

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 9日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20770073

研究課題名（和文） アカネ科における倍数体の起源および二型花柱性喪失と自殖の進化に関する研究

研究課題名（英文） Origin of polyploids and evolution of selfing associated with breakdown of distyly in Rubiaceae

研究代表者

内貴 章世 (NAIKI AKIYO)

岡山大学・大学院教育学研究科・講師

研究者番号：30393200

研究成果の概要（和文）：アカネ科のアリドオン属においては、二型花柱性（短雄しべ・長雌しべをもつ花と長雄しべ・短雌しべをもつ花がみられる現象）は倍数性と相関し、4数体では二型花柱性が崩壊している。本研究では二型花柱性をもつ2倍体では自家・同型不和合性を示し、二型花柱性を持たない4倍体では自家受精による結実が可能であることが明らかになった。また分子系統学的解析により、4倍体の出現はアリドオン属内で複数回起こっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Distyly in *Damnacanthus* (Rubiaceae) is associated with poliploidization, and tetraploids do not show distyly. In this study, it was revealed that diploid *Damnacanthus* species showed self- and intramorphic- incompatibility and tetraploid species had self-compatibility. Phylogenetic analysis of *Damnacanthus* suggested multiple origins of polyploidization within the genus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：植物系統分類学、植物繁殖生態学

科研費の分科・細目：

キーワード：倍数化、自殖、異型花柱性、二型花柱性、アカネ科

1. 研究開始当初の背景

被子植物において、自殖（自家受粉による生殖）の成立要因について追求することは、種分化機構の主要な一側面を解明することにつながる。自殖を行う被子植物は多くの分類群で見られ、約40%がその能力をもち、約

20%がもっぱら自殖を行っている。本研究は、二型花柱性は被子植物の約20の科で見られる。これは、外交配を促進するための種内の形態的多型で、めしべが長くおしべの短い花（長花柱花）を付ける株とめしべが短くおしべが長い花（短花柱花）を付ける株が存在

する現象であり、アカネ科には比較的多くみられる。二型花柱性植物は、一部を除いて短花柱花と長花柱花間での受粉のみ結実に至ることができる。

報告者らは、東アジアに約 10 種が分布するアカネ科アリドオシ属 *Damnacanthus* において、二型花柱性をもつ分類群もたない分類群があることを発見し、さらに、二型花柱性をもつ分類群は 2 倍体、二型花柱性を持たない分類群は 4 倍体であることを明らかにし、二型花柱性の喪失は倍数化による可能性が非常に高いことを示した。

これまで、二型花柱性植物における自殖は、集団の分断や極小化と、送粉を行う昆虫の減少などの要因によって、長花柱花内、短花柱花内でまれに起こる自家受粉がもとで生じる、という観点からの研究がもっぱらなされてきた。

しかし、申請者が野外における予備調査を行ったところ、倍数化によって二型花柱性を失ったと考えられるアリドオシ属の 4 倍体の分類群の一つ (*D. macrophyllus*) では、大きな集団であるにもかかわらず、結実率が高く、自殖を行っていることが示唆された。一方で、2 倍体分類群の一つ (*D. biflorus*) で予備的な交配実験を行い、蛍光顕微鏡で花粉管の発芽を観察したところ、短花柱花内、長花柱花内での受粉 (非適法受粉) による花粉管の発芽数は、短花柱花・長花柱花間の受粉 (適法受粉) によるものよりも大幅に少なかった。したがって、アリドオシ属においては集団の分断や極小化、訪花昆虫の現象といったことが要因で自殖が進化しているのではなく、倍数化とそれに伴う二型花柱性の喪失が要因で自殖性を獲得したと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、倍数化とそれに伴う二型花柱性の喪失が自殖の進化をもたらした、という新たな視点で、2 倍体と 4 倍体のみられるアカネ科アリドオシ属の植物を用い、自殖の成立要因の一部とその有利性を実験的に検証し、また倍数体の起源となった植物種を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 自家・同型不和合性の検証

アリドオシ属において、二型花柱性をもつ 3 分類群 (*Damnacanthus biflorus*, *D. indicus*, *D. okinawensis*) では、袋がけ、および人工交配実験 (適法授粉と非適法授粉) を行い、雌しべ内における花粉管発芽の観察を行った。二型花柱性をもたない 2 分類群 (*D. indicus*, *D. macrophyllus*) では袋がけ、および人工交配実験 (他家授粉と自家授粉) を行い雌しべ内における花粉管発芽の観察を行うとともに、結実率の調査を行った。

花粉管の観察に関しては、人工受粉後 4 8 時間後の花を 70%エタノールで固定し、雌しべを 8 規定水酸化ナトリウムで軟化後、0.05%アニリンブルー (pH=11) で染色し、蛍光顕微鏡によって観察した。

(2) 分子系統学的解析

アリドオシ属 7 分類群 78 個体において、葉緑体の *trnL-trnF*, *trnL intron 2* 領域に関して塩基配列決定の実験を行い、塩基配列データ (996 形質) にもとづく分子系統樹を構築した。塩基配列データは、塩基置換数のほか挿入欠失数数を塩基置換数に換算しデータとして使用した。系統樹構築は最節約法によって行った。

(3) 4倍体起源種の探索

アリドオシ属 4倍体種 (*D. giganteus*, *D. hainanensis*, *D. indicus*, *D. macrophyllus*) の起源について、候補となる全ての2倍体種の各DNAのリボゾーム5Sおよび18Sの塩基配列をプローブとしたFISH (蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション) 法を用いて検証を行った。

4. 研究成果

(1) 自家・同型不和合性

2倍体の3分類群 (*D. biflorus*, *D. indicus*, *D. okinawensis*) において、長花柱花と短花柱花の間での授粉 (適法授粉) では多数の花粉管が花柱基部まで観察されたが、長花柱花同士、短花柱花同士での授粉 (非適法授粉) ではほとんどの場合、少数の発芽した花粉管は柱頭または花柱上部で伸長が停止しており、強い自家・同型不和合性をもつことが示された (表1)。

4倍体の2分類群 (*D. indicus*, *D. macrophyllus*) においては、自家授粉、他家授粉ともに花粉管の伸長が花柱基部まで観察された。また、人工自家授粉による4倍体の結実率は、*D. indicus* では 55.5 ± 17.5 (SD) %、*D. macrophyllus* では 35.2 ± 30.3 (SD) %であった。

以上のことから、アリドオシ属においては、2倍体は自家・同型不和合性を持つのに対し、4倍体は自家和合性を持ち自殖しうることを示された。

同属内で二型花柱性を持つ分類群と持たない分類群の自家不和合性の有無が研究された例は少なく、本研究は新たな例を提出した。

表1 二型花柱性をもつアリドオシ属3分類群の人工授粉による花粉管の発芽数

分類群 (胚珠親 × 花粉親)	花数 (個体数)	観察された花粉管の本数				
		0	1	5	10	15-
<i>D. biflorus</i>						
P × P (自家授粉)	8 (6)	6	0	2	0	0
P × P (同型内授粉)	3 (2)	3	0	0	0	0
P × T (適法授粉)	5 (5)	0	0	1	0	4
T × T (自家授粉)	34 (15)	33	1	0	0	0
T × T (同型内授粉)	4 (3)	4	0	0	0	0
T × P (適法授粉)	11 (7)	0	1	1	1	8
<i>D. indicus</i>						
P × P (自家授粉)	21 (7)	14	6	1	0	0
P × P (同型内授粉)	8 (5)	6	2	0	0	0
P × T (適法授粉)	9 (8)	0	0	1	0	8
T × T (自家授粉)	24 (11)	24	0	0	0	0
T × T (同型内授粉)	10 (4)	9	0	1	0	0
T × P (適法授粉)	9 (9)	0	0	0	0	9
<i>D. okinawensis</i>						
P × P (自家授粉)	36 (12)	35	1	0	0	0
P × P (同型内授粉)	15 (4)	15	0	0	0	0
P × T (適法授粉)	7 (3)	1	5	0	1	0
T × T (自家授粉)	2 (1)	2	0	0	0	0
T × T (同型内授粉)*	-	-	-	-	-	-
T × P (適法授粉)	3 (1)	0	0	0	0	3

(2) アリドオシ属の系統関係と倍数性の起源
ヤエヤマアオキ *Morinda citrifolia* を外群とした分子系統学的解析の結果、アリドオシ属は2つのクレード (*D. biflorus*, *D. indicus*, *D. okinawensis* のクレードと *D. angustifolius*, *D. giganteus*, *D. macrophyllus*, *D. tsaii* のクレード) に大きく分かれた。また、ツルアリドオシ *Mitchella undulata* はアリドオシ属全体の姉妹群となった (図1)。

2倍体、4倍体の両方がみられる *D. indicus* では倍数体間で同じ塩基配列を持つものが複数個みられた (図1)。属内においても2倍体と4倍体が各クレードに散在していた。このため、アリドオシ属内においては、倍数化が複数回起源し、特に *D. indicus* では4倍体の遺伝子プールに2倍体からの供給が何度もあったことが示唆された。

FISH法による4倍体の起源種の探索に関しては、アリドオシの内在性の蛍光物質により、ローダミン (5S) のシグナルが検出する事が不可能で、18Sの検出をする事はできるが、検出箇所が付随体と一致し、新たな染色体マーカーとして利用出来ないため、検証を行うことができなかった。

倍数化が同属内で複数回起源したと考えられる例の報告はこれまでもいくつかなされているが、倍数化と二型花柱性の喪失が相関し、それが複数回起源していると考えられる例は非常にまれで、本研究はその新たな例を提出した。

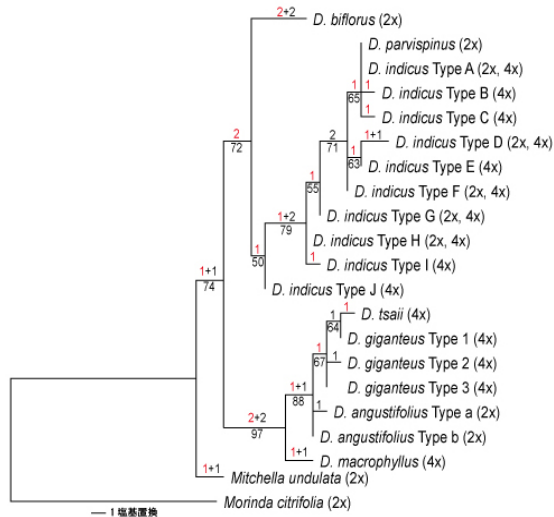


図1 アリドオシ属の葉緑体 *trnL-trnF*, *trnL* intronの塩基配列に基づく最節約法による分子系統樹。枝上の数字は塩基置換数（赤字）と挿入欠失数（黒字）を示し、枝下の数字はブートストラップ値を示す。

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 Naiki, A. Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. *Plant Species Biology* <査読あり> Vol.27, 2012, 3-29.

〔学会発表〕（計1件）

- ① 内貴章世, 永益英敏. アリドオシ属（アカネ科）における倍数化に伴う自家和合性の進化. 日本植物分類学会第11回大会（2012.3.24）於：大阪学院大学（吹田市）

〔その他〕

岡山大学教育学部附属中学校1年生5クラスにおいて、報告者の研究成果の一部に関して、「植物の花の異型花柱性」というタイトルで、二型花柱性植物の観察、計測、グラフ作成、環境とのかかわりを含めた授業を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内貴 章世 (NAIKI AKIYO)

岡山大学・大学院教育学研究科・講師

研究者番号：30393200