

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19580173  
 研究課題名 (和文) 亜高木樹種マルバアオダモ花粉の繁殖成功の比較による雄性両性異株の維持機構の解明  
 研究課題名 (英文) Male reproductive success in the androdioecious tree, *Fraxinus sieboldiana*  
 研究代表者  
 岡崎純子 (OKAZAKI JUNKO)  
 大阪教育大学・教育学部・准教授  
 研究者番号：20195332

研究成果の概要：雄性両性異株は希な性表現で雄株と両性花株から構成される性型である。この性型の進化・維持要因として提唱されている雄株の高い繁殖成功についての検証を行った。材料としてマルバアオダモ(モクセイ科)を用い、雄株と両性株の花粉発芽率・花粉管伸長の比較、両性型花粉の混合受粉実験によって結実した種子のDNAマーカーによる父系解析を行った。その結果、雄株花粉由来の種子が多く産出されており、これは雄株の花粉の高い発芽率が関与していることが判明した。これらから雄株は高い繁殖成功を示すことが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：繁殖生態学 性型進化 生物多様性 性表現 花粉発芽率 父系解析

## 1. 研究開始当初の背景

被子植物の示す性表現は次世代を生み出す植物の繁殖に関わる重要な形質であり、植物種群の多様性を生み出す分類形質となっている。このなかで雑居性と総称される性型の一つである雄性両性異株性は雄株と両性株から繁殖集団が構成される性型であり、この性型を示すことが報告されている生物は非常に少なく、動物で約 30 種、植物では 50 種ほどが報告されているにすぎない (Week et al. 2006)。雄性両性異株性は、両性株から雌雄異株への進化経路、あるいは、雌雄異株性の崩壊過程であるという進化経路であると捉えられ、雌性両性異株のような他の雑

居性とあわせ性型の進化要因を明らかにしていく鍵となる性型であると考えられている (Thomson et al. 1989)。そのため、1970～1980 年代には Lloyd(1975)、Charlesworth (1984)をはじめとする一連の数理モデルの研究が進められ、両性株の集団から雄性両性異株が進化する場合、雄株が両性株の 2 倍以上の繁殖成功を持たねばならず、これを満たす進化条件は、非常に厳しいことが指摘され、この性型の実在そのものを疑問視する性型進化研究のレビューも出された。

しかし 1990 年代、Liston et al. (1990)、Fritsch & Riesenber (1992) の Dasticaceae

の種群についての詳細な遺伝学的な調査から、その実在性が明瞭となり、それ以降種数は少ないものの、いくつかの分類群で真に雄性両性異株の種群が存在することが明らかになってきた。

この性型の進化・維持機構については、雄株の著しく高い繁殖成功度を保証する要因、高い外交配率、強い近交弱勢という交配様式に関わる要因や性型間での異なる空間構造・遺伝構造という生態学的要因が関与しているのではないかと指摘されている (Pannel, 2002)。また Sato (2002) のように従来の近交弱勢の遺伝的要因だけではなく繁殖器官への性配分の視点からその進化要因を説明するモデルも提唱されている。

このような研究の進展の中で、実際にどの要因が、どのようにこの非常に希な性表現の維持に関与しているのかの野外植物を扱った研究は少なく、その遺伝的背景を含め解明していく必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究はモクセイ科マルバアオダモ (*Fraxinus sieboldiana*) を用い、雄性両性異株の主要な進化要因とされるもののうち、雄株の高い繁殖成功度の存在について、雄株と両性株の花粉親としての繁殖成功度を受粉様式の直接観察による形態学的手法と野外での交配実験、マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝学的な手法により比較することにより検証することを目的とする。

このために花粉親としての繁殖成功度を測るステージを、受粉・受精期、結実期の2段階にわけ、各ステージでの花粉親としての雄株と両性株の花粉の受粉・受精能力の違いの有無を観察・測定する。

受粉・受精期においては、受粉量を調節した交配実験および時系列での蛍光顕微鏡を用いた花粉の発芽率・花粉管伸張速度の比較から、雄株花粉に高い発芽能力・花粉管の伸張能力の優位性があるのかを検証する。結実期においては、野外で交配実験を行い、その結実率の比較をおこなうとともに、マイクロサテライトマーカーにより遺伝子型から個体識別を行った雄株・両性株の混合花粉を用いた交配実験を行い、結実種子のマイクロサテライト遺伝子座を明らかにすることにより、性型間での花粉の結実能力の差異の有無を明らかにする。この2段階の実験観察・解析により性型間に花粉親としての繁殖成功度に違いがあるのかを検証するとともに、受粉から結実までのどの段階でこの差異が発現されているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料および調査地

マルバアオダモ (*Fraxinus sieboldiana*)

は、モクセイ科の落葉高木で日本では本州から九州に広く分布する。マルバアオダモは両性花株と雄株からなる、雄性両性異株である。雄花には2本の雄蕊と4枚の花弁を持つ。両性花はさらに1本の雌しべを持ち雌性先熟である。交配は、虫媒、風媒の両方を行っている。果実は翼果で8月下旬～11月下旬にかけて散布される。調査は大阪府柏原市大阪教育大学柏原キャンパスの北側緑地に設置した80×120 m<sup>2</sup>の永久コドラートで行った。調査地は自然放置され、自然回復してきたまばらな2次林で、平坦で明るい疎林となっており、マルバアオダモが優占し、他にコナラやヌルデ、ハリエンジュのみられる林となっている。

### (2) 花粉の受粉・花粉管伸長速度の比較

性型および自殖による発芽能力の違いと花粉管の伸長速度の違いを調査するため、2007年は両性花株13個体、2008年は両性花株15個体を調査木とし、各個体につき3花序を実験に使用した。1花序あたり60花程度に摘花した後、除雄処理を施し、他個体の花粉が受粉しないよう窓付きスギ交配袋をかぶせた。同一個体の処理外の花序を観察しながら、その花の葯の裂開直前または葯が裂開して間もない時期に花粉銃による人工授粉を行った。3花序のうち1花序には雄株花粉で他家受粉をおこない、別の1花序に別個体の両性花株花粉で他家受粉をおこない、残りの1花序に自家受粉をおこなった。受粉後は他個体の花粉が受粉しないよう再び花序に交配袋をかぶせた。受粉してから2007年は6時間、12時間、24時間後に、2008年には3時間、6時間、9時間、12時間、24時間後に受粉した花を回収し、FAAで1晩以上固定後、蒸留水で洗浄し、4N・NaOH水溶液に1日以上放置した。次に、花粉管を染色するため、アニリンブルー溶液を滴下し24時間静置後、0.005%アニリンブルー溶液：グリセリン(1:1)混合溶液で封入し、プレパラートを観察した。作成した資料は蛍光顕微鏡下で観察した。発芽率は、柱頭上についた花粉数に対する発芽花粉数の割合で求めた。花粉管伸長速度の比較は各花の花粉管伸長の長さを観察し、最も伸長した花粉管の到達位置により、A:柱頭上、B:柱頭から花柱1/4長まで、C:柱頭から花柱1/2長まで、D:柱頭から花柱基部まで、E:子房内まで伸長の5段階に分け、各花粉の花粉管伸長速度を解析した。

### (3) 結実種子のマイクロサテライトマーカーを用いた父系解析

#### ① 交配実験と種子の採取

雄花花粉と両性花花粉の混合花粉を受粉させ、結実した種子のDNAを抽出し、FEMSATL4遺伝子座におけるマイクロサテライトフラグメント解析を行った。交配は、FEMSATL4遺

伝子座の遺伝子型がホモの遺伝 17 個体を 2007 年 4 月に母樹として選定し、他個体の花粉が受粉できないように交配袋をかぶせた。交配は弱い自家不和合性を持つことから、除雄処理により雌蕊にダメージを与えることを減らすため 5 個体のみ除雄処理を行った。袋がけをした花序 1 個体につき 3 花序に、雄花花粉と両性花花粉の混合花粉を花粉銃により花粉がけを行った。選定した 17 母樹のうち花序数 9 個体については交配親による稔性の違いを調査するため、さらに 3 花序父樹の組み合わせを変えた混合花粉の花粉がけを行った。交配実験の花粉親としては母樹と異なる遺伝子型をもつ 14 個体(雄株 7 個体、両性株 7 個体)を選定した。

交配実験には雄花花粉および両性花花粉を各スパチュラ半量(約 40 万粒)ずつ混合した後、スギ花粉用花粉銃を用いて、1 花序につき 5 回十分に噴き付けをおこなった。交配は花の柱頭が赤みを帯び乳頭状突起が発達し、葯は緑色から黄色がかり裂開直前にまで成熟した段階で行った。結実期に実験花序から果実を回収し-80℃で冷凍保存した。

## ②FEMSATL4 遺伝子座のマイクロサテライト多型解析による父系解析

個体につき 30 粒の種子の回収種子についてテンプレート DNA を作成した。トータル DNA の抽出には CTAB 法(Murray and Tompson, 1980)を用いて行った。FEMSATL4 の蛍光修飾プライマーを用いて PCR 増幅をおこない、DNA シーケンサーでフラグメント解析をおこなった。PCR はまずプレヒートを 95℃で 1 分間行った後、Denature を 95℃で 30 秒間、Annealing Temperature を 52℃で 2 分間、Extention を 72℃ 30 秒間 30 サイクルおこない、最後に Final extention を 72℃で 5 分間行った後、4℃で維持し、プログラム終了後は-20℃で保存した。PCR 産物は 10~15 倍に希釈し、濃度を調整したものをを用い DNA シーケンサー(ABI PRIZM 3100 Avant)で電気泳動を行った。得られたデータは ABI PRISM GeneMapper™ Software Version 3.0 を用い、種子の SSR フラグメント解析をおこなった。

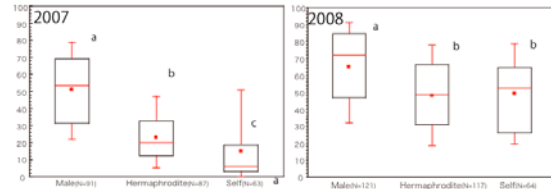
## 4. 研究成果

### (1) 花粉の発芽率と花粉管伸長速度の比較

Fig. 1 に 2007 年および 2008 年の受粉 12 時間後の他個体の両性花花粉、雄花花粉、自家花粉の発芽率の結果を示した。2007 年、2008 年ともに花粉の発芽率は、雄花花粉が最も大きく、雄花花粉と両性花花粉の間には統計的に有意な差が認められた(Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ )。他個体の両性花花粉と自家花粉の間には 2007 年には有意な差が認められたが

(Kolmogorov-Smirnov test;  $D=0.489$ ,  $p < 0.01$ )。2008 年には他家花粉の両性花花粉と自家花粉の間には有意な差が認められなかった(Kruskal-Wallis test;  $H=13.6$ ,  $p > 0.05$ )。

Fig. 1. 各性型花粉の柱頭上での発芽率の



比較。ボックスグラフの端は上側 10%・下側 10%、■は平均値、箱上辺は上側 25%、下辺は下側 25%、箱内の線は中央値。異なるアルファベット間には有意差がある。

観察年	受粉後	Sex	花粉管伸長状態のクラス					N
			A	B	C	D	E	
2007	6時間後	M	27	9	5	1	0	42
		H	38	2	1	0	0	41
		S	21	1	1	0	0	23
	12時間後	M	20	15	11	1	1	48
		H	32	2	0	0	10	44
		S	27	0	0	0	2	29
	24時間後	M	10	4	18	17	6	55
		H	35	5	4	0	11	55
		S	21	4	1	1	2	29
2008	3時間後	M	11	8	3	0	0	22
		H	24	0	1	0	0	25
		S	24	0	0	0	0	24
	6時間後	M	6	16	5	1	0	28
		H	26	0	1	1	0	28
		S	14	0	0	0	0	14
	9時間後	M	3	11	8	3	2	27
		H	32	1	1	0	4	38
		S	11	0	2	0	2	15
	12時間後	M	6	5	7	4	6	28
		H	25	0	1	0	2	28
		S	16	0	0	1	1	18
24時間後	M	4	1	1	5	14	29	
	H	27	2	1	0	2	32	
	S	16	0	0	1	0	17	

M: 他家受粉の雄花花粉, H: 他家受粉の両性花花粉, S: 自家花粉, N: 観察花数

Table 1 に 2007 年の受粉後 6 時間後、12 時間後、24 時間後における花粉管伸長の各クラスの観察度数を、2008 年の 3 時間後、6 時間後、9 時間後、12 時間後、24 時間後における花粉管伸長の各クラスの観察度数を示した。2007 年の受粉 6 時間後において花粉管が柱頭から花柱の 1/2 まで達したものは、他家受粉の雄花花粉では 42 花中 5 花、他家受粉の両性花花粉では 41 花中 1 花、自家花粉では 23 花中 1 花であった。そのうち花粉管が柱頭から花柱基部まで達したものは、他家受粉の雄花花粉の 1 花のみであった。その他の花ではどの授粉様式間においても、柱頭上もしくは花柱の 1/4 までしか伸長していなかった。2008 年においても、他家花粉の雄花花粉と両性花花粉、自家花粉すべてにおいて、受粉 6 時間後までに花粉管が子房に到達した花は観察されなかったが、受粉 9 時間後では花粉管が胚珠に到達した花が、他家花粉の雄花花粉では 27 花中 2 花、他家花粉の両性花花粉では 38 花中 4 花、自家花粉では 15 花中 2 花観察された。これらの結果から花粉管が胚珠

に到達するには最低9時間が必要であることが明らかになった。花粉管伸長程度について2007年の受粉6時間後、12時間後、24時間後それぞれで比較すると、どの時間においても各授粉様式の間統計的に有意な差は認められなかった(Kruskal-Wallis test、6時間後； $H=0.119$ 、 $p=0.94190$ 、12時間後； $H=16.447$ 、 $p=0.00027$ 、24時間後； $H=2.506$ 、 $p=0.28557$ )。この傾向は2008年も同じであった。これらのことから発芽した花粉は各受粉条件間で伸長のパターンに差がなく、花粉管の伸長速度には差異がないことが示された。

これらから、発芽した花粉では、その伸長速度には性型間で差異がないが、柱頭上での花粉の発芽率には性型間で有意な差異があり、雄花花粉が結実には有利であることが判明した。

## (2) 結実種子のマイクロサテライトマーカーを用いた父系解析

得られた除雄処理3母樹と非除雄処理10母樹のFEMSATL4遺伝子座のそれぞれの遺伝子型と花粉親の遺伝子型および交配実験から得られた359種子の遺伝子型をTable 2に示した。除雄しなかった交配実験では、自殖花粉由来の種子も出現した。自殖花粉は柱頭上での発芽率が低いことから、この自殖種子は受粉実験終了後に袋の内部で開花した花が隣花受粉により結実したものと考えられる。自殖花粉由来の種子を除外した場合、13個体例中7個体で雄花粉が両性花粉よりも5倍以上の多くの種子を産出していた。この結実種子での花粉親の性比は有意に1:1から(Fisherの正確検定、 $p<0.05$ )偏っていた。ただし、3個体については有意に両性花粉の方が多く(Fisherの正確検定、 $p<0.05$ )、3個体では雄株花粉と両性花粉由来の種子数には有意差がなかった(Fisherの正確検定、 $p>0.05$ )。開花後半では自殖花粉由来の種子数も多く生産されていたことから、開花の後半では自家不和合性が弱くなるような母樹の生理的な状態変化が関係しているものと考えられる。

Table 2 交配実験から得た各花粉親由来の種子数とその頻度

除雄	処理	時期	母樹	花粉親						Total	M/H	p
				M		H		S				
				Frequency	Seeds	Frequency	Seeds	Frequency	Seeds			
あり	前年	21(2)		1.000	25	0.000	0	-	-	25	>	
		93		0.880	22	0.120	3	-	-	25	7.33	<0.001
		549		0.833	28	0.067	2	-	-	30	14.00	<0.001
なし	21(1)			0.731	19	0.000	0	0.269	7	26	>	-
	333			0.714	20	0.143	4	0.143	4	28	5.00	0.002
	377			0.900	27	0.000	0	0.100	3	30	>	-
	43(1)			0.321	9	0.571	16	0.107	3	28	0.56	0.230
	43(2)			0.296	8	0.444	12	0.259	7	27	0.67	0.503
	177			0.080	2	0.920	23	0.000	0	25	0.09	<0.001
	後半	550		0.750	21	0.071	2	0.179	5	28	10.50	<0.001
	12			0.067	2	0.333	10	0.600	18	30	0.20	0.039
	335			0.000	0	0.233	7	0.767	23	30	<	-
	363			0.185	5	0.370	10	0.444	12	27	0.50	0.302
Total					188		89		82	359	2.11	

M: 雄株花粉、H: 両性花粉、S: 自家花粉  
p: Fisher's Exact Tests

これらの結果から、雄株花粉と両性花粉

を混合した場合において雄株花粉の方が競争力が大きく両性花粉よりも多くの種子を残せることが明らかになった。

以上のことから雄株花粉は高い繁殖成功を示し、これには雄株花粉の高い花粉発芽率が大きく関与し、雄株花粉の受粉競争能力の高さがその一因になっているものと考えられる。

(1) と (2) の結果から、従来提出された雄性両性異株の維持に関するLloyd(1975)およびCharlesworth and Charlesworth(1978)の雄性両性異株の性型を維持するためには雄株が両性株の少なくとも2倍以上の繁殖成功度を持つ必要があるという仮説を支持する結果が得られた。ただし雄としての繁殖成功度を比較する際、雄花粉の受精能力の指標として、花粉の発芽率、花粉管伸長の比較、結実率、種子の発芽率、実生の定着率などさまざまな過程があり、そのうちどこで繁殖成功度の差が生み出されているのかということを明らかにすることは、性型間の繁殖成功度の違いを理解する上で重要であり今後の課題である。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 岡崎純子・笹村由貴・塩崎勇喜・石田清、雄性両性異株の雄株花粉の繁殖成功度は両性花粉より高いのか：花粉の発芽率と花粉管伸長の性差、日本生態学会、2009年3月19日、岩手県立大学
- 2) 岡崎純子・原綾子・石田清、雄性両性異株の維持機構：マルバアオダモ雄株花粉は両性花粉より多くの種子を残せるのか、日本生態学会、2008年3月15日、福岡国際会議場

[図書] (計 1 件)

岡崎純子他、日本林業調査会、日本樹木誌、2009、762頁(33-50)

[その他]

大阪教育大学リポジトリ

<http://ir.lib.osaka-kyoiku.ac.jp/dspace/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡崎 純子 (OKAZAKI JUNKO)

大阪教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：20195332

### (2) 研究分担者

石田 清 (ISHIDA KIYOSHI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：10343790