

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：33936

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281051

研究課題名(和文)水生植物アサザを用いた科学的リファレンス像の構築に関する研究

研究課題名(英文) Study on the scientific reference based on the aquatic plants of *Nymphoides peltata*

研究代表者

藤井 伸二 (Fujii, Shinji)

人間環境大学・人間環境学部・准教授

研究者番号：40228945

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)：水生植物アサザの遺伝的分化の度合いは非常に低く、地理的構造は存在しなかった。また、琵琶湖の能登川と霞ヶ浦の富田浜の二つの小集団においては、それぞれの小集団が国内のアサザの遺伝的変異の大半を保有していた。相補性の観点からは、琵琶湖と霞ヶ浦の小集団のどちらか一方と河北潟または佐賀平野の小集団の一つを保全することで、遺伝的多様性を効果的に保全できることが示された。また、霞ヶ浦について過去の航空写真解析を行った結果、1947年当時には浮葉植物帯がほとんど存在していなかった。自然湖沼と農耕の両方の水湿地環境に生育するアサザは、その生育場所や分布が人為活動とともに短期間で大きく変化してきたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Genetic diversity of *Nymphoides peltata*, an aquatic plant widely distributed in Japan except Hokkaido, was very low and had no geographical structure of genetic variation. Each of the two populations of Notogawa in Lake Biwa and Tomitahama in Lake Kasumigaura possessed the greater part of the genetic diversity in Japan. In the view point of complimentary, conserving one of the two populations above with a population in Kahokugata or a population in Saga Plain could be effective for keeping the genetic diversity. In Lake Kasumigaura, only small area of the communities of floating plants was found based on the photos taken by US army in 1947. *Nymphoides peltata* grows on the wet land habitats both natural and cultivated and supposed to greatly change its growing places and distribution ranges in short period under the human activities.

研究分野：植物分類学

キーワード：アサザ 遺伝的変異 保全 リファレンス 地理的変異 集団内変異 琵琶湖 霞ヶ浦

1. 研究開始当初の背景

日本の水生植物はこの半世紀で激減し、その多くが絶滅危惧種としてリストされるようになった。その要因として挙げられるのが、営農法の変化とそれに伴う環境改変(農薬の使用、圃場整備、減反政策など)、湖沼開発、水質の汚染などである。かつては全国に普遍的であった水生植物が、現在は限られた場所のみに残存している例は多いが、そのような減少に伴って起こる様々な変化については、断片的な情報しか知られていない。

例えば、水田雑草のサンショウモは、最近の30年間に水田から消失し、堀などにその生育場所を移して生き延びていることが指摘されている(藤井 2002)。一方で、緑肥としての「藻刈り」がされるほど大量に生育していたセキショウモやササバモなどの沈水植物が、印旛沼や手賀沼ではほぼ絶滅した(千葉県中央博物館 2003)。しかしながら、水生植物の激減や生育環境の転換は、もともとの生育場所の喪失によって起こったのか、あるいは生育の場所は維持されているけれども環境条件の悪化によって起こったのかについては、不明な点が多い。サンショウモの例のように、生育環境の転換という結果だけを現在の我々が見ているとすれば、水生植物への理解を大きく誤らせてしまう可能性がある。霞ヶ浦で知名度の高いアサザについては、藤井・山室の共同研究において西日本の湖岸環境では稀であったことが判明しており、関東地域での報告とは大きく異なる結果となった。水生植物の効果的な保全のためには、本来の生育環境の様子とその後の変化の実態を明らかにすることが不可欠であると考えられる。かつては普遍的に繁茂していた植物が減少して集団が断片化すると、それともなって遺伝的な構造は著しく変化すると予想される。いくつかの植物で知られているように、強い近交弱勢があれば断片化した集団の絶滅リスクはさらに高いものとなる。一方、水生植物ではクローン繁殖をもっぱら行っていて遺伝的多様性が低いものも数多く存在する。過去の集団の遺伝的構造を推定し、現在の集団との比較を行うことは、その植物の保全計画を立案するために必須である。しかしながら、すでに消えてしまった集団を解析することは不可能に近い。アサザは、その美しさや知名度から各地で系統保存がなされ、また埋土種子からの復活個体群と考えられるものも知られている。さらに、多数の標本資料が蓄積されている。このため、アサザは過去の様子を推測するのに理想的な材料と考えられる。

2. 研究の目的

水生植物は、営農法の変化や生育環境の激変によってこの半世紀で著しく減少したことが知られているが、その一方で過去の生育実態には不明な点が多い。現在行われている保全事業のリファレンス(参照対象)を明らかに

するために、過去の実態解明は急務である。本研究では、これまでの情報や研究の蓄積が豊富なアサザを材料として、過去と現状の相違を明らかにすることで、より効果的な保全策の提案を行うことを目的とする。1)標本情報を活用して当時の生育環境を明らかにする、2)現存および系統維持集団と標本資料を用いて過去と現在の遺伝的多様性を比較評価する、3)アサザをモデルとしながらより普遍性のある水生植物の保全策の提案を行う。

3. 研究の方法

(1)各地の博物館施設や研究施設に保管されている標本資料、文献資料、過去の地形図や航空写真を網羅的に調査し、アサザの過去と現在の生育環境の変遷について明らかにする。

(2)既存のSSRマーカーに加えて、新たな遺伝子領域および遺伝子座について解析を行い、これらのマーカーを用いてアサザ個体群の遺伝的な集団構造および地理的構造を明らかにする。とくに、近年の技術手法の進展がめざましいSNP変異について、RADSeq法(Baird et al., 2008)およびMIGseq法(Suyama & Matsuki, 2015)の導入を行って、多量のデータを得ることで信頼性の高い解析結果を得る。

(3)遺伝子解析の結果を用いて、地理的な構造とクローン分散の推定を行う。また、個体数の減少が開花集団と非開花集団に与える遺伝的構造に与える影響を評価する。

(4)上記の結果を統合してアサザのリファレンス像の構築を行い、保全策への提言とする。

4. 研究成果

(1)アサザの現状と過去からの変遷

メタ個体群としてみた場合、現在のアサザの集団規模がとくに大きいのは、霞ヶ浦と佐賀平野である。霞ヶ浦について米軍撮影の航空写真を解析した結果、1947年当時の霞ヶ浦西浦ではアサザを含む浮葉植物群落は西端の土浦周辺にのみ存在し、当時の霞ヶ浦では浮葉植物群落は非常にマイナーな存在であった(図1)。

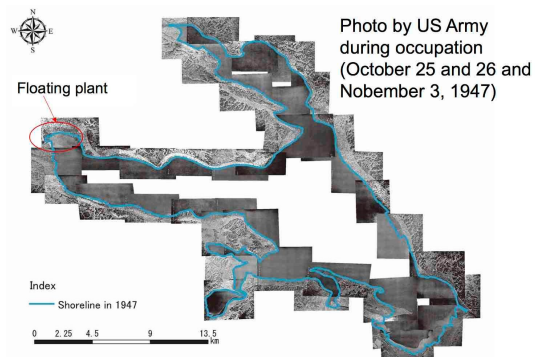


図1. 1947年当時の霞ヶ浦西浦の航空写真。

現在の霞ヶ浦において集団規模が大きくかつ遺伝的多様性が高いとされる富田浜の麻生漁港(上杉ほか, 2009)については、1965

年当時には浮葉植物群落はほとんど存在しなかった(図2). 現在のような大規模なアサザ群落の成立には, 1965年当時になかった漁港および防波堤の建設による波浪の減衰が影響した可能性がある.

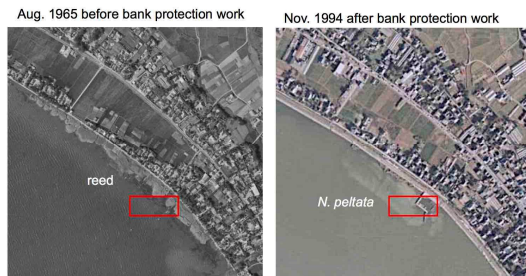


図2. 富田浜の湖岸植生の様子の变化.

(2)予備的解析によって, アサザの遺伝的変異は小さいことが判明した. SSR マーカーは解析できる遺伝子座数が少ないため, SNP 変異の解析に優れている RADseq 法による解析を行った. この手法は高コストであるために 1 集団について 1 個体のみのデータしか得られず, 集団内の遺伝的変異の把握には至らなかった. また, 地理的な遺伝構造については, 樹状図の各枝の支持率であるブートストラップ値が低く, 信頼のおける解析結果を得ることはできなかった(図3).

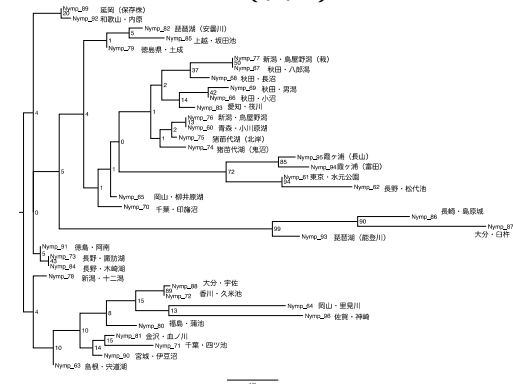


図3 .RADseq 法データに基づく NJ 法による樹状図.

RADseq 法による遺伝子データをストラクチャー解析した結果, サンプル数が少ないという問題はあるものの, 国内のアサザには 3 タイプの遺伝子型を認めることが可能であった(図4). 東北や関東では青色タイプが卓越するが, 西日本では 3 タイプが混在する複雑な状況を呈した.

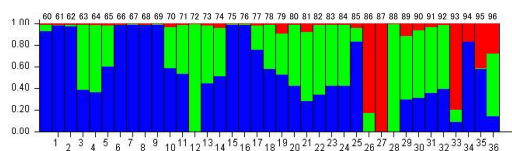


図4 .RADseq 法データに基づくストラクチャー解析の結果. K=3 が最適値.

(3)新しい解析方法である MIGseq 法を用いることで, 安価で多数サンプルの DNA 配列デ

ータを得ることに成功した. その結果, 次のようなアサザの遺伝的構造が明らかになった.

- ①過年度の研究成果も踏まえて総括すると, アサザの遺伝的変異は非常に小さい.
- ②クラスター分析によって, アサザの遺伝的変異は 2 群に分割されること, そして多くの集団で遺伝的に異なる 2 群が共存していた(図5). また, 両者の遺伝子が混じりあった交雑由来と考えられる個体も多く見いだされた.

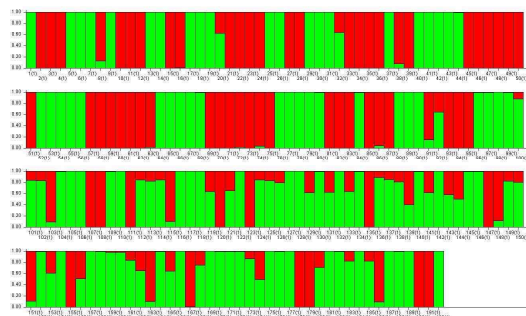


図5 .MIGseq 法データに基づくストラクチャー解析の結果. K=2 が最適値.

- ③クラスター分析によって見いだされた遺伝子型 2 群は, アサザの花型(長花柱花, 短花柱花, 等花柱花)とは対応していなかった. このことは, 遺伝子型 2 群は花型(花型の遺伝的な維持機構やその交配様式)とは無関係に集団内に維持されていることを示唆する.
- ④構築された樹状図(図6)からは, アサザの遺伝的変異には地理的構造の存在しないことが明らかになった. また, PCA 解析ではおおそ 6 群のまとまりが認められたが(図7), これら 6 群には地理的構造は存在しなかった.

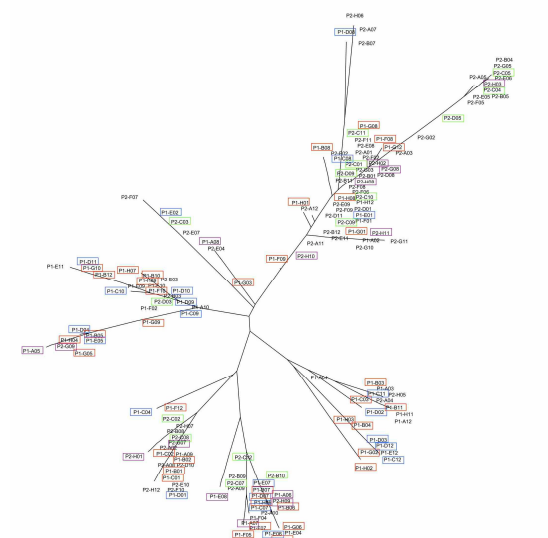


図6 .MIGseq 法データに基づく NJ 法による樹状図.

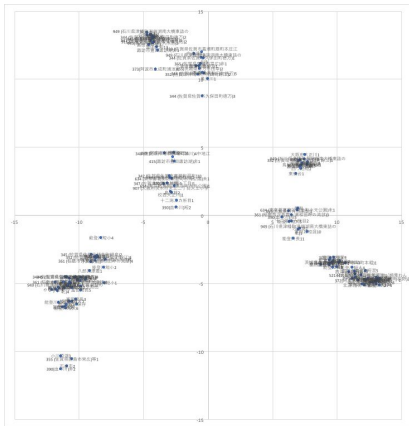


図7 . MIGseq 法データに基づく PCA 解析 .

⑤霞ヶ浦（北浦と西浦の合計 14 集団）, 河北潟（2 集団）, 琵琶湖（2 集団）, 佐賀平野（8 集団）の 3 地域について十分な個体数を解析した結果, 最も遺伝的な変異の大きかったのは, 霞ヶ浦と琵琶湖であった。とくに, 琵琶湖の能登川 1 集団と霞ヶ浦の富田浜 1 集団では, それぞれが全国のアサザ全体の遺伝的変異を内包するほどの多様性を保持していた（図 8）。これら 2 集団は, そのどちらか一方を残すことで, 国内のアサザの遺伝的変異の大半を後世に継承することが可能と考えられた。能登川 1 集団は, 水田用水路の除草と泥土除去による定期的攪乱によって維持されてきたと考えられる。一方, 霞ヶ浦では 11ヶ所行われた保全区画のうち 9ヶ所で消滅または衰退しており, アサザの永続的維持については保全方法の再検討が必要と考えられる。

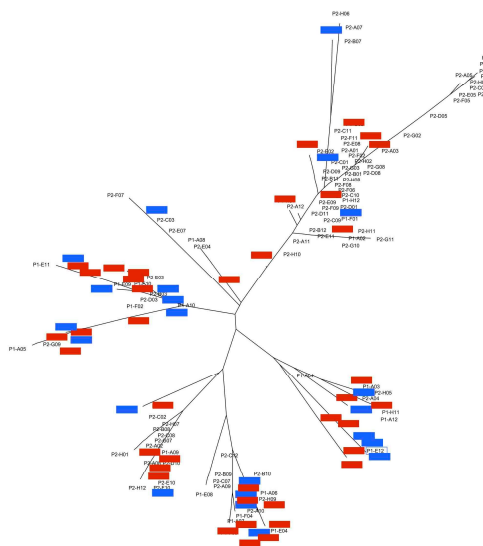


図 8 . MIGseq 法データに基づく NJ 法による樹状図。青色は琵琶湖の能登川集団, 赤色は霞ヶ浦の富田浜集団。

⑥琵琶湖の能登川 1 集団と霞ヶ浦の富田浜 1 集団の遺伝的多様性に内包されない遺伝子型が, 佐賀平野の一部の集団・河北潟・猪

苗代湖鬼沼で見いだされた。相補的保全の観点からは, 琵琶湖の能登川 1 集団または霞ヶ浦の富田浜のうちのどちらか 1 集団に加えて, 佐賀平野（3 集団）・河北潟・猪苗代湖鬼沼のうちのどれか 1 集団を保全することが非常に有効と考えられた。

(4) 遺伝子解析の結果から, アサザの遺伝的変異の保全はごく少数の集団の維持によって達成できることが明らかになった。これは, 遺伝的変異に地理的構造がなく, ひとつの集団内での変異の大きいことが要因と考えられる。ただし, どのような性質の集団が多様性の高い遺伝的変異を保持しているかについては, 他のデータ（花型と交配様式, 生育環境, 過去からの変遷）と合わせて現在検討中である。

(5) アサザは自然水域にも農耕水域にも生育する植物であり, 大半の集団はため池や水路などの人為的に創出された環境に生育する。そのため, 現在の分布状況は縄文晩期以降の農耕の拡大とともに急速に形成された可能性が高い。1947 年当時の霞ヶ浦の航空写真では土浦付近でしか浮葉植物群落を捉えることができなかったことから, 現在のように霞ヶ浦全域に多数の集団がメタ個体群を形成するようになったのは比較的最近のことと推測される。自然湖沼に加えて農耕環境にも依存して生育するアサザでは, その分布域の変化や移動が人為活動にともなって短期間で起こっている可能性が高い。本研究で得られた遺伝的分化の低さと地理的構造の欠如は, そうした過去の歴史を傍証している可能性がある。

< 引用文献 >

- ① Baird NA et al. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. PLoS ONE Vol. 3. No.10, 2008, e3376., <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- ② 千葉中央博物館編, うらべ書房, 野の花・今昔, 2003, pp. 187.
- ③ 藤井伸二, 文一総合出版, 地方版レッドデータブックの成果と問題点, 種生物学会(編), 保全と復元の生態学-野生生物を救う科学的思考, 2002, 95-107p.
- ④ Suyama, Y. & Matsuki, Y.. MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. Scientific Reports Vol. 5, 2015, 16963 doi:10.1038/srep16963
- ⑤ 上杉龍士・西廣 淳・鷺谷いづみ, 日本における絶滅危惧水生植物アサザの個体群の現状と遺伝的多様性, 保全生態学研究, Vol. 14 No.1, 2009, 13-24.

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15件)

- ① 藤井伸二, 上杉龍士, 山室真澄, アサザの生育環境・花型・逸出状況と遺伝的多様性に関する追試、*保全生態学研究*, 査読有、**Vol. 20**, No. 1, 2015, pp. 71-85.
- ② 藤井伸二, 絶滅危惧植物の将来—レッドリストとホットスポットから見えること、生物の科学遺伝、査読なし、**Vol. 70**, No. 1, 2015, pp. 66-71.
- ③ 藤井伸二, カドハリイの越冬芽の形態と分類学的ノート、*分類*, 査読有、**Vol. 15**, No. 2, 2015, pp. 159-161.
- ④ 藤井伸二, 海老原 淳, 2015、四国におけるヨロイグサの新産記録、*分類*, 査読有、**Vol. 15**, No. 2, 2015, pp. 203-205.
- ⑤ Wasekura, H., S. Horie, S. Fujii, M. Maki, 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*, 査読有、**Vol. 128**, No.1, 2016, pp. 1-6.
- ⑥ 藤井伸二, 牧 雅之, 志賀隆, 新外来水草コウガイセキシヨウモおよびオーストラリアセキシヨウモの同定、*水草研究会誌*, 査読なし、**103号**, 2016, pp. 8-12.
- ⑦ 藤井伸二, 栗原 孝, 小幡和男, 関東地方におけるヨロイグサ(セリ科)の標本記録と野外個体群について、*分類*, 査読有、**Vol. 16**, No. 2, 2016, pp. 197-201.
- ⑧ Kizawa, A., M. Maki, Phylogeography of *Arabis serrata* (Brassicaceae) in the Japanese Archipelago based on chloroplast DNA variations, *Plant Species Biology*, 査読有、**Vol. 31**, No. 1, 2016, pp. 65-72.
- ⑨ Fujii, S., A new variety of *Cyperus pacificus* (Ohwi) Ohwi (Cyperaceae). *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 査読有、**Vol. 67**, No. 2, 2016, pp. 123-126.
- ⑩ 日比野友亮, 藤井伸二, 愛知県筏川のアサザの開花と花型、*水草研究会誌*, 査読なし、**104号**, 2016, pp. 31-33.
- ⑪ Fujii, S., M. Omura, S. Sugahara, H. Kamiya, M. Yamamuro, Effect of Herbicides in Paddy Runoff on Seed Germination of *Vallisneria asiatica* and *Ammannia multiflora*. *Aquatic Science and Technology*, 査読有、**Vol. 5**, No. 1, 2017, pp. 1-12.
- ⑫ Kimura, T., Yamazaki, S., Uno, K., Yamada, T. and M. Maki, Isolation and characterization of microsatellite loci in the endangered perennial *Eleocharis pulvula* (Cyperaceae), emerging in the 2011 tsunami inundation areas, *Plant Species Biology*, 査読有、**Vol. 32**, 2017, pp. 169-172.
- ⑬ 藤井伸二, 山室真澄, 神谷 宏, 江角敏明, セキシヨウモ実生を用いた水質への反応実験における測定形質の探索、*水草研究会誌*, 査読なし、**105号**, 2017, pp. 24-28.
- ⑭ 藤井伸二, 牧 雅之, マダイオウと雑種ノダイオウの混乱、*長野県植物研究会誌*, 査読なし、**50号**, 2017, pp. 31-35.
- ⑮ 藤井伸二, 勝山輝男, 狩山俊悟, 牧 雅之, コウガイセキシヨウモの野生化個体群を神奈川県と岡山県に記録する、*分類*, 査読有、**Vol. 47**, No. 1, 2017, pp. 43-47.

[図書](計3件)

- ① 矢原徹一, 藤井伸二, 伊藤元巳, 海老原淳(監修), 山と溪谷社, *絶滅危惧植物図鑑レッドデータプランツ増補改訂新版*, 2015, 782.
- ② 三重県農林水産部みどり共生推進課(編), 三重県, *三重県レッドデータブック2015～三重県の絶滅のおそれのある野生生物～*, 2015, 757.(分担執筆)
- ③ 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室(編), ぎょうせい, *レッドデータブック2014-日本の絶滅のおそれのある野生生物—8 植物1(維管束植物)*, 2015, 646.(分担執筆)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

山室 真澄 (YAMAMURO, Masumi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：80344208