

原著論文

## 絶滅危惧種ビャッコイ (*Isolepis crassiuscula* Hook. f.) の染色体と葉緑体遺伝子の分析

平原友紀・矢野興一・星野卓二

岡山理科大学大学院総合情報研究科数理環境システム専攻 (〒700-0005 岡山県岡山市理大町 1-1)

Tomonori HIRAHARA, Okihito YANO and Takuji HOSHINO: Chromosome observations  
and chloroplast DNA sequences of a Japanese endangered species,*Isolepis crassiuscula* Hook. f. (Cyperaceae)Department of Mathematical and Environmental System Science, Graduate School  
of Informatics, Okayama University of Science, Ridai-cho 1-1,  
Okayama-shi, Okayama 700-0005, Japan**Abstract**

*Isolepis crassiuscula* Hook. f. is distributed in Japan, Indonesia, Papua New Guinea, Australia and New Zealand. In Japan, *I. crassiuscula* is found only in Shirakawa-shi, Fukushima Prefecture, and is listed in Endangered Species List of Japan. The origin and phylogenetic relationships of Japanese *I. crassiuscula* was investigated using chloroplast DNA sequence data. The chromosome number of *I. crassiuscula* was  $2n=96$ , which was the highest number in the genus *Isolepis*. Relationships among ten species of *Isolepis* are explored using *rbcL* and *trnL* intron sequence data. Our molecular data show a close phylogenetic relationship between Japanese and Australian *I. crassiuscula*.

**Key words:** chloroplast DNA, chromosome, Cyperaceae, *Isolepis crassiuscula* Hook. f., *rbcL*, *trnL* intron

**要旨** ビャッコイ (*Isolepis crassiuscula* Hook. f.) は日本とインドネシア、パプアニューギニア、オーストラリア、ニュージーランドに分布することが報告されている。日本では福島県白河市のみに生育しており、絶滅危惧種 (IB) に指定されている。本研究では日本産ビャッコイの染色体と葉緑体遺伝子の解析を行った。その結果、ビャッコイの染色体数は  $2n=96$  であり、今までに報告されたビャッコイ属の他種よりも高次の染色体数を持つことが明らかになった。また、ビャッコイ属 10 種について葉緑体 *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の比較を行なった結果、日本産ビャッコイは同属 9 種よりも、オーストラリア産ビャッコイと相同性が高いことが明らかになった。

ビャッコイ属 *Isolepis* R. Br. は広義のホタルイ属 *Scirpus* L. s. l. に含まれていたが、現在では独立した属として扱われている。ビャッコイ属はアフリカやオーストラリアなどの南半球に 65 種が分布しているが、そのうちの 4 種はユーラシア大陸や北アメリカ大陸にも生育している。ビャッコイ *Isolepis crassiuscula* Hook. f. は日本とインドネシア、パプアニューギニア、オーストラリア、ニュージーランドに生育している (Kern 1974, Muasya and Simpson 2002)。日本では福島県白河市の湧水池のみに生育しており、福島県の天然記念

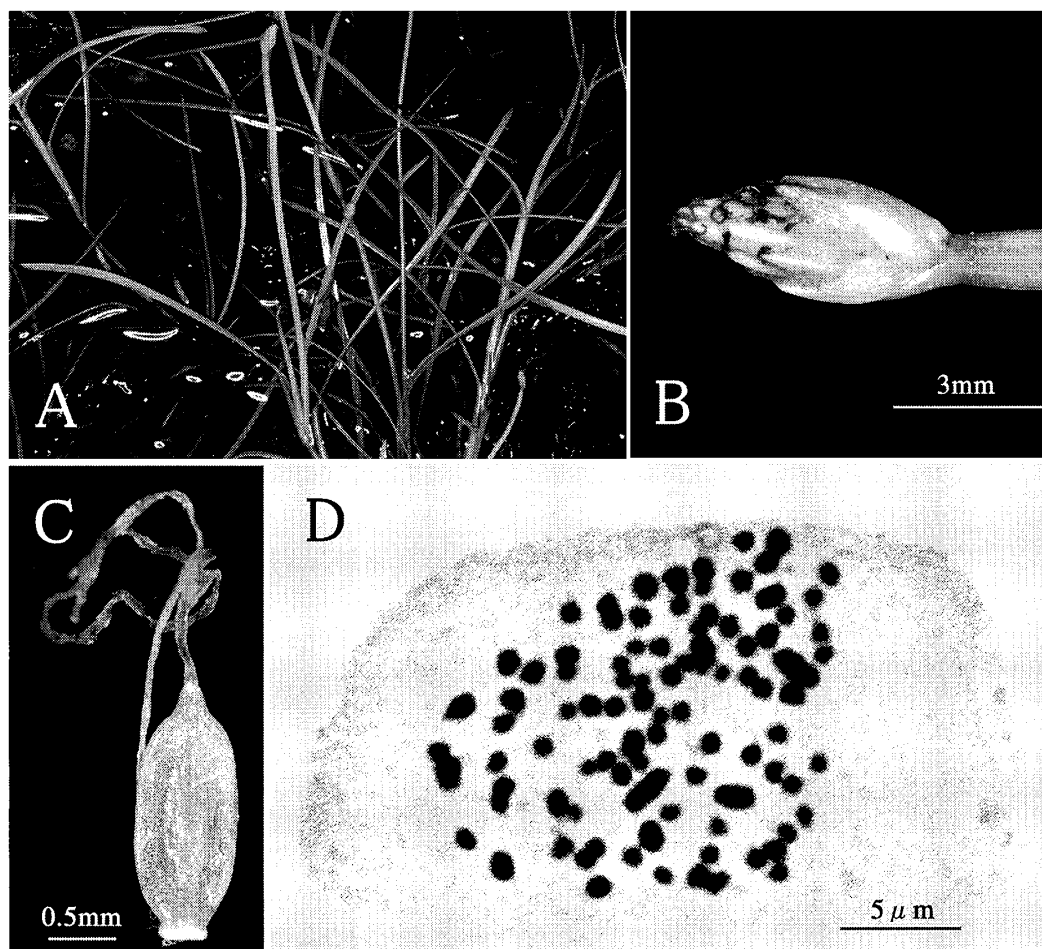


図1. ビャッコイの植物体, 小穂, 瘦果および体細胞分裂中期染色体像. A: 植物体 (福島県西白河郡表郷村金山 (現 白河市), 2003年9月1日撮影). B: 小穂. C: 瘦果. D: 体細胞中期染色体 ( $2n=96$ ).

物に指定されている (表郷村企画調整課 1996). また, ビャッコイは生育地が限られていることから絶滅危惧種 (IB) に指定されている (矢原 2003). ビャッコイは Makino (1905) によって新種 *Scirpus pseudofluitans* Makino として植物学雑誌第 19 巻に記載発表されたが, その後, Koyama (1958) は *Scirpus fluitans* L. subsp. *pseudofluitans* (Makino) T. Koyama, 小山 (1964) は *Isolepis crassiuscula* Hook. f., 大井 (1982) は *Scirpus crassiusculus* (Hook. f.) Benth. と再同定している.

ビャッコイはほぼ沈水して生育する多年草である. 長い走出枝を出し, その各節から 5–10 cm の葉や稈を生じる (図 1A). 稈の先に狭卵形の小穂を 1 個生じ, 長さは 5–7 mm である (図 1B). 瘦果は長楕円形で両凸レンズ状, 柱頭は 3 個, 刺針状花被片はない (図 1C). 広義のホタルイ属とは刺針状花被片がないことで区別される.

Muasya *et al.* (2001) および Muasya and Simpson (2002) は, 分子系統解析に基づいてビャッコイ属の範囲と属内分類群を整理し, ビャッコイを *Isolepis crassiuscula* Hook. f. として扱った. しかし, これらの研究において, DNA 塩基配列の解析を行ったのはオーストラリア産 1 個体のみである. 本研究では日本産ビャッコイの DNA 塩基配列を解析し,

ビャッコイ属における日本のビャッコイの位置づけを試みた。また、これまでに明らかになっていないビャッコイの染色体を分析した。

## 材料と方法

ビャッコイを福島県白河市より2株採集し、葉緑体 *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の塩基配列を決定した。DNA を抽出した2株は証拠標本として岡山理科大学植物標本庫に収蔵した (OKAY 19165, 19166)。

ビャッコイ属69種は *Fluitantes*, *Isolepis*, *Micranthae* の3亜属に分類されている (Muasya and Simpson 2002)。ビャッコイは *Fluitantes* 亜属に分類される。本研究では、日本産ビャッコイの塩基配列の比較に、オーストラリア産ビャッコイを含む *Fluitantes* 亜属の8種と *Isolepis* 亜属の2種を用いた (表1)。

### (1) 塩基配列の決定と比較

ビャッコイの生葉0.1gから Nucleon Phytopure Plant and Fungal DNA Extraction Kit (Amersham Biosciences Co.) を用いて全DNAを抽出し、タンパク質等の不純物を取り除くためにエタノール沈殿を行った。次にPCR法による解析領域の増幅を行った。*trnL* intron 領域の増幅は Taberlet *et al.* (1991), *rbcL* 遺伝子の増幅には Olmstead *et al.* (1992) の方法に従った。また、*rbcL* 遺伝子の増幅には新たに作成した *rbcL*-740R (GCTCTTTTG-ATCATTTCTTC), *rbcL*-1434R (CTAGCTATCTAGTTTGCTA) のプライマーも使用した。次に、電気泳動によって解析領域の増幅を確認した。増幅が確認できたPCR産物は QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Co.) を用いて精製した。精製後のPCR産物は DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences Co.) を用いて Cycle sequence を行い、ABI PRISM 310 automated DNA sequencer によって塩基配

表1. 解析に使用したカヤツリグサ科ビャッコイ属10種の採集地および DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号

種名	採集地	DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号	
		<i>rbcL</i>	<i>trnL</i> intron
Cyperaceae			
<i>Isolepis</i> R. Br.			
Subgen. <i>Fluitantes</i>			
<i>I. crassiuscula</i> Hook. f.	日本 (福島県白河市)	AB236355	AB236356
<i>I. crassiuscula</i> Hook. f.	オーストラリア	AJ404706	AJ295777
<i>I. fluitans</i> (L.) R. Br.	ケニア	Y12961	AJ295780
<i>I. graminoides</i> (R. W. Haines & Lye) Lye	ケニア	Y12960	AJ295782
<i>I. inyangensis</i> Muasya & Goetgh.	ジンバブエ	AJ297506	AJ295787
<i>I. ludwigii</i> (Steud.) Kenth	南アフリカ	AJ404713	AJ295789
<i>I. producta</i> (C. B. Clarke) K. L. Wilson	オーストラリア	AJ404717	AJ295795
<i>I. rubicunda</i> (Nees) Kunth	南アフリカ	AJ404719	AJ295797
<i>I. striata</i> (Nees) Kunth	南アフリカ	AJ404721	AJ295801
Subgen. <i>Isolepis</i>			
<i>I. cernua</i> (Vahl) Roem. & Schult.	イギリス	Y13014	AJ295775
<i>I. setacea</i> (L.) R. Br.	ケニア	Y12962	AJ295799

列の決定を行った。その後、CLUSTAL W 1.83 (Thompson *et al.* 1994) を用いて塩基配列を比較した。

## (2) 体細胞分裂中期染色体の観察

ビャッコイの根端の先端を約 5 mm 採取し、16°C 0.002 M 8-オキシキノリンで 5 時間前処理した。次に固定液（エタノール：酢酸=3:1）に浸し、-20°C で 24 時間以上固定し、エタノールシリーズで水和した。次に、60°C 1 N-HCl に根端を 10 分間浸し、室温のフクシン亜硫酸液で 1 時間染色した。2% ペクチナーゼと 2% セルラーゼ酵素混合液に 37°C で 1 時間処理し、D.W. で水洗した。その後、1% アセトオルセインを滴下し、押しつぶし法でプレパラートを作成した。

## 結果と考察

### (1) 塩基配列の比較

福島県白河市より採集したビャッコイ 2 株について、葉緑体 *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の塩基配列を決定した。*rbcL* 遺伝子は 1369 塩基、*trnL* intron 領域は 631 塩基であり、2 株の塩基配列は 100% 一致した。

次に、日本産ビャッコイとオーストラリア産ビャッコイを含む *Fluitantes* 亜属の 8 種および *Isolepis* 亜属の 2 種について、*rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の比較を行った。

表 2. ビャッコイ属 10 種における *rbcL* 遺伝子の塩基の変異

	13	16	19	37	67	108	118	128	205	217	226	244	385	481	482	550	561
1 <i>I. crassiuscula</i> (日本)	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	T	G
2 <i>I. crassiuscula</i> (オーストラリア)	T	A	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	T	G
3 <i>I. producta</i>	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	T	G
4 <i>I. fluitans</i>	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	A	T	C	T	G
5 <i>I. inyangensis</i>	T	A	T	T	C	C	C	A	C	A	G	G	A	C	A	T	G
6 <i>I. graminoides</i>	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	A	T	C	T	G
7 <i>I. striata</i>	T	A	C	T	T	C	A	C	G	T	G	G	G	T	C	T	G
8 <i>I. rubicunda</i>	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	T	C
9 <i>I. ludwigii</i>	T	G	T	T	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	T	G
10 <i>I. cernua</i>	T	G	T	T	C	G	C	G	C	T	A	A	G	T	C	C	G
11 <i>I. setacea</i>	G	G	T	A	C	C	C	C	C	T	G	G	G	T	C	C	G

	595	604	628	634	638	639	640	662	667	670	714	793	806	859	925	970	985	1099	1120	1123	1169	1195	1202	1242	1264	1323	1339
1	T	A	T	C	T	T	C	T	G	T	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
2	T	A	T	C	T	T	C	G	G	T	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
3	T	A	T	C	T	T	C	G	A	C	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	T	A	T	C
4	C	A	T	C	T	T	C	T	A	T	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
5	C	A	T	A	T	C	T	G	A	T	C	C	G	C	A	A	G	T	G	G	A	A	A	G	G	C	T
6	C	C	T	C	T	T	C	T	A	T	C	C	G	C	T	A	G	A	G	T	G	A	G	G	A	C	T
7	T	A	T	C	T	T	C	G	G	T	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	G	G	G	A	C	T
8	C	A	T	C	T	T	C	G	G	T	G	G	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
9	T	A	T	C	G	T	C	G	A	C	C	C	G	C	T	A	G	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
10	T	A	C	C	T	T	C	T	G	T	C	C	A	T	T	A	A	T	G	T	G	A	G	G	A	C	T
11	C	A	T	C	T	T	C	G	G	T	C	C	G	T	T	C	A	T	T	T	G	A	G	G	A	C	T

アラインメント後、分析した 1369 サイトのうち、変異が確認できた 44 サイトを抜き出した。表の上の数字は塩基配列の順番を示し、横の数字は種に対応している。1-9 が *Fluitantes* 亜属、10-11 が *Isolepis* 亜属、太線で囲った部分は日本産とオーストラリア産ビャッコイの間で異なる塩基配列を示している。



*rbcL* 遺伝子の比較には 1369 サイトを用い、44 サイトで塩基置換が確認できた。日本産ビャッコイと *Fluitantes* 亜属 8 種を比較した結果、最も変異が少なかったのは、オーストラリア産ビャッコイの 2 サイトの置換であり、最大は *Isolepis inyangensis* の 17 サイトの置換であった (表 2)。また、日本産ビャッコイと *Isolepis* 亜属 2 種の比較では 2 種ともに 9 サイトの置換が確認できた。

ビャッコイ属 10 種の *trnL* intron 領域の比較には 647 サイトを用い、109 サイトで変異が確認できた。日本産ビャッコイと *Fluitantes* 亜属 8 種の比較で、最も変異が少なかったのはオーストラリア産ビャッコイの 2 サイトの置換であり、最大は *Isolepis graminoides* の 8 サイトの置換と 20 サイトの挿入欠失であった (表 3)。また、日本産ビャッコイと *Isolepis* 亜属 2 種の比較では *Isolepis cernua* の 17 サイトの置換と 33 サイトの挿入欠失、*Isolepis setacea* の 23 サイトの置換と 21 サイトの挿入欠失が確認できた。以上の結果から、日本産ビャッコイの *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域はオーストラリア産ビャッコイと最も相同性が高いことが明らかになった (表 4)。

Dhooge *et al.* (2003) は *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域を用いて、ボリビア産、チリ産、アルゼンチン産のカヤツリグサ科 *Zameioscirpus atacamensis* を比較している。その結果、*rbcL* 遺伝子に 1 サイトの置換、*trnL* intron 領域に 1 サイトの置換と 4 サイトの挿入欠失が存在することが報告されている。また、Senni *et al.* (2005) は *trnL* intron 領域を用いて、北海道から中部地方のスゲ属 3 種の比較を行っている。その結果、ミヤマアシボソスゲ 6 個

表 4. ビャッコイ属 10 種の間で異なる塩基の数

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	4 (2, 2)									
3	18 (6, 12)	18 (6, 12)								
4	21 (3, 18)	23 (5, 18)	31 (7, 24)							
5	37 (17, 20)	35 (15, 20)	45 (19, 26)	16 (14, 2)						
6	33 (5, 28)	35 (7, 28)	43 (9, 34)	13 (2, 11)	25 (16, 9)					
7	22 (7, 15)	20 (5, 15)	34 (11, 23)	27 (10, 17)	39 (20, 19)	39 (12, 27)				
8	19 (5, 14)	19 (5, 14)	29 (9, 20)	20 (6, 14)	34 (18, 16)	32 (8, 24)	19 (10, 9)			
9	18 (4, 14)	18 (4, 14)	26 (4, 22)	21 (5, 16)	35 (17, 18)	33 (7, 26)	18 (9, 9)	15 (7, 8)		
10	59 (9, 50)	61 (11, 50)	71 (15, 56)	62 (12, 50)	77 (25, 52)	74 (14, 60)	65 (16, 49)	60 (14, 46)	58 (13, 45)	
11	53 (9, 44)	53 (9, 44)	62 (13, 49)	60 (10, 50)	74 (22, 52)	72 (12, 60)	61 (14, 47)	54 (10, 44)	57 (11, 46)	67 (12, 55)

表中の数字は *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の種間で異なる塩基の数を示す。表の上と横の数字は表 2, 3 に示した種名に対応している。括弧内の数字はそれぞれ *rbcL* 遺伝子、*trnL* intron 領域の異なる塩基の数を示している。挿入欠失は回数ではなく、挿入欠失に含まれる塩基数を比較した。太線で囲った部分は日本産とオーストラリア産ビャッコイの間で異なる塩基の数を示している。

体の塩基配列は100%一致したが、イトキンスゲ8個体において4サイトの置換、イワスゲ10個体にも1サイトの置換と1サイトの挿入欠失が存在することが報告されている。このように、カヤツリグサ科では生育地が異なる場合、*rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域の塩基配列に多型がみられる可能性がある。したがって、日本産とオーストラリア産ビャッコイの *rbcL* 遺伝子と *trnL* intron 領域で確認できた4サイトの置換も同様に種内変異である可能性が高いと考えられる。

## (2) ビャッコイの分布

ビャッコイの分布域は日本、インドネシア、パプアニューギニア、オーストラリア、ニュージーランドであり、北半球唯一の生育地である日本と南半球の生育地は4500 km以上離れている。また、南半球の生育地は標高700-3900 mの山地の湿地や水辺である(Kern 1974, Muasya and Simpson 2002)。それに対して、日本では福島県白河市の不動清水と旧鈴木邸と呼ばれる2カ所の湧水池のみである。標高は約350 m、水温は年間を通して10-15°Cに保たれている(表郷村企画調整課1996)。このような地理的隔離と生育地の環境の違いから、北半球と南半球のビャッコイが別種である可能性を考えたが、今回の結果は同種とする現在の分類学的取り扱いと矛盾しないことがわかった。このことから、日本産ビャッコイの起源としては、もともと北半球に生育していた集団が遺存的に残った可能性と、鳥などによって運ばれた可能性の2つが考えられる。

## (3) 染色体の分析

ビャッコイ属で染色体数が明らかにされているものは *Isolepis setacea* の  $2n=26$ , 28 (Davies 1956, Mičičeta 1986),  $n=14$  (Hoshino *et al.* 2000), *Isolepis cernua* の  $2n=48$  (Tanaka 1942) と *Isolepis cernua* f. *cernua* の  $2n=54$  (Dopchiz and Poggio 1999) の2種1品種のみである。なお、両種については *Scirpus* のもとで染色体数が報告されている。すなわち、*Scirpus setaceus* では  $n=14$  (Galland 1988),  $2n=28$  (Galland 1988, Pignotti and Fiorini 1998), *Scirpus cernuus* として  $2n=31, 37, 60$  (Pignotti and Fiorini 1998) である。本研究では福島県白河市より採集したビャッコイ1株について染色体を調べた。その結果、ビャッコイの染色体数は  $2n=96$  であり、染色体の長さは0.5-1.4  $\mu\text{m}$  であった(図1D)。以上のことから、ビャッコイ属にも高次の染色体数が存在することがわかった。今後はオーストラリアのビャッコイおよび近縁種の核型とDNAを分析し、比較することにより、日本産ビャッコイの起源と著しい隔離分布の原因について明らかにできるものと考えられる。

本研究を行うにあたり、ビャッコイ採集許可の申請と調査でお世話になりました福島県教育委員会と生涯学習課社会教育主事の鈴木純氏に感謝いたします。

## 引用文献

- Davies, E. W. 1956. Some new chromosome numbers in the Cyperaceae. *Watsonia* 3: 242-243.  
 Dhooge, S., P. Goetghebeur and A. M. Muasya. 2003. *Zameioscirpus*, a new genus of Cyperaceae from south America. *Pl. Syst. Evol.* 243: 73-84.  
 Dopchiz, L. P. and L. Poggio. 1999. Meiosis and pollen grain development in *Isolepis cernua* f. *cernua* (Cyperaceae). *Caryologia* 52: 197-201.  
 Galland, N. 1988. Recherche sur l'origine de la flore orophile du Maroc étude caryologique et cytogéographique. *Trav. Inst. Sci. Univ. Mohammed V, Sér. Bot. (Rabat)* 35: 1-168.  
 Hoshino, T., K. R. Rajbhandari and H. Ohba. 2000. Cytological studies of eleven species of Cy-

- peraceae collected from central Nepal. *Cytologia* **65**: 219-224.
- Kern, J. H. 1974. Cyperaceae. *In* van Steenis, C. G. G. J. (ed.): *Flora Malesiana I* Volume 7, pp. 435-753. Noordhoff, Leyden.
- Koyama, T. 1958. Taxonomic study of the genus *Scirpus* Linné. *J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, Sect. 3, Bot.* **7**(4-6): 271-366.
- 小山鐵夫. 1964. カヤツリグサ科. 北村四郎・村田 源・小山鐵夫(編): 原色日本植物図鑑. 草本編 III, pp. 210-303. 保育社, 大阪.
- Makino, T. 1905. Observations on the flora of Japan. *Bot. Mag. Tokyo* **19**: 22-30.
- Mičieta, K. 1986. Karyological study of the Slovak flora XI. *Acta Fac. Rer. Nat. Univ. Comen., Ser. Bot.* **33**: 51-53.
- Muasya, A. M. and D. A. Simpson. 2002. A monograph of the genus *Isolepis* R. Br. (Cyperaceae). *Kew Bull.* **57**: 257-362.
- Muasya, A. M., D. A. Simpson, M. W. Chase and A. Culham. 2001. A phylogeny of *Isolepis* (Cyperaceae) inferred using plastid *rbcL* and *trnL-F* sequence data. *Syst. Bot.* **26**: 342-353.
- Olmstead, R. G., H. J. Michaels, K. M. Scott and J. D. Palmer. 1992. Monophyly of the Asterideae and the identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **79**: 249-265.
- 表郷村企画調整課 (監修). 1996. 県指定天然記念物ビャッコイ保護調査研究事業調査報告書.
- 大井次三郎. 1982. カヤツリグサ科. 佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・巨理俊次・富成忠夫(編): 日本の野生植物. 草本 I. 単子葉類, pp. 145-184. 平凡社, 東京.
- Pignotti, L. and G. Fiorini. 1998. Mediterranean chromosome number reports 8. *In* Kamari, G., Felder, F. and Garbari, F. (eds.): *Fl. Medit.* **8**: 214-221.
- Senni, K., N. Fujii, H. Takahashi, T. Sugawara and M. Wakabayashi. 2005. Intraspecific chloroplast DNA variations of the alpine plants in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* **56**: 265-275.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of the Chloroplast DNA. *Pl. Mol. Biol.* **17**: 1105-1109.
- Tanaka, N. 1942. Chromosome studies in Cyperaceae. XVI. Chromosome numbers in the genus *Scirpus*. *Med. Biol.* **2**: 91-95.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1994. *CLUSTAL W*: improving the sensitivity of Progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- 矢原徹一 (監修). 2003. ヤマケイ情報箱 レッドデータプランツ. 山と溪谷社, 東京.