

イタリアアルプス自然河川のユスリカ群集の DNA 種分類法を用いた種多様性の解明

愛媛大学大学院 学生会員 ○近藤俊介 愛媛大学大学院 正会員 渡辺幸三
京都大学防災研究所 非会員 竹門康弘

Leibniz-Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries 非会員 Michael T Monaghan

1. 背景

タリアメント川はイタリア北東部から地中海に流れるアルプス自然河川である。人為的影響が少なく、原始的な河川生態系と複雑な河道地形を有する自然氾濫原を維持している（図 1）。したがって、ヨーロッパ温帯河川の自然再生の目標像となるモデル生態系として位置付けられている¹⁾。

ユスリカ科は底生動物群集の中で最も多様な水生昆虫グループの一つである。しかし、体サイズが 1cm 未満と小さく、形態同定が困難で、種分類が進んでいない。したがって、現在のバ



図 1 タリアメント川の洪水氾濫原

イオモニタリングでは種多様性は評価されない場合が多い。種多様性の評価では、実体顕微鏡を用いて生物の形態学的特徴から種を同定する手法が主に採用されている。しかし、同定基準が複雑で時間や労力がかかること、誤同定の可能性があること、そして未記載種の同定ができないことなどの問題点があげられる。

近年、この形態学的手法に代わる手法として DNA 塩基配列情報を用いた方法が注目されている。これは、形態学的同定の熟練した技術がない人でも同定することができる。DNA 種分類法の一つとして General Mixed Yule-Coalescent モデル (GMYC モデル) が知られている。このモデルは、枝長が進化時間に比例する系統樹に基づいて種分化と種内進化の境界年代を決定することで、種レベルで形態同定できない分類群でも迅速に種数を定量化できる²⁾。

以上、この形態学的手法に代わる手法として DNA 塩基配列情報を用いた方法が注目されている。これは、形態学的同定の熟練した技術がない人でも同定することができる。DNA 種分類法の一つとして General Mixed Yule-Coalescent モデル (GMYC モデル) が知られている。このモデルは、枝長が進化時間に比例する系統樹に基づいて種分化と種内進化の境界年代を決定することで、種レベルで形態同定できない分類群でも迅速に種数を定量化できる²⁾。

以上の背景より、本研究は、タリアメント川のユスリカ群集を GMYC モデルで DNA 種分類を行い、ヨーロッパ温帯河川のモデル生態系の真の種多様性を解明することを目的とする。

2. 方法

調査地点間の生物群集構造の違いと環境異質性が最大化されることが期待される 20 地点を選定した。調査は 2009 年 7 月 13 日から 9 月 10 日までと 2010 年 3 月に実施し、河川底生動物の採取と生息場の環境調査を行った。各調査地点に出現した早瀬、淵、ワンドなどを含む 8 つの生息場区分から 3 箇所以上をランダムに選択し、D フレームネットを使って、河床、倒流木及び水草を生息場とする底生動物を定性的にキックネットで採取した。採取直後に 99.5%エタノールで固定し、実験室に持ち帰った後、サンプル瓶の中を新たな 99.5%エタノールに入れ替え、その後 4℃下で長期保存した。

採取した 1698 個体のユスリカサンプルから DNA を DNeasy 96 Blood & Tissue Kits (QIAGEN) を用いて抽出した。ミトコンドリア DNA (mtDNA) の Cytochrome Oxidase Subunit I (CO I) 領域を PCR 増幅した。CodonCode Aligner 4.2.5 (CodonCode Corporation) でシーケンシングデータのアライメント (塩基配列の整理と挿入・欠損の調整) を行い、Cleancollapse で 1698 個体から 991 個のハプロタイプを検出した。その後、991 個のハプロタイプを進化的に近い 3 つの亜科グループに分類した (表 1)。BEAST v1.7.5 で、ベイズ法に基づいて系統樹探索と分岐年代の推定を行った。R パッケージの SPLITS を使用し、GMYC 解析³⁾で種分類を行った。

3. 結果

3つの亜科グループの進化系統樹と GMYC 種が得られた。エリユスリカ亜科、ヤマユスリカ亜科及びオオヤマユスリカ亜科のグループは 162 種、ユスリカ亜科は 70 種 (図 2)、モンユスリカ亜科は 32 種、合計で 264 種のユスリカの存在が推定された (表 1)。形態種は合計 88 種であり、GMYC モデルで約 3 倍多い種数が得られた。

また、20 地点のうち最も GMYC 種数の多い地点 (82 種) は氾濫原を有しており、複雑な河道地形であった。また、その地点の全ての生息場区分で倒流木が出現した。

4. 考察

GMYC 種と形態種を比較すると、1 種の形態種から複数の GMYC 種が推定されている場合 (28 形態種の中に 86 GMYC 種) と、形態学的に種レベルで同定できない分類群で複数の GMYC 種が存在している場合 (46 分類群の中に 120 GMYC 種) が、GMYC 種全体の約 8 割で確認された。この結果、GMYC 種数が約 3 倍多くなったと考えられる。1 種の形態種から複数の GMYC 種が見られたことは、ユスリカの形態学的分類を見直す必要があることを示唆している。また、GMYC モデルは種レベルで形態同定できない分類群も種分類できたので、未記載種の種数の推定に有効であることが確認された。

GMYC 種数が最も見られた地点は、洪水氾濫原であった。そこは、河畔林のため池や倒流木など、多様な生息場を有していた。倒流木が存在することにより、川を流れてくる有機物や土砂、シルトが留められ、多くのユスリカの餌場や住処になっていると考えられる。

5. おわりに

DNA 種分類法により、タリアメント川に生息するユスリカ群集が 264 種であることが解明された。また、洪水氾濫原に多様な種が見られた。生息場の環境要因と種数の関連性を探ることが今後の課題である。

参考文献

- 1) Arscott, D. B. *et al* (2002). *Ecosystems*, 5(8), 802-814.
- 2) Vuataz, L. *et al* (2011). *PLoS ONE*, 6(5)
- 3) Fujisawa, T. *et al*. (2013). *Systematic Biology*, 62(5), 707-724.

表 1 亜科グループごとの解析データ

亜科グループ	形態種	GMYC 種	ハプロタイプ	個体数
エリユスリカ亜科				
ヤマユスリカ亜科	60	162	620	954
オオヤマユスリカ亜科				
ユスリカ亜科	25	70	246	508
モンユスリカ亜科	3	32	125	236
全体	88	264	991	1698

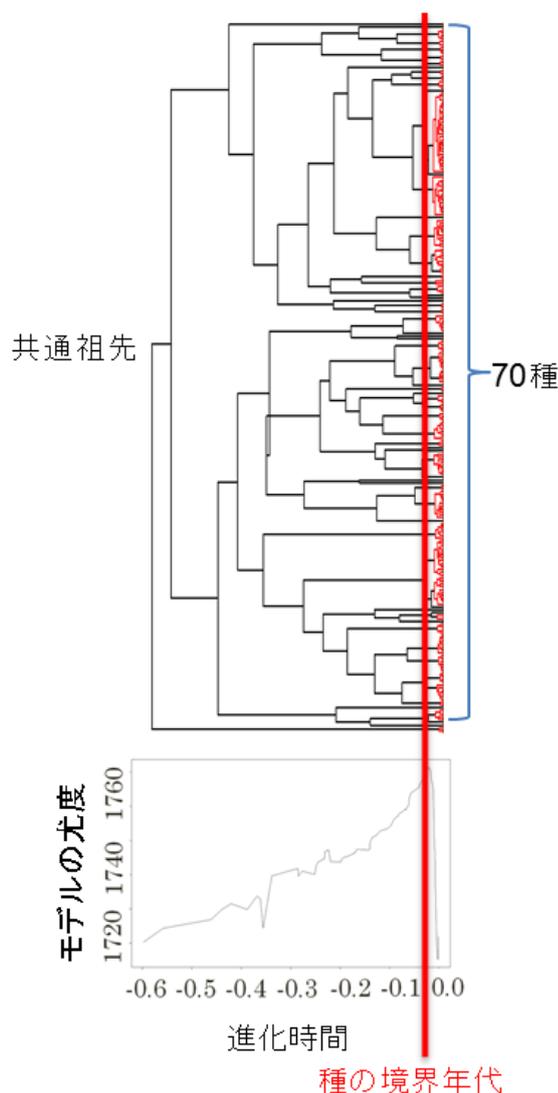


図 2 GMYC モデルにより種分類された進化系統樹の例 (ユスリカ亜科 70 GMYC 種)

進化系統樹は共通祖先から分岐していく。モデルの尤度が最大値をとるとき、種分化と種内進化の境界年代が決定される。