

絶滅危惧種イソニガナとその近縁種の遺伝的多様性

安ヶ平 紀子*・佐藤 浩二*・高原 美規*・山元 皓二*

Genetic polymorphism among *Ixeris dentata* subsp. *nipponica* a vulnerable species, and some related subspecies.

Noriko YASUGAHIRA, Kouji SATOH, Yoshinori TAKAHARA, Koji YAMAMOTO

Ixeris dentata subsp. *nipponica* is a vulnerable species which grows only some limited seaboard bluffs in Kashiwazaki. *Ixeris dentata* is a complex species composed of some subspecies, varieties and forms. Genetic polymorphism among four kinds of this species, viz., subsp. *nipponica*, var. *albiflora*, var. *albiflora* f. *amplifolia* and the type species was investigated by PCR-RAPD analysis. Genetic distances between every pair of collected samples were calculated according to shared polymorphic bands of RAPD. Each kind was placed as a separate cluster from others on the phylogenetic tree based on genetic distances. And two clusters of subsp. *nipponica* and var. *albiflora* f. *amplifolia* were connected first, then the cluster of var. *albiflora* joined together. It was indicated that subsp. *nipponica* is related most closely to var. *albiflora* f. *amplifolia* among the examined four kinds of *Ixeris dentata* and the type species is less related to other three.

Key words: Genetic polymorphism/ RAPD/ *Ixeris dentata* subsp. *nipponica*/ complex species

1. 緒 言

1. 1 絶滅危惧種イソニガナ

イソニガナ (*Ixeris dentata* subsp. *nipponica*) は新潟県柏崎市の海岸の、海に面した崖のみに生育するキク科の宿根多年草である。もともと生育地が非常に限られているうえに、海水浴場やヨットハーバーなどの海浜レジャーのための開発によりさらに生育地が狭められ、また開発に伴うゴミや土砂による圧迫もあり絶滅寸前であるとして、1994年発行の「レッドデータプランツ——日本絶滅危機植物図鑑——」¹⁾に絶滅危惧種とされている。ここで言う絶滅危惧種とは、絶滅の危機に瀕している種で、1) 現在知られている全ての個体群で個体数が著しく減少している、2) 現在知られている全ての生育地で生育条件が著しく悪化している、3) 再生能力を上回るほど採取されている、のいずれかにあたるものを言い、イソニガナではこの1)と2)が当てはまる。環境庁は1997年8月にそれまでの定性的要件によるカテゴリーに加え、定量的要件によって絶滅の危険性を考慮した新しいカテゴリー一定義によって分類した「植物に関するレッドリスト」²⁾を作成した。そこではイソニガナは絶滅危惧II類 (Vulnerable (VU) 絶滅の危険が増大している種) に分類されている。

1. 2 イソニガナの分類学上の位置

イソニガナは中井 (1920) によって、*Ixeris nipponica* という学名で独立種として報告された³⁾が、竹本 (1956) の核型分析により、ニガナ (*Ixeris dentata*) に分類されている植物群と、染色体の形状、大きさにおいて互いに類似した構成を持っていることが示され⁴⁾、現在ではニガナの亜種と位置づけられている。ニガナは1種として分類されているが、種内に複雑な分化の含まれる複合種 (complex species) であり、北村 (1956) の分類によれば、5亜種、3変種、および3品種 (表1) が知られている⁵⁾が、この他にも特徴ある地域個体群に亜種名を与えている報告もある⁶⁾。染色体の基本数は7であるが、2倍性、3倍性、4倍性のものが知られており、イソニガナを含む2倍性のものは有性生殖を行い、3倍性および4倍性のものは単為生殖によって繁殖することも知られている。

本研究では和名及び亜種変種の区別は保育社の「原色植物図鑑草本編I」⁷⁾に従うこととした。また、ニガナという種内の亜種、変種あるいは品種であるかに関わらず、便宜的に表1に示された和名を用い、種と呼ぶこととする。複合種ニガナのうち、ニガナ、オオバナニガナ、シロバナニガナは全て単為生殖を行う3倍性で新潟県内に普通に産する。これにイソニガナを加えた4種のうち、ニガナは植物体全体がやや小振り、根出葉の葉柄が細長く茎上葉の基部が茎を巻かず、小花の数が5~7と他の3種より少なく、形態的に区別できる。シロバナニガナはオオバナニガナの白花色

原稿受付：平成11年5月25日

*長岡技術科学大学 生物系

表1 複合種ニガナを構成する種類

種 類	和 名	染色体数(2n)
<i>Ixeris dentata</i> (type)	ニガナ	21
f. <i>atropurpurea</i>	クロニガナ	21
var. <i>albi flora</i>	シロバナニガナ	21
f. <i>ampli folia</i>	オオバナニガナ	14, 21
var. <i>stoloni fera</i>	ハイニガナ	14, 21
subsp. <i>alpicola</i>	タカネニガナ	14, 21, 28
var. <i>lenuissima</i>	ホソバナタカネニガナ	14
subsp. <i>Kimurana</i>	クモマニガナ	14, 21, 28
f. <i>albescens</i>	シロバナクモマニガナ	28
subsp. <i>shiranensis</i>	シラネニガナ	21
subsp. <i>nipponica</i>	イソニガナ	14
subsp. <i>kitayamensis</i>	ドロニガナ	14, 21

とされ、花が白色である他は、この2種に形態上の本質的な差異はないが、シロバナニガナの方がやや山地性の分布を示す。イソニガナは、新潟県に普通に産する3倍性ニガナ3種のうち、形態的にはオオバナニガナと最も近いが、根出葉の先端が円頭であること、茎上葉が上部まで幅広くまたよく発達すること、葉縁の微鋸歯の数が少なくまたあまり発達しないことといった点で、オオバナニガナと区別される。

また、オオバナニガナは3倍性が普通であるが、新潟県上越市の郷津海岸には2倍性の個体が存在し、この2倍性オオバナニガナは、イソニガナと本質的な違いはないとする見解もある⁸⁾。

1. 3 本研究の目的

本研究では、複合種ニガナ種内の遺伝的多様性を調べることにより、イソニガナとその近縁亜変種との分子遺伝学的類縁関係を調査することを目的とし、新潟県内に産する4種のニガナを材料にRAPD分析を行い、その結果から系統関係を推定した。

2. 材料と方法

2. 1 植物材料

材料には新潟県内に自生する*Ixeris dentata*の4種(ニガナ、オオバナニガナ、シロバナニガナ、イソニガナ)および系統樹作成のための外群としてキク科の異属の種オニノゲンシ(*Sonchus brachyotus*)を用いた。

今回、絶滅危惧種を含む材料を集めるにあたって、種子を集めることとした。自然集団中では結実した種子の大半が結実個体まで生育することはないとされているので、種子を採取する方法は葉の一部を採取する方法などと比べても、自然集団に与えるダメージが少ないと考えられる。また、室内栽培した植物体は葉が

柔らかく、DNAの抽出が容易であるという利点もある。一方で野生種の種子は発芽率が低く、採取した種子数に比して、実験に供試できるサンプル数が少なくなってしまう傾向がある。

イソニガナは柏崎マリーナ近くの集団から、ニガナ、オオバナニガナは長岡市内の集団から、シロバナニガナは弥彦山の個体群、オニノゲシは長岡市内の集団から種子を採取した。

採取した種子は土を入れた平鉢に播種し、本葉が4~5cmまで展開するまで室内で育てた。十分に展開した本葉から葉身の一部を、DNAの抽出に用いた。ニガナ2個体、オオバナニガナ3個体、シロバナニガナ3個体、イソニガナ3個体、外群であるオニノゲンシ1個体をDNAの抽出に供試した。

2. 2 DNAの抽出

植物のDNA抽出では、多糖類の混入を防ぐことが重要である。それにはCetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) という界面活性剤を用いるCTAB法⁹⁾が有効である。本実験では、CTAB法を改変した簡便な方法で行った。試料0.1gをマイクロテストチューブに詰めて、液体窒素で凍結、粉碎した後、表2に示す組成の約300 μ lの2%CTAB soln. を加え、マイクロマルチミキサーを用いてよくすりつぶした。十分に振り混ぜたのち、65 $^{\circ}$ Cの温浴で30分間加温した。等量のクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加え、5分間穏やかに攪拌したのち、12,000rpmで15分間遠心し、水層である上層を新しいマイクロチューブに移した。クロロホルム/イソアミルアルコールの混合、遠心、水層の分離をもう一度繰り返した後、1~

表2 DNA抽出液組成

2%CTAB soln.	
Tris-HCl(pH 8.0)	100mM
EDTA(pH 8.0)	20mM
NaCl	1.4M
CTAB	2%
1%CTAB soln.	
Tris-HCl(pH 8.0)	10mM
EDTA(pH 8.0)	1 mM
CTAB	1%
TEバッファー	
Tris-HCl(pH 8.0)	10mM
EDTA(pH 8.0)	1mM

1.5倍量の1%CTAB soln. を加え、転倒混和後、1時間室温で静置し、8,000rpmで10分間遠心し、DNAを沈殿させた。上清を捨てて400 μ lの1M CsClを加え、沈殿を完全に溶かし、800 μ lの無水エタノールを加え、転倒混和後、-20 $^{\circ}$ Cで20分以上静置し、12,000rpmで5分遠心してDNAを回収した。上清を捨て、沈殿を風乾させた後、20~50 μ lのTEバッファーに溶解して試料DNA溶液とした。

2. 3 PCRによるDNAの増幅

PCRは、ニッポンジーン社（東京）製のGene Taqキットの試薬を用い、MJ RESEARCH社（Watertown, MA, USA）製MINI CYCLER model: PCT-150で温度サイクルをプログラムし増幅反応を行った。0.5mlのマイクロテストチューブに、2.0 μ lのdNTP混合溶液、2.5 μ lの10 \times Taqバッファー、0.125 μ lのTaq polymerase溶液を入れ、蒸留水を18.375 μ l加えて混合し、さらにプライマー溶液1 μ l、鋳型として500倍に希釈した試料DNA溶液を1 μ l加え反応溶液とした。増幅反応中の加熱による突沸を防ぐため反応溶液にはミネラルオイルを重層した。プライマーにはオベロン社製の塩基数10のプライマーA-kitの

17種類を用いた。表3にその塩基配列を示す。17種類のプライマーそれぞれを個別に用い、17通りのPCR反応を行った。増幅反応は95 $^{\circ}$ C 3分の初期変性の後、変性: 93 $^{\circ}$ C 1分、アニーリング: 40 $^{\circ}$ C 2分、伸長: 72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを40回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ C 5分の伸長反応を行うというプログラムで行った。

2. 4 RAPD分析

RAPDの検出は、PCR反応の終了した混合液をアガロースゲル電気泳動して行った。電気泳動装置マルチ・サブマージ・アガロース32（アトー社）を用い、0.5mg/ml濃度で臭化エチジウムを加えた0.8%アガロースゲルにPCR反応の終了した混合液を8 μ lアプライし、160V定電圧で電気泳動した。泳動が終了したゲルをトランスイルミネータ（コスモ・バイオ社製、CFS-20BC）上に移し、波長254nmの紫外光でバンドパターンを確認し、ポラロイドカメラで撮影した。泳動像のままでは分析が困難であるため、バンドの有無を数値で示すスコア表を作成した。全ての泳動像を比較し、いずれかの試料でバンドが現れている移動度の位置に番号を振り、それぞれの位置にバンドがあれば1、なければ0として表を作った。さらにそれぞれの試料の間の遺伝的距離を次に示す式で算出した。 N_1 は試料1で得られた全てのバンド本数、 N_2 は試料2で得られた全てのバンド本数、 N_{12} は試料1と2に共通するバンドの本数である。遺伝的距離はプライマー17種類を用いて得られた結果を全て総合して算出した。

表3 プライマーの塩基配列

プライマー	5' to 3'	GC含量(%)
A-01	CAGGCCCTTC	70
A-02	TGCCGAGCTG	70
A-03	AGTCAGCCAC	60
A-04	AATCGGGCTG	60
A-05	AGGGGTCTTG	60
A-08	GTGACGTAGG	60
A-09	GGGTAACGCC	70
A-11	CAATCGCCGT	60
A-12	TCGGCGATAG	60
A-13	CAGCACCCAC	70
A-14	TCTGTGCTGG	60
A-15	TTCCGAACCC	60
A-16	AGCCAGCGAA	60
A-17	GACCGCTTGT	60
A-18	AGGTGACCGT	70
A-19	CAAACGTCGG	60
A-20	GTTGCGATCC	60

$$\text{遺伝的距離} = 1 - 2 N_{12} / (N_1 + N_2)$$

2. 5 系統樹

2. 4で求めた遺伝的距離から、平均距離法(UPGMA法)¹⁰⁾により系統樹を作成した。

3. 結 果

3. 1 RAPD分析

17種類のプライマー全てで多型が検出された。17種類のプライマーの合計で193のバンド位置が得られ、そのうち176のバンド位置で多型が見られた。多型が見られたバンドのうち、85は外群であるオニノゲンにのみ見られる多型だった。各プライマーでの総バンド数と多型バンド数および各サンプルのバンド数を表4に示した。また式1に従って算出した遺伝的距離を表5に示した。遺伝的距離は同種のサンプル間では、最小で0.047、最大で0.189であり、同種間の遺伝的距離

は、異なる種に属する個体間よりも小さかった。また同種サンプル間で遺伝的距離が最も遠かったものはイソニガナの2個体間のものだった。また、*Ixeris dentata*の4種において、それぞれの種内において共通に見られ他の3種には見られないバンドを種特異的バンドとすると、オオバナニガナには1本、シロバナニガナには8本、ニガナには8本の種特異的バンドが見られたが、イソニガナには今回用いたプライマーで増幅されるDNA断片のバンド中には種特異的バンドは見られなかった。

3. 2 系 統 樹

遺伝的距離を基に近隣結合法で求めた系統樹を図1に示す。それぞれの種がまずクラスターを作ることが確認された。種間の関係では、まずオオバナニガナとイソニガナが結合した後、シロバナニガナと結びつき*Ixeris dentata*の4種の中では、ニガナが他の3種とは異なることが示された。

4. 考 察

4. 1 生殖方法と遺伝的距離

イソニガナは2倍性で有性生殖を行い、また自家不

和合性であることが知られている。そのため世代ごとに必ず2個体間の遺伝子の混合が行われるため、集団中に遺伝的多様性が維持されやすいと予想され、また結果においても同種内で最も遠い遺伝的距離を示したものはイソニガナの個体間であることから支持される。

今回調査した*Ixeris dentata*のうちイソニガナを除く3種は全て3倍性であり、単為生殖を行うことが知られている。これは減数分裂において染色体倍加の後、第一分裂で生じた二核が融合して6倍性の復帰核を作り、第二分裂で3倍性の二つの核に分かれ、その内の一つが単為発生することで、3倍性の遺伝的なクローンを種子の形で生じる。そのためある範囲内の集団は遺伝的なクローンであり、種内の変異も小さいと考えられるが、イソニガナに比べれば種内の遺伝的距離は小さいものの、以前に行ったツルマメのRAPD分析における純系内の遺伝的距離(0.01程度)¹¹⁾よりも大きく、相対的に多様な遺伝子型が混在していることが示唆された。

今回採取した種子の発芽率が低く、RAPD分析に供試できた個体数が少なかったために、集団内変異や集団間変異を調べることができなかった。今後、供試個体数を増やすとともに、今回種子を採集した地点以外

表4 各プライマーでのバンド数

プライマー	Total	多型バンド	O-1	O-2	O-3	I-1	I-2	I-3	S-1	S-2	S-3	N-1	N-2	OG
A-01	10	9(6)*	6	6	6	5	5	4	5	4	5	6	5	4
A-02	12	12(6)	4	4	6	6	6	5	5	4	5	5	5	7
A-03	6	6(6)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4
A-04	8	7(5)	5	5	5	4	4	4	6	6	6	4	4	3
A-05	5	3(3)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4
A-08	17	17(2)	4	6	1	5	3	5	5	9	10	6	6	3
A-09	6	5(4)	3	3	3	3	3	3	4	4	4	3	3	3
A-11	14	12(8)	5	5	5	5	6	6	4	5	4	6	6	9
A-12	18	16(6)	6	6	6	8	6	7	10	9	6	9	7	8
A-13	4	4(4)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
A-14	8	8(3)	3	4	6	3	3	3	3	5	3	3	4	5
A-15	15	11(7)	7	7	8	7	7	6	9	9	9	8	8	9
A-16	26	26(5)	7	7	4	9	9	7	11	8	15	9	8	5
A-17	21	21(8)	9	8	8	5	5	6	10	9	8	5	6	6
A-18	8	7(7)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	7
A-19	6	3(1)	3	3	3	4	4	4	4	3	3	4	5	5
A-20	9	9(4)	4	3	4	4	2	4	5	4	5	5	5	4
合計	193	176(85)	74	75	73	76	71	72	89	87	91	81	80	89

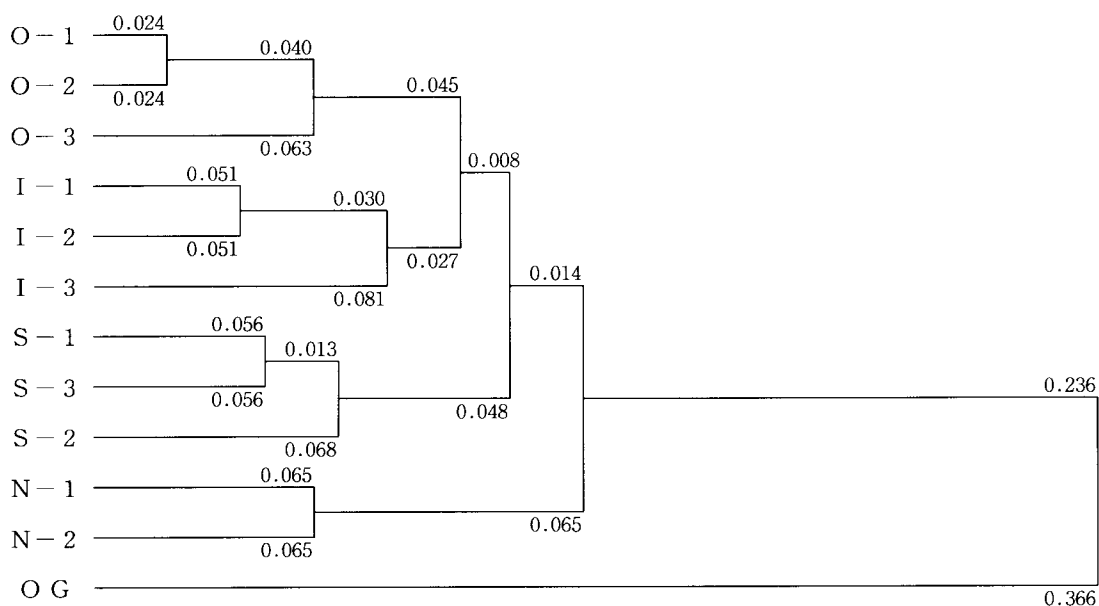
O:オオバナニガナ I:イソニガナ S:シロバナニガナ N:ニガナ OG(out group):オニノゲシ

* () はOG:オニノゲシに固有の多型で内数

表5 サンプル間の遺伝的距離

	O-2	O-3	I-1	I-2	I-3	S-1	S-2	S-3	N-1	N-2	OG
O-1	0.047	0.116	0.187	0.159	0.233	0.202	0.230	0.224	0.239	0.234	0.730
O-2		0.135	0.192	0.178	0.241	0.232	0.210	0.217	0.231	0.239	0.732
O-3			0.208	0.208	0.241	0.247	0.237	0.280	0.260	0.260	0.716
I-1				0.102	0.135	0.188	0.239	0.210	0.185	0.205	0.697
I-2					0.189	0.212	0.253	0.210	0.197	0.205	0.725
I-3						0.230	0.220	0.264	0.229	0.250	0.714
S-1							0.136	0.111	0.271	0.267	0.742
S-2								0.135	0.298	0.317	0.739
S-3									0.256	0.275	0.744
N-1										0.130	0.741
N-2											0.728

O:オオバナニガナ I:イソニガナ S:シロバナニガナ N:ニガナ OG (out group):オニノゲシ



O:オオバナニガナ I:イソニガナ S:シロバナニガナ N:ニガナ OG (out group):オニノゲシ

図1 RAPD分析による系統樹

の場所に生育する集団からも試料を収集し、分布を反映した解析を行う必要がある。

4.2 *Ixeris dentata*種内の系統関係

本報告では、便宜的に*Ixeris dentata*種内の4「種」としたが、北村(1956)の分類によれば、イソニガナだけが亜種レベルで分かれ他の3種から最も遠く、オオバナニガナとシロバナニガナの2種はニガナと変種のレベルの違いがあり、オオバナニガナとシロバナニガナは品種の違いで、この4種の中では最も近いとされている。一方で、緒言でも述べたように形態的にはニガナが他の3種とはやや異なることが示されている。

イソニガナを除く3種はいずれも3倍性で単為生殖を行うため、交配によって系統関係を調べることはできず、これまで形態や核型によって系統関係が推定されてきた。イソニガナが形態的にはオオバナニガナに近いにもかかわらず別亜種とされてきたのは、有性生殖を行う2倍性であり生殖様式が異なるためであると考えられる。

今回、RAPD分析により直接ゲノム中のDNA配列を元に系統関係を調べた結果、イソニガナはオオバナニガナと最も近く、次にシロバナニガナを含めた3種が一つの集団を作り、ニガナが最も遠いという結果を得た。これは、形態的特徴においてニガナがやや異な

ること及びオオバナニガナの2倍性個体とイソニガナが非常に近いとする竹本の見解を支持するものである。

また、シロバナニガナはオオバナニガナの白花品であり、オオバナニガナと最も近いと考えられたが、今回作成した系統樹ではオオバナニガナとイソニガナの方が先に結合する結果となった。イソニガナが2倍性であることと有性生殖を行うことを重視せず、オオバナニガナ、シロバナニガナと一つのグループを形成することを認めれば、イソニガナとオオバナニガナが平地性であるのに対しシロバナニガナがやや山地性の分布を示すことと合わせて、この3種の共通祖先からシロバナニガナが先に分かれたと考えるのも決して突飛なこととは思われない。しかし、ゲノムDNA中の変異の蓄積は、形態の変異と直接結び付くものではなく、分岐後の時間と相関があるが必ずしも比例するとは限らない。またニガナが他の3種より遠いとはいえその差は小さなものであった。この点に関しては、異なるプライマーを用いて実験を行い、独立した系統樹を複数作成し多くの情報から支持されるかどうか確かめる必要がある。

今後郷津海岸の二倍性オオバナニガナや、他の亜種に分類されているタカネニガナやクモマニガナの試料を入手し、より広範な調査を行うことで、複合種ニガナの分化について明らかにすることができると考えられる。

RAPD分析により、オオバナニガナには1本、シロバナニガナには8本、ニガナには8本の種特異的バンドが見られたが、イソニガナでは見られなかった。こうした種特異的バンドが、亜種変種の鑑別に有効かどうかは、さらに多くの個体について調べることで明らかにできるだろう。

5. イソニガナの現状

イソニガナは他の植物に遮蔽されず、やや水分の多い乾燥しない土地を好む性質がある。また茎や葉は軟弱で他の植物との競争には弱いと考えられる。そのため地下水の浸み出しがある崖や傾斜地の斜面にその分布が局限されている。こうした条件が満たされれば海岸沿いでなくとも生育することができるが、自然条件下では海からの吹き付けが他の植物の生育を制限するために、海辺の崖にのみ生育していたのであろう。また、有性生殖で自家不和合性を持つため、種子による1個体の侵入では新たな群落を形成することができず、生育適地が限られているため離れた場所に分布を広げることが困難であると思われる。こうしたことが柏崎

の海岸という限られた分布の理由だと考えられる。

柏崎市の海岸線は砂浜と海に切り立った崖を持つ岬が交互に並んでおり、砂浜は海水浴場、海触崖は観光遊覧船の周航に利用され、海浜レジャーを目的とした開発が進んでいる。そのためイソニガナの生育地全体が人為的な影響を受けている。イソニガナは利用しにくい崖地を好むので、人間活動の影響の少ない生育地もあるが、柏崎の中心に近い番神岬と鯨波東側の岬は大きく環境が変化している。番神岬では崖下の海沿いに柏崎中心街と海水浴場を結ぶ道路が建設されたために、斜面の植生が安定し他の植物が繁茂するようになっており、著者らの調査ではイソニガナは確認できなかった。一方、鯨波東側の岬では、崖下は柏崎マリーナとして、崖上は御野点公園として隣接する鯨波海水浴場と一体の公園整備が行われているが、除草などの管理が行われているために逆に他の植物に占有されない空間がもともとの生育地に隣接する形でイソニガナに解放され、公園内の平地にも多くの個体が生育しており、ここではむしろ人為によりイソニガナが繁栄していると言える。しかしここでも除草剤の散布による除草が行われれば、イソニガナの個体群に大打撃を与えることが必至であり、決して楽観はできない。

現在、イソニガナの生育地は柏崎市の海岸線約15kmの範囲内に互いに離れた6ヶ所の生育地が確認されているのみで、それぞれの生育地も面としての広がりほとんど持たず、全て合わせても1km²に満たない。個体数については、生育地では比較的密に生育しており、今回重点的に調査を行った柏崎マリーナ付近の集団のみでも5000個体以上はあると見積られる。また、開花が及んでいない集団もあり、個体数が継続的に減少しているわけではない。そのため環境庁によるレッドリストで絶滅危惧II類のカテゴリーに分類されているのは妥当だと言える。

イソニガナは、現状では生育地が非常に狭い範囲に局限されているとはいえ、個体群は安定しており、直ちに絶滅の危機に瀕しているわけではない。しかし、その生殖様式や生態的地位から言って分布が今後拡大していくとは到底考えられず、今ある個体群が失われてしまえば、地球上から姿を消してしまうことも事実である。

イソニガナは*Ixeris dentata*種内の亜種であり、種としての*Ixeris dentata*は普通種で絶滅は考えられない。しかし、普通に存在する*Ixeris dentata*は3倍性のニガナあるいはオオバナニガナであり、2倍性の*Ixeris dentata*は、イソニガナ、ドロニガナなどいずれもその生育地が局限されている。植物の種分化の方向とし

て3倍性種は2倍性種から派生したと考えるのが妥当で、2倍性のものの方が*Ixeris dentata*の祖型に近いと考えられるが、2倍性の亜種の中ではイソニガナが普通種である3倍性ニガナに形態的に最もよく似ており、複合種ニガナの分化を考える上で鍵となるものであると考えられる。この点から考えても、亜種であってもイソニガナの絶滅を避けることは重要であり、そのためには最低限現状を維持することが必要であろう。

参考文献

- 1) レッドデータブック日本絶滅危機植物図鑑, p.129-130, 宝島社, 1994
- 2) 植物に関するレッドリスト, 環境庁, 1997
- 3) 中井猛之進, 植物学雑誌, 34, 154, 1920
- 4) 竹本貞一郎, 植物学雑誌, 69, 325-328, 1956
- 5) Kitamura, S., Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ. Ser. B, 23, 105-168, 1956
- 6) Nishioka, T., Jap. Journ. Bot., 18, 199-223, 1963
- 7) 原色日本植物図鑑草本編(I) 合弁花類, p.6-7, 保育社, 1990
- 8) 竹本貞一郎, 岡山大学教養学部研究集録, 29, 71-89, 1970
- 9) 番 保徳, 植物のPCR実験プロトコール, p.30-36, 秀潤社, 1995
- 10) Saitou N., Methods in Enzymology, Vol. 266, p. 427-449 Academic Press, Inc., Orlando, 1996
- 11) 小笠原貴哲, 高原 美規, 山元 皓二, 長岡技術科学大学研究報告, 20, 73-80, 1998