

9 5 2 3 野生植物の耐塩性の進化に関する生態遺伝学的研究

助成研究者：牧 雅之（福岡教育大学 生物学教室）

共同研究者：増田 理子（九州大学）

河口付近などの塩分濃度が高い環境には、形態的にも機能的にも特殊化した、いわゆる「塩生植物」が生育する。一方、塩沢地と淡水域のいずれにおいても生育できる種も少ないながら存在する。塩生植物の生理的特性は、古くから生物学者の関心を引いており、多くの研究がなされてきたが、広い塩分環境に生育できる種についての研究はまだあまりないのが現状である。このような種において、耐塩性が表現的可塑性によって決まっているのか、あるいは遺伝的にもコントロールされているのかどうかは定かではない。表現的可塑性によってのみ、耐塩性が実現されているとすると、異なる塩分環境に生育する集団間で、異なる塩分環境に対する反応に違いがないことが期待される。一方、遺伝的に決定されているとすれば、高塩分環境の集団と低塩分環境の集団では、反応に違いが存在するはずである。本研究では、河口域から内陸までの広い塩分環境に生育するヨシ（*Phragmites communis*）の耐塩性が、表現的可塑性によるのか、あるいは遺伝的なバックグラウンドをもつものなのかを明らかにすることを目的とする。

塩沢地の3集団、内陸地の2集団から種子を採集し、異なる4つの塩分環境において発芽実験および成長実験を行った。同じ集団においては、高塩分環境ほど発芽速度が小さい傾向が見られた。発芽速度は塩沢地の集団が低濃度の塩分環境で内陸地集団よりも有意に大きかった。これは、塩沢地集団では吸水性確保のために種皮が薄くなっており、その結果としてすばやい発芽反応を示した可能性がある。一方、最終的な発芽率は、いずれの塩分環境においても集団間で有意な差は見られなかった。一方、初期生長量は、塩沢地集団は内陸地集団よりも、高塩分環境下で有意に大きかった。したがって、ヨシにおける耐塩性は表現的可塑性だけでなく、ある程度遺伝的な制御も受けている可能性がある。

次に、塩沢地集団と内陸地集団について、酵素多型レベルでの違いが生じているかどうかを調べた。その結果、塩沢地集団と内陸地集団間の遺伝的分化の程度は、塩沢地集団間および内陸地集団間の遺伝的分化の程度と違いがなかった。したがって、塩沢地集団と内陸地集団では現在でも遺伝子流動が頻繁に起きていると考えられる。塩沢地集団と内陸地集団の間に見られた、異なる塩分環境に対する違いは、自然選択によって維持されていると考えられる。

9523 野生植物の耐塩性の進化に関する生態遺伝学的研究

助成研究者：牧 雅之 (福岡教育大学 生物学教室)

共同研究者：増田 理子 (九州大学)

1. 研究目的

河口付近などの塩分濃度が高い環境には、形態的にも機能的にも特殊化した、いわゆる「塩生植物」が生育する。塩生植物の生理的特性は、古くから生物学者の関心を引いており、多くの研究がなされてきた。また、塩生植物は生態学的にも強い関心もたれてきており (Sen, 1982; Ungar, 1978, 1987)、これまでに多くの研究の蓄積がある。

通常、高塩分環境の塩沢地では塩生植物が優占し、それ以外の植物は少数の種に限られて分布する。これらの塩沢地に生育する、塩生植物でない種は、しばしば完全な内陸地においても良好な生育を示すことが多い。しかしながら、このような広範囲の塩分濃度環境に生育する野生植物種の耐塩性についての研究例は、現時点ではごくわずかである (Bazzaz, 1973; Khatri, 1991)。

本来の生育環境が内陸地でありながら、塩沢地にも生育できる植物種は、低塩分濃度環境下のみならず高塩分濃度でも生育できる生理的メカニズムを獲得していると考えられる。しかしながら、この生理的メカニズムが表現的可塑性 (phenotypic plasticity) によって実現されているのか、あるいは塩分濃度が高い環境下の集団は自然選択を受けた結果として、内陸地の集団とは耐塩性に関して遺伝的に分化しているのかについては明らかではない。前者によって耐塩性が実現されているのであれば、内陸地集団でも塩沢地集団でも、異なる塩分環境に対する反応が等しくなっているはずであり、一方、耐塩性について遺伝的分化が確立しているのであるならば、両集団の異なる塩分環境に対する反応は異なるはずである。野生植物の重金属耐性に関する一連の研究では、廃坑などの高い重金属濃度環境下においては、重金属耐性に関する遺伝的分化が確立されており、これはごく短期間のうちに起こったと考えられている (Bradshaw, 1971; Shaw, 1989)。

本研究の目的は、イネ科のヨシを材料として、広範囲の塩分濃度に生育する野生植物の耐塩性が表現可塑的に決定されているのか、あるいは遺伝的に決定されているのかに関する情報を与えることにある。そのために、内陸地と塩沢地の集団から種子を採集し、異なる塩分環境下で発芽・生育させて、反応の違いをみる。また、仮に内陸地と塩沢地の集団では、耐塩性の遺伝的分化がみられたとすると、両集団は異なる遺伝子プールをもつ異なる遺伝的交流集団として認識できるのか、あるいは現在でも両集団では遺伝的交流が存在し、耐塩性は選択の結果として実現されているのかを、酵素多型を用いた集団遺伝学的解

析によって明らかにする。

2. 材料

ヨシ (*Phragmites communis* Trinius) はイネ科の多年生草本であり、しばしば河川敷に群生する。地下に長い走out枝をもち、1 クローンが大きな面積を占めることが多い。植物体の高さは約2メートル以上になり、花期は8-10月である。ヨシは内陸地の河川敷以外にも、しばしば河口域のような高塩分濃度環境下にも生育する。このような環境下では、植物体の高さも内陸地に比べて低く、1メートル以下であることが多い。

本研究では、福岡県内の2カ所の内陸地集団 (F1, F2) と3カ所の塩沢地集団 (S1, S2, S3) から1995年11月に花穂をサンプリングした (Fig. 1)。サンプリングの際には、異なるクローンから種子を採集するようにするため、明らかにクローンが認識できる場合を除いて、10メートル以上の間隔をおいてサンプリングを行った。採集した花穂を挿し鉢で擦ることによって、花穂から種子を分離し、個体ごとに多数の種子を得た。

3. 異なる塩分環境下におけるヨシの発芽・成長

塩分濃度の異なる環境下で、内陸地集団と塩沢地集団が、発芽およびその後の成長に関して異なる反応を示すかどうかを調べる。

3.1 方法

3.1.1 種子発芽の反応性の違い

各集団からえられた種子を、異なる4つのNaCl濃度 (0mM, 100mM, 200mM, 300mM) の水で浸した濾紙を置いたシャーレに個体ごとに入れた。このシャーレをプログラム恒温槽にうつし、Washitani (1987) によるGTM法のDT系を用いて、種子を発芽させた。恒温槽に移してから3日後から、1日おきに発芽した種子の個数を記録した。

3.1.2 発芽後の生長量の違い

蒸留水に浸した濾紙を置いたシャーレに、各集団から得られた種子を個体別に入れ、25℃で発芽させた。発芽後、3.1.1と同様の4つの濃度のNaCl水溶液で浸したピートモス・ブロックに移し換え、25℃、育成灯下で栽培した。1カ月後、植物体の高さをデジタルノギスを用いて、0.01mm単位まで測定した。

3.2 結果

3.2.1 種子発芽の反応性の違い

Figure 2にS2集団の4つの塩分環境における発芽パターンを示す。NaCl濃度が高くなるにつれて、発芽速度は低くなった。

次に、異なる塩分環境下における集団間の発芽パターンの違いをFigure 3に示す。NaCl濃度が高い場合 (300mM, 400mM) には、塩沢地集団と内陸地集団の間で、発芽速度に大きな違いはみられなかった。一方、NaCl濃度が低い場合 (0mM, 100mM) には、塩沢

地集団は内陸地集団よりも有意に発芽速度が早かった。なお、最終的な発芽率には、集団間で違いはみられなかった（Figure 4）。

3.2.2 発芽後の生長量の違い

Figure 5に1カ月後の稚苗の高さの違いを、異なる塩分環境ごとに示した。低NaCl濃度（0mM、100mM）環境においては、塩沢地集団と内陸地集団の間で違いは見られなかったが、高NaCl濃度（300mM、400mM）環境においては、塩沢地集団の方が生長量が有意に大きかった。

3.3 考察

異なる塩分環境に対する発芽反応の違いは低塩分濃度環境下のみで観察された。塩沢地集団は低塩分濃度環境下では、内陸地集団よりも有意に発芽速度が大きかった。このような大きい発芽速度は、いわゆる塩生植物一般に見られる傾向である（Ungar, 1978）。この理由としては、塩沢地では吸水が困難であるために、種皮を薄くする選択圧が働くためであると考えられる。ヨシの場合にも、塩沢地集団では、吸水のために種皮が薄くなっており、その結果として、これらの集団では低塩分環境下で発芽速度が大きかった可能性がある。

初期生長量は、高塩分環境下で塩沢地集団と内陸地集団との間で違いがみられた。ヨシが生育するような塩沢地においては、NaCl濃度はしばしば200mMを越えることがあり（Mariko et al., 1992）、塩沢地集団は、このような環境下で生育が可能であるように選択を受けている可能性が高い。一方、低塩分環境下で初期生長量の違いに特定の傾向は見られなかった。イネ科植物の重金属耐性である集団は、しばしば通常土壌においては低い生長量を示すことが知られている（Macnair, 1993）。今回のヨシの塩分に対する反応においては、このような傾向は観察されなかったが、ヨシは長命の多年生草本であり、初期生長量だけでなく、その後の生長量において違いが生ずる可能性はある。

今回の実験では、異なる塩分環境に対して、塩沢地集団と内陸地集団では異なる発芽反応と初期成長を示したことから、これらが単に表現的可塑性のみによって決定されているとは考えにくい。むしろ、塩沢地集団と内陸地集団では、それぞれの環境に適した遺伝子型が自然選択によって残された可能性があると考えられる。

4. ヨシの内陸地集団と塩沢地集団の集団遺伝学的解析

ヨシの内陸地集団と塩沢地集団は、異なる塩分濃度に対する発芽反応性と初期生長量に違いがあることが3により明らかとなった。次に、両集団は異なる遺伝子プールをもつ異なる遺伝的交流集団として認識できるのか、あるいは現在でも両集団では遺伝的交流が存在し、ことなる発芽反応と初期生長量は選択の結果として実現されているのかを、酵素多型を用いた集団遺伝学的解析によって明らかにする。

4.1 方法

4.1.1 ゲル電気泳動

3.2の生長量実験で用いた残りの芽生えを、蒸留水で浸したミートモス・ブロックに植え、25℃、育成灯下で1カ月間育成した。この芽生えをShiraishi et al. (1986)のすり潰し緩衝液中で、ホモジェナイザーをもちいて破碎し、4℃、15,000rpmで10分間遠心し、上澄みを酵素粗抽出液とした。1親個体につき、芽生えを1個のみ分析に用いた。得られた粗抽出液をShiraishi (1988)の方法によるポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって、電気泳動した。泳動後、Soltiset al. (1983)の方法により、活性染色を行った。染色を行った酵素は、グルコースリン酸イソメラーゼ (PGI)、フォスホグルコムターゼ (PGM)、6-フォスフォグルコン酸脱水素酵素 (6PG)、トリオースリン酸イソメラーゼ (TPI)、アルコール脱水素酵素 (ADH)、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH)、アスパラギン酸アミノ転移酵素 (AAT) の7つである。

4.1.2 統計処理

活性染色して得られたザイモグラムから個体の遺伝子型を決定し、集団における遺伝子頻度を各遺伝子座ごとに決定した。このデータセットを用いて、Nei (1987)の遺伝的同一度 (I) と標準遺伝的距離 (D) をすべての集団を2つずつペアにして計算した。標準遺伝的距離をもしいて、Saitou and Nei (1987)の近隣接合法を用いて集団間の類似図を作成した。

4.2 結果

7酵素種の染色により、15 遺伝子座について遺伝子型を決定することができた。そのうち多型が観察されたのは、7遺伝子座 ($Pgi-3$, $6pg-1$, $Pgm-1$, $Pgm-2$, $Tpi-1$, $Tpi-3$, $Aat-2$) であり、残りの8遺伝子座 ($Pgi-4$, $6pg-2$, $Tpi-2$, $Gdh-1$, $Gdh-2$, $Adh-1$, $Adh-2$, $Aat-1$) は単型であった。また、いくつかの遺伝子座 ($Pgi-1$, $Pgi-2$, $6pg-3$, $6pg-4$ など) はバンドパターンが非常に複雑で、遺伝子型の解釈が不可能であった。ほとんどの遺伝子座で固定ヘテロ接合が観察されたことから、ヨシは異質倍数体性であると考えられる。

Table 1に5つの集団間の遺伝的同一度と遺伝的距離を、Table 2にTable 1の結果を要約した値を示す。全集団のすべての組み合わせの遺伝的同一度の平均は0.845であり、これはこれまでに調べられてきた多数の植物種における種内集団間の値の範囲にはいる。一方、塩沢地集団間、内陸地集団間、および塩沢地集団と内陸地集団間の遺伝的同一度はそれぞれ、0.849、0.828、0.846となり、ほとんど違いが見られなかった。

Table 1に示した遺伝的距離をもとに、近隣接合法をもちいて描いた集団間類似図をFig. 1に示す。塩沢地集団ごとあるいは内陸地集団ごとにクラスターを作ることはなかった。

4.3 考察

発芽速度および初期生長量の塩分濃度に対する違いが塩沢地集団と内陸地集団との間で観察されたことから、両者は異なる遺伝的背景を持っている可能性が示唆された。しかし

ながら、塩沢地集団間、内陸地集団間、および塩沢地集団と内陸地集団間で遺伝的同一度に違いはみられず、自然選択に中立な遺伝子のレベルでは遺伝的な分化はないと考えられる。したがって、塩沢地集団と内陸地集団間には遺伝的交流がない状態であるとは考えにくい。

ヨシは、風媒花であり、また自家不和合性であることから集団間での遺伝子流動はかなり頻繁に起こるものと考えられる(Hamrick, 1987)。ヨシの分布は通常、河川に沿って連続的であるため、塩沢地集団と内陸地集団の間に遺伝的交流を妨げる障壁はないと考えられ、今回の結果はこれを支持する。

したがって、今回観察された、発芽速度および初期生長量の塩分濃度に対する違いは強い選択圧のもとで、維持されている可能性がある。イネ科のいくつかの植物で調べられた重金属耐性においても、耐性集団と自然集団の間には遺伝子流動が頻繁に起きており、重金属耐性は強い自然選択圧によって維持されているものと考えられている。

5. 今後の課題

まず第一に、今回集団間で観察された、発芽速度および初期生長量の塩分濃度に対する違いがどのようなメカニズムで起きているかを調べる必要があると考えられる。低塩分濃度における種子の発芽速度が、塩沢地集団では大きかったことから、種子の吸水性に大きな違いがある可能性がある。種子の吸水性は、種皮の厚さに大きく依存するので、種皮の厚さを塩沢地集団と内陸地集団で比較することは意味がある。また、初期生長量の違いが生じる生理学的研究も必要とされる。ヨシにおいても、塩分耐性に関する生理学的研究がなされているが(Matoh, 1988)、1塩沢地集団についてのみの解析であり、今後は、異なる塩分環境下の集団間で、耐塩性に関する生理学的メカニズムの違いを明らかにすることが必要であると考えられる。

次に、今回は集団の成立に重要であると考えられる、発芽反応と初期成長のみを対象としたが、ヨシは長命な多年生草本であり、定着後の成長も重要である。したがって、ある程度長い期間にわたって、今回と同様の実験を行う必要があると考えられる。

さらに、塩分に対する発芽反応や初期生長量が、どの程度遺伝的に決定されているかを知ることが必要である。このためには、量的遺伝学的解析が必要である。異なる反応を示す個体間で交配を行い、異なる塩分環境で栽培して比較を行えば、反応の違いのどれくらいが遺伝的な制御として説明できるかを知ることが可能である。

6. 引用文献

- Bazzaz, F. A. 1973. Seed germination in relation to salt concentration of *Prosopis farcta*. *Oecologia* 13: 73-80.
- Bradshaw, A. D. 1971. Plant evolution in extreme environments. In: *Ecological Genetics*

- and Evolution. Pp. 20-50. Blackwell, Oxford.
- Hamrick, J. L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: Differentiation patterns in higher plants. Pp. 53-66. Academic Press. London.
- Khatri, R., Sethi, V. and Kaushik, A. 1991. Inter-population variations of *Kochia indica* during germination under different stresses. Ann. Bot. 67: 413-415.
- Macnair, M. R. 1993. The genetics of metal tolerance in vascular plants. New. Phytol. 124: 541-559.
- Mariko, S., Kachi, N., Ishikawa, S.-I. and Furukawa, A. 1992. Germination ecology of coastal plants in relation to salt environments. Ecol. Res. 7: 225-234.
- Match, T., Matsushita, N. and Takahashi, E. 1988. Salt tolerance of the reed plant *Phragmites communis*. Physiol. Plant. 72: 8-14.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Pp. 512. Columbia University Press. New York.
- Saitou, N and Nei, M. 1987. The neighbor joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Sen, D. N. and Rajpurohit, K. 1982. Contributions to the Ecology of Halophytes. Pp. 272. Junk. Hague, Netherlands.
- Shaw, A. J. 1989. Heavy Metal Tolerance in Plants. Pp. 355. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Shiraishi, S., Kaminaka, H. and Nishimura, K. 1986. Genetics of glutamate oxaloacetate transaminase isozymes of needle and pollen tissues in *Chamaecyparis obtusa*. J. Jap. For. Soc. 68: 499-504.
- Shiraishi, S. 1988. Inheritance of isozyme variation in Japanese black pine, *Pinus thunbergii* Parl. Silvae Genet. 37: 93-99.
- Soltis, D. E., Haufler, C. H., Darrow, D. C. and Gastony, G. J. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffer, and staining schedules. Am. Fern. J. 73: 9-27.
- Unger, I. 1978. Halophyte seed germination. Bot. Rev. 44: 233-264.
- Unger, I. 1987. Population ecology of halophyte seeds. Bot. Rev. 53: 301-334.
- Washitani, I. 1987. A convenient screening test system and a model for thermal germination responses of wild plant seeds: behavior of model and real seeds in the system. Pl. Cell Environ. 10: 587-598.

Table 1. Nei's genetic identity (upper) and distance (lower) among the populations of *P. communis*.

	S1	S2	S3	F1	F2
S1	-	0.883	0.783	0.787	0.889
S2	0.124	-	0.882	0.817	0.872
S3	0.244	0.125	-	0.948	0.760
F1	0.240	0.202	0.053	-	0.828
F2	0.117	0.137	0.274	0.188	-

Table 2. Summary values for Nei's genetic identity for pairwise combination among the populations of *P. communis*.

	Mean	Range
All populations	0.845	0.760-0.948
Within saltmarsh	0.849	0.783-0.883
Within inland	0.828	-
Between salt marsh and inland	0.846	0.760-0.948

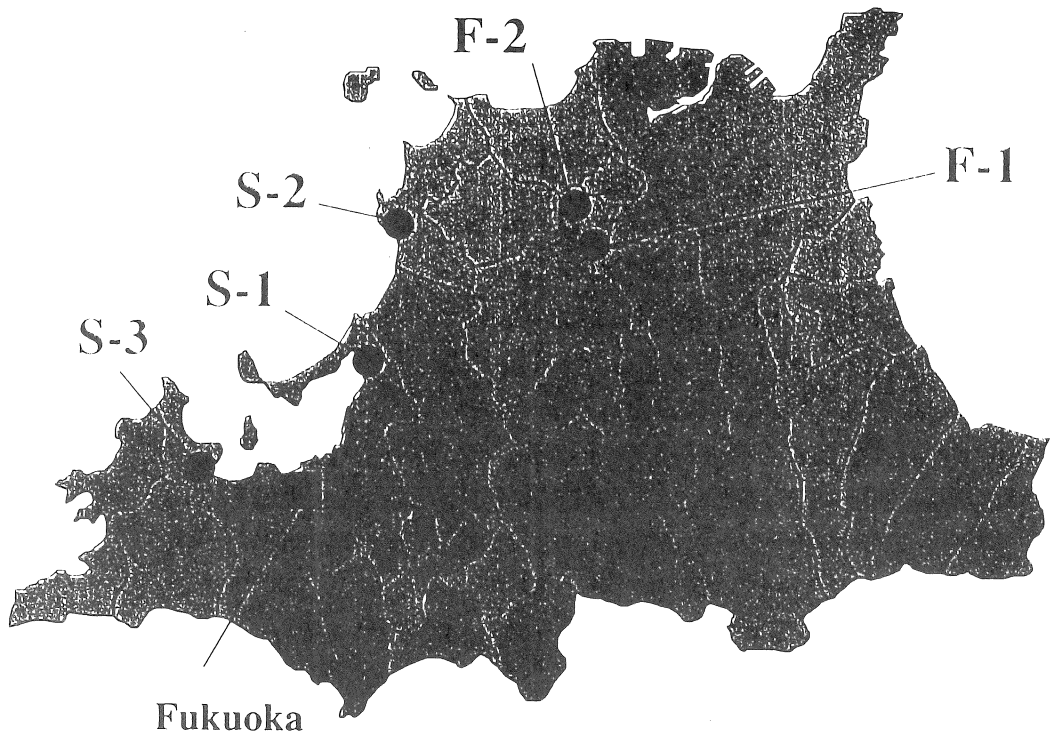


Figure 1. Sampling localities of *P. communis*.

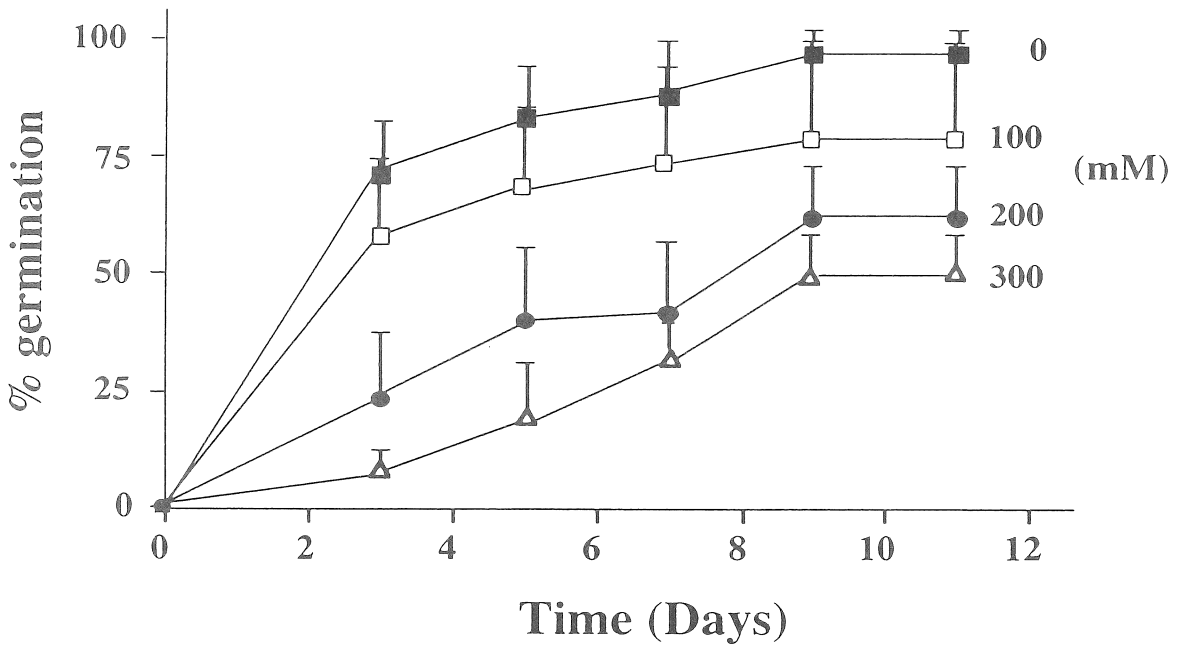


Figure 2. Germination responses of S2 populaiton to four different salinity levels.

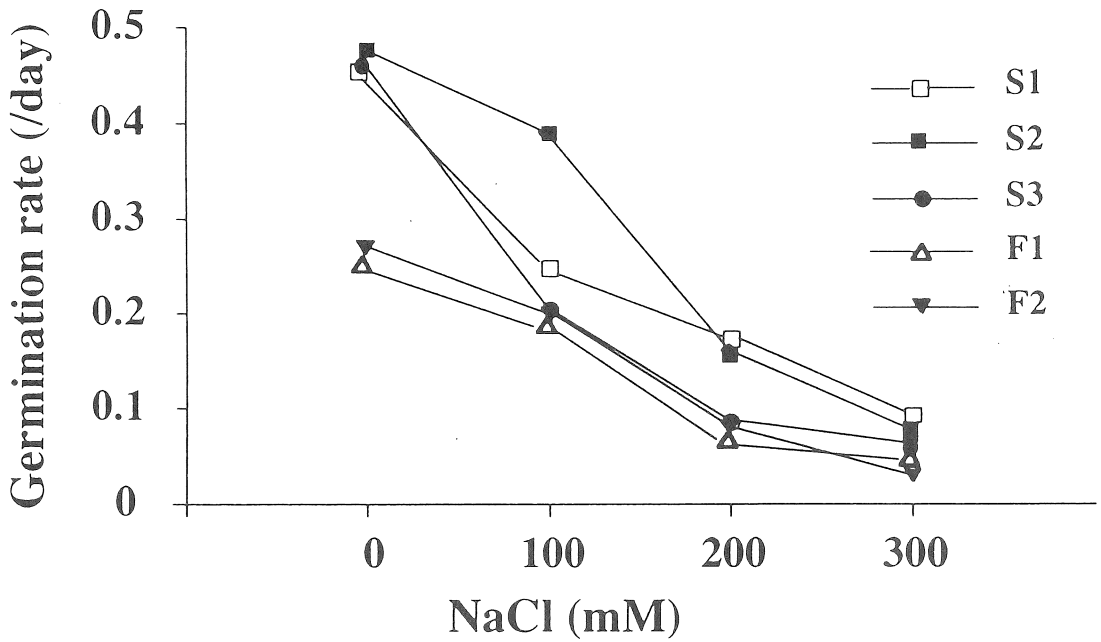


Figure 3. Differences in percent germination among five populations under four salinity conditions.

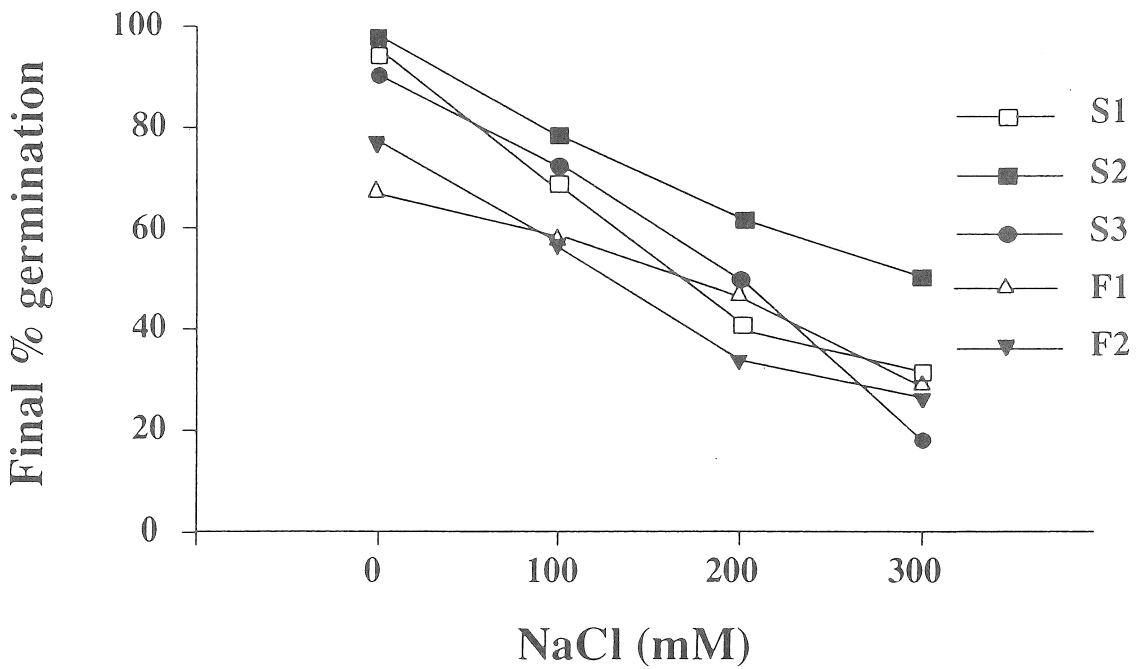


Figure 4. Final percent germination under four salinity conditions.

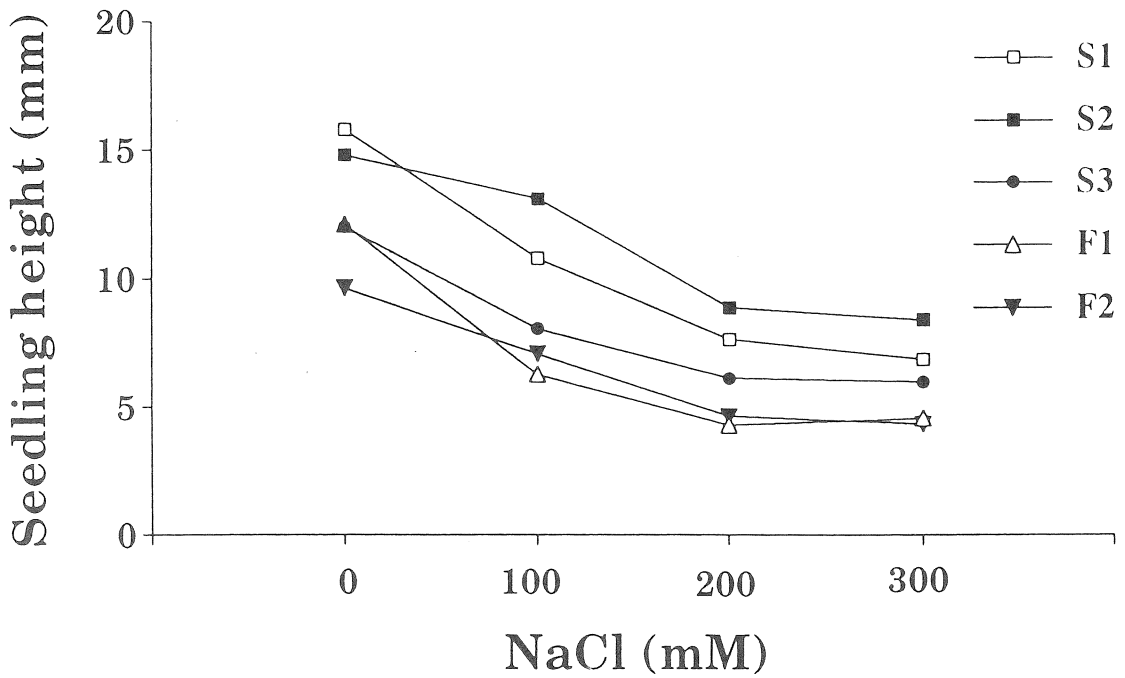


Figure 5. Differences in seedling height among five populations under four salinity conditions.

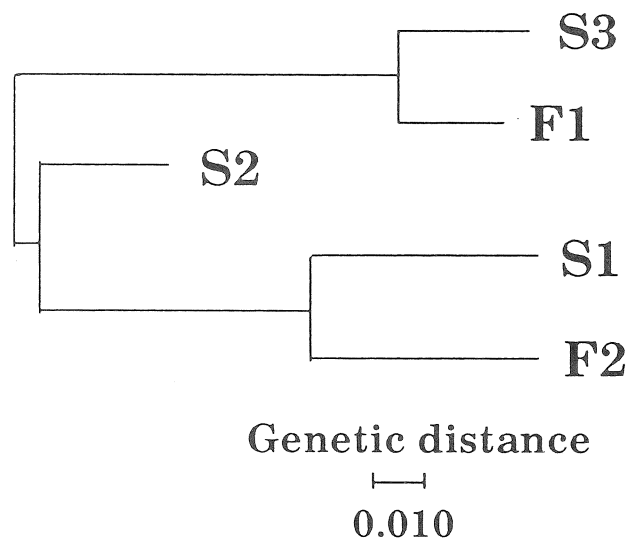


Figure 6. The phenogram for five populations using the neighbour joining method based on Nei's standard genetic distance.

Ecological genetics of salinity tolerance in a wild plant.

Masayuki Maki (Department of Biology, Fukuoka University of Education)

Michiko Masuda (Department of Biology, Kyushu University)

Summary

Differences in percent germination, germination rate, and initial growth rate under four salinity conditions were compared among five natural populations (three salt marsh populations and two inland ones) of *Phragmites communis* Trinius (Graminae). Germination rate was higher in salt marsh populations than inland ones under low NaCl concentrations, although no difference was found under high NaCl concentrations. On the other hand, final germination rate was not different among populations through any salinity levels. Initial growth rate is higher in salt marsh populations than inland ones in high salinity levels, but is the same under low salinity conditions. These facts suggest that salinity tolerance in *P. communis* is controlled not only by phenotypic plasticity but also genetically in part.

We also examined allozyme diversity among these five populations. Genetic differentiations between salt marsh populations and inland ones were not higher than among salt marsh populations or between inland ones. This fact suggests that gene flow extensively occurs between salt marsh and inland populations, and that genetic control for salinity tolerance is maintained by natural selection in salt marsh populations of *P. communis*.