

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 年～2010 年

課題番号：20780111

研究課題名 (和文) 遺伝情報を用いた外来生物種の分布拡大経路の推定

研究課題名 (英文) Chloroplast and nuclear microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of invasive species in Japan

研究代表者

木村 恵 (KIMURA MEGUMI)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・特任研究員

研究者番号：20436520

研究成果の概要 (和文)：

外来生物の分布拡大過程を推定する為、核、葉緑体 DNA を用いてニセアカシアの集団遺伝解析を行った。各集団は遺伝的に有意に分化するが在来種のような地理的な遺伝構造はみられなかった。また 2 種類以上の種苗源が国内に導入されたと考えられた。

この種を蜜源として効率的に利用する為、ミツバチに付着した花粉 DNA から採餌範囲を推定した。ミツバチは半径 3km を広く利用しており、時期や蜂群間で採餌対象木は異なっていた。

研究成果の概要 (英文)：

In order to elucidate the invasion process and effectively manage the growing area of *R. pseudoacacia*, two studies were carried out as follows:

First, to understand the invasion process using nuclear and chloroplast SSR markers. In Japan, there is no isolation by distance, however, significant genetic differences were found between populations. The genetic analysis also suggested that *R. pseudoacacia* in Japan might be originated from several seed/seedling sources.

Second, to reasonably design the growing area size of *R. pseudoacacia* for honeybee farms, the genotype of pollen collected from honeybee legs was compared with flowered trees growing around honey colonies. From this results, we estimated the foraging area.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：外来生物、ニセアカシア、マイクロサテライトマーカー、遺伝子流動、分布拡大

1. 研究開始当初の背景

近年、国内に侵入・定着した外来生物の分布拡大が在来生態系に及ぼす影響が問題となっている（鷲谷・矢原 1996）。植物のみに着目しても多くの外来種の侵入が確認されており、在来種との生育地の競合など悪影響が懸念されている。特定外来生物には12種の維管束植物が定められているほか、要注意リストには更に多くの植物種がリストアップされている。このように、外来植物の定着が問題視されているにも関わらず、外来種の日本における生活史やその分布拡大の経路、定着要因に関する情報は極めて少なく、十分な管理方法が確立されていない状況である。

ニセアカシア (*Robinia pseudoacasia* L. 別名ハリエンジュ) は1873年に導入された北アメリカ原産の落葉高木で、荒廃地の緑化樹、砂防林、街路樹として国内に植林されてきた（臼井 1993、中越・前河 1996）。良質な蜜源として養蜂家に利用される一方で、植林地から逸出し、現在では河畔・海岸域を中心に分布を拡大しており、注意すべき外来植物の1つである。ニセアカシアは純林を形成して在来種の生育地を占有するため、希少種を含めた在来種を駆逐する恐れが指摘されている（崎尾 2003）。伐採しても根元からの萌芽や根萌芽など旺盛なクローナル成長で個体を維持するため、一旦定着した侵入地での除去が困難であり（岩井 1996、崎尾 2003）、新規個体群の増加を抑制するためには種子定着を阻止することがもっとも重要な課題である。しかし、これまでの研究では旺盛なクローナル成長ばかりが着目されることが多く、種子によってどのように定着し個体群の分布を拡大

しているのかという予防管理に繋がる知見は極めて少ない。またニセアカシア林の拡大が問題視される一方で、養蜂に有効利用されている側面もあり、利用と防除を両立した管理法を提言するためには、ミツバチの利用範囲を明らかにし、現在利用されている林分を適切に管理し拡大を抑制する必要がある。

植物個体群の分布拡大の過程を知る手がかりとして、DNA マーカーを用いた遺伝子流動解析が行われている。特に近年ではマイクロサテライトマーカーを用いた解析が主流である。遺伝構造の地理的な違いから分布変遷を推定し、種子や実生の親子解析からは遺伝子流動の実態が明らかにされてきている（ex. Tsuda & Ide 2005, Islam et al. 2006, Sestuko et al. 2007）。しかしマイクロサテライトマーカーを用いた解析の多くは在来種を対象としたものであり、現在分布拡大が問題となっている外来種に関する知見は極めて少ない。ニセアカシアでは既に核のマイクロサテライトマーカーが開発されており、クローンサイズに関する知見が報告されているが（Lian et al. 2004）、集団遺伝学的な解析や種子散布範囲に関する情報はまだ無い。侵入地の複数の個体群を対象とした遺伝的な解析を行うことで個体群の定着・維持と分布拡大の過程を推定することが、外来生物の管理を行う上で急務である。

2. 研究の目的

外来植物管理のモデルケースとして、個体群の分布拡大が問題視されているニセアカシアの繁殖様式を明らかにする。具体的には、多型性の高いマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的な解析から、個体群内の遺伝的多様性、個

体群間の遺伝距離、ミツバチによる花粉流動範囲を明らかにする。これらの解析は、分布拡大がもっとも問題視されている河畔域（流域スケール）で行うほか全国の個体群間の比較（全国スケール）することで、河川に沿った分布拡大の実態と植栽による人工的な遺伝子流動が遺伝構造に与える影響を明らかにする。遺伝的な解析では核 DNA だけでなく、遺伝様式の異なる葉緑体 DNA でもマイクロサテライトマーカーを作成・使用することで、より詳細な解析を行う。具体的には以下の項目について調べる。

1) 侵入予防のために種子による初期定着の過程を明らかにする（核、葉緑体マイクロサテライトを用いた遺伝的多様性と遺伝距離の比較）

2) 管理・利用範囲を特定するためにミツバチによるアカシア林の利用範囲を明らかにする（花粉 DNA を用いたミツバチの採餌範囲の推定）

3. 研究の方法

1) 侵入予防のために種子による初期定着の過程を明らかにする

核と葉緑体のマイクロサテライトマーカーを利用し、各個体群の遺伝的多様性、個体群間の遺伝的距離を計測した。2つのマイクロサテライトは遺伝様式が異なっており、核は花粉流動と種子散布の動きを、葉緑体は種子散布の動きのみを反映している。調査は流域スケール（分布拡大過程）、全国スケール（植栽地からの逸出の影響）の2つのスケールでおこなった。

流域スケールとしては荒川流域の秩父から浦和に成立するニセアカシア自然林 12 個体群 486 サンプルを、全国スケールとしては北海道、青森、秋田（3 個体群）、山形、長野、東京、兵庫、鳥取、広島から採取し

た 12 個体群 367 サンプルと中国の 1 個体群 35 サンプルを含め解析を行った。

葉緑体に関しては、葉緑体マイクロサテライト 5 遺伝子座を用いてハプロタイプを調べ、その組成を個体群間で比較した。また、核マイクロサテライト 6 遺伝子座を用いて遺伝子型を調べ、Sstructure 2.2 (Pritchard et al. 2007) を用いて導入の由来となる個体群数を推定した。

更に種苗の移動がニセアカシアの遺伝構造に与える影響を探るため、現在生産されているニセアカシア種苗集団の遺伝的多様性について調べた。長野県の種苗元が生産するニセアカシア種苗 4 集団（A、B と同じ苗畑に生産されている播種年度の異なる C1、C2）から合計 175 個体の葉を採取した。またこれらの種苗は種子によって生産されていることから、種苗元が使用している種子を採取したと考えられるニセアカシア自然集団 2 集団（梓川流域、鎖川流域）からも合計 88 個体の葉を採取した。集団解析に使用したのと同じマイクロサテライト S マーカーのセットを用いて遺伝子型を特定した。葉緑体マイクロサテライトの結果からは種子を採取した母樹数を反映する葉緑体ハプロタイプ数と集団内の組成を調べた。核マイクロサテライトの結果からは遺伝的多様性の指標としてアレリックリッチネス (A_r) を算出した。これらの値を集団間および全国集団の結果と比較した。

2) 管理・利用範囲を特定するためミツバチによる花粉の送粉範囲を明らかにする
養蜂に用いているミツバチの採餌範囲を推定するため、ミツバチの体表に付着した花粉の遺伝子型を調べ、周囲の開花個体と比較した。

東京都昭島市、立川市、日野市の多摩川河川敷 (35° 41' N, 139° 24' E) 約 3 km

に成立するニセアカシア林を対象とし、解析を行った。調査地におけるニセアカシアの開花期間は5月初旬に開始し、5月中旬にはほとんどの個体で8割以上の花序の開花が終了した。先行研究から調査区内には遺伝的に異なる164のニセアカシアパッチの存在することが調べられており位置図が作成されている(練ら, 2004)。このうち162ジェネットについて、5つのマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を特定し、花粉親候補として用いた。花粉の採集には調査地の北側300mに養蜂目的で設置された蜂群を用いた。採集は開花の初期、最盛期、後期にあたる5月6日、9日、16日に行った。帰巢したミツバチの後肢からニセアカシア花粉塊を採集し、0.01M濃度のスクロース溶液に保存した。花粉を1粒ずつ分離し、各マイクロサテライト5遺伝子座を用いて遺伝子型を特定した。ミツバチ12個体から採集した86花粉について採集日ごとにアレリックリッチネス($Ar_{(10)}$)計算した。このうち3座以上のデータが収集できた74花粉についてはCervus3.0(Marshall, 2007)を用いて父性解析を行った。花粉親候補の遺伝子型から計算した父性排斥率は0.9952である。

4. 研究成果

1) 侵入予防のために種子による初期定着の過程を明らかにする

a) 流域スケール

荒川流域の12個体群では個体群あたり平均6.8タイプ、計20タイプが確認された。最上流に位置する、埼玉県で最も古くに植栽された個体群(Pop1)では11タイプの他に、9タイプが他の個体群で確認されたことから、導入は数回にわたって行われたと考えられる。上流の4個体群(Pop1~4)で存在した計17タイプは下流の個体群でも確認されており、河川によって上流から種子が散布された可能性が示された(図1)。また実生の定着がみられる、熊谷の2個体群(Pop8、9)では11タイプ、10タイプとハプロタイプ数が

多く、3つのレアハプロタイプもみられた。特に実生由来の個体群であるPop9では10タイプが確認されており、上流の様々な母樹が種子源となって分布拡大に貢献している可能性が示唆された。

b) 全国スケール

日本全国24集団853サンプルについて葉緑体のハプロタイプを調べたところ、21タイプが検出された。個体群あたりのハプロタイプ数は平均5.4タイプ(1~11タイプ)であった。在来樹種で報告されているような、ハプロタイプの地理的な集中はみられず、全21タイプ中17タイプは複数の個体群で確認され、例えば北海道と鳥取など異なる地域であっても共通のハプロタイプが確認された。また中国個体群でも日本と共通のハプロタイプのみが確認された。これらの結果は、限られた起源のニセアカシア個体群を元に全国的に植栽された可能性を示唆する。その一方で、日本で最も古くにニセアカシアを植栽した長野県牛伏川の個体群では5タイプみられたが、兵庫と広島を除く21個体群では長野とは異なるハプロタイプも確認されており、複数の個体群を元に数回にわたり植栽された可能性が示された。

核の遺伝子データからSutstructure 2.2を用いて推定された導入期の由来となる個体群は2個体群以下と推定された。いずれの個体群でも同様の推定値を示したことから、日本に導入されたニセアカシア個体群は、ハプロタイプ数が多様な少なくとも2個体群を由来として導入されたものと考えられる。

種苗集団および種子採取集団の全175個体を葉緑体SSRで解析した結果、合計13の葉緑体ハプロタイプが確認された。この内10タイプは全国集団でも確認されたタイプであった。また、種苗で78%を占める2つのハプロタイプは全国集団の中でも広範囲で確認されたタイプであり、種苗の全国的な移動を示唆する結果が得られた。また、自然集団の梓川で11、鎖川で7、種苗集団ではA、B、C1、C2でそれぞれ8、3、1、5タイプみられた。種苗BやC1ではタイプ数が極端に少ないことから、限られた母樹から採取した種子によって種苗が生産されたと考えられる。全国集団では1タイプのみで構成された自然集団もみられており、これはBやC1のようにタイプ数が限られた種苗によって成立、拡大したものと考えられる。また、同じ種苗元Cの種苗であっても種子の採取年度によって、ハプロタイプの多様性は変動していることが示唆された。

核DNAの遺伝的多様性を示す平均 Ar は全体で9.0、集団あたり7.0~8.7であり、種苗集団で特に低い値を示すことはなかった。種苗集団では、例え種子を採取した母樹数が限られていたとしても、種子生産時の昆虫によ

る活発な花粉流動によって遺伝的多様性は保たれていると考えられた。

2) 管理・利用範囲を特定するためミツバチ

による花粉の送粉範囲を明らかにする

花粉から計算された $Ar_{(10)}$ の平均値は開花の初期、最盛期、後期でそれぞれ 5.2、5.1、4.6、全ての期間を合わせても 5.5 と開花時期によって大きな差はみられなかった。父性解析を行った 74 花粉のうち 29 花粉について調査区内で花粉親を特定することができた。特定された花粉親数は開花の初期、最盛期、後期でそれぞれ 9、7、10、開花期全体で 21 であった。このうち 17 の花粉親はいずれか 1 日のみで特定されたことから、ミツバチは開花時期によって異なるジェネットを採餌に利用している可能性が示された。また、1 つのミツバチ個体から 0~5、平均 2.4 の花粉親が特定され、その組成は異なっていたことから、同じ蜂群由来であっても採餌範囲はミツバチ個体によって異なる結果が示唆され、ミツバチ 1 個体が半径 3km 内に生育する様々なニセアカシアを利用していることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

木村 恵・練 春蘭

「SSR マーカーを用いた花粉解析によるセイヨウミツバチコロニーの利用範囲の推定」

第 120 回日本森林学会大会、

2009 年 3 月 25 日~28 日、京都大学

木村 恵・練 春蘭・小山 泰弘

「植栽に用いられるニセアカシア種苗の遺伝的多様性」

第 121 回日本森林学会大会、

2010 年 4 月 2 日~5 日、筑波大学

[図書] (計 1 件)

崎尾均編、文一総合出版、

「ニセアカシアの生態学 外来種の歴史・利用・生態とその管理」

練春蘭・木村恵・崎尾均・寶月岱造

「第 12 章マイクロサテライトマーカーが明かすニセアカシアの繁殖特性」

P185-199、2009 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 恵 (KIMURA MEGUMI)

東京大学・アジア生物資源環境研究センター・特任研究員