

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06407

研究課題名(和文)「管理された氾濫原」水田の動物プランクトンの生態・遺伝的特性とベータ多様性

研究課題名(英文) Ecology, genetics, and beta diversity of zooplankton in "managed floodplain" rice paddies

研究代表者

牧野 渡 (Makino, Wataru)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：90372309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1)「水田」の微小甲殻類では、湛水期間が相対的に長い「湖沼・ため池」の微小甲殻類よりも、リボソームRNA遺伝子のコピー数が多い可能性を、定量PCR法を用いて検討したが、その仮説を支持する結果は得られなかった。2)「湛水」時期が大きく異なる「水田」が混在すると、地域全体の動物プランクトン多様性が増加する可能性を調べたところ、その仮説を支持する結果が得られた。ただし湛水時期の遅い水田は、そうでない水田よりも水田雑草が多く、水田雑草を基質として利用する微小甲殻類が出現した結果、多様性が増加していた。従って、湛水時期の効果と水田雑草の効果とを区別することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦を特徴づける里山景観の構成要素である「水田」と「湖沼・ため池」に出現する微小甲殻類(ミジンコ類など)の、生態特性の違いを調べる際に、遺伝子の構造を比較した点が、学術的に新しい試みであった。また水田に、いわゆる「水田雑草」が生えることで、その表面を生活基質とする微小甲殻類(これらは、雑草がない水田には、ほとんど出現しない種である)が卓越することを初めて示した点にも、学術的に大きな意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we 1) examined the possibility that the copy number of ribosomal RNA genes is higher in microcrustaceans in rice paddies than in microcrustaceans in lakes and reservoirs where the period of inundation is relatively long, using the quantitative PCR method, but the results did not support the hypothesis. Furthermore, 2) the possibility that the zooplankton diversity of the entire region increases when there is a mixture of "rice paddies" that differ greatly in the timing of inundation was examined, and the results supported this hypothesis. However, paddy fields that were flooded later in the year had more paddy weeds than those that were not, and the diversity increased as a result of the emergence of microcrustaceans that used the paddy weeds as a substrate. Therefore, it was not possible to distinguish the effect of inundation timing from the effect of paddy weeds.

研究分野：生態学

キーワード：種多様性 微小甲殻類 水田 耕作方法 遺伝子コピー数

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本では河川改修や新田開発などにより、氾濫原湿地が著しく減少した。そのため現在では、「水田」が、かつて氾濫原湿地に生息していた生物の、代替生息地として機能していると考えられている。つまり「水田」は、本邦淡水域の生物多様性を維持する上で、もはや欠かせない存在である。

近年では、国土のおよそ 5%程度の面積が実際に作付けされ「水田」として機能しており、そのほとんどが 5-6 月にのみ湛水し、以後は意図的に水を抜く農法に従い運営されている。このように、人為的に「管理された氾濫原」とも解釈できる「水田」は、古来の氾濫原湿地性生物の生息場所として、確かに多大な貢献をしているが、その一方で、湛水時期を(ほぼ)統一しているため、古来の氾濫原湿地性生物に「湛水時期」という淘汰圧をかけて来た、とも言えるのではないだろうか。

では、この淘汰圧をくぐり抜けた、現世の「水田」に棲息する生物がもつ生態特性や、それを可能にする遺伝的背景について、どれほど理解されているかといえ、実は、研究がほとんど進んでいない。これが研究開始当初の状況である。

### 2. 研究の目的

上記の未知領域を取りあげ、水田の生物多様性に関する理解を、進化の視点から深化させるのが本研究の目的である。具体的には、動物プランクトン(浮遊性以外のタクサ、例えば付着性のタクサも出現するため、これ以後は微小甲殻類と記述する)を材料とし、以下に述べる 2 つのテーマを設定した。

(1) 遺伝子構造の比較: 「水田」に出現するタクサでは、水田から水が抜かれる前に繁殖することが必須となるので、「水田」より湛水期間が長い「湖沼・ため池」のタクサよりも成長が早く、世代時間が短縮している可能性が考えられる。その遺伝的基盤としては、リボソーム RNA 遺伝子のコピー数が多い可能性をあげることができる(補足: 迅速な成長のためには、高いタンパク質合成速度が必要であるが、これは細胞内でタンパク質合成を担う細胞小器官であるリボソームの数を増加させること可能となる)。この仮説を検証するために、定量 PCR 法による検討を行った。

(2) 水管理方法の違いが種多様性に与える影響: 水性の微小甲殻類にとっては、水の在不在は分布を左右する最大の要因である。本邦の「水田」の(面積ベースで)ほとんどでは、5-6 月に継続的に「湛水」しているが、その後意図的に水を抜く「中干し」を 1 ヶ月程度はさみ、以後は刈り取り前まで「間断湛水」を短期間で繰り返している。この「中干し」時期は、ちょうど梅雨の盛期に相当するため、本邦「水田」では、実際に河川の氾濫が頻発する(と考えられる)時期に水がない、ということになる。

ただし少数ながら、様々な目的で、稲の作付けをひと月程度遅らせる水田が各地に散在する。このような「湛水」時期が異なる「水田」が混在すると、その地域全体の微小甲殻類の多様性が増加するのではないかと考えた。この点を検証することが本研究のもう一つの目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子構造の比較:

日本産タマミジンコ属について、リボソーム RNA (18S と 28S を想定) 遺伝子と、ハウスキーピング遺伝子の存在比率を、定量 PCR で求めた。まず、日本産ミジンコ属の数種と、タマミジンコ属の全種から抽出した RNA の塩基配列をもとに、リボソーム RNA の 4 領域と、ハウスキーピング遺伝子の 4 領域について、定量 PCR に用いるプライマーを設計した。それぞれの領域について、PCR 条件の最適化を行った後に、「水田」と「湖沼・ため池」で得られたタマミジンコ個体に対して定量 PCR に供し、Cs 値を求めた。得られた Cs 値を「水田」種と「湖沼・ため池」とに分けてプールし、統計的に比較することで、「水田」種ではリボソーム RNA 遺伝子のコピー数が多くなっている可能性を検討した。

#### (2) 水管理方法の違いが種多様性に与える影響:

日本海に面した I 県 H 市にて調査を行った。ここでは、地方創成の一環として水稻を中心とした自然栽培(ここでは、無農薬・無肥料栽培のことを意味する)の取り組みが進められている。そして自然栽培水田は、慣行栽培水田と比べ、田植えが遅く、また(強度の)中干しをしないため、

夏季の湛水期間が長い傾向があった。これらの理由により、水稻農法の違いが「水田」の微小甲殻類の現存量や多様性に与える影響を調べる本研究にとって、I 県 H 市は最適な場所であると考えられた。

調査地域として、同一地域内に同等の面積の水田が 2 筆（うち 1 筆は自然栽培水田、1 筆は慣行栽培水田）含まれるよう設定し、これを 7 地域分選んだ。微小甲殻類の採集時期は、当該地域にて、慣行栽培水田の田植え後の湛水期間である 5 月と 6 月、同じく中干し-間断湛水時期に相当する 7 月と 8 月の合計 4 回実施することとし、これを 3 年間繰り返した。いずれの調査日においても、畦から採取した水田水の 2 リットル（1 筆の水田全体から水を少量ずつ採取）中に含まれる微小甲殻類を捕集し、99%エタノールで固定して研究室に持ち帰った。採集は各筆 2 連で行ったが、中干しされていた筆では採集を行わなかった。

また 2 - 3 年目には、自然栽培水田にて、水田植物（コナギなどの、いわゆる水田雑草）の現存量を知るために、イネ株間の直径 12cm の円内に生えていた水田雑草を全て引き抜いてラボに持ち帰り、その乾燥重量（根を除いた植物体の重量）を見積もった。この採集は各筆 3 連で行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 遺伝子構造の比較

結果：水田で優占するタマミジンコ属の 2 種（種 A と種 B）、湖沼・ため池で優占するタマミジンコ属の 2 種（種 c と種 d）について調べた。リボソーム RNA 遺伝子の Cs 値の平均値を、ハウスキーピング遺伝子の Cs 値の平均値で除した値を、便宜的にリボソーム RNA 遺伝子のコピー数（以下、rRNA-C と記す）とみなした。

各種の平均 rRNA-C ( ± 標準偏差 ) は、種 A では  $515 \pm 173$ 、種 B では  $205 \pm 59$ 、種 c では  $206 \pm 38$ 、そして種 d では  $190 \pm 68$  であった。一元配置分散分析の結果、平均 rRNA-C は種間で異なることが示され ( $P < 0.001$ )、その理由は種 A の平均 rRNA-C のみが、他種の平均 rRNA-C よりも有意に高いため、であることがわかった ( TukeyHSD テスト、 $P < 0.05$  )。

考察：本邦水田に広く出現する種 A の平均 rRNA-C が、湖沼・ため池で優占する種 c、d の値よりも有意に高かったことは、事前の予測どおりであった。ただし、種 A とともに水田に広く出現する種 B の平均 rRNA-C が、種 c と種 d の値と同等の値となったことは、事前の予測に反した。このように本研究では、「水田」種ではリボソーム RNA 遺伝子のコピー数が高いという可能性は、完全には支持されなかった。

換言すれば、リボソーム RNA 遺伝子のコピー数が、湖沼・ため池タイプの種 c、d と同じ程度の種 B も、水田で卓越できることがわかった、ということでもある。この解釈は、「水田」に出現するタクサでは、水田から水が抜かれる前に繁殖する必要があることは事実であるが、短い湛水時期への適応策が、リボソーム RNA 遺伝子コピー数の他に存在する可能性を示した。そして、そのメカニズムが具体的にどのようなものであるかを調べるのが、今後の課題として浮上した。

なお分類学の既往研究によれば、種 A と、種 B、c、d の 3 種とは、属は同じであるが、亜属レベルで異なるという。従って今回得られた、種 A の平均 rRNA-C のみが他種の平均 rRNA-C よりも有意に高いという結果は、系統の違いを反映していると考えられた。

##### ( 2 ) 水管理方法の違いが種多様性に与える影響

結果：初年度の調査では、次のことがわかった。5 - 6 月の調査時に湛水されていた水田では、いずれの農法でもタマミジンコ群集が出現し、現存量は数百から数千個体/L に達した。タマミジンコは、7 - 8 月の調査時に湛水されていた水田にもいたが、最大でも 100-200 個体/L 程度であった。ただし、7 - 8 月の調査時に湛水していた自然栽培水田のうち、水田雑草や浮草が高密度で繁茂していた水田ではタマミジンコは出現せず、植物の表面を基質として付着基質として利用するシカクミジンコ類が増加することがわかった。このシカクミジンコ類は、除草剤を使用してイネ以外の植物の現存量を著しく低く抑えている慣行栽培水田には、調査期間をとおして、ほとんど出現しなかった。

2 年目以降の調査では、自然栽培水田に調査の主眼をおき、そこでのシカクミジンコ類の消長と、水田雑草の消長との関係を調べた。自然栽培水田の水田雑草は、6 月には双葉状でありその現存量はごくわずかであり、シカクミジンコ類の現存量もほぼゼロであった。当該地の自然栽培水田では、7 月上旬までは機械除草期間であるため、水田雑草の量は小さかったが、除草期間が終わると、水田植物は急激に成長し増加した。そして水田雑草の増加に伴い、シカクミジンコ類の現存量も増加した。すなわち、水田植物のフェノロジーとシカクミジンコ類のフェノロジーが概ね一致することが示された。なお水田雑草の多くは、コナギとオモダカであり、これらは中干し期間中の筆でも生育を続けていた。

考察：上記の結果から、次のことが考えらえられた。

まず日本の水田面積の大半を占める慣行栽培水田では、除草剤を使用してイネ以外の植物の

現存量を著しく低く抑えているため、イネ株間が解放水域化している。この状況は、かつての氾濫原湿地の様相のうちで、植物現存量が低い状態を再現していると言えようが、そのような慣行栽培水田では、タマジシコ類が卓越し、シカクミシコ類はほとんどいない。

一方(少なくともI県H市の)自然栽培水田では、コナギやオモダカなどの水田雑草が、イネ株間を埋め尽くすように増加し、水生雑草の表面を付着基質として利用するシカクミシコ類が増加することがわかった。従って自然栽培水田は、かつて「草ぼうぼう」だった氾濫原湿地に出現していた表在性シカクミシコ類の、貴重な代替生息地であると考えられた。

そして、農法に応じて優占種が(少なくとも一時期は)入れ替わるというロジックにて、ある地域で多様な水稻農法を採用することは、微小甲殻類の種多様性の増加につながる、と言えるだろう。ただし本研究では、自然栽培水田と慣行栽培水田との間の、微小甲殻類の種組成の違いに対する「湛水時期の効果」と「水田雑草の効果」とを区別することができていないことに、留意する必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imane S, Makino W, Urabe J	4. 巻 22
2. 論文標題 Differential intraspecific genetic variations of the closely related, wide-ranged freshwater copepods <i>Cyclops vicinus</i> Uljanin, 1875 and <i>C. kikuchii</i> Smirnov, 1932	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 209-219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-020-00647-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makino W, Machida RJ, Okitsu J, Usio N	4. 巻 847
2. 論文標題 Underestimated species diversity and hidden habitat preference in <i>Moina</i> (Crustacea, Cladocera) revealed by integrative taxonomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hydrobiologia	6. 最初と最後の頁 857-878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10750-019-04147-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamamoto A, Makino W, Urabe J	4. 巻 21
2. 論文標題 The taxonomic position of Asian <i>Holopedium</i> (Crustacea: Cladocera) confirmed by morphological and genetic analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Limnology	6. 最初と最後の頁 97-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10201-019-00585-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野渡
2. 発表標題 淡水産微小甲殻類の多様性と生態
3. 学会等名 日本微生物学会第33回大会（山梨大会）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野渡・西川潮
2. 発表標題 自然栽培水田は表在性ミジンコ類の代替生息地として機能する
3. 学会等名 日本生態学会大会 ESJ66
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------