

諏訪湖のヒシ類 *Trapa* spp. の形態的多様性と遺伝構造との関係性究明に向けた DNA 解析

○谷野宏樹¹・筒井裕文¹・宮坂真司¹・北野聡¹

¹ 長野県諏訪湖環境研究センター

はじめに

生物の形態は、遺伝的および環境的要因によって変化する。この背景には、地理的に分断化された系統でランダムに形態が変化する可能性や、異なる自然淘汰に晒された結果形態が変化的な変化すること、あるいは遺伝的分化を伴わない発現遺伝子変動などのエピジェネティックな差異などによる表現型可塑性がみられることが想定される。

ヒシ類は果実形態が多様であり、集団ごと、あるいは地域ごとに形態が異なることが報告されている (Oniguma et al., 1996)。また、ヒシ *Trapa japonica* が交雑由来の種である可能性が示されるなど、果実形態の多様性の背景には複雑な交雑の状況があることも想定される。こうした背景から、果実形態の多様性は地域の環境条件によって創出されていることや、あるいは交雑や地理的隔離の結果によるものと考えられるものの、それぞれどのように寄与しているのかは不明瞭な状況にある。

ヒシ類が大量繁茂し計画的な除去が課題となっている諏訪湖においても、多様な果実形態を有するヒシ類がみられる。ヒシ類の果実形態の多様性が遺伝的分化に基づくのか遺伝的分化によらない表現型可塑性に基づくのかによって、諏訪湖におけるヒシ対策は異なる可能性が考えられることから、形態的多様性の遺伝的基盤について検討することは重要である。

そこで、本研究ではヒシ類の果実形態を地点間で比較するとともに遺伝構造を比較することで、果実形態の多様性創出機構が遺伝的分化に基づくか否か検討することを目的とする。本年はヒシ類の形態的な多様性について

測定するとともに、鋭敏な SNPs マーカーを用いる上での条件検討として葉緑体 DNA の解析を実施して抽出 DNA の品質が十分か否かについても検討した。

方法

2024 年の 10 月に諏訪湖の 4 地点 (図 1) でヒシ類の果実と葉を採集した。果実は形態的多様性の評価に用い、採集した葉は DNA 抽出までの期間、シリカゲルで乾燥させた状態で保管して DNA 解析に用いた。



図 1. ヒシ類の採集地点。地図は電子地形図 25000 (国土地理院) を加工して作成。

先行研究における形態的多様性の評価では、果実形態の幅や高さ、棘の大きさなどヒシ類の形態的測定に適した場所が提唱されていることから (福井・清水, 1992)、先行研究に基づいて計測を行なった (図 2)。得られた測定結果に基づき、ソフトウェア R に含まれるパッケージ stats (R Core Team, 2012) により主成分分析を実施した。乾燥させた葉は 1cm 角に細断してジルコニアビーズと TissueLyser

LT (QIAGEN Hilden) を用いて破碎した。その後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Hilden) のプロトコルに従って total DNA を抽出した。

抽出した total DNA を用いて、植物の DNA バーコーディング用プライマー 3 種のうち、葉緑体 DNA matK 領域を増幅するプライマー (Setsuko et al., 2023) で PCR を実施した。

PCR (Polymerase Chain Reaction) では 95°C で 3 分間のプレヒート後「98°C で 20 秒間の熱変性、60°C で 15 秒間のアニーリング、72°C で 15 秒間の伸長」を 1 サイクルとする反応を 35 サイクル行った後、72°C で 5 分の最終伸長を行い、4°C で保存した。これらの反応には HiFi HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems Massachusetts) を用いた。

PCR 産物の精製には ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific Massachusetts) を用い、37°C で 4 分間、80°C で 1 分間の反応の後、4°C で保存した。精製した産物はマクロジェンジャパンに送付し、3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems Massachusetts) で塩基配列を決定した。シーケンス後の塩基配列についてはソフトウェア ApE (Davis and Jorgensen, 2022) を用いてアセンブリを行い、NCBI のデータベース登録配列とともにソフトウェア MAFFT

(Katoh and Standley, 2013) によりアライメントを実施した。アライメントした配列を用いてソフトウェア RAxML (Stamatakis, 2014) による系統解析を実施した。

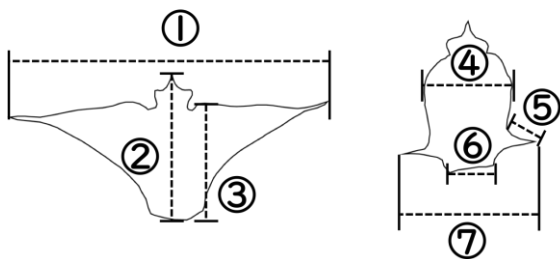


図 2. ヒシ類の形態的測定に用いた部位。

結果

角野 (2014) に基づくヒシ類の果実形態に

よる分類の結果、諏訪湖にはヒシ *Trapa japonica* およびオニビシ *Trapa natans* の 2 種が分布していることが明らかとなった。特に地点 1 では典型的なオニビシの形態を有する個体が優占しており、地点 4 では典型的なヒシの形態を有する個体が優占していた。一方で、棘などの形態からオニビシ様のヒシやヒシ様のオニビシもみられるなど、中間形のような個体も多く見られた。

形態測定の結果に基づく主成分分析の結果、ヒシとオニビシの形態は明確には分かれず、先行研究における形態測定および遺伝子解析による交雑の可能性 (Fan et al. 2022; Lam et al. 2024) を支持する結果が得られた (図 3)。

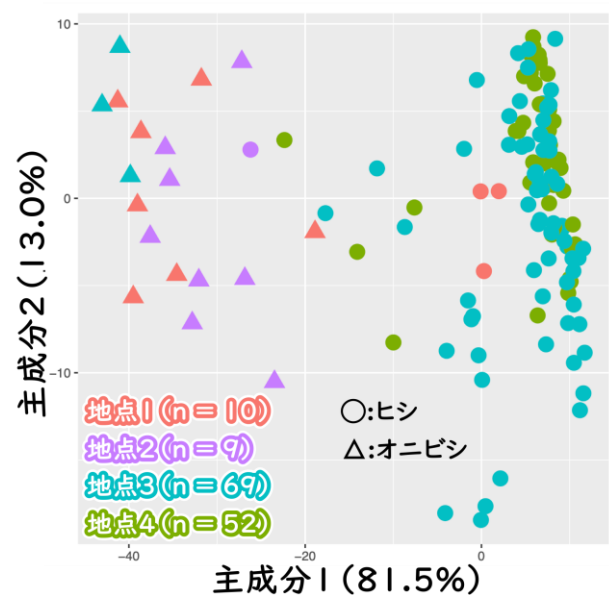


図 3. 形態計測結果の主成分分析。

葉緑体 DNA に基づく系統解析の結果では、複数の遺伝子型は検出されたものの、形態学的に分類した種が単系統となるほどの感度は得られなかった (図 4)。

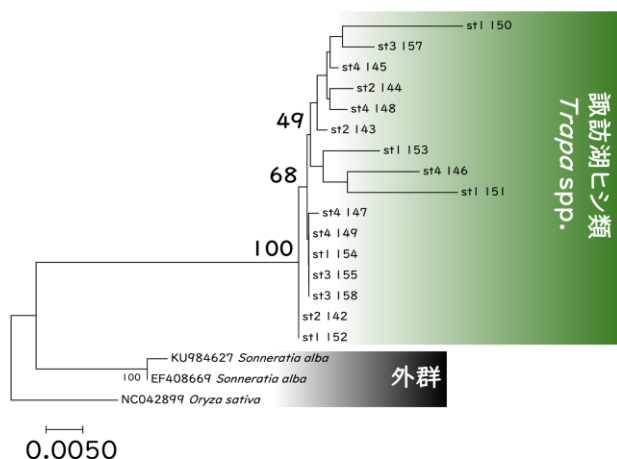


図 4. 葉緑体 DNA matK 716-bp に基づく分岐図。ノードの値は ML 法によるブートストラップ確率を示す。

考察

諏訪湖では形態的にヒシに分類されるものとオニビシに分類されるものの 2 種のヒシ類が分布していた。また、中間形のような個体も多く見られている。これまでにヒシ類では種間交雑がよく知られていることも踏まえれば (Lam et al., 2024)、諏訪湖では異なるニッチに 2 種のヒシ類が分布しながらも、その分布の間では交雑帯が生じている可能性が考えられる。ヒシとオニビシとの種間競争については知見が不足しているものの、諏訪湖ヒシ類は、近接する地域において近縁種の棲み分けと交雑が起きている興味深い事例であることが期待される。

将来的に、核領域を含む GRAS-Di 等のゲノム縮約解析を実施することで交雑の実態を把握するとともに、系統と生態的特徴を対応させることで、今後のヒシ類管理に資する知見が得られるものと考えられる。

引用文献

- Davis, M. W. and E. M. Jorgensen (2022): ApE, a plasmid editor: A freely available DNA manipulation and visualization program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2:818619.
- Fan, X. Wang, W. Wagutu, G.K. Li, W. Li, X. and Y. Chen (2022): Fifteen complete chloroplast genomes of *Trapa* species (Trapaceae): insight into genome structure, comparative analysis and phylogenetic

- relationships. *BMC Plant Biology*, 22:230.
- 福井順治・清水源 (1992): 静岡県のヒシ属果実の形態変異の分析. *水草研究報*, 47:1-5.
- Katoh, K. and D.M. Standley (2013): MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772-780.
- Lam, D.T. Kataoka, T. Yamagishi, H. Sun G. Udatsu, T. Tanaka, K. and R. Ishikawa (2024): Origin of domesticated water chestnuts (*Trapa bispinosa* Roxb.) and genetic variation in wild water chestnuts. *Ecology and Evolution*, 14:e10925.
- Oniguma, K. Takano, A. and Y. Kadono (1996): Karyomorphology of some Trapaceae in Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 47:47-52.
- R Core Team (2012): R: a language and environment for statistical computing. URL: <http://www.R-project.org/>
- Setsuko, S. Yoshimura, K. Ueno, S. Worth, J. R. P. Ujino-Ihara, T. Katsuki, T. Noshiro, S. Fujii, T. Arai, T. and H. Yoshimaru (2023): A DNA barcode reference library for the native woody seed plants of Japan. *Molecular Ecology Resources*, 23:855-871.
- Stamatakis, A. (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312-1313.