

論文内容の要旨

論文題目 APOMIXIS AND ITS EVOLUTION IN CORNOPTERIS CHRISTENSENIANA (WOODSIACEAE)

[ハコネシケチシダ(イワデンダ科)における無配生殖とその進化に関する研究]

パク チャンホ
氏名 朴 贊 浩

世界のシダ植物の約10%が無配生殖種であり、日本の種では約15%が無配生殖を行う。しかも無配生殖種の約75%が倍数体でしかもほとんどが3倍体である。このように、無配生殖とそれに伴う倍数性はシダ植物の多様化に深くかかわっている。無配生殖種の起源については、有性生殖種と無配生殖種間の雑種が無配生殖様式を母種から受け継ぐことによって新種が生じる例が知られている。一方、有性生殖種の種間雑種が無配生殖を獲得して不稔状態を脱し、独立種になったと推定されることもある。しかし無配生殖という様式がどのように進化したかはわかっていない。無配生殖(無融合生殖)では、非減数孢子(染色体数が複相)が形成され、その後、受精なしに非減数配偶体の栄養細胞から直接孢子体が生じる(狭義の無配生殖)という2つの過程が生活環で相次いで起こる(図1)。本研究は、不稔雑種とされるハコネシケチシダにおける不完全あるいは初期進化段階と予想される無配生殖を解析し、無配生殖の起源を探ることを目的とする。

1. 半人工環境下における自然繁殖

シケチシダ属の3倍体ハコネシケチシダは形態、染色体数および分布からイッポンウラボ(2倍体)とシケチシダ(4倍体)の種間3倍体不稔雑種と推定されている。しかし日本から韓国南部に広く分布しているので不明の生殖様式によって繁殖している可能性がある。一方、東京大学植物園の「シダ園」(屋外半地下)で自然繁殖したハコネシケチシダと見られる幼個体が多数見つかった(図2)。この幼個体は(1)シダ園で共に栽培されているイッポンウラボとシケチシダの新たな雑種形成によって、あるいは(2)シダ園および近くの

栽培場にある日本各地から集められたハコネシケチシダ成個体から無配生殖によって繁殖した可能性の2つが考えられる。そこでどのように繁殖するかを明らかにするために東大植物園および自然集団のハコネシケチシダと近縁種について染色体数を観察した。幼個体を倍数体レベルにより同定するために、シダ園及び栽培場から集められた3種の27の幼個体及び27成個体の合計54個体について染色体数を観察した(図3-12)。21幼個体は3倍体($2n=120$)、1幼個体は異数体($2n=121$)のハコネシケチシダであった。シダ園のハコネシケチシダ1成個体も120本の染色体をもつ3倍体であった。栽培場の25

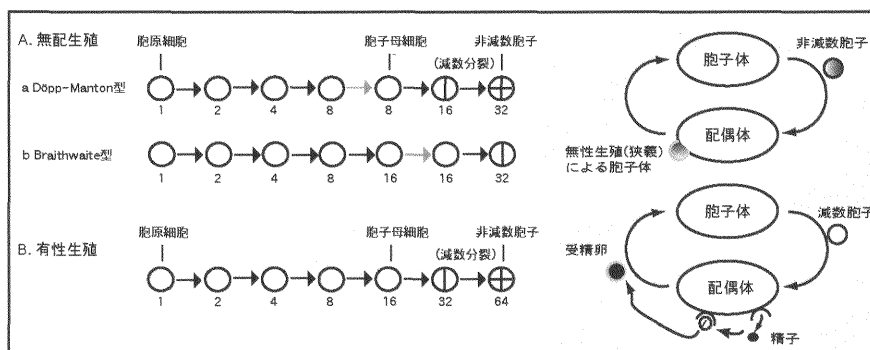


図1. シダ植物の有性生殖と無配生殖における孢子形成過程と生活環。孢子形成過程の赤い矢印は染色体倍加(復旧核)を示す。

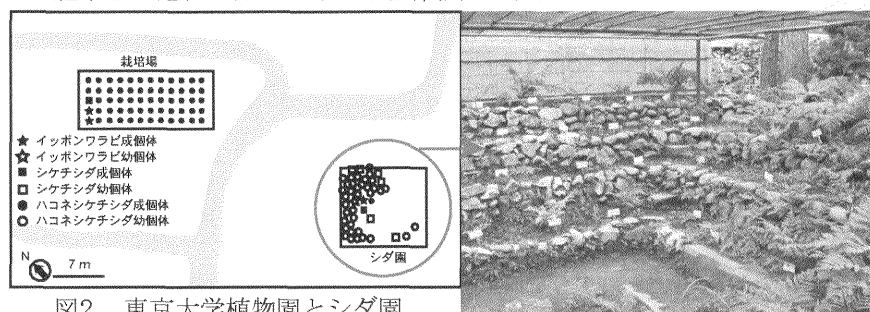


図2. 東京大学植物園とシダ園。

成個体は 120, 121, 122, 126本の染色体をもつ4つの異数性サイトタイプに分かれた。2n=120のサイトタイプが19個体, 121, 122本の異数体がそれぞれ3個体, 2個体, 126本の異数体は1個体であった。シダ園のイッポンワラビの1幼個体と1成個体はともに2倍体(2n=80)であり, シケチシダの5幼個体と1成個体は4倍体(2n=160)であった。シダ園ではイッポンワラビの繁殖は極端に少なかった。この結果および比較形態(データ省略)から, ハコネシケチシダは孢子(無配生殖)を介して自然繁殖する可能性が高いことが示唆された。

2. 酵素多型およびDNA多型分析

シダ園でハコネシケチシダ幼個体が無配生殖で自然繁殖した可能性と, 両親種間の新たな交雑によって繁殖した可能性をさらに検証するために, 酵素多型およびDNA多型分析を行った。

2-1. 酵素多型分析

3種の計108個体について13酵素種を予備的に検査したところ10アイソザイムで変異が見られた。幼個体で検出された8アロザイムパターンのいずれもイッポンワラビとシケチシダの交雑の結果生じると期待される表現型と一致しなかった(表1)。したがって, ハコネシケチシダ幼個体がシダ園において交雑によって生じた可能性はないと考えられる。これに対し, ハコネシケチシダ幼個体で見つかった8表現型のうち, A-Fの6型は植物園で栽培されている成個体と同一であり, ハコネシケチシダ幼個体が6個体以上の成個体の非減数孢子から生じたことが示された(表1)。一方, 残り2幼個体の表現型GとHは成個体では見つけれず, 親子関係は不明である。

さらに, ハコネシケチシダ成個体には6つの表現型以外にも19表現型, 計25型があることがわかった(表1)。したがって, ハコネシケチシダ自身が著しい複数回起源であることが示唆される。

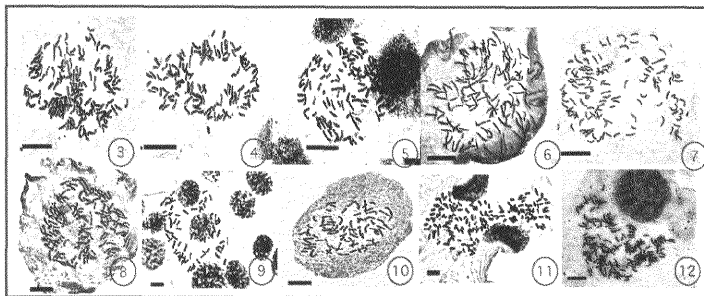


図3-12. ハコネシケチシダ (3-8), イッポンワラビ (9,10) 及びシケチシダ (11,12) 成・幼個体の体細胞染色体. 3 幼個体 2n=120. 4 成個体 2n=120. 5 幼個体 2n=121. 6 成個体 2n=121. 7 成個体 2n=122. 8 成個体 2n=126. 9 幼個体 2n=80. 10 成個体 2n=80. 11 幼個体 2n=180. 12 成個体 2n=180. スケール=10 μ m.

表2. ハコネシケチシダ幼個体の推定両親種.

幼個体の アロザイム型	親種	
	イッポンワラビ	シケチシダ
A*	母親	父親
A	父親	母親
A	父親	母親
B	父親	母親
B	父親	母親
C	母親	父親
C	父親	母親
D	母親	父親
E	父親	母親
F	父親	母親
G	父親	母親
H	母親	父親

(*アロザイム型 A, B, Cは系統樹より区別)

表1. シケチシダ属3種のアイソザイムパターン (表現型)

	アロザイム								倍体数	
	PGI-1	PGM-1	TPI-1	TPI-2	SKDH	6PG-1	6PG-2	IDH	幼個体	成個体
ハコネシケチシダ										
アロザイム型										
A	b	b	b	b	b	a	b	b	19	5
B	ab	b	b	b	b	a	b	b	8	1
C	b	b	ab	b	b	a	b	b	2	7
D	ab	b	ab	b	b	a	b	b	3	2
E	ab	b	b	ab	b	a	b	b	2	2
F	b	b	b	b	ab	a	b	b	1	15
G	b	ab	ab	b	b	a	b	b	1	0
H	b	b	b	b	b	b	b	a	1	0
I	b	b	b	b	ab	ab	b	b	0	4
J	b	ab	b	b	b	a	b	ab	0	2
K	b	b	b	b	ab	b	b	b	0	2
L	b	ab	ab	b	b	a	ab	b	0	2
M	b	b	b	b	b	a	ab	ab	0	1
N	b	ab	b	b	b	a	b	b	0	1
O	b	b	ab	b	b	ab	ab	b	0	1
P	b	b	ab	b	b	a	b	ab	0	1
Q	b	b	b	b	b	ab	b	b	0	1
R	b	ab	ab	b	b	ab	b	b	0	1
S	b	b	b	b	ab	a	ab	b	0	1
T	a	b	b	b	c	a	ab	b	0	1
U	a	b	b	b	b	a	ab	b	0	1
V	bc	ab	b	b	ab	a	b	b	0	1
W	b	ab	b	b	b	a	ab	b	0	1
X	b	b	b	b	bc	a	b	b	0	1
Y	b	b	ab	b	b	b	b	ab	0	1
Z	bc	ab	ab	b	b	a	ab	b	0	2
ZA	ab	b	ab	b	b	a	ab	b	0	1
イッポンワラビ										
CA	a	a	b	b	b	a	b	b	1	1
CB	b	b	b	ab	b	b	b	c	1	0
CC	b	b	b	b	b	b	a	e	1	0
シケチシダ										
A	b	b	b	b	b	a	b	a	1	1
DA	b	b	b	b	b	a	b	ab	0	1
DB	b	b	b	ab	b	a	b	a	4	1

2-2. DNA多型分析

葉緑体はほとんどの被子植物及びあるシダ植物では母性遺伝することが知られている。無配生殖による親子関係をさらに検証するために、葉緑体DNA上のtrnL-F遺伝子領域の塩基配列を比較解析した(図13)。得られた系統樹はイッポンワラビとシケチシダの2つの群に分かれ、調べた69個体のハコネシケチシダ中30幼個体はそのどちらかに分かれた。従ってハコネシケチシダ幼個体は、イッポンワラビを母親とするか、シケチシダを母親とした交雑によって生じた成個体からつくられることが示された。また、ハコネシケチシダ幼個体の8つのアロザイム表現型は2つの群のどちらかに分かれるものの他に、両方の群に分かれるもの(例えば表現型A)があった。酵素多型分析とDNA多型分析結果を合せると、ハコネシケチシダ幼個体には12のタイプが存在することが明らかになり、それらはそれぞれ異なる成個体から派生したことが示された(表2、図13)。これより、シダ園においてハコネシケチシダは頻繁に無配生殖によって繁殖できることが示唆される。

さらに、ハコネシケチシダ成個体にもイッポンワラビを母種とするもの、シケチシダを母種とするものがあり、同一のアロザイムタイプでも両方の場合があることもわかった。結局、日本各地から集められたハコネシケチシダ成個体には、酵素多型及びDNA多型データによって34の表現型が識別されることが明らかになった。多型が生じる要因として(1)異なる遺伝子型のイッポンワラビとシケチシダの親個体の間で複数回交雑が起こった、あるいは(2)交雑後に突然変異が蓄積された可能性が考えられる。酵素多型がアロザイムの組合せによるものでありユニークなアロザイムがないことと、個体によって母親種が異なっていることから、(1)が主たる要因であると考えられる。このような有性生殖種間の交雑が複数回起こって、無配生殖する独立種が生じるパターンはハコネシケチシダで初めて示された。

3. 孢子形成と孢子体形成

3-1. 孢子形成

ハコネシケチシダが繁殖に必要な稔性のある良形孢子をつくるかを明らかにするために孢子形成過程を調べた。成個体は観察したすべての孢子嚢で異常な孢子形成パターンを示した。1孢子嚢中には通常16個(稀に14か12)の孢子母細胞(SMC)がつくられ(図14)、無配生殖に典型的な8SMCをつくる孢子嚢は見られなかった。第一減数分裂では、二価染色体は規則的に分かれるものの、一価染色体が細胞中に散乱し、不稔雑種で見られるような異常が観察された(図15)。SMCのその後の発生により、4つの孢子形成パターンが観察された。孢子の多数またはほとんどが集合し不良形であるパターン1(図16)、約64の良形孢子を形成するパターン2(図17)、約64個の孢子のほとんどが不良形で一部は良形であったパターン3(図18)の他、まれに16の良形孢子を形成するパターン4(図19)もあった。また日本各地から集めた成個体について良形孢子形成率を調べた結果、個体によって変異が大きかった(表3)。以上より、ハコネシケチシダの良形孢子形成は不稔雑種で見られるパターンとよく似ており、一般的な無配生殖の非減数孢子形成(復旧核を伴う8個の倍数体SMCを経由するDöpp-Manton形式、あるいは減数分裂時に復旧核となるBraithwaite形式; 図1)とは異なることが明らかになった。

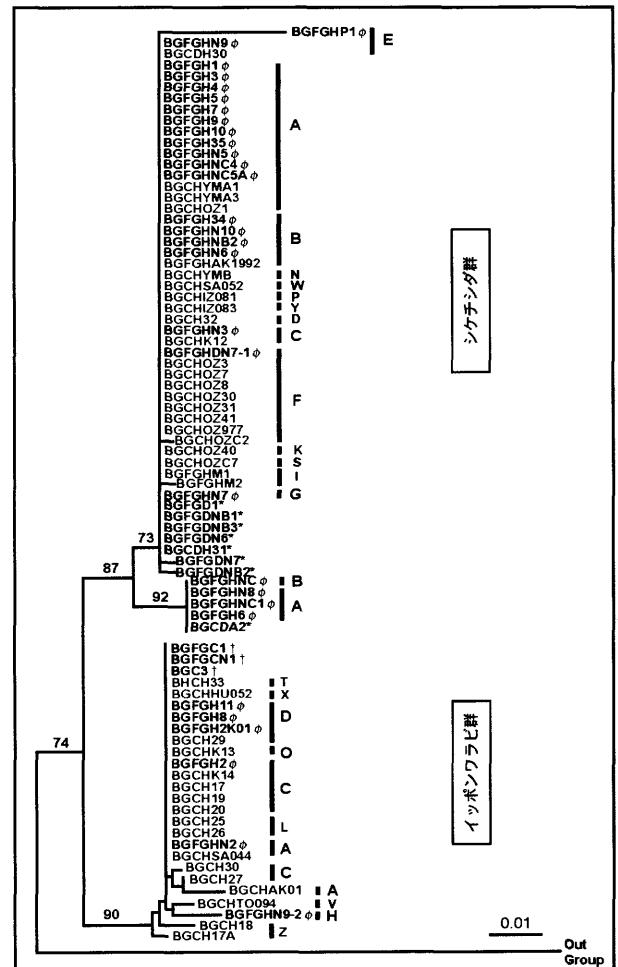


図13. ハコネシケチシダ、イッポンワラビ及びシケチシダのNJ方法に基づく葉緑体遺伝子の系統樹。†はイッポンワラビ、*はシケチシダを、φはハコネシケチシダ幼個体、赤い色はハコネシケチシダ成個体を示す。A-Zはアロザイム型(表1)を示す。

3-2. 無配生殖による孢子体形成

ハコネシケチシダの配偶体が無配生殖によって孢子体をつくるかどうかを確かめるために、成個体の孢子を採集し培養した。成個体の良形孢子の発芽率は個体によって変異が大きく、良形孢子形成率が高い個体ほど発芽率も高い傾向があった(表3)。酵素多型及びDNA多型分析により、親子関係が推定できた成個体について発芽率を比べた結果、良形孢子形成率が高いものは発芽率も高い相関が認められた。配偶体は造卵器と造精子とも生じず、栄養組織から孢子体は無配生殖的に形成し(図20, 21)。孢子体形成率も個体によってばらつきがあるが、良形孢子形成率および発芽率とおおまかな正の相関が認められた(表3)。

4. 考察

本研究により、これまで不稔雑種とされたハコネシケチシダは人工的環境下ではあるが無配生殖によって自然繁殖することが示され、培養条件下で確認された。シダ植物に一般的な無配生殖ではDöpp-Manton形式またはBraithwaite形式によって32個の非減数孢子(図1)を作るのに対して、ハコネシケチシダではそれらとは異なり不稔雑種で見られるような孢子形成パターンを示した。そして、比較的低い頻度(0-45%)で配偶体から孢子体は無配生殖的に形成する(表3)。したがって、非減数孢子形成と無配生殖(狭義)の両方の過程が不完全であり、無配生殖種の初期の進化段階にあると考えられる。さらに本研究により、ハコネシケチシダそのものが交雑による多数回起源(少なくとも34回)であることが示された(表2, 図13)。また孢子形成パターンと狭義の無配生殖パターンの観察から、無配生殖は遺伝子レベルではまだ確立していないと推定され、不完全な無配生殖がくり返されている可能性が高いといえる。無配生殖の起源について、非減数孢子形成にかかわる遺伝子が無配生殖(狭義)も支配するとする一遺伝子説と、2つの過程それぞれにかかわる複数の突然変異が起こったとする説が提唱されている。本研究により非減数孢子と狭義の無配生殖の生理的つながりがハコネシケチシダの少なくとも34系列(クローン)で生まれていることから、非減数孢子形成を起こす突然変異が起これば、狭義の無配生殖も引き起こされるという1遺伝子説の方がより支持される。

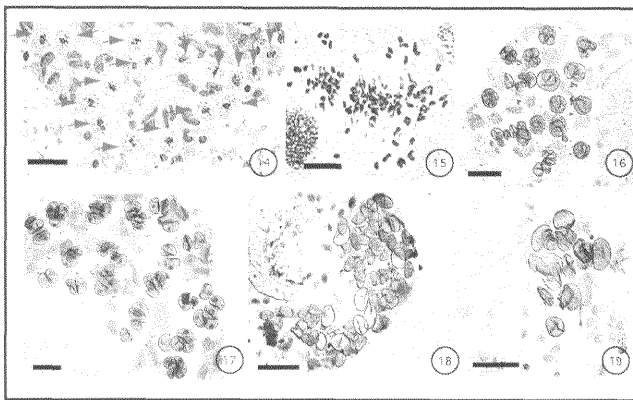


図14-19. ハコネシケチシダ成個体の孢子形成過程。14 16個の孢子母細胞. 15 第一減数分裂. 16 不良形孢子を形成するタイプ. 17 約64個の良形孢子を形成するタイプ. 18 小数の良形孢子を形成するタイプ. 19 約16個の良形孢子を形成するタイプ. 14,15 スケール=10 μ m. 16-19 スケール=100 μ m.

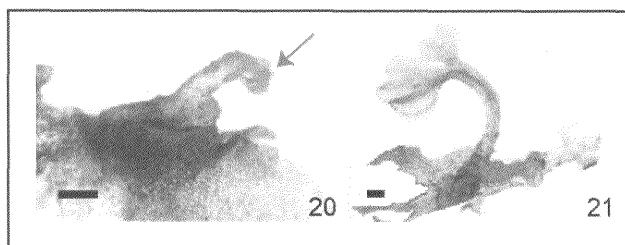


図20, 21 配偶体から無配生殖的に生じたハコネシケチシダ孢子体. スケル=1mm.

表3. ハコネシケチシダの良形孢子形成率、発芽率、無配生殖(狭義)と無配生殖(広義)の頻度

標本	頻度(%、平均 \pm 標準偏差)			
	良形孢子	発芽	無配生殖(狭義)	無配生殖(広義)*
BGCH33	27 \pm 2.21	9.6 \pm 1.42	1.6 \pm 1.2	0.04
BGCHYMA1	40 \pm 1.68	40 \pm 2.23	25 \pm 2.2	4.0
BGCHYMA3	92 \pm 3.45	80 \pm 1.6	45 \pm 2.1	33
BGCHYMB	38 \pm 3.74	55 \pm 1.52	12 \pm 1.2	2.5
BGHM1	1.2 \pm 1.25	0.2 \pm 0.7	0	0
BGCHOZ977	2.1 \pm 1.26	0.3 \pm 0.3	0	0
BGCHOZ41	1.1 \pm 1.2	0.2 \pm 0.5	0	0
BGCHOZ7	1.1 \pm 1.21	0.2 \pm 0.5	0	0
BGCH29	14 \pm 2.45	2.3 \pm 1.6	0	0
BGCH32	12 \pm 1.74	11 \pm 2.1	0	0
BGCHK12	56 \pm 2.21	65 \pm 2.4	12 \pm 1.3	4.4
BGCHK14	54 \pm 2.22	32 \pm 2.2	11 \pm 1.2	1.9
BGCH19	15 \pm 1.35	20 \pm 2.2	0	0
BGCH26	34 \pm 3.14	32 \pm 2.6	15 \pm 1.2	2
BGCH27	54 \pm 2.32	54 \pm 2.2	18 \pm 1.2	5.2
BGCH30	55 \pm 2.41	63 \pm 1.6	22 \pm 1.2	7.6

* 良形孢子形成率、発芽率と無配生殖(狭義)の割合から計算