

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18724

研究課題名（和文）マメ科在来植物の外国産種子を用いた緑化による遺伝的攪乱リスクと適正利用

研究課題名（英文）Risk assessment of genetic pollution to native populations of Leguminosae plants by revegetation using foreign seeds and proposal of proper utilization guidelines

研究代表者

今西 亜友美（牧野亜友美）（Imanishi, Ayumi）

近畿大学・総合社会学部・准教授

研究者番号：70447887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マメ科植物であるコマツナギを主に対象として、外国産種子を用いた緑化による自生外来植物の遺伝的攪乱リスクを評価した。核と葉緑体DNAの解析から、国内自生個体と外国産種子は遺伝的に異なることが分かった。国内自生個体と外国産個体では、開花が重複する期間があることが明らかになったため、交雑が起こる可能性が示唆された。日本国内の自生地において遺伝的地域性が認められた。コマツナギの遺伝的地域性を保全するためには、外国産種子の使用を避けるだけでなく、日本産種子の採取地にも注意し、長距離離れた地域への種苗移動は避けるべきであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、コマツナギなど緑化に利用されるマメ科植物を対象とし、国内自生個体と外国産種子の遺伝的な違いを明らかにするとともに、日本国内での遺伝的変異とその地理的分布を明らかにした。また、コマツナギは緑化に使用されている日本産種子に限られた採取地由来であることを示した。これらの結果から、コマツナギの遺伝的地域性を保全するためには、外国産種子の使用を避けるだけでなく、日本産種子の採取地にも注意すべきであることから、日本国内での種苗移動ガイドラインを示した。

研究成果の概要（英文）：The risk of genetic pollution of native plants by revegetation using commercial seeds imported from foreign countries was evaluated, mainly for Indigofera pseudotinctoria. Analysis of nuclear and chloroplast DNA revealed that individuals derived from Japanese populations and foreign commercial seeds were genetically different. Natural hybridization between Japanese and foreign individuals may occur because there was overlap in flowering times. Japanese populations showed geographical structure. In order to conserve the genetic diversity and differentiation of Japanese populations, not only the use of foreign commercial seeds, but also long-distance movement of seeds in Japan should be avoided.

研究分野：緑化植物学

キーワード：地域性種苗 外国産在来植物 コマツナギ 次世代シーケンサー 葉緑体DNA 遺伝的地域性 のり面緑化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物多様性の重要性に対する認識の高まりにより、道路の新設等に伴って生じる人工斜面の緑化において在来植物の利用が推奨されている。しかし、種が同じであれば種子の採取地は問わなかったため、緑化に使用される在来植物の種子の99%は中国等の外国で生産されている。外国産種子による緑化は、自生在来植物の遺伝的攪乱を引き起こす可能性がある。

イタドリやススキ、ヨモギなど、のり面緑化に使用される在来植物の一部については、国内の集団の遺伝構造が調べられている。しかし、根粒菌と共生し、やせ地でも良く育つため緑化現場で多用されるコマツナギなどのマメ科植物については、国内の集団の遺伝構造がほとんど明らかにされていない。自生しているコマツナギに比べて外国産コマツナギは樹高が高いなど、自生個体と外国産個体で形態的な違いがあることが報告されており、外国産個体による自生個体の遺伝的攪乱が懸念される。

### 2. 研究の目的

本研究は外国産種子が多用されるマメ科植物を対象として取り上げ、国内の自生個体の遺伝的多様性の地理的分布、外国産個体と国内自生個体の形態、フェノロジーおよび遺伝的な違い、緑化現場における外国産個体の定着状況及び自生個体との交雑状況、外国産個体と自生個体間の交雑親和性および雑種適応度を明らかにすることで、外国産種子を用いた緑化による遺伝的攪乱リスクを総合的に評価し、のり面緑化におけるマメ科植物の適正な利用について提言することを目的とした。

### 3. 研究の方法

対象としたマメ科植物のうち、明確な結果が得られたコマツナギについてまとめる。

#### (1) 国内の自生個体の遺伝的多様性の地理的分布および外国産種子との遺伝的な違い

国内の自生個体の遺伝的多様性の地理的分布を明らかにするため、日本各地のコマツナギ自生地50地点の各3~20個体から遺伝解析に用いる葉を採取した。採取した葉から1~6サンプルを選び、改変CTAB法を用いてDNAを抽出した。また、中国産種子から育てた36個体(以下、中国産種子)と、日本産種子を用いて中国で生産された種子から育てた12個体(以下、原種子日本産種子)から葉を採取し、自生個体と同様に改変CTAB法を用いてDNAを抽出した。抽出されたDNAを用いて、核DNAと葉緑体DNAの遺伝的変異を調べた。

核DNAは、自生個体50サンプル、中国産種子13サンプル、原種子日本産種子4サンプルについて次世代シーケンサーを利用したMIG-seq法によってSNPs(一塩基多型)探索を行い、遺伝子型を決定した。検出されたSNPsの情報を用いて、クラスタリングを行った。

葉緑体DNAは、自生個体150サンプル、中国産種子36サンプル、原種子日本産種子12サンプルについて2領域(850bp)の塩基配列を決定した。その後、塩基配列上の変異からハプロタイプを識別した。

#### (2) 外国産個体と国内自生個体の種子形態およびフェノロジーの違い

コマツナギの中国産種子6ロットと原種子日本産種子2ロット、日本国内の自生地11地点から採取した種子を対象として、種子の形状、重量を計測した。形状は、方眼紙上に各ロット・地点につき30~40個体の種子を並べ、デジタルカメラを用いて写真を撮影し、画像解析ソフトを用いて種子の長径および短径、円形度を算出した。また電子天秤を用いて種子重量を計測した。中国産種子、原種子日本産種子、国内自生個体の種子の長径、短径、円形度および種子重量に差があるかを明らかにするため、一元配置分散分析およびTukeyのHSD検定を行った。

自生地から採取した種子から育成した117個体、中国産種子から育成した67個体を対象として、圃場にて同じ条件で生育実験を行い、開花時期を記録した。

#### (3) 緑化現場における外国産個体の定着状況

日本各地ののり面緑化地17地点の各3~10個体から遺伝解析に用いる葉を採取した。採取した葉から1~4サンプルを選び、改変CTAB法を用いてDNAを採取し、自生個体や外国産種子と同様に核DNAと葉緑体DNAの遺伝的変異を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 国内の自生個体の遺伝的多様性の地理的分布および外国産種子との遺伝的な違い

核DNAについては、75個体以上の個体に共通する遺伝子座を抽出した結果、397SNPsが検出され、8クラスターに分けられた。自生個体は4つのクラスター(クラスター1、4、6、7)に分けられ、主にクラスター1は主に東日本、クラスター4は西日本、クラスター6は宮崎県、クラスター7は主に北陸~中部地方に分布していた(図1)。また、原種子日本産種子はクラスター7に割り当てられ、中国で生産されても自生個体と同様の遺伝子型を維持していることが分かった。

葉緑体DNA上の2領域(850bp)の変異から21種類のハプロタイプが識別された(図2)。国内自生のコマツナギからは5種類のハプロタイプが検出された(A1、A2、A5、A8、B2)。全国に分布する1つのハプロタイプ(A1)がある一方で、東北・北陸地方のみ(A2)、近畿地方のみ(A5)、宮崎県のみ(A8)、太平洋側に点在(B2)のように、局地的に分布する少数のハプロタイプがあることが分かった(図3)。原種子日本産種子はすべて東北・北陸地方のみに見ら

れるハプロタイプ A2 であり、核 DNA の結果と合わせて、現在流通している日本産種子は当該地域に由来するものであることが推察された。

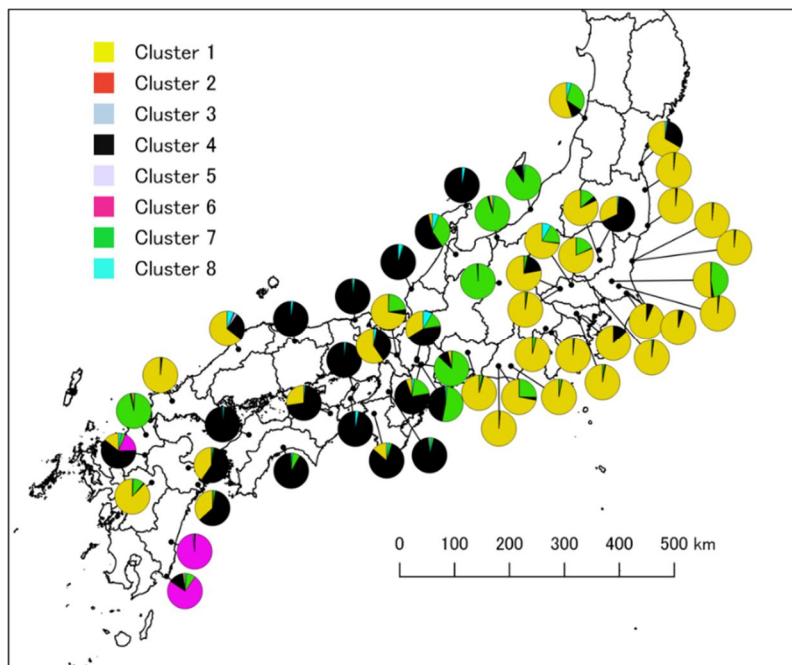


図 1 核 DNA の解析による自生の遺伝的集団構造

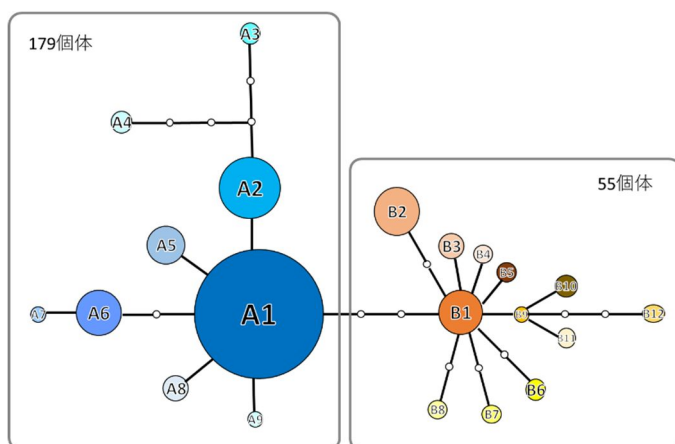


図 2 コマツナギの葉緑体 DNA の 2 領域の変異から識別された 21 種類のハプロタイプのネットワーク

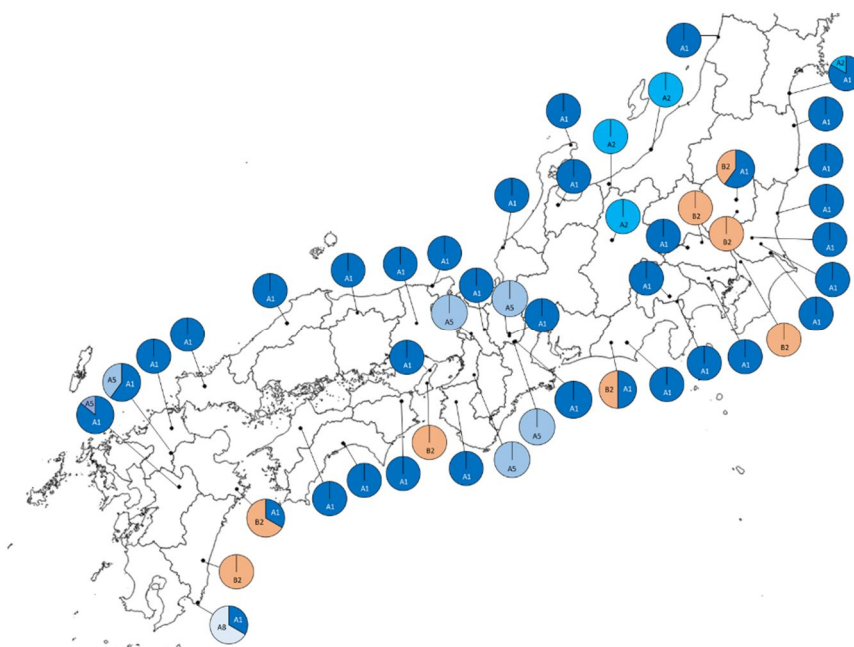


図 3 葉緑体 DNA の解析による自生の遺伝的集団構造

核 DNA について、中国産種子は自生個体とは異なるクラスターに割り当てられた（クラスター 2、3、5）。葉緑体 DNA についても同様に、中国産種子は自生個体とは異なる 12 のハプロタイプ（A3、A4、A6、A7、B1、B3、B5、B6、B7、B10、B11、B12）を有していた。

(2) 外国産個体と国内自生個体の種子形態およびフェノロジーの違い

一元配置分散分析および Tukey の HSD 検定の結果、コマツナギの種子の長径、短径と重量について、中国産種子と国内自生個体の種子との間で有意な差が見られた（図 4）。種子の長径については、中国産種子は平均 2.5mm であったのに対し、国内自生個体の種子は平均 2.0mm とやや短かった。短径についても、中国産種子は平均 1.9mm であったのに対して国内自生個体の種子は平均 1.7mm とやや短かった。種子重量（千粒重）は、中国産種子は平均 6.2g であったのに対し、国内自生個体の種子は平均 4.1g と大きく異なった。円形度には有意な差がなかった。以上のことから、コマツナギの種子は中国産のほうが自生個体よりも大型であることが示された。

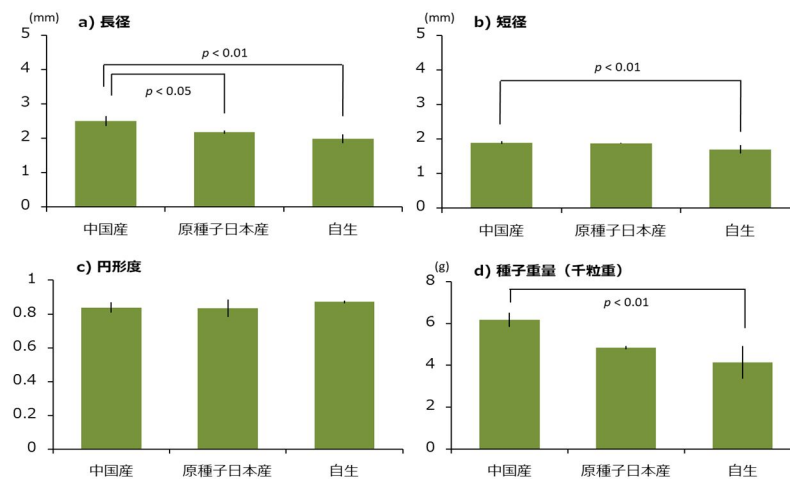


図 4 コマツナギの中国産種子、原種子日本産種子、国内自生個体の種子の a) 長径、b) 短径、c) 円形度、d) 種子重量（千粒重）の差

また、自生地から採取した種子から育成した個体の開花時期のピークは 8 月中旬であったのに対し、中国産種子から育成した個体の開花時期のピークは 9 月中旬であった。開花のピークの時期に違いがみられたが、8 月下旬は開花が重複していた。

(3) 緑化現場における外国産個体の定着状況

のり面個体は、核 DNA の解析の結果、13 地点で中国産種子と同様にクラスター 2、3、5 に割り当てられた。残る 4 地点ののり面個体は、原種子日本産種子と同様に、主にクラスター 7 に割り当てられた。

葉緑体 DNA の解析の結果、14 地点で日本の自生地では見られなかった 12 ハプロタイプ（A3、A6、A9、B1、B3、B4、B6、B8、B9、B10、B11、B12）が検出された（図 5）。のり面緑化には多様な系統の外国産種子が用いられており、外国産個体は緑化現場に定着していることが分かった。また、日本の自生地で見られたハプロタイプ（A1、A2）も 5 地点で検出された。とくに、東北・北陸地方のみで見られるハプロタイプである A2 が 4 地点で確認され、当該ハプロタイプが見られない西日本ののり面緑化地でも確認された。

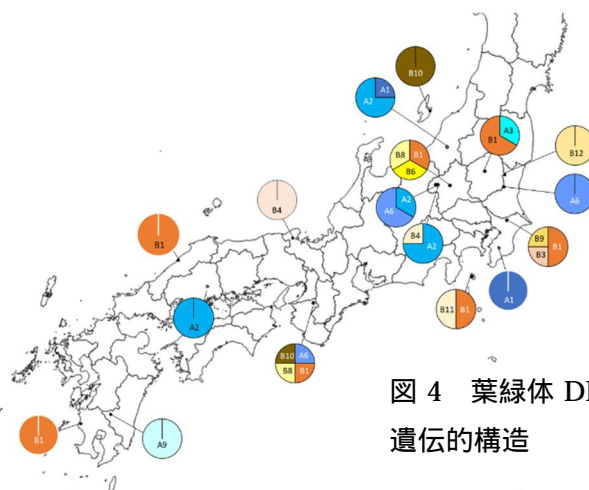


図 4 葉緑体 DNA の解析によるのり面緑化地の遺伝的構造

#### (4) まとめ

核 DNA と葉緑体 DNA のどちらにおいても、国内のコマツナギの自生集団と外国産種子は遺伝的に異なることが明らかになった。国内各地ののり面緑化地の大部分で多様な系統の外国産種子が使用され、定着していることも分かった。圃場実験の結果から、自生個体と外国産個体では、開花時期のピークが異なるものの、開花が重複する期間もあることが明らかになったため、交雑が起こる可能性は否定できない。のり面緑化地周辺で自生個体と外国産個体の交雑個体を検出することはできなかったものの、緑化における外国産種子の使用は国内のコマツナギ自生集団の遺伝的攪乱を引き起こす可能性が示唆された。また、外国産種子のほうが、自生個体の種子よりもやや大型であることが分かったため、種子の大きさは外国産か否かを見分ける目安になると考えられた。

日本国内においては、核と葉緑体 DNA の両方に共通して新潟・長野、関西、九州に遺伝的地域性があることが認められたため、少なくともこれらの地域の種苗の移動は避けるべきであると考えられた。核 DNA の結果から、関東と近畿・中国・四国地方で遺伝的に異なることが示されたため、これらの地域間の種苗移動も制限すべきであると考えられる。また、原種子日本産種子の核および葉緑体 DNA の分析結果から、新潟・長野の周辺で採取された種子が日本産種子として流通し、緑化に利用されていることが推察された。実際、広島県ののり面緑化地において新潟・長野の遺伝子タイプが検出された。コマツナギの遺伝的地域性を保全するためには、外国産種子の使用を避けるだけでなく、日本産種子の採取地にも注意し、長距離離れた地域への種苗移動は避けるべきであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今西亜友美・今西純一・井鷲裕司
2. 発表標題 日本国内におけるコマツナギの遺伝的変異とその地理的分布
3. 学会等名 第49回日本緑化工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Imanishi, A., Imanishi, J., Kimura, M., Mitsuyuki, C., Tsunamoto, Y., Isagi, Y. and Suyama, Y.
2. 発表標題 The geographical distribution of genetic variation of <i>Lespedeza cuneata</i> (Dum. Cours.) G. Don
3. 学会等名 8th ICLEE Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今西亜友美・今西純一・木村元則
2. 発表標題 コマツナギ, メドハギの国内産および外国産種子の形状, 重量に見られる差異の検討
3. 学会等名 第47回日本緑化工学会大会研究発表交流会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 今西亜友美・今西純一・陶山佳久・井鷲裕司
2. 発表標題 自生および外国産コマツナギにおける葉緑体ゲノムの遺伝的変異
3. 学会等名 2019年度日本景観生態学会第29回京都大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----