

報告 (Report)

弁天池 (岐阜県可児市) のヒメコウホネ (広義)
Nuphar subintegerrima (Casp.) Makino *sensu lato* 地域個体群の
水上葉の形態的特徴と DNA 情報を用いた分類学的再考

南 基泰¹⁾・吉田桃子¹⁾・藤井太一¹⁾・森 高子¹⁾・村上哲生¹⁾

Taxonomic reconsideration of the local population of *Nuphar subintegerrima* (Casp.) Makino *sensu lato* in Benten-ike Reservoir, Kani City, Gifu Prefecture, Central Japan using the morphological characteristics of the emergent leaves and DNA information

Motoyasu MINAMI¹⁾, Momoko YOSHIDA¹⁾, Taichi FUJII¹⁾, Takako MORI¹⁾ and Tetuo MURAKAMI¹⁾

摘 要

2015年に絶滅した弁天池 (岐阜県可児市) のヒメコウホネ (広義) *Nuphar subintegerrima* (Casp.) Makino *sensu lato* (スイレン科 Nymphaeaceae) 個体群再生事業を、2017年から実施してきた。コウホネ属の形態には種内および種間で多様な変異があるため、本事業開始時点では本個体群を他のコウホネ属と明確に識別することができていなかった。そのため、これまでは本個体群を暫定的にヒメコウホネ (広義) としていた。本事業の学術的価値を保証するためには、保全対象種の正確な種名を同定しておく必要がある。そこで、本事業に関わる一般の人々でも容易に種同定可能な水上葉の形態的特徴を用いて、種同定を行った。本個体群の水上葉の葉身形は広卵形から狭卵形で、裏面にはわずかに毛が生え、サイコクヒメコウホネ *N. saikokuensis* Shiga et Kadono の葉身形の形態的特徴と一致した。また、葉身長と葉身幅についても、本個体群 (葉身長8.5~16.2 cm, 葉身幅8.0~11.9 cm) とサイコクヒメコウホネ (葉身長10~30 cm, 葉身幅7~20 cm) は重複していた。水上葉の形態的特徴から、本個体群をサイコクヒメコウホネと同定した。さらに、水上葉の形態による種同定結果の補完と他のコウホネ属との分子系統関係を明らかにするために、ヒメコウホネ (狭義) *N. subintegerrima sensu stricto*, サイコクヒメコウホネ, コウホネ *N. japonica* DC., オグラコウホネ *N. oguraensis* Miki を入手し、核 ITS および葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域を用いて分子系統学的解析も実施した。本個体群は、サイコクヒメコウホネと最も近縁となり、水上葉の形態的特性による種同定結果と一致した。かつて、サイコクヒメコウホネはヒメコウホネ (広義) として分類されてきたが、2015年に独立種になったことが報告されている。したがって、本事業が開始された2017年の段階で、本個体群はヒメコウホネ (広義) からサイコクヒメコウホネに修正されなくてはいけなかった。しかし、本事業に参加していた研究者の文献調査不足が原因で種名が修正されないまま2019年まで放置されてしまった。本事業に参加した研究者として、早い段階で本個体群の再同定を行い、常にコウホネ属に関連する情報収集を継続的に実施することの必要性を再認識した。さらに、事業終了後も保全対象生物の分類学的再考が可能なように、保全対象とした生物の写真や証拠標本を保管していくことも必要である。

キーワード：サイコクヒメコウホネ, ヒメコウホネ (広義), 弁天池 (岐阜県可児市), 分子系統学

¹⁾ 〒487-8501 愛知県春日井市松本町1200 中部大学応用生物学部 (南基泰 E-mail; minami@isc.chubu.ac.jp) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University, 1200 Matsumoto-cho, Kasugai City, Aichi Prefecture, 487-8501 Japan

Abstract

We conducted a regeneration project of a local population of *Nuphar subintegerrima* (Casp.) Makino *sensu lato* (Nymphaeaceae), which has been extinct since 2015, in the Benten-ike reservoir, Kani City, Gifu Prefecture, Central Japan, from 2017. The species name of the population had not been precisely identified, due to the inter- and intraspecific morphological variations within the genus *Nuphar*, and had been provisionally referred to as *N. subintegerrima sensu lato*. Identification of the exact species name of the population became necessary to enhance the academic value of the preservation project. The species were initially identified using morphological characteristics of the emergent leaves so that individuals engaged in the regeneration project can easily identify the species. The shape of emergent leaf blades of the population was widely ovate to narrowly ovate, and slightly pilose on the underside, which was consistent with those of *N. saikokuensis* Shiga et Kadono. In addition, the length and the width of emergent leaf blades of the population (length, 8.5 – 16.2 cm; width, 8.0 – 11.9 cm) and those of *N. saikokuensis* (length, 10 – 30 cm; width, 7 – 20 cm) overlapped. Identification from the morphological features of emergent leaves thus revealed that the population consists of *N. saikokuensis*. We then obtained samples of *N. subintegerrima sensu stricto*, *N. saikokuensis*, *N. japonica* DC., and *N. oguraensis* Miki, and determined the DNA sequences of the nuclear internal transcribed spacer (ITS) and chloroplast *trnL-trnF* intergenic spacer regions in order to enhance the morphological identification and to identify the species' molecular phylogenetic relation to other members of the genus. The population was found to be phylogenetically very closely related to *N. saikokuensis*, which was traditionally identified as *N. subintegerrima sensu lato*, but was defined as a new distinct species in 2015. At the start of the project in 2017, the species name should have been corrected from *N. subintegerrima sensu lato* to *N. saikokuensis*; however, due to the lack of background research, it was left uncorrected until 2019. Prior thorough background research on the genus *Nuphar* would have led to early re-identification of the species name of the population. In addition, it is necessary to keep photographs and voucher specimens of conserved organisms so that their classification can be reconsidered even after the project is over.

Key words: *Nuphar saikokuensis*, *Nuphar subintegerrima sensu lato*, Benten-ike Reservoir (Kani City, Gifu Prefecture, Central Japan), molecular phylogeny

(2020年2月14日受付；2020年4月8日受理)

はじめに

ヒメコウホネ (狭義) *Nuphar subintegerrima* (Casp.) Makino *sensu stricto* (スイレン科 Nymphaeaceae) は、東海地方に産する日本固有の水草である (志賀, 2015)。しかし、生育地の消失や生育環境の変化によって多くの個体群が衰退もしくは絶滅している (例えば, 名古屋市動植物実態調査検討会, 2004; 山岡, 2016)。岐阜県可児市東帷子薬王寺境内弁天池 (以降, 弁天池) にもヒメコウホネ (広義) *N. subintegerrima sensu lato* 個体群 (以降, 本個体群) が生育していたが、2015年に絶滅してしまった。幸にも本個体群の一部は、地元自然保護団体「鳩吹山を緑にする会」によって弁天池下の休耕田に移植されていた (以降, 休耕田に移植されていた個体群を休耕田個体群と称す)。そこで、2017年より、鳩吹山を緑にする会、可児市環境課、中部大学によって、休耕田個体群を用いて本個体群を再生する取り組みが行われている (村上ほか, 2018)。

本事業を開始した当初から、本個体群は鳩吹山を緑にする会によってヒメコウホネ (広義) と呼ばれていた。しか

し、著者らが入手できた最も古い記録の「可児の植物」(可児市教育委員会, 1998) には本個体群の種名は、コウホネ *N. japonica* DC. と記載されている。その後、どのような経緯があったかは不明だが、「可児市史第4巻自然編」(可児市, 2007) では本個体群の種名はヒメコウホネ (狭義, 広義については不明) と修正されている。このように種名が修正されたのは、コウホネ属は形態に多様な変異があり (角野, 1994), その変異も種を超えて連続するため (志賀・角野, 2005), 最初に誤同定されたことが原因と考えられる。ヒメコウホネ (狭義) は、Makino (1910) の原記載では長さ5~11 cm, 幅4.8~8.5 cm で円みのある水上葉を持つ小型の植物としている。しかし、西日本には葉身の長さが20 cm を超える個体や、コウホネとオグラコウホネ *N. oguraensis* Miki の中間の形態的特性をもつ個体が生育している (志賀・角野, 2005)。これらの個体は他に該当する分類群がないことから、ヒメコウホネ (狭義) に、これらの個体も含めてヒメコウホネ (広義) とされていた時期がある (志賀・角野, 2005)。その後、分類学的再考がされ、ヒメコウホネ (広義) に含まれていた中部から西日本に分布する広卵形から長楕円形の葉

形を持つものを、ヒメコウホネ（狭義）とは別種のサイコクヒメコウホネ *N. saikokuensis* Shiga et Kadono として独立させた（Shiga and Kadono, 2015；志賀，2015）。本個体群をヒメコウホネ（狭義，広義については不明）と記載している「可児市史第4巻自然編」（可児市，2007）が発刊された頃は、サイコクヒメコウホネはヒメコウホネ（広義）に含まれていた（志賀・角野，2005；Shiga and Kadono, 2015；志賀，2015）。このような分類学的問題点を認識していたが、本個体群を形態や DNA 情報に基づく再同定をしていなかったため、前報（村上ほか，2018）では本個体群をヒメコウホネ（広義）と表記した。

最新の植物分類体系 APGIII によると、日本国内に生育するコウホネ属植物は6種および数種の変種、雑種に分類されている（志賀，2015）。本事業の学術的価値を高めるためには、本個体群の正確な種名を同定しておく必要がある。コウホネ属は、水上葉の形態を比較することによって、植物学的専門知識を有しない一般の人々でも容易に種同定が可能である（志賀，2015）。そこで、休耕田個体群を水上葉の形態的特徴で再同定した（志賀，2015）。さらに、水上葉の形態による再同定結果の補完と他のコウホネ属との分子系統関係を明らかにするために、ヒメコウホネ（狭義）、サイコクヒメコウホネ、コウホネ、オグラコウホネを入手し、高等植物の分子系統学的解析に用いられることの多い核 ITS および葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域（例えば、Minami *et al.*, 2019）を用いて分子系統学的解析も行った。DNA 解析は、費用がかかり、実験施設が必要なため大学や研究機関に依存しなくてはいけなくなる。そのため、DNA 解析は、一般の人々によ

る自主独立的な自然保護活動に落とし込むことができない。しかし、水上葉の形態による再同定の補完だけでなく、本個体群の地域固有の遺伝的特性まで配慮した再生のためには遺伝的地域性についても明らかにしておく必要があると判断したため DNA 解析も実施した。

供試試料および方法

水上葉の形態学的特徴による種同定

水上葉の状態、葉身形、葉身サイズ（長さ、幅）の形態的特徴を用いて（表1）（志賀，2015）、休耕田個体群の種同定を行った。また、葉身形については、志賀（2015）と分子系統学的解析用サンプルとして各地より分与を受けたコウホネ属の水上葉も参考とした（表2，図1）。

分子系統学的解析

分子系統学的解析のために、各地で保存されてきたコウホネ属の新鮮な水上葉の分与を受けた（表2，図1）。分与された同属植物は、いずれも研究者によってすでに種同定され、自生地もしくは施設内で保存栽培されてきたヒメコウホネ（狭義）（岐阜県岐阜市達目洞）、サイコクヒメコウホネ（熊本大学薬学部附属薬用植物園）、コウホネ（昭和薬科大学附属薬用植物園、熊本大学薬学部附属薬用植物園）、オグラコウホネ（熊本大学薬学部附属薬用植物園）の4分類群である（表2）。以降、休耕田個体群はヒメコウホネ（広義，弁天池）と称し、分子系統学的解析に供試したサンプルの略記は表2に記載した。

表 1. ヒメコウホネ（広義，弁天池）とその他コウホネ属 4 分類群の水上葉の形態的特徴

Table 1. Morphological characteristics of emergent leaves in *Nuphar subintegerrima sensu lato* and other four *Nuphar* taxa

和名 (学名)	水上葉の状態	水上葉の葉身形	水上葉の葉身長 (cm)	水上葉の葉身幅 (cm)	水上葉の毛
Japanese name (Scientific name)	State of emergent leaves	Shape of emergent leaf blades	Length of emergent leaf blades (cm)	Width of emergent leaf blades (cm)	Emergent leaf hair
ヒメコウホネ (広義, 弁天池) ¹⁾ (<i>N. subintegerrima sensu lato</i>)	水面から抽出するか、浮葉となる emergent from water or floating on water surface	広卵形から狭卵形 widely ovate to narrowly ovate	8.5~16.2	8.0~11.9	裏面：わずかに毛 slightly pilose on the underside
ヒメコウホネ (狭義) ²⁾ (<i>N. subintegerrima sensu stricto</i>)	水面から抽出するか、浮葉となる emergent from water or floating on water surface	円形 roundish	4~17	4~15	記載無 undescribed
サイコクヒメコウホネ ²⁾ (<i>N. saikokuensis</i>)	水面から抽出するか、浮葉となる emergent from water or floating on water surface	広卵形から狭卵形 widely ovate to narrowly ovate	10~30	7~20	裏面：わずかに毛 slightly pilose on the underside
コウホネ ²⁾ (<i>N. japonica</i>)	水面から抽出するか、浮葉となる 浅い水深では、水面から鋭角に抽出 emergent from water or floating on water surface emergent at an acute angle from water surface in shallow waters	狭卵形から長楕円形 narrowly ovate to oblong	20~52	10~26	表面：無毛 裏面：若い時に少し毛 glabrous on the uppersurfaces slightly pilose on the underside during immature stages
オグラコウホネ ²⁾ (<i>N. oguraensis</i>)	ふつう水面に浮いて浮葉となる normally floating on water surface	広卵形 widely ovate	9~19	8~15	裏面：毛 pilose on the underside

1) ヒメコウホネ（広義，弁天池）の水上葉の形態的特性については、2019年7月18日に本研究調査地で開花していたヒメコウホネ（広義）20個体を観察、測定したデータを記載した。

2) ヒメコウホネ（狭義）、サイコクヒメコウホネ、コウホネ、オグラコウホネの水上葉の形態的特徴については、志賀（2015）より引用。

1) We collected a total of 20 flowering plants of *N. subintegerrima sensu lato* (July 18, 2019) at the study site and measured the morphological characteristics of emergent leaves.

2) The morphological characteristics of emergent leaves of *N. subintegerrima sensu stricto*, *N. saikokuensis*, *N. japonica*, and *N. oguraensis* are cited from Shiga (2015).

表 2. 分子系統学的解析に用いたコウホネ属5分類群の履歴

Table 2. The source of five *Nuphar* taxa used in molecular phylogenetic analysis

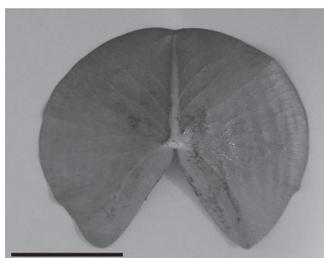
和名 (学名) Japanese name (Scientific name)	略記 ¹⁾ Abbreviation ¹⁾	履歴 Origin
ヒメコウホネ (広義) (<i>N. subintegerrima sensu lato</i>)	ヒメコウホネ (広義, 弁天池 -1, 2, 3) <i>N. subintegerrima sensu lato</i> (Benten-ike-1, 2, 3)	薬王院弁天池 (岐阜県可児市東帷子) 保全株 Cultivar, Benten-ike reservoir, Yakuo-in Temple, Higashikatabira, Kani City, Gifu Prefecture, Japan
ヒメコウホネ (狭義) (<i>N. subintegerrima sensu stricto</i>)	ヒメコウホネ (狭義, 達目洞 -1, 2, 3) <i>N. subintegerrima sensu stricto</i> (Dachibokubora-1, 2, 3)	達目洞ヒメコウホネ特別保全地区 (岐阜県岐阜市達目洞) 保全株 Native variety, <i>N. subintegerrima</i> Preservation Area, Dachibokubora, Gifu City, Gifu Prefecture, Japan
サイコクヒメコウホネ (<i>N. saikokuensis</i>)	サイコクヒメコウホネ (熊大 -1, 2, 3) <i>N. saikokuensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	熊本大学薬学部附属薬用植物園 (熊本県熊本市中央区大江本町) 保存株 Cultivar, Eco-Frontier Center of Medicinal Resources, School of Pharmacy, Kumamoto University, Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto City, Kumamoto Prefecture, Japan
コウホネ (<i>N. japonica</i>)	コウホネ (昭薬大 -1, 2, 3) <i>N. japonica</i> (Showa Pharm. Univ.-1, 2, 3)	昭和薬科大学附属薬用植物園 (東京都町田市東玉川学園) 保存株 Cultivar, Medicinal Plant Garden, Showa Pharmaceutical University, Higashi-Tamagawagakuen, Machida City, Tokyo, Japan
	コウホネ (熊大 -1, 2, 3) <i>N. japonica</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	熊本大学薬学部附属薬用植物園 (熊本県熊本市中央区大江本町) 保存株 Cultivar, Eco-Frontier Center of Medicinal Resources, School of Pharmacy, Kumamoto University, Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto City, Kumamoto Prefecture, Japan
オグラコウホネ (<i>N. oguraensis</i>)	オグラコウホネ (熊大 -1, 2, 3) <i>N. oguraensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	熊本大学薬学部附属薬用植物園 (熊本県熊本市中央区大江本町) 保存株 Cultivar, Eco-Frontier Center of Medicinal Resources, School of Pharmacy, Kumamoto University, Oe-honmachi, Chuo-ku, Kumamoto City, Kumamoto Prefecture, Japan

1) 各コウホネ属分類群より3サンプルについて、核 ITS、葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域の塩基配列を決定した。

1) A total of three samples in each *Nuphar* taxon were determined the DNA sequences of the nuclear ITS and chloroplast *trnL-trnF* intergenic spacer region.



ヒメコウホネ (広義, 弁天池)
N. subintegerrima sensu lato (Benten-ike)



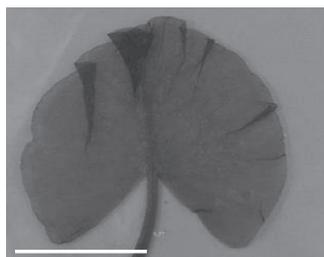
ヒメコウホネ (狭義, 達目洞)
N. subintegerrima sensu stricto (Dachibokubora)



サイコクヒメコウホネ (熊大)
N. saikokuensis (Kumamoto Univ.)



コウホネ (昭薬大)
N. japonica (Showa Pharm. Univ.)



オグラコウホネ (熊大)
N. oguraensis (Kumamoto Univ.)

図 1. ヒメコウホネ (広義, 弁天池) とその他コウホネ属 4 分類群の水上葉. 各コウホネ属植物の履歴については、表2を参照. 写真中の直線は3cm.

Fig.1. Emergent leaves of *Nuphar subintegerrima sensu lato* and other four *Nuphar* taxa. The source of each *Nuphar* taxon are shown in Table 2. The scale bars in the photo correspond to 3 cm.

ヒメコウホネ（広義，弁天池）および入手した同属植物4分類群の水上葉は，全DNA抽出まで -20°C で保存した。各分類群ともに異なる個体から採集された水上葉3サンプルずつを全DNA抽出用サンプルとした。各水上葉約30 mgを液体窒素下で粉碎し，DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて全DNAを抽出した後，GENECLEAN SPIN KIT (MP Biomedicals, CA, USA) を用いて精製した。精製した全DNAを鋳型として，PCR法による核ITSおよび葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域（以降，葉緑体 *trnL/F*）の増幅は TaKaRa Ex Taq (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan) のプロトコールに従った。核ITSおよび葉緑体 *trnL/F* を増幅することのできるユニバーサルプライマー（各プライマー最終濃度 $0.2\ \mu\text{M}$ ）を用い， $20\ \mu\text{l}$ のPCR反応液を調製した。核ITSは，Forwardプライマー： $5' -\text{GACGTCGCGAGAAGTTCATT}-3'$ ，Reverseプライマー： $5' -\text{GTAAGTTTCTCTTCTCCCGC}-3'$ (Long *et al.*, 2004)，葉緑体 *trnL/F* は Forwardプライマー： $5' -\text{CGAAATCGGTAGACGCTACG}-3'$ ，Reverseプライマー： $5' -\text{ATTTGAACTGGTGACACGAG}-3'$ (Taberlet *et al.*, 1991) を用いた。PCR反応はDNAサーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Beverly, MA, USA) を用いて，両領域共に熱変性 94°C ，2分を1回，熱変性 94°C ，15秒，アニーリング 60°C ，30秒，伸長反応 68°C ，1分を1サイクルとして30サイクル行い，最後に伸長反応 68°C ，7分を1回の条件で行った。PCR産物は2.0%アガロースゲル電気泳動 ($1\times\text{TBE}$ ， 100V ，30分間) で増幅を確認後，QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。DNAシーケンス反応はBigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い，核ITSはPCR増幅用プライマー，葉緑体 *trnL/F* はPCR増幅用のForwardプライマーおよび合成したシーケンス用プライマー (Forwardプライマー： $5' -\text{GGTTCAAGTCCCTCTATCCC}-3'$ ，Reverseプライマー： $5' -\text{GGGGATAGAGGGACTTGAAC}-3'$) を用いて，3500 Genetic Analyzer System (Applied Biosystems) のプロトコールに従いダイレクトシーケンス法で各領域の塩基配列を決定した。決定された両領域のDNA配列はDDBJ (DNA DATA BANK of JAPAN) に登録し，アクセッション番号を取得した (表3, 4)。決定された塩基配列はMEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) を用いてDNA多型を検出し，Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992) によって最尤系統樹を構築した (図2)。また，系統樹の信頼性は，500回繰り返しによるブートストラップ解析によって評価した。

結果および考察

ヒメコウホネ（広義，弁天池）の葉身形は広卵形から狭卵形で，文献 (志賀, 2015) に記載されているサイコクヒメコウホネの葉身形の特徴と一致し，葉身形が円形となるヒメコ

ウホネ（狭義）とは明らかに異なっていた (表1, 図1)。また，葉身長と葉身幅についても，ヒメコウホネ（広義，弁天池） (葉身長 $8.5\sim 16.2\ \text{cm}$ ，葉身幅 $8.0\sim 11.9\ \text{m}$) と，文献 (志賀, 2015) に記載されているサイコクヒメコウホネ (葉身長 $10\sim 30\ \text{cm}$ ，葉身幅 $7\sim 20\ \text{cm}$) と一致し，両分類群ともに葉裏面には，わずかに毛が生えていた。

ヒメコウホネ（広義，弁天池）と他のコウホネ属4分類群の核ITSは $788\sim 794\ \text{bp}$ のDNA配列が決定でき，塩基置換が8箇所，挿入または欠失が14箇所を確認された (表3)。ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）の核ITSは，コウホネ (昭葉大 -2) と一致した。しかし，ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -1, 2, 3） (DNA多型箇所：319番目)，サイコクヒメコウホネ (熊大 -1, 2, 3) (DNA多型箇所：512番目)，コウホネ (昭葉大 -1, 3，熊大 -1, 2, 3) (DNA多型箇所：749番目) およびオグラコウホネ (熊大 -1, 2, 3) (DNA多型箇所：99, 114, 162, 176, 241, 512, 519-526, 542-545, 581, 770番目) との間に，塩基置換，挿入または欠失が認められた。一方，葉緑体 *trnL/F* は $1,048\sim 1,059\ \text{bp}$ のDNA配列が決定でき，塩基置換が4箇所，挿入または欠失が24箇所を確認された (表4)。ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）は，ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -1），サイコクヒメコウホネ (熊大 -1, 2, 3) およびコウホネ (昭葉大 -1, 2, 3，熊大 -1, 2, 3) と一致した。しかし，ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -2, 3） (DNA多型箇所：303-305, 312-314, 347, 348-351, 352, 388, 407-412, 977番目) およびオグラコウホネ (熊大 -1, 2, 3) (DNA多型箇所：303-305, 347, 352, 373-378, 401, 920番目) との間に，塩基置換，挿入または欠失が認められた (表4)。このように異なる種であるにもかかわらず，核ITSと葉緑体 *trnL/F* に共通の配列が認められたのは，ヒメコウホネ（広義）はコウホネ，オグラコウホネ，ヒメコウホネ（狭義）の種間雑種を起源とする可能性があるという報告 (志賀・角野, 2005) を支持するものであった。特に，コウホネ (昭葉大 -2) は，核ITSと葉緑体 *trnL/F* 共にヒメコウホネ（広義，弁天池）と一致した。コウホネとヒメコウホネ（広義）は，両種の識別が困難な形態的に中間体があり (角野, 1994)，自然雑種と考えられる個体も報告されている (志賀・角野, 2005)。コウホネ (昭葉大 -1, 2, 3) は，1993年4月に東京都薬用植物園から昭和薬科大学附属薬用植物園に導入され，形態的特徴からコウホネとして保存栽培されてきた。しかし，コウホネ (昭葉大 -2) は核ITSと葉緑体 *trnL/F* 共にヒメコウホネ（広義，弁天池）と一致したことから，形態的に識別できなかったヒメコウホネ（広義），もしくは核ITSと葉緑体 *trnL/F* 共にヒメコウホネ（広義，弁天池）と一致する両種の自然雑種の可能性が考えられた。本研究のように，核DNAおよび葉緑体DNAを各一領域ずつ解析しただけでは，コウホネ (昭葉大 -2) が，形態的に識別できなかったヒメコウホネ（広義）なのか，自然雑種なのかを断定することはできない。そのため，この間

題を解決するためには解析領域を増やすか、もしくは次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が必要となってくる。

ヒメコウホネ（広義，弁天池）は核 ITS および葉緑体 *trnL/F* 共に集団内変異が認められなかった。しかし、同一個体群由来であっても、コウホネ（昭薬大）については、核 ITS で2つのハプロタイプが確認できたことから花粉親に少なくとも2系統（もしくは異なる2種）あることが明らかとなっ

た（表3）。また、ヒメコウホネ（狭義，達目洞）は、葉緑体 *trnL/F* で2つのハプロタイプが確認できたことから、種子親は少なくとも2系統（もしくは異なる2種）あることが明らかとなった（表4）。3株のみの解析だったため確信は持てないが、ヒメコウホネ（広義，弁天池）は核 ITS および葉緑体 *trnL/F* 共に集団内変異が認められなかったことから、最初に弁天池に導入された個体群が同一の遺伝的系統であったことを示唆

表3. ヒメコウホネ（広義，弁天池）とその他コウホネ属4分類群の核 ITS の DNA 多型比較

Table 3. Comparison of DNA polymorphisms in the Nuclear ITS region in *Nuphar subintegerrima sensu lato* and other four *Nuphar* taxa

略記 ¹⁾ Abbreviation ¹⁾	DDBJ アクセション番号 DDBJ accession no.	DNA 多型箇所 ²⁾ Nucleotide position ²⁾											
		99	114	162	176	241	319	512	519-526	542-545	581	749	770
ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3） <i>N. subintegerrima sensu lato</i> (Benten-ike-1, 2, 3)	LC512889	T	T	C	T	A	T	—	—	GTGG	—	G	G
ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -1） <i>N. subintegerrima sensu stricto</i> (Dachibokubora-1)	LC512891	*	*	*	*	*	C	—	—	*	—	*	*
ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -2, 3） <i>N. subintegerrima sensu stricto</i> (Dachibokubora-2, 3)	LC512892	*	*	*	*	*	C	—	—	*	—	*	*
サイコクヒメコウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. saikokuensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3.)	LC512890	*	*	*	*	*	*	C	—	*	—	*	*
コウホネ（昭薬大 -2） <i>N. japonica</i> (Showa Pharm. Univ.-2)	LC512894	*	*	*	*	*	*	—	—	*	—	*	*
コウホネ（昭薬大 -1, 3） <i>N. japonica</i> (Showa Pharm. Univ.-1, 3)	LC512895	*	*	*	*	*	*	—	—	*	—	A	*
コウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. japonica</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	LC512896	*	*	*	*	*	*	—	—	*	—	A	*
オグラコウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. oguraensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	LC512893	C	C	T	C	G	*	C	CACCC ACC	—	T	*	C

1) 略記は、表2を参照。 2) DNA 多型箇所は、PCR 増幅領域のプライマーを含まない5' 末端からの塩基数。表中の「—」は欠失、「*」は最上段のヒメコウホネ（広義，弁天池）と同一の塩基。

1) Details for the abbreviation are shown in Table 2. 2) Variation sites are shown as nucleotide positions from the 5' end of the PCR-amplified region without forward primer sequence. Dashes (-) denote alignment gaps. Asterisks (*) indicate nucleotides identical to those in the top row.

表4. ヒメコウホネ（広義，弁天池）とその他コウホネ属4分類群の葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域の DNA 多型比較

Table 4. Comparison of DNA polymorphisms in the Chloroplast *trnL-trnF* intergenic spacer region in *Nuphar subintegerrima sensu lato* and other four *Nuphar* taxa

略記 ¹⁾ Abbreviation ¹⁾	DDBJ アクセション番号 DDBJ accession no.	DNA 多型箇所 ²⁾ Nucleotide position ²⁾											
		303-305	312-314	347	348-351	352	373-378	388	401	407-412	920	977	
ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3） <i>N. subintegerrima sensu lato</i> (Benten-ike-1, 2, 3)	LC512897	—	—	A	TATT	A	ATATAT	A	A	—	G	T	
ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -1） <i>N. subintegerrima sensu stricto</i> (Dachibokubora-1)	LC512899	—	—	*	*	*	*	*	*	—	*	*	
ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -2, 3） <i>N. subintegerrima sensu stricto</i> (Dachibokubora-2, 3)	LC512900	TTA	ATA	—	—	—	*	T	*	TTATAT	*	C	
サイコクヒメコウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. saikokuensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	LC512898	—	—	*	*	*	*	*	*	—	*	*	
コウホネ（昭薬大 -2） <i>N. japonica</i> (Showa Pharm. Univ.-2)	LC512902	—	—	*	*	*	*	*	*	—	*	*	
コウホネ（昭薬大 -1, 3） <i>N. japonica</i> (Showa Pharm. Univ.-1, 3)	LC512903	—	—	*	*	*	*	*	*	—	*	*	
コウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. japonica</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	LC512904	—	—	*	*	*	*	*	*	—	*	*	
オグラコウホネ（熊大 -1, 2, 3） <i>N. oguraensis</i> (Kumamoto Univ.-1, 2, 3)	LC512901	TTA	—	—	*	—	—	*	T	—	T	*	

1) 略記は、表2を参照。 2) DNA 多型箇所は、PCR 増幅領域のプライマーを含まない5' 末端からの塩基数。表中の「—」は欠失、「*」は最上段のヒメコウホネ（広義，弁天池）と同一の塩基。

1) Details for the abbreviation are shown in Table 2. 2) Variation sites are shown as nucleotide positions from the 5' end of the PCR-amplified region without forward primer sequence. Dashes (-) denote alignment gaps. Asterisks (*) indicate nucleotides identical to those in the top row.

弁天池（岐阜県可児市）ヒメコウホネ（広義）地域個体群の分類学的再考

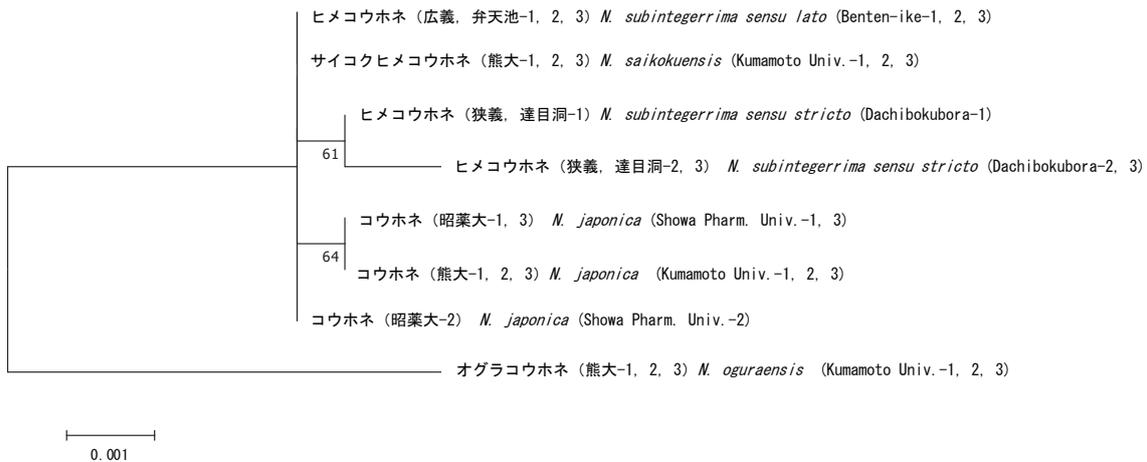


図 2. 核 ITS と葉緑体 *trnL-trnF* 遺伝子間領域によって構築されたコウホネ属5分類群の最尤系統樹。枝上の数字は500回のブートストラップ50%以上のもの。図中のスケールは塩基置換数を示す。各コウホネ属分類群の履歴および略記は、表2を参照。

Fig.2. Maximum-likelihood tree of the five *Nuphar* taxa based on the combined analysis of Nuclear ITS and Chloroplast *trnL-trnF* intergenic spacer regions. Numbers on the branches indicate the percentages of bootstrap probability based on 500 replicates; only values exceeding 50% are shown. The scale bar indicates 0.001 substitutions per site. Details for source and abbreviation of each *Nuphar* taxon are shown in Table 2.

する結果となった。今後は、ヒメコウホネ（広義，弁天池）の集団内変異の有無について、サンプル数を増やして解析していく予定である。

核 ITS と葉緑体 *trnL/F* の両 DNA 配列を合わせて、他のコウホネ属との間で最も DAN 多型が検出されたオグラコウホネ（熊大）をアウトグループとして最尤系統樹を構築した（図2）。ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）は、ヒメコウホネ（狭義，達目洞 -1, 2, 3）のクラスターには含まれなかった。また、ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）は、核 ITS および葉緑体 *trnL/F* 共にコウホネ（昭薬大 -2）と一致したが、その他のコウホネ（昭薬大 -1, 3，熊大 -1, 2, 3）によって形成されたクラスターには含まれなかった。そのため、形態的に識別できなかったヒメコウホネ（広義）もしくは自然雑種だった可能性のあるコウホネ（昭薬大 -2）を除くと、ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）はサイコクヒメコウホネ（熊大 -1, 2, 3）と最も近縁であった。したがって、水上葉による種同定と分子系統学的解析から、ヒメコウホネ（広義，弁天池 -1, 2, 3）はサイコクヒメコウホネと同定できた。

保全対象種の分類に関する提言

本個体群は、水上葉の形態的特徴（志賀，2015）および分子系統学的解析から東海地方固有のヒメコウホネ（狭義）ではなく、中部地方以西に広く分布するサイコクヒメコウホネと同定された。環境省レッドリスト2017（環境省，2017）ではヒメコウホネは絶滅危惧 II 類となっているが、サイコクヒメコウホネは記載されていない。しかし、他のコウホ

ネ属（オグラコウホネ，オゼコウホネ *N. pumila* (Timm) DC. var. *ozeensis* H. Hara，シモツケコウホネ *N. submersa* Shiga et Kadono，ネムロコホネ *N. pumila* (Timm) DC. var. *pumila*，ヒメコウホネ）は環境省レッドリスト2017（環境省，2017）に記載され、サイコクヒメコウホネは京都府（京都府自然環境課，2015）では絶滅危惧種に指定されている。保全活動を行っている「自分たちが保全対象としている生物は、地域固有の希少性の高いもの」と意識・無意識に期待してしまうことがある。確かに、保全対象種の地域固有性や希少性は、保全活動の理由づけ、活動のモチベーション維持につながるかもしれない。しかし、東海地方で情報公開されているサイコクヒメコウホネの保全は唯一本事業だけで、コウホネ属の生育地は急速に消失している。本事業において再生を試みている個体群が、東海地方固有ではなく、中部地方以西に広く分布するサイコクヒメコウホネであっても引き続き保全をしていくことは非常に意義深いことである。

かつて、サイコクヒメコウホネはヒメコウホネ（広義）として分類されてきたが（志賀・角野，2005），2015年に独立種になったことが報告されている（Shiga and Kadono，2015；志賀，2015）。したがって、本事業が開始された2017年の段階で、本個体群はヒメコウホネ（広義）からサイコクヒメコウホネに修正されなくてはいけなかった。しかし、本事業に参加していた研究者の文献調査不足が原因で種名が修正されないまま2019年まで放置されてしまった。本事業に参加した研究者として、早い段階で本個体群の再同定を行い、常にコウホネ属に関連する情報収集を継続的に実施することの必要性を再認識した。さらに、植田（1991）も提言しているよう

に、事業終了後も保全対象生物種の分類学的再考が可能なように、保全対象とした生物の写真や証拠標本を保管していくことも必要である。

謝 辞

本研究は、可児市の環境保全団体「環境パートナーシップ・可児」の活動の一環として行ったものである。会員諸氏および事務局を務められた可児市環境課のご理解とご協力に感謝致します。本研究は、「清流の国ぎふ森林・環境基金事業」の助成を受けた。岐阜市達目洞のヒメコウホネ（狭義）については、岐阜市の許可（岐阜市自自（貴）指令第2号、平成30年10月26日）を得て、岐阜市自然共生部自然環境課自然係立ち合いのもと採集した。熊本大学薬学部の杉村康司准教授からはコウホネ、サイコクヒメコウホネおよびオグラコウホネ、昭和薬科大学の高野昭人教授からはコウホネをご提供頂いた。以上の方々に深謝致します。

引用文献

- 角野康郎 (1994) : コウホネ属. 日本水草図鑑 : 112-116. 文一総合出版, 東京.
- 環境省 (2017) : 環境省レッドリスト2017. <http://www.env.go.jp/press/files/jp/105449.pdf>. 最終閲覧日2019年12月11日.
- 可児市 (編) (2007) : ヒメコウホネ. 可児市史第4巻自然編 : 192. 可児市, 可児.
- 可児市教育委員会 (編) (1998) : コウホネ. 可児の植物 (可児市の文化財第10集) : 19. 可児市教育委員会, 可児.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016): MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**:1870–1874.
- 京都府自然環境課 (2015) : 京都府レッドデータブック <https://www.pref.kyoto.jp/kankyo/rdb/bio/db/flo0232.html>. 最終閲覧日2019年12月11日.
- Long, C., N. Kakiuchi, A. Takahashi, K. Komatsu, S. Cai and M. Mikage (2004): Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China. *Planta Medica*, **70**: 1080–1084.
- Makino, T. (1910): Observations on the flora of Japan (continued from p.130). *The Botanical Magazine*, **24**: 137-147.
- Minami, M., M. Yasueda, T. Shirako, T. Murakami, T. Mori, T. Fujii, T. Atsumi, T. Shibata and Y. Kadota (2019): Ecological, phylogenetical, and pharmacognostical characteristics of *Aconitum kiyomiense* endemic to Hida highlands, Takayama city, Gifu Prefecture, Japan. *Journal of Natural Medicines*, **73**: 523-532.
- 村上哲生・三宅義信・岡崎敏広・南基泰 (2018) : 弁天池 (岐阜県・可児市) のヒメコウホネ (*Nuphar subintegerrima* (Casp.) Makino; Nymphaeaceae) 地域個体群の衰退と生育環境改善の試み. 陸の水, **80** : 1-9.
- 名古屋市動植物実態調査検討会 (監) (2004) : ヒメコウホネ. 名古屋市の絶滅の恐れのある野生生物レッドデータブック なごや2004—植物編— : 103. 名古屋市環境局環境都市推進部環境影響評価室, 名古屋.
- 志賀隆 (2015) : コウホネ属. 改訂新版日本の野生植物 1 ソテツ科〜カヤツリグサ科, 大橋広好・門田裕一・木原浩・邑田仁・米倉浩司 (編) : 46-48. 平凡社, 東京.
- 志賀隆・角野康郎 (2005) : ヒメコウホネ (広義) の分類と生育地の現状について. 分類, **5** : 113-122.
- Shiga, T. and Y. Kadono (2015) : *Nuphar saikokuensis* (Nymphaeaceae), a new species from central to western Japan. *The Journal of Japanese Botany*, **90**: 22-28.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet (1991): Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**:1105–1109.
- Tamura, K. (1992): Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, **9**: 678–687.
- 植田邦彦 (1991) : 学名と証拠標本の重要性. 雑草研究, **36** : 227-235.
- 山岡雅俊 (2016) : 犬山市のため池・農業用水路に生息する絶滅危惧種〜その現状と保護・保全に関わる課題〜. ため池の自然, **57** : 14-32.
- (担当編集委員 : 野崎健太郎, 椋山女学園大学教育学部)