

## 伊豆沼から新たに記録されたアカウキクサ属植物

横山 潤<sup>1\*</sup>・中井静子<sup>2</sup>・嶋田哲郎<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 山形大学理学部生物学科 〒990-8560 山形県山形市小白川町 1-4-12

TEL 023-628-4772 FAX 023-628-4625 e-mail jyokoyam@sci.kj.yamagata-u.ac.jp

<sup>2</sup> 日本大学生物資源科学部下田臨海実験所 〒415-0014 静岡県下田市須崎池の段 1237-1

<sup>3</sup> 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 〒989-5504 宮城県栗原市若柳字上畠岡敷味 17-2

\* 責任著者

キーワード: ITS 領域 アカウキクサ属 伊豆沼 交雑種 野生化

2010年1月25日受付 2010年2月16日受理

**要旨** アカウキクサ属(*Azolla*)は浮遊性の水生シダ植物で、日本には2種(アカウキクサ *A. imbricata* とオオアカウキクサ *A. japonica*)が知られている。近年、本属の外来種が国内で野生化していることが報告されているが、形態的な区別が難しいために見過ごされている。本報では、伊豆沼からこれまで記録のないアカウキクサ属(*Azolla*)植物を報告する。本植物は、2009年10月に伊豆沼の南岸で50×5 m程度の範囲に高密度に生育している状態ではじめて観察された。葉の表面に1細胞および2細胞の突起が混在すること、および核DNAリボソームRNA遺伝子のITS領域の塩基配列の比較から、*Azolla microphylla* Kaulf.×*A. filiculoides* Lam.であることが確認された。本交雑種は有性生殖を行なえないが、活発に栄養繁殖を行なうことから、定着すれば伊豆沼・内沼の生態系に何らかの影響を与えるかもしれない。今後の推移を継続して観察する必要がある。

### はじめに

アカウキクサ属(*Azolla* Lam.アカウキクサ科)は浮葉性の水生シダ植物で、国内には2種(アカウキクサ *A. imbricata* (Roxb. Ex Griff.) Nakai, オオアカウキクサ *A. japonica* Franch. et Sav.)が知られている(岩槻 1992, 角野 1994)。いずれの種も近年生育地が減少し、各地で絶滅が懸念される植物とされている(環境省自然保護局野生生物課 2000)。一方、外来種のアカウキクサ属植物の野生化も報告されており、外部形態での区別が難しいことから在来種と混同されている可能性も高い(Suzuki et al. 2005)。

東北地方には在来種として上記2種が分布し、宮城県はアカウキクサの北限、およびオオアカウキクサの太平洋側北限にあたる(宮城植物の会・宮城県植物誌編集委員会 2001)。いずれも県内での分布は

局限され、アカウキクサは山元町、オオアカウキクサは名取市から記録されているのみである。今回、伊豆沼でアカウキクサ属植物を発見したので、ここにその生育状況を報告する。伊豆沼ではこれまでアカウキクサ属植物の記録がなく(宮城県 1992, 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団 2006), 本報告が初記録となる。あわせて、分子データに基づいて伊豆沼産のアカウキクサ属植物の帰属についての解析を試みたので、その結果についても報告する。

## 方法

伊豆沼のアカウキクサ属植物は、2009年10月16日に横山・嶋田が伊豆沼・内沼で行なった野外調査の際に見いだされた。その際生育状況を確認した後、植物体を採集し、後の形態観察および分子データ解析のための試料とした。

採集した植物体からDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN社)を用いて全DNAを抽出し、得られたDNAをテンプレートにして、核DNA上のリボソームRNA遺伝子のinternal transcribed spacer (ITS)領域(ITS1, 5.8SrDNA, ITS2)を増幅した。増幅にはWhite et al. (1990) のプライマー(ITS5, ITS4)を用い、増幅のための反応液はDNA 100-200 ng, 各プライマー0.5  $\mu$ M, Ampdirect<sup>TM</sup> Plus PCRバッファ(島津製作所)25  $\mu$ L, NovaTaq<sup>TM</sup> DNAポリメラーゼ(島津製作所)0.5 ユニットを含む全量50  $\mu$ Lのスケールで調整した。増幅産物は1%アガロースゲルで電気泳動した後、目的の産物をゲルから切り出して、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN社)を用いて精製した。精製した増幅産物についてBigDye cycle sequencing ready reaction kit v3.1 (Applied Biosystems社)を用いてサイクルシークエンス反応を行なった後、ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems社)を用いて塩基配列の決定を行なった。

伊豆沼のアカウキクサ属植物の帰属を明らかにするために、得られた配列を既知のアカウキクサ属植物のITS領域(Reid et al. 2006)と比較した。日本DNAデータバンクのサイト(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)上で植物の塩基配列データdivisionに対してBLAST検索(Altschul et al. 1997)を行ない、どの配列と最も相同意が高いのかを調べた。

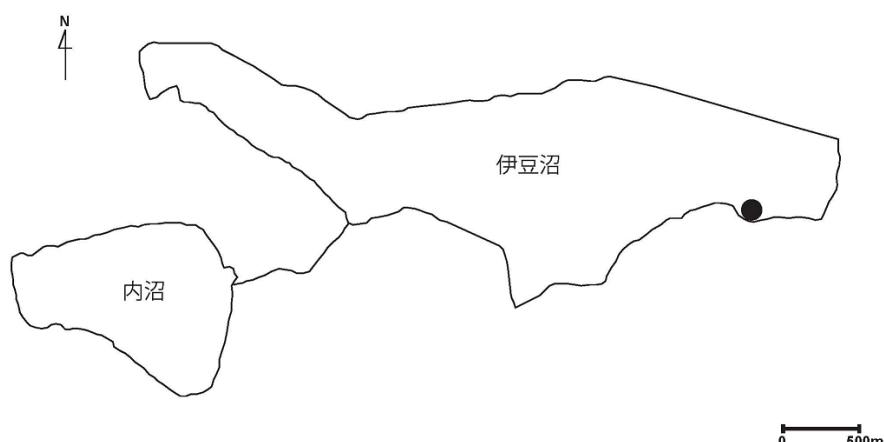


図1. アカウキクサ属植物の生育が確認された地点。

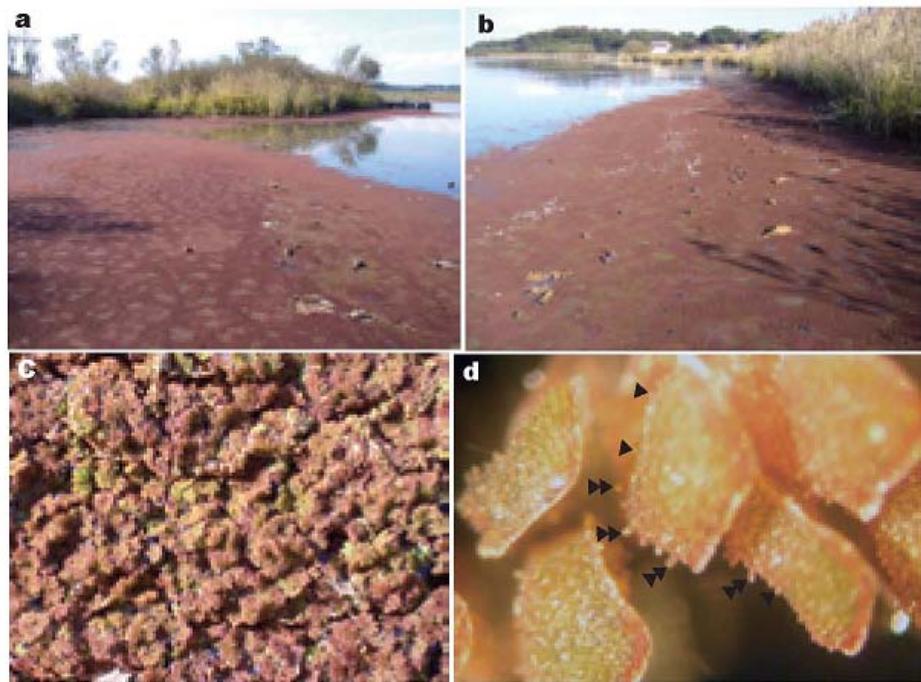


図2. 伊豆沼で発見されたアカウキクサ属植物の生育状況. a: 伊豆沼南岸の生育水域西側の状況, b: 同東側の状況, c: 水面に浮かんではいる植物体の状況, d: 葉の表面にある毛の状態, 矢印は1細胞の, 二重矢印は2細胞の毛を示す.

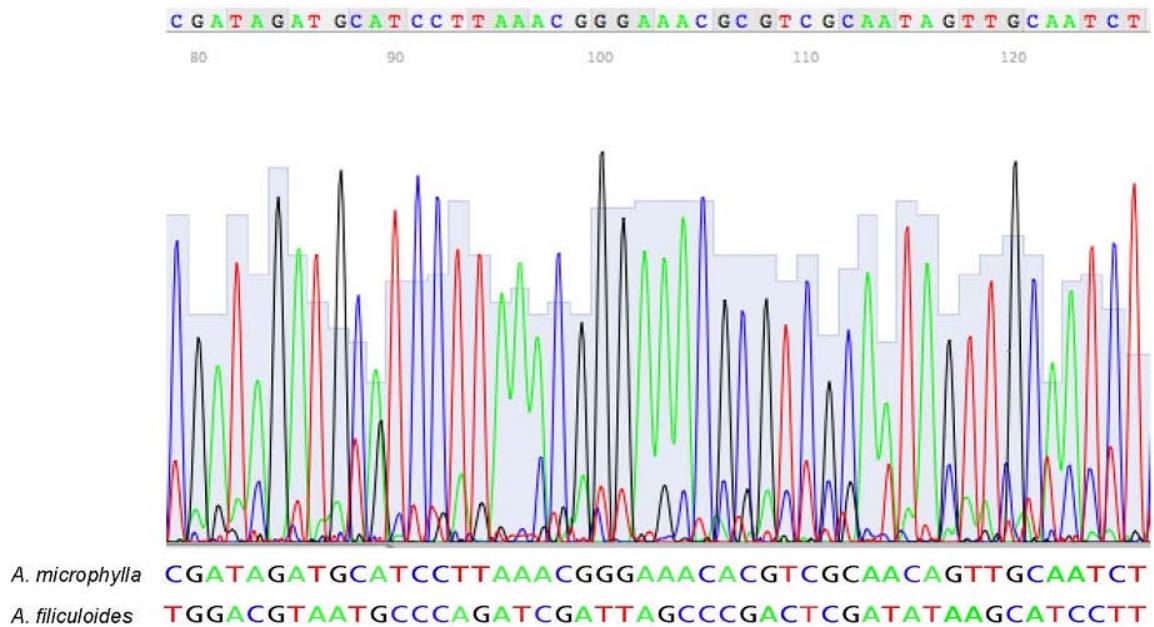


図3. 今回決定した伊豆沼産アカウキクサ属植物のITS2領域の配列の一部. ITS4プライマー側から読んでいるため, DNAデータバンク登録配列とは逆向きの相補鎖の配列となっている. 波形データ上部が今回決定した配列の解析結果そのものを, 下の2つの配列はそれぞれ対応する領域の *Azolla microphylla*, *A. filiculoides* の配列を示す. 波形データの主要なピークの方を読むと前者と, 低いピークの方を読むと後者と相同意が高いた. 波形データは 4Peaks ( Mekentosj.com, <http://mekentosj.com/science/4peaks/>)を用いて解析した.

## 結果と考察

アカウキクサ属植物は、伊豆沼南岸の旧迫町野鳥観察小屋付近に生育していた(図 1)。生育範囲は約 50×5 m におよび、この範囲では水面を完全に覆うように生育していた(図 2a-c)。得られたアカウキクサ属植物は、葉の表面に 1 細胞の毛と 2 細胞からなる毛が混生していることから、形態的には農業目的で利用されている *Azolla microphylla* Kaulf. × *A. filiculoides* Lam. であると考えられる(図 2d)。

伊豆沼のアカウキクサ属植物から、ITS1 領域、5.8SrRNA 遺伝子、ITS2 領域を含む合計 810 塩基対を決定した。決定した配列は、DDBJ/EMBL/GenBank 国際 DNA データベースにアクセスション番号 AB560967 として登録した。得られた配列と既知のアカウキクサ属植物の配列との間の相同性は、*A. microphylla*、*A. mexicana* との間で高く(94~95%)、最も相同性が高いと判断されたのは *A. microphylla*(voucher: Reid & Peters 70, アクセション番号:DQ066487)であった。また、伊豆沼のアカウキクサ属植物は、この 2 種に共通の ITS2 領域の 32 塩基対の欠失も共有していた。ただし、この欠失部位に近い ITS4 プライマー側からの配列決定データを見ると、低頻度ながら他の ITS 配列が混在していることがわかった(図 3)。主要な波形データに重なる低いピークを読むと、32 塩基対の欠失を持たない *A. filiculoides* の配列と最も相同性が高かった。このことから、形態から示された通り、伊豆沼から得られたアカウキクサ属植物は *Azolla microphylla* Kaulf. × *A. filiculoides* Lam. であると判断される。

このアカウキクサ属植物の交雑種の親種の一つである *A. microphylla* は、「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(外来生物法)」に定められる特定外来生物に指定されている(*Azolla cristata* Kaulf. (=*A. caroliniana* Willd., *A. mexicana* Schlecht. & Cham., *A. microphylla* Kaulf.))。しかし、この交雑種は外来生物法の規制を受けず、かつ国内の在来アカウキクサ属植物のようにすでにその地域に存在しているアカウキクサ属植物の分布や遺伝子の搅乱を引き起こす心配のない植物として、緑肥や家畜の餌などとして水田での多目的な利用が可能な有用植物として栽培されている(渡辺 2008)。有性生殖を行なう能力がなく、交雑によって在来種の遺伝子汚染を引き起こすこともないため、環境への負荷は小さいと考えられている。一方、近年このアカウキクサ属の交雑種が野外で生育している状況が報告されている(Suzuki et al. 2005, 渡辺 2008)。これらの在来生態系への影響は不明だが、栄養繁殖によって活発に増殖する性質をもつ植物であり、生育範囲が拡大すれば何らかの影響が生じる恐れは否定できない。特に伊豆沼南岸には個体数が激減した沈水植物の生育地があり、そこへの侵入には特に注意を払う必要があると考えられる。もともと伊豆沼・内沼のようにある程度の水深と面積のある比較的大きな水域に生育する植物ではないことと、冬期の低温に対しては耐性が弱いことを考慮すると、この水域で現在の個体群がどう推移するのかは分からぬが、今後も継続して観察を続ける必要がある外来植物であると考える。

## 謝辞

本研究の一部は、平成 20 年度および平成 21 年度沈水・抽水植物復元基礎調査(宮城県)の補助を受けていることを記して謝意を表します。

## 引用文献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- 岩槻邦男. 1992. 日本の野生植物 シダ. 平凡社, 東京.
- 角野康郎. 1994. 日本水草図鑑. 文一総合出版, 東京.
- 環境省自然保護局野生生物課. 2000. 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 植物 I(維管束植物). 財団法人自然環境研究センター, 東京.
- 宮城県. 1992. 伊豆沼・内沼環境保全対策に関する報告書. 伊豆沼・内沼環境保全対策検討委員会編, 宮城県.
- 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団. 2006. 伊豆沼・内沼環境調査及び研修会等企画運営業務報告書. 特定非営利活動法人あぐりねっと 21 編, 宮城県伊豆沼・内沼環境保全財団.
- 宮城植物の会・宮城県植物誌編集委員会. 2001. 宮城県植物目録 2000. 宮城植物の会・宮城県植物誌編集委員会.
- Reid, J. D., Plunkett, G. M. & Peters, G. A. 2006. Phylogenetic relationships in the heterosporous fern genus *Azolla* (Azollaceae) based on DNA sequence data from three noncoding sequence regions. *Int. J. Plant Sci.* 167: 529-538.
- Suzuki, T., Watanabe, I. & Shiraiwa, T. 2005. Allozyme types of water fern *Azolla japonica* and its relatives (Azollaceae) growing in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 56: 71-83.
- 渡辺 巖. 2008. アゾラについて. <http://www.asahi-net.or.jp/~it6i-wtnb/azolla.html>.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. et al. (Eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. pp. 315-322. Academic Press, San Diego.

Plants of genus *Azolla* (Azollaceae) newly recorded from Lake Izunuma

Jun Yokoyama<sup>1\*</sup>, Shizuko Nakai<sup>2</sup> & Tetsuo Shimada<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Yamagata University. 1-4-12 Kojirakawa, Yamagata-shi, Yamagata 990-8560, Japan. TEL 023-628-4772

FAX 023-628-4625 e-mail jyokoyam@sci.kj.yamagata-u.ac.jp

<sup>2</sup> Shimoda Marine Research Station, College of Bioresource Sciences, Nihon University. 1237-1 Susaki-Ikenodan, Shimoda, Shizuoka 415-0014, Japan.

<sup>3</sup> The Miyagi Prefectural Izunuma-Uchinuma Environmental Foundation. 17-2 Shikimi, Kamihataoka, Wakayanagi, Kurihara, Miyagi 989-5504, Japan.

\* Corresponding author

**Abstract** The genus *Azolla* (Azollaceae) is a floating water fern and two species, *A. imbricata* and *A. japonica*, are known from Japan. Recently, introduced species of the genus have been naturalized in Japan, but the difficulty of morphological characterization has made them overlooked. Here we report *Azolla* plants occurring in Lake Izunuma for the first time. *Azolla* plants were found on the southern coast of Lake Izunuma and covered an approximate 50×5 m area in high density. Morphological examination showed that the plants had both one-cell and two-cell leaf surface trichomes, and seemed to be a hybrid between *A. microphyllum* and *A. filiculoides*. Nucleotide sequence data of internal transcribed spacer (ITS) regions in nuclear rDNA showed a composite pattern of *A. microphyllum* and *A. filiculoides* sequences, also suggesting the hybrid nature of *Azolla* plants in Lake Izunuma. Although the hybrid is sterile, the fern's ability of active vegetative reproduction may have some impacts on native organisms and environments in Lake Izunuma-Uchinuma if stable populations are established. Further studies are warranted.

**Keywords:** ITS region, *Azolla*, Lake Izunuma, hybrid, naturalization

Received: January 5, 2010 / Accepted: February 16, 2010