

機関番号：82105

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580167

研究課題名 (和文) 一回結実性ササ属の繁殖システムおよび実生更新が遺伝的動態に及ぼす影響の解明

研究課題名 (英文) Effects on the genetic variation by mating system and seedling regeneration of monocarpic dwarf bamboo species

研究代表者

北村 系子 (KITAMURA KEIKO)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・主任研究員

研究者番号：00343814

研究成果の概要 (和文)：ササ属は長年にわたって地下茎による栄養繁殖を繰り返し、数十年に一度開花して枯死する性質をもつ一回結実性植物である。本研究の結果、オクヤマザサの小面積開花は単独ジェネットが開花していることが明らかになった。また種子の分析結果より、ササはほとんどが完全に自殖していた。しかし、中には他殖率が 0.7 に及ぶものもあり、受け取る花粉の性質によって混合交配を行っていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Dwarf bamboos have vigorous vegetative regeneration system in general. On the other hand, dwarf bamboos are monocarpic, which flower and fertilize seeds once and die in several decades. The genetic analysis revealed that these small-scale flowering was single genet flowerings. The results indicated that the dwarf bamboo species have self compatibility and the seeds showed the complete selfing. Several culms showed mixed mating system when they received outcross pollens, and these culms have outcrossing rates of 0.7.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ササ、他殖率、マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

(1)ササ属は栄養繁殖系によって個体の占有面積を拡大する一方、数十年に一度起きる一斉開花の後に枯死する。このようなササ属の稀な開花結実に伴う有性繁殖が、集団の遺伝的動態にどの程度寄与しているのかは明らかになっていない。

(2)ササの栄養繁殖系は長い年月にわたって

継続して広い面積を占有するジェネットパッチを形成する。しかしながら、ササ集団の遺伝的多様性は他の植物集団に比べてもかなり高いことが明らかになりつつある。一般に栄養繁殖系を主とするクローナル植物の集団では、単一のジェネットが広い空間を占めることが予想され、集団全体としての遺伝的多様性は低いと考えられるが、ササ集団ではそうになっていない。このことから、稀に起

きる有性繁殖の機会に様々なジェネット間で遺伝子の組み換えが生じ、遺伝的多様性を高く保っているのではないかと予想される。

(3)ササ属の開花結実稀であり、種子あるいは実生を対象にした研究は発芽率あるいは生存率に関するわずか2例(蒔田ら 1993、小山 2000)しかなく、遺伝変異に関する研究は未だ皆無であるため、本研究計画が国内外における最初の試みとなる。

2. 研究の目的

ササ属は旺盛な栄養繁殖系を長い年月にわたって維持し、我が国の森林林床において膨大な面積を占有している。とくに北海道の森林においてこの傾向は顕著である。しかしながら、我々の先行研究により、ササ集団の遺伝的多様性は極めて高く、栄養繁殖系だけから作出された多様性だと考えにくい。しかし、ササ属は「一回結実性(monocarpic)」とされ、数十年に一度大面積で一斉開花して枯死する。その開花間隔は極めて長いため、ササ属における稀な有性繁殖の機会ほどの程度、集団の多様性作出および多様性維持機構に寄与しているのかわかっていない。また、繁殖の機会が稀である事から研究の機会も稀であり、種子繁殖に関する知見は蓄積されていない。そこで、本研究計画では追跡調査しているササ集団において一斉開花によって結実した種子に注目し、その繁殖システムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)研究対象としたササは北海道の日本海側森林における代表的な林床性のササであるオクヤマザサである。当試験区におけるオクヤマザサは 2003 年より連続的に小面積開花を繰り返し、枯死が進んでいる。

(2)2006-2007 年 5 月に開花したシュート 18 本を選び、開花直後に寒冷紗製の袋をかけ、種子の充実に伴う脱粒によって種子の損失を防いだ。7 月に袋ごと回収し、種子を稈ごと採取した。採取した種子は洗浄風乾後、ベンレート 0.05% に浸漬してカビを防いだ。

(3)ササ種子は休眠が深いため、低温処理をすることによって休眠打破する方法を用いた。低温に際してはセルロース製スポンジに水道水を浸したもので種子を挟み、乾燥を防いで 0°C~4°C でインキュベートした。一定期間の低温を経験させた後、25°C の高温期間に移行し、その後再び低温におくインターバルを繰り返した(変温処理)。

(4)ほとんどの種子の休眠は低温を 2 回経験させることによって解除することができた。

中には、1 回の低温で発芽したもの、4 回の低温で発芽したもの、5 回以上の低温をかけても発芽しなかったものが存在した。これは、ササの休眠の深いことを示唆している(図 1)。低温によって発芽した種子を室温におき、子葉を展開させたのち、液体窒素を用いて粉碎して全 DNA を抽出した。この試料を用いて、核 DNA 多型(マイクロサテライトマーカー)を分析し、自殖率、その他遺伝的パラメータを推定する。

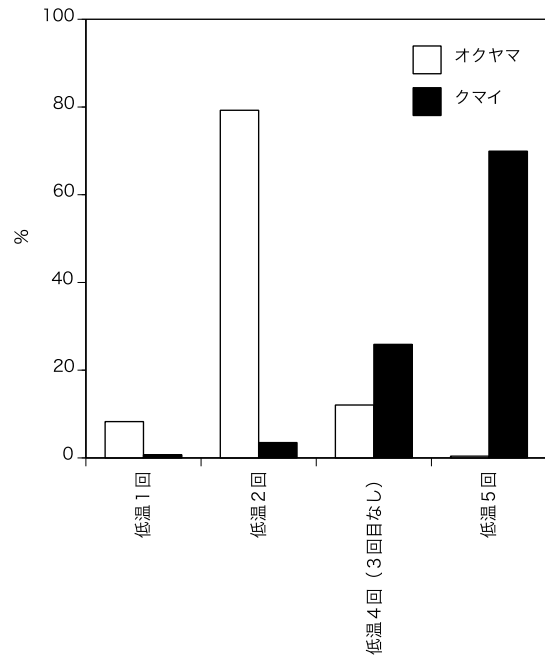


図 1. 低温処理による発芽促進

(5)開花 2 年後に発芽した、同じ集団内の野外で更新した実生についても同様に DNA 多型(マイクロサテライト)分析を行い、有性繁殖によって集団に持ち込まれる新たな遺伝的多様性の評価を行う。

(6)ササの種分化と雑種性についての考察を行うために、開花日に花粉を採取して形質の観察を行った。採取した花粉は室温で FAA 固定液に浸漬、脱気して保存した。観察にあたっては酢酸カーミンで染色し、1 稈あたり 50 粒をランダムに選び、顕微鏡下で充実率、直径を測定した。オクヤマザサ 5 稈およびクマイザサ 4 稈を供試した。

4. 研究成果

(1)ササの小面積開花集団について、開花個体を分析した結果、すべて単独のジェネットのみが開花する「小面積単独開花」であることが明らかになった。また、開花面積はほぼ

数十メートルの範囲で一定していたことから、単独ジェネットの栄養繁殖範囲にほぼ一致しているのではないかと考えられる。ただし、ジェネット内の全ラメットが開花したのではなく、非開花のラメットも含まれていた(図2)。

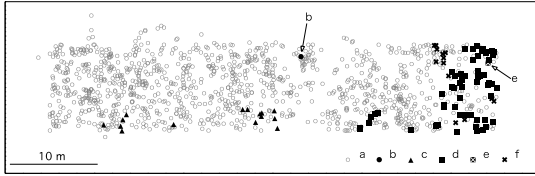


図2. 小面積開花集団のジェネット構造

(2) 種子を採取した稈ごとに他殖率を推定した結果、平均で 0.4 (0.0~0.7) であった。しかしながら、ほとんどの稈が 0.0 となり、ササは自殖性であることを示すものである。また、開花2年後に発芽した野外の実生を分析した結果、これらも自殖性を示す結果となった。他のイネ科植物の先行研究によると、野生イネでは 0.0 (一年生) ~0.6 (多年生) であり、本研究の結果とほぼ一致した。半野生のキビ集団についても他殖率に関しては同様の値が報告されている。集団の遺伝的多様性の程度に関しても、ササは野生イネのそれとほぼ一致していた。このことから、ササ属の遺伝的構造および遺伝的動態はイネ科植物の典型的な種とほぼ同様であると言える。

(3) このことから、ササは他のイネ科植物同様に自家和合性植物であることが示唆された。さらに、種子の段階でアルビノ(白子、黄色子、斑入り実生)が数パーセントの割合で観察された事実からも、ササの自家和合性は指示される。

(4) 他殖していた稈での他殖率は 0.3~0.7 であり、これらは混合交配(mixed mating)を呈していることから、他殖花粉が含まれた場合には受精に有利であることが示唆された。これらの、他殖を示した稈では受粉した花粉の多様性がかなり高いことから、選択的に他殖花粉を受け取っている可能性が考えられる。そして、これらの他殖由来の種子が栄養繁殖系によって長い年月にわたり集団内に維持されていることによって、ササ集団全体の遺伝的多様性を高く保っているのだと考えられる。

(5) 他殖稈において結実した種子の中に、母稈由来の遺伝子が欠落したものが数パーセント含まれていた。これは、とくに他殖率の

高かった稈で顕著であった。また、遺伝子の欠落は先行研究によって多様性が高く、かつ体細胞突然変異が起こり易い遺伝子座で観察されたことから、これらの遺伝子座における突然変異率が他の遺伝子座よりも高いことが考えられた。さらに、最近の研究では他殖によって突然変異率が高くなる(突然変異が誘発される)という結果も得られていることから、栄養繁殖系とことなつたメカニズムで遺伝的多様性を高める働きが有性繁殖系に付与されている可能性がある。とくに、ササ属は雑種性の進化経路を辿っている歴史があり、ゲノムの再編成等、複雑かつ柔軟な機構を保有していることも考えられる。

(6) 本研究は一回結実性植物であるササ属で、稀に起こる繁殖の機会を捉える事によって、ササの繁殖様式に関する国内外で初の研究結果を得ることができた。これは、当試験区において追跡調査を続けてきたことで、いち早くササの開花現象を発見できたことで可能となった。

(7) 旺盛な栄養繁殖系をもつササ属において自殖性が発達している事実は、クローナル植物における遺伝的多様性の維持機構解明において、新たな知見を与えるものである。つまり、ササ属は稀な有性繁殖の機会に作出された遺伝的多様性を長年にわたって集団に保持していることで、自殖による遺伝的劣化を防ぐ働きを持つことが考えられる。

(8) しかしながら、野外観察によって新たな実生はほぼ全てが一年以内に消失した。これは、栄養繁殖系よりも有性繁殖系によって更新する機会が極めて低いことを示唆している。つまり、有性繁殖の機会は稀で、実生繁殖のチャンスも低いことから、小面積開花において作出されたあらたな遺伝的多様性が集団内に残存する頻度はわずかであろう。大面積開花における知見はまだないことから、今後、大面積あるいは複数ジェネット同時開花の機会における同様の研究を行うことによって、ササの多様性維持機構の全体像が明らかになると考えられる。

(9) さらに、ササ属の進化については種分化の過程で雑種形成による新たな種の形成がなされている可能性がある。また、高い雑種性を示すササでは大面積開花ではなく比較的小面積の部分開花を示すという説もある。ササの雑種性については、稈および葉が示す形態形質からのアプローチのみであったが、本研究ではそれらに加えて開花の際に花粉を採取して観察することによって、ササの雑種性についても考察を行った。その結果、ササの花粉はイネ科の花粉とほぼ同様の大き

さで30~60 μm であった。種によって花粉の直径はほぼ一定であった(図3)。

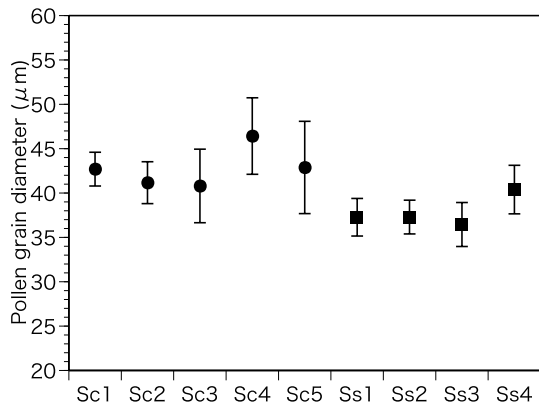


図3. オクヤマザサ5種(Sc)およびクマイザサ4種(Ss)の花粉直径

(10) 雑種性を示す植物では、花粉粒の変形、直径の不均一、および花粉が空であること等の異常が観察されることが知られている。本研究で扱ったクマイザサではこのような花粉の異常は観察されなかった。しかし、雑種複合体とされるオクヤマザサでは、形質の変形は観察されなかったが、花粉直径の分散がクマイザサに比べて大きかった。このことは、オクヤマザサは花粉稔性を持った雑種複合体(チマキザサ節×チシマザサ節)である根拠の一つとなろう。

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5件)

- ① Keiko Kitamura (in press) Pollen diameter of *Sasacernua* MAKINO and *S. senanensis* (FRANCH. & SAVAT.) REHD. in small-scale flowering at Sapporo, central Hokkaido. Bull. FFPRI. 査読有, 印刷中(掲載確定)
- ② Keiko Kitamura, Takayuki Kawahara. Estimation of outcrossing rates at small-scale flowering sites of the dwarf bamboo species, *Sasacernua*, Journal of Plant Research, 査読有, 印刷中(掲載確定)
- ③ Keiko Kitamura, Takayuki Kawahara, 2011, Difference in germination response to cold stratification intervals between two dwarf bamboo species, *Sasacernua* and *S. senanensis*, 森林総合研究所研究報告,

418: 1-5, 査読有

- ④ Keiko Kitamura, Tomoyuki Saito, Ayumi Matsuo, Yoshihisa Suyama, 2009, Development of microsatellite markers for the dwarf bamboo species *Sasacernua* and *S. kurilensis* (Poaceae) in northern Japan. Molecular Ecology Resources 9: 1470-1472, 査読有
- ⑤ Keiko Kitamura, Takayuki Kawahara, 2009, Clonal identification by microsatellite loci in sporadic flowering of a dwarf bamboo species, *Sasacernua*. Journal of Plant Research 122: 299-304., 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Keiko Kitamura, Takayuki Kawahara, 2011, Estimation of outcrossing rates at small-scale flowering sites of the dwarf bamboo species, *Sasacernua*. 第58回日本生態学会大会, 2011年3月10日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)
- ② Keiko Kitamura, Takayuki Kawahara, 2009, Clonality in the sporadic flowering of a dwarf bamboo *Sasacernua* identified by microsatellite loci. 9th Clonal Plant Symposium abstract: 12.

[その他]

ホームページ等

http://www.ffpri-hkd.affrc.go.jp/koho/kitanomoridayori/Vol.3/kitanomoridayori_vol3.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 系子 (KITAMURA KEIKO)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・主任研究員

研究者番号: 00343814

(2) 研究分担者

河原 孝行 (KAWAHARA TAKAYUKI)

独立行政法人森林総合研究所・北海道支所・グループ長

研究者番号: 70353654