態が維持される機構について考察を行った。形態形質およびマイクロサテライトマーカーによる雑種クラスの推定の結果、交雑集団の多くが、雑種2世代とアキチョウジとの戻し交雑個体から構成されていることが明らかとなった。このような非対称な交雑が起こる理由としては、アキチョウジとヤマハッカに強い生理的隔離が働いていることと、訪花昆虫の体サイズがヤマハッカの花序の強度に対応していないことによると考えられる。

研究成果の概要(英文)：An interspecific hybrid population between *Isodon logitubus* and *I. japonicus* was investigated by morphometric and genetic analyses. Both morphometric analyses and joint estimation of ancestry and interclass heterozygosity based on the SSR markers revealed that the F2 and backcross with *I. longitubus* were dominant in the population. Strong incompatibility was observed between *I. longitubus* and *I. japonicus* from artificial cross experiments. Although bumblebee pollinated the flowers of *I. longitubus* and hybrids, those of *I. japonicus* seem to be failed. Asymmetrical structure of the hybrid population (toward to *I. longitubus*) might be caused by the mismatch of the body size and *I. japonicus* inflorescence.

研究分野：植物分類学

キーワード：種間交雑 花冠長 遺伝子型 雑種指数

1. 研究開始当初の背景

被子植物の花の形態は送粉者である昆虫などの動物との相互作用により多様化を遂げたと考えられている。近縁種間での花の形態変化と送粉昆虫の切り替わりについては分子系統樹上に花の形質や送粉者をトレースすることや、花部器官と昆虫の体サイズの比較などにより、研究が行われてきた。しかし、近縁種間で異なる花の形態への分化がどのような媒介者との相互作用により起こり、そして維持されるのかを実験的に検証している研究例は少ない。

種間交雑は植物では比較的頻繁に見られる現象で種分化において重要な役割を果たしていると考えられている。著しく異なる花の形態を持つ種間が交雑を起こすと、集団内にはさまざまな両親種との中間段階が生じる。中間的な形態を持つ個体が両親種の集団に生じると、これまで形態的に適合した媒介者による選択的な訪花のバランスが崩れることが予想される。そのため、このような集団では、異なる両極端の花の形態の分化に送粉昆虫の媒介がどのように関連しているのかを間接的に検証するには適した材料になると考えられる。しかし、このような観点から行われた研究例はない。

2. 研究の目的

ヤマハッカ属植物は日本に7種8変種が自生し、花冠の長さが顕著に異なる種が存在しており、それぞれ、送粉昆虫の口吻サイズに適応して進化したと考えられている。しかし、それら長い花冠を持つ分類群と短い花冠を持つ分類群の隔離は完全ではなく、推定交雑種が記載されている。愛媛県東温町にはアキチョウジとヤマハッカの推定交雑集団があり、本集団では両者のさまざまな中間的な花冠の長さを持つ個体が存在している。本研究では花冠の長さが著しく異なるアキチョウジとヤマハッカの交雑集団において両親種の間接的な花冠長を持つ個体が戻し交雑などの過程を経て淘汰されるのか、それとも中間的な花冠を持つ個体同士の交配が起こりやすく維持されるのかを、集団の遺伝的構成、形態形質、送粉昆虫の観察、人工交配等の手法により検証することを目的とした。

3. 研究の方法

愛媛県東温市の交雑集団において、交雑個体の交配パターンを明らかにするため、下記のようなデータを収集した。

(1) 形態形質による交雑集団の構成の解析

開花期にアキチョウジとヤマハッカの交雑集団および両種の典型集団(アキチョウジ:東温、石鎚山;ヤマハッカ:東温、つるぎ町)から、花をつけているシュートの最大葉および花と蕾をつけた花序のサンプリングを行った。押し葉標本にした葉について11形質をデジタルノギスで測定した。花はFAA(70%エタノール:ホルマリン:酢酸=19:1:1)で固定した後、花冠と萼片から6形質について、デジタルカメラユニットを実装した実体顕微鏡下で測定した。

2種間の外部形態の測定データについてマンホイットニーのU検定を用い、各形質の違いを調べた。交雑集団の形態雑種係数は線形判別分析により算出した。典型的なアキチョウジ2集団とヤマハッカ2集団において測定したデータを用いて判別関数を作成し、得られた関数から、交雑集団の各個体の判別得点を算出した。得られた判別得点を形態雑種指数として解析に用いた。

交雑個体の花粉稔性を調べるため、FAAで固定した蕾みから花粉を採取し、アレクサンダー液を用いて染色性を調べた。光学顕微鏡下で個体あたり100粒を観察し、正常花粉と異常花粉の割合を算定した。

(2) 遺伝子マーカーの開発及び遺伝子マーカーによる集団の構造の解明

アキチョウジの生葉から抽出したDNAサンプルを使用してマイクロサテライト遺伝子マーカーの開発を行った。抽出を行ったDNAを4塩基認識の制限酵素を使用し断片化し、既知の配列からなるアダプターを結合した。ピオチンで標識した、マイクロサテライト配列を持つプローブをDNA断片にハイブリダイズさせ、磁気ビーズで選別し、選別した断片についてクローニングを行った。シーケンスの結果マイクロサテライトを含む配列について、マイクロサテライトを含む領域を増幅できるプライマーの設計を行った。

開発したマイクロサテライト遺伝子マーカーを使用して東温市の交雑集団の遺伝子型の決定を行った。リファレンスのためアキチョウジとヤマハッカの典型集団(それぞれ2集団)についても遺伝子型の決定を行った。さらに、交雑集団から得られた、果実についても遺伝子型の決定を行った。採集した果実は湿った濾紙に播種し、4で2週間保存した後、25に加温し発芽させた。各サンプルから抽出したDNAについて、マルチプレックスPCR法を用いて、本研究で開発したプライマーにより11遺伝子座を増幅した。PCR増幅産物については、ベックマンコールドライのサイズスタンダード400を添加し、ベックマン

CEQ-8000 遺伝子解析システムを使用して電気泳動および遺伝子型の決定を行った。

得られた遺伝子型データは集団ごとに遺伝的多様性のパラメーター（平均対立遺伝子数、ヘテロ接合体の期待値、ヘテロ接合体の観察値、近交係数）を求めた。交雑集団の遺伝的構成を明らかにするため、R のパッケージ Hlest (Fitzpatrick 2012) を使用して、各個体の両親種からの祖先性 (S) とクラス間のヘテロ接合体度 (h) を求めた。得られた両親種からの祖先性 (S) は、スピアマンの順位相関により、形態雑種係数との相関を調べた。

(3) 送粉昆虫の行動、訪花選好性の調査

開花期に交雑集団において、5m × 1m の方形区を設け、訪花昆虫種類、訪花行動および形態タイプへの訪花頻度の記録を行った。訪花昆虫が花へ訪花し吸蜜行動が見られた場合を1つの訪花イベントとしてカウントした。

(4) 人工交配実験

ヤマハッカ及びアキチョウジを栽培し、交配実験に使用した。人工交配は種内の個体間と種間について行った。ヤマハッカおよびアキチョウジ 10 株について、各個体 10 花を使用して、同種の異なる個体同士の交配を行った。種間交雑には両種ともに、別の 10 個体を準備し、各個体 10 花について交配を行った。蕾みから雄蕊を除去し、柱頭の先端が二裂しているのを確認した後、筆で花粉を塗布した。2 週間後、果実を採集した。

4. 研究成果

(1) 種間の形態形質の差異と交雑集団の形態的構成

計測を行った葉の 11 つの形質のうち 10 個でアキチョウジとヤマハッカの間に有意差が認められた (U -test, $p < 0.001$)。また、6 つの花部形態の形質では花冠長と下萼片の長さの 2 つにおいて両種に有意差が認められた (U -test, $p < 0.001$)。

13 形質に基づく線形判別分析の結果、1 つの判別関数が得られた。アキチョウジの判別得点は平均 5.52 (2.20-7.72) であり、ヤマハッカでは平均 -4.47 (-3.41~-6.07) であり、明瞭に区別された。交雑集団の判別得点は、平均 2.35 (-5.58~8.68) であり、アキチョウジよりも分類された個体が多いが、ヤマハッカとアキチョウジの中間的な個体も多く存在していた (図 1)。

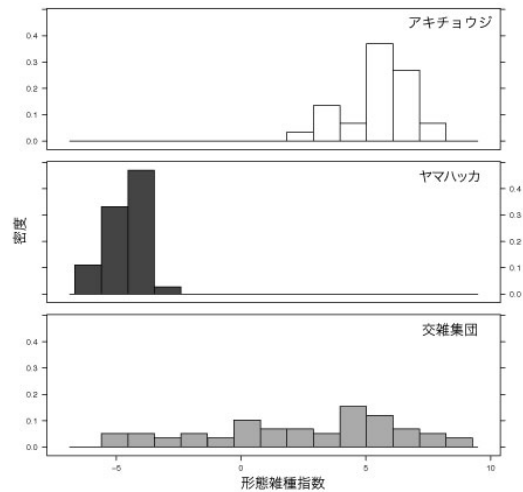


図1. アキチョウジとヤマハッカの交雑集団の形態雑種指数。

(2) マイクロサテライト遺伝子マーカーによるアキチョウジとヤマハッカの遺伝的多様性

本研究において開発した 11 個のマイクロサテライト遺伝子マーカーを用いて、アキチョウジとヤマハッカの典型集団の遺伝的多型のスクリーニングを行った。集団レベルの遺伝的多様性はアキチョウジでは、平均対立遺伝子数は 6.2-7.7、ヘテロ接合体の観察値は 0.65-0.69 であり、ヤマハッカでは、平均対立遺伝子数は 5.1-8.0、ヘテロ接合体の観察値は 0.55-0.72 であった。開発したマーカーについては、ハーディーワインバーク平衡からのずれと遺伝子座間の連鎖不平衡は検出されなかった。東温の交雑集団では、平均対立遺伝子数は 8.9 でヘテロ接合体の観察値は 0.74 であり、遺伝的多様性が高い傾向が見られた。

(3) 交雑集団の遺伝的構成および分子雑種指数

Hlest による交雑集団の両親種からの祖先性 (S) とクラス間のヘテロ接合体度 (h) を図 2 に示した。 S の値は平均 0.71 (0.09~1.00)、 h の値は平均 0.22 (0.00~0.76) であり、アキチョウジに偏っている傾向が見られた。交雑集団 52 個体の 6 つの遺伝子型クラスへ (アキチョウジ、ヤマハッカ、雑種 1 代、雑種 2 代、アキチョウジとの戻し交雑、ヤマハッカとの戻し交雑) の分類の結果、6 個体がアキチョウジに、1 個体がヤマハッカへ、19 個体が雑種 2 世代、17 個体がアキチョウジとの戻し交雑に分類された。実生より得た 27 サンプルについては、4 個体がアキチョウジ、10 個体が雑種 2 世代、12 個体がアキチョウジとの戻し交雑、1 個体がヤマハッカとの戻し交

雑であると推定された。実生から得たサンプルにおいてアキチョウジに割り当てられた4個体のうち2個体はアキチョウジを母親として得られた個体であり、2個体はアキチョウジとの戻し交雑個体から由来していた。

13の形態形質による線形判別分析の得点(形態雑種指数)とHlestで得られたS(分子雑種指数)には有意な相関が見られた($r=0.66$ 、 $p<0.001$)。

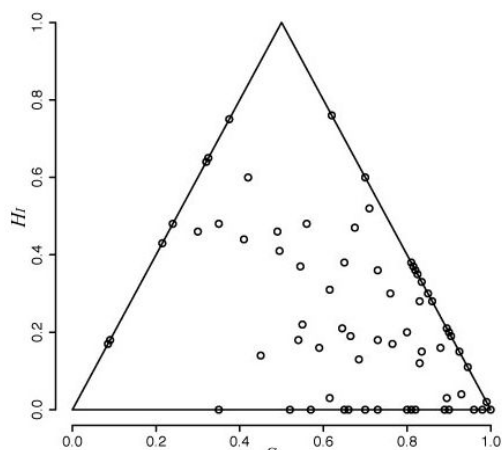


図2. 交雑集団のS(ancestry index)とHt(interclass heterozygosity) Sはアキチョウジに由来する対立遺伝子の割合。

(4) 交雑個体の花粉稔性

花粉の染色性から見たアキチョウジの花粉稔性は96.7%であり、ヤマハッカでは95.6%であった。雑種2世代の花粉稔性は89.7%($n=23$)であり、アキチョウジとの戻し交配個体は92.1%($n=18$)、ヤマハッカとの戻し交配個体は92.1%($n=3$)であり、交雑個体の花粉稔性には著しい低下は見られなかった。

(5) 送粉昆虫の行動、訪花選好性

アキチョウジはトラマルハナバチのワーカーにより訪花されていた(のべ、450の訪花)、ヤマハッカではミツバチのワーカー(のべ212の訪花)が優占的に訪花していたが、トラマルハナバチ(のべ28の訪花)の訪花も見られた。トラマルハナバチは典型的なアキチョウジばかりを訪花せず、花冠がより短い交雑個体も訪花していた(アキチョウジから交雑個体:50回、交雑個体からアキチョウジ56回)。ヤマハッカにも訪花していたが、花序が弱く、植物体が倒れるため、1個体あたりの訪花時間は非常に短かった。

(6) 人工交配実験

アキチョウジおよびヤマハッカの種内交

配の結果率はそれぞれ、86%および78%であった。しかし、アキチョウジとヤマハッカの交雑では、いずれの種を胚珠親または花粉親としても果実は得られなかった。

(7) まとめ

愛媛県東温市のヤマハッカとアキチョウジの交雑集団では、雑種2世代とアキチョウジとの戻し交雑個体が優占していた。ヤマハッカとの戻し交雑個体が少ないことは、両者を共通に訪花するトラマルハナバチのワーカーサイズとヤマハッカの花序の強度との不一致によるものと考えられる。それに対して、アキチョウジやアキチョウジとの戻し交雑個体では花序がより堅牢なため、繁殖がうまくいきやすいと考えられる。人工交配の結果、雑種1世代は得られなかった。また、形態の解析がアキチョウジに偏っていることや集団遺伝学的解析から雑種1代クラスが検出されなかったことから、アキチョウジとヤマハッカには強い生殖的隔離が働いていることを示している。しかし、雑種2世代や戻し交雑個体の花粉稔性やそれらから形成された種子の発芽率は高いため、いったん種間交雑個体が生じると、高次の交雑個体や戻し交雑を通じて交雑集団が維持されていると考えられる。アキチョウジとの交雑が比較的多く検出されたことは、将来的に交雑集団がアキチョウジ型の形態に固定していく可能性が示唆される。

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1件)

1. Yamashiro T, Yamashiro A, Dohzono I, Maki M. 2013. Development of microsatellite markers for *Isodon longitubus* (Lamiaceae). *Application in Plant Sciences* 2013 Oct. 1(10): 1300028. Doi:10.3732/apps.1300028 (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

1. 萩島美帆・堂園いくみ・星野佑介・山城考・堀江佐知子・牧雅之・タカクマヒキオコシの花筒長変異と遺伝的分化・第62回日本生態学会大会 鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)・2015年3月19日。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山城 考(Yamashiro Tadashi)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50380126