

次世代シーケンサーを取り入れた埋土種子評価法に向けて

○ 南條智美¹・廣田充²・平尾章¹・田中健太¹ (¹筑波大・菅平、²筑波大・生命環境)

土壤中で発芽能力を保持している埋土種子は、光・温度条件等の変化を合図として発芽して次世代に寄与する。埋土種子の種組成は過去の植生を反映しており、過去の植生の復元や絶滅危惧種の個体群回復のための種子源として注目されている。また、埋土種子を利用するには事前の種組成評価が必要である。その評価法として先行研究では、(1) 発芽させて実生の種同定を行う発芽法、(2) 種子を土壌から取り出して形態的に分類する分離同定法、が用いられてきた。しかし、全ての種子を休眠解除させることや、種子や実生の種同定が難しいという難点があった。本研究では、多数の絶滅危惧植物が分布しその保全が課題となっている菅平高原の森林と草原において、複数条件を用いた発芽法による埋土種子評価を行いつつ、次世代シーケンサーを用いた DNA メタバーコーディングによる埋土種子評価法の可能性を検討する。

調査地は、菅平高原実験センターの林齢約 45 年のアカマツ林と、峰の原スキー場の半自然草原とした。2014 年 5 月に、各調査地に 80m のトランセクトを敷き、10 m 間隔の各 9 地点において 30 × 60 × 深さ 3 cm の土壌を採取した。各調査地の採取土壌全てをよく混ぜ合わせ、3 処理×3 反復の発芽実験に供した。処理 (1)：気温の日較差を大きく出すため、窓を開放したガラスハウスの中で 5 月～11 月に行った。処理 (2)：野外と類似した環境にするため、センターの圃場で 5 月～11 月に行った。処理 (3)：冬を模した冷湿処理を 2 ヶ月施した後、インキュベーター内で温度変化させて 8 月～11 月に行った。5 °C から始めて 1 週間につき 5 °C 上昇させ 35 °C に達する温度上昇系に引き続き、1 週間につき 5 °C 減少させて 5 °C に達する温度下降系を行った。いずれの処理も、1 反復あたり 30×60 cm のトレイの上に 1 cm の厚さで土壌を撒き出し、発芽個体数を 2 週間に一度記録し、種同定ができた実生はその時点で引き抜いた。また調査地に 2×2 m の方形区を森林に 9 箇所、草原に 10 箇所設け、地上現存植生を調査した。

森林・草原土壌からの発芽個体数(種数)はそれぞれ、ガラスハウスで合計 515(29 種)・1407(34 種)、圃場で合計 75(15 種)・318(15 種)、インキュベーターで合計 56(14 種)・497(10 種)だった。森林土壌ではシラカバ・コナスビ・タチツボスミレが優占し、草原土壌ではヒメジョオン・ヒメスイバが優占した。植生調査では森林に 44 種、草原に 61 種が出現した。発芽実験では全処理合計で森林・草原から 31 種・35 種(うち未同定 5 種・4 種)が発芽し、そのうち 13 種・14 種が地上植生に出現しない潜在種だった。潜在種は地上植生出現種に比べ、森林では草本の割合が高く、草原では木本の割合が高かった(図)。

DNA メタバーコーディングを行うには、土壌から種子だけを取り出し、混合種子から DNA を抽出し、混合 DNA を葉緑体遺伝子について PCR し、混合 PCR 産物を次世代シーケンシングすることが必要である。比重分離法によって土壌から種子を分画できるか試したところ、種子・リター・花粉からなる有機物混合層を分画することしかできず、これでは埋土種子 DNA とその他の有機物 DNA を区別できない。そこで、リター中では速やかに分解する RNA のメタバーコーディングが可能か、検討を行っている。

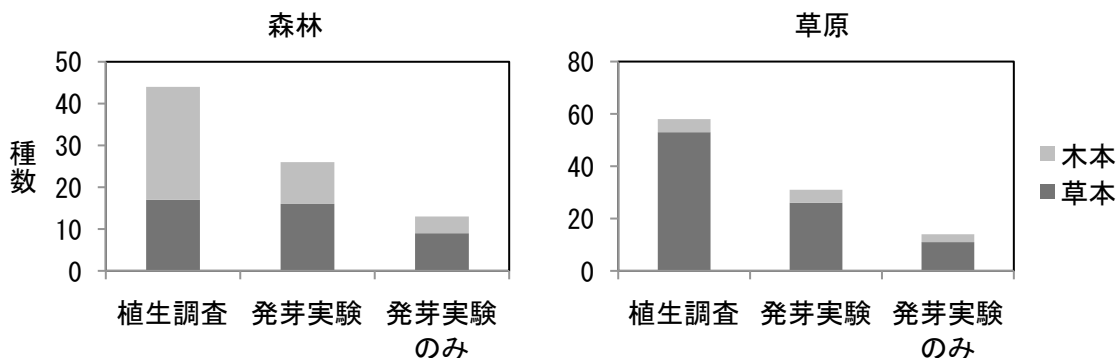


図 森林土壌と草原土壌における生活型組成(未同定種を除く)