

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657158

研究課題名(和文) 光環境適応に関わるトレードオフの遺伝的背景：スミレ属2種を用いた分子進化生態学

研究課題名(英文) Genetic background of tradeoffs related to the adaptation to different light conditions: molecular evolutionary ecology using two *Viola*

研究代表者

遠山 弘法 (Toyama, Hironori)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：00571837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：草原に生育するヒゴスミレ集団に林床性のエイザンスミレが侵入する事で形成された雑種集団を用いて、光環境の変化に伴う遺伝的な変化を調べた。339のAFLPを用い遺伝構造と雑種の世代を調べ、母系をatpI-atpH配列で確認した。葉の厚さ、葉の切れ込みを適応形質として測定した。結果、スギ植林による被陰で雑種個体のゲノムはエイザンスミレに置換わり、ゲノムの置換わりと葉形質の間に相関がみられた。この事は、林床環境に適応的な遺伝子が、雑種形成後、集団中に固定されてきたことを示唆する。QTL解析のために、形質を分離させたF2雑種443個体を作成し、5形質を測定、DNA抽出、AFLPによる多型解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We focused hybrid area of two closely related *Viola* species that was formed by invasions of *V. eizanensis* preferring more shaded places to *V. chaerophylloides* preferring more open places. 339 AFLP loci were used to estimate genetic architecture and generation of hybrids. Maternal inheritance was confirmed thorough sequencing of cpDNA atpI-atpH. Phenotypic variations were measured by leaf thickness and leaf dissection that were diversified between species. Molecular analysis showed that a genome of hybrid individuals was replaced by *V. eizanensis*. Significant correlations were observed between hybrid indices and two leaf traits. These results suggested adaptive genes of *V. eizanensis* to shaded habitats were fixed among hybrids and two leaf traits were important for their adaptation to light environments. For QTL analysis, we measured 5 traits for 443 F2 individuals and analyzed AFLP patterns.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：雑種集団 ゲノムの置き換わり AFLP QTL 光環境

### 1. 研究開始当初の背景

植物は光環境に適応し、様々な形質を進化させてきている。林床性の暗い環境下に生育するエイザンスミレと草原性の明るい環境下に生育するヒゴスミレを比べると、ヒゴスミレは、開放花への投資割合が大きく、葉重/面積比が小さい葉をより多く生産する。この背景には、開放花・閉鎖花への投資のトレードオフ、および葉の寿命と葉の数のトレードオフがあると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)ヒゴスミレ集団にエイザンスミレが侵入することで形成された雑種集団を用いて、光環境変化に伴って遺伝的な置換わりが生じているのかを明らかにする。また、(2)QTL解析で明らかになるトレードオフに関わる遺伝子座群が、野外の雑種集団内で強い連鎖不平衡にあるのかどうかを確かめる。具体的には、開放花・閉鎖花への投資、および葉の寿命と葉の数の違いに注目し、その遺伝的背景を明らかにすることで、エイザンスミレ、ヒゴスミレの適応的種分化の背景にある2つの「トレードオフ」を検証する。

### 3. 研究の方法

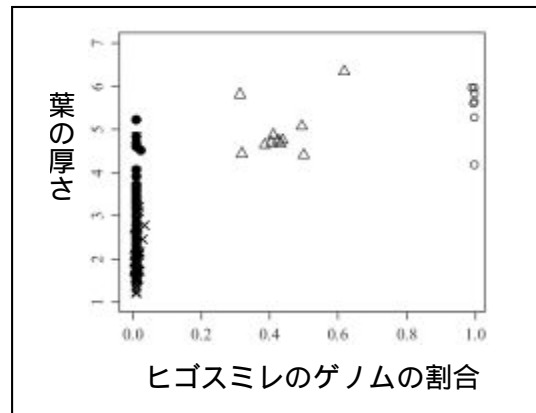
(1) 形質から判断された雑種集団(約 1 km×1 km)が、実際に雑種かどうか5つの AFLP マーカー (MseI-CAT and EcoRI-ACT, MseI-CAC and EcoRI-ACC, MseI-CTA and EcoRI-ACA, MseI-CTG and EcoRI-ACT, and MseI-CAT and EcoRI-ACA)を用いて明らかにする。広範に分布しているため、1箇所あたり6個体ずつ、30箇所から採集し何処に雑種が多く分布しているのかを明らかにする。雑種を特定する際は、母系遺伝する atpI-atpH をシーケンスし、同県内で観察される、エイザンスミレ集団、ヒゴスミレ集団との比較を行う。解析ソフト NewHybrids を用いて雑種集団の世代構成 (F1、F2、BC など) を推定する。また、表現形質としては、種間で分化しており集団内で均一化する選択がはたらいっている葉の厚さ(春葉重/面積)を測定する。雑種集団の個体の遺伝的組成は、解析ソフト Structure を用いて推定し、光環境勾配に沿った遺伝子型の分布を調べる。

(2) 同一環境下で生育させている F2、443 個体を用いて QTL 解析を行う。具体的には、AFLP (MseI-CAT and EcoRI-ACT, MseI-CAC and EcoRI-ACC, MseI-CTA and EcoRI-ACA, MseI-CTG and EcoRI-ACT, and MseI-CAT and EcoRI-ACA)、マイクロサテライトマーカーを用いて、連鎖地図を作製し、5項目について形質測定を行い、拮抗的な多面発現効果を持つ QTL の検出、および検出された QTL における方向性選択の歴史を明らかにする。また、雑種集団を用いて、QTL 解析で特定されたトレードオフに関わる遺伝子マーカー

が、雑種集団内の光環境勾配の中でどのように分布しているのか、また、強い連鎖不平衡にあるのかを明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 5つの AFLP プライマーセットを用いる事で339バンドを得ることができ97.7%の再現性を得ることができた。339のバンドの内エイザンスミレに特有のバンドが69個、ヒゴスミレに特有のバンドが16個見つかった。エイザンスミレ、ヒゴスミレに特有の AFLP バンドの両方を持っている個体が、雑種集団内で81個体(58.3%)見つかった。また、atpI-atpHのシーケンス結果、Structureによるゲノム組成の結果から、ヒゴスミレを母系に持ちながら、ゲノムがエイザンスミレに置き換わっている雑種が9個体つかった。これらの結果は、林床環境に適応的な遺伝子が、雑種形成後、集団中に固定されてきたことを示唆する。また、これまでの研究から種間で多様化している葉形質を測定したところ、ヒゴスミレのゲノムの割合と形質には正の相関がみられた。この結果は、光環境の適応に重要だと考えられる葉形質は、両種を識別するのに重要な形質である事が示唆された。

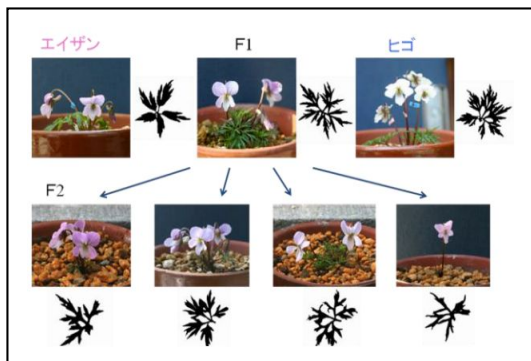


今後は、(2)の QTL 解析で特定されるトレードオフに関わる遺伝子座群が、野外の雑種集団内で強い連鎖不平衡にあるのかどうかを確かめていく。このような、トレードオフに関わる遺伝子座間の強い連鎖不平衡を野外で実証した研究例はなく、新しい点だと言える。また、以上のような解析を行うことで、実験室で解明されたことが、きちんと野外で反映されているのかを確かめることができ、光環境への適応という植物で一般的な現象の実態について実証的に迫ることができる。

エイザンスミレとヒゴスミレは姉妹種といわれているが、形質データからのみである。そこで、スミレ属全体での2種の系統関係を調べるために、全国から251個体サンプリングを行い、雑種等を含む109種について、rbcL、atpB-rbcL、rpoC1、psbK-Iのシーケンスを行った。結果、エイザンスミレ、ヒゴスミレ

の姉妹種関係が確認された。今後は、シーケンス領域を増やし、解像度を上げスミレ属全体の系統樹として発表予定である。

(2) 生育させた雑種には大きな形質の分離が観察された。形質測定は、葉面積、葉重/面積、葉数、開放花数、閉鎖花数に対して行い、現在解析を進めている。



F2 個体 443 個体について DNA 抽出と 5 プライマーセットでの AFLP による多型解析を行った。現在、波形を読み取る作業を順次進めている。

#### 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)

[雑誌論文](計 2 件)

Toyama, H., S. Tagane, P. Chhang, T. Kajisa, R. Ichihashi, V. Samreth, V. Ma, H. Sokh, A. Katayama, H. Itadani, M. Tateishi, Y. Tachiki, K. Mase, Y. Onoda, N. Mizoue, H. Tachida & T. Yahara. 2013. Inventory of the Woody Flora in Permanent Plots of Kampong Thom and Kampong Chhnang Provinces, Cambodia. Acta Phytotax. Geobot. 64: 45-105. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009657378> (査読有り)

Toyama, H. & T. Yahara. 2012. Adaptive species differentiation and population uniformity in Viola species sharing similar geographical distribution but differing habitat preferences 1: 26-39. DOI: 10.5539/jps.v1n2p26 (査読有り)

[学会発表](計 10 件)

遠山弘法 群集組成における競争排他と環境制約の相対的な重要性, 日本植物分類学会13回大会、2014年3月、熊本

遠山弘法 チャオシー川下流域における水草類の多様性、日本生態学会第61回大会、

2014年3月、広島

Toyama H. The effect of illegal logging on forest diversity in permanent sample plots, Kampong Thom Cambodia. Asia Forest Workshop 2013, Phnom Penh, Cambodia, 3-4 December 2013.

Toyama H. DNA barcoding and community phylogenetics in 32 permanent plots of Kampong Thom, Cambodia Invited speaker, East Asian Plant Diversity and Conservation, Korea November 7, 2013

遠山弘法 森林動態による系統的群集構造の変化-カンボジアの森林プロットを用いて-、第 23 回日本熱帯生態学会年次大会、口頭発表、福岡、2013 年 6 月 16 日

遠山弘法 群集系統関係に対する違法伐採の影響-カンボジアのコンポントムプロットを用いて- 第 60 回日本生態学会、2013 年 03 月 05 日~2013 年 03 月 09 日、静岡県。

Toyama, H., S. Tagane, R. Ichihashi, Y. Onoda. Forest plot studies using DNA barcoding. The 5th East Asian Federation of Ecological Societies (招待講演), 19 March 2012, Shiga, Japan.

Toyama, H. Evaluation of biodiversity in Cambodia. I. Identification using DNA barcoding of forest trees in Cambodia. II. Preliminary results of phylogenetic community structure. 九州大学創立百周年記念「グローバル化する世界と多様性」国際シンポジウム 2011. Oral sessions. Fukuoka, Japan. November 19, 2011.

Toyama, H. Identification using DNA barcoding of forest trees in Cambodia. Conference on Biodiversity Informatics in Indonesia (招待講演), 15 September 2011, Gunadarma, Indonesia.

Toyama, H. & T. Yahara. Adaptive Species Replacement in Hybrid Population of Two Closely Related Viola Species Occurring in Contrast Habitats. Society for Molecular Biology & Evolution. 27 June 2011. Kyoto, Japan.

[図書](計 3 件)

Toyama H., S. Tagane, T. Kajisa, P. Chhang and T. Yahara. A pictured guide of forest trees in Cambodia II ~Kampong Thom~. Published by the Center for Asian Conservation Ecology, Kyushu University,

1-272 (2013).

H. Toyama, S. Tagane, T. kajisa, P. Chhang, R. Ichihashi and T. Yahara: A pictured guide of forest trees in Cambodia I Kampong Chhnang. Published by Center for Asian Conservation Ecology, Kyushu University, April 2012. 109 pages.

T. Yahara, M. Akasaka, H. Hirayama, R. Ichihashi, S. Tagane, H. Toyama, R. Tsujino: (S. Nakano et al. eds.) The Biodiversity Observation Network in the Asia-Pacific Region, pp. 3-19, Springer (2012) "Strategies to observe and assess changes of terrestrial biodiversity in the Asia-Pacific Regions" .

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

遠山 弘法 (TOYAMA, HIRONORI)

九州大学・大学院理学研究院・学術研究員

研究者番号 : 00571837