

# 開花時期の違いによるキバナシャクナゲの花粉散布および結実成功の変動パターン (高山の多雪環境がもたらす遺伝的多様性メカニズムの解明)

生態環境科学専攻 地域生態系学講座  
博士後期課程3年 平尾 章 (指導教官 工藤 岳)

## 1. 背景

野生生物集団の遺伝的多様性が形成・保持される過程において、遺伝子流動は遺伝的浮動や自然選択と共に重要な役割を果たす。理論的には、遺伝子流動は互いの距離に応じて減少すること (isolation-by-distance) が示されているが、野外では単純な空間配置だけではなく、景観特性やそれに付随した生態学的要因が遺伝子流動を大きく左右する。本研究では、景観特性が遺伝子流動に与える影響を通して、遺伝的多様性のメカニズムにアプローチする。

モデル系として、高山多雪地域の重要な景観要素である雪 (残雪パッチ) を景観特性として取り挙げ、雪によって生活史スケジュールが規定される高山植物の遺伝子流動と遺伝構造の解明を試みた。高山では、生育場所の消雪時期 (雪解け傾度) に応じて開花フェノロジーが異なる集団がモザイク状に存在する。雪解け傾度を持つ高山生態系は、モデル系として次の特徴を持つ。

- (1) 開花フェノロジーの異相によって花粉媒介による遺伝子流動が制限されるため、集団間または集団内で雪解け傾度に沿った遺伝構造が生じる可能性がある。
- (2) 訪花昆虫相が質・量ともに季節変化するため、開花フェノロジーの異なる集団で遺伝子流動がダイナミックに変化することが期待される。

特徴(1)については、雪田草本植物 3 種の集団間の遺伝構造がすでに明らかになっている (2003 年度成果報告書; Hirao & Kudo 2004)。ここでは、特徴(2)の訪花昆虫を介した遺伝子流動の変動性について報告する。

植物の花粉散布パターンは、繁殖成功や遺伝子

流動を通して、集団の遺伝的多様性の規定する要素の1つである。自ら移動することのできない植物は、花粉の運搬を媒介者に委ねる。もし環境の変化によって送粉者が変化すれば、花粉散布パターンはどの程度変動するだろうか? 対象の高山植物であるキバナシャクナゲ (*Rhododendron aureum* Georgi) は、消雪時期の違いによって開花フェノロジーおよび訪花昆虫相が質・量ともに大きく異なるので (Fig. 1), 花粉媒介による遺伝子流動のダイナミックな変化を検出することが可能であろう。本研究では、消雪時期に沿って開花時期が大幅に異なる2つのプロットを設定し、結実成功および花粉散布パターンを比較検証した。

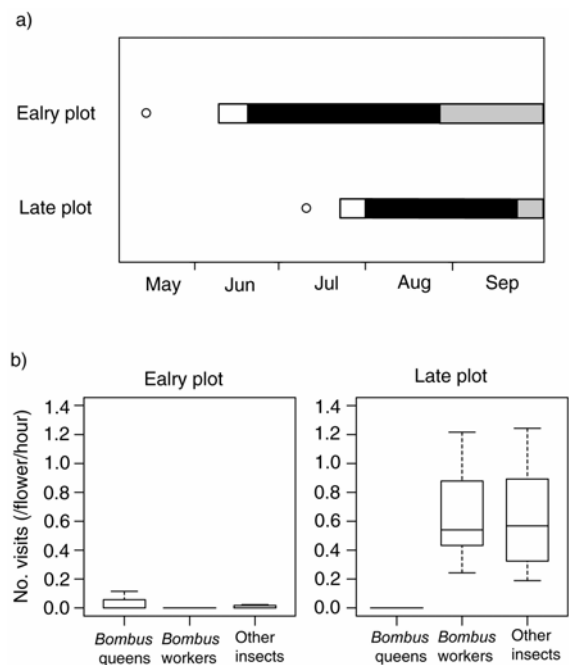


Fig. 1. Reproductive phenology of *Rhododendron aureum* and frequency of insect visits in the early and late snowmelt plots in 2003. a) Flowering and fruiting phenology (open circle: snowmelt, open bar: flowering season, solid bar: fruiting period, shadow bar: seed dispersal). b) Frequency of insect visits per flower per hour ( $N = 7$  hours). Vertical bars indicate SD. Measurements were performed on the 17th and 19th of June in the early plot and 28th and 29th of July in the late plot.

## 調査方法

対象種のキバナシャクナゲ(ツツジ科)は矮生低木であり、風衝地から雪田まで広く分布する。1花序あたり2~5個のクリーム色の花をほぼ同時に開き、その寿命は1週間前後である。自動的自家受粉機構は存在しない(Kudo 1993)。

2003年に大雪山・ヒサゴ沼の南西斜面に早期消雪プロット(5月中旬雪解け・6月上旬開花)と晩期消雪プロット(7月中旬雪解け・7月下旬開花)を40m×10mの大きさで設定した。ポリネーターの訪花頻度(1花1時間当たりの昆虫の訪問数)および結実成功(結果率および結実率)を調査した。2004年に交配システムを確認するために、早期プロットにおいて強制自家受粉および強制他家受粉処理を行った。

分子マーカーには5つのマイクロサテライト DNA 遺伝子座 (RM2D5, RM3D1, RM9D1, RM9D6, RM9D9; Naito *et al.* 1999)を用いた。親集団の遺伝的多様性を推定するために各プロットから50~70枚の葉をサンプリングした。また各プロットから12個の果実を選び、1果実あたり10~20の種子について他家花粉による受精率(他殖率)を求めた。

花粉散布パターンの評価には、他殖種子を選び、two generation analysis (TwoGener: Smouse *et al.* 2001; *Evolution* 55: 260-271) を自作 R プログラムにより実施した。また果実内の種子の花粉親多様性を評価するために、プログラム PARENTAGE (Wilson 2000)を用いて種子の兄弟関係の振り分けを行ない、花粉親数や花粉親の同一度を推定した。

## 2. 結果

### [訪花昆虫活性・開花密度]

キバナシャクナゲの主要な訪花昆虫はマルハナバチであり、早期プロットでは女王の訪花が稀に観察された(Fig. 1b)。一方で、晩期プロットでは女王は認められず、マルハナバチのワーカーおよびハナアブなどが10倍以上の高頻度で訪花していることが観察された(Fig. 1b)。各プロットの開花密度は同じレベル(早期:  $2.9 \pm 1.7$  SD, 晩期:  $2.3 \pm 1.1$  花

**Table 1** Genetic diversity of five microsatellite loci in *Rhododendron aureum* at each plot.

Locus	Early snowmelt plot (N = 33 genets)			Late snowmelt plot (N = 29 genets)		
	A	He	F	A	He	F
RM2D5	15	0.857	-0.025	16	0.900	0.003
RM3D1	15	0.877	-0.036	12	0.873	0.013
RM9D1	5	0.300	-0.112	2	0.100	-0.037
RM9D6	12	0.804	-0.018	11	0.887	-0.011
RM9D9	5	0.715	-0.101	6	0.753	-0.043
Average	10.4	0.711	-0.049	9.4	0.703	-0.009

A: number of alleles per locus, He: expected heterozygosity, F: Wright's fixation index. All of the F values did not differ significantly from zero according to randomization tests (Godet 2000)

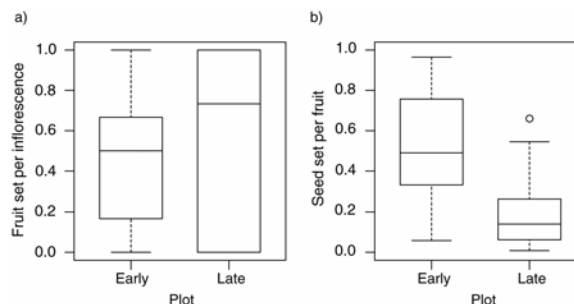
序/m<sup>2</sup>)であり、開花密度がもたらす訪花頻度への影響はほぼ無視することができる。

### [親集団の遺伝的組成]

早期プロットからは33ジェネット、の晩期プロットからは29ジェネットが検出された(Table 1)。各プロットの遺伝子多様度は同レベルであり、近交係数Fが0と有意に変わらないことから、親集団ではHardy-Weinberg平衡が成立していた(Table 1)。

### [種子生産]

訪花頻度がプロット間で明確に異なる一方で、結果率(果実数/着花数)には、プロット間で違いが認められなかった(Fig. 2a)。また予想に反して、訪花活性の高い晩期プロットにおいて成熟果実あたりの種子生産量が減少した(早期結実率 = 0.52, 晩期結実率=0.17; Fig. 2b)。



**Fig. 2.** Fruit-set ratio (a) and seed-set ratio (b) of *Rhododendron aureum* in the early and late snowmelt plots in 2003. Box plots show the median and the ranges from 25-75th and 10-90th percentiles. Multi-level logistic analyses showed no significant difference for the fruit-set ratio ( $P > 0.1$ ) but a significant differences for the seed-set ratio ( $P < 0.001$ ) between the plots.

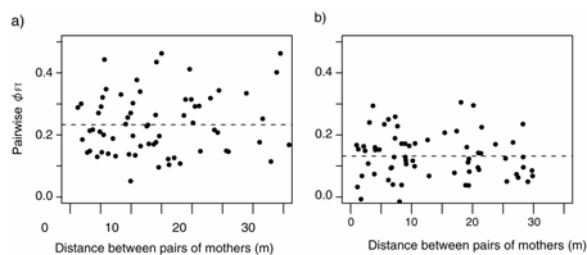
**Table 2** The maximum likelihood estimators in the multilocus ( $f_m$ ), and single locus outcrossing rate ( $f_s$ ), and biparental inbreeding in the early and late plot. Mean $\pm$ SE.

Plot	$n$ (12 fruits)	$f_m$	$f_s$	Biparental inbreeding
Early	153	0.89 $\pm$ 0.051	0.88 $\pm$ 0.046	0.007 $\pm$ 0.024
Late	142	0.67 $\pm$ 0.071	0.62 $\pm$ 0.090	0.053 $\pm$ 0.029

他殖率は、早期よりも晩期プロットで低い値を示した (Table 2). また晩期プロットでは二親性の近親交配が認められた (Table 2). 受粉実験の結果, キバナシャクナゲは自家受粉でもほとんど全ての花が果実は発育するが, 種子稔実率は非常に低下した (自家和合性指数 = 0.120).

#### [花粉流動の程度]

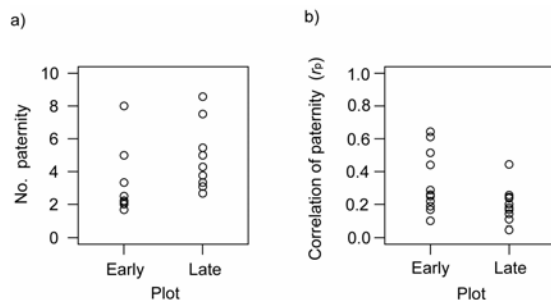
TwoGener のパラメーターである花粉遺伝子プールの遺伝的分化係数 ( $\phi_{FT}$ ) は, 0 から 1 までの範囲で花粉流動の強さを示し, 値が小さいほど花粉散布が促進されていることを意味する. 花粉遺伝子プールの遺伝的分化係数は, 早期から晩期にかけて約半分に押し下げられ (早期  $\phi_{FT} = 0.233$ , 晩期 = 0.135; Fig. 3), 訪花活性の高い晩期プロットにおいて花粉流動が増加したことが示された. 花粉散布が親から離れるにしたがって指数関数的に減少する場合, 花粉プールの遺伝的分化係数は一般に物理距離の増加関数として表される. しかしながら, どちらのプロットとも物理距離に依存した花粉散布パターンは認められなかった ( $P > 0.1$ , overall Mantel test).



**Fig. 3.** Distribution of pairwise  $\phi_{FT}$  in the early (a) and late snowmelt plots (b). The dashed line shows the level of global  $\phi_{FT}$  (0.233 and 0.132 in the early and late plot, respectively).

#### [花粉親の多様性]

プログラム PARENTAGE (ベイズ・アルゴリズム) によって推定した他殖種子 10 個当たりの平均花粉親数は, 早期プロットで 3.2, 晩期プロットで 5.5 であり, 晩期プロットの方が増加していた (Fig. 4a). さらに果実内の他殖種子の同一度 ( $r_p$ : full sib のペア数/全ペア数) は, 早期プロットで 0.335, 晩期プロットで 0.211 であり, 晩期プロットの方が花粉親の多様性が増加していた (Fig. 4b). 最尤推定法に基づいたプログラム MLTR (Ritland, 2002) でも, 花粉親の多様性は同様の傾向を示した (早期で 0.475, 晩期で 0.275).



**Fig. 4.** Diversity of pollen parents within fruits. a) Number of paternal contributors per 10 outcrossed seeds. A significant difference between the plots was assessed by Mann-Whitney  $U$ -test ( $P < 0.05$ ). b) Correlation of paternity ( $r_p$ : proportion of full sibs among all pairs). A marginally significant difference was detected between the plots ( $P = 0.057$ , Mann-Whitney  $U$ -test).

#### 4. 考察

キバナシャクナゲの花粉散布は, ポリネーター活性に応じて異なったパターンを示した. 晩期プロットでは, ポリネーターの頻繁な訪花行動に応じた花粉流動の増加が明らかになった (Fig. 3). Two generation analysis における花粉散布モデルでは, 花粉散布距離だけでなく有効な花粉親密度の増加も花粉プールの遺伝的分化を緩和する役割を果たす (Smouse et al. 2001; Austerlitz & Smouse 2001; Austerlitz & Smouse 2002). したがって晩期プロットにおける花粉親多様性の増加 (Fig. 4) が, 花粉プールの遺伝的分化の緩和 (つまり花粉流動の促進) を引き起こしたと解釈することができる.

果実当たりの有効な花粉親数を花粉親同一度 ( $r_p$ ) の逆数と定義すると, 早期では 2.1, 晩期では 3.6 の

花粉親が種子生産に貢献していることになる。キバナシャクナゲの果実あたりの胚珠数は 400~600 であり、胚珠数に比べてごく少数の花粉親で種子生産が賄われていた。シャクナゲ属は粘着糸に包まれた四量体花粉を生産するため、効率よく送受粉が行なわれるようである。キバナシャクナゲの花粉/胚珠数比は、自殖植物と同程度の値 (276, unpublished data) であり、送受粉効率の高さを支持する。今回解析したキバナシャクナゲの  $F_T$  の値は、先行研究 (e.g. Dick *et al.* 2003) に比べて非常に高い値であり、少ない花粉親数が高い  $F_T$  値の原因となっている。

訪花昆虫活性に対応した花粉散布パターンの変化によって、種子生産のパターンは変化したが、訪花頻度そのものから予測されるような生産パターンは認められなかった。キバナシャクナゲの果実発達の有無には、受粉される花粉の質 (自家花粉 vs 他家花粉) は影響しない。果実生産は、プロット間で同程度であり、柱頭に一度でも花粉が付着する機会はプロット間で差がなかったのだと考えられる。しかしながら、稔実率は訪花頻度の高い晩期プロットにおいて、予想に反して減少していた。その原因の1つとして、遅い雪解けの晩期プロットでは光合成期間が減少するため、資源制限を受けた可能性が挙げられる。しかしながら資源配分モデルによれば、資源制限を受けた場合は他殖種子よりもまず自殖種子の生産が抑制されるとの予測や報告があり、晩期プロットでの自殖率の増加を説明することができない。そこで種子生産の律速要因として、頻繁な自家受粉および隣花受粉による胚珠中絶の増加を挙げることができる。受粉実験では自家受粉処理によって稔実率が非常に低下することが示されている。

一般にマルハナバチの女王は点在型の採餌飛行をおこなうのに対して、ワーカーは花粉の採取を行いながら近距離を連続的に訪花するので、自家または隣花受粉が促進されやすいと考えられる。晩期プロットにおける二親性の近親交配の存在は、血縁個体間つまりは隣接するキバナシャクナゲをポリネーターが移動していることを示唆している。今後、ポ

リネーターの訪花頻度だけでなく、行動パターンを含めたデータの解析が望まれる。

早期・晩期の両プロットとも、自殖種子が含まれる種子形成時の遺伝子頻度は近親交配の影響を受けていたのに対し、親集団の遺伝子頻度は Hardy-Weinberg 平衡を示しており、近交弱勢の存在が示唆された。一般に、自殖種子は不安定なポリネーション環境において繁殖成功を保證する役割を果たすと考えられているが、近交弱勢が強く働くならば自殖種子の生産コストは高くなる。キバナシャクナゲにおける自家受精胚珠の高い中絶率は、匍匐枝によってクローン繁殖する際の隣花受粉のリスクを緩和しているのかもしれない。

今回解析を行なった花粉散布パターンの変化は、現行の遺伝子流動 (contemporary gene flow) の変動性を示している。しかしながら集団の遺伝構造の発達には、幾世代にも渡る遺伝子流動の蓄積効果 (historical gene flow) を考える必要がある。高山生態系全体における遺伝的多様性の形成・維持のメカニズムについては、今後、時空間的規模を積み重ねた調査・解析が必要だろう。

## 5. 発表

Hirao AS, Kudo G (2004) Landscape genetics of alpine-snowbed plants: comparisons along geographic and snowmelt gradients. *Heredity*, **93**, 290-298.

Hirao AS, Kameyama Y, Ohara M, Isagi Y, Kudo G (投稿中) Seasonal changes in pollinator activity influence the pollen dispersal and seed production of an alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). *Molecular Ecology*

平尾章, 亀山慶晃, 大原雅, 井鷲裕司, 工藤岳 (2005) 開花時期の違いによるキバナシャクナゲの花粉散布および結実成功の変動パターン. 第 52 回日本生態学会, 大阪 [3.30]