

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310168

研究課題名(和文) 外来侵入植物による遺伝的汚染 - ギシギシ属在来種の危機的実態の解明

研究課題名(英文) Genetic pollution of Rumex species indigenous to Japan by alien invaders

研究代表者

牧 雅之 (Maki, Masayuki)

東北大学・学術資源研究公開センター・教授

研究者番号：60263985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の人間活動の活発化により、多くの植物が外来侵入種となっている。そのような外来侵入種は、同属の在来種と交雑を起こすことによって、後者の遺伝子プールを汚染する可能性がある。

この研究では、日本産のギシギシ属の在来種が外来侵入種と交雑起こすことにより、遺伝子プール汚染が生じているかどうかをフローサイトメトリーや遺伝子マーカーを用いて検証した。その結果、在来種のノダイオウと外来のエゾノギシギシ・ナガバギシギシとの間で交雑が起きていることが明らかとなった。単純なF1雑種だけでなく、戻し交雑やF2以降の交雑個体も生じている可能性がある。ギシギシ属では、在来種の遺伝子プール汚染が強く懸念される。

研究成果の概要(英文)：Recent human activity enabled wild plants to move from their indigenous places to other areas in which they are not distributed naturally. Such alien species may hybridize with native congeners, resulting in genetic pollution in gene pools of the latter species. In this study, I investigated natural hybridization between Rumex species native to Japan and their congeneric alien species using flow cytometry and genetic markers.

Based on previous morphological observations, it is known that Rumex longifolius, native species in Japan, often hybridized with the alien species R. obtusifolius and R. crispus. I certified the natural hybridization between R. longifolius and the two alien species by FCM and population genetic analyses. The data suggested that, in addition to F1 hybridization, back-crossings and F2 or later hybridization may have occurred between the native and the alien species. It is very concerned that genetic pollution of the native Rumex by the alien congeners occurs.

研究分野：植物進化学

キーワード：在来種保全

## 1. 研究開始当初の背景

外来侵入種が在来近縁種に及ぼす悪影響については、保全生物学や遺伝資源保全の見地から広く関心が持たれている。なかでも、競争的排除と交雑現象は在来種に深刻な影響を与えることが危惧されている。競争的排除に関する研究は従来から積極的に取り組まれてきたが、交雑の実態は肉眼で認識することが困難な場合が多いために研究は大きく遅れている。

外来侵入種と在来近縁種の間生殖的な隔離がない場合には、両者間で遺伝子交流が起き得る。その結果として、在来種と外来侵入種の間交雑個体の生存力が弱い場合には、結果として在来種の繁殖投資が無駄に使われて衰退を招く。逆に、交雑個体の生存力が同等もしくは強くて、稔性もある場合には、両親種とさらに交雑を起こし、遺伝子プールを共有することになる。外来侵入種の遺伝子は、在来種にとって必ずしも適応的ではなく、在来種でこれまでになかった病害や食害、環境の不応答を引き起こす可能性があることが指摘されている。しかも、分類群によっては、外来侵入種から在来種への一方向的な遺伝子流動が起こることも報告されており、外来侵入種と在来種の交雑は、在来種の生存にとって大きな脅威になり得る。

日本には在来のギシギシ属植物が 10 種ほど知られている。一方、ヨーロッパ原産の外来侵入種も 10 種ほど知られており、そのうち、エゾノギシギシとナガバギシギシは 19 世紀後半に国内で認識されて以来、ほぼ全国に分布を広げている。これら外来侵入種と在来種の雑種は 7 つの組み合わせで知られている。これほどまでに交雑例が知られているにもかかわらず、その交雑の程度や頻度といった遺伝子流動の実態は明らかではない。唯一、キブネダイオウとエゾノギシギシの交雑に関して、繁殖生態学的研究が行われているが、2 種間における遺伝的交流については不明のままである。我々は、ギシギシ属の在来種のうち、特にノダイオウと狭義ギシギシ（以下、ギシギシと記述）について、北海道から近畿地方にわたって多数の野外集団を観察した結果、これらが外来侵入種と普遍的に交雑を起こしているとの確信を持つに至った。

外来侵入種と在来種の交雑現象に注目した研究は、近年、北米とヨーロッパで動物を用いた研究が盛んに行われているが、植物を対象とした研究はそれほど多くない。また、国内では在来のタンポポとセイヨウタンポポの交雑現象がよく研究されているが、この例では少数クローンの雑種タンポポが無融合生殖によって侵略的な増殖を行っており、頻繁な遺伝子流動を伴う通常の有性生殖種群における交雑現象とは大きく

異なる。

本研究では、さまざまな組み合わせに交雑が報告されているギシギシ属の在来種のなかから、外来侵入種のエゾノギシギシとナガバギシギシと頻繁に交雑している可能性が高く、分布域が比較的広いノダイオウとギシギシを対象とする。これらの種群では、F1 雑種のみならず、それ以降の戻し交雑が起きていることを予備的な調査でつきとめた。そこで、本研究ではギシギシ属の外来侵入種による在来種の遺伝子プール汚染の実態を明らかにし、在来種の遺伝子プールを保全するための方策を検討することを目的とする。広域に分布する有性生殖の雑草性植物を扱うことによって、地域の違いや生育環境の違いが遺伝的汚染の程度にどのように影響するのかの評価が可能となり、遺伝子汚染に対して普遍性の高い対策指針の提言を目指すことができる。

## 2. 研究の目的

交雑における遺伝子浸透には、双方向の場合もあれば、方向性に偏りを持つ場合もある。浸透パターンには、送粉様式、生活様式、個体群構造などが複雑に影響する。このため、生育環境の違いや相手種との相対的地位の違いに応じて遺伝子プールの汚染パターンが異なると予想される。例えば、外来侵入種と在来種が混生してきた経過時間の違いや両種の相対頻度の違い、さらに気候風土の地域的な違いに応じた交雑の進行が起きているであろう。遺伝子プールの汚染パターンについて、地理的な差異と生育環境に応じた差異を分子マーカーによって明らかにし、どのような条件が在来種への遺伝子浸透を促進しているかを評価する。

ノダイオウ（岡山以东に分布、山間湿地や氾濫原）、ギシギシ（全国に分布、水田とその周辺）、エゾノギシギシ（ヨーロッパ原産、全国に定着、やや湿った草地）、ナガバギシギシ（ヨーロッパ原産、全国に定着、乾いた裸地～草地）は、広い分布域を示すが、それぞれ異なった生育特性をもっており、地理的な差異と生育環境に応じた差異を比較するのに適した材料である。

在来種と外来侵入種の分布域は重なるものの、各種の主な生育環境は微妙に異なる。これまでの予備的調査では、多くの場合、人為的な攪乱が起きた（あるいは攪乱の程度が強い）場所で両者の交雑個体を高頻度で観察している。そこで、在来種と外来侵入種のそれぞれの繁殖特性と生育環境の特性を生理生態学の見地から明らかにし、交雑を促進している要因を推定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 倍数体解析による交雑パターンの解析

在来種のノダイオウは体細胞染色体数が  $2n = 80$  の 8 倍体、ギシギシは  $2n = 100$  の

10 倍体, 外来侵入種のエゾノギシギシは  $2n = 60$  の 6 倍体, ナガバギシギシは  $2n = 40$  の 4 倍体であることが知られている。交雑個体は親の組み合わせの間の染色体数を持つことになる。そこで, フローサイトメーターを用いて, 交雑集団の個体の倍数性について推定し, 集団の構成を明らかにする。

#### (2) 遺伝子マーカーによる解析

前項の倍数体解析では, ある個体が交雑由来であることや F1 個体であること (両親種間のほぼ中央のゲノムサイズを示す場合) について大まかに推定することができる。しかし, 倍数性が連続性を示すことは, 戻し交雑や F2 以降の交雑に由来する個体が存在する可能性を示唆する。したがって, そのような集団では, 種特異的な遺伝子マーカーを用いた詳細な解析が必要となる。現在では, 十分な遺伝子マーカーが利用できれば, F1 以外の交雑個体をベイズ推定によって分別する手法が確立されている。

また, 多くの被子植物の場合には葉緑体 DNA は母系遺伝であり, 葉緑体 DNA の変異解析を行うことにより, どの種が種子親となっているかを推定することが可能である。葉緑体 DNA の非コード領域における塩基配列変異を決定することにより, 交雑がどのようなパターンによって生じているかを明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) ノダイオウの遺伝子プール汚染に関する全国規模調査

国内から在来種のノダイオウからなる形態的に推定される集団から広くサンプリングを行った。葉緑体 DNA の解析ではこれら 3 種はそれぞれ特有のハプロタイプをもっていた。核 ITS 領域においても 3 種は特有の配列をもっていた。ノダイオウ, エゾノギシギシ, ナガバギシギシの 3 種が同所的に生育している交雑集団を 5 集団解析したところ, どの集団からもノダイオウとエゾノギシギシまたはナガバギシギシの 2 種間の雑種がみつき, さらに 1 つの集団からはこれら 3 種間の雑種も見出された。また, エゾノギシギシの ITS をもちながら, ノダイオウの葉緑体ハプロタイプをもっている個体とナガバギシギシの葉緑体ハプロタイプをもっている個体が確認されたことから, 戻し交雑が起こっている可能性が示唆された。

さらに, 3 種の倍数性の違いに注目し, フローサイトメーターによりゲノム量を測定し, 雑種の倍数性を推定した。解析を行った 5 つの交雑集団のうちではゲノムサイズが連続的になっている場合と, 一定の値の近くに集中分布している場合があった。ゲノムサイ

ズが連続的になっている交雑集団では, 同じ核 ITS 配列をもつ個体でもゲノムサイズにばらつきが生じていることが示された。これは戻し交雑が繰り返し起こることにより, さまざまなレベルの倍数性をもつ個体が生じたことを示唆する。このようにノダイオウと外来近縁種の交雑集団では, 集団によって遺伝子侵食の程度に差があり, 最も外来種との交雑が進んでいる交雑集団ではノダイオウの遺伝子プールが大きく侵食されている可能性があることが示された。

全国的に見ると, 純粋なノダイオウの遺伝子プールを保持していると考えられる集団は 20 集団中 1 集団のみであった。ノダイオウの純粋集団は 2 個体のみの個体であるため, 早急に保全をしなければ, 遺伝的な観点からは絶滅してしまうと考えられる。

#### (2) ギシギシの遺伝子プール汚染に関する全国規模調査

ギシギシについては, 10 地点から典型的な形態を持つ集団をサンプリングし, ノダイオウ集団と同様の解析を行った。ギシギシでは遺伝的に純粋と考えられる個体と交雑個体が同時に生育している集団が発見されず, すべて純粋なギシギシのみから構成されているか, 交雑個体のみからなる集団であった。このことはギシギシの生育地が外来種と似た環境であるため, 交雑の頻度が高く遺伝子の浸透速度が速いためだと考えられる。

#### (3) 地域集団における局所的遺伝子プールの汚染に関する解析

青森県青森市の主としてノダイオウとエゾノギシギシからなる集団を対象に解析を行った。調査地点から 2011 年から 2013 年の間に 226 個体サンプリングを行った。その際にそれぞれの個体の位置をマッピングした。

解析対象としている種は全て倍数性が異なるため, フローサイトメーター (FCM) によってそれぞれの個体が何倍体であるかの推定を行った。核 DNA は核 ITS 領域のシーケンスを行うことで解析を行った。葉緑体 DNA は, ひとつの SNP (A/G) が存在する配列を見つけ, その領域を増幅するプライマーを作り, HRM (High resolution melting) 法による解析を行った。

葉緑体のクローニングの結果, ノダイオウとエゾノギシギシは両系遺伝しているということがわかった。ノダイオウはノダイオウとギシギシのハプロタイプを保有しており, エゾノギシギシはエゾノギシギシと今回用いた 4 種以外のハプロタイプが出現したことから, ノダイオウとエゾノギシギシはそのハ

プロタイプを葉緑体捕捉によって捕捉し、両系遺伝で現在まで保持し続けていたと考えられる。また倍数体の多くは異質倍数体であるため、エゾノギシギシで出現した不明のハプロタイプはエゾノギシギシの片親であった可能性がある。

局所的な遺伝子侵入の解析では、在来種に有利であると考えられるヨシ原、用水路には純粋なノダイオウが存在していた。また草刈による攪乱の頻度が高いあぜ道の個体は、草刈の頻度が低いあぜ道の個体と比較すると交雑個体の割合が少なくなっていた。これらのことから在来種を守るためにとるべき手段としては、(1) 在来種に有利な環境を保全する、(2) 定期的に外来種の駆除、または繁殖の妨害を行う、ということが重要であると考えられる。1 番目の方法では、外来種が在来種の生育地に侵入することを遅らせることができ、2 番目の方法では、外来種自体の分布の拡大を防ぐことができるだけでなく、在来種を戻し交雑をし、遺伝子浸透を引き起こす交雑個体の形成を阻害することができるからである。外来種を完全に駆除しなくとも、繁殖の妨害をするだけである程度の交雑個体の形成を防ぐことができるといことが今回の研究から判明した。

#### 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)

[雑誌論文](計6件)

Wasekura, H., Horie, S., Fujii, S. and Maki, M. 2016. Molecular identification of alien species of *Vallisneria* (Hydrocharitaceae) species in Japan with a special emphasis on the commercially traded accessions and the discovery of hybrid between nonindigenous *V. spiralis* and native *V. denseserrulata*. *Aquatic Botany* 128:1-6. (査読あり)

Li, Y. and Maki, M. 2015. Variation in the frequency and extent of hybridization between *Leucosceptrum japonicum* and *L. stellipilum* (Lamiaceae) in the central Japanese mainland. *PLoS ONE* 10: e0116411. (査読あり)

Li, Y., Iijima, S and. Maki, M. 2015. Development and characterization of microsatellite markers for *Veratrum maackii* (Melanthiaceae). *Application in Plant Sciences* 3: 1500030. (査読あり)

Sakamoto, Y., Yokoyama, J. and Maki, M. 2015. Mycorrhizal fungal diversifications in mixotrophic orchid *Cephalanthera longibracteata*: is mixotrophy a

transitional stage from autotrophy to myco-heterotrophy? *Mycoscience* 56: 183-189. (査読あり)

Lee, S.-R. and Maki, M. 2015. Origins of *Hosta* cultivars based on sequence variations in chloroplast DNA. *Horticulture Journal* 84: 350-354. (査読あり)

藤井伸二・牧雅之・國井秀伸. 2014. 島根県新産植物3種の記録(シログワイ, ノダイオウ, ヒメタデとアオヒメタデに関するノート). 分類 14: 169-176. (査読あり)

[学会発表](計2件)

清水勝也・藤井伸二・石濱史子・牧雅之: 在来のギシギシ属への同属外来種の遺伝的な侵入に関する研究. 日本植物分類学会第13回大会. 熊本大学. 2014年3月22日.

清水勝也・藤井伸二・石濱史子・牧雅之: 在来のギシギシ属への同属外来種の遺伝的な侵入. 日本植物分類学会第14回大会. 千葉大学. 2013年3月15, 16日.

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

牧雅之(MASAYUKI MAKI)  
東北大学・学術資源研究公開センター・教授  
研究者番号: 60263985

##### (2) 研究分担者

藤井伸二(SHINJI FUJII)  
人間環境大学・人間環境学部・准教授  
研究者番号: 40228945

##### (3) 研究分担者

石濱史子(FUMIKO ISHIHAMA)  
国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員  
研究者番号: 80414358

##### (4) 研究分担者

酒井聡樹(SATOKI SAKAI)  
東北大学・大学院生命科学研究所・准教授  
研究者番号: 90272004