

日本産ブナ科樹木花粉の電子顕微鏡による形態と分子進化

原田 光*・玉置 教司*・上谷 浩一*・武智 裕里*

Pollen morphology observed by scanning electron microscopy
on Japanese Fagaceae species and molecular phylogeny

Ko HARADA *, Kyoji TAMAKI *, Koichi KAMIYA * and Yuri TAKECHI *

Summary: Pollen morphology was observed by scanning electron microscope for 18 tree species of Fagaceae growing in Japan. We also reconstructed phylogenetic trees using molecular variations detected by AFLP method for all 20 species including four genera except *Fagus* in Japan. We comparatively discussed how much of the pollen morphology is reflecting the phylogenetic relationship revealed by the molecular method. All of the Fagaceae pollen examined was tricolporate. The largest distinction was observed on the shape and the surface sculpture between anemophilous and entomophilous pollen. In entomophilous pollen they are typically prolate or perprolate and having smaller size. Surface of the pollen is smooth and has regulate sculpture. In anemophilous pollen they are typically spheroidal and having larger size. The surface sculpture is granulate and often rough and irregular. The UPGMA tree based on AFLP analysis showed that species in *Quercus* was polyphyletic, while *Castanea-Castanopsis* and *Lithocarpus* constructed monophyletic groups. The species in Subgenus *Cyclobalanopsis* and the sections in subgenus *Quercus* are also monophyletic. Pollen morphology was distinctive at genus, subgenus and sectional level. Variation in pollen morphology was observed in the size and shape of *Fagus crenata* and in the surface sculpture of *Quercus serrata*.

* 森林資源生物研究室 Laboratory of Resources Biology

要 旨 日本にはブナ科樹木として5属22種が生育するが、各属を代表する18種についてその花粉を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。一方ブナ属2種を除いた20種について AFLP による変異を検出し、これに基づく UPGMA 系統樹を作成した。花粉形態と分子系統樹を照らし合わせて、花粉の形状がどれくらい系統関係を反映しているかを比較検討した。その結果、すべての樹種の花粉が三溝孔型といわれるものであり、最も大きな差異が風媒と虫媒の花粉で生じていた。虫媒では長球状、小型化する傾向があり、表面は滑らかで規則的な表面彫刻が見られた。風媒花粉では球状化、大型化する傾向があり表面彫刻は粗く、不規則であった。AFLP による UPGMA 系統樹ではコナラ属は多系統になり、その位置が確定できなかったが、クリ属-シイ属およびマテバシイ属はそれぞれ単系統になった。またアカガシ亜属、およびコナラ亜属内の各節もそれぞれ単系統になった。花粉の形態と表面形状により属、亜属および節の区分は明確に区別された。属もしくは亜属内の種間においても差異が認められた。またブナでは花粉の大きさや形状に関して地域間の差異が認められ、またコナラでも表面彫刻に個体間の変異が認められた。

1. は じ め に

ブナ科樹木 (*Fagaceae*) は世界中に9属約900種が知られており、北半球の温帯の森林から、熱帯アジアの山地林にかけて世界中に広く分布する。各属に含まれる種の数にはきわめて大きな偏りがあり、最も多くの種数を有するのはコナラ属 (*Quercus*) で、世界中に全種数の半数、約450種が生育する。これはアジア、ヨーロッパ、北アメリカの冷温帯を中心に分布する落葉性のコナラ亜属 (*Subg. Quercus*) と、東アジアから東南アジア熱帯山地にかけて分布する常緑性のアカガシ亜属 (*Subg. Cyclobalanopsis*) に分けられる (Nixon, 1984 and 1989)。以下、マテバシイ属 (*Lithocarpus*) 約300種、シイ属 (*Castanopsis*) 120種、ブナ属 (*Fagus*) 12種、クリ属 (*Castanea*) 10種、トゲガシ属 (*Chrysolepsis*) 2種と広義のカクミガシ (*Trigonobalanus sensu lato*) 3属3種となっている (Nixon, 1989)。日本ではこのうちブナ属2種、クリ属1種、シイ属2種、マテバシイ属2種、およびコナラ属15種の、5属、22種の樹種が知られており、それぞれ落葉広葉樹林や常緑広葉樹林の主要構成樹種となっている。またブナ科樹木は古くから世界各地で様々な形で利用されてきており、日本でもなじみの深いものである。

近年になって分子生物学的手法を用いて系統解析を行うことが可能になったが、その注目すべき効果は種間の系統進化的な関係を形態的特徴とは無関係に塩基置換数に基づいて定量的に示すことが出来るようになったことである。これにより、これまで系統分類の基本とされてきた外部形態、あるいは解剖学的な特徴は分子系統樹に照らして見直すことが必要になり、改めて形態変化の適応進化的な機能上の意味が問われることになった。

花粉形態は植物の進化に伴って変化してきたことが知られるが、とくに発芽口の数、形状、位置は科の間の大きな系統関係を区別する重要な形質として用いられてきた。また、花粉表面の模様(表面彫刻)は、属間の系統区分に有用であるとともに、種レベルにおいてもかなりの形態的分化が進んでいることが知られ、花粉分析において種の同定に用いられる重要な形質となっている。分子分類によって書き換えられつつあるブナ科樹種の系統関係を花粉の形態変異はどのように反映するのか、とくに送粉、受粉、種子散布および発芽の形態といった繁殖機能の進化的変化に花粉形態がどのように対応しているのかは興味深い問題である。形態分類の立場では、種の分類基準となる形態的特徴は環境の

違いによって変化するものであってはならないとする考え方があった (Darwin, 1859)。このような観点から花粉形状が安定的なものなのか、すなわち形態に固定された種内変異が存在するのかということも検証すべき問題である。

ブナ科樹木では今日に至るまで属および節の弁別にいくつかの問題が指摘されている。核遺伝子や葉緑体遺伝子のレベルから分子分類学的研究が進められているが、コナラ属の位置関係はまだ明確になっていない。またコナラ属内の各節における種間関係もコナラ属に特徴的に見られる頻繁な種間雑種の形成により不明瞭である。本研究ではこのような観点から日本産のブナ科樹木について新たな分子系統樹を作成し、これに照らして電子顕微鏡観察による花粉形態の系統関係を再検討した。

2. 材 料 と 方 法

2. 1 花粉の走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

2. 1. 1. 花粉サンプルの採集

採集した樹種、採集場所および日時を表1に示した。採集した花粉は観察に用いるまで冷蔵もしくは冷凍保存した。

表1. ブナ科樹木花粉採取日と採取場所

属 名	種 和 名	種 名	採 集 日	採 集 地
ブ ナ 属	ブ ナ	<i>Fagus crenata</i> Blume	1998年5月2日 1995年5月3日	愛媛大学演習林 林木育種センター東北育種場
ク リ 属	ク リ	<i>Castanea crenata</i> Sieb. et Zucc.	1998年5月27日	愛媛大学農学部構内
クリガシ属	ス ダ ジ イ	<i>Castanopsis sieboldii</i> (Makino) Hatusima ex Yamazaki et Mahiba	1998年4月26日	愛媛県緑化センター
	コ ジ イ	<i>Castanopsis cuspidata</i> (Thunb. ex Murray) Schottky	1998年4月23日	愛媛県緑化センター
マテバシイ属	マテバシイ	<i>Lithocarpus edulis</i> (Makino) Nakai	1998年5月28日	愛媛県緑化センター
	シリブカガシ	<i>Lithocarpus glabra</i> (Thunb. ex Murray) Nakai	1998年8月28日	松山市繁多寺
コナラ属	イチイガシ	<i>Quercus gilba</i> Blume	1998年4月26日	愛媛県緑化センター
	アラカシ	<i>Quercus glauca</i> Thunb. ex Murray	1998年4月18日	愛媛県緑化センター
	シラカシ	<i>Quercus myrsinaefolia</i> Blume	1998年5月7日	愛媛県緑化センター
	ツクバネガシ	<i>Quercus sessilifolia</i> Blume	1998年4月26日	愛媛県緑化センター
	アカガシ	<i>Quercus acuta</i> Thunb. ex Murray	1998年5月7日	愛媛県緑化センター
	ミズナラ	<i>Quercus crispula</i> Blume	1998年	森林総合研究所
	カシワ	<i>Quercus dentata</i> Thunb. ex Murray	1998年4月15日	愛媛大学農学部構内
	ナラガシワ	<i>Quercus aliena</i> Blume	1998年4月23日	愛媛県緑化センター
	コナラ	<i>Quercus serrata</i> Thunb. ex Murray	2000年4月22日	愛媛県緑化センター
	クヌギ	<i>Quercus acutissima</i> Carruthers	1998年4月15日	愛媛大学農学部構内
	アベマキ	<i>Quercus variabilis</i> Blume	1998年4月15日	愛媛大学農学部構内
	ウバメガシ	<i>Quercus phillyraeoides</i> A. Gray	1998年4月23日	愛媛県緑化センター

2. 1. 2 資料の調整

花粉のサンプルはSEM資料として導体化コーティングを行った。SEM資料台に両面テープをはり、その上に採取した花粉を落として固定した。次に資料台をIB-2型イオンコーダーによりスパッタコーティング操作で金を300~350Åの厚さで蒸着させた。

2. 1. 3 SEMによる観察

コーティングした資料台を日立-明石走査型電子顕微鏡 MSM-9型に装着し、1000~5000倍に拡大して写真撮影を行った。フィルムはKodak Tri-X pan TX120を使用した。また花粉各部の大きさは同時に写し込まれたマイクロマーカーによって測定した。

2. 2 分子系統樹の作成

各樹種より生葉を採集し、CTAB法(Doyle and Doyle, 1990)を用いて全DNAを抽出した。DNAの抽出に用いた樹種および採集地はクリ、シラカシ、ミズナラ、コナラ、クヌギ(愛媛大学演習林)、アベマキ、カシワ、ウバメガシ、イチイガシ(愛媛大学農学部構内)、アカガシ、ナラガシワ(愛媛県緑化センター)、アラカシ、ウラジロガシ、コジイ(松山市日招八幡大神社)、シリブカガシ(松山市三熊神社)、マテバシイ(松山市南久米)、ツクバネガシ(松山市三島神社)、スダジイ(愛媛県伊予郡広田村)である。またオキナワウラジロガシは琉球大学農学部中須賀常雄教授より、ハナガシは森林総研九州支所佐藤保氏より寄贈された。これらのDNAを鋳型として用い、AFLP(Amplified fragment length polymorphism)(Vos et al. 1995)をおこなってゲノムDNAの増幅断片を検出した。断片の検出にはオートシーケンサー(島津DSQ1000L)を用いた。増幅断片の有無について0-1マトリックスを作成し、これをバイナリーデータとしてPAUP4.0v10(Swofford, 1998)に入力し、UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic mean)による系統樹を作成した。なお本論文で用いる分類名および学名は大場(1989)に従った。

3. 結 果

3. 1 花粉の外部形態

花粉の構造はすべての樹種で三溝孔型(tricolporate)とされるものであった。これは軸方向に沿って三本の溝があり、極観像では溝が120°の角度をなして配列しているものである。また溝の中央には発芽孔である内孔が位置する(図1)。各樹種の花粉について極軸長(P)と赤道軸長(E)を測定し、その比(P/E)から形状を区分した。形状比は0.91~2.03の範囲にあり、Erdtman(1943)に従って、これらは球形(spheroidal, 0.88~1.33)、長球形(prolate, 1.33~2.00)および過長球形(perprolate, 2.00以上)に分類した(表2)。湿度に関してほぼ同一条件で資料の作成を行ったが、風媒樹種と虫媒樹種で乾燥に対する耐性の違いから変形率が異なる可能性があることが指摘される。Erdtman(1943)では球形をさらに長球状球形、偏球状球形などに分けるが、資料作成時の変形の可能性を考慮して細分化はしなかった。これにより、風媒樹種の花粉と虫媒樹種の花粉ではっきりした区別が認められた。すなわちクリ属、シイ属、マテバシイ属の虫媒花粉では長球形もしくは過長球形の形状を示すのに対し、ブナ属、コナラ属の風媒花粉では一部(シラカシ、ツクバネガシおよびアカガシ)を除いて球形の形状を示した。花粉のサイズは風媒樹種のもののほうが大きく、極軸長はブナで35μ程度、コナラ属で20μ(ウバメガシ)ないし32μ(ミズナラ)の値を示した。これに対し、虫媒樹種の花粉は小型であり、極軸長で16μ(クリ)ないし20μ(マテバシイ)の値を示した。

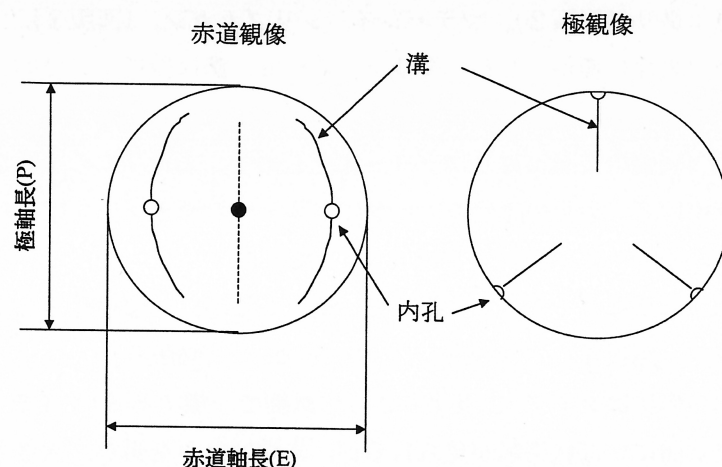


図1. 三溝孔型花粉の赤道観像(左)および極観像(右)の模式図。

表2. 日本産ブナ科樹木花粉の形状と表面模様

属名	亜属および節名	種名	計測個数	極軸長 (P) ¹	赤道軸長 (E) ¹	P/E 比 ²	表面模様 ³
ブナ属		ブナ(演習林)	12	34.8±2.63	35.1±1.43	0.99 (s)	細粒突起型
		ブナ(東北)	13	44.2±3.02	37.8±2.92	1.17 (s)	細粒突起型
クリ属		クリ	21	16.0±2.37	8.1±0.77	1.97 (p)	平滑しわ模様型
クリガシ属		スダジイ	14	17.7±1.95	10.6±1.07	1.67 (p)	細小しわ模様型
		コジイ	12	18.1±1.00	12.0±0.79	1.51 (p)	細小しわ模様型
マテバシイ属	Subg. <i>Pasania</i>	マテバシイ	2	19.7±2.00	9.7±1.12	2.03 (pe)	平滑しわ模様型
		シリブカガシ	16	17.6±1.59	8.74±0.73	2.01 (pe)	平滑しわ模様型
コナラ属	Subg. <i>Cyclo-balanopsis</i>	イチイガシ	18	25.5±5.18	19.7±2.83	1.29 (s)	カリフラワー型(Ⅲ)
		アラカシ	8	22.9±3.08	22.0±2.04	1.04 (s)	カリフラワー型(Ⅰ)
		シラカシ	1	29.7	15.8	1.87 (p)	カリフラワー型(Ⅱ)
		ツクバネガシ	10	27.3±3.66	18.6±1.30	1.47 (p)	カリフラワー型(Ⅱ)
		アカガシ	15	28.4±1.81	19.7±1.13	1.44 (p)	カリフラワー型(Ⅱ)
	Subg. <i>Quercus</i> Sec. <i>Prinus</i>	ミズナラ	10	31.5±2.12	28.7±1.68	1.10 (s)	いば状突起型
		カシワ	5	28.9±1.38	28.6±2.69	1.01 (s)	いば状突起型
		ナラガシワ	3	21.0±1.35	21.3±2.18	0.99 (s)	いば状突起型
		コナラ	17	30.5±6.32	24.4±2.49	1.25 (s)	いば状突起型
	Subg. <i>Quercus</i> Sec. <i>Cerris</i>	クヌギ	6	21.6±2.75	23.7±2.74	0.91 (s)	おうとつ型
		アベマキ	6	27.1±1.70	27.1±1.80	1.00 (s)	おうとつ型
	Subg. <i>Quercus</i> Sec. <i>Ilex</i>	ウバメガシ	7	19.8±1.41	19.6±2.15	1.01 (s)	ウバメガシ型

1. 単位は μ ($=10^{-3}\text{mm}$)

2. かっこ内は形状, s: spheroidal (球形), p: prolate (長球形), および pe: perprolate (過長球形) を示す。

3. かっこ内は表面模様の亜型, I: I型, II: II型, および III: III型を示す。

これらの花粉の表面彫刻には様々な形態が区分される。多くはしわ模様型、もしくはいば状紋型とされるものであるがさらに平滑に近いものまで多様な変異が認められる。花粉外壁の構造は Traverse (1988) ほか多数の解析例があるが、これらを参考に、ブナ科の樹木に見られる花粉の表面彫刻の特徴からその類似性に従って以下の6タイプに分類した。また溝の切れ込みの程度も分類の基準となると考えられるのであわせて示した。

1. 細粒突起型 (細粒の突起をもち、これは拡大像により棒状の突起であることが示される。極軸長に対する溝の切れ込みは中程度。): ブナ。(図版1)
2. 平滑しわ模様型 (平滑な表面にしわ状の模様が見られる。しわの幅は広い。溝は極近くまで切

れ上がっている。)：クリ (図版2)，マテバシイ，シリブカガシ。(図版3)

3. 細小しわ模様型 (表面に細かいしわ状模様が見られる。溝は極近くまで切れ上がっている。表面彫刻はスダジイでより微細である。)：スダジイ，コジイ。(図版2)

4. カリフラワー型 (表面の突起はカリフラワー状をしめす。また多くの穿孔を持つものもある。溝の切れ上がりは中程度。突起の起伏の大きさにより三つのタイプに分けられる。)

タイプⅠ (多少の起伏のあるもの)：アラカシ。(図版4)

タイプⅡ (突起の形状はタイプⅠより微細で一様であるが，一部穿孔をともなうものがある)：

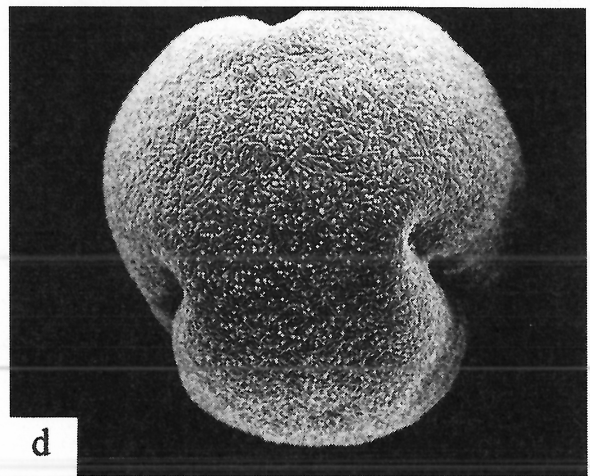
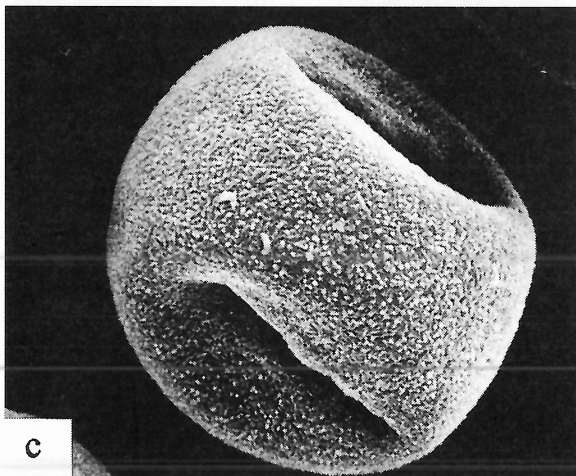
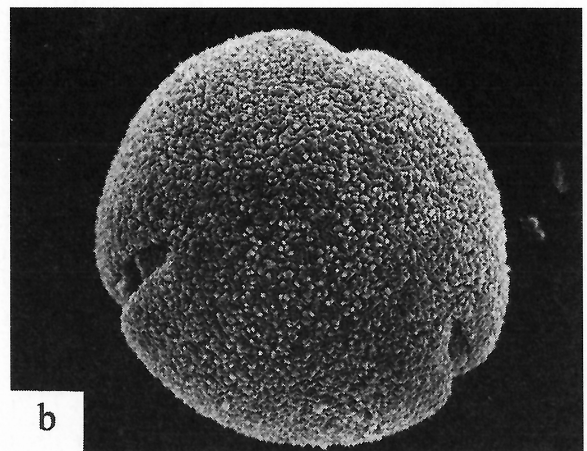
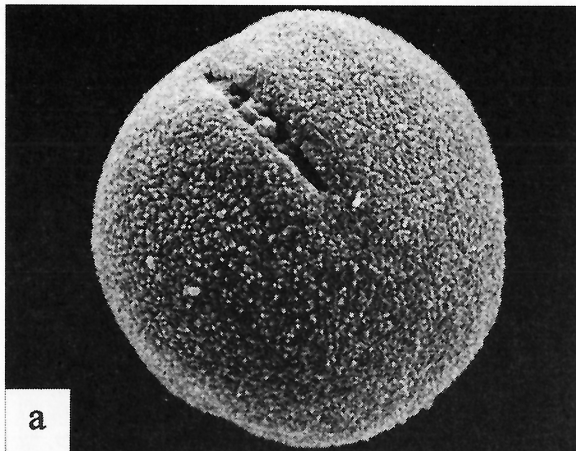
シラカシ (図版4)，アカガシ，ツクバネガシ。(図版5)

タイプⅢ (突起の形状はタイプⅠ，Ⅱよりさらに微細で一様である)：イチイガシ。(図版4)

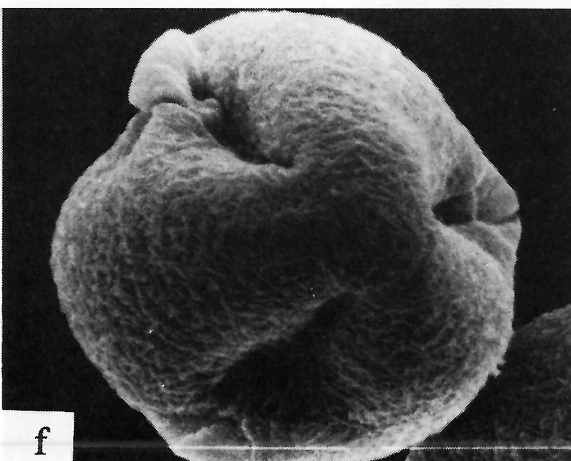
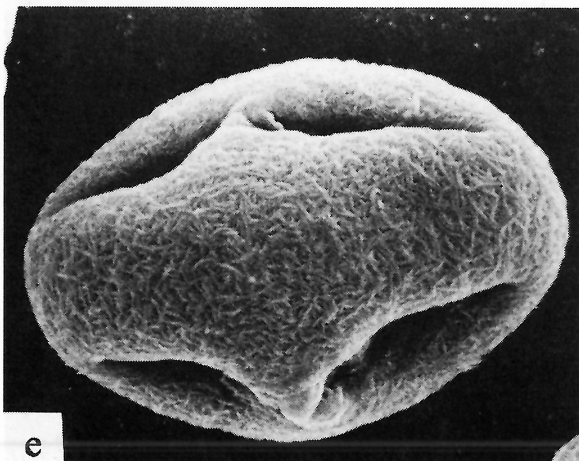
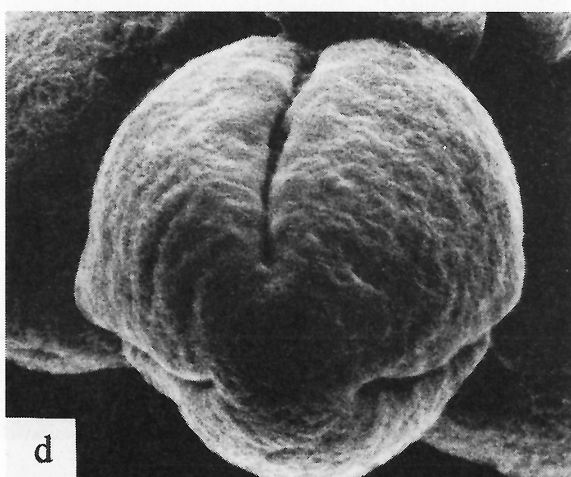
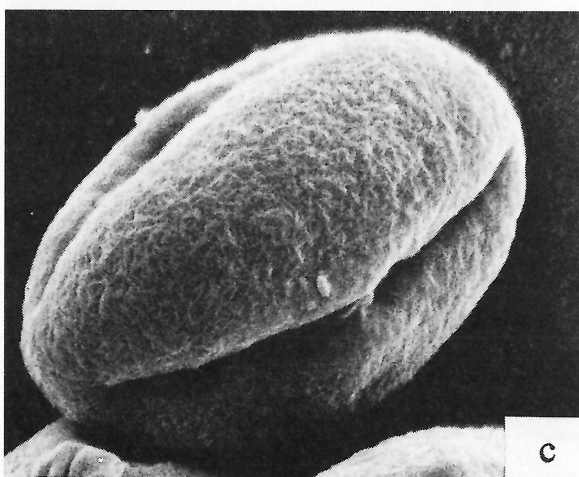
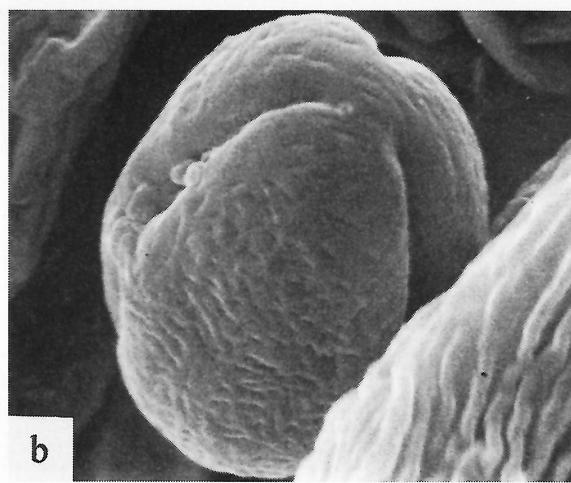
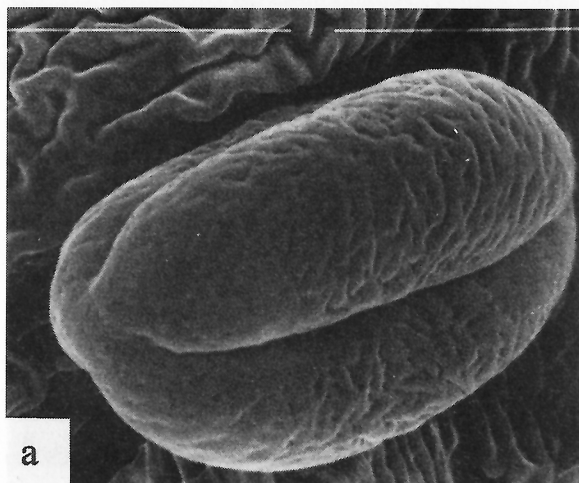
5. いぼ状突起型 (表面にいぼ状突起が見られるが，先端は丸みを帯び，大きさは不揃いである。溝の切れ上がりは中程度。)：ミズナラ，コナラ，カシワ，ナラガシワ。(図版6)

6. おうとつ型 (いぼ状突起型に似るが，いぼ状の突起はなく表面におうとつが出来る。表面のおうとつはクヌギでやや小。溝の切れ上がりは中程度。)：アベマキ，クヌギ。(図版7)

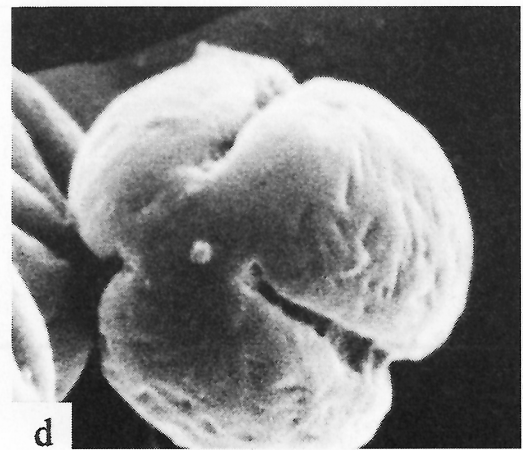
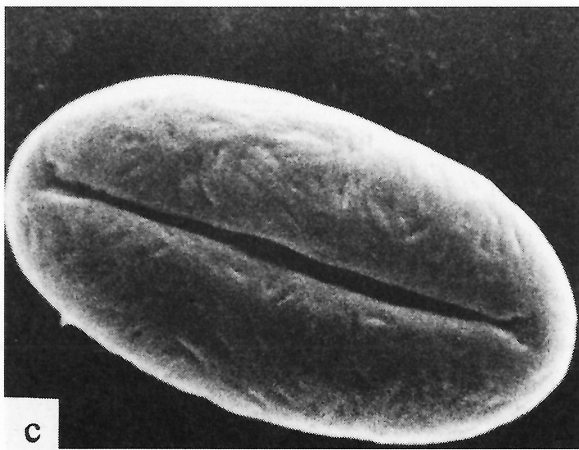
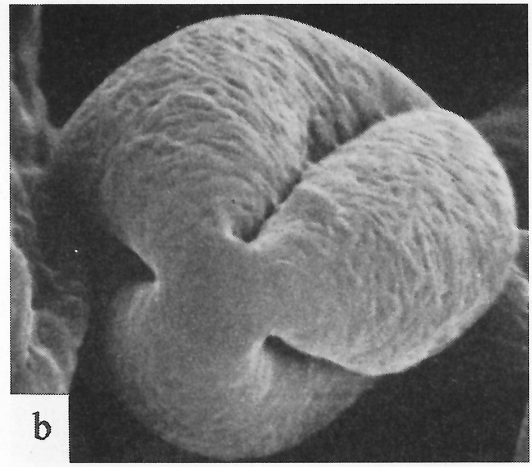
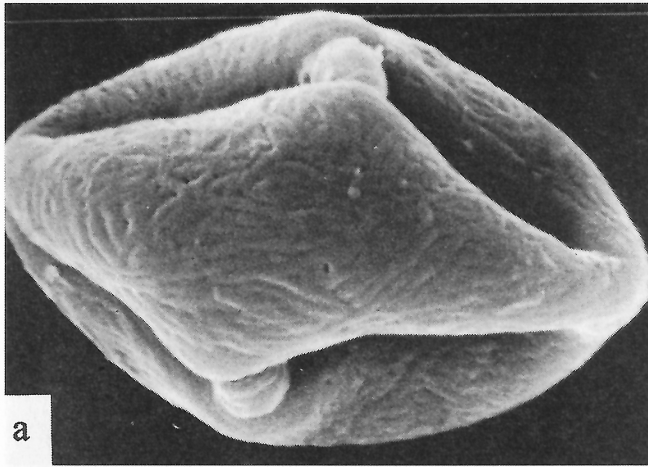
7. ウバメガシ型 (おうとつ型に似るが，おうとつはより顕著でおおまかである。いぼ状の突起はない。溝の切れ上がりは中程度。)：ウバメガシ。(図版7)



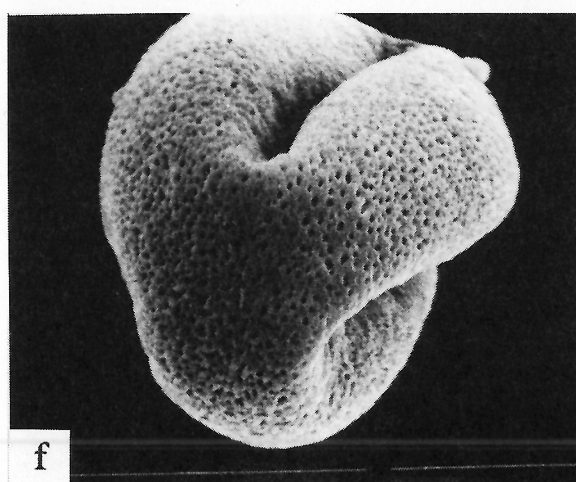
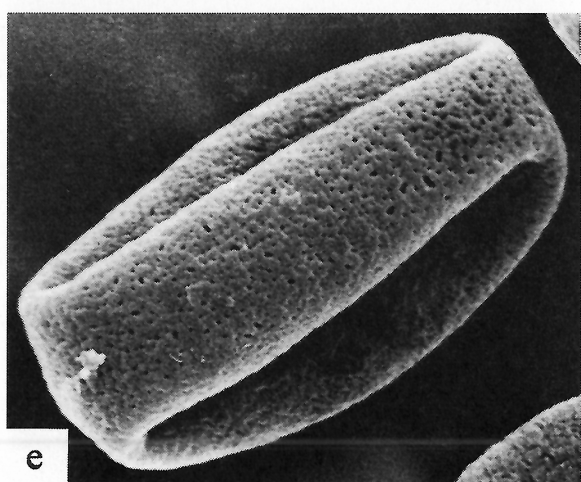
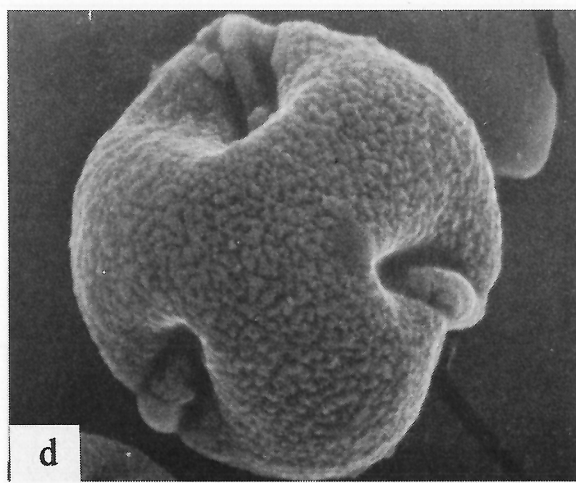
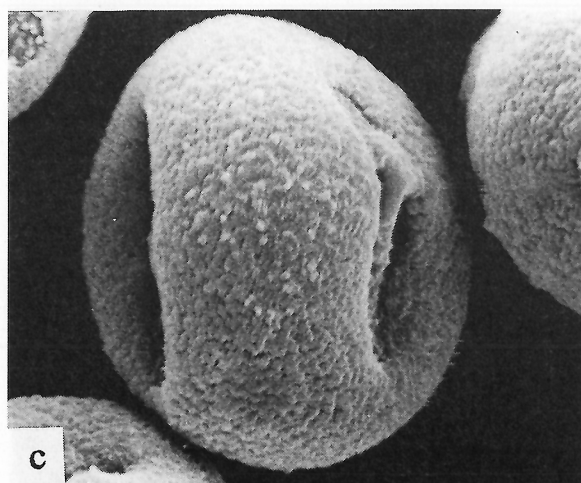
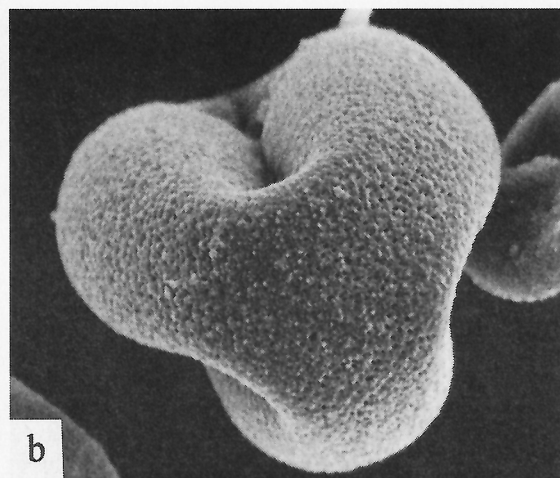
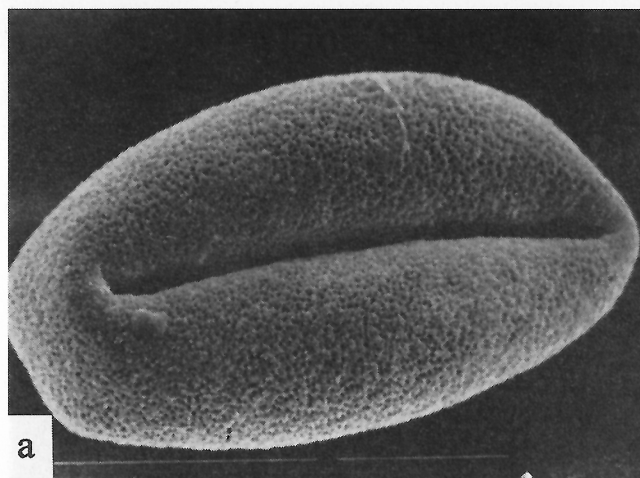
図版1. 演習林で採集したブナ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。林木育種センター東北育種場で採集したブナ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。



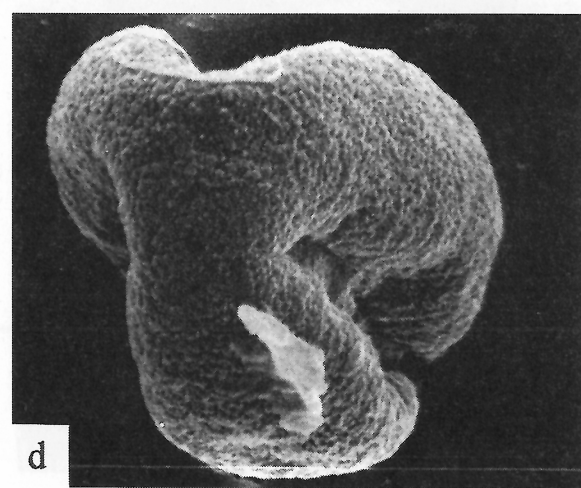
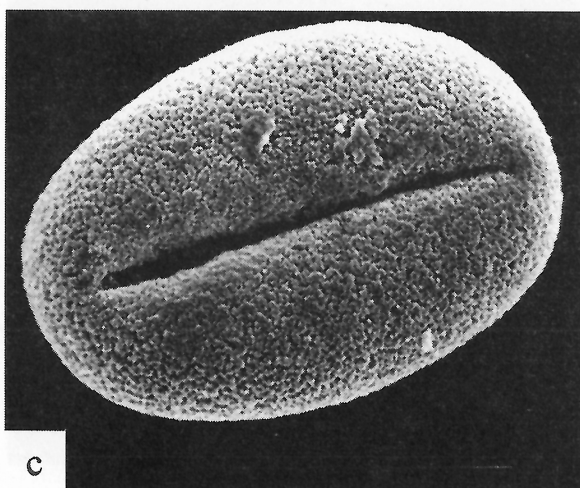
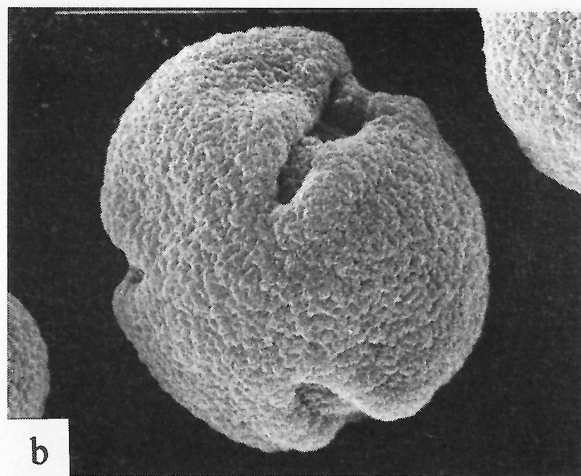
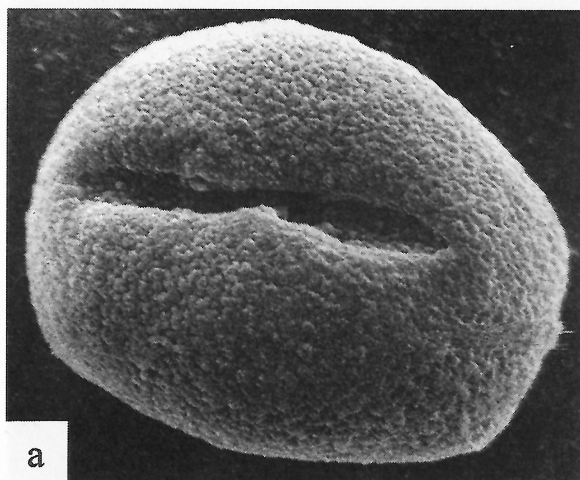
図版2. クリ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。スダジイ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。コジイ花粉赤道観像 (e) および極観像 (f)。



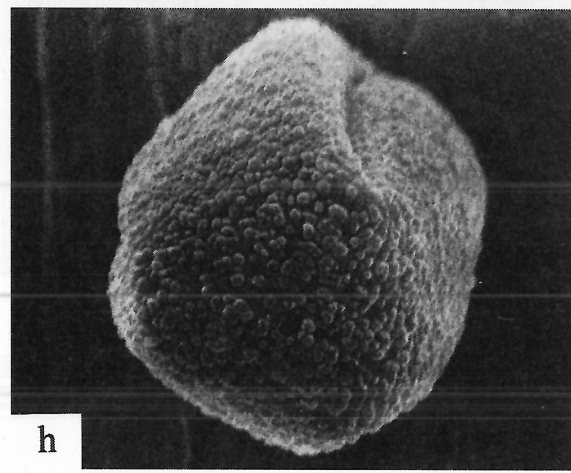
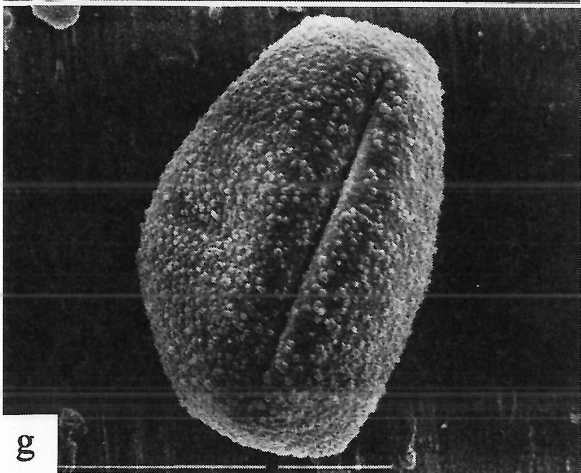
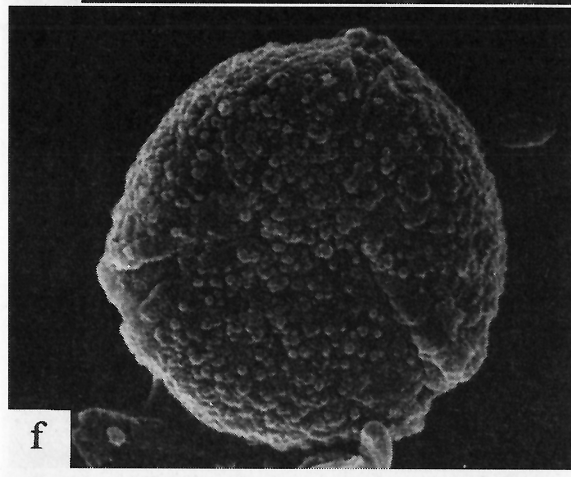
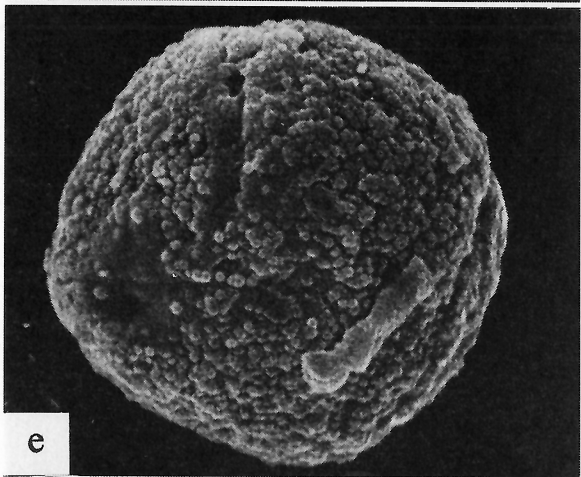
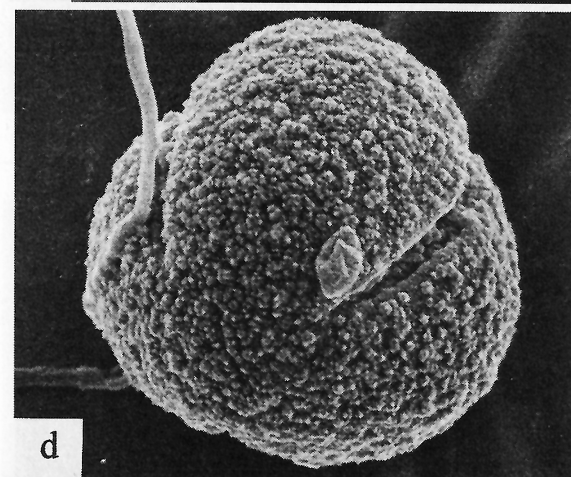
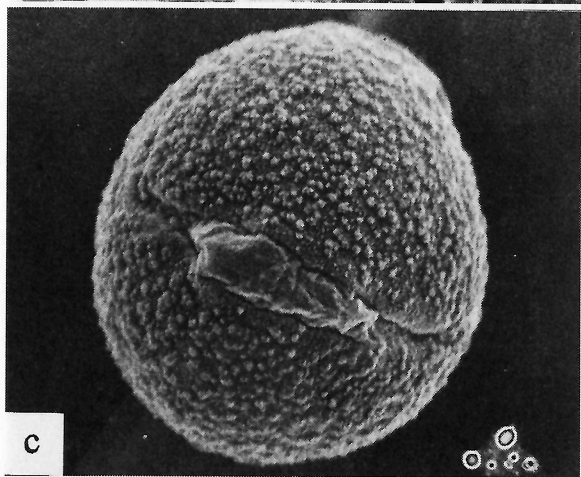
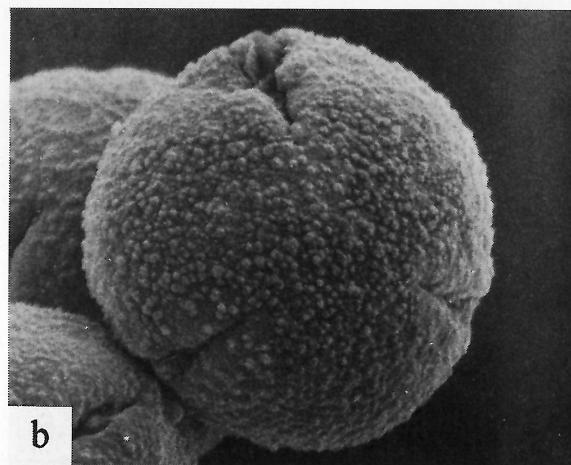
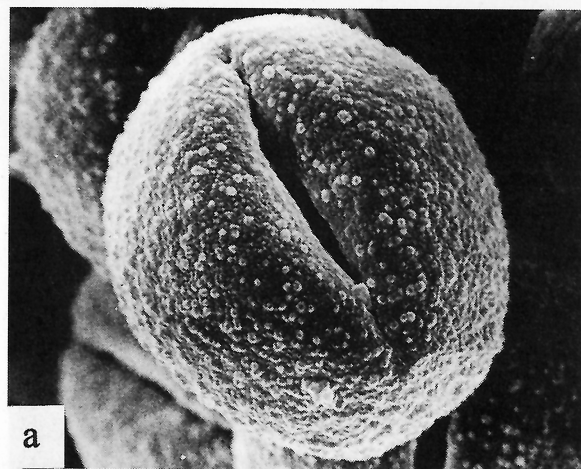
図版3. マテバシイ花粉赤道観 (a) および極観像 (b)。シリブカガシ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。



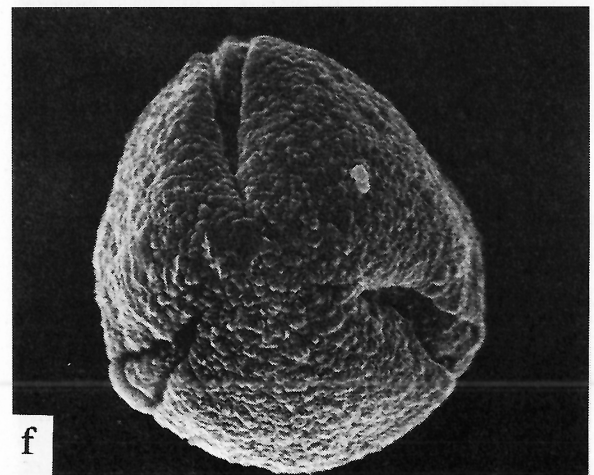
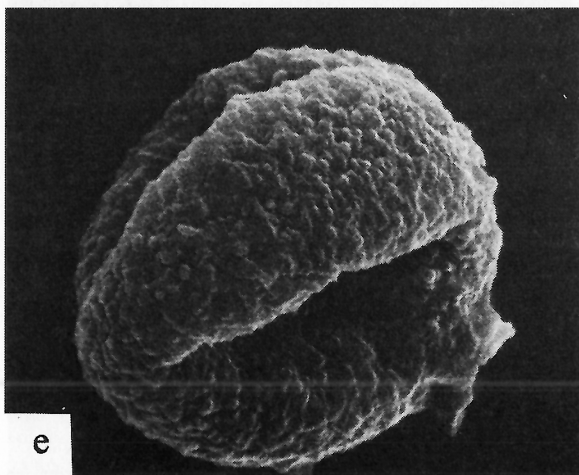
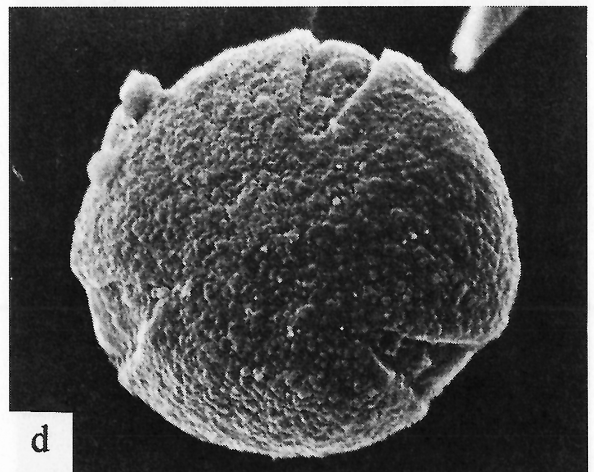
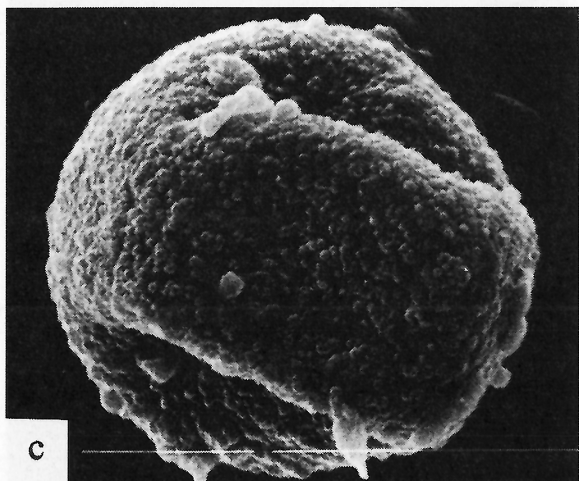
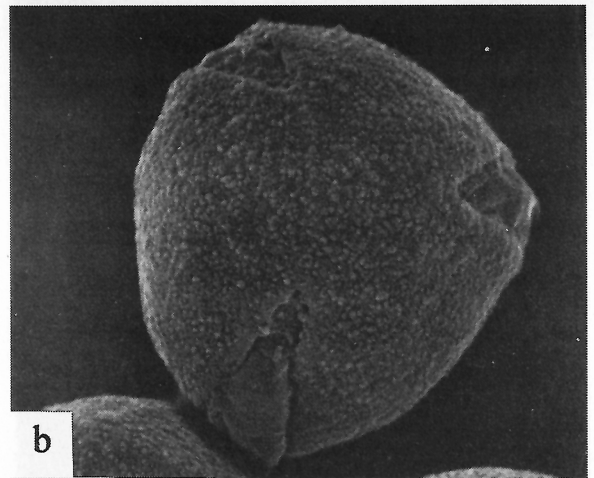
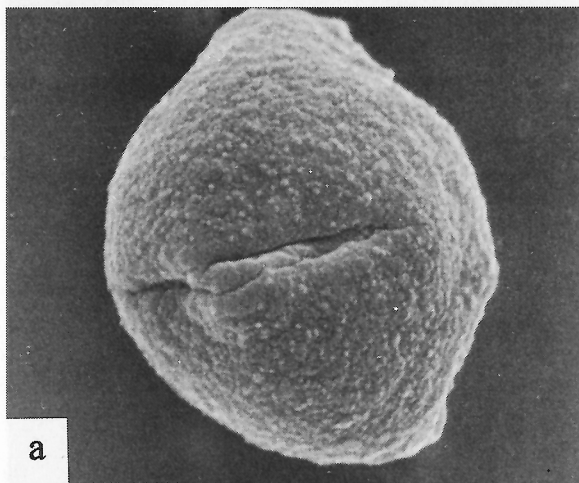
図版4. イチイガシ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。アラカシ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。シラカシ花粉赤道観像 (e) および極観像 (f)。



図版5. ツクバネガシ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。アカガシ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。



図版6. ミズナラ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。カシワ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。ナラガシワ花粉赤道観像 (e) および極観像 (f)。コナラ花粉赤道観像 (g) および極観像 (h)。



図版 7. クヌギ花粉赤道観像 (a) および極観像 (b)。アベマキ花粉赤道観像 (c) および極観像 (d)。
ウバメガシ花粉赤道観像 (e) および極観像 (f)。

花粉のサイズおよび表面彫刻の形態をまとめて表2に示した。

ここでも虫媒樹種の花粉と風媒樹種の花粉ではっきりした違いが見られ、虫媒樹種では表面模様が浅く、単純になる傾向があるのに対し、風媒樹種では突起を持ち不揃いになる傾向があった。コナラ属における花粉表面の突起はコナラ亜属 (Subg. *Quercus*) で大きく不揃いになるのに対し、アカガシ亜属 (Subg. *Cyclobalanopsis*) でよりきめが細かく粒子サイズがそろった傾向があった。

次に種内に変異があるかどうかをブナとコナラについて、異なる地域から採集したものを比較した。ブナでは四国 (愛媛大学演習林) および東北 (林木育種センター東北育種場) のものを比較したが、極軸長、赤道軸長ともに東北のものが有意に大きかった (それぞれ $t=8.28$, $P<0.01$ および $t=2.78$, $P<0.05$, $df=23$)。また形状比は演習林のものが $P/E=0.99$ でやや偏球状であるのに対し、林木育種センターのものは 1.17 で長球状となる傾向があった。形状の違いは 1% レベルで有意であった ($t=4.31$, $df=23$)。また表面彫刻にも差が見られ、突起の形状が林木育種センターのものがより微細であった (図版1)。コナラについては森林総合研究所より構内に生育するものの花粉の分譲を受けたが、この花粉は表面が平滑であり、より多孔質であった (図版には示していない)。これは他のアカガシ亜属のものと比べても異質であった。

3. 2 分子系統樹

AFLP データに基づいて作成した UPGMA 系統樹を図2に示す。コナラ属の各節は単系統群として分離され、それぞれ高いブートストラップ確率で支持されることが示された (98~100%)。このなかでクヌギ節 (sec. *Cerris*) とウバメガシ節 (sec. *Ilex*) は高い確率 (100%) で単系統となることが示された。またマテバシイ属も高い確率 (100%) で単系統群となった。クリ属とシイ属はまとまって一つの単系統群を形成した (95%)。このなかでスダジイとコジイは明らかに分岐し、両者が別種であることを示唆した。コナラ属ではアカガシ亜属は高い確率で (99%) 単系統となったが、コナラ亜属ではコナラ節およびクヌギ節-ウバメガシ節がそれぞれ高い確率 (いずれも100%) で単系統になったが、クヌギ節-ウバメガシ節はマテバシイ属の姉妹系統になり、コナラ亜属およびコナラ属の単系統性は支持されなかった。最も種数の多いアカガシ亜属内ではアラカシ、シラカシおよびオキナワウラジロガシが近縁のグループを作り (68%), またツクバネガシとアカガシが高い確率 (100%) で近縁であることが示された。ツクバネガシは葉の形などがアカガシに類似し (大場, 1989), 形態上の知見と上記の結果は一致する。またイチイガシはこのグループの中で最初に分岐し、他の種の側系統になった (89%)。UPGMA 系統樹の根 (共通祖先からの分岐点) はアカガシ亜属とその他の分類群との間に設定され、コナラ属が他の分類群の祖先型であることを示唆しているが、その分岐は有意でなく、コナラ属の多系統性も不確定的である。

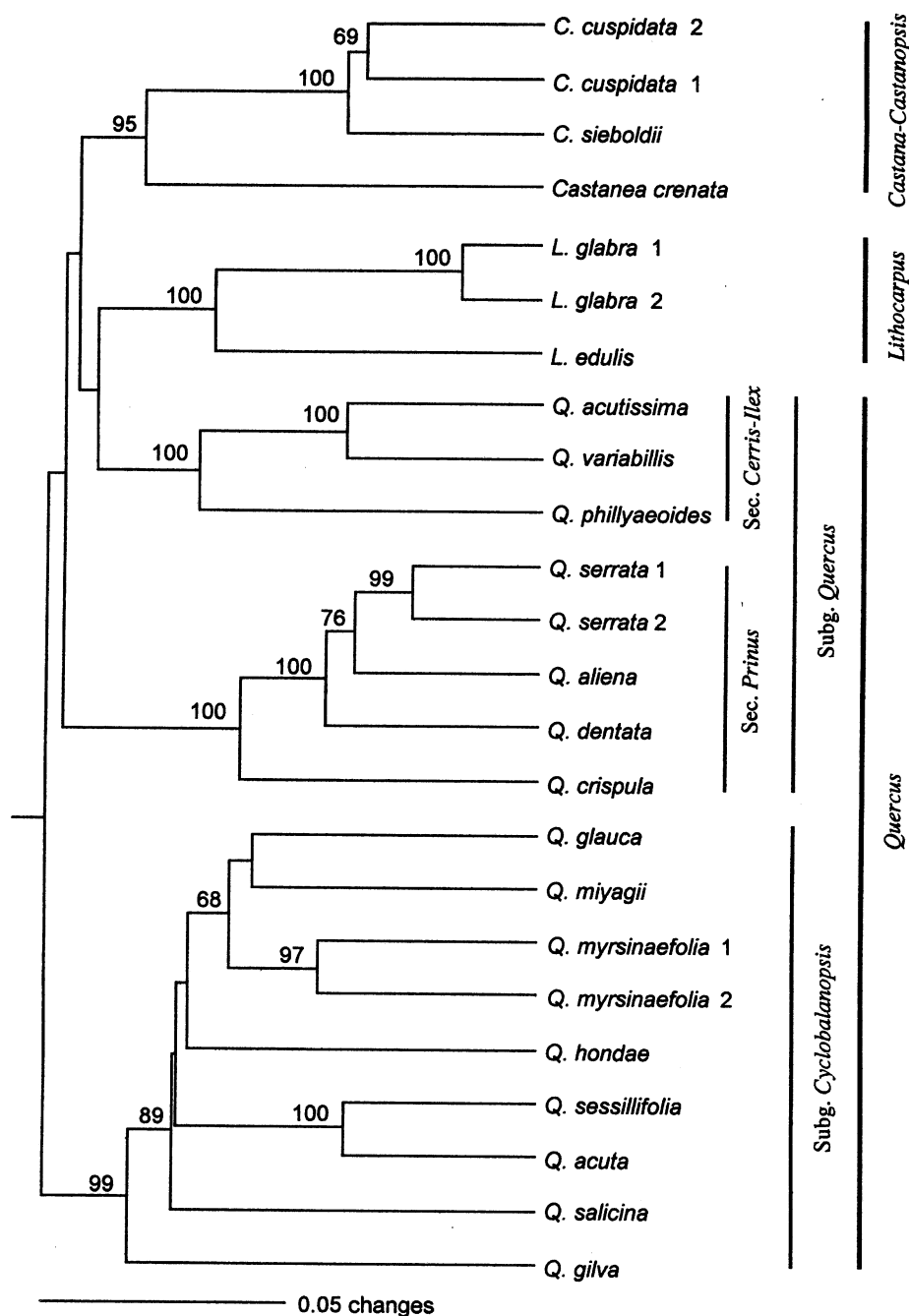


図2. 日本産コナラ属 (*Quercus*, Q.), クリ属 (*Castanea*), シイ属 (*Castanopsis*, C.) および マテバシイ属 (*Lithocarpus*, L.) の各種の AFLP データを用いた UPGMA 系統樹。枝上の数値はブートストラップ確率 (%) を示す。50%以下のものは示していない。図下の横棒は AFLP によって生じるバンド数が異なる割合を示したものである。

4. 考 察

初期の分類ではブナ科は3つの亜科；ブナ亜科 (Fagoideae), クリ亜科 (Castanoideae) および コナラ亜科 (Quercoideae) に分けられ, ブナ亜科として, ブナ属とナンキョクブナ属 (*Nothofagus*) が, クリ亜科としてクリ属, シイ属, マテバシイ属およびトゲガシ属がふくまれ, コナラ亜科として

コナラ属およびカクミガシ属が含まれるとした (Forman, 1964; Hutchinson, 1967; Abbe, 1974)。Nixon (1989) の最近の分類ではブナ亜科に含まれていたナンキョクブナ属を科 (*Nothofagaceae*) として独立させるとともに、コナラ亜科を廃し、カクミガシ属を独立した3属 (*Torigonobalanus*, *Colombobalanus* および *Formanodendron*) にわけて、コナラ属とともにブナ亜科に移した。この分類の基礎となった形態的基準は送粉様式と、堅果(種子)と総苞との関係である。すなわち、ブナ亜科ではすべて風媒であり、カクミガシのように3ないし7花からなる花序を総苞が包み込むようなタイプを祖先型として、2花からなるもの(ブナ属)および1花からなるもの(コナラ属)が進化したとする。コナラ属で総苞は碗型の殻斗に進化し、堅果の上部は露出する。また発芽の様式も重要な分類基準となりうるが、カクミガシ属、ブナ属では子葉が発芽に際し、地上に出る (epigeal cotyledon) のに対し、コナラ属では地下に残る (hypogeal cotyledon)。一方クリ亜科ではすべて虫媒であり、クリおよびシイ属に見られる3個の堅果が4つの総苞弁に包まれるものを祖先型とし、中心の果実を残して両脇のものが退化した様式 (スダジイ、コジイ) および、各花が独立し総苞はそれを包み込む殻斗に進化したもの (マテバシイ属)、および雌花数が増加したもの (トゲガシ属) に進化したとする。この属に含まれるものはすべて発芽に際し、子葉は地下に残る。

最近の葉緑体 DNA による分子分類ではナンキョクブナは8科を含む、より高次の分類群であるマンサク亜目 (Hamamelids) の中でブナ科を含む他の7科の外群となる、かなり遠縁の科として位置づけられており (Manos and Steele, 1997), Nixon の形態による科の独立はきわめて妥当であったといえる。花粉形態から見てもナンキョクブナが多溝型 (stephanocolpate) であり、表面が粒子状 (granulate) であるのに対し、ブナ科ではすべて三溝孔型 (tricolporate) で表層は柱状構造 (col-lumellate) からなり、両者は独立した分類群であることが認められる。なお、マンサク亜目の他の6科 (Casuarinaceae, Ticodendron, Betulaceae, Myricaceae, Juglandaceae および Rho-iptelea: core "higher " Hamamilids) は分子分類では単系統となり、ブナ科はこれとは姉妹系統となる (Manos and Steele, 1997)。これらの6科の花粉のほとんどは孔型 (porolate) であり孔の数には変異がある。また表面は粒子状である。Crepet and Nixon (1987) はブナ科で見られる花粉の形状が原始形質であり、6科のものは派生形質であるとしている。花粉の溝孔の形態はこのことから、ブナ科を規定する大分類の重要な形質の一つであるといえる。

Manos and Steele (1997) は葉緑体遺伝子, *matK* および *rbcL* の塩基配列による系統樹から、ブナ科の中でブナ属が他の属とは最も遠縁の外群になり、さらに残された単系統群の中でカクミガシが側系統として最初に分岐することを明らかにした。これにより Nixon (1987) の分類群、ブナ亜科は分子分類ではその根拠を失うことになった。従って風媒性は複数回別々の系統で派生したことが示唆されることとなった。虫媒性の形成には葯の小型化、花糸の多出化、香りや花密の生産、そして花粉の小型化と表面の平滑化等の形質を獲得する必要がある、虫媒性から風媒性への変化は不可逆的であると考えられる (Manos et al., 2001)。Manos et al. (2001) は虫媒性、地上性子葉および総苞に包まれた複数の果実形態をブナ科における原始形質とし、核 (ITS 領域) および葉緑体 (*matK*) の塩基配列情報を統合して、図3のような系統樹を再構築した。これによればクリ属、シイ属、マテバシイ属およびコナラ属は単系統となって祖先を共有し、コナラ属は最も最近にマテバシイ属から風媒化することによって分化したことが示唆される。一方我々の AFLP データに基づく UPGMA 系統樹 (図2) ではコナラ属が祖先であることが示唆され、クリ属-シイ属およびマテバシイ属がそれぞれ独立にコナラ属から派生したことを示している。これは風媒から虫媒が派生したことを意味し、他の植

それでは電子顕微鏡観察による花粉形態を分子分類による分類体系と比較してみよう。一般的に属の区分と花粉形態の特徴による区分は非常によく一致しているといえる。虫媒であるクリ属、シイ属およびマテバシイ属では長球状で小型であり、表面は平滑化している。また表面彫刻はそれぞれの属で特徴あるものとなっている（図版2, 3）。一方コナラ属では花粉は大型化し、球形に近くなる。また表面彫刻は粗く、不規則なものになる傾向がある。コナラ属は2つの亜属に分けられるが、それぞれに対応して表面彫刻にも明らかな違いが見られる。アカガシ亜属では表面彫刻はよりきめが細かく規則的であり、カリフラワー状を示す。この中で3つのタイプ（Ⅰ～Ⅲ）が区別され、最もきめが細かいのがイチイガシであり（タイプⅢ）、アラカシ（タイプⅠ）が最もきめが粗い。またタイプⅡのうちアカガシとツクバネガシは非常によく似ており、系統樹上の近縁関係を反映していると思われる。従って表面彫刻においてもある程度、亜属内の系統関係を反映したものとなった。コナラ亜属は三つの節からなるが、コナラ節では表面に不揃いなば状の突起が生じる。この突起はナラガシワでやや大きい全体としてよく似ており区別が付けにくい。クヌギ節ではアベマキとクヌギの花粉はよく似ており、おうとつの盛り上がりはなだらかできめが細かい。それに対し、ウバメガシ（ウバメガシ節）では表面のおうとつは盛り上がりも大きく、ごつごつとした印象をあたえ系統樹の上ではクヌギ節と近縁であるが、明らかにそれとは区別される。これらのことからコナラ亜属では花粉の表面彫刻により節間の違いは明瞭に区別でき、節内における種間の違いもある程度反映したものとなっていることが示された。コナラ節ではミズナラーカシワ（ナラガシワ、コナラ）の順で段階的に種が分岐したことが示されるが（図2）、花粉の表面形態はこの極性を反映していない。それに対しアカガシ亜属ではイチイガシーウラジログアシ（アカガシ、ツクバネガシ）ーハナガカシーシラカシ（アラカシーオキナワウラジログアシ）の順で種が分岐したことが示唆されるが（図2）、花粉を調べた種に限ってみれば表面の粒状がこの方向で粗くなる傾向が見られた。一方形状比（P/E）は、アカガシ亜属（ 1.42 ± 0.303 ）とコナラ亜属（ 1.04 ± 0.108 ）の間で有意な差が見られた（ $t=2.61$, $df=10$, $P<0.05$ ）。すなわち、アカガシ亜属では長球状、コナラ亜属では球状になった。またクヌギ節ーウバメガシ節とコナラ説の間では形状に有意な差はなかった。虫媒から風媒が派生したことが正しければ、アカガシ亜属でより原始的な形態を残しているといえるのかも知れない。

花粉形態に関して種内変異があるかどうかをブナおよびコナラについて調べたが、ブナ花粉の形状、サイズおよび表面彫刻について明確な変異がみられた。四国地方のブナが表日本型であるのに対し、東北地方のブナは裏日本型であるとされ、葉の形状や、幹の立ち上がりに大きな違いが認められている。これらの違いが花粉の形態にも反映されているのかも知れない。この点に関してはさらに複数の地域からのサンプルについて調べる必要がある。コナラ花粉についてみると、森林総合研究所の構内に生育していたものは表面が平滑であり、より多孔質であった。電子顕微鏡観察のためのサンプル製作上の差異は考えにくく、生来のものと考えられるが、これは他のコナラ亜属のものと比べても差異が大きいことから突然変異によるものであることも考えられる。このような差異が受粉効率に影響するかどうかは興味深い点である。

以上の結果をまとめると、ブナ科樹木において花粉の形態は属および節の区分をよく反映しているものであることが明らかになった。また属内の種間の関係においてもある程度の区別が可能であった。最も大きな区分は風媒と虫媒樹種の花粉の差異であり、虫媒では形態が長球状で小型になり、表面は滑らかで、表面彫刻は規則的になる傾向があった。また虫媒花粉は表面が粘液質となり互いにくっついて複合的になることが知られているがそのような傾向は特にクリで顕著に見られた。風媒花粉は形

態は球状で大型化し、表面は粗く、彫刻は不規則になる傾向があった。コナラ属とクリ属、シイ属およびマテバシイ属との相互の系統関係は不確定的であったが、コナラ属がこれらの属の祖先型であるとする、風媒から虫媒が派生したとする生物学的な説明の困難さが生じる。今後さらに分子データを蓄積して、属間の関係をより明確にする必要がある。花粉の形態変異の方向性も、これをもとに明らかにされてゆくことであろう。

謝 辞

稲田哲治氏（現愛媛県林業試験場）には愛媛県緑化センターでの花粉採集に助力をいただいた。また森林総合研究所・津村義彦氏、林木育種センター東北育種場・高橋誠氏にはそれぞれコナラおよびブナの花粉を採集送付いただいた。琉球大学農学部・中須賀常雄教授および森林総合研究所九州支所・佐藤保氏にはそれぞれオキナワウラジロガシ、ハナガカシの葉のサンプルを採集送付いただいた。また前愛媛大学農学部・渋谷昌資氏には走査型電子顕微鏡の操作にご教示をいただいた。ここにあわせて感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) Abbe, E. C. (1974) Flowers and inflorescences of the "Amentiferae". Botanical Review 40 : 159-261.
- 2) Crepet, W. L. and Nixon, K. C. (1987) Tricolporate angiosperms: success, phylogeny and early radiation. XIV International Botanical Congress (Berlin), p284.
- 3) Darwin, C. (1859) The origin of species. John Murray, London.
- 4) Doyle, J. and Doyle, L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 : 13-15.
- 5) Erdman (1943) An introduction to pollen analysis. Chronica Botanica, Whitman, Massachusetts.
- 6) Forman, L. L. (1964) *Trigonobalanus* a new genus of Fagaceae with notes on the classification of the family. Kew Bull. 17 : 381-396.
- 7) Hutchinson, J. (1967) The genera of flowering plants. Vol 2. Dicotyledons. Oxford University Press, London.
- 8) Manos, P. S. and Steele, K. P. (1997) Phylogenetic analyses of "higher" Hamamelididae based on plastid sequence data. Am. J. Botany 84 : 1407-1419.
- 9) Manos, P. S., Zhou, Z. -K. and Cannon, C. H. (2001) systematics of Fagaceae : phylogenetic tests of reproductive trait evolution. Int. J. Plant Sci. 161 : 1361-1379.
- 10) Nixon, K. C. (1985) A biosystematic study of *Quercus* section *Virentes* (the live oaks) with phylogenetic analyses of fagales, Fagaceae and *Quercus*. Ph. D. diss. University of Texas, Austin.
- 11) Nixon, K. C. (1989) Origins of Fagaceae. in Crane, P. R. and Blackmore, S. eds. evolution systematics and fossil history of the Hamamelidae. Vol. 2. "Higher" Hama-

- melidae. pp. 23–44. Clarendon, Oxford.
- 12) Nixon, K. C. (1993) Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. Ann. Sci. For. Suppl. 1 (Paris) 50 : 25–34.
 - 13) 大場秀章 (1989) 佐竹義輔・原寛・亘理俊次・富成忠夫編「日本の野生植物—木本」. 平凡社, 東京.
 - 14) Swofford, D. L. (1998) PAUP# : Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland. Massachusetts.
 - 15) Traverse, A. (1988) Paleopalynology. Unwin Hyman, Boston.
 - 16) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) : AFLP : A new technique for DNA fingerprinting, Nucleic acids Res. 23 : 4407–4414.