

## 報 告

DNA バーコーディングで明らかにされた真鶴半島における  
ビロウ *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. (ヤシ科) の野生化

大井和之・大西 亘

Kazuyuki Ooi and Wataru Ohnishi: DNA barcoding reveals naturalization of  
*Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. (Arecaceae)  
in the Manazuru Peninsula, Kanagawa, Japan

## 緒 言

真鶴半島は相模灘に突き出た半島で、その先端部に位置する約 50 ha の通称「お林」とよばれる樹林地は、県指定天然記念物、魚つき保安林および県立自然公園として保護されており、江戸時代に植林されたクロマツのほか、暖帯性のクスノキやスダジイなどが生育する。お林では、近年シュロに似た団扇形の葉をつけるヤシ科植物の稚樹の侵入が顕著となっている。ヤシ科は熱帯～亜熱帯を中心に分布する大きなグループで、世界中に約 2,400 種が知られている。地面から幹を垂直に伸ばし、幹の先端に放射状に重なる大きな葉が特徴的な一群だが、葉の形状でいくつかのグループに分けられる他は類似の種間で顕著な識別形質に乏しく、特に稚樹の状態での形態での識別はしばしば困難である。

ヤシ科植物は日本では琉球、小笠原を中心に 6 種が自生するほか、かなりの種が街路樹や庭園樹および観賞用として栽培される（國府方，2015）。『神奈川県植物誌 2018』によると、神奈川県内にヤシ科植物の自生はないが、県内各地で栽培株の鳥散布種子由来のシュロ *Trachycarpus fortunei* (Hook.) H.Wendl. の実生の生育が記録されている。また、真鶴半島の該当植物について「真鶴半島のシャボテン公園跡地では、ワシントンヤシと言われているものが種子繁殖して周辺の樹林内に逸出状態になっている」と記載されている（神奈川県植物誌調査会，2018）。ここではワシントンヤシ *Washingtonia filifera* (Linden ex André) H.Wendl. ex De Bary が当てられているが、確実な種同定は実施されていない。複数の種類が街路樹や庭園樹として利用されており、鳥による果実の採食によって離れた場所へも種子散布されることから、逸出の可能性のある母種を絞り込むのは容易ではない。該当植物は稚樹であり、形態での同定が困難であるため、DNA を用いた分子同定（DNA バーコーディング）を実施した。DNA バーコーディングは、生物が普遍的に持つ

ている遺伝子領域の塩基配列をデータベース化し、登録されたリファレンス配列との一致により生物種を同定する方法で、芽生えや種子、葉の断片等の形態情報が不十分な標本からでも、DNA が抽出できれば分析できる。DNA バーコーディングの結果、該当の植物はシュロやワシントンヤシ、ワシントンヤシモドキ *W. robusta* H.Wendl. ではなく、ビロウ *Livistona chinensis* (Jacq.) R.Br. ex Mart. と推定された。本報告は、本州におけるビロウの野生化を初めて報告するものである。

なお、台湾から九州南部に分布するビロウは楕円形の果実を持つことから *L. chinensis* var. *subglobosa* (Hassk.) Becc. という変種にされていたが、果実の形態は連続的で区別できるものではないとして、中国南部・海南島に分布する基準変種 *L. chinensis* forma *typica* のシノニムとされた（Dowe, 2009）。DNA データバンクのビロウのリファレンス配列にも変種名の記載はなく区別できないため、本報告では *L. chinensis* として取り扱った。

## 材料と方法

2019 年 12 月 1 日に、真鶴半島お林内で確認されたヤシ科植物 1 株（図 1）から葉の先端約 10 cm を切り取り、DNA 用標本（KPM-NA0306727）とした。

DNA 用標本は冷凍保存し、IsoPlant II（ニッポンジーン）を使用してマニュアルに従って DNA 抽出を行った。抽出後の DNA は Nucleospin gDNA Clean-up kit（タカラバイオ）を使用して精製し、PCR 反応に供した。

DNA バーコーディングに用いられる国際的なデータベースである Barcode of Life Data Systems (BOLD) では、植物の DNA バーコードとして葉緑体 DNA の *rbcL* と *matK* 遺伝子領域が採用されている（Erickson *et al.*, 2010）。しかしながら、これらの領域は塩基配列の変異が比較的少ないことが知られており、同属種間では塩基配列が 100 % 一致して区別できないことが多い。そのた



図 1. DNA サンプルを採取した株 (2019 年 12 月 1 日撮影)。

め、葉緑体 DNA の遺伝子間領域 (例えば *psbA-trnH* 領域, Pang *et al.*, 2012) や核 DNA の遺伝子 (例えば PRK, RPB2, Thomas *et al.*, 2006) の塩基配列も DNA バーコーディングに用いられている。ただし、これらの領域はリファレンスとなる塩基配列が登録されていない場合も多く、また解析対象の分類群に適合した PCR プライマーを用いて分析を行う必要がある。本分析では、ヤシ科の DNA バーコーディングや分子系統解析に用いられている複数の遺伝子領域の PCR プライマーを試行したところ、表 1 に示した葉緑体 DNA の 2 領域 (*matK*, *psbA-trnH*) と核 DNA のシングルコピー遺伝子 2 領域 (CISP5, PRK) について PCR 増幅産物が得られ、その産物を用いて塩基配列を決定した。PCR 反応は KOD One (TOYOBO) を用い、温度サイクルは 94 °C 10 秒 – (98 °C 10 秒 – 55 °C 5 秒 – 68 °C 15 秒) × 35 回とした。アガロースゲル電気泳動で増幅が確認できた PCR 産物は、ExoSAP-IT (ThermoFisher LT) で余剰の dNTP 等を分解した後、PCR プライマーまたはシーケンス用インターナルプライマーを 1 つずつ用いて BigDye Terminator v3.1 でシーケンス反応を行い、3500 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、BioEdit 及び CLUSTAL W を用いてアセンブルと精査、整列を行った。系統樹の推定には最尤法を用い、塩基置換モデルとして Tamura-Nei model を、塩基置換速度の分布モデルとして Gamma distribution with Invariant sites (G+I) を使用した。系統樹の各分岐の信頼性については 500 回のブートストラップ分析により評価した。以上の計算には MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) を用いた。

表 1. 分析に使用したプライマー。\* 領域欄の \* はシーケンスプライマー、無印は PCR とシーケンス両方に使用したプライマーを示す

名称	配列	領域	出典
matKAF	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT	<i>matK</i>	Ooi <i>et al.</i> (1995)
matK8R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	<i>matK</i>	Ooi <i>et al.</i> (1995)
matK-19F	CGTTCTGACCATATTGCACTATG	<i>matK</i>	Molvrey <i>et al.</i> (2000)
trnK2R	AACTAGTCGGATGGAGTAG	<i>matK</i>	Johnson & Soltis (1994)
LivmatKintF	CCCATCCATCTGAAAATCTTGGT	<i>matK</i> *	This study
psbA_F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	<i>psbA-trnH</i>	Al-Qurainy <i>et al.</i> (2011)
trnH_R	CGCGCATGGTGGATCACAATCC	<i>psbA-trnH</i>	This study
CISP5_F	CACAGAGAAGTTAAGTGCCA	CISP5	Bacon <i>et al.</i> (2007)
CISP5_R	ATCAAGGAGTACCGTGGCAA	CISP5	Bacon <i>et al.</i> (2007)
CISP5_F011	TATTGGGTGAGTTGAGGGCA	CISP5*	This study
CISP5_R586	GTGATGGCATCCTGAAGCTG	CISP5*	This study
PRK-717F	GTGATATGGAAGAACGTGG	PRK	Lewis & Doyle (2002)
PRK-969R	ATTCCAGGGTATGAGCAGC	PRK	Lewis & Doyle (2002)

## 結果

当該ヤシ科植物 DNA から *matK* 領域 (1793 bp), *psbA-trnH* 領域 (717 bp), CISP5 領域 (612 bp), PRK 領域 (646 bp) の塩基配列を決定した。DNA データバンク (INSD) のアクセッション番号は LC589974 ~ LC589977 である (表 2)。NCBI BLAST で、カバー率 (比較対象塩基数 / 塩基長) が 80 % 以上あり相同性が高いデータベース登録配列 (リファレンス) を検索したところ, *matK* 領域は *Livistona chinensis* と *L. saribus* (Lour.) Merr. ex A.Chev. の 2 種と 100 % 一致し, *psbA-trnH* 領域は *L. chinensis* と 100 % 一致した。CISP5 領域は *L. chinensis*, *L. saribus*, ノコギリヤシ *Serenoa repens* (W.Bartram) Small の 3 種が 100 % 一致であった。PRK 領域は 100 % 一致するリファレンスがなく, 最も相同性が高いのは *Johannesteijsmannia* 属の 3 種で 97.84 % 一致していた (表 2)。また, *psbA-trnH*

領域の分子系統樹を図 2 に, CISP5 領域の分子系統樹を図 3 に示す。

BOLD system による *matK* 遺伝子領域の DNA バーコーディングでは, システムが解析に用いる最大塩基長が 1300 bp (カバー率 72.5 %) であるため, 100 % 一致したものが *Livistona* で 10 種あったが, このうちの 8 種は NCBI BLAST の登録配列全長 (カバー率 93 % 以上) の比較では 1-4 塩基の相違があった。また, ワシントンヤシ属は 4 塩基違いの 99.77 % 一致, シュロは 7 塩基違いの 99.60 % と長い塩基配列を解析しても違いはわずかであった。葉緑体 DNA の遺伝子間配列 (IGS) である *psbA-trnH* 領域では *Livistona chinensis* の登録配列と 100 % 一致し, 他に 100 % 一致するリファレンス配列はなかった。*psbA-trnH* 領域は葉緑体ゲノム LSC 領域の逆位反復配列 (IR) に近い位置にあり, 挿入欠失が多いほか, 短い逆位反復配列によるループ構造が認められる。この

表 2. 塩基配列解析と相同性検索結果。一致度は一致する塩基数 / 比較対象塩基数で求めた

塩基配列解析結果			BLAST 検索結果上位配列		
領域	Accession No.	塩基長	Acc. No.	種名	一致度
matK	LC589974	1793 bp	AM114574	<i>Livistona chinensis</i>	100% (1775/1775)
			HQ720335	<i>L. chinensis</i>	100% (1690/1690)
			HQ720336	<i>L. saribus</i>	100% (1668/1668)
			HQ720341	<i>L. fulva</i>	99.9% (1729/1730)
			HQ720342	<i>L. inermis</i>	99.9% (1729/1730)
			HQ720344	<i>L. lorophylla</i>	99.9% (1729/1730)
			HQ720343	<i>L. mariae</i>	99.9% (1711/1712)
			HQ720345	<i>L. benthamii</i>	99.9% (1710/1711)
			HQ720334	<i>L. nasomophila</i>	99.9% (1680/1681)
			HQ720339	<i>L. concinna</i>	99.9% (1710/1712)
			HQ720340	<i>L. nitida</i>	99.8% (1739/1743)
			AM114586	<i>Washingtonia robusta</i>	99.8% (1771/1775)
			HQ720328	<i>W. filifera</i>	99.8% (1716/1720)
			AM114570	<i>Trachycarpus fortunei</i>	99.6% (1747/1754)
psbA-trnH	LC589975	717 bp	AB331261	<i>Livistona chinensis</i>	100% (709/709)
			GU135381	<i>L. chinensis</i>	100% (584/584)
			MK756443	<i>L. chinensis</i>	98.5% (672/682)
			MK756449	<i>L. speciosa</i>	98.5% (672/682)
CISP5	LC589976	612 bp	HQ720794	<i>Livistona chinensis</i>	100% (612/612)
			HQ720793	<i>L. chinensis</i>	100% (567/567)
			HQ720806	<i>L. saribus</i>	100% (612/612)
			HQ720834	<i>Serenoa repens</i>	100% (577/577)
			HQ720798	<i>L. jenkinsiana</i>	99.3% (608/612)
			HQ720799	<i>L. lanuginosa</i>	99.2% (523/527)
PRK	LC589977	646 bp	KF991988	<i>Johannesteijsmannia magnifica</i>	97.8% (632/646)
			KF991725	<i>J. altifrons</i>	97.8% (632/646)
			KF991681	<i>J. lanceolata</i>	97.8% (632/646)

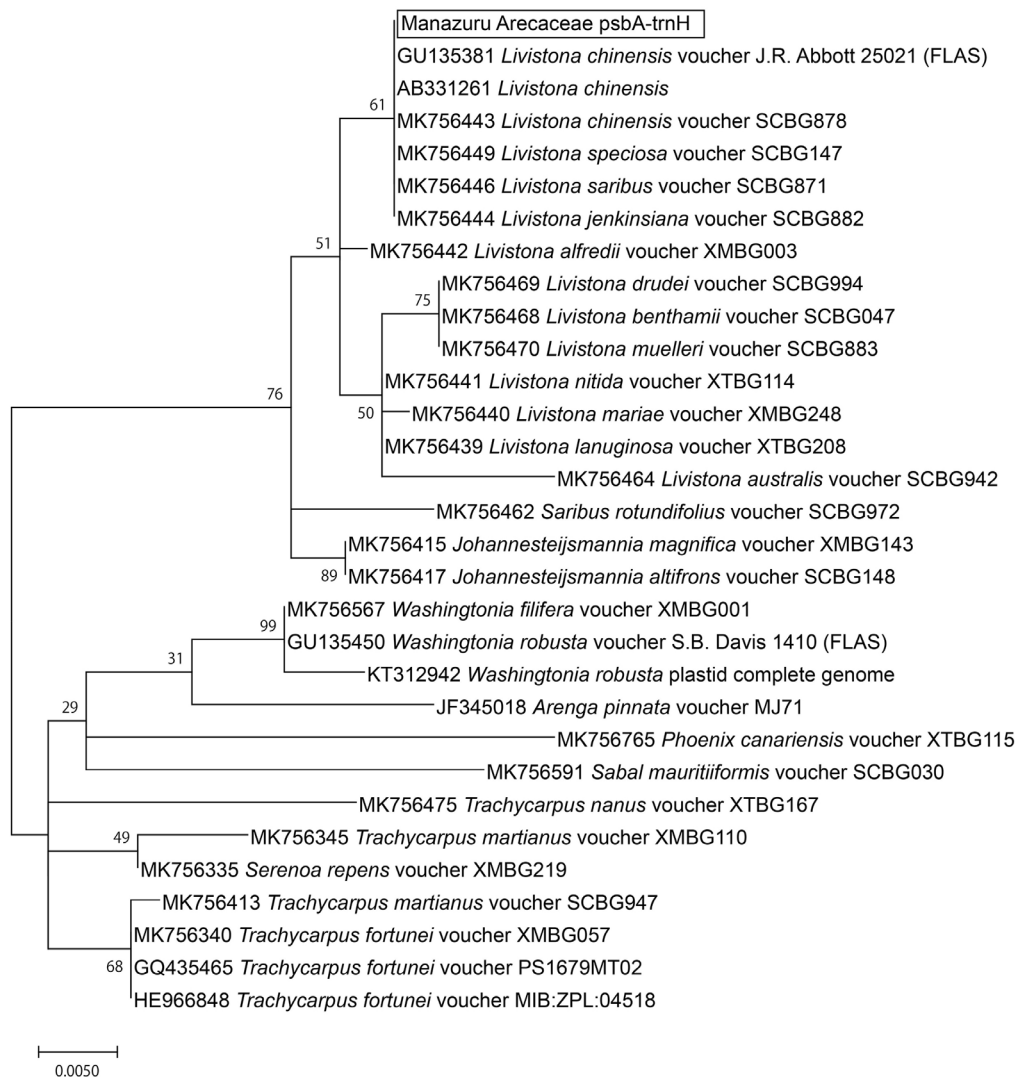


図2. *psbA-trnH* 領域の最尤法による分子系統樹 (各枝の数字はブートストラップ支持確率). 本研究の試料は枠囲みで示した.

ループ構造の10塩基が逆転しただけで他の塩基配列が完全に一致するリファレンス配列が、*L. chinensis* で1配列 (MK756443) と *L. saribus*, *L. jenkinsiana* Griff., *L. speciosa* Kurz の3種であった。核DNAの機能不明遺伝子イントロンであるCISP5領域でも複数種と同一配列となったが、ワシントンヤシ属やシュロ属のリファレンス配列とは94-97%程度の一致率で明確に異なっていた。PRK領域は、ヤシ科の分子系統解析によく用いられている (Roncal *et al.*, 2008, Baker *et al.*, 2011) が、*Livistona* 属や近縁属のリファレンス配列が少なく本試料の種同定には使えなかった。ただし、PRK領域についても福岡市西公園に植栽されているビロウのDNAサンプルから同一配列を得ている (大井・山口, 未発表)。

以上から、今回分析したヤシ科植物はビロウと判定した。インドシナに分布するビロウの近縁種 *L. saribus* も、リファレンスが得られている *matK*, *psbA-trnH*, CISP5 の3領域の塩基配列は、*psbA-trnH* の逆位を除くと100%一致となるが、本種が真鶴半島に植栽され、生育している可能性は低いであろう。

## 考 察

今回解析した遺伝子領域において、供試個体はビロウに最も合致したが、配列が類似した種間の塩基配列の差異が少ない傾向にあった。このことはヤシ科植物が比較的近年に急速な多様化を遂げた分類群であり、種間の分岐の深い他分類群と比較して、種間のDNA配列の違いは少ない傾向にあることを反映したものと考えられる (Hahn, 2002)。このため、1遺伝子領域だけでは1種に絞ることが難しく、複数領域の塩基配列情報が必要であった。今回分析した領域では *psbA-trnH* 領域とCISP5領域の2つが、比較的塩基配列の変異が多くリファレンス配列の登録数も多いため、ヤシ科植物の種レベルの同定に有用であった。

ビロウは、東アジアの亜熱帯地域 (中国南部～琉球) が原産とされるが、フロリダ、ハワイ、カリブ海のバーミューダやインド洋のモーリシャス等で野生化しており、侵略的外来植物として在来の植生に悪影響を与える可能性が指摘されている (CABI Invasive Species

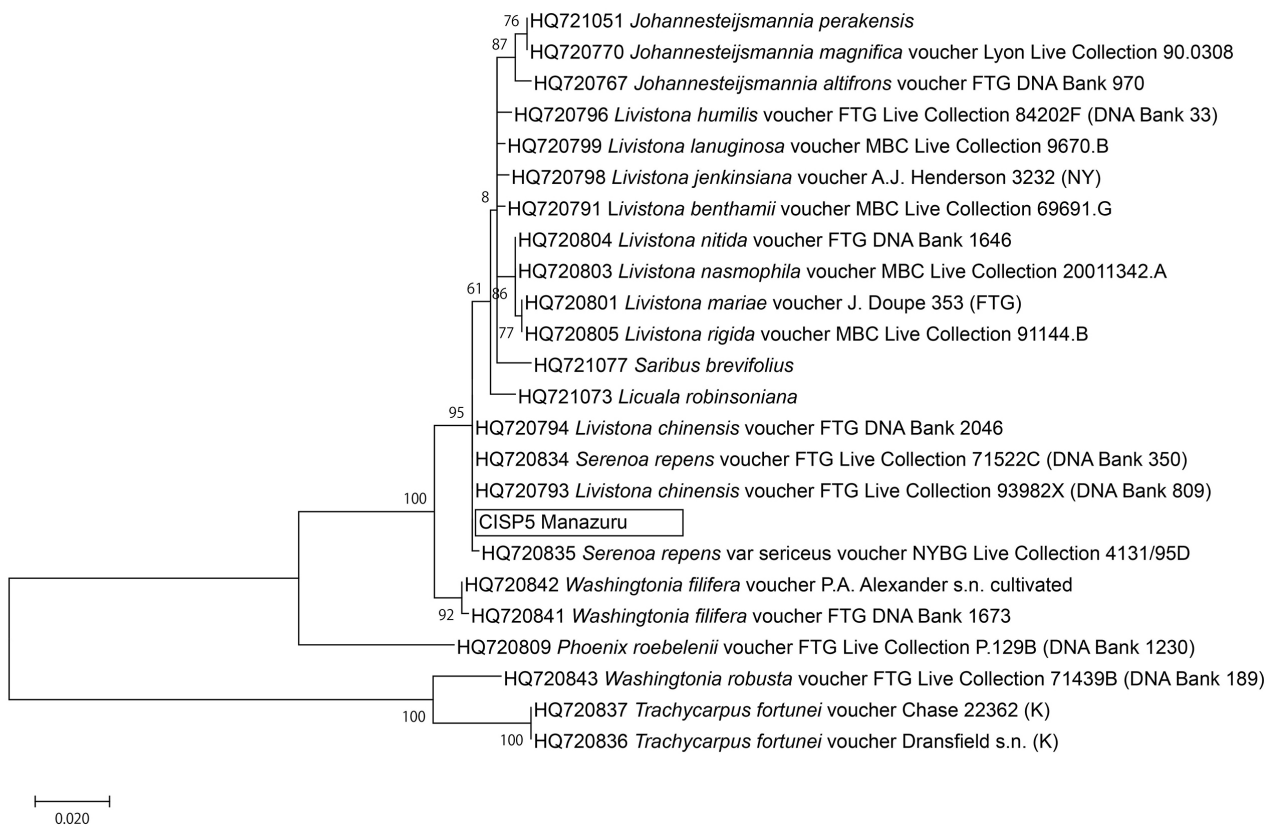


図3. CISP5 領域の最尤法による分子系統樹 (各枝の数字はブートストラップ支持確率). 本研究の試料は枠囲みで示した.

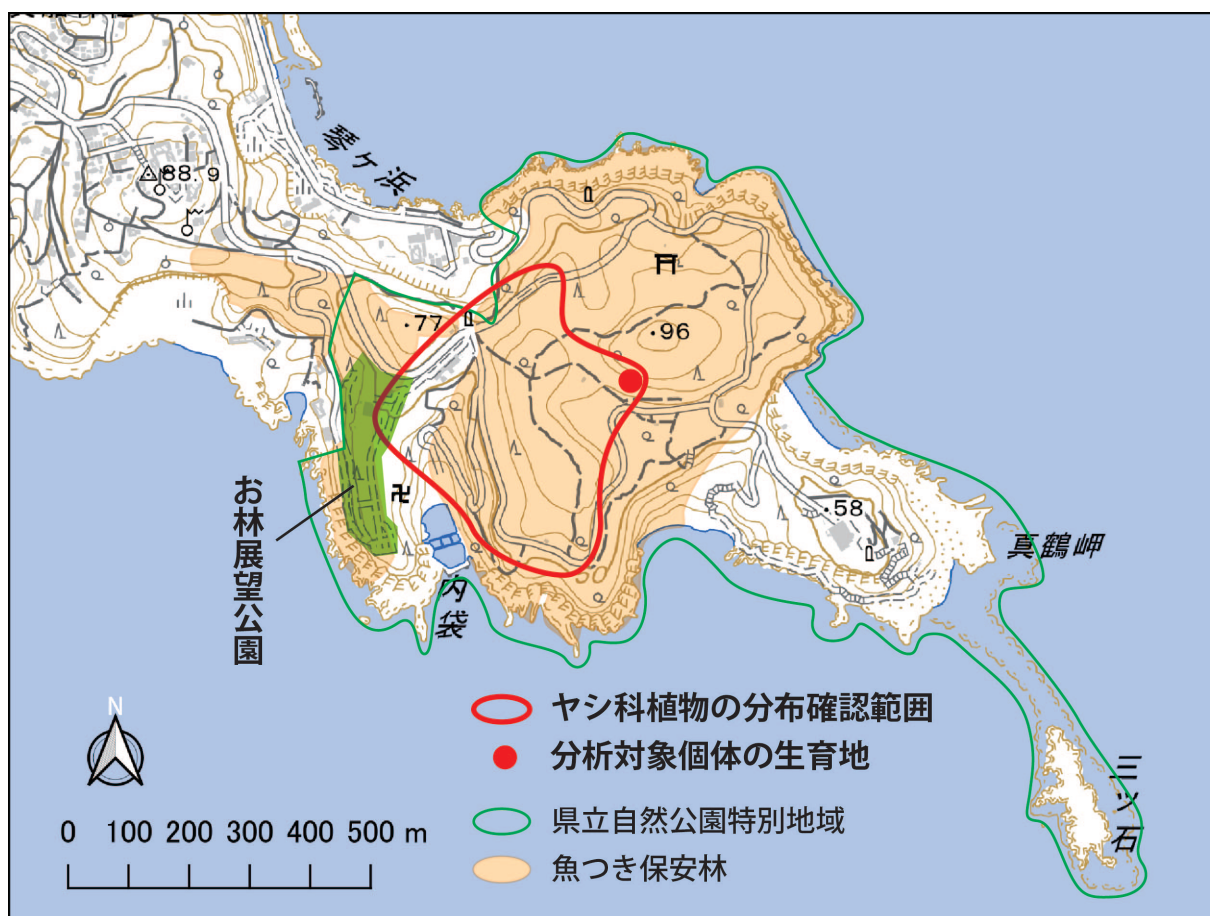


図4. お林におけるヤシ科植物稚樹の分布確認範囲 (地理院タイルに加筆して作成).

Compendium)。本種は自殖可能な両性花をつけ、結実率も発芽率も高いことが知られている (Dowe, 2009)。直立する幹の高さが 5 m 程度になれば花序をつけ、果実は鳥や哺乳類によって種子散布される。海岸から標高 600 m まで分布し、土壌に関する選好性もなく、幼植物は被陰にも強い (CABI Invasive Species Compendium)。このように、本種は野生化しやすい条件を備えている。国内では関東以南の暖地で公園樹や街路樹として露地栽培されるが、国内の自生地北限は福岡県宗像市の沖ノ島とされ、主な生育地は九州中南部以南の沿海地や島しょ部である。四国にも足摺岬付近や愛媛県南部の離島で限定的ながら分布が報告されている (Yoshida *et al.*, 2000)。しかし、これまでに本州でのピロウの生育や野生化は報告されていなかった。

今回の DNA バーコーディングによる同定結果が得られた後、周辺地域でのピロウの探索を行った (図 4)。今回のピロウと同様の幹が成長していない 1–2 m の掌状葉をつけたヤシ科植物稚樹はお林の西半分のエリアに点々と 25 株ほどが生育していた。また、お林の西側に隣接する「お林展望公園」に樹高 10 m 弱のピロウと思われる成木が植栽されていることを確認した。お林展望公園の敷地は、1963 年から 2004 年初まで営業していた「真鶴サボテンランド」の跡地であり、この木はサボテンランド時代に植栽されたものと考えられる。この木がお林内に広がる稚樹の親木の可能性もあるが、結実を確認できていない。また、鳥による種子散布が考え得る周辺地域にはお林展望公園以外にもピロウの植栽があり得ることから、お林内の稚樹の由来については、さらなる調査とマイクロサテライト遺伝子多型等を用いた分析を要すると考えられる。

## 謝 辞

調査にあたりお世話になった真鶴町産業観光課に感謝の意を表す。

## 引用文献

- Al-Qurainy, F., S. Khan, F. M. Al-Hemaid, M. A. Ali, M. Tarroum & M. Ashraf, 2011. Assessing molecular signature for some potential date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia, based on chloroplast DNA sequences rpoB and psbA-trnH. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**: 6871–6880.
- Bacon, C. D., F. A. Feltus, A. H. Paterson & C. D. Bailey, 2007. Novel nuclear intron-spanning primers for Arecaeae evolutionary biology. *Molecular Ecology Notes*. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01928.x
- Baker, W. J., M. V. Norup, J. J. Clarkson, T. L. P. Couvreur, J. L. Dowe, C. E. Lewis, J.-C. Pintaud, V. Savolainen, T. Wilmot & M. W. Chase, 2011. Phylogenetic relationships among arecoid palms (Arecaceae: Arecoidae). *Annals of Botany*, **108**: 1417–1432.
- CABI Invasive Species Compendium, 2020. *Livistona chinensis* (Chinese fan palm). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/31059> (accessed on 2020-October-7).
- Dowe, J. L., 2009. A taxonomic account of *Livistona* R. Br. (Arecaceae). *Gardens' Bulletin Singapore*, **60**(2): 185–344.
- Erickson, D. L., J. Spouge, A. Resch, L. A. Weigt & W. J. Kress, 2010. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current Science*, **99**: 1530–1541.
- Hahn, W. J., 2002. A molecular phylogenetic study of the Palmae (Arecaceae) based on atpB, rbcL, and 18S nrDNA sequences. *Systematic Biology*, **51**: 92–112.
- Johnson, L. A. & D. E. Soltis, 1994. matK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany*, **19**: 143–156.
- 神奈川県植物誌調査会編, 2018. 神奈川県植物誌 2018 電子版. 神奈川県植物誌調査会, 小田原. <http://flora-kanagawa2.sakura.ne.jp/efloraofkanagawa.html> (accessed on 2020-October-6).
- 國府方吾郎, 2015. ヤシ科. 大橋広好・門田裕一・邑田 仁・米倉浩司・木原 浩編, 改訂新版日本の野生植物 1, pp. 261–264. 平凡社, 東京.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz & K. Tamura, 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, **35**: 1547–1549.
- Lewis, C. E. & J. J. Doyle, 2002. A phylogenetic analysis of tribe Arecaeae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution*, **236**: 1–17.
- Molvray, M., P. J. Kores & M. W. Chase, 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. In Wilson, K. L. & D. A. Morrison, (eds.), *Monocots: systematics and evolution*, pp. 441–448. CSIRO Publishing, Collingwood.
- Ooi, K., Y. Endo, J. Yokoyama & N. Murakami, 1995. Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene matK from angiosperm plants. *Journal of Japanese Botany*, **70**: 328–331.
- Pang, X., C. Liu, L. Shi, R. Li, D. Liang, H. Li, S. S. Cherny & S. Chen, 2012. Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PLoS ONE*, **7**(11): e48833. DOI: 10.1371/journal.pone.0048833
- Roncal, J., S. Zona & C. E. Lewis, 2008. Molecular phylogenetic studies of Caribbean palms (Arecaceae) and their relationships to biogeography and conservation. *Botanical Review*, **74**: 78–102.
- Thomas, M. M., N. C. Garwood, W. J. Baker, S. A. Henderson, S. J. Russell, D. R. Hodel & R. M. Bateman, 2006. Molecular phylogeny of the palm genus *Chamaedorea*, based on the low-copy nuclear genes PRK and RPB2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**: 398–415.
- Yoshida, N., R. Nobe, T. Yamada, K. Ogawa & Y. Murooka, 2000. Origin of fan palm (*Livistona chinensis* R. Br. var. *subglobosa* Becc.) in Aoshima, Japan. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**: 447–452.

大井和之：一般財団法人九州環境管理協会；大西 亘：  
神奈川県立生命の星・地球博物館

(受領 2020 年 10 月 30 日；受理 2021 年 1 月 28 日)