

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006 ～ 2010
 課題番号：18770075
 研究課題名 (和文) 雌しべが動いて性が変わる：フレキシスタイリーの起源と進化に関する研究
 研究課題名 (英文) Changing sex by moving stigma: study on the origin and evolution of flexistylly
 研究代表者 高野 温子 (TAKANO ATSUKO)
 研究者番号：20344385

研究成果の概要 (和文)：本研究では雌雄異熟性の一種であるフレキシスタイリーの起源と進化について探るために *Alpinia nieuwenhuizii* を材料とし、複数の集団で生態的・遺伝的調査を行い、フレキシスタイリーが進化する環境条件等について考察を行った。フレキシスタイリーの進化には、開花の同調性と開花個体の密度、吸蜜を目的とする訪花動物の存在が重要であるという結果が得られた。

研究成果の概要 (英文)：To consider the origin and evolution of flexistylly, a unique floral mechanism involving extreme curving of the style, I conducted ecological, genetic and morphological analyses of *Alpinia nieuwenhuizii*, a member of flexistylous species. The results obtained suggest synchronized flowering and density of flowering individuals, and existences of possible pollinators of honey suckers are necessary for evolution of flexistylly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	保留		
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：進化

1. 研究開始当初の背景

植物の性表現の多様さは進化の重要な要因であり、それゆえその起源の解明は進化生物学の中心的な話題である。

近年 Flexistylly という新しい雌雄異熟性の仕組みが中国雲南省のショウガ科植物において発見された。Flexistylly は雌性先熟花と雄性先熟花の性的 2 型が存在し、他の雌雄

異熟性とは異なり、花柱が葯の背側⇄腹側に移動し、能動的に自家受粉を避けるという点で特徴的である。Flexistylly は現時点ではショウガ科植物にのみ知られているが、系統的には離れた複数の種にみられることから、科内で多数回進化したと考えられている。しかしどの性表現からどのように起源し、維持されているのかは不明である。

2. 研究の目的

ショウガ科の一種 *Alpinia nieuwenhuizii* はボルネオ島固有種で、同島では最も普通に見られる *Alpinia* 属植物である。最近の調査により本種もまた Flexistylus を示すことがわかった (Takano et al. 2005)。が、その後の調査から本種は個体サイズや個体密度が集団によって大きく異なり、全ての集団で flexistylus がみられる訳ではないことが分かってきた。本研究では、*A. nieuwenhuizii* の集団内および集団間の形態的、遺伝的変異、性表現、送粉者の違いを明らかにすることにより、flexistylus が起源し維持される環境、生態的要因などについて明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) サバ州西部クロッカー山脈の非フレキシスタイリー個体が確認された *A. nieuwenhuizii* 集団 (Ulu Kimanis) 他における個体の性表現の確認およびの送粉者調査

①調査地および調査期間

ア. Ulu Kimanis (マレーシア・サバ州 クロッカー山脈南部 北緯 5 度 29 分 19 秒, 東経 116 度 1 分 7 秒, 標高 555m.)

2008 年 11 月 13-16 日及び 2009 年 9 月 15-18 日 (計 8 日)

イ. Tambunan (クロッカー山脈北部 北緯 5 度 45 分 51 秒, 東経 116 度 21 分 10 秒 標高 1113m) 2009 年 9 月 19-21 日 (計 3 日)

ウ. Ranau (サバ州西北部北緯 5 度 56 分 45 秒, 東経 116 度 38 分 43 秒 標高 737m) 2009 年 9 月 22-23 日 (計 2 日)

②調査方法

集団内 (およそ 1 km 四方) における開花個体の探索、およびフレキシスタイリーを示すかどうかの確認と、フレキシスタイリーを示す個体であれば、午前 10 時前後と午後 2 時前後に花を観察して Anaflexistylus か Cataflexistylus のどちらかを確認した。その後送粉者を観察する個体を選び、午前 8 時から午後 5 時までの間、観察個体を決めて直接目視で観察した。観察個体数および観察時間は Ulu Kimanis 2008 年 11 月 1 個体、12.5 時間、2009 年 3 個体、37.9 時間、Tambunan 観察個体 2 個体 18.7 時間、Ranau 観察個体 1 個体 11.8 時間。訪花した昆虫の種類と訪花時間を記録。1 種につき数個体を捕獲、一部の種については京都大学の加藤真教授に同定を依頼した。

(2) 集団毎の *Alpinia nieuwenhuizii* の花部の形態計測

クロッカー山脈の 4 地点 (Ulu Kimanis,

Ulu Kimanis atas (北緯 5 度 29 分 19 秒 東経 116 度 1 分 7 秒, 標高 700m), Tambunan, Mahua (北緯 5 度 47 分 49 秒, 東経 116 度 24 分 31 秒, 標高 1048m) および Ranau, サバ州東部の Lower Segama (北緯 5 度 24 分 49 秒, 東経 118 度 35 分 6 秒 標高 15m) の合計 6 地点の *A. nieuwenhuizii* の花を採取し、デジタルノギスを用いて花冠筒、花糸の長さ、唇弁の長さおよび幅、葯の長さを計測した。計測した花数は Ulu Kimanis 28, Ulu Kimanis atas 2, Tambunan 6, Mahua 5, Ranau 26, Lower Segama 16 であった。

(3) クロッカー山脈内 3 地点 (Ulu Kimanis, Ulu Kimanis atas, Mahua) 及び Ranau, Lower Segama の *A. nieuwenhuizii* 集団の ISSR を用いた遺伝的解析

各集団から計 50 個体 (Ulu Kimanis 12 個体, Ulu Kimanis atas 7 個体, Mahua 11 個体, Ranau 10 個体, Lower Segama 10 個体) の葉をシリカゲル乾燥させて日本に持ち帰り、Doyle & Doyle (1987) の方法を改変した CTAB 法を用いて DNA の抽出を行った。予備的に 15 の ISSR プライマー (ISSR-1, ISSR-2, ISSR-3, ISSR-4, ISSR-5, ISSR-6, UBC-808, UBC-820, UBC-827, UBC-830, UBC-831, UBC-843, UBC-852, UBC-870, UBC-874) を用いて検討し、安定的にバンドが得られた ISSR-4, ISSR-6, UBC-808, UBC-820, UBC-852 の 5 プライマーを以後の解析に使用することとした。PCR の反応系は 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 3.0mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 10 pmol primer, 鋳型 DNA 20-50ng で、反応液の総量は 25 μl とした。

反応液を調整後、Takara Thermal Cycler を用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応を 94°C 1.5 分、(94°C 40 秒—44°C 45 秒—72°C 1.5 分) × 35 サイクル、72°C 5 分で行った。

PCR 終了後、2% アガロースゲルを作成し電気泳動を 100 ボルト定常電圧、2 時間で行い、得られた ISSR バンドを有る (1) 無い (0) で記録した。データは Popgen32 ソフトウェアを用いて解析した。

4. 研究成果

Ulu Kimanis における個体の性表現と送粉調査の結果 (2008 年度)

調査地を探索した結果、開花個体 4 個体を発見した。2 個体は開花した花すべてが柱頭の動きがみられない非フレキシ個体であった。あとの 2 個体は、開花した花の一部に柱頭の動きがみられたが、上→下方向への移動で、開花が終わる際の重力による変化であり、他の花は柱頭に動きがみられなかったため、

非フレキシ個体であると判断した。

訪花回数が最も多かったのは、コシブトハナバチの一種 (*Amegilla calceifera* 図1) で、62回の訪花を記録した。次がハリナシバチの一種 (*Tetragonilla collina* 図2) の35回であった。他ハナバチの一種 (*Trigona melanocephala* 4回) やクマバチ (*Xylocopa caerulea* 2回) を観察した。日中いつ訪花したかを表1に示したが、最も訪花頻度が高いのは両種ともに6-8時の間で、ついで12-14時の間であった。コシブトハナバチは口吻を花冠筒に差し込んで蜜を吸い、花粉を集める行動も見られたが、ハリナシバチの方は専ら直接葯に止まって花粉を集め、吸蜜行動は確認されなかった。



図1 (左) コシブトハナバチの一種 (*Amegilla calceifera*) 口吻を差し込んで吸蜜。背中と足に花粉が付着。



図2 (右) ハリナシバチの一種 (*Tetragonilla collina*) 葯にとまって花粉を集めている。

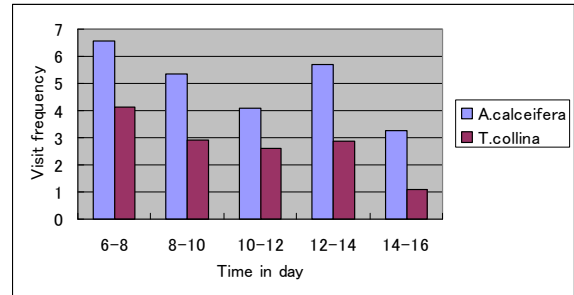


表1. Ulu Kimanis における訪花昆虫の日中の訪花頻度 (2008年11月)

Ulu Kimanis における個体の性表現と送粉調査の結果 (2009年度)

前年度と同じく開花個体を4個体発見したが、これらはいずれもフレキシスタイリーを示し、1個体が Anaflexistyly (雌性先熟花)、3個体が Cataflexistyly (雄性先熟花) を示した。2008年に観察した個体とは異なる個体であり、この集団はフレキシスタイリーを示す個体と示さない個体の混生集団であることが明らかになった。訪花昆虫を観察したのはいずれも半径3m以内に生育していた3個体で、1個体が Anaflexistyly, 2個体が Cataflexistyly であった。

観察期間中、コシブトハナバチの一種 (*Amegilla calceifera*) が181回、ハリナシバチの一種 (図3 未同定だが、2008年度に観察した *Tetragonilla collina* とは異なる) が139回訪花した。他、クマバチ (図4 *Xylocopa caerulea*) が68回訪花した。



写真上. 図3 ハリナシバチの一種 (未同定) 花粉を集めている

写真下. 図4 クマバチ (*Xylocopa caerulea*) 吸蜜中。花粉が背中に付着している

訪花昆虫が日中いつ訪花したかを表 2 に示した。コシブトハナバチは 10 時から 12 時の間に最も訪花頻度が高いのに対し、ハリナシバチは 6-8 時の間がピークで、その後は急激に訪花頻度が下がり午後ほとんど訪花がみられなかった。クマバチは最も訪花頻度が高かったのが 16-17 時、その次に 6-8 時、ついで 12-14 時の間であった。コシブトハナバチは口吻を花冠筒に差し込んで蜜を吸い、花粉を集める行動も見られたが、ハリナシバチの方は専ら直接葯に止まって花粉を集め、吸蜜行動は確認できなかった。クマバチは吸蜜行動のみで、背中に花粉が付着しているのをしばしば観察したが、花粉を集めることはしなかった。

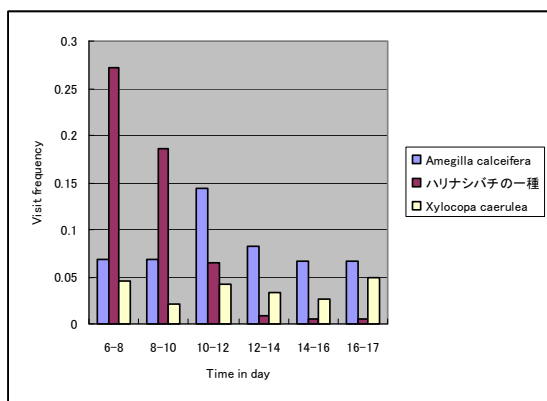


表 2. Ulu Kimanis 集団における訪花昆虫の日中の訪花頻度 (2009 年 9 月)

Tambunanにおける個体の性表現と送粉調査の結果

開花を確認できたのは 2 個体で、近接していたため (2m 以内) どちらも送粉者の観察に供した。両個体とも Cataflexistyly を示した。訪花昆虫は専ら 2009 年度に Ulu Kimanis で観察したハリナシバチの一種 (未同定) で、3 日の間に 232 回と圧倒的に多かった。ついでクマバチ (*Xylocopa caerulea*) が 9 回、コシブトハナバチ (*Amegilla calceifera*) が 3 回訪花するのを観察した。ハリナシバチは午前中に多く訪花がみられ、14 時以降は訪花頻度が下がる傾向がみられた。クマバチは午前中のみ、コシブトハナバチの訪花は 3 回とも 12 時-14 時の間であった。

Ranauにおける個体の性表現と送粉調査の結果

開花を確認できたのは 1 個体で、Cataflexistyly を示した。訪花昆虫は最も多かったのがコシブトハナバチ (*Amegilla calceifera*) で 37 回、ほかに Ulu Kimanis でもみかけたハリナシバチの一種 (未同定) も 23 回訪花を確認した。コシブトハナバチ

は 12 時から 14 時の間に最も訪花頻度が高かったが、ハリナシバチはすべての訪花が午前 10 時までの時間帯で、それ以降は観察されなかった。

花部の形態計測の結果

6 集団の花部の各部分を計測した結果は表 3 のとおり。クロッカー山脈の 4 地点 (Ulu Kimanis, Ulu Kimanis atas, Tambunan, Mahua) から採集した *A. nieuwenhuizii* の花は、特に花冠筒、唇弁の長さ、花糸の長さなどから分かるように、Ranau や Lower Segama の集団と比較して花サイズが有意に小さいことが明らかになった。

表 3. *A. nieuwenhuizii* の集団毎の花の各部分の大きさ

	花数	花冠筒	花糸の長さ	唇弁の長さ	唇弁の幅	葯の長さ
	(個)	(mean ± S. D.)	(mean ± S. D.)	(mean ± S. D.)	(mean ± S. D.)	(mean ± S. D.)
Kimanis	28	8.01 ± 0.787a	10.2 ± 0.950a	12.8 ± 0.930a	13.2 ± 3.50a	1.33 ± 0.016a
Kimanis Atas	2	7.90 ± 0.605a	11.7 ± 2.90a	12.8 ± 0.146a	14.99 ± 0.162a	1.69 ± 0.000b
Tambunan	6	7.66 ± 0.810a	11.5 ± 0.363a	12.8 ± 1.88a	10.5 ± 0.826b	1.48 ± 0.003a
Mahua	5	8.44 ± 0.406a	6.92 ± 0.861b	13.6 ± 0.376a	12.2 ± 1.31a	1.34 ± 0.003a
Ranau	26	14.1 ± 1.45b	16.6 ± 2.31c	19.3 ± 3.12b	18.5 ± 3.48c	1.68 ± 0.016b
L. Segama	16	12.5 ± 1.21b	15.8 ± 1.85c	19.3 ± 1.38b	17.5 ± 6.53c	1.74 ± 0.035b

単位は mm. 値の後ろのアルファベットは、Tukey-Kramer HSP multiple comparison test で有意差が出たもの。

ISSR解析の結果

5 つのプライマーから合計 37 の遺伝子座が得られた。得られたデータから計算された遺伝的同一度と遺伝的距離を表 4 に示した。クロッカー山脈の 3 集団はいずれも遺伝的同一度が 0.943-0.989 と高いのに対し、クロッカー山脈の 3 集団と Ranau, クロッカー山脈の 3 集団と Lower Segama の遺伝的同一度はそれぞれ 0.884-0.892, 0.851-0.894 と低く、Ranau と Lower Segama の遺伝的同一度は 0.894 だった。

表 4. Nei の遺伝的同一度 (上) と遺伝的距離 (下)

	Ulu Kimanis	Kimanis atas	Mahua	Ranau	L. Segama
Ulu Kimanis	0.9896	0.9795	0.8797	0.8818
Kimanis atas	0.0105	0.9426	0.8924	0.8707
Mahua	0.0207	0.0592	0.8838	0.8512
Ranau	0.1281	0.1139	0.1235	0.8943
L. Segama	0.1258	0.1385	0.1612	0.1117

遺传的距離から UPGMA 法を用いてフェノグラムを作成した結果を図 5 に示した。クロッカー山脈の 3 集団が一つのクレードにまとまり、Ranau と Lower Segama が別のクレードにまとまる結果となった。

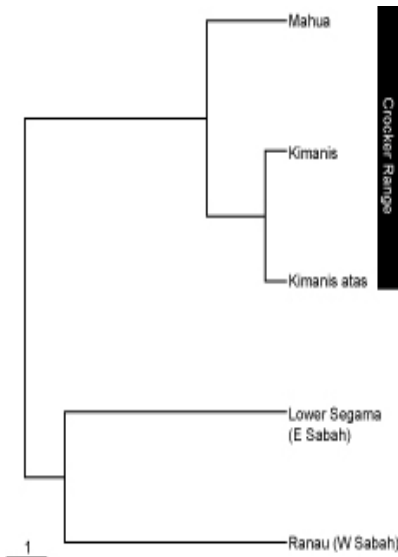


図 5. UPGMA 法で書かれた *A. nieuwenhuiizii* 5 集団のフェノグラム

得られた成果

各調査集団の性表現と有効な送粉者

Ulu Kimanis

2008 年度に観察した開花 4 個体はフレキシスタイリーを示さない非フレキシ個体だったが、2009 年度に観察した 4 個体はいずれもフレキシスタイリーを示した。実際はフレキシスタイリーと非フレキシスタイリー個体の混生集団であったことが判明した。訪花していた昆虫のうち、クマバチ (*Xylocopa caerulea*) とコシブトハナバチ (*Amegilla calceifera*) は、吸蜜の際背中に花粉が付着するのを確認した。よってこれら 2 種は送粉者として機能しているものと考えられる。一方ハリナシバチ (*Tetragonilla collina* および未同定種ともに) は専ら花粉集めを行い、08 年 09 年ともに朝の訪花が多かった。特に 09 年に観察した未同定種は、午前中は雄性先熟花である Cataflexistyly の個体、午後は雌性先熟花である Anaflexistyly の個体に訪花していた。花粉を集めるために花粉を放出している (=雄期の) 個体にばかり訪花をするという合理的な行動だが、フレキシスタイリーは性表現のタイプの異なる個体間の外交配を促進するメカニズムと理解されていることからすると、フレキシスタイリーを示す種の送粉者として役に立っているとは言

いがたい。

Tambunan

開花個体は 2 個体のみ確認になったが、過去 3 度の採集経験もあわせて非フレキシスタイリー個体を見たことはないので、フレキシスタイリーを示している集団であるといえる。有効な送粉者は Ulu Kimanis で説明したのと同様、コシブトハナバチとクマバチである。

Ranau

開花個体は 09 年の調査時には 1 個体しか確認できなかったが、2003, 4, 8 年度の採集経験もあわせてフレキシスタイリー集団であるといえる。確認した訪花昆虫のうち送粉者として機能している可能性があるのはクロッカー山脈の集団と同種のコシブトハナバチだけだが、後述するようにクロッカー山脈の集団よりも花サイズが有意に大きいいため、吸蜜時に背中に花粉が付着することはない (図 6)。花粉集め行動も Ranau 集団では確認できなかった。よって有効な送粉者として機能しているかどうかは不明である。



図 6. Ranau の *A. nieuwenhuiizii* に訪花するコシブトハナバチ。葯はハチの背中に接触していない。

集団内及び集団間の形態的な変異

表 3 に示したように、集団内における花の形態変異の度合いは大きくないが、クロッカー山脈の 4 集団と Ranau, Lower Segama の 2 集団とは花の各部のサイズが有意に異なり、後者の方が大きい花をつけることがわかった。つまり花サイズに 2 つのタイプが存在した。

集団間の遺伝的な分化の程度

ISSR マーカーを用いて集団間の遺伝的な変異を調べた結果、クロッカー山脈の 3 集団間の遺伝的同一度は高く、クロッカー山脈 3 集団と Ranau 間、クロッカー山脈 3 集団と Lower Segama 間、Ranau と Lower Segama 集団間の遺伝的同一度は同程度 (0.85-0.89) に低い値であった。サバ州東

部に位置する Lower Segama と西部の各集団間で遺伝的同一度が低いのは地理的距離を反映した結果と考えられるが、地理的に近いクロッカー山脈3集団と Ranau の間の遺伝的同一度が同程度に低いというのは興味深い。両者の間には花サイズの違いという差異があり、有効な送粉者が既に異なっている可能性は十分ある。送粉者が異なっていれば、地理的には近くても遺伝的交流が少なくなり、遺伝的分化が進むということが考えられる。

Flexistylis が起源し、維持される環境および生態的要因について

今回得られた結果を、筆者らが 2003 年にサバ州東部 Lower Segama で行った *A. nieuwenhuizii* 集団の送粉者と送粉パターン調査の結果と比較する。Lower Segama 集団は、Segama 川下流域の淡水湿地林下に密集しており、調査期間中集団の成熟個体のほぼ 7 割-8 割 (数百個体) が開花し、送粉者は大型のクマバチ *Xylocopa latipes* と *Xylocopa albioxantha* であり、訪花時間は朝 6 時-8 時と夕方 4 時-6 時の間に集中していたのに対し、今回クロッカー山脈で行った調査では、成熟個体数は数十、調査期間中にみられた開花個体は数個体と密度が低かった。たまたま今回は調査時期が悪かったというだけでなく、2003 年以来クロッカー山脈には少なくとも 6、7 度調査に訪れているが、集団中の個体が一斉に開花しているということは一度もなく、開花個体もあれば非開花個体もいるという状態である。またクロッカー山脈の個体への訪花パターンはあまり明瞭ではないが、6-8 時と 12-14 時に頻度があがる傾向がみられた。12-14 時というのは Anaflexistylis, Cataflexistylis とともに性を雌から雄、雄から雌に変換している最中のいわば中途半端な時期であり、この時期の訪花は花粉の受け渡しの効率が下がるといっても良い。また花粉食者であるハリナシバチが高頻度で訪花していたが、花粉食者は Flexistylis を示す種の場合は、有効な送粉者として機能し得ない。以上の結果を勘案して、Flexistylis が起源し、維持される環境を考えてみる。

ショウガ科植物は 1 日花であること、Flexistylis は性の異なる個体間の外交配を促進するメカニズムであり、他個体がいなければ受粉ができないこと、12-14 時の間は Anaflexistylis, Cataflexistylis とともに性を雌から雄、雄から雌に変換している最中で受粉効率が落ちることを考えると、Flexistylis が起源し維持されるためには、1. ある程度の個体数が同時期に一斉に開花している。2. 送粉者が早朝と夕方に活動を活性化させる。3. 送粉者として機能しうる花粉食者ではない動物相が豊か。という条件が

揃っていることが前提になるのではと考える。Lower Segama は標高が低い川沿いで、湿度も温度も高く、送粉者の活動が暑すぎる日中は鈍るという条件と、開花が同調しているという点で Flexistylis が起源しうる条件は整っていると考えられる。一方クロッカー山脈の *A. nieuwenhuizii* 集団は、送粉者となりうる動物相は豊かであるが個体の密度は低く開花も同調していないため、Flexistylis が起源するような環境ではないと考えられる。おそらくは川沿いや道路沿いなどのオープンな環境から林床などの閉鎖的な環境に進出するにつれて、個体サイズを小さくし、開花も非同調的になっていったと推測されるが、そういう条件では Flexistylis はあまり適応的ではない。結果 Ulu Kimanis に見られたような Flexistylis を示さない個体が出現したのではないだろうか。Flexistylis が崩れても花としては両性花であるので、個体の生残率には影響しないのではないかと考える。むしろ集団内で開花が同調せず開花個体がいっつも少ない状態であれば、Flexistylis よりも両性花をつける個体の方が有意意味適応的ともいえる。

Flexistylis はこれまでショウガ科の中で複数回進化してきたと考えられているが、裏を返せば Flexistylis が何度も起源しては Flexistylis から両性花へ戻るといふ進化、あるいは種分化が起こったともいえる。*A. nieuwenhuizii* でも花サイズに 2 型が生じており、その変化に伴い有効な送粉者が変わって集団間の遺伝的な分化が起こり、一方の花サイズの集団の個体の一部で Flexistylis が崩れて両性花がみられるという状況が確認された。これはもしかすると、Flexistylis を示す *A. nieuwenhuizii* から両性花の新たな種が分化するその前段階であるのかもしれない。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織 (1) 研究代表者

高野温子 (TAKANO ATSUKO)
研究者番号: 20344385