

機関番号：82617

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770071

研究課題名 (和文) 地中生配偶体を持つシダ植物の種形成機構解明

研究課題名 (英文) A study on speciation of pteridophytes producing underground gametophytes

研究代表者

海老原 淳 (EBIHARA ATSUSHI)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・研究員

研究者番号：20435738

研究成果の概要 (和文)：地中生配偶体を形成するハナヤスリ科ハナワラビ属シダ植物で、配偶体の空間分布を効率的に調査するための分離法・分子同定法を確立した。複数種の孢子体が混生する茨城県つくば市の野生集団において孢子体の平面分布と地中生配偶体の空間分布とを解析した結果、孢子体が比較的少ない地点の土壤中に高密度で配偶体が生育し、2種の配偶体が空間的に近接する場合があることも明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Methods of isolation of gametophytes from soils and their molecular identification to survey the spatial distribution of underground gametophytes of *Botrychium* (Ophioglossaceae) were established. I have analyzed the distribution of sporophytes and gametophytes in a native population of the genus in Tsukuba-shi, where three species grow mixed together. The result shows that gametophytes are present in high density where sporophytes are sparse, and gametophytes of multiple species are sometimes spatially very close to each other.

交付決定額

(金額単位：円)

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

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：シダ植物、配偶体、種形成

## 1. 研究開始当初の背景

シダ植物の配偶体は多くの群では地上に生育するが、ハナヤスリ科やマツバラ科などでは地中生であることが知られている。配偶体が地中生であるにもかかわらず、ハナヤスリ科ハナワラビ属では種間雑種が多数知られており、一般的には移動困難と考えられる地中で、精子がどのように移動するのかは全く未解明であった。

## 2. 研究の目的

シダ植物の配偶体の特性と種形成様式の相関を、地中生配偶体を持つハナヤスリ科ハナワラビ属をモデルに用いた研究から明らかにする。特に複数種混生集団における、地中での配偶体の空間分布解析を行うことで、地中生配偶体における地中での遺伝子流動の実態解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)地中生配偶体を効率良く土壌から分離し、空間分布を再現する方法の検討を行った。

①土壌採取は金属杵を埋め込んで、土壌毎回収する方法を検討し、適切な杵サイズ・金属板厚等を検討した。

②土壌からの分離は、Johnson-Groh et al. (2002)に基づいて、さらに遠心分離の方法の効率化を検討した。

(2)極めて小型の地中生配偶体からDNAを抽出し特定領域を増幅する方法を比較検討し、分子同定に利用可能な分子マーカーの検討も行った。

①直径1mmに満たない配偶体を、証拠標本として半分を保存しつつ、DNAを抽出する方法を検討した。

②日本産のハナヤスリ科のほとんどの種を収集し、DNAバーコーディングの可能性を検討した。葉緑体遺伝子だけでなく、核遺伝子の利用も検討した。

(3)筑波実験植物園内の自生集団をモデルに地中生配偶体の空間分布解析を行った。

(4)上記配偶体と同一集団を形成する、複数種の胞子体について平面分布の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1)ステンレス杵を用いた土壌の採取や、篩と遠心分離による地中生配偶体分離技術の確立によって、効率的な地中生配偶体の空間分布解析が可能になった。

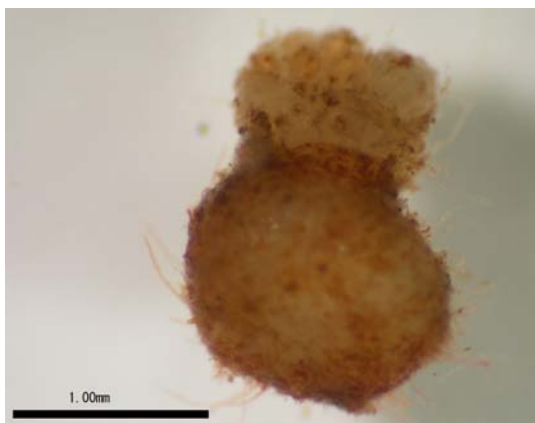


図1 土壌から分離された配偶体

(2)葉緑体 *trnL-F* 領域、核 *GapC* 領域の塩基

配列を解析することによって、配偶体の分子同定法を確立した。

(3)筑波実験植物園内落葉広葉樹林下に自然状態で形成された胞子体の3種混生集団（オオハナワラビ・フユノハナワラビ・アカハナワラビ、南北約17m・東西約22m）の30地点において土壌中の配偶体の空間分布解析を行った結果、特に胞子体の少ない東側地点から多数の地中生配偶体を分離した。これらの地点では異なる2種の配偶体が空間的に近接して高密度で生育している実態が明らかになった。

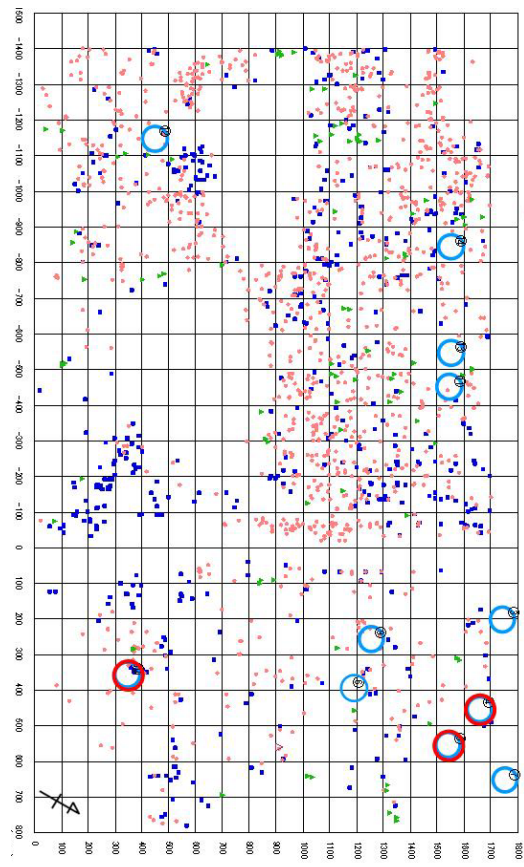


図2 調査地の胞子体分布図（葉身長3cm以上の個体） 1メッシュは1×1m、■オオハナワラビ、●アカハナワラビ、▲フユノハナワラビ。

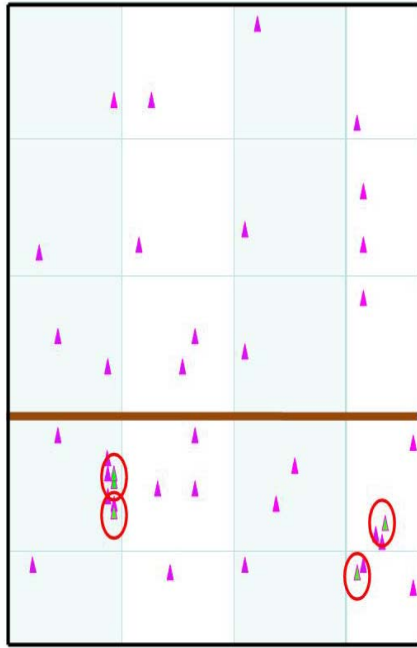


図3 土壤採取地点▲と配偶体を含んでいた土壤（○囲み）

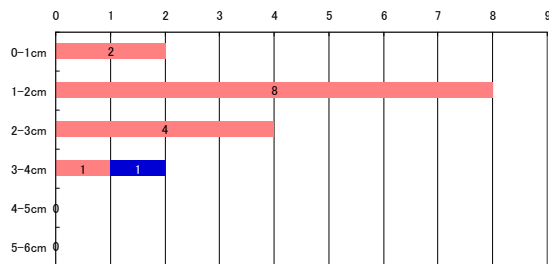


図4 配偶体が発見された土壤採取地点の例と分子同定結果（■オオハナワラビ、■アカハナワラビ）  
土壤は深さ1cmの層別に採取

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 Ebihara, A., Nitta, J. H. and Ito, M., Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan、査読有、5巻、2010、e15136.

〔学会発表〕（計2件）

- ① 海老原淳・神保宇嗣・伊藤元己・加藤雅啓、系統的多様性(PD)から見た日本産シダ植物のホットスポット、日本植物学会、2009年9月18日、山形大学
- ② 海老原淳・山岡麻美・迫田曜他2名、「独立配偶体種」は日本にもあるか?、日本植物分類学会、2009年3月13日、宮城県民会館（仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 淳 (EBIHARA ATSUSHI)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究  
部・研究員

研究者番号：20435738