

アザメの瀬自然再生事業初期に出現したアゼナ類の自然適性に関する遺伝学的一評価

著者	山口 裕文, 向井 恵美, 中山 祐一郎
引用	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科学術報告. 2005, 57, p.25-31
URL	http://doi.org/10.24729/00009656

アザメの瀨自然再生事業初期に出現したアゼナ類の 自然適性に関する遺伝学的一評価

山口裕文・向井恵美・中山祐一郎

(大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)

要 旨

河川後背地の自然再生事業における植生回復のまきだしに出現したアゼナ属植物について AFLP分析によって遺伝的適性を評価した。3組のAFLPプライマー組で検出された164本のDNA断片の変異は、明瞭な種間差を示し、アゼナ、アメリカアゼナ、タケトアゼナを識別した。修復事業地の土壌より出現したアゼナ類の種内変異の程度は極めて低く、個体群や地理的産地の違いを検出できなかった。AFLP分析によって産地間移動の許容性は判断できなかったが、幼若期には形態的に種の同定の困難なアゼナ類において在来種のアゼナと帰化種のアメリカアゼナおよびタケトアゼナを識別出来たことから、遺伝評価は自然修復過程で現れる植生の初期管理に必要な情報を提供する。

Abstract

Hirofumi YAMAGUCHI, Emi MUKAI, and Yuichiro NAKAYAMA (*Laboratory of Conservation Ecology, Graduate School of Agriculture and Biological Sciences, Osaka Prefecture University*): A Genetic Evaluation on *Lindernia* Species Emerged from Soil Seed-Bank in a Wetland Restoration in Azamenose Site, the Matsuura River, Saga Prefecture, Japan. *Sci. Rep. Grad. Sch. Agric. & Biol. Sci., Osaka Pref. Univ.* **57**: 25~32(2005).

AFLP genotypes of *Lindernia procumbens* (Krock) Borbás, *L. dubia* (L.) Pennell subsp. *major* (Pursh) Pennell, *L. dubia* (L.) Pennell subsp. *dubia* plants emerged from seed bank scattered soil for natural restoration were evaluated by three AFLP primer pairs. Three taxa showed distinct difference in AFLP genotypes determined by 164 fragments but diagnosis differences among local populations. AFLP evaluation is possible to discriminate the indigenous species *Lindernia procumbens* from the alien invasive species, *L. dubia* subsp. *major* and *L. dubia* subsp. *dubia*, at ecological management of the vegetation in the early process of nature restoration.

はじめに

産業の推進や開発において生物多様性への配慮が社会的要請となり、日本各地で自然再生事業やビオトープの設計が進められている。河川生態系の修復を目的とした自然再生事業の一つとして佐賀県松浦川におけるアザメの瀨自然再生事業がある(国土交通省, 2003)。松浦川とその支流になる厳木川の流域には、西岳連山、黒髪山、背振山塊よりの浸食土を堆積した氾濫原を利用した水田群があり、これらは縄文時代から継続的に開田されてきたものである。佐賀県相知町下佐里にあるアザメの瀨地区は、松浦川と丘陵とに挟まれた場所、面積約6ha延長約1000m幅約400mの水田である。ここでは年に1回の割合で洪水があり、

松浦川流域は10年に一度は大きな被害を受けるため、流域全体でさまざまな治水対策が施され、松浦川沿いには強固な堤防が設けられている。アザメの瀨自然再生事業では地元との協議の結果、洪水時の氾濫を許容し、下流域の洪水流量の低減も図るため、これまで水田として利用されてきた土地を掘り下げ湿地としての機能の再生を計ることになった。2002年に掘り下げが始まり、松浦川沿いの堤防の一部も開削され、洪水時の攪乱を利用しながら湿地を再生する事業が進められている。

アザメの瀨では本来の生態系を取り戻すために洪水などの自然現象にともなって供給される植物種子を活用するほか、事業地やその付近の土壌に眠っている種子をまきだして、土壌シードバンクを利用しながら植物群落の再生を計っている。洪

水などにもなって自然に供給される植物種子や土壌シードバンクの利用にあたり注意すべき点は、復元してくる植物が復元地への自然適性をもつかどうかである。例えば外来種が優占する場所においては土壌シードバンクにも、自然供給される種子のなかにも、外来種の種子が大量に蓄積している。そのような種子源を再生に用いれば、再生どころか侵略的外来植物のいっそうの蔓延をもたらす可能性がある(荒木ら, 2003)。また、種レベルでは在来であっても種子源が本来の地域集団と遠い遺伝的組成をもつ場合、自然再生事業そのものが生物多様性の質の低下を招く原因となる。従って、再生事業では植物種のみならず、個体群の遺伝適性を評価しながら順応的管理に取り組むのが望ましい。しかし、再生事業の当初には、どのような種をどの程度の分析レベルで継続的に評価すべきかわからない現状にある。そのためにはいくつかの種をモデルとして適性の評価を試み、一般性を導く必要がある。本研究では土壌がまきだされた再生事業の初期に多く出現したアゼナ類を対象としてAFLP分析による遺伝的評価を試みた。

アゼナ類には日本に5種類が分布しているが、形態的に種の識別が難しく、在来種と帰化種の区別も困難である(山崎, 2003)。日本には*Lindernia*属として在来種のアゼナ(*Lindernia procumbens* (Krock) Borbás)、外来種のアメリアアゼナ(*L. dubia* (L.) Pennell subsp. *major* (Pursh) Pennell)、タケトアゼナ(*L. dubia* (L.) Pennell subsp. *dubia*) およびヒメアメリアアゼナ(*L. anagallidea* (Michx.) Pennell)があり、呼称の似た種として外来種のウキアゼナ(*Bocopa reotundifolia* (Michx.) Wettst.)がある。アゼナは日本の水田や湿地にふつうにみられる種で、葉に鋸歯がなく、葉の基部は円脚で葉柄状に細く

ならない。アメリアアゼナは1930年代に、タケトアゼナは1960年代に日本に伝来したと推定されている帰化植物であり(好野ら, 2002)、水田や湿地などの縁に生育する。アメリアアゼナでは葉は長楕円形で鋸歯があり、葉の基部が次第に細く葉柄状となり、タケトアゼナでは葉は卵状楕円形で鋸歯があり、葉の基部が円脚で葉柄状に細くならない。花器の着生状態や形態的特徴には種差が明瞭であるが(好野ら, 2001)、発芽から若い実生の間など、発生の初期には種の識別は極めて困難である。

植物種や集団の遺伝的評価手法には、アイソザイム、RAPD、マイクロサテライトマーカー、シーケンスやSNPに基づくハプロタイプ分析などがあるが、簡便性、経済性、再現性などに関してそれぞれ個性がありすべてを用いることは出来ない。本研究では、比較的簡便で再現性が高く、汎用性があると考えられるAFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)法を採用し、まきだしの際に出現したアゼナ類に焦点を絞り、種、集団内、地域集団間の遺伝的差異を評価し、その結果から再生事業における植物種の遺伝的管理について考察する。

材料および方法

材料

アザメの瀬事業地において複数の地点と深さから採取された土壌からのまきだしによって出現した植物から、アゼナ類と推定される個体を2003年7月に採集した。また7月から9月にかけて佐賀県伊万里市金石原および鹿島郡肥前山口町、長崎県対馬市内山、大阪府堺市、静岡県東伊豆郡河津町大堰)から得られたアゼナ類を比較として用いた(表1および図1)。アゼナ類は幼苗では種の

表1. AFLP分析に用いた材料

種名	個体数	個体コード	採集地	生育地/備考
アゼナ	5	1~5	佐賀県 相知町佐里下アザメの瀬	まきだし土壌
	4	6~9	大阪府 堺市百舌鳥梅町	水田の畦畔
	2	10~11	長崎県 下県郡厳原町大字内山	水田内
	3	12~14	静岡県 河津町大堰	水田/2個体は再同定
アメリアアゼナ	11	15~25	佐賀県 相知町佐里下アザメの瀬	まきだし土壌
	4	26~29	佐賀県 伊万里市金石原	金石原駅付近
	4	30~33	大阪府 堺市百舌鳥梅町	水田の畦畔
	1	34	静岡県 河津町大堰	水田
タケトアゼナ	3	35~37	佐賀県 相知町佐里下アザメの瀬	まきだし土壌/1個体は再同定
	1	38	佐賀県 相知町佐里下アザメの瀬	自然再生地
	6	39~44	佐賀県 杵島郡江北町	肥前山口駅付近/水田

60個体準備, 52個体からDNA抽出, 44個体をAFLP分析

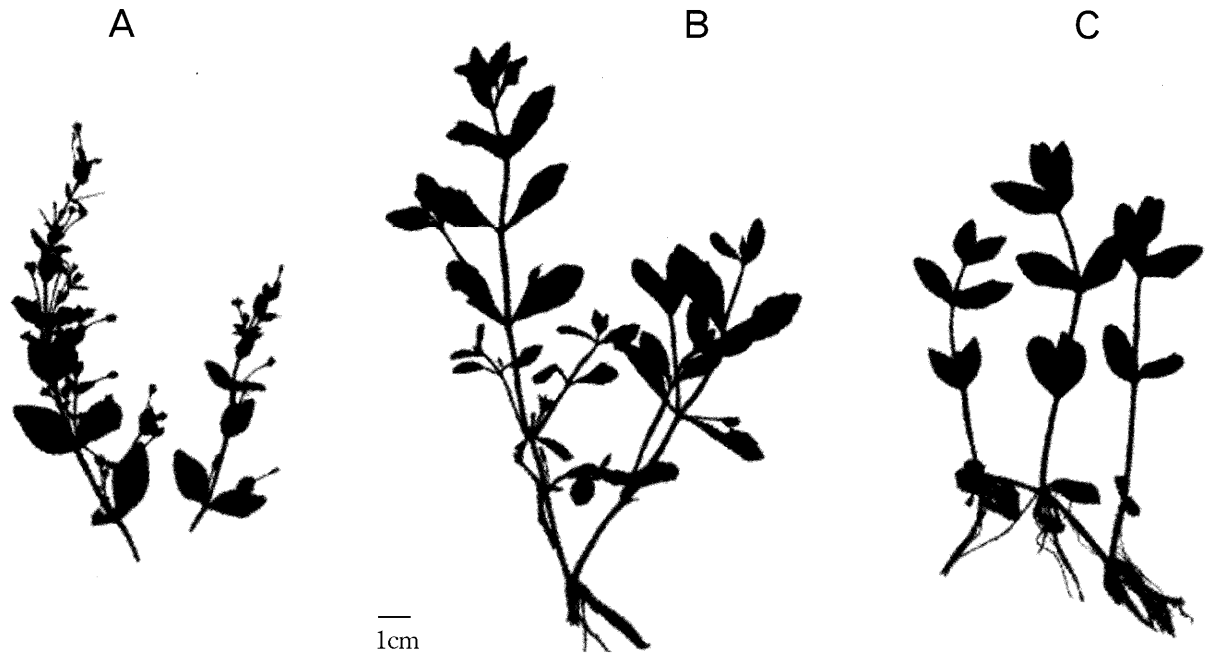


図1. アザメの瀬から得られたアゼナ類 A: アゼナ, B: アメリカアゼナ, C: タケトアゼナ

同定が難しいので、採集したサンプルを研究室に持ち帰り、1個体ずつ直径8cmのビニールポットに移植して10葉以上の葉齢まで温室で栽培した。開花結実した個体で種や亜種を同定し、その個体はさく葉標本として保存した。準備した60個体のうち枯死などの個体を除いた52個体について、種を同定した後、生葉からDNAを抽出した(表1)。

DNAの抽出

Zhou et al. (1999) の方法に従ってゲノムDNAを抽出した。生葉300mgに洗浄溶液(0.1M Tris-HCl (pH 8.0), 2% 2-メルカプトエタノール, 1% ポリビニルピロリドン, 0.05M アスコルビン酸) 1500 μ lを加えて乳鉢ですりつぶした後、2mlチューブに移し、14000rpmで5分間遠心分離して上清を除去し、これに洗浄溶液1000 μ lを入れ攪拌し、さらに14000rpmで5分間遠心分離し、上清を除いた後、2 \times CTAB (2% CTAB, 0.1M

表2. AFLP分析における試薬と組成

酵素・ライゲーション反応	A液	10 \times T4Buffer DNA Ligase buffer with ATP	0.1 μ l
		0.5M NaCl	0.1 μ l
		0.5mg/ml BSA	0.1 μ l
		20U/ μ l Mse I	0.05 μ l
		15U/ μ l EcoR I	0.33 μ l
		350U/ μ l T4 DNA Ligase	0.025 μ l
		滅菌水	0.295 μ l
	B液	10 \times T4Buffer DNA Ligase buffer with ATP	1.0 μ l
		0.5M NaCl	1.0 μ l
		0.5mg/ml BSA	1.0 μ l
		Mse I Adaptor pairs*	1.0 μ l
		EcoR I Adaptor pairs*	1.0 μ l
Preselective PCR	C液	Preselective Primer Pairs*	1 μ l
		AFLP Core Mix*	15 μ l
Selective PCR	D液	5 μ M Mse I Selective primer	0.5 μ l
		1 μ M EcoR I Selective primer**	0.5 μ l
		AFLP Core Mix*	7.5 μ l

*, AFLP Ligation and Preselective Amplification Module (Applied Biosystems)

***, Beckman Dye蛍光標識 (Proligo Japan).

表3. Selective PCRに用いたプライマー

プライマーペア	コード	塩基配列
E-AAG/M-CTC	①	E-5'GACTGCGTACCAATTCAAG M-5'GATGAGTCCTCAGAAGCTC
E-AAG/M-CTT	②	E-5'GACTGCGTACCAATTCAAG M-5'GATGAGTCCTCAGTAACTT
E-ACT/M-CTT	③	E-5'GACTGCGTACCAATTCACCT M-5'GATGAGTCCTCAGTAACTT

Tris-HCl pH 9.0, 1.4M NaCl, 0.01M EDTA) 溶液 750 μ lを加え, 65°Cで1時間静置した。これに, クロロホルム: イソアミルアルコール=24:1 溶液を750 μ l加えて5分間ローテートした後, 14000rpmで5分間遠心分離した。上清750 μ lを取り, 新たな2mlチューブに移してクロロホルム: イソアミルアルコール=24:1 溶液を750 μ l加えた後, 14000rpmで5分間遠心分離した。上清620 μ lを取って1.5mlチューブに移した後, イソプロパノール620 μ lを加え, 4°Cで5分間12000rpmで遠心分離した。沈殿物(ペレット)に, 80%エタノール500 μ lを加え, 再び4°Cで5分間12000rpmで遠心分離した。上清を捨て, 乾燥させたペレットにTE緩衝液(10mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA) 100 μ lを加えてDNAを溶解し, RNase A (10mg/ml) を1 μ l加えて37°Cで30分間処理し, RNAを消化させた。次に20% PEG溶液(20%ポリエチレングリコール, 2.5M NaCl) を60 μ l加えて30分間氷冷した後, 4°Cで10分間14000rpmで遠心分離した。ペレットが残るように注意して上清を捨て, 80%エタノールを500 μ l加え, 4°Cで5分間14000rpmで遠心分離し, 上清を捨て乾燥させた。これを50 μ lのTE緩衝液で溶解させ4°Cで保存した。DNA濃度を分光光度計で測定した後, TEで希釈して約100 ng/ μ lになるように調整した。

AFLP分析

同じ地点からの多数の同種個体を分析対象から外し, 44個体についてAFLP分析した(表1)。AFLP™ Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems) に従って, 制限酵素・ライゲーション反応では, 2種類の制限酵素 (*Mse*I, *Eco*RI) を用いてDNAを切断し, 切断された断片の端に2種類の二本鎖アダプターを結合(ライゲーション)させた。A溶液とB溶液(表2)を混合したのち, 0.5 μ gのDNAを入れ混合した。その後20~25°Cで約10時間反応させ, 65°Cで20分間インキュベートし酵素を失活させた。これにTE0.1緩衝液(10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA pH8.0) を189 μ l加えて希釈し, 冷凍保存した。

Preselective PCRでは, 制限酵素・ライゲーション反応で得た希釈液4 μ lとC試薬(表2)を混合し, 72°Cで2分間処理したのち, 94°Cで20秒, 65°Cで30秒, および72°Cで2分の処理を20サイクル繰り返し, 最後に60°Cで30分間処理した。このPCR産物10 μ lにTE0.1緩衝液を190 μ l加えて希釈し, 冷凍保存した。

Selective PCRでは, Selective PCRで使うプライマー組を決めるため, まず9組のプライマーペアを用い, アザメの瀬, 大阪, 対馬産のアゼナ3サンプル, アザメの瀬, 金石原, 大阪産のアメリカアゼナ3サンプル, アザメの瀬および肥前山口産のタケトアゼナ2サンプルについて予備実験を行った。検出されたバンド数と多型バンドの割合から最も効率良く解析できるよう3組のプライマー組(表3)を決定した。PCR反応ではフォワード側のプライマーを蛍光標識し, フラグメント解析に備えた。Preselective PCR反応の希釈液1.5 μ lと表2の試薬を混合し, 94°Cで2分間処理したのち, 94°Cで20秒の処理と66°Cから1サイクルごとに1°Cずつ下げた温度で30秒処理および72°Cで12分の処理を10サイクル繰り返し, 94°Cで20秒, 56°Cで30秒, および72°Cで2分の処理を20

表4. アザメの瀬におけるアゼナ類の出現場所と個体数

地点*	深度 (m)	アゼナ	アメリカアゼナ	タケトアゼナ
A	0.05	0	13	0
	0.5-1	0	1	0
	1-1.5	0	1	0
B	0-0.5	1	6	0
	0.5-1.0	2	0	0
C	0-0.5	6	0	3
D	0	0	0	1

*, まきだし土壌の採取地点

表5. 種・亜種に固有なAFLPバンド

種・亜種	アゼナ						アメリカアゼナ			タケトアゼナ			
	①		②			③		①	②	③	①	②	③
プライマーペア*													
バンドの記号	58	199	66	117	175	68	386	57	72	70	59	84	67
	64	201	68	127	183	75		118	111	146	104	98	121
	75	214	76	135	198	79		164		256	106	112	130
	91	255	81	147	205	135		193		283	129	119	295
	125	291	83	153	231	137		197		288	184	243	
	149		86	158	239	156		232			191		
	153		93	165	240	162					217		
	179		97	166	253	220					380		
	186		99	168	286	258							
	190		106	169	297	291							
固有バンド数	15		30			11		6	2	5	8	5	4

*、表3参照

サイクル繰り返したのち、60°Cで30分間処理した。反応産物は次の分析まで凍凍保存した。

Selective PCR反応液とDNA Size Standard Kit-400 (Beckman Coulter) をSLS (脱イオン化ホルムアミド (Beckman Coulter) で希釈した。蛍光プライマーにより希釈の程度を変え、青色プライマーを用いた反応産物：黒色プライマーを用いた反応産物：SLS=1:2.8:1.5とした。この希釈液2 μ lとSLS 30 μ lをCEQ8000XLマルチキャピラリーDNA解析システム (Beckman Coulter) のサンプルプレートに入れたのち、ミネラルオイルを1滴ずつ加え、泳動条件をFrag-1に設定し、泳動した。得たデータをCEQ8000XLのフラグメント解析ソフトウェアを用い、蛍光色素のmobilityをAE-V2として解析した。波形図のピークからAFLPバンドの有無を1,0に変換し、サンプルごとにデータ行列を作った。次にSPSS 12.0JによってこのデータからLance and Williamsの2値非類似度係数を求めた (SPSS Inc., 2003)。この測度の行列を用いてMEGA 2.1 (Kumar et al., 2001) により近隣結合 (NJ) 系統樹を作成した。

結果および考察

実生から育てた60個体のアゼナ類を植物の形態的特徴によって同定したところ、18個体はアゼナ、32個体はアメリカアゼナ、10個体はタケトアゼナであった (図1)。このうち3個体では形態的特徴からの同定とAFLP像とに不整合が認められたため、標本を再調査して種を同定した (表1)。アザメの瀬からは、アゼナ、アメリカアゼナおよびタケトアゼナが確認され、アゼナは地点BとCから、アメリカアゼナは地点AとBのおもに表層部から、タケトアゼナは地点CとDから出現し

た (表4)。レファレンスに使ったアゼナ類でも生育の初期や水田に生育する個体では、種の識別が困難で、育成個体で同定した。金石原のアゼナ類はアメリカアゼナであり、肥前山口のアゼナ類はタケトアゼナ、対馬のアゼナ類はアゼナ、大阪のアゼナ類はアゼナおよびアメリカアゼナ、伊豆のアゼナ類はアゼナおよびアメリカアゼナであった。

予備調査に用いた9組のAFLPプライマーのうち、アゼナでは7ペア、アメリカアゼナでは3ペアに多型が検出され、タケトアゼナでは多型はみられなかった。1組のプライマーペアは、最少で14本のバンド、最大で70本のバンドを検出した。アゼナとアメリカアゼナの両者において多型がみられたのは、E-AAG/M-CTC、E-ACC/M-CAGおよびE-ACT/M-CTTであった。E-ACC/M-CAGでは総バンド数が33本と少なかった。E-AAG/M-CTTは、アゼナで多型を検出し、バンド数が最も多かった。これらの多型バンド数と総バンド数を考慮して、9組のプライマーペアから3組を選んで以後の分析に用いた (表3)。

3組のAFLPプライマーで検出された総バンドは164本あり、そのうち7本は単型、157本は多型であった。アゼナには56本の固有なバンドがみられ、アメリカアゼナには13本、タケトアゼナには17本の固有バンドがみられた (表5)。アゼナでは96本のバンドのうち21本 (22.9%) が多型で、アメリカアゼナでは52本のバンドのうち14本 (26.9%) が、タケトアゼナでは61本のバンドのうち22本 (36.1%) が多型であった。

バンドの有無から計算した個体間の遺伝距離は、アゼナの種内では0から0.075、アメリカアゼナの種内では0から0.099、タケトアゼナの種内では0から0.165であり、平均的な変異性はタケ

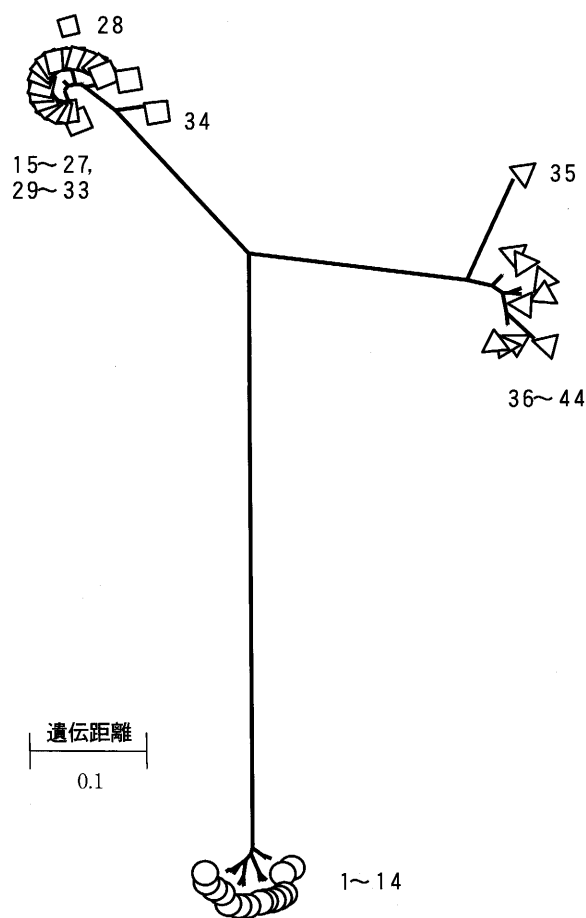


図2. AFLP変異に基づくアゼナ類のNJ系統樹

○：アゼナ，□：アメリカアゼナ，△：タケトアゼナ
番号は個体コード

トアゼナ，アメリカアゼナ，アゼナの順に大きかった（データ省略）。3種間の遺伝距離は0.416から0.864であった。遺伝距離はアゼナとアメリカアゼナ間では0.769から0.821，アゼナとタケトアゼナ間では0.802から0.864，アメリカアゼナとタケトアゼナ間では0.416から0.534であり，種内の遺伝距離よりはるかに大きかった。NJ系統樹では種または亜種に対応する3つのクラスターがみられ（図3），これら3種が遺伝的に明らかに異なることを示している。アゼナ類では種内の変異は小さく，外来種のアメリカアゼナとタケトアゼナは在来種のアゼナより互いに遺伝的に近縁であると推定される。

ゴマノハグサ科の *Pedicularis palustris* L. subsp. *palustris* では4組のAFLPプライマーペアによって検出されたバンド262本のうち167本（64%）が多型であることから（Schmidt and Jensen, 2002），本件研究のアゼナ，アメリカアゼナおよびタケトアゼナの種内遺伝的変異は小さいと思われる。小さい種内変異は，アゼナ類の条件的閉鎖花による自殖も関与しているかも知れない

（Ikeda and Miura, 1994）。種ごとの変異量の差異には，花序や花冠の形態的な違いが自家受粉や他家受粉の割合に関わっていることもあろう（好野ら，2001）。

AFLPについての同一のAFLP表現型は，アゼナでは大阪産の2個体，対馬産の2個体，伊豆産の2個体にそれぞれみられ，アメリカアゼナではアザメの瀬産7個体，アザメの瀬産3個体と金石原産1個体，金石原産1個体と大阪産1個体，大阪3個体で，また，タケトアゼナではアザメの瀬産1個体と肥前山口産4個体でみられた。アゼナ類は一年生で種子繁殖するので，これらは同じ個体あるいは同じ親由来の子孫と推定される。同一の遺伝子型は，狭い範囲だけでなく広い範囲でも認められ，アゼナ類では地域集団間あるいは集団内変異は大きくないと推定される。種内で大きな変異を示す個体も認められたが，どれほどの変異を保有するかはさらに個体数を増やして調査する必要がある。

以上のように，アゼナ類では種内，集団内および地域集団間の多様性は小さく，地域個体群の違いを明らかにできなかったが，形態的に判別の困難な3種は遺伝的には大きく異なり，AFLP分析によって3種を識別できる。アゼナ類の日本への帰化年代は異なっており，アゼナは史前帰化（笠原，1976），アメリカアゼナは1930年代に，タケトアゼナは1960年代に帰化したと推定されている（好野ら，2002）。松浦川下流に位置する唐津菜畑遺跡の縄文時代晩期の層からは，水田雑草がイネの籾とともに発掘されており，ミズアオイやシャジクモ，スブタなどが発掘されているが，アゼナ類は見つかっていない（笠原，1982）。しかし，アゼナが古くから日本の水田に生育していたことは確実であり，帰化種とは区別する必要がある。AFLP分析からも明らかのように，自然修復過程ではアゼナ類は，歴史性の異なるものとして扱う必要がある。

遺伝的多様性の分析には近年様々な方法が使われるようになってきている。そのなかでAFLP分析はRAPD分析に比べ再現性が高く信頼性も高く，安定して多型を調べることができる。AFLP分析はRAPD分析よりもコストはかかるが，遺伝的多様性の分析に適している。アゼナ類のように変異の少ない種では，マイクロサテライトなどによって多型を検出する方法もあるが，マイクロサテライト分析にはプライマーの開発に多くの時間と労力と経費を要する。自然再生事業の現状を簡単にかつ迅速に把握できるという点で，AFLP法は優れた方法であるが，本研究では，分析の繰り返しのなかでフラグメント解析の数値にいくらかのふれ

がみられたため、分析終了後すべての波形図を比較し、そのパターンから増幅断片の相同性を判断するという操作を行っている。これは、分析の細かい手順や使用する機器あるいは分析の担い手の違いによってDNA断片長の数値が変動することを意味する。また、AFLP法では種ごとに検出バンド数が異なったように種や属による検出感度の違いも存在する。自然適性の診断のための統一的なスキルとして遺伝評価手法を確立し、汎用化を計るには、事例の蓄積と解析データのデータベース化や供覧のシステムの構築が望まれる。

本研究で得られたこれらの情報はアゼナ、アメリカアゼナ、タケトアゼナの生育を復元過程で管理する場合に有効に活用できると考えられる。

引用文献

- 荒木佐智子・安島美穂・鷺谷いづみ 2003. 土壌シードバンクを自然再生事業に活かす. 鷺谷いづみ・草刈秀紀編「自然再生事業－生物多様性の回復をめざして」, 築地書館, 187-211.
- Ikeda, E. and Miura, R. 1994. A note on the proportion of cleistogamos flowers in *Lindernia dubia* (L.) Pennell (Scrophulariaceae) in a paddy field. *Weed Research, Japan* **39**, 177-179.
- 笠原安夫 1976. 日本における作物と雑草の系譜(2). *雑草研究***21**, 49-55.
- 笠原安夫 1982. 菜畑遺跡の埋蔵種実の分析・同定研究－古代農耕と植生の復元－. 唐津市教育委員会編 菜畑：佐賀県唐津市における初期稲作遺跡の調査. 354-379.
- 国土交通省武雄工事事務所 2003. <http://www.qsr.mlit.go.jp/takeo/>
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., and Nei, M. 2001. MEGA 2.1: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- Schmidt, K. and Jensen, K. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal of Botany***87**(5), 678-689.
- 生物多様性政策研究会 2002. 「生物多様性キーワード辞典」. 中央法規, 東京.
- SPSS Inc. 2003. SPSS 12.0J for Windows Base System. SPSS Inc., Chicago.
- 鷺谷いづみ 2003. 今なぜ自然再生事業なのか, 鷺谷いづみ・草刈秀紀編「自然再生事業－生物多様性の回復をめざして」, 築地書館, 2-42.
- 山崎 敬 2003. ゴマノハグサ科. 清水建美編 日本の帰化植物. 平凡社 184-191.
- 好野奈美子・汪光熙・伊藤操子 2001. 日本産アゼトウガラシ属3草種の分類形質について－個体内開花パターンを中心に－. *雑草研究***46**(別), 142-143.
- 好野奈美子・汪光熙・伊藤操子 2002. アメリカアゼナおよびタケトアゼナにおける帰化年代および分布拡大速度の推定－標本および現地調査を元にして－. *雑草研究***47**(別), 74-75.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol.* **144**, 55-63.