

兵庫県南東部での無融合生殖種セイヨウタンポポの 遺伝子型多型とクローンの地理分布

鈴木 武¹⁾・橋本佳延²⁾・武田義明²⁾・永吉照人¹⁾

Genotype Polymorphism of Agamosperous *Taraxacum officinale* Weber and Geological Distributions of Clones in Southeastern Area of Hyogo Prefecture, Japan

Takeshi SUZUKI¹⁾, Yoshinobu HASHIMOTO²⁾, Yoshiaki TAKEDA²⁾
and Teruto NAGAYOSHI¹⁾

Abstract

Genotype polymorphism in agamosperous *Taraxacum officinale* Weber was investigated among 9 populations in the southeastern area of Hyogo Prefecture. Seven clone types were distinguished by 8 polymorphic enzyme loci. Each population has a dominant clone type. "Sanda" clone type is dominant among populations in the North of Rokko mountains, while "Rokko 1" and "Rokko 2" are so in the South. Based on multivariate statistical analysis of frequencies of clones, three clusters were recognized: populations of cluster 1 distribute in the North of Rokko mountains, and cluster 2 and 3 in the South of Rokko mountains.

Key words : agamospermy, allozymes, clonal diversity, genotype polymorphism, isozymes, *Taraxacum officinale* Weber

はじめに

1970年代になって、カントウタンポポ *Taraxacum platycarpum* Dahlst., カンサイタンポポ *Taraxacum japonicum* Koidz.などの日本在来の二倍体有性生殖のタンポポが都市部で減少するとともに、無融合生殖（いわゆる単為生殖）を行う三倍体帰化種のセイヨウタンポポ *Taraxacum officinale* Weber やアカミタンポポ *Taraxacum laevigatum* DC.が市街地や都市周辺部で増加していることが注目されるようになってきた（堀田 1977）。生態的な特性の比較や各地で行われた分布調査の結果から、帰化タンポポの増加は人間の自然環境に対する攪乱の程度と密接な関係があり、環境指標として非常に有効であると考えられている（堀田 1977; Ogawa and Mototani 1991）。

一方で、さまざまな無融合生殖を行う植物で酵素多型

などを用いた研究が行われ、オオバノイノモトソウ *Pteris cretica* L. (Suzuki & Iwatsuki, 1990) やヤブマオ類 *Boehmeria* (Yahara, 1990) では無融合生殖型のかに多数のクローン報告されている。タンポポ類では日本産のエゾタンポポ *Taraxacum venustum* H.Koidz. (Akhter et al., 1993)などで複数のアロザイムを用いて、多数のクローンが含まれることが示されている。ヨーロッパのセイヨウタンポポ類でもきわめて多くのクローンがあることがわかってきた（den Nijs and Menken, 1989）。

セイヨウタンポポはすべて同じと見なされて日本在来の有性生殖種と対比した様々な生態学的研究で用いられてきた（Ogawa, 1978; Sawada et al., 1982）が、日本でのセイヨウタンポポについても遺伝子型多型（クローン多型）を検討した上で、分布や生育環境を関連させた議論がなされるべきである。

¹⁾ 兵庫県立人と自然の博物館 生物資源研究部 Division of Biological Resources, Museum of Nature and Human Activities, Hyogo, Yayoigaoka 6, Sanda, 669-1546 Japan

²⁾ 神戸大学 発達科学部 Division of Science for Biology and Environment, Faculty of Human Development, Kobe Univ. Tsurukabuto 3-11, Nada-ku, Kobe, 657-0011 Japan

渡邊ほか(1997)はアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AAT)の遺伝子多型から見かけのセイヨウタンポポには少なくとも4つのクローンがあることを示しており、日本産のタンポポとの雑種の可能性も示唆している。しかしながら、セイヨウタンポポの遺伝子型多型を把握して、より多くのクローンを識別するには複数の遺伝子座を用いるべきである。

そこで、本研究では兵庫県南東部において8つの酵素遺伝子座を用いてセイヨウタンポポの遺伝的変異を調べて、遺伝的に異なるクローンを識別し、その分布との関連について調べた。

材料および方法

1. 調査地

材料のセイヨウタンポポは、三田市フラワータウン、神戸市灘区鶴甲3丁目神戸大学発達科学部六甲台キャンパス、神戸市灘区六甲台町神戸大学周辺、西宮市夙川沿岸、宝塚市仁川、神戸市北区有野台、神戸市東灘区六甲アイランド、神戸市北区星和台、神戸市灘区神戸大学鶴甲1丁目鶴甲キャンパスの9地域で採集した(Table 1)。特に、三田市フラワータウンと神戸市灘区六甲台キャンパスで集団内でのセイヨウタンポポの遺伝子型多型(クローン多型)を集中的に調べた。

2. 試料の採集

試料採取は1998年4月下旬から1998年11月下旬に行った。北村(1981)と長田(1989)に従い、頭花の外総苞片が反曲し、瘦果が黄褐色であるものをセイヨウタンポポとして、在来のカンサイタンポポ、瘦果の赤い帰化種のアカミタンポポと区別した。調査地内で試料採取地点が偏らないように採取地点を選んで、少なくとも2m以上は離れるようにして個体を選んだ。頭花・瘦果・葉を同時にもつ個体の葉1枚を資料として採取し、冷蔵保存して実験室に持ち帰った。

フラワータウンにて103個体、六甲台キャンパスにて

52個体、残りの地域ではそれぞれ20個体前後を採取した(Table 1)。

3. 酵素電気泳動法

抽出緩衝液はGottlieb(1981)を用いた:100mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA/4Na, さらに5% (w/v) PVP (Sigma 40T), 0.3% (v/v) 2-メルカプトエタノールを加えた。生葉の葉先から2cmまでの部分を取り、少量の石英砂、ミクロスパーテル1杯分のDowex Clを加え、乳棒で素早くすりつぶした。1.5mlのマイクロチューブで遠心して、得られた上澄み液を電気泳動に用いた。

電気泳動には、デンブングルとアクリルアミドを用いた。デンブングル電気泳動ではSoltis et al. (1983)の#8の不連続緩衝液系(#8系)、#10のTEB連続緩衝液系でゲル緩衝液を電極緩衝液の4倍希釈とした系(TEB系)、Cardy et al. (1981)のヒスチジン-クエン酸連続緩衝液系PH6.5(HIS系)の3つの緩衝液系を用いた。アクリルアミドゲル電気泳動は、白石(1987)による平板垂直電気泳動法に従った。

以下の酵素の活性染色はSoltis et al. (1983)の方法に従った:グルコン酸-6-リン酸脱水素酵素(6PGD), アコニット酸水添加酵素(ACO), アルコール脱水素酵素(ADH), グルタミン酸脱水素酵素(GDH), イソクエン酸脱水素酵素(IDH), ロイシルアミノペプチダーゼ(LAP), リンゴ酸脱水素酵素(MDH), リンゴ酸酵素(ME), グルコースリン酸異性化酵素(PGI), グルコースリン酸ムターゼ(PGM), シキミ酸脱水素酵素(SKD), トリオースリン酸異性化酵素(TPI)。ただしアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AAT)はWatano(1988)の方法に従った。LAP, PGI, TPIは#8系デンブングルで、6PGD, IDH, ME, PGMはHISデンブングル系で、ACO, ADH, MDHはTEB系デンブングルで、AAT, GDH, SKDはアクリルアミドゲルでそれぞれ泳動した後に染色した。

得られたザイモグラムからのアイソザイムと遺伝子型

Table 1. Localities of sample populations of *T. officinale*. Destinations are corresponded to Fig.2. See Fig.2 for locations of sample population.

	Locality	No. of individuals
a	Flower town, Sanda City	103
b	Rokkodai Campus, Kobe Univ. ,Nada, Kobe City	52
c	Around Kobe Univ., Nada, Kobe City	23
d	along Syukugawa River, Nishinomiya City	25
e	Nigawa, Takarazuka City	20
f	Arinodai, Kita, Kobe City	19
g	Rokko Island, Higashi-nada, Kobe City	22
h	Seiwadai, Kita, Kobe City	21
i	Tsurukabuto Campus, Kobe Univ., Nada, Kobe City	25

の解釈は Weeden and Wendel (1989) に従った。同一酵素に複数のアイソザイムがある場合には、より陽極側に泳動したアイソザイムから順に、PGI-1, PGI-2のようにアイソザイム名をつけた。また、アロザイム多型と判断される場合には、単量体酵素ではより陽極側のバンドからa,b,c,...とし、多量体酵素ではより陽極側のホモ多量体バンドからa,b,c,...とした。

4. クラスタ分析

クローン頻度から調査地点の類似性を明らかにするために、UPGMA法によりクラスタ解析を行った (Manly, 1992)。調査地点間の距離dは、調査地点のクローン頻度に基づき、式により求めた (Manly, 1992)。

$$d = 1 - \frac{\sum p_{1i} * p_{2i}}{\sqrt{(\sum p_{1i}) * (\sum p_{2i})}}$$

(p_{1i} , p_{2i} はそれぞれ集団1, 2におけるi番目のクロンの頻度)

結 果

1. クロンの識別

用いた13酵素のうち、明瞭なバンドパターンを示したのは6PGD-2, AAT, GDH, IDH, LAP, MDH, PGI-2, PGM-2, SKD, TPI-1, TPI-2の10酵素11アイソザイムであった。Fig.1にザイモグラムの模式図を示した。これらのうち6PGD-2, AAT, GDH, LAP, PGI-2, PGM-2, SKD, TPI-2の8つのアイソザイムが多型であった。

今回は倍数性を確認していないため、表現型に基づく遺伝子型の解釈は行っていないが、明らかに複数の対立遺伝子がある6PGD-2, GDH, LAP, PGI-2, PGM-2,

では、a, ab, bcなどのように表現型として表記した。特にTPI-2では、相対的なバンドの濃さが異なるパターンがあったので、aab,abbとして区別した。対立遺伝子の解釈ができなかったAAT, IDH, MDH, SKDについては、各バンドパターンをA,B,...として区別して用いた。

今回、多型の検出された8つのアイソザイムすべてに同一のパターンを示す個体は同一の遺伝子型をもつクローンとして識別して、「六甲1」のように出現した調査地名と番号を組み合わせることで区別した。

全体では「六甲1型」、「六甲2型」、「三田型」、「星和型」、「夙川1型」、「夙川2型」、「夙川3型」の7つのクローンが識別できた。各クローンの遺伝子型または表現型をTable 2に示す。このように、兵庫県南東部でもセイヨウタンポポには複数のクローンが存在していることが明らかになった。

2. クロンの分布

調査地点ごとにクローン組成を調べた結果はFig. 2に示されている。すべての地点で、複数のクローンが検出された。しかし、詳細に調べたフラワータウンでは約95%が三田型、六甲台キャンパスでは約96%が六甲1型であり、すべての調査地点で複数のクローンがあるものの、頻度の高い特定のクローンが存在していた。

クローンの分布を見てみると、三田型は六甲山の北側に多く、六甲山の南側には六甲1型、六甲2型のクローンが多い傾向が見られた。

さらにManly (1992)の方法による距離 (Table 3) からクラスタ分析を行ったところ、UPGMAによる樹状図 (Fig. 3) が得られた。これからクラスタ1 (フラワータ

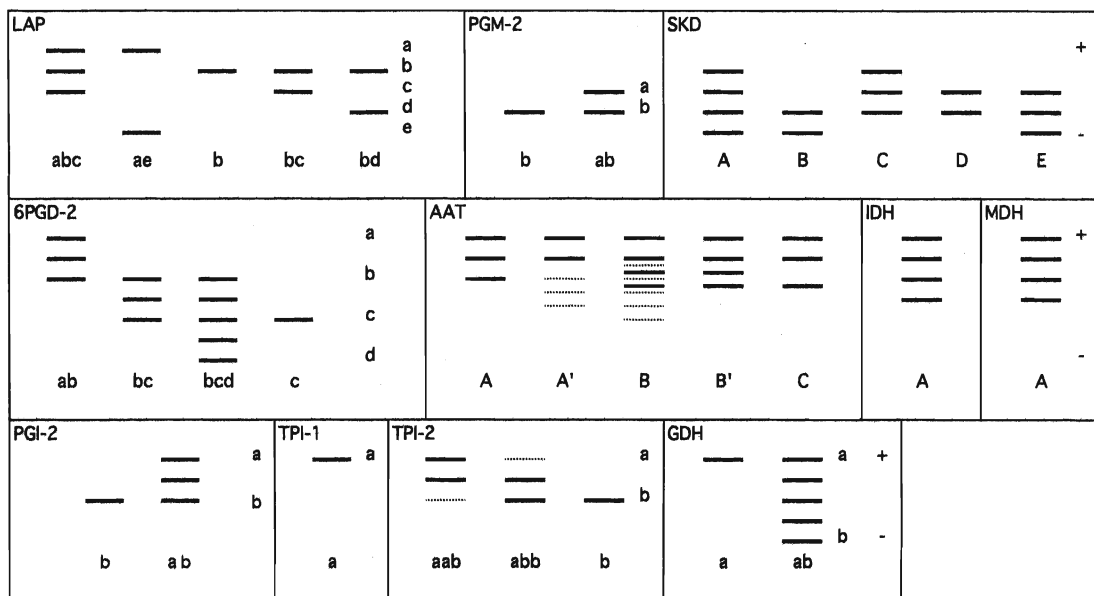


Fig. 1. Schematic zymograms of 11 isozymes at 10 enzymes in *T. officinale*.

Upper side in this figure is toward the anode at electrophoresis. At AAT and TPI-2, faint bands are shown by dotted lines.

ウン、有野台、星和台)、クラスター2(夙川沿岸、六甲アイランド)、クラスター3(六甲台キャンパス、神戸大学周辺、仁川、鶴甲キャンパス)の3つのクラスターが識別された。クラスター1に属する調査地では三田型、クラスター2では六甲2型、クラスター3では六甲1型の頻度が高く、3つのクラスターはこれを反映したものと考えられる。またクラスター1の調査地は六甲山系の北側に、クラスター2の調査地は六甲山の南麓、クラスター3の調査地

は臨海部に位置しており (Fig. 2)、クラスターと地理的分布との関連性がある、つまりはそれぞれで頻度の高いクローン(三田型・六甲1型・六甲2型)の地理的分布が異なっていることを反映していると思われる。

考 察

本研究では8遺伝子座のアロザイム多型の基づいて、

Table 2. Phenotypes of clones of *T. officinale* at 8 polymorphic enzyme loci. See Fig. 1.

Clone name	Isozyme							
	6PGD-2	AAT	GDH	LAP	PGI-2	PGM-2	SKD	TPI-2
Rokko1	bc	B'	a	bd	b	b	C	aab
Rokko2	bc	A'	a	bd	b	b	A	aab
Sanda	ab	A	a	ae	b	b	A	abb
Seiwa	ab	C	a	ae	b	b	A	abb
Syukugawa 1	bc	B	a	bd	ab	ab	E	aab
Syukugawa 2	bcd	A'	ab	b	b	b	A	b
Syukugawa 3	c	A'	a	bc	b	b	B	abb

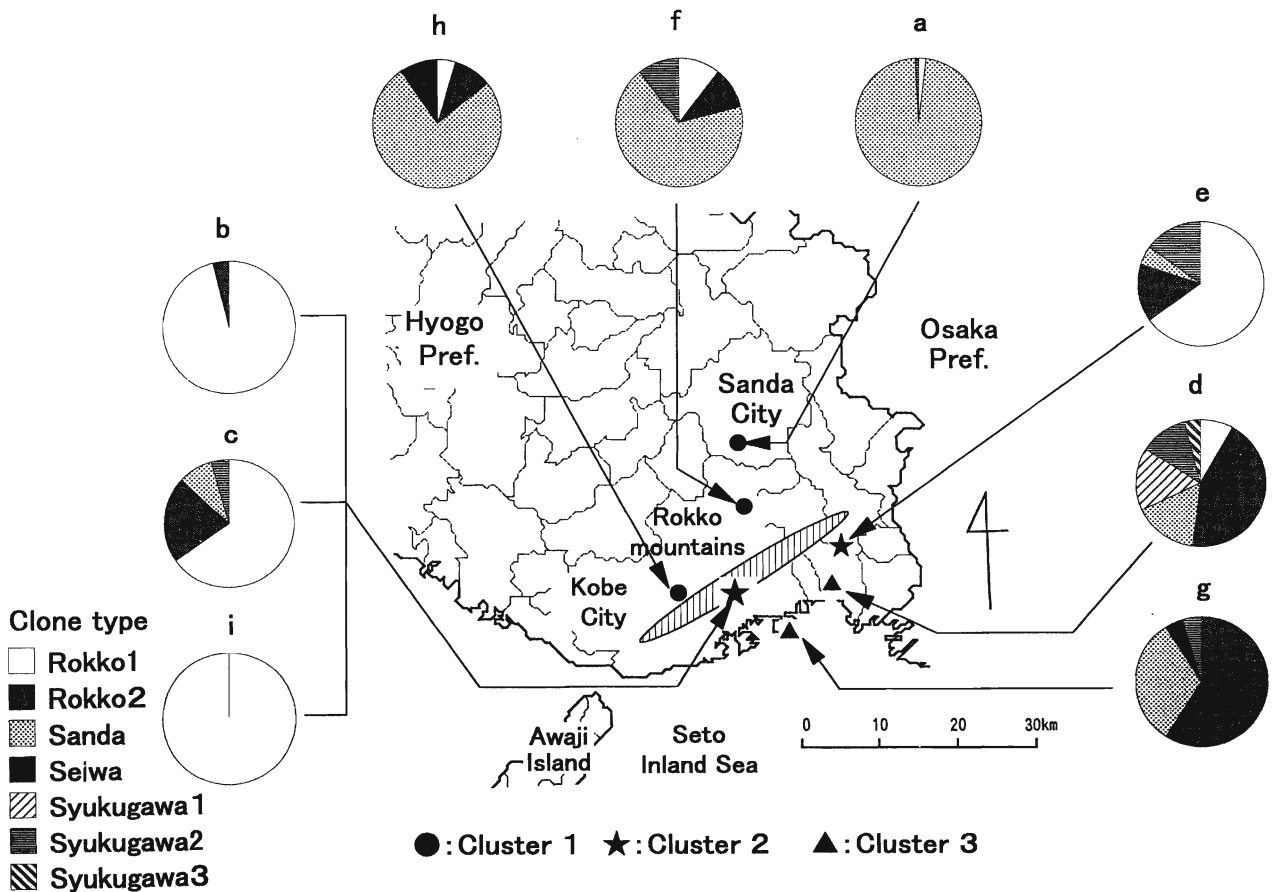


Fig. 2. Frequencies of 7 Clones of *T. officinale* in 9 populations.

See Table 1 for the locality names and sample sizes. Hatched area shows Rokko mountains.

兵庫県南東部でもセイヨウタンポポには複数のクローンが存在していることが示した。

複数のクローンが存在する原因として以下の2つが考えられる。まずは、ヨーロッパなどの原産地ではセイヨウタンポポが複数のクローンがあることが知られており (den Nijs and Menken, 1989), それらに由来するクローンが日本に複数侵入したことが考えられる。

次いで、セイヨウタンポポと日本在来のタンポポとの間に雑種が形成された可能性がある。Morita et al. (1990) は複数の酵素遺伝子座を用いて遺伝子型がはっきりしている在来タンポポと帰化タンポポを親として交配実験を行い、低頻度ではあるが雑種が得られることを示している。また渡邊ら (1997) は愛知県での見かけのセ

イヨウタンポポをAATの酵素遺伝子座で調べて、その約9割が雑種であるとしている。

しかし本研究ではAATのバンドパターンは不明瞭であり、渡邊ら (1997) のように識別できなかった。しかしながら、AATでのCやD (Fig. 2参照) はAと比べて複雑なパターンであり、より複数の対立遺伝子の関与を示唆しており、渡邊ら (1997) が報告している雑種タンポポに相当するのかもしれない。雑種の問題についてはさらに複数の酵素マーカーや母型マーカーとなる葉緑体DNAなどを用いてさらに詳しく調査する必要がある。

また、本研究は地理的分布の異なるクローンが存在することも示した。クローン間で分布が異なる原因にはどのようなものが考えられるだろうか。まずは、侵入経路

Table 3. Distances based on clone frequencies among populations of *T. officinale*.

	Rokkodai Campus	Around Kobe-Univ.	Syukugawa	Nigawa	Arinodai	Rokko Island	Sewadai	Turukabuto Campus
Flower Town	0.980	0.855	0.685	0.906	0.030	0.528	0.016	0.980
Rokkodai Campus	---	0.049	0.811	0.044	0.846	0.965	0.934	0.001
Around Kobe-Univ.	---	---	0.535	0.018	0.683	0.662	0.781	0.061
Syukugawa	---	---	---	0.594	0.517	0.092	0.582	0.845
Nigawa	---	---	---	---	0.724	0.759	0.843	0.052
Arinodai	---	---	---	---	---	0.404	0.023	0.851
Rokko Island	---	---	---	---	---	---	0.420	1.000
Sewadai	---	---	---	---	---	---	---	0.939

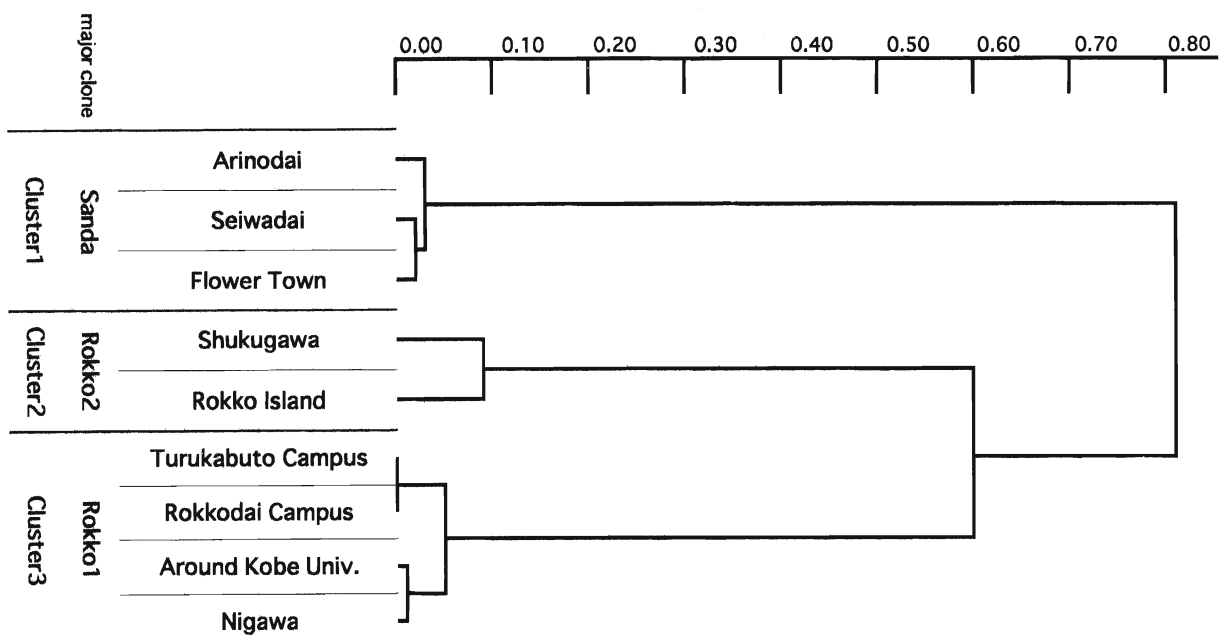


Fig. 3. UPGMA dendrogram of populations of *T. officinale* based on distances shown in Table 3.

が異なる可能性がある。つまり、六甲山系の北側と南側に最初に異なるクローンが侵入して、それぞれの場所で無融合生殖で急速に子孫を増やしたものの、六甲山系が障害となって、拡散できない可能性である (Fig. 2)。

もう一つは、クローンによって生態的特性が異なる可能性である。そのため、気温などの気候条件や都市開発の経過年数などの環境条件が異なる六甲山系の南と北や海沿いにおいて、適応するクローンが異なることは考えられる。Vavrek (1998) は、分子マーカーによる検討はしていないものの、形態の大きく異なる5つの遺伝子型(クローン)をオオバコなどの競合する雑草とともに栽培して、クローン間で成長速度に差異があることを示しており、兵庫県南東部でも、クローンにより環境への適応が異なる可能性は十分にある。

検証には、より多数の広範な地域でのクローン分布を調べるとともに、複数のクローンが高い頻度存在する場所で細かい分布を調べて、生育立地との関係を調べたり、さまざまな栽培条件下でのクローンごとの生態特性を比較することが必要であろう。

本研究では兵庫県南東部において、セイヨウタンポポには複数のクローンが存在し、地理的分布も異なる傾向があることがわかった。今後、セイヨウタンポポの生態的特徴の調査にあたっては、遺伝子型多型(クローン多型)があることに注意しなければならない。

謝 辞

本研究の過程で多大なるご協力をいただいた姫路工業大学自然・環境研究所の服部保教授、実験時に手伝っていただいた神戸大学大学院総合人間科学研究科植生研究室(現アルバック)の吉田久視子氏に厚く御礼申し上げます。本研究に関して、文部省科学研究費奨励研究(A)「都市ビオトープにおける在来植物の遺伝子多様性の保全の研究」(No. 10780343) および兵庫県立人と自然の博物館総合共同研究「六甲山系」による援助を鈴木武が受けている。

文 献

- Akhter, S., Morita, T., and Yoshida, Y. (1993) Clonal diversity in the agamosperous polyploids of *Taraxacum honoense* in northern Honshu, Japan. *J. Plant Res.*, **106**, 167-179.
- Cardy, B.J., Stuber, C.W., and Goodman, M.N. (1981) Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Inst. Statics Mimeograph Series No.1317, North Carolina State Univ.
- Gottlieb (1981) Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog. Phytochem.*, **7**, 1-45.
- Morita, T., Menken, S.B.J., and Sterk, A.A. (1990) Hybridization between European and Asian dandelion (*Taraxacum* section *Ruderalia* and section *Mongolica*). I. Crossability and break-down of self-incompatibility. *New Phytol.*, **114**, 519-529.
- Manly, B.F.J. (1992) 多変量解析の基礎 (村上・田栗訳). 培風館, 東京, 150p.
- Nijs, J.C.M. den and Menken, S.B.J. (1989) Variation patterns and sexuality in some sections of the genus *Taraxacum*. Proc. of 4th International Symposium of Plant Biosystematics, P.65.
- 堀田満(1977)近畿地方におけるタンポポ類の分布. 自然史研究 **1** (12), 117-134.
- 北村四郎 (1983) キク科. 佐竹ほか編, 日本の野生植物草本編III, 平凡社, 156-235.
- 長田武正 (1989) 原色日本帰化植物図鑑. 保育社, 大阪,
- Ogawa, K. (1978) The germination pattern of native dandelion (*Taraxacum platycarpum*) as compared with introduced dandelions. *Jap. J. Ecol.*, **28**, 9-15.
- Ogawa, K. and Mototani, I. (1991) Land-use Selection by Dandelions in the Tokyo Metropolitan Area, Japan. *Ecol. Res.*, **6**, 233-246.
- Sawada, S., Takahashi, M., and Kasaishi, Y. (1982) Population dynamics and production processes of indigenous and naturalized dandelions subjected to artificial disturbance by moving. *Jap. J. Ecol.*, **32**, 142-150.
- 白石進 (1983) アイソザイム分析—その実際と木材遺伝育種への利用—。木材の育種, 142, 23-25.
- Soltis, D.E., Haufler, C.H., Darrow, D.C., and Gastony, G.J. (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.*, **73**, 9-27.
- Suzuki, T. and Iwatsuki, K. (1990) Genetic variation in agamosporous fern *Pteris cretica* L. in Japan. *Heredity*, **65**, 221-227
- Vavrek, M.C. (1998) Within-population genetic diversity of *Taraxacum officinale* (Asteraceae): Differential genotype response and effect on Interspecific competition *Amer. J. Bot.*, **85**, 947-954
- 渡邊幹夫, 丸山由加里, 芹沢俊介 (1997) 東海地方西部における在来タンポポと帰化タンポポの交雑(1)ニホンタンポポとセイヨウタンポポの雑種の出現頻度と形態的特徴. 植物研究雑誌, **72**, 51-57.
- Weeden, N.F. and Wendel, J.F. (1989) Genetics of Plant Isozymes. In Soltis, D.E. and Soltis, P.S.(eds.), *Isozymes in Plant Biology*. Discorides Press, Oregon, USA, 46-72.
- Watano, Y. (1988) High levels of genetic divergence among populations in a weedy fern, *Pteris multifida* Poir. *Pl. Sp. Biol.*, **3**, 109-115.
- Yahara, T. (1990) Evolution of agamosperous races in *Boehmeria* and *Eupatorium*. *Pl. Sp. Biol.*, **5**, 183-196.

(1999年6月17日受付)

(1999年10月21日受理)