

1 はじめに

現在、長い歳月をかけて形成された生物群集は、人間活動により地球上のあらゆるところではかり知れない大きな打撃を受けている。人間の直接の活動による自然の改変を数えあげるだけでも、その量は膨大なものとなる。多くの種はすでに個体数がひどく減っており、絶滅に瀕している。生物多様性の消失は、長い地球上の生命の歴史のなかでかつてないほど短期間に、しかも急速におこっている (Primack & 小堀 1997)。

東海地方の愛知県でも例外ではなく、かつて平地の大部分を占めていた照葉樹林は、畑、田園、集落、市街地、工業用地に姿を変え、神社の森などにその面影を伝えるのみである。東海地方に固有もしくは日本での分布の中心がある植物を東海丘陵要素といい、15種がこれにあたる (植田 1989)。東海丘陵要素の主たる生育環境である周伊勢湾地域と呼ばれる地域は、湧水が随所に見られ、それに続く斜面や谷底平野の流水面に湿地が形成されている。これら湧水に涵養されて維持されている低湿地は、水はごく貧栄養で比較的低温で、土壤層が存在せず、砂礫が裸で露出しているという特異な湿地である。(広木 2002)。つまり、このような他ではみることのできない希少な湿地にしか生育していない植物が絶滅に瀕しているのである。

生態系を非持続的な方法で利用すると、人間にとって大きい潜在的利用価値をもつ種を絶滅の淵に追いやることになる。セイヨウイチイはその好例で、木材会社によって棄てられていたが、樹皮と針葉から検出されたタクソールという複雑な化合物が、多くの癌の治療薬として有効であることが明らかにされるやいなや (Daly 1992: Joyce 1993)、人々のセイヨウイチイに対する態度は一変した (Primack & 小堀 1997)。このようなことがどの植物に起こるかがわかっていない以上は、より多くの種を保全していくしかない。つまり周伊勢湾地域の湿地について、より多くの植物を保全することも必要となる。

本研究では開発が進む都市部での絶滅危惧植物の実体を明らかにするために、フェノロジー (植物の生活史) の中でも、植物で種の存続に一番関わりがある開花期を調べることとした。同じ条件で栽培をした場合に、採集地ごとに成長曲線や開花期に違いが現れるか、各調査地で生存率や成長曲線、開花期に違いが現れるかを調査した。これにより、地域間変異が分化に与える影響を検証した。また、三年間のデータを基に、それぞれが年変動による挙動となっているのか、遺伝的による挙動となっているのかを確認した。

これらの結果を通して、土地開発などによる絶滅危惧植物の維持管理を考えるべきかを考え、保全に役立てることを目的としている。

2 調査材料

今回調査の対象としたのは、ホシクサ科ホシクサ属シラタマホシクサ (*Eriocaulon nudicuspe* Maxim.) である (図 1.)。シラタマホシクサは、日本固有の湿地に生える無茎一年草である。芽生えの時期は、3月下旬から4月上旬 (早いものは2月) である。葉は基部の1-3mmから束生して斜上し、線形、長さ5-30cm、幅1-5mm、全緑で先端は細くとがる。花茎は1-10個あり、直立して高さ15-60cm、4稜でねじれ、基部に3-12cmの鞘があり、先端に一個の頭花をつける。花期は、8月下旬～9月下旬。頭花は、白色球形で多数の花からなり、花苞の上半部背面に白色の短毛がある。



図 1. シラタマホシクサ径は6-8mm.

総苞片は頭花より短く倒卵形で淡褐色、萼裂片背面に白色の短毛が密生。子房と蒴果は3室である (愛知県自然史研究連絡会 2002)。平均減少率は約50%、100年後の絶滅確率は約98%である。絶滅危惧II類 (VU)。ただし現状不明の生育地の中には現存する場所もあると考えられ、これらの値はやや過大推定である。湿地の開発、土地造成、園芸用の採集等が減少の主要因である (環境庁自然保護局野生生物課 2000)。今シラタマホシクサは、かつて三河地方を中心に、100ヶ所ほどの自生地がみとめられていた (標本庫標本調査による)。しかし、現在確認されている自生地は36ヶ所である。

3 実験方法

育成実験は発芽して約一ヵ月後より、移植した全個体の葉の枚数をカウントした。カウントは2006. 5. 12. ~2006. 7. 7. までの3ヶ月間、2週間に1回とした。根ざわ径が1mm以上になったのち、1親個体中から中程度の個体を抽出し、根ざわの長径と短径を測定した。測定は2006. 6. 25~2006. 10. 17までの4ヶ月間、2週間に1回行った。また、乾燥重量推定のため個体を7月と10月に刈り取り、長径と短径のサイズを測定した。そののち、80℃

で48時間乾燥させ、乾燥重量を測定した。成長期の地上部の乾燥重量は、7月に刈り取った個体より、長径、短径、葉の枚数などに相関が最も強いものを用いて推定した。開花期の地上部の乾燥推定重量は、10月に刈り取った個体を用いて推定した。開花結実フェノロジーは同一環境下での集団間の遺伝的違いを検討するための栽培実験と、野外における集団間の違いを観察するための野外調査の2つの手法で行った。栽培実験は育成実験に用いた個体を利用して開花期間の調査を行った。調査は刈り取った個体以外のすべてについて2006.9.10~2006.11.5の2ヶ月間行った。1週間に1度、開花した個体の花茎に開花した時期が分かるように色を変えてマーキングし、開花開始から開花終了の期間調査を行った。野外調査では植物体の成長、生存率、開花についての調査を行った。各調査地において個体群全体を網羅できるように10コの方形区を設置した、1方形区あたり10個体にマーキングを行い、計100個体の追跡調査を行った。尚、三ツ池については、調査地の現状から、8方形区のみを設置し、計80個体の追跡調査を行った。各調査地でマーキングした80もしくは100個体を2006.6.21~2006.10.25までの間、1ヶ月に1回の頻度で生存の確認と、根ぎわの長径、短径の計測を行った。そののち根ぎわ径から、乾燥重量を推定し、成長を調査する方法については、栽培実験と同様の方法で行った。開花パターン調査は、約50cm×50cmの方形区を各自生地について、さらに1ヶ所設置して行った。方形区内で開花した花茎について、1週間ごとに色を変えてマーキングし、開花開始から開花終了の期間を追跡調査した。集団遺伝学的解析をするための個体抽出は、実生を3~4葉まで成長させた個体(約1mg)を用いて実験を行った。酵素の抽出は植物体1mgをTris-HCl grinding buffer-PVP solution 200 μ lを加えて乳鉢と乳棒で細かくすりつぶした。その後5 $^{\circ}$ C・10000rpmで5分間遠心分離を行い、得られた上澄み液を粗抽出液として電気泳動に用いた。電気泳動はデンブングル電気泳動法を用いた。泳動緩衝液にはSoltisら(1983)による#5の溶液を、ゲル緩衝液には#5の溶液を蒸留水で3.6%に希釈したものを使用した。粗抽出液を吸収させた3×10mmの濾紙片(東洋濾紙(株) Filter paper Chromatography 514A)をゲルの切れ目に挟み、4 $^{\circ}$ C・80mAで5分泳動した後、濾紙片を取り除き、さらに4 $^{\circ}$ C・80mAの定電流で150分間電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを1~2mmにスライスし、各酵素種の染色を行った。酵素多型分析の実験には11酵素、Aconitase (ACO), Isocitrate Dehydrogenase (IDH), Sialate Dehydrogenase (SKDH), Malate Dehydrogenase (MDH), Acid Phosphatase (ACP), Phosphoglucose Isomerase (PGI), Phosphoglucumutase (PGM), Menadione Reductase (MR)を用いて、酵素の検出を行った。ゲルを染色後、37 $^{\circ}$ C・0.2 μ molという条件下で2時間から24時間発色させた後に観察を行い、個体ごとに遺伝子型を決定した。

(1) 対立遺伝子頻度

酵素の染色パターンから遺伝子座内での対立遺伝子の占める割合を求め、それぞれを遺伝子型頻度、遺伝子頻度とした。

(2) 種の遺伝的多様性および遺伝的分化

個体群の遺伝的多様性を表す指標である、多型遺伝子座の割合(P)、集団ごとの遺伝子座あたりの対立遺伝子数(A)、分集団での平均ヘテロ接合頻度(H_T)、遺伝子多様度(H_S)を求めた(Nei, 1983)。 H_0 は実測のヘテロ接合体の割合であり、 H_e はハーディー・ワインベルグ平衡より期待されるヘテロ接合体頻度の割合で、分集団が任意交配をおこなっていると仮定したときのヘテロ接合度である。 P 、 A 、 H_e 、 H_T 、 H_S の算出法は以下のとおりである。

$H_e = 1 - \sum p_i^2$ (p_i はそれぞれ部分集団での対立遺伝子頻度)、 $H_T = \sum H_0 / N$ (N は検出された遺伝子座数)
 $H_S = \sum H_e / N$ (N は検出された遺伝子座数)、 $P = (\text{変異の見られた遺伝子座数}) / (\text{調査を行った全遺伝子座数})$

$$A = (\text{観察された全対立遺伝子座数}) / (\text{調査を行った全遺伝子座数})$$

また、生物は同じ種であっても、個体群間で遺伝的な文化が生じていることがある。遺伝的な分化の程度は遺伝的分化係数(G_{ST})で評価される。 G_{ST} は分集団間の集団分化に起因する遺伝的多様性の割合を示す。

$$G_{ST} = (H_T - \overline{H_S}) / H_T \quad (H_S \text{は} \overline{H_S} \text{の平均値を表す})$$

H_T は全集団が任意交配を行っているとした時の平均ヘテロ接合頻度を表しており、 $H_T = 2p_o q_o$ (p_o 、 q_o はそれぞれ全集団での平均の対立遺伝子頻度)で算出した。

(3) 固定指数

各集団の分集団内近交係数(F_{IS})、固定指数(F_{IT})、全近交係数(F_{ST})を算出した。 F_{IS} は、部分集団内での任意でない交配によるヘテロ接合性の減少を表しており、 F_{IT} は、全集団に対する個体のヘテロ接合性の減少を表しており、 F_{ST} は遺伝的浮動による部分集団のヘテロ接合性の減少量を表している。以下に計算式を記す。

$$F_{IS} = (H_S - H_T) / H_S, \quad F_{IT} = (H_T - H_T) / H_T, \quad F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

(4) Neiの遺伝距離

電気泳動で得られた遺伝子頻度に基づいて、各集団のNeiの遺伝的距離 D を算出した(Nei, 1972)。

$$D = \frac{D_{XY} - (D_X + D_Y)}{2} \quad (D_{XY} = 1 - J_{XY}, \quad D_X = 1 - J_X, \quad D_Y = 1 - J_Y)$$

J_{XY} , J_X , J_Y は、ゲノム内のすべての遺伝子座の j_{XY} , j_X , j_Y の平均である。

$$j_{XY} = \sum x_i y_i, \quad j_X = \sum x_i^2, \quad j_Y = \sum y_i^2$$

x_i, y_i はそれぞれの遺伝子座の対立遺伝子頻度である。 I は $I = 1 - D$ によって算出した。また、得られた D をもとに近隣結合法 (NJ法; Saitou and Nei, 1987) によって樹系図を構築した。

4 結果

育成実験の結果、葉の枚数の計数による、成長の比較であるが、それぞれの地域由来の各集団の葉の枚数の経時変化より、集団間にある程度の違いが認められた。特に行人町の集団が最も成長が遅く、東谷山の集団が最も成長が早かった。それぞれの集団の乾燥重量による成長変化を求めた結果、乾燥重量推定による成長については、集団間にもある程度の差が認められた。最大成長したのが県芸大の集団であった。島田の集団は開花期以降は低下しない傾向がみとめ

られた。栽培実験における同一環境下での開花調査の結果、開花開始時期、開花終了時期に集団間にある程度の差が認められた。特に、板山の集団は開花開始時期が全個体同時であり、開花終了時期については東谷山の集団は11月以降も咲き続ける個体が多く認められ、集団によっては開花期間を決定している温度が低いような場合も観察された。採集地ごとに、開花が始まった週についての Steel-Dwass 検定を行った結果より、有意差から、天伯、板山、行人町の集団、育種場、県芸大、新池の集団という2つのグループに分けられた。野外調査における生存率で得られた結果、死亡率が7月から8月にかけて高くなる集団 (島田)、死亡率が8月から9月にかけて高くなる集団 (三ツ池)、一定の比率で生存率が下がる集団 (大谷)、5月から6月と6月から7月の死亡率の差が0.04と近い値をとっている集団 (JA) など、集団によって様々な特徴があることが示された。また、5月から6月の死亡率が最も高い集団 (島田、大谷、JA)、6月から7月の死亡率が最も高い集団 (育種場、三ツ池)、8月以降生存率が一定となっている集団 (JA、育種場)、8月以降死亡率が一定で下がる集団 (三ツ池、島田、大谷) など、違う集団間で似たような結果になっている部分も示された。全体の傾向では、8月以降の生存率は安定していることが示された。調査地ごとに、8月の生存率について Steel-Dwass 検定を行った結果、三ツ池と育種場・JAでは有意差がみられたが、その他の組み合わせでは有意差はみられなかった。野外における成長の差異をみる為に、栽培実験と同様の近似で乾燥推定重量で描いた成長曲線の結果、三ツ池の集団がもっとも大きく、他の集団の約2倍の値となっている。また、栽培実験では曖昧であった集団間の差が、大きくなっていることが認められた。野外における開花調査の結果、2006年の調査では、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が3週間しかない集団 (行人町)、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が8週間もある集団 (育種場)、一個体で6週間もの開花期間がある集団 (三ツ池) など、集団によって差が示された。2007年の調査では、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が4週間しかない集団 (矢並)、最初に開花が

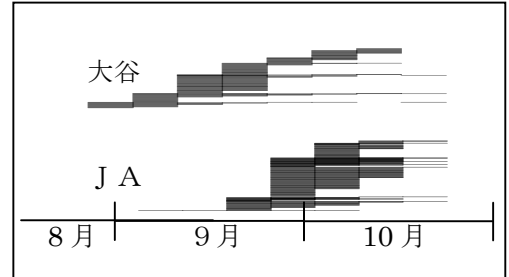


図2. 開花時期の一例 (データは2007) (直線は1頭花が開花していた期間を表す)

開始時期、開花終了時期に集団間にある程度の差が認められた。特に、板山の集団は開花開始時期が全個体同時であり、開花終了時期については東谷山の集団は11月以降も咲き続ける個体が多く認められ、集団によっては開花期間を決定している温度が低いような場合も観察された。採集地ごとに、開花が始まった週についての Steel-Dwass 検定を行った結果より、有意差から、天伯、板山、行人町の集団、育種場、県芸大、新池の集団という2つのグループに分けられた。野外調査における生存率で得られた結果、死亡率が7月から8月にかけて高くなる集団 (島田)、死亡率が8月から9月にかけて高くなる集団 (三ツ池)、一定の比率で生存率が下がる集団 (大谷)、5月から6月と6月から7月の死亡率の差が0.04と近い値をとっている集団 (JA) など、集団によって様々な特徴があることが示された。また、5月から6月の死亡率が最も高い集団 (島田、大谷、JA)、6月から7月の死亡率が最も高い集団 (育種場、三ツ池)、8月以降生存率が一定となっている集団 (JA、育種場)、8月以降死亡率が一定で下がる集団 (三ツ池、島田、大谷) など、違う集団間で似たような結果になっている部分も示された。全体の傾向では、8月以降の生存率は安定していることが示された。調査地ごとに、8月の生存率について Steel-Dwass 検定を行った結果、三ツ池と育種場・JAでは有意差がみられたが、その他の組み合わせでは有意差はみられなかった。野外における成長の差異をみる為に、栽培実験と同様の近似で乾燥推定重量で描いた成長曲線の結果、三ツ池の集団がもっとも大きく、他の集団の約2倍の値となっている。また、栽培実験では曖昧であった集団間の差が、大きくなっていることが認められた。野外における開花調査の結果、2006年の調査では、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が3週間しかない集団 (行人町)、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が8週間もある集団 (育種場)、一個体で6週間もの開花期間がある集団 (三ツ池) など、集団によって差が示された。2007年の調査では、最初に開花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が4週間しかない集団 (矢並)、最初に開花が

表1. 開花開始における Steel-Dwass 検定の結果

大谷06		三ツ池06		島田06		育種場06		行人町06		JA06	
三ツ池06	***	三ツ池06	***	島田06	-	育種場06	***	行人町06	***	JA06	***
島田06	***	三ツ池06	***	島田06	-	育種場06	***	行人町06	***	JA06	***
育種場06	***	三ツ池06	***	島田06	-	育種場06	***	行人町06	***	JA06	***
行人町06	***	三ツ池06	***	島田06	-	育種場06	***	行人町06	***	JA06	***
JA06	***	三ツ池06	***	島田06	-	育種場06	***	行人町06	***	JA06	***

大谷07		三ツ池07		島田07		育種場07		矢並07		JA07	
島田07	-	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-
三ツ池07	-	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-
県芸大07	**	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-
矢並07	-	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-
JA07	***	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-
育種場07	***	三ツ池07	-	島田07	-	育種場07	-	矢並07	-	JA07	-

大谷08		三ツ池08		島田08		育種場08		矢並08		JA08	
三ツ池08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-
県芸大08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-
矢並08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-
JA08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-
育種場08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-
島田08	***	三ツ池08	***	島田08	**	育種場08	***	矢並08	-	JA08	-

表2. 遺伝子頻度よりもとめられた各値

個体群	H_I	H_S	H_T	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	G_{ST}
板山*	0.438	0.470	0.293	0.068	-0.498	-0.607	0.236
寺町田*	0.578	0.587		0.016	-0.973	-1.005	
大谷	0.141	0.181		0.223	0.519	0.381	
新池	0.078	0.104		0.249	0.733	0.644	
島田	0.194	0.233		0.169	0.338	0.203	
東谷山	0.116	0.118		0.017	0.604	0.598	
三ツ池	0.043	0.079		0.453	0.852	0.729	
矢並	0.157	0.225		0.301	0.463	0.232	
県芸大	0.078	0.093		0.157	0.732	0.682	
育種場	0.129	0.187		0.311	0.559	0.360	
JA裏	0.165	0.191		0.135	0.436	0.349	
天伯	0.156	0.213		0.270	0.468	0.271	

花が開始した個体から、最後に開花が終了した個体までの期間が 8 週間もある集団（県芸大）など、集団によって差が示された。開花期について、各調査地で開花が始まった週についての Steel-Dwass 検定を行った結果を表 1 に示す。アイソザイム実験の結果から得られた分集団内でのヘテロ接合体頻度 H_I 、遺伝子多様度 H_S 、全集団での平均ヘテロ接合体頻度を示す H_T 、分集団内での任意でない交配による個体のヘテロ接合体頻度の減少量をあらわす分集団内近交係数 F_{IS} 、全集団に対する個体のヘテロ接合体頻度の減少量をあらわす全近交係数 F_{IT} 、遺伝的浮動による分集団のヘテロ接合体性の減少量を表す固定指数 F_{ST} 、遺伝子分化係数 G_{ST} の値を表 2 に示す。Nei の遺伝距離から NJ 法を用いて得られた系統樹を図 3 に示す。

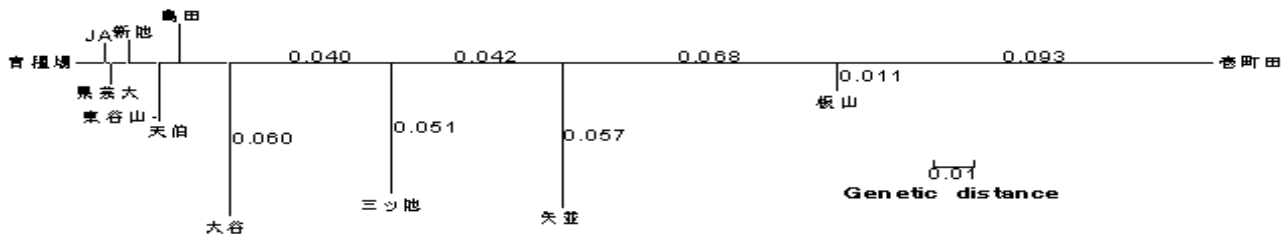


図 3. シラタマホシクサの系統樹 (NJ 法)

5 おわりに

栽培実験においての成長の違いであるが、水系が同じところや、採集地がかなり近くであっても、成長の仕方、大きさに違いがみとめられ、地域間変異が分化に影響している可能性が高い。特に開花パターンでは、集団間に有意な差異が認められた。特に JA、育種場、新池、島田、県芸大、東谷山などのように水系が同じであったり、きわめて隣接する集団どうしであっても有意な差が認められ、環境要因が一緒であっても、集団ごとに違った選択圧がかかっていることが示されている。次に野外における成長、生存率、開花パターンの違いは集団ごとに明らかに異なっていた。生存率について各調査地で異なるパターンが示されたのは、各調査地で全く選択圧のかかり方が違うためである。生態学では野外におけるフェノロジーのパターンや、形質に差異が出る場合、それが系統制約なのか、環境制約なのか問題にされる (河野 2005)。今回、これらのことを把握するために 30 親個体から 1 頭花ずつから採集した種子を用いて同一環境下で育成し、それぞれの繁殖形質について変化も計測したが、これに関しても野外の現状ほど大きな差ではないが、集団間に分化があることが認められている。このため、シラタマホシクサに観られる集団間の変異は遺伝学的なバックグラウンドを持つと考えられた。そのためこれらの集団にはそれぞれ、環境から受ける選択圧の違いがあり、そのために遺伝的な分化が起こっていることを示唆できた。遺伝的な分化が起こっているかの確認を、酵素を使ったアイソザイム実験で行った。板山、壺町田を抜きにして G_{ST} を計算すると、0.445 となる。さらに F_{IT} の値が 0.5 以上であった大谷、三ツ池は NJ 法によりかいた系統樹で、系統的に遠くなっていることも示されているので、集団間分化はおこっていることが示唆された。さらに、NJ 法によりかいた系統樹からは、大谷、矢並、三ツ池といった人が容易に近づくことができない湿地は系統的に遠くっており、人が容易に近づくことができ、人の出入りが頻繁にある湿地は系統的に近いことが確認された。これは人の出入りが頻繁あるところでは、共通の生育地をソースとして、そこから種を他の湿地に播種した可能性が示唆された。これは、それぞれの湿地の距離が遠い天伯、東谷山、島田、新池、JA、県芸大の遺伝距離が非常に近くなっていることから示される。安易に消失したからと言うことで別集団から採集した種子を用いて集団を復元することは、非常に危険である可能性があることを明らかにした。今回の研究から、シラタマホシクサの集団間のフェノロジーパターンの差異、遺伝構造が明らかになった。これによって、それぞれの湿地の保護、集団の復元などを行う場合、開花パターン等を考慮する必要性が示された。土木工事などにより、一時的に湿地の生態系が破壊される場合、移植などによって、集団を復元する場合が多い。しかし、シラタマホシクサのような一年草の場合、その集団を維持することは難しい。また、近隣の個体群へ移植し、これを再度復元個体として用いることが良く行われるが、今回の調査の結果これらの手法は好ましくないことが示された。このため、開発によって、一時的に湿地の生態系が破壊される場合には種子を採集し、開発が終わるまで開発地と同じような条件で発芽・生育させ、開発が終わり次第移植、あるいは種子播種を行い、復元を試みることももっとも良い手法ではないかと考えられる。しかし、今回の研究はシラタマホシクサにのみ焦点をあてたことであり、生育地のまわりの環境条件とフェノロジーの関係については関係がはっきりと示されていない。そのため、これらの復元した個体群を維持するためには、生育地のまわりの環境とシラタマホシクサの関係を解析することが重要であると考えられる。単に湿地のみの保全にとどまると、種子繁殖が出来なくなる可能性も考えられるため、湿地の保全には近隣の里山が確保されることも必要であると考えられる。