

フユノハナワラビの交配様式と 集団の遺伝的構造の予備的解析

綿野 泰行*

Yasuyuki WATANO* : Preliminary Investigation on Mating System and
Population Genetic Structure of *Botrychium ternatum* (Thunb.) Swartz

ABSTRACT : Predominant inbreeding in homosporous ferns is so far reported only in two species of *Botrychium*. In order to test the generality of inbreeding in *Botrychium*, selfing rate was estimated in the natural population of *B. ternatum* in Botanic Garden of Kanazawa University by polyacrylamide gel electrophoresis of 8 enzyme systems. Mean selfing rate calculated at 3 polymorphic loci (*Aat*, *Pgm-2*, *6Pgd*) was 0.98. This value suggests that *B. ternatum* is also predominant inbreeding species. In this population, significant correlations of allele frequencies among polymorphic loci were also detected. This genetic disequilibrium of population may be caused by extreme inbreeding in the population.

Key words : Allozyme—*Botrychium*—Inbreeding—Genetic disequilibrium

はじめに

同形胞子シダ植物においては、その配偶体世代が独立生活を行い1個体内に造精器と造卵器の両方の生殖器官を形成する。この体制上、自配受精と呼ばれる同一配偶体の精子と卵の受精が可能となる。自配受精においては受精を行う精子と卵が全く遺伝的に同一であるため、結果として生じる胞子体は全ての遺伝子座において同型接合となってしまう。つまり1世代で完全な純系個体ができる (Klekowski, 1979)。Klekowski & Baker (1966) は、この極端な自殖のシダ植物の進化における役割について問題提起を行い、それ以来さまざまなシダ植物の種について、その交配様式の解析がなされている (Haufler, 1987 ; Soltis & Soltis, 1987)。

従来調べられた限りでは、大部分の同形胞子シダ植物が他殖種であることが明らかになっている (Soltis & Soltis, 1987)。そのなかで、本研究の材料であるハナワラビ属 (*Botrychium*) は、唯一100%に近い自配受精率を示す特異なグループである (*B. dissectum*, McCauley et al., 1985 ; *B. virginianum*, Soltis & Soltis, 1986)。 *Botrychium* は地中性配偶体を持つ属であるが、この体制が高自殖性をもたらす要因になっている可能性も示唆されている (Tryon & Tryon, 1982)。

本研究では、*Botrychium* の交配様式についてさらに知見を増やし、この属において高自殖性

*〒920 金沢市丸の内1-1 金沢大学理学部生物学教室 Department of Biology, Faculty of Science, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan.

が一般的な現象であるのかどうかを確かめるため、フユノハナワラビ (*B. ternatum*) について、アイソザイムを遺伝子マーカーとして交配様式の解析を行った。

材料と方法

調査地

金沢大学理学部附属植物園内には、比較的良好な自然林が残されており、その林床にはフユノハナワラビ、アカハナワラビ、オオハナワラビ等の *Botrychium* が生育している。そのうち、最も個体数の多いフユノハナワラビを材料にした。なおこの集団の個体は、典型的なフユノハナワラビでなく、若干エゾフユノハナワラビ的な形質を示す (佐橋, 私信)。

電気泳動

葉身を個体ごとに採集し、プラスチックバッグに入れ、4℃の低温室で保存し電気泳動に供した。この状態で3ヶ月は酵素活性に変化は見られない。調べた酵素種は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AAT)、ヘキサキナーゼ (HK)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)、ホスホグルコムターゼ (PGM)、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGD)、シキミ酸デヒドロゲナーゼ (SkDH)、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI) の8種類を使った。水平型平板式ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析を行ったが、詳細は Watano & Iwatsuki (1988) を参照のこと。酵素の抽出のための緩衝液は、0.1M トリス-塩酸バッファー pH7.5, 0.5% アスコルビン酸ナトリウム, 0.5% ピロ亜硫酸ナトリウム, 4% PVP, 10mM 塩化マグネシウム, 1mM EDTA, 0.5% 2-メルカプトエタノールである。ゲルおよび電極バッファーは表1に示した。活性染色は Soltis et al. (1983) に従った。

表1. ゲルおよび電極バッファーの組成

System	Electrode buffer	Gel buffer	Examined enzyme
No. 1	0.039M LiOH 0.263M boric acid	0.100M tris 0.0237M citric acid 0.078M LiOH 0.0526M boric acid	AAT, HK, IDH, LAP, 6PGD, TPI
No. 2	0.039M LiOH 0.263M boric acid	0.050M tris Adjust to pH7.2 with dry powder of citric acid	PGM
No. 3	0.400M citric acid 1.0M HCl to pH7.0	0.020M Histidine · HCl 1.0M NaOH to pH7.0	SkDH

バッファーシステム1と2は Soltis et al. (1983) の No. 7 から変更した。

バッファーシステム3は Soltis et al. (1983) の No. 1 から変更した。

1つの活性染色で、複数の遺伝子座支配のアイソザイムが検出された場合、陽極側のものから順に番号を付け、たとえば *Pgm-1*, *Pgm-2* というふうに遺伝子座に名前を付けた。またそれぞれの遺伝子座のアロザイムについては、陽極側から a, b とアルファベットで表記した。

自配受精率の推定

同形孢子シダ植物の場合、自殖率 (S) は次の式で与えられる (McCauley et al., 1985)。

$$S = 1 - H/He$$

H は集団中での異型接合体の頻度の観察値、He はランダムな他殖を想定した場合の異型接合体頻度の期待値で $2pq$ (p および q は対立遺伝子頻度) で表される。

結 果

分析した 8 酵素種について、12 遺伝子座 (*Aat*, *Hk*, *Idh*, *Lap*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *6Pgd*, *Skdh-1*, *Skdh-2*, *Skdh-3*, *Tpi-1*, *Tpi-2*) が識別された。そのうち、多型が検出されたのは *Aat*, *Lap*, *Pgm-2*, *6Pgd*, *Tpi-1* の 5 遺伝子座である。*Pgm-1* では遺伝子重複のためと思われる 2 本バンド型、残りの遺伝子座では全ての個体が 1 本バンド型を示し、変異はなかった。*Lap* (図 2) ではバンドの移動度に変化はないが活性の強いタイプと非常に弱いタイプ (null phenotype) の 2 型がある。同じ抽出サンプルでも他の酵素では活性に変化がないため、この *Lap* の 2 型は遺伝的なものであると考えられる。ただ遺伝的な解釈が困難なため、自殖率の推定には使わなかった。*Tpi-1* も、この論文では詳しく言及しないが、遺伝子重複が関与していると思われる複雑なバンドパターンを示すため遺伝的な解釈が出来なかった。*Aat*, *Pgm-2*, *6Pgd* (図 1, 3, 4) では、

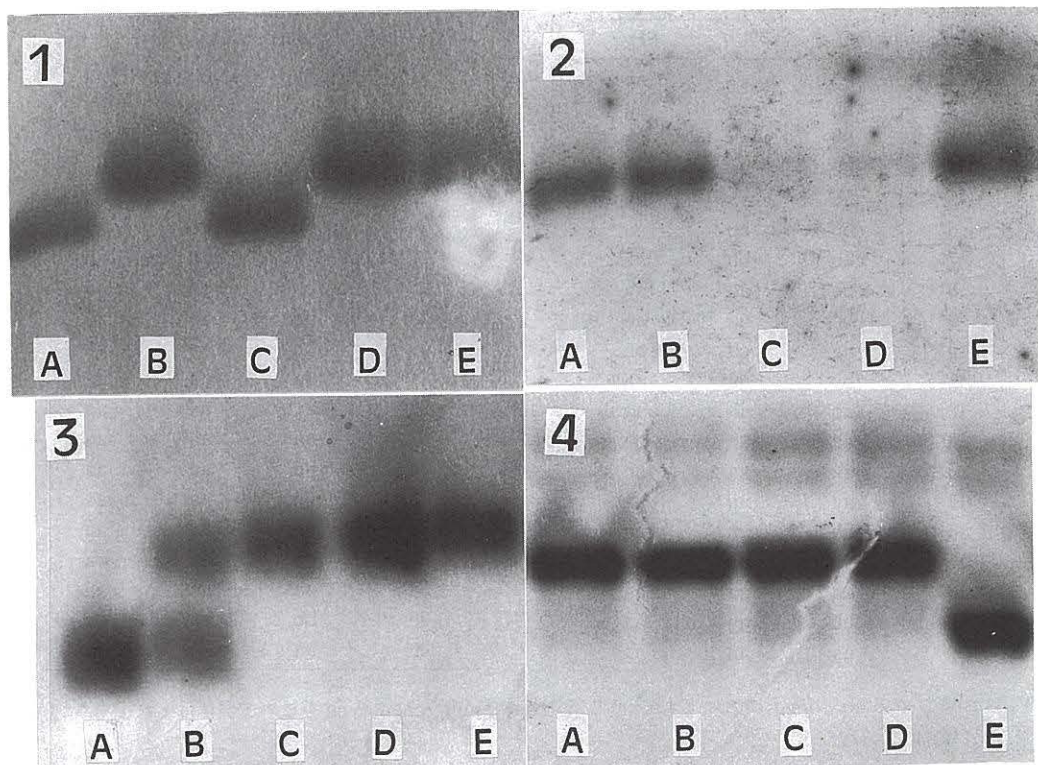


図 1 *Aat* のザイモグラム。A, C は bb、B, D, E は aa の遺伝子型を示す。
 図 2 *Lap* のザイモグラム。C, D は null phenotype を示す。
 図 3 *Pgm-2* のザイモグラム。A は bb、B は ab、C, D, E は aa の遺伝子型を示す。
 図 4 *6Pgd* のザイモグラム。A, B, C, D は aa、E は bb の遺伝子型を示す。

それぞれ2つの対立遺伝子支配のアロザイムが存在する。これら3遺伝子座を使って自殖率の推定を行った。

3つの多型遺伝子座における、調査集団での遺伝子型、対立遺伝子頻度、自殖率については表2に結果を示した。3遺伝子座とも極めて異型接合体が少なく、唯一 *Pgm-2* で1個体見つかったのみである。その結果非常に高い自殖率を示し、3遺伝子座での平均は0.98である。このことは、この集団の98%の胞子体が自配受精により形成されたことを意味する。それ故、フユノハナワラビは、すでに報告されている *Botrychium* の2種 (*B. dissectum*, *B. virginianum*) と同様、高自殖性種である可能性が高い。

表2. 金沢大学植物園のフユノハナワラビの自然集団における、自配受精率の推定

Locus	Genotypes			Allele frequencies		Selfing rate
	aa	ab	bb	a	b	
<i>Pgm-2</i>	15	1	24	0.388	0.612	0.95
<i>Aat</i>	35	0	5	0.875	0.125	1.00
<i>6Pgd</i>	36	0	4	0.900	0.100	1.00
Mean						0.98

表3. 金沢大学植物園のフユノハナワラビの自然集団における、3遺伝子座での遺伝子型

Name of Sample	Loci						
	<i>Pgm-2</i>	<i>Aat</i>	<i>6Pgd</i>				
KAN1***	bb	aa	aa	21*	bb	bb	aa
2***	bb	aa	aa	22**	aa	aa	bb
3	bb	aa	aa	23	bb	aa	aa
4	bb	aa	aa	24	bb	aa	aa
5***	aa	aa	aa	25	bb	aa	aa
6*	bb	bb	aa	26*	bb	bb	aa
7*	bb	bb	aa	27***	bb	aa	aa
8***	bb	aa	aa	28*	bb	bb	aa
9***	bb	aa	aa	29	bb	aa	aa
10**	aa	aa	bb	30	bb	aa	aa
11	bb	aa	aa	31	aa	aa	aa
12	ab	aa	aa	32	aa	aa	aa
13**	aa	aa	bb	33	aa	aa	aa
14**	aa	aa	bb	34	aa	aa	aa
15	aa	aa	aa	35	bb	aa	aa
16	bb	aa	aa	36***	bb	aa	aa
17	aa	aa	aa	37	bb	aa	aa
18	aa	aa	aa	38	aa	aa	aa
19	bb	aa	aa	39	bb	aa	aa
20	aa	aa	aa	40	aa	aa	aa

Aat において bb, *6Pgd* において bb, そして *Lap* で null phenotype をしめず個体はそれぞれ*と**と***の印をつけた。

この集団では、高自殖性だけでなく特異な集団内の遺伝的構造も検出された。表3に、調べた全個体の *Pgm-2*, *Aat*, *6Pgd* における遺伝子型を示したが、特定の遺伝子型の組み合わせが多

いことがわかる。*Aat* で *bb* という遺伝子型をもつ個体は 5 個体あるが、これらの *Pgm-2*, *6Pgd* での遺伝子型は全て、それぞれ *bb*, *aa* である。また *6Pgd* で *bb* の個体は 4 個体だが、これらの *Pgm-2*, *Aat* での遺伝子型は全て、それぞれ *aa*, *aa* である。*Lap* で null phenotype を示した 7 個体は、1 個体 (KAN5) を除き、みな *Pgm-2*, *Aat*, *6Pgd* がそれぞれ *bb*, *aa*, *aa* である。このことは、遺伝子座間の遺伝子頻度に相関があることを示唆している。この相関の程度は *R* という統計量であらわされるが(向井, 1978), その結果を表 4 に示した。カイ自乗検定により、*Pgm-2* と *Aat*, *Pgm-2* と *6Pgd* の間には有意な相関が存在することがわかる。このような、高自殖性種における遺伝子座間の相関は、種子植物の *Avena barbata* や *Hordeum vulgare* で報告されている (Allard, 1975 ; Clegg et al., 1978)。

表 4. 3 遺伝子座間における遺伝子頻度の相関の程度 (*R*)

	<i>Pgm-2</i>	<i>Aat</i>	<i>6Pgd</i>
<i>Pgm-2</i>	—	0.301*	-0.419*
<i>Aat</i>	—	—	-0.126n. s.

*, 5%水準で有意; n. s., 有意でない。

討 論

Botrychium が自殖性のグループであろうという推測は、主に配偶体が地中性であるため精子の移動が妨げられるであろうという理由でなされてきた (Tryon & Tryon, 1982)。しかし、同じ地中性配偶体を持つ同形孢子シダ植物でありながら、*Equisetum* (Soltis et al., 1988) や *Lycopodium* (Soltis & Soltis, 1988) では自殖は認められていない。それゆえ *Botrychium* の自殖性は地中性配偶体とは結び付かず、他の要因が関与している可能性が高いと考えられる。

遺伝子座間の相関については、この集団における極めて高い自殖性が影響していると思われる。自配受精を行うと 1 代で純系個体になるが、その子孫がさらに自配受精を続けた場合、これは遺伝的には栄養繁殖が無配生殖と同じで、同じ遺伝子型の個体がクローナルに増えることとなる。この集団の場合、そういった自殖で増えるクローナルな系列が、複数集まって 1 つの集団を形成していると解釈できる。しかし有性生殖種であるかぎり、たとえ低頻度でも他殖がおこなわれていれば無配生殖種と違い、世代交代と共に遺伝子座間の相関は減少し最後にはなくなってしまう。しかし、*Botrychium* は一般にパイオニア的な性格を持つため、おのおのの集団は一時的なもので、決して遺伝的な平衡に達していないのかもしれない。

普通、遺伝子座間の相関は、互いに連鎖している遺伝子座で観察され、連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) と呼ばれる。フユノハナワラビの *Pgm-2*, *Aat*, *6Pgd* が連鎖しているかどうかは、この種の配偶体の培養が困難であるため、実質上たしかめる手段がない。だがこの種は染色体数が多いため ($2n=90$, Nishida et al., 1964), 別の染色体に乗っている可能性の方が高い。しかし、たとえ別の染色体に乗っていても、強度の自殖が行われた場合、特定の遺伝子型の組

合わせが保護される例は、前にも述べたが Allard (1975) らの *Avena barbata* で報告されている。Abena の場合、特定の遺伝子型組み合わせは、土壤の水分環境 (mesic or xeric) に対応しており、自然選択も特定の遺伝子型組み合わせの保護に寄与していることが示唆される。フユノハナワラビでもそのような環境との対応が存在するかどうかは今後の課題である。

Tryon & Tryon (1982) は、*Botrychium* の自殖性と、このグループの分類の難しさを結び付け次のように述べている。“Thus a minor variation of a species may, through inbreeding, form a colony ; or different variations may grow together without intergrading through crossing. The resulting complex patterns of local morphological variation combined with the relatively few characters of the plants have made the taxonomy of the species difficult.”。本研究では、各遺伝子型組み合わせを形態的には区別することはできなかった。しかし、ある形態的変異型が自殖により固定し、クローナルに増えることは十分に推測でき、この要因が分類を混乱させている可能性は高いと私は思う。

この報告では、ただ 1 集団を扱ったのみであり、高自殖性および遺伝子座間の相関といった現象が、例外的なものであることを否定できない。さらに多くの集団について解析し、一般性を確かめることが必要である。

本研究の便を与えられた金沢大学理学部付属植物園長清水建美教授に深謝する。

引用文献

- Allard, R. W. 1975. The mating system and microevolution. *Genetics* 79 : 115-126.
- Clegg, M. T., A. L. Kahler, & R. W. Allard. 1978. Estimation of life cycle components of selection in an experimental plant population. *Genetics* 89 : 765-792.
- Haufler, C. H. 1987. Electrophoresis is modifying our concepts of evolution in homosporous pteridophytes. *Amer. J. Bot.* 74 : 953-966.
- Klekowski, E. J. 1979. The genetics and reproductive biology of ferns. In : A. F. Dyer (ed.), *The experimental biology of ferns*. Academic Press, London.
- . & H. G. Baker. 1966. Evolutionary significance of polyploidy in the Pteridophyta. *Science* 153 : 305-307.
- Mccauley, D. E., D. P. Whittier, & L. M. Reilly. 1985. Inbreeding and the rate of self-fertilization in a grape fern, *Botrychium dissectum*. *Amer. J. Bot.* 72 : 1978-1981.
- 向井輝美 1978. 集団遺伝学. 講談社, 東京.
- Nishida, M. S. Kurita, & S. Niizeki. 1964. Cytotaxonomy of Ophioglossales. II. Chromosome number in *Sceptridium*. *J. Jap. Bot.* 39 : 140-144.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow, & G. J. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns : a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.* 73 : 9-27.
- . & P. S. Soltis. 1986. Electrophoretic evidence for inbreeding in the fern *Botrychium virginianum* (Ophioglossaceae). *Amer. J. Bot.* 73 : 588-592.
- . & ———. 1987. Polyploidy and breeding systems in homosporous Pteridophyta : a reevaluation. *Amer. Nat.* 130 : 219-232.
- , P. S. Soltis, & R. D. Noyes. 1988. An electrophoretic investigation of intragametophytic selfing

- in *Equisetum arvense*. Amer. J. Bot. 75 : 231-237.
- Soltis, P. S. & D. E. Soltis. 1988. Estimated rates of intragametophytic selfing in lycopods. Amer. J. Bot. 75 : 248-256.
- Tryon, R. M. & A. F. Tryon. 1982. Ferns and allied plants. Springer-Verlag, New York.
- Watano, Y. & K. Iwatsuki. 1988. Genetic variation in the fern, the 'Japanese apogamous form' of *Asplenium unilaterale* Lam. Bot. Mag. Tokyo 101 : 213-222.