

近畿地方の河川におけるバイカモの保全研究

要旨

1. はじめに
2. 近畿地方におけるバイカモの分布状況
3. バイカモの集団の遺伝的構造
4. 保全に向けた考察

謝辞

参考文献

京都大学 大学院人間・環境学研究科

瀬戸口浩彰

要旨

バイカモは我が国の清流を象徴する植物として知られる。近年は河川改修などで水辺環境が急激に変化しつつあり、日本の水草は大きな影響を受けているが、バイカモもまた生育地の消滅が報告されてきている。本研究では特に分布の南限に該当して生育地の減少が指摘される近畿地方のバイカモを対象に現在の分布状況を調査し、その遺伝学的情報を得ることで保全の必要性を確認した。まず、兵庫県、京都府、滋賀県の3府県で生育地を調査し、過去の分布と比較した。その結果、記録に残る17生育地のうち10ヶ所で生育を確認し、新たに2ヶ所の生育地を発見した。現在の生育を確認できなかった7地点では水質の悪化や河床のコンクリート化などが確認された。一方で現存の生育地の多くもコンクリートの河床であったが、土砂が堆積しており、バイカモが優占していることが確認できた。これは流入土砂中の埋土種子が寄与した可能性があるとともに、バイカモの攪乱に対して適応した生育特性を反映しているものと考察した。続いて、ISSRを用いてバイカモの遺伝的構造を解析した。その結果、集団内の遺伝的多様性は低く、集団間の遺伝的多様性は高いことが明らかになった。また、同一水系の上流と下流の集団の遺伝的構造を解析した結果、上下流での遺伝子交流や個体の移入は少なく、クローンの数も少ないことが分かった。これらは河川間の遺伝的交流がほとんどないこと、同一河川内においても集団間で種子や切れ藻の移動があまり寄与していないことを意味しており、集団内の繁殖には種子の寄与もあることを裏付ける結果であった。遺伝的多様性を維持する上では各地で生育する集団をそれぞれ保全する必要性が示唆され、現在生育が確認できなかった地点においても復元の可能性が示唆された。

1. はじめに

バイカモ類は北半球に広く分布する沈水植物であり、キンポウゲ科キンポウゲ属 *Ranunculus* L. (Ranunculaceae) の中で完全に水生生活に適応したバイカモ亜属 *Batrachium* に属する。バイカモ (ウメバチモ) *Ranunculus nipponicus* (Makino) Nakai var. *submersus* Hara は日本では北海道と本州の河川、水路、湧水池などに広く生息する。変種にヒルゼンバイカモ *R. nipponicus* (Makino) Nakai var. *okayamensis* Wiegleb とイチョウバイカモ *R. nipponicus* (Makino) Nakai var. *nipponicus* があり、形態の特異性と地理的まとまりから独立した変種とされているが (Wiegleb, 1988)、葉柄の長さ、葉身のサイズや形状といった外部形態は変異に富むため分類学的取り扱いには遺伝学的背景からの検討の余地があるとされる (角野, 1994)。また、日本産のバイカモ亜属はほとんどの種が日本固有種とされているが、アジア大陸の種との関係も再検討の必要が指摘されている (角野, 1994)。バイカモの生育環境については水温と水質の面で制約があることが示唆されており (原, 1947)、一年を通して水温が低く (20°C以下; 木村と國井, 1998) 透明度の高い水中でないと生育できない。このため生育地域の南限が近畿地方となっており、西限は鳥取県と広島県とされている (角野, 1994)。

近年清流域の環境悪化が懸念されており、西日本のバイカモ群落の衰退が各地で報告されている (レッドデータブック近畿研究会編著, 1995, 2001)。農薬や除草剤といった水質汚濁、河川の埋め立てや改修などの急速な水辺環境の変化が影響して多くの日本産水草の絶滅が危惧されており (角野, 私信)、バイカモ群落の衰退はその典型的な事例の一つである。

本研究ではバイカモの保全の必要性を探ることを目的とした。第 1 章ではバイカモの分布域の南限である近畿地方における現在の分布状況をし、過去の分布と比較することでバイカモ群落の推移を確認した。生育地の現状とバイカモ群落の推移の考察から、保全に関する知見の前提を確認することを目的とした。

また、保全を考える上では遺伝的多様性の維持が重要である。たとえ集団数や個体数が多くあろうとも遺伝的多様性が高いとは限らない。しかし、バイカモを初めとする水草については集団内・水系内・水系間の遺伝的構造はほとんど解明されていない。そこで、第 2 章では ISSR Inter-Simple sequence repeat を用いて群落内での遺伝的多様性の状態を 1 河川を例にして解析し、群落間の

遺伝的構造についても解析を行った。これによってバイカモの集団を維持管理
する上での留意すべき事項を考察した。

2. 近畿地方におけるバイカモの分布状況

2. 1 序論

日本の河川は急流であるために水草の生育環境としては適さない場所が多く、各地の河川に侵入した帰化植物を除けば、在来種が何種類も群生するような場所はごく一部に限られる。バイカモはその数少ない場所である湧水地に好んで生育する。形態的な変異が地域によって大きく出るバイカモの分類にはまだ研究の余地があり、生育特性について分かっていないことも多いが、バイカモの生育地は底質が砂質で年間を通して冷水の河川や湖沼であることは古くから知られており（原, 1947）、水温と水質の面での研究がなされている（國井と井上, 1997; 木村と國井, 1998）。また、バイカモは絶滅危惧種のハリヨの産卵場になることも知られており、その生育環境から清流を象徴する植物とされている。昨今の環境意識の高まりを受け、美しい環境を残すことを目的として、滋賀県醒井の地蔵川や兵庫県浜坂町の田君川では地元住民と行政が一体となってバイカモの保護活動を行っている。梅の花に似た白い小さな花を水面一面に咲かせる美しさとその水環境の美しさから、両地点とも花期にあたる 6~8 月には多くの観光客を呼び、バイカモが有用な観光資源となっている。一方で、バイカモは放置すると用水路を埋め尽くすほど繁茂して水路の水はけを妨げる原因となるため、水路に生育するバイカモはそれを直接利用する農家や養鱒経営者などによって定期的な刈り取りを受けていることが多い。

近年西日本のバイカモ群落の衰退が各地で報告されており（レッドデータブック近畿研究会編著, 1995, 2001）、清流域の環境悪化が懸念されている。農薬や除草剤といった水質汚濁、河川の埋め立てや改修などの急速な水辺環境の変化の影響で多くの日本産の水草の絶滅が危惧されており（角野, 私信）、バイカモ群落の衰退もその典型的事例の一つである。そこで本研究ではバイカモの保全の必要性を考えるために、どれだけ生息地が失われたかを含めて現状を知ることがを目的とした。調査範囲は分布の南限にあたる近畿地方の兵庫県、京都府、滋賀県の 3 府県とし、過去の分布データを標本で調べ、現在の分布を現地に赴いて確認した。そして、現在の自生地を地図上で明確にするとともに、各自生地の状況をまとめた。

2. 2 材料と方法

本研究では兵庫県、京都府、滋賀県の近畿 3 府県におけるバイカモの 2004 年現在での分布状況を京都大学総合博物館 (KYO)、大阪市立自然史博物館 (OSA)、兵庫県立人と自然の博物館 (HYO) の標本で調べた。さらに、神戸大学理学部の角野康郎教授と、現地住民からの聞き取りによる情報、web サイトの情報を加えて調査した。

バイカモは常緑で 15°C 前後の冷水を好み、透明度の高い河川、水路、湧水池に一年を通して生育している。葉柄は 0.5~2cm、葉身の全長は 3~7cm で、水位低下時には陸生形を作るが、この場合でも浮葉は作らない (角野、1994)。近畿 3 府県では水路、河川において局所的に小集団を形成して生育している。先に得た情報をもとに、4 月に 1 週間、5 月に 3 日間、7 月に 3 日間の計約 2 週間を使って現地に赴き、生育の有無を確認した。

2. 3 結果と考察

2. 3. 1 各地点の現状

標本庫のデータと現在の分布状況をTABLE 2 に示す。また、近畿 3 府県全体での地図上の分布をFig. 2-1 に示す。今回の調査では標本などでかつて生育が確認された場所 17 ヶ所のうち、7 ヶ所で生育を確認することができなかった。具体的には兵庫県の香住町、中町の 2 地点、京都府の東山区の 1 地点、滋賀県の余呉町、湖北町、安土町、野洲市 (旧野洲郡) の 4 地点、計 7 地点において現在での生育を確認することができなかった。これらの多くは河川や水路の護岸、水質の悪化による低い透明度、さらには水路への水の流入がないといった状況が見られた。一方で滋賀県の今津町と八日市市の 2 ヶ所で新たな生育地を確認した。

Table 2

Fig. 2-1

(1) 兵庫県

浜坂町にある田君川 (Fig. 2-2-a) は保護の成果から非常に大きな群落を形成していた (Fig. 2-3-a-1)。特にここのバイカモに特徴的だったのは陸生形をとるパッチが確認されたことである (Fig. 2-3-a-2)。今回調査した中で陸生形を形成していたバイカモはこの田君川の群落のみである。陸生形を作っている同じパッチで水中にある部分では水中葉を形成していた (Fig. 2-3-a-3)。

同じく浜坂町にある久斗川 (Fig. 2-2-a) でも、町役場の方の話によると 2003 年にはほとんど群落を確認できなかったということだが、今回の調査では多くのパッチを確認できた (Fig. 2-3-a-4)。バイカモはこの群落よりも上流では確認できず、途中に造られた小さな砂防ダムから伏流した川が地表に出てきたあたりから群落が現われだしていた。湧水地を好むというバイカモの特性をよく表しているといえる。

村岡町の大笹、和池 (Fig. 2-2-b) はそれぞれ山峡ランド (Fig. 2-3-b-1)、但馬高原植物園 (Fig. 2-3-b-2) に流れる水路に見かけられた。両水路ともコンクリートによる護岸はされていない。放置すると流れを埋め尽くしてしまうため、流域の住民が定期的な刈り取りを行っている。

日高町十戸 (Fig. 2-2-c) では豊富な湧水を利用した養鱒が古くから行われており、その水路にバイカモを見ることができる (Fig. 2-3-c)。ここでも下流の養鱒場に十分な水が行き渡るようにするために刈り取りが行われているということである。十戸では各養鱒場をつなぐ水路が細かく入り組んでいるが、流れが別れると突然バイカモが見られなくなって他の沈水植物が優占し、さらに下流ではバイカモの優占が見られる、といった状況を観察できた。水路の幅が狭いことから生育できるパッチが限られ、攪乱の度に起きた競争の結果だと推察される。

青垣町佐治川 (Fig. 2-2-d) のバイカモは大きな群落を形成していなかったことが大きな特徴である。川は護岸されていないが、久斗川と同様小さな砂防ダムで伏流しており、水が湧き出したところからバイカモの生育が見られる (Fig. 2-3-d)。ここで観察されたバイカモはほとんど側枝を出しておらず、15cm ほどしか伸びていないパッチが広がった状態であったことはこの群落において特徴的な点である。大きな集団を作らないバイカモも近畿以外では存在するが、ここの集団がそれに該当するのか、あるいは攪乱直後のパッチ形成の前段階にあったのかは分からない。

加美町清水 (Fig. 2-2-e) の集団は杉原川に流れ込む支流の、杉原川に合流するまでの部分で見つかった (Fig. 2-3-e-1)。大袋 (Fig. 2-2-e) はその下流にあたり、バイカモは杉原川からとった用水路の中で見つかった (Fig. 2-3-e-2)。大袋は農業用水路であることからやはり定期的な刈り取りを行っているが、バイカモが清流の象徴であることを意識して、ある程度の間隔を残して地上部のみを刈り取っているようにしている (地元住民による)。

神崎町新野 (Fig. 2-2-f) の群落も水田の横を流れる用水路の中にあつたが (Fig. 2-3-f)、刈り取り後であつたためか僅かに 15 パッチを確認するに留まつた。

(2) 滋賀県

滋賀県で最も多くの集団を確認できたのがマキノ町蛭口 (Fig. 2-2-g) の群落である。最上流部に湧水池があり、知内川に沿って約 4km ほど流れる水路に生育している。ここも水田の間を流れる水路であり、側壁と河床はコンクリートで覆われているが、幅が約 3m あり、土砂も流入していたことから大きな群落を形成できたのであろう (Fig. 2-3-g)。

今津町南新保 (Fig. 2-2-h) の群落は住宅街の間を縫う幅約 2m 水路に見つかった (Fig. 2-3-h)。パッチ数も非常に少なく、上流は用水路となっている。付近を流れる石田川や周辺の水路でもかつてバイカモが広く生育していた (地元住民による)。

醒井 (Fig. 2-2-i) の集団は、養鱒場 (Fig. 2-3-i-1) と地蔵川 (Fig. 2-3-i-2) の2つの地点があり、それぞれの群落のある地点より下流で合流している。やはりどちらも定期的な刈り取りがある。地蔵川では地域をあげて水環境の保全に取り組み、絶滅危惧種であるハリヨとともに積極的な保護が行われている。

能登川町垣見 (Fig. 2-2-j) の群落は住宅街の間を縫う幅約 30cm の水路に 10 パッチが見つかった。

八日市市建部北町 (Fig. 2-2-k) の群落は現在「河辺いきものの森」という公園内に流れる川に、僅かに 3 パッチだけが見つかった。公園管理者に確認したところ、公園ができた当時 (1998 年) からあつたとのことである。

2. 3. 2 全地点を通じた考察

生育地の減少にはバイカモの生育条件である水の透明度の低下や水温の上昇

などが考えられ、水田などでの農薬や除草剤の使用、河川の埋め立てなどの急速な環境変化が指摘されているが、今回調査した地域については、河川改修や上下水道の整備によって、河川や生活用水として利用していた水路の河床がコンクリート化したことが特に大きな原因であると考えられる。例えば滋賀県の琵琶湖の西岸は内湖を埋め立てて農地とした経緯から、伏流した地下水が下流で湧水となりやすい環境である。このため最近まで琵琶湖の西岸一帯には広くバイカモが分布していたという証言も得られた。それが近年の河川や水路の整備に伴い集団が減少していったようである。農家の方々も水路のコンクリート化後に姿を見なくなったと話していた。

一方で現在生育を確認した地点の多くもコンクリートで舗装された水路であった。兵庫県では日高町十戸、加美町大袋、大河内町新野、滋賀県ではマキノ町蛭口、今津町南新保、米原町醒井、能登川町垣見の生育地が舗装された水路となっていた。これらの生育地では水路の中に上流から土砂が流入して河床のコンクリートの上に堆積することによって生育に成功していた。特に砂の供給に関しては木村と國井（1998）によってその重要性が指摘されているが、上記の事例は、たとえコンクリートで被われた河川であっても河床に土砂があれば生育させることが可能であるということ、また、流入する土砂の埋土種子が地域固有集団を復元させる可能性をもつこと示唆するものかもしれない。このことはバイカモの保全を考える上で重要であり今後の研究が必要だろう。また、これらの水路は農業用水路、もしくは養鱒用水路として利用されているため全ての地点で定期的な清掃が行われており、バイカモについても例外なく刈り取りを受けていた。それにも関わらずバイカモが優占して生育する現状を鑑みると、バイカモにとってこのような攪乱を定期的に受けることが同所的に生育する他の種との競合に打ち勝つために必要な条件なのかもしれない。バイカモの同所的保全を考える上で生育条件の更なる研究が必要である。

Fig. 2-2-a

～□

Fig. 2-2-k

3. バイカモの遺伝的構造

3. 1 序論

バイカモは水中花と水上花を作り、どちらにおいても種子を形成することから、特に水中花の場合には自家受粉の可能性が高いと考えられている（角野，1994）。しかし、これらの交配様式は直接的な観察が行われておらず、また酵素多型解析などの遺伝的解析で検証もされていないため、推測としての記述にとどまっている、繁殖様式や種子散布様式についても同様に明らかにはなっておらず、切れ藻や分枝による栄養生殖と種子散布のどちらが主なのか、自家受粉と外交配のどちらが主なのか、種子は水流散布なのか、それとも動物散布もあるのか。このような疑問に対する明確な答えはない。また、河川に生育する水生植物の場合には、生育する水系内で遺伝子流動が起こりやすいと予想されるが、その様式、水の流れに沿って上流から下流に向けた方向性があるのかといったことについても不明である。さらに、これまでバイカモの集団間における遺伝的な交流についての知見も存在しない。保全を考える上で遺伝的多様性の維持は重要であり、バイカモの遺伝的構造を知ることはその保全を考える上で非常に有意義であると考えられる。

前章で報告したように、現在、特に近畿地方のバイカモ生育地は側壁と河床がコンクリートで被われた水路となっているところが多いにも関わらず、滋賀県マキノ町蛭口などの水路では多くの個体が観察された。しかし、完全に舗装された水路に生育する群落は土木工事の際に一旦は消失した可能性が高く、昔からそこに存在した群落とは遺伝的に異なる可能性が高いと考えられる。工事による大規模な攪乱からボトルネック効果が働き、遺伝的多様性が失われていると予想される。

そこで、本章では ISSR を遺伝マーカーとして集団解析を行った。ISSR は遺伝的多型を調べる上で非常に有用な手法であり、バイカモにおいても多くの情報が得られることが期待された。一方でバイカモを初めとする水草について、集団内・水系内・水系間の遺伝的構造はほとんど解明されていない。バイカモの集団を維持管理する上での留意すべき事項を考察するために、特に 1 河川を例にして群落の上流と下流の遺伝的関係を調べ、さらに近畿地方におけるバイカモの遺伝的構造について解析し、考察を行った。

3. 2 材料と方法

3. 2. 1 材料

バイカモの1河川内での遺伝的多様性を調べるにあたって滋賀県マキノ町蛭口の集団を対象にした。サンプルを上流集団と下流集団から採取し、比較のために近畿圏の他の地点から兵庫県と滋賀県のサンプルを10地点より採取して合計12集団を解析に用いた。今後は各地点で採取したものを1つの「集団」として扱った。

現在、バイカモの近畿での生育地は舗装された水路となっているところが多い。そこで1河川内での解析をするために、舗装された水路であるマキノ町蛭口のバイカモについて上流集団 (Hirukuchi up) 42 個体、下流集団 (Hirukuchi down) 39 個体を用いた。河川間での解析には蛭口のサンプルに、滋賀県醒ヶ井の養鱒場集団 (Samegai up) 4 個体、醒ヶ井の地蔵川集団 (Samegai down) 3 個体、兵庫県田君川集団 (Takimi) 4 個体、久斗川集団 (Kuto) 4 個体、大笹集団 (Ozasa) 3 個体、和池集団 (Tajima) 4 個体、十戸集団 (Jugo) 3 個体、佐治川集団 (Saji) 3 個体、大袋集団 (Obukuro) 4 個体、新野集団 (Nino) 4 個体を加えて合計 117 個体で解析を行った。1 パッチにつき十分に若いと思われる水中葉を 1 枚ずつ採取し、生葉のまま実験に用いた。

3. 2. 2 方法

(1) サンプルの洗浄

沈水植物であるバイカモには微小なプランクトンが付着している可能性があり、PCR 法による DNA の増幅に際してバイカモ以外の遺伝子を増幅してしまう危険性がある。今回の実験では DNA 抽出を行う前に、サンプルを流水中で綿棒を使って洗浄することで不純物を除去した。

(2) CTAB 法による DNA の抽出

採取した葉は液体窒素で凍結させ、すり潰して微粉末にした。この微粉末を HEPES (pH 8.0) で洗浄して多糖類を除去したのち (Setoguchi and Ohba, 1995)、CTAB を用いて Hasebe and Iwatsuki (1990) に従って DNA を抽出した。CTAB 溶液はクロロホルム-イソアミルアルコール混合液で洗浄してタンパ

ク質を除去した後、イソプロパノールを加えて DNA を沈殿させた。その後に減圧乾燥して回収した DNA を TE に溶解させ、Gean Clean II キット(Bio 101 Co., CA)を用いて精製した。

(3)DNA の濃度調整

ISSR を使った解析ではバンドの有無でデータを集めるが、DNA の濃度の差によってバンドの出方に偏りが出ないようにする必要があるので、分光光度計 Pharmacia GeneQuant (Pharmacia, North Peapack) でサンプルの DNA 濃度を計測して希釈し、10l / mg に統一した。

(4)PCR 法による DNA の増幅

(3)で得られた DNA 溶液 0.7l に対して、1 種類の 10pmol プライマー各 0.50l と dNTP Mixture (TaKaRa Ex taq, TaKaRa Bio., Kyoto) 4.0l、10X Ex Taq Buffer (TaKaRa Ex taq, Takara Bio, Kyoto)、DNA 合成酵素として TaKaRa Ex Taq (Takara Bio, Kyoto) 0.066l (33U) を加え反応液とした。PCR 増幅する領域は Takara PCR Thermal Cycler 480 (TaKaRa Bio., Kyoto, Japan) を用いて PCR 増幅した。PCR は、DNA の熱変性の行程を 94°C で 1 分、アニーリングを 42 - 58°C で 1 分、DNA 鎖の伸長を 72°C で 2 分とし、これを 1 サイクルとして計 45 - 50 サイクル行った。PCR 増幅の対象とする領域は予備実験においてジヌクレオチドモチーフとトリヌクレオチドモチーフ合計 71 プライマーで確認し (UBC primer set no. 9, Biotechnology Laboratory, University of British Columbia)、明瞭なバンドを検出することが出来た 9 つのプライマー (UBC nos. 809, 811, 813, 815, 823, 824, 834, 835, and 841) を ISSR 解析に用いた。

(5) 電気泳動による PCR 産物の確認

PCR 反応液は泳動用色素と混合し、2% アガロースゲルを用いて TAE 緩衝液中において電気泳動を行った。ゲルはエチジウムブロマイドで染色した後にトランスイルミネーターで紫外線光を照射して手動式ポラロイドカメラ (Funakoshi, Tokyo) で撮影し、バンドの有無で多型を確認した。

(6) 集団解析

バイカモの集団内、及び集団間の遺伝的多様性を確認するため、POPGENE 1.3.2 (Yeh, Yang, and Boyle, 1999) による解析を行った。評価した遺伝的多様性のパラメーターは、遺伝子座あたりの観察された対立遺伝子数の平均 (A_o)、対立遺伝子の有効数 (A_e)、多型をもつ遺伝子座の割合 (P)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E)である。種のレベルにおいては、Nei (1973) の遺伝子多様度統計を用いて全集団の遺伝的多様度 (H_T) を測った。また、遺伝的多様度をShanon指数でも計測した (Lewinton, 1972)。Shanon指数は、 P_i を与えられた ISSR のバンドの頻度として $H_0 = -P \log_2(P)$ で計算される。 H_0 は集団内平均多様度 (H_{pop}) と全多様度 (H_{sp}) の二つのレベルにおいて計算した。集団間の多様度の比は $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ で評価した。

また、全集団を通した個体間の系統関係を明らかにするために PAUP 4.0 (Swofford, 2003) を用いて UPGMA 法で系統樹を推定した。

分子分散解析 (AMOVA: Excoffer, Smouse, and Quattro, 1992) も行い、集団間の分化を調べるために固定指数 F_{ST} を計算した。解析には Arlequin 2.001 (Schneider, Rosseli, and Excoffer, 2001) を用い、無作為化検定を 5000 回行った。

3. 3 結果

選択した 9 つのプライマーを用いて 51 本のバンドを検出した。これらのバンドのうち、全 117 の個体間で 51 本中 35 本 (72.6%) が多型を示し、Hirukuchiの集団では 81 の個体間で 15 本 (29.4%) が多型を示した (TABLE 3-1)。TABLE 3-2 に示したように、ハーディ・ワインベルグ平衡の仮定の下で、集団内の平均遺伝子多様度 (H_E) は Hirukuchi up で 0.034、Hirukuchi down で 0.055、集団レベル (H_T) で 0.188 となった。Shanon 指数 (H_0) は 0.00 から 0.176 までの値をとり、集団レベル (H_{pop}) での平均値は 0.058 ± 0.050 、種内のレベル (H_{sp}) で 0.251 となった。Hirukuchi up (P : 15.7%, A_e : 1.052, H_E : 0.034, H_0 : 0.055) と Hirukuchi down (P : 25.5%, A_e : 1.083, H_E : 0.055, H_0 : 0.090)、この二つの集団をひとまとめにした Hirukuchi (P : 29.4%, A_e : 1.085, H_E : 0.056, H_0 : 0.094) のいずれの結果も種内レベル (P : 72.6%, A_e : 1.233, H_E : 0.154, H_0 : 0.251) と比べて非常に低い多様度を示した。

Table 3-1

Table 3-2

UPGMA の結果 (Fig. 3) では、滋賀県マキノ町蛭口の群落が遺伝的によくまとまった集団であり、近隣他集団とは遺伝的にも独立した集団であることが明らかになった。蛭口の群落内においても、上流と下流でのまとまりが見られた。また他集団についても、それぞれの集団の個体が地点ごとにある程度まとまる傾向があることが示された。

Fig. 3

AMOVA による解析は、Nei の遺伝的多様度統計とShanonの多様度評価から得られた遺伝的構造の根拠を強める結果となった。バイカモ 12 集団間の遺伝的相違は非常に明らかなものとなった ($P < 0.001$)。全体の遺伝的多様度の中で、77.4% が集団間の多様度に属し、残り (22.6%) が集団内に属することが分かり、集団間で非常に高い固定指数 ($F_{ST} = 0.774$) が示された (TABLE 3-3)。

Table 3-3

3. 4 考察

バイカモ類は種子による有性生殖と切れ藻や横走した茎による無性生殖が可能であるが、実際の増殖はほとんど無性生殖によるものとされている (國井と井上, 1997)。蛭口の集団は水路が完全に舗装されているため、河川改修工事以前に生育していた在来の個体群ではなく、工事によって一旦は消滅した後、上流から流入してきた土砂に含まれる切れ藻か埋土種子によるものと考えられる。そのため、水路内に集団を形成する過程でボトルネック効果が効いていることが想定されたため、集団内の遺伝的多様性はかなり低いものになるだろうと予測された。12 集団における解析の結果、Shanon 指数は $H_{SP} = 0.251$ に対し蛭口上流で $H_{POP} = 0.055$ 、蛭口下流で $H_{POP} = 0.090$ 、Nei のヘテロ接合度の期待

値は全体で $H_T=0.154$ に対し蛭口上流で $H_E=0.034$ 、蛭口下流で $H_E=0.055$ という値をとっている。蛭口の上流と下流をまとめた蛭口グループにおいても Shannon 指数 $H_0=0.094$ 、Nei のヘテロ接合度の期待値 $H_E=0.056$ という値となっている。この結果から近畿地方のバイカモ全体から見た蛭口の上流集団と下流集団では遺伝的多様性が非常に低く、蛭口全体で見ても非常に低く、現在の蛭口全体の群落形成にはボトルネック効果が強く影響しているといえる。

また、Fig.3 から蛭口の集団内では上流と下流でそれぞれクラスターを形成するものの、 F_{ST} は、近畿県全体では 0.774 という高い値をとるのに対し上流と下流の間では 0.386 (TABLE 3-3) という低い値をとることから、上流集団と下流集団の間に遺伝的交流がないとはいえない。だがヘテロ接合度の低さ ($H_E=0.034, 0.055$; TABLE 3-2) から花粉による交配は考えにくく、流水による種子散布の結果であるならば下流集団には上流集団の移入が Fig.3 においてもっと多く見られるはずである。よって、低い F_{ST} の原因は、現存する集団が形成される際に遺伝的多様性の低い親に由来する種子や切れ藻が源となった結果だと推測される。バイカモは多年草であり、上流と下流で最初に定着した個体群がそれぞれで集団サイズを大きくした結果、集団間での種子や切れ藻による移入が起きにくい環境が作られたのだろう。一方で、それぞれの個体を見る限り、特に下流ではクローンは少ない。それにもかかわらず上流と下流の各々で遺伝的まとまりが見られることは、種子散布が集団形成に影響している可能性を示唆するものなのかもしれない。ISSR は優性マーカーによって多型を検出しているために、自殖による純系化から、物理的には別クローンの個体を遺伝的に識別できていない可能性がある。よって、正確なクローンの同定にはアロザイムなどの共有性マーカーによる調査が必要になるが、蛭口のバイカモにおいては繁殖様式として無性生殖以外に定着範囲が非常に狭い種子散布を行っている可能性も示唆された。

一方で全集団の個体を通して見ると、ある程度集団ごとのまとまりが見られ (Fig. 3)、集団間の固定指数が $F_{ST}=0.774$ と比較的高い値をとったことから (TABLE 3-3)、集団間の遺伝的交流はほとんどないことが示唆される。近畿地方を琵琶湖水系、日本海水系、瀬戸内海水系にグループ化した結果、グループ間には明確な隔離は見られず、むしろグループ内の集団間で高い固定指数が見られたことから、河川間での集団の独立性を支持しているといえる。ただし、正確な結論を出すには各集団の個体数を増やし、各河川集団のグループ分けに

ついて更なる研究が必要となる。

バイカモと同じく沈水植物であるリュウノヒゲモ *Potamogeton pectinatus* の ISSR 研究からバルト海沿岸の集団間で $F_{ST}=0.496$ という値が出ており、この値と比べても今回のバイカモの固定指数は著しく高いといえる (King *et al.*, 2002)。リュウノヒゲモは果実が水鳥の餌となることが知られており、種子が水鳥によって散布される。水鳥の存在が集団間の遺伝的距離をなだらかなものにするのは Mader, Vierssen, and Schwenk (1998) によっても研究されており、集団間での遺伝構造に水鳥の影響が大きいことが示唆されている。一方でバイカモの集団間の遺伝的距離の隔たりは水鳥のような種子散布者が存在しないことを示唆するものなのかもしれない。ただし、リュウノヒゲモは水面媒による他家受粉を行うことから、主に自家受粉を行うと考えられるバイカモに比べて集団間での遺伝的距離が縮まりやすいとも考えられる。今後、その他の水草において集団間解析の研究例が増え、本知見との比較が可能になることが期待される。

遺伝的多様性の評価に関して ISSR とアロザイムや RAPD の結果を比較した研究は少ないが、それぞれの手法で同様の結果が出るとする研究もある (e.g., Ge *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004)。蛭口集団内でのバイカモにおいて $H_E=0.056$ となったことから、この点からも他殖の可能性の低さと動物散布の可能性の低さが示唆される (Hamrick, 1989)。ただし、この評価についても他の水草との比較が必要であるし、バイカモについても ISSR 以外の方法で実験を行うことで確認するべきであろう。

4. 保全に向けた考察

個体数減少を起こした生物を保全する際には遺伝的多様性を維持することが重要である（松田, 2002; 小池と松井, 2003）。今回の研究でバイカモは集団間の遺伝的な独立性が非常に強いことが明らかになった。これはバイカモの保全を考える上では集団内の個体数に目を奪われるのではなく、現在ある群落の維持を目指すべきだということを示している。特に、現在水路に生育しているバイカモにはボトルネック効果が強く影響している可能性が高く、今後のバイカモ群落の推移に注目する必要がある。

蛭口の集団が生育する水路に近接して流れる知内川においては、現在のところバイカモを発見することができなかった。過去にはこの地域に流れる知内川と生来川にはバイカモが生育していたとの報告もあるが、現在では両河川とも護岸工事を受けており、その姿を見ることはできなかった。蛭口の用水路内の群落の源が知内川にかつて分布していた集団の埋土種子に由来するものだとしたら、両河川で消滅したバイカモの復元の可能性もあるのかもしれない。同様の可能性が各地のバイカモが消滅した地域でも考えられる。バイカモの種子が埋土種子となる可能性については木村と國井（1998）によっても指摘されており、発芽条件等の研究が待たれる。

近畿地方においては、かつてバイカモが生育していた河川・水路のほとんどが改修工事によってコンクリート舗装されており、その後の生育の有無には土砂の流入が影響しているようである。これは、たとえ改修によってコンクリートで被われた河川であっても、河床に土砂があればバイカモが生育できる可能性があることを示唆している。一方でこのような水路にみられるバイカモがこのような環境下で永続的に生育可能であることは何ら証明されておらず、多くの水路ではコンクリート舗装後にバイカモの生育が見られなくなったと言う事実には注意すべきである。バイカモの保全には生育特性の更なる研究が必要であるが、その減少が水辺環境の悪化と大きく関係していることは確かであろう。

兵庫県浜坂町の田君川や、かつて消滅の危機まで指摘された滋賀県醒井の地藏川（角野, 1991）のように、バイカモの保全は成功した事例が既にあり、バイカモが観光資源ともなっている。従って、バイカモの保全は自然環境の視点だけでなく経済的効果においても生育地にとって有用であると言えるだろう。

本研究で明らかになった近畿地方の生育地は、そのほとんどが農地や住宅地、

養鱒場などの人間の生活域内に位置していた。従って、バイカモの保全にあたっては地域住民や自治体も加わった包括的な取り組みが効果的であると考えられる。用水路内で定期的に行われる除草作業に際しても、兵庫県加美町大袋における管理のように、草丈を短くするにとどめて個体全体を消失させない工夫も場所によっては必要であろう。近畿地方のバイカモ集団に遺伝的多様性を残すためには、個々の現存集団を残すことが最も有効で重要であることが明らかになった。そのため、現在バイカモが生育している地域においては、水辺環境を含む保全対策を講じ、現存集団を維持することが強く望まれる。生育特性の詳細が不明であるバイカモにおいては今後も数多くの研究が必要であり、古くからその存在が確認されている地域の集団は、これからも引き続き生育させることに注意しながらも有効に活用していくことが重要であろう。

謝辞

本研究においては多くの方々のご協力を頂きました。

本研究を開始するにあたりましては、神戸大学理学部生物学教室の角野康朗教授にデータや資料を多数提供していただきました。

京都大学総合博物館の永益英敏助教授、兵庫県立人と自然の博物館の秋山弘之研究員、大阪市立自然博物館の岡本素治主任研究員には収蔵標本の閲覧にあたって便宜を図って頂きました。

また、自生地調査にあたっては多くの地域住民や自治体関係者にお世話に以上のご協力・ご指導頂いた方々に心よりお礼申し上げます。

また末筆ながら、本研究を資金面から援助して頂きました河川環境管理財団にお礼申し上げます。

本研究は京都大学総合人間学部の古賀啓一君が卒業研究の一環として実施した内容を含むもので、今後同君によって大学院の研究課題としてさらに展開するとともに、バイカモが地域社会の中で良好な状態で維持されていくこと、ならびに絶滅した生育地における復元に貢献していくことを目指していく所存です。

参考文献

- 1) Excoffier L. Smouse P. E. and Quattro J. M. (1992) : Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondria DNA restriction sites, *Genetics*, 131, pp.479-491.
- 2) Ge., X. J. Yu Y. Zhao N. X. Chen H. S. and Qi W. Q. (2003) : Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae), *Biological Conservation*, 111, pp.427-434.
- 3) Hamrick, J. L. and Godt M. J. W. (1989) : Allozyme diversity in plant species. In: A. H. D. Brown., M. T. Clegg., A. L. Kahler, and B. S. Weir (eds.). *Plant population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. pp.43-63. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- 4) 原寛 (1947) : 日本産バイクワモの分類, *植物学雑誌*, 60, pp.77-82.
- 5) Hasebe M. and Iwatsuki K. (1990) : *Adiantum capillusveneris* chloroplast DNA clone bank: as useful heterologous probes in the systematics of the leptosporangiate ferns, *American Fern Journal*, 80, pp.20-25.
- 6) 角野康郎 (1991) : 滋賀県の水生植物, 滋賀県自然史編集委員 (編), 滋賀県自然誌総合学術調査研究報告, pp.1275-1294. 滋賀県自然保護財団, 滋賀県
- 7) ——— (1994) : 日本水草図鑑, pp.104-105. 文一総合出版, 東京.
- 8) 木村保夫・國井秀伸 (1998) : バイカモ (*Ranunculus nipponicus* var. *submersus*) とヒルゼンバイカモ (*R. nipponicus* var. *okayamensis*) のシュートの形態と成長特性の比較, *日本生態学会誌*, 48, pp.257-264.
- 9) King R. A. Gornall R. J. Preston C. D. and Croft J. M. (2002) : Population differentiation of *Potamogeton pectinatus* in the Baltic Sea with reference to waterfowl dispersal, *Molecular Ecology*, 11, pp.1947-1956.
- 10) 國井秀伸・井上功一 (1997) : バイカモの成長と光合成, *水草研究会報*, 61, pp.1-11.
- 11) 小池裕子・松井正文 (2003) : 生物多様性と保全遺伝学, 小池裕子・松井正文 (編), *保全遺伝学*, pp.3-18. 東京大学出版, 東京.
- 12) Lewinton R.R. (1972) : The apportionment of human diversity.

- Evolutionary Biology, 6, pp.381-398.
- 13) Mader E., W. van Vierssen, and Schwenk K. (1998) : Clonal diversity in the submerged macrophyte *Potamogeton pectinatus* L. inferred from nuclear and cytoplasmic variation, *Aquatic Botany*, 62, pp.147-160.
 - 14) 松田裕之 (2002) : 野生生物を救う科学的思考とは何か?, 矢原徹一・川窪伸光 (編), 保全と復元の生物学, pp.19-36. 文一総合出版, 東京.
 - 15) Nei M. (1973) : Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 70, pp.3321-3323.
 - 16) Qiu Y. X., Hong D. Y. Fu C. X. and Cameron K. M. (2004) : Genetic variation in the endangered and endemic species *Changium smyrnioides* (Apiaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, pp.583-596.
 - 17) レッドデータブック近畿研究会編著 (1995) : 近畿地方の保護上重要な植物—レッドデータブック近畿—, pp.20. 関西自然保護機構.
 - 18) ————— (2001) : 改訂・近畿地方の保護上重要な植物—レッドデータブック近畿 2001 —, pp.20. 財団法人平岡環境科学研究所.
 - 19) Schneider S. Roessli D. and Excoffier L. (2001) : Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.001. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
 - 20) Setoguchi H. and Ohba H. (1995) : Phylogenetic relationships in *Crossostylis* (Rhizophoraceae) inferred from restriction site variation of chloroplast DNA, *Journal of Plant Research*, 108, pp.87-92.
 - 21) Swofford, D. L. (2003) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
 - 21) Wiegand G. (1988) : Notes on Japanese *Ranunculus* subgenus *Batrachium*, *Acta Phytotaxonomica Geobotanica*, 39, pp.117-132.
 - 22) Yeh F.C. Yang R. and Boyle T. (1999) POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Release 1.32. University of Alberta, Edmonton.

Table 2. 近畿三府県におけるバイカモの分布状況

No.	Locality	Voucher	Collection date	Presence	Number of individuals
Hyogo Pref.					
1	Takimi Riv., Hamasaka-cho, M kata-gun	Y. Kadono 7234 (HYO)	1991/9/26	○	>100
2	Kuto Riv., Hrasaka-cho, M kata-gun	Y. Gjimoto, and S. Fujimoto 2611	1994/6/17	○	>100
3	Sadu, Kasumi-cho, Kinasaki-gun	S. Hosomi 14461 (HYO)	1974/9/17	×	
4	Ozasa & Wachi, Muraoka-cho M kata-gun	G. Murata 20902 (KYO)	1970/5/31	○	10~30
5	Jugo, Hidaka-cho, Kinasaki-gun	T. Fujii 6944 (OSA)	1996/10/5	○	>100
6	Saji Riv., Aogaki-cho, Hikami-gun	T. Fujii 10048 (OSA)	1998/8/12	○	40
7	Obukuro & Shimizu, Kami-cho, Taka-gun	G. Nakai 3565 (KYO)	1947/8/11	○	20~50
8	Nino, Okochi-cho, Kanzaki-gun	M. Yauchi 25030 (OSA)	1996/8/13	○	15
9	Naka-cho Taka-gun	Y. Kadono 6672-KOBE(6) (KYO)	1990/5/27	×	
Kyoto Pref.					
10	Oyake, Yamashina, Higashiyama-ku, Kyoto-shi	H. Yamamoto 2290 (KYO)	1933/4/15	×	
Shiga Pref.					
11	Makinouchi, Takashimagun	T. Uehara 7650 (OSA)	1998/5/19	○	>200
12	Maminoshino, Imadu-cho			△	5
13	Yogoriv., Yogo-cho	Y. Kadono 7055 (KYO)	1991/7/25	×	
14	Tsunosato, Kohokucho	K. Seto 15008 (OSA)	1965/6/23	×	
15	Samegai, Maibara-cho, Sakata-gun	T. Fujii 11095 (HYO)	1999/5/31	○	10~30
16	Kakimi, Notogawa-cho			○	10
17	Kawabei-kinononori, Takebekitamaichi, Yokai-chi-shi			△	3
18	Aduchi-cho			×	
19	Mamiyama, Yasugun	K. Yamaguchi 136 (OSA)	1953/5/25	×	

No. and symbols correspond to those in Fig. 1. ○, present; ×, absent; △, new record

Table 3-1. バイカモ 117 個体に対して使用した SSR プライマー

Primer name	Sequence 5' to 3'	No. of bands scored	No. of polymorphic bands (all)	No. of polymorphic bands (Hirukuchi)
809	(AG)8G	5	3	1
811	(GA)8C	2	0	0
813	(CT)8T	4	1	0
815	(CT)8G	12	10	5
823	(TC)8C	5	2	0
824	(TC)8G	4	4	1
834	(AG)8YT	8	7	7
835	(AG)8YC	8	7	1
841	(GA)8YC	3	3	0
Total		51	37	15

Table 3-2. バイカモのISSRによる集団内、集団間の遺伝的多様性の解析

Population	Sample size (N)	A_o	A_e	H_E	H_o	P (%)
Hirukuchi up	42	1.157 (0.367)	1.052 (0.172)	0.034 (0.100)	0.055 (0.151)	15.7
Hirukuchi down	39	1.254 (0.440)	1.083 (0.205)	0.055 (0.120)	0.090 (0.183)	25.5
Samegai up	4	1.098 (0.300)	1.061 (0.195)	0.037 (0.116)	0.055 (0.171)	9.8
Samegai down	3	1.059 (0.238)	1.046 (0.195)	0.025 (0.103)	0.036 (0.148)	5.9
Takimi	4	1.020 (1.400)	1.014 (0.099)	0.008 (0.058)	0.012 (0.085)	2.0
Kuto	4	1.118 (0.325)	1.065 (0.203)	0.040 (0.116)	0.061 (0.173)	11.8
Ozasa	3	1.000 (0.000)	1.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.0
Tajima	4	1.196 (0.401)	1.118 (0.270)	0.070 (0.152)	0.105 (0.223)	19.6
Jugo	3	1.294 (0.460)	1.219 (0.370)	0.121 (0.197)	0.176 (0.281)	29.4
Saji	3	1.000 (0.000)	1.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.000 (0.000)	0.0
Obukuro	4	1.137 (0.348)	1.071 (0.205)	0.044 (0.119)	0.068 (0.179)	13.7
Nino	4	1.078 (0.272)	1.045 (0.178)	0.027 (0.099)	0.041 (0.146)	7.8
Hirukuchi	81	1.294 (0.460)	1.085 (0.208)	0.056 (0.120)	0.094 (0.182)	29.4
All populations	117	1.726 (0.451)	1.233 (0.281)	0.154 (0.159)	0.251 (0.230)	72.6

Table 3-3. バイカモのISSRマーカーを用いたAMOVAによる解析

Grouping	Source of variations	d. f.	SSD	Variance component	% Total	Fixation index	P-value
All populations	Among populations	10	315.6	5.031	77.36	$F_{ST}=0.774$	<0.001
	Within populations	106	156.1	1.472	22.64		
Hirukuchi region (Hirukuchi up) vs. (Hirukuchi down)	Among populations	1	29.1	0.692	38.65	$F_{ST}=0.386$	<0.001
	Within populations	79	86.8	1.098	61.35		
Kinki region (Biwako region) vs. (Nihonkai region) vs. (Setonaikai region)	Among groups	2	160.3	1.151	17.05	$F_{ST}=0.171$	=0.455
	Among populations within groups	8	155.2	4.126	61.14	$F_{SC}=0.737$	<0.001
	Within populations	106	156.1	1.472	21.81	$F_{CT}=0.782$	<0.001

Biwako region, (Hirukuchi up, Hirukuchi down, Samegai up, Samegai down); Nihonkai region, (Takimi, Kuto, Ozasa, Tajima, Jugo); Setonaikai region, (Saji, Obukuro, Nino)

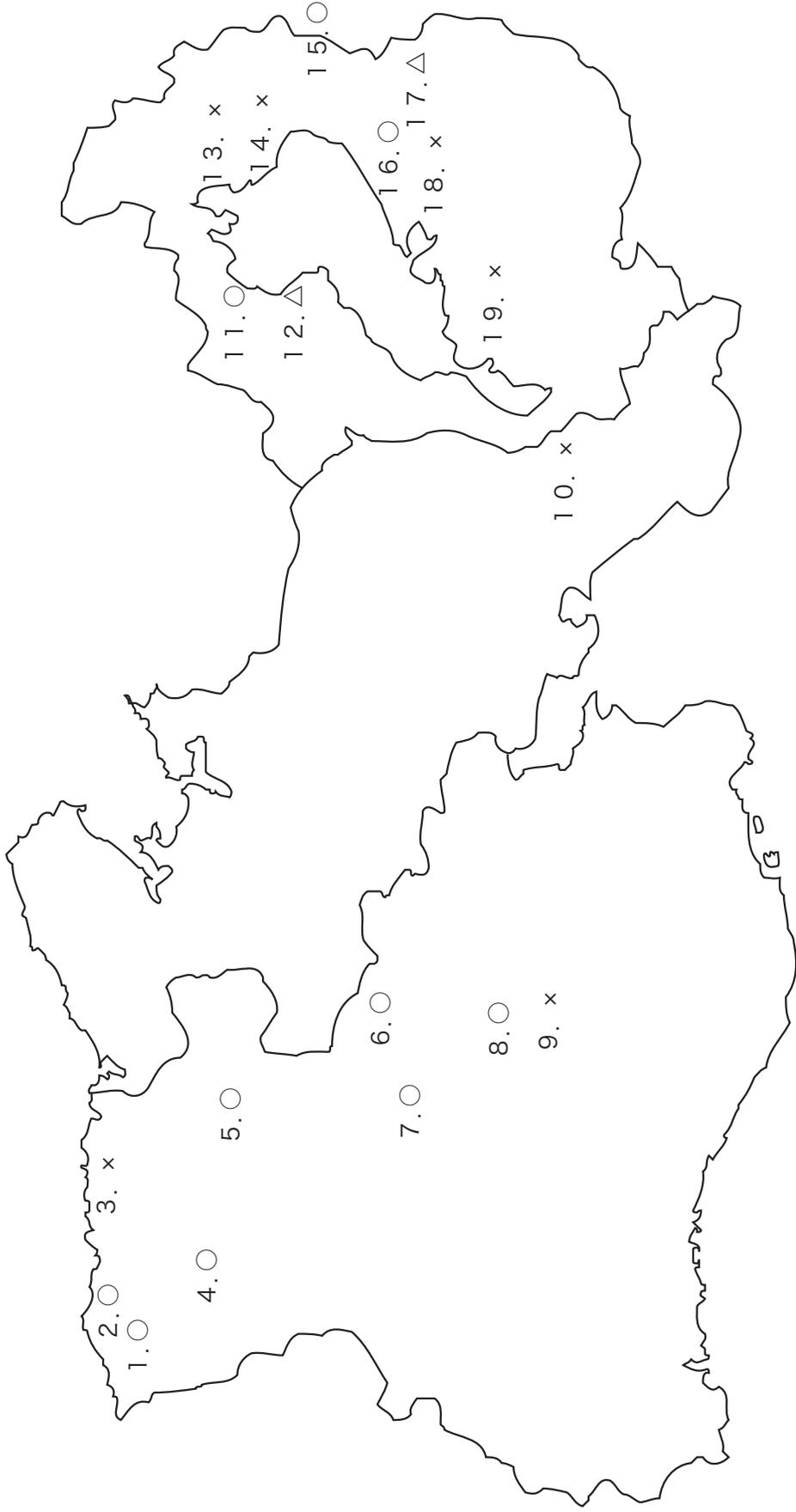


Fig. 2-1

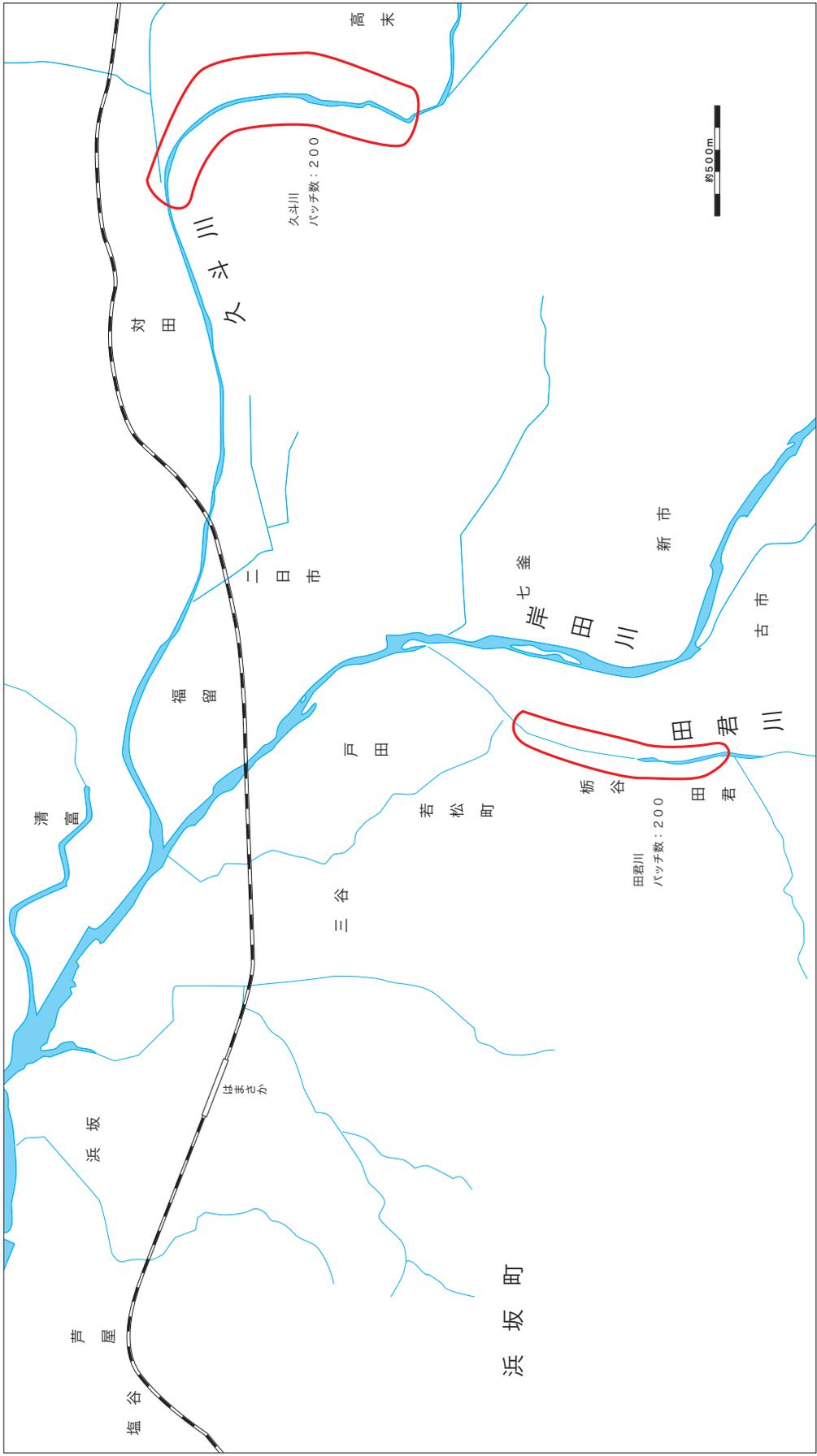


Fig. 2-2-a

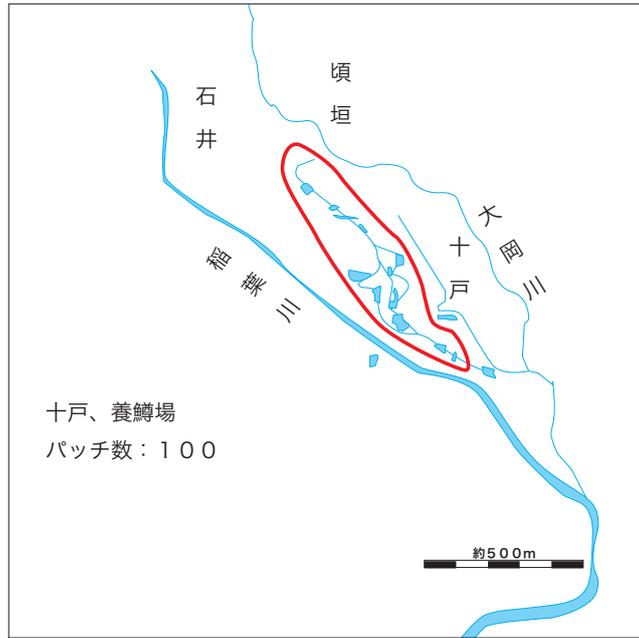


Fig. 2-2-c



Fig. 2-2-d

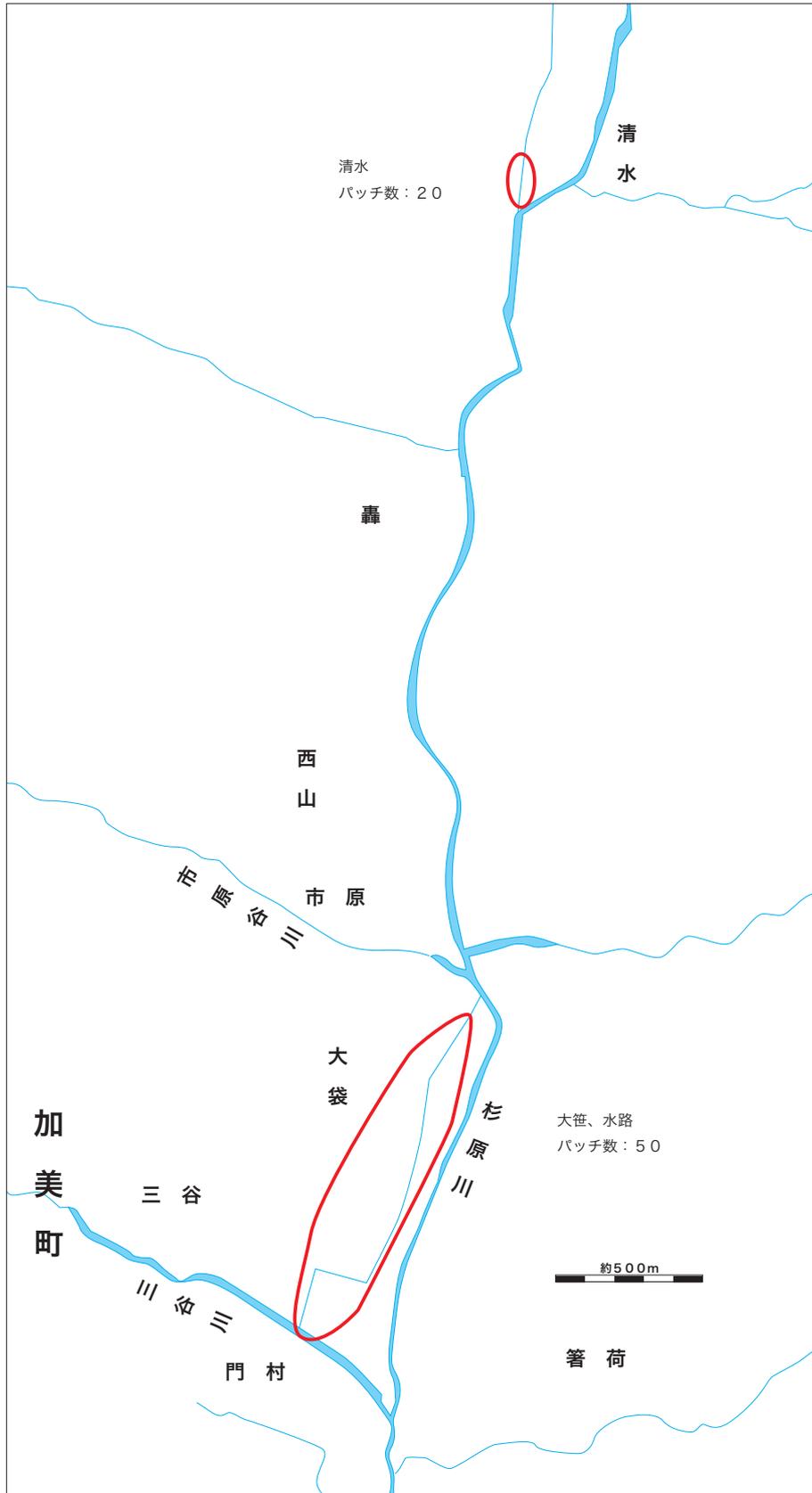


Fig. 2-2-e

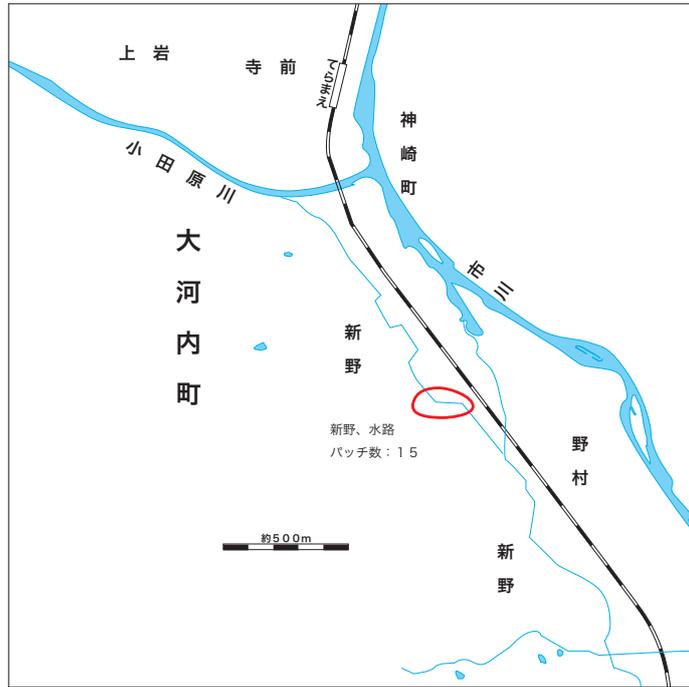


Fig. 2-2-f

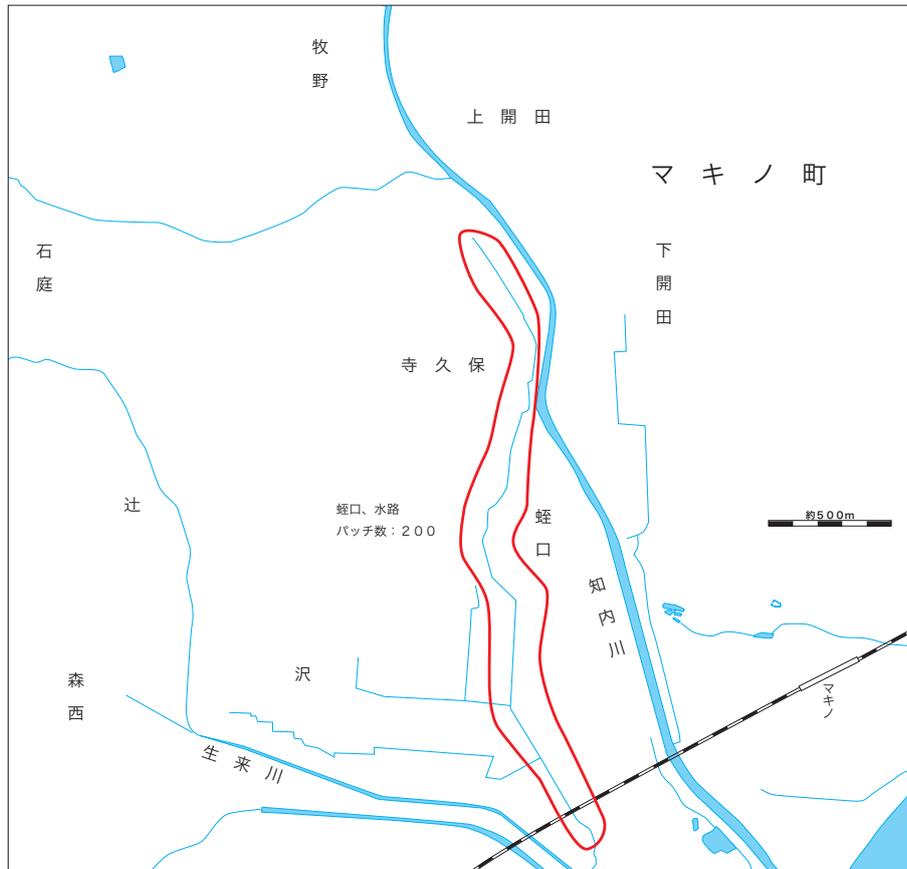


Fig. 2-2-g



Fig. 2-2-h

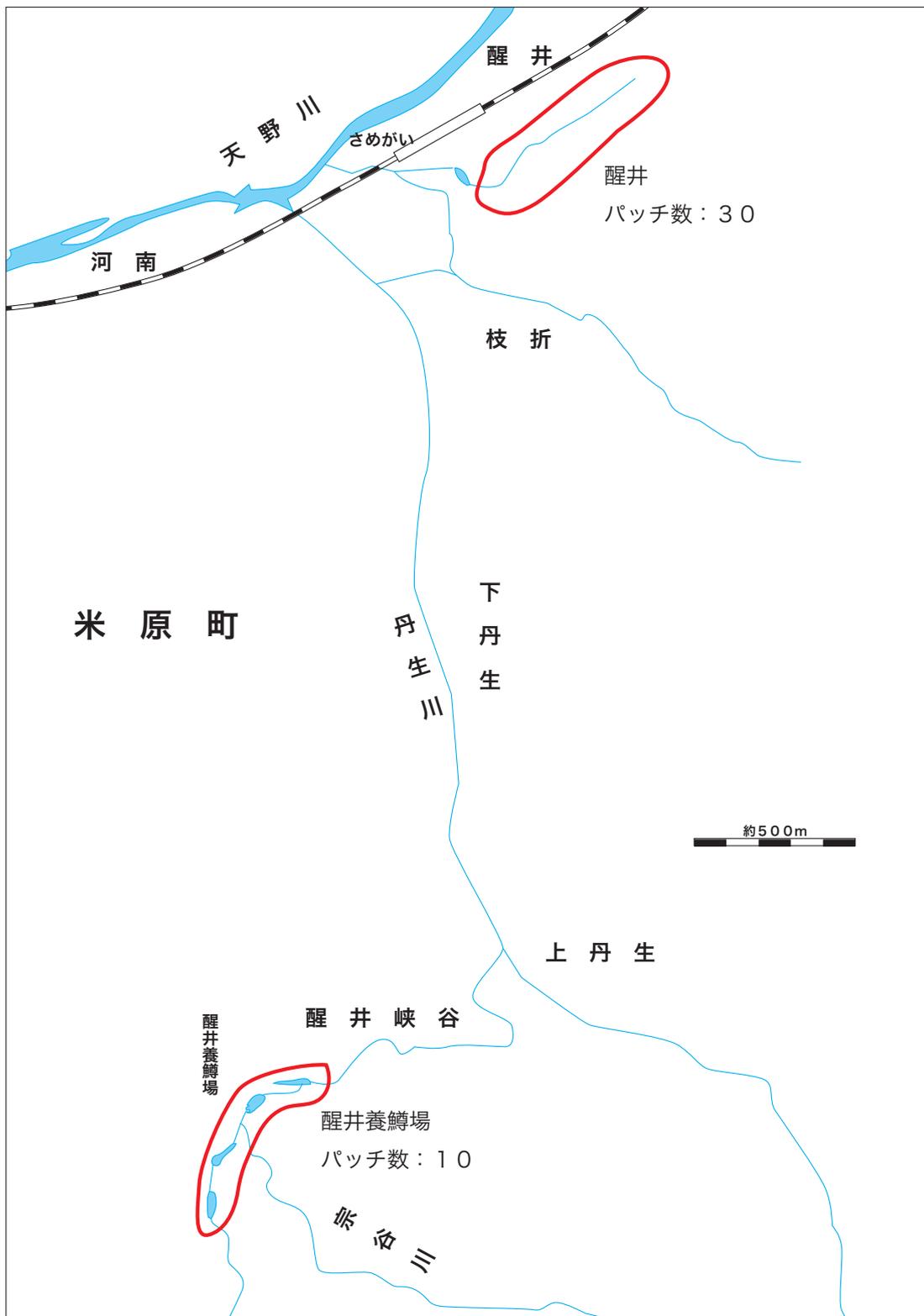


Fig. 2-2-i

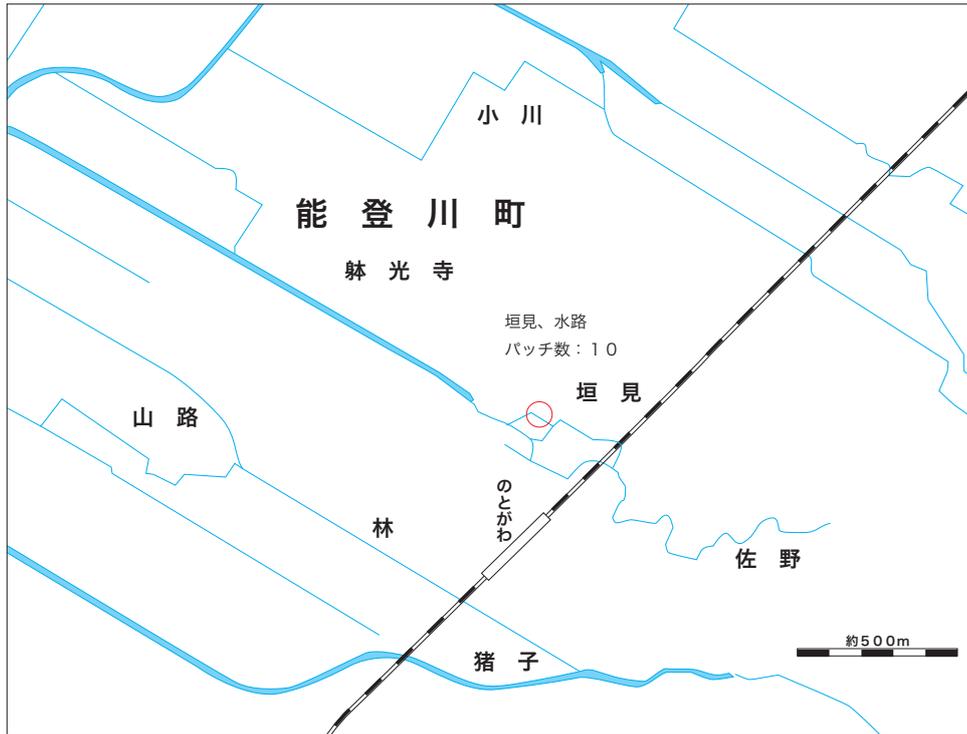


Fig. 2-2-j

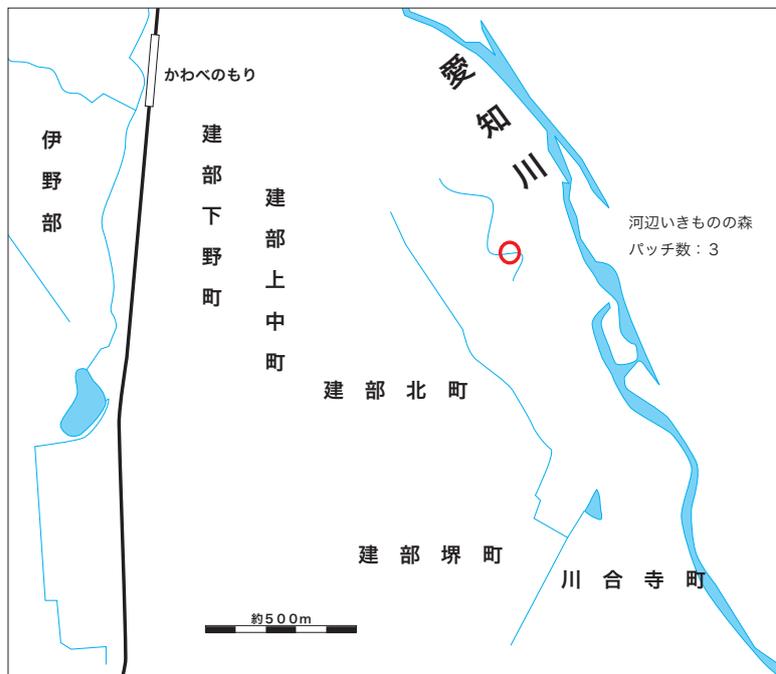


Fig. 2-2-k



Fig. 2-3-a-1



Fig. 2-3-a-2

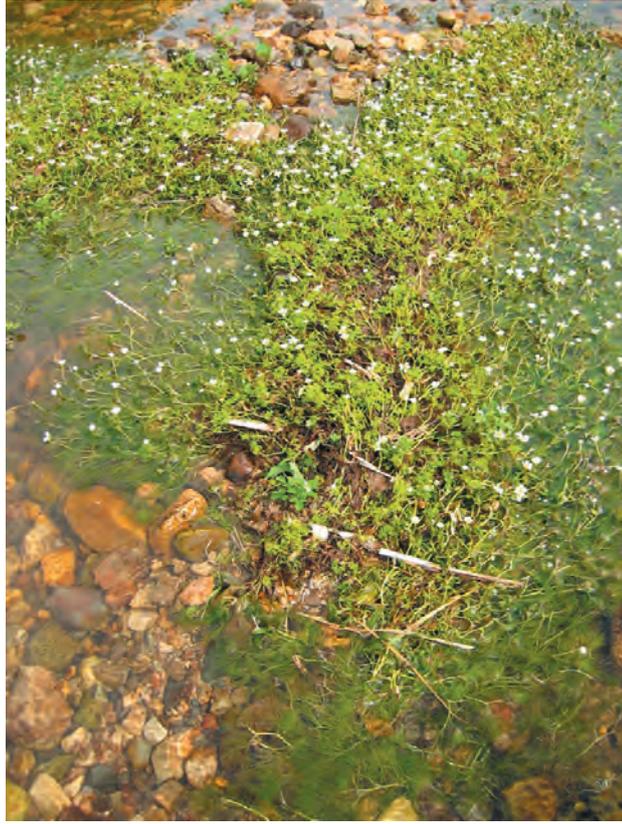


Fig. 2-3-a-3



Fig. 2-3-a-4



Fig. 2-3-b-1



Fig. 2-3-b-2



Fig. 2-3-c



Fig. 2-3-d

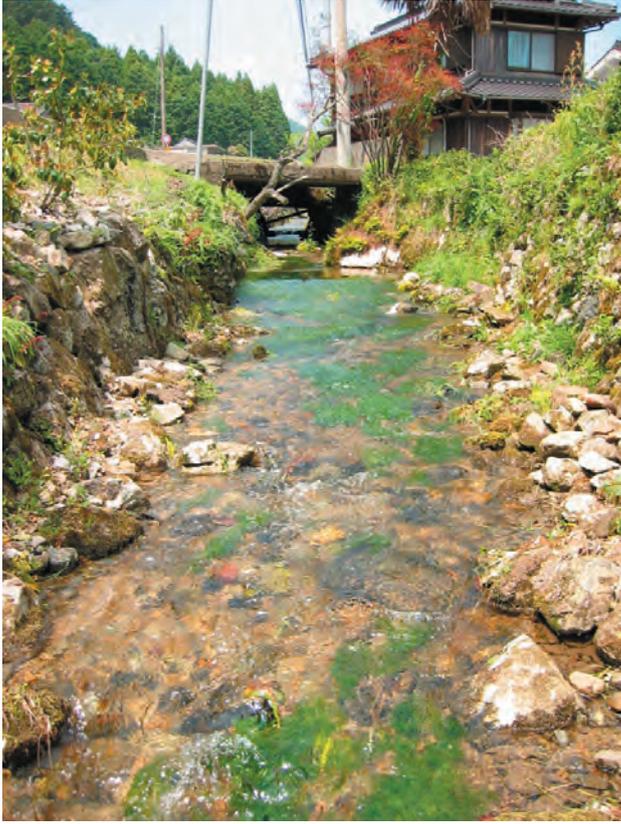


Fig. 2-3-e-1



Fig. 2-3-e-2



Fig. 2-3-f



Fig. 2-3-g



Fig. 2-3-h



Fig. 2-3-i-1



Fig. 2-3-i-2

Fig. 2-1 近畿地方におけるバイカモの分布状況（数字と記号はTABLE 2 に対応）。

Fig. 2-2 生育地の詳細地図。

- a 兵庫県浜坂町の田君と久斗
- b 兵庫県村岡町の大笹と和池
- c 兵庫県日高町の十戸
- d 兵庫県青垣町の佐治
- e 兵庫県加美町の大袋と清水
- f 兵庫県神崎町新野
- g 滋賀県マキノ町の蛭口
- h 滋賀県今津町の南新保
- I 滋賀県近江町の醒井

Fig. 2-3 生育地の写真。

- a-1 田君川
- a-2 田君川のバイカモで観察された陸生形
- a-3 田君川におけるバイカモの群落
- a-4 久斗川
- b-1 大笹の水路
- b-2 和池の水路
- c 十戸のコンクリート舗装された水路
- d 佐治川
- e-1 清水の杉原川に向けて流れる支流
- e-2 大袋のコンクリート舗装された水路
- f 新野のコンクリート舗装された水路
- g 蛭口のコンクリート舗装された水路
- h 今津のコンクリート舗装された水路
- i-1 醒井の養鱒場におけるコンクリート舗装された水路
- i-2 醒井の地藏川

Fig. 3 117 個体の ISSR データに基づいて推定された UPGMA による系統樹。（S, Samegai up; D, Samegai down; SU, Samegai up, SD; Samegai down; TK, Takimi; KT, Kuto; OZ, Ozasa; TJ, Tajima; JG, Jugo; SJ, Saji; OB, Obukuro; NN, Nino）