日本のアメリカゼナは、本当に 2 タイプ? —— AFLP 法で類縁関係を検証する

○好野奈美子・汪光熙・伊藤操子(京都大・農)

[背景および目的] ゴマノハグサ科アゼトウガラシ属(*Lindernia* All.)に属するアメリカゼナ(*L. dubia* Pennell)は、日本においては 2 タイプに区別できることが報告されている(森田, 1994)。この 2 タイプは葉の基部がそれぞれくさび形(connate)、円形(round)であることから、C タイプ・R タイプ、あるいは(狭義の)アメリカゼナ・タクトアゼナと区別されることが普通となっている。しかしながら、原産地の北米での Pennell(1935)の記載以外、北米を含めた諸外国において、この 2 タイプを区別するような見解は見当たらない。そこで、AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)法による DNA-fingerprinting にて、日本における *L. dubia* が遺伝子レベルではどのような様相であるかを推定し、分類階級を設けることへの妥当性を検討した。

[材料および方法] 供試材料および採集方法は表 1 に示す。アメリカゼナとタクトアゼナは上記の方法で葉の基部により同定した。アメリカゼナ・タクトアゼナに対する対照として、アゼナ(*L. procumbens*)も供試した。1 集団あたり 3 個体(一部 1~2 個体)、葉あるいは地上部全体をディープフリーザーにて保存した部位を用いた。DNA の抽出は Plant DNAzol (Invitrogen 社製)を用いて行われた。制限酵素処理、ライゲーション、予備増幅および選択的増幅は AFLP analysis Core reagent kit (Invitrogen 社製)のプロトコールを一部改変した方法に従った。選択的増幅のプライマーは表 2 のとおりである。泳動はポリアクリルアミドにて行い、染色は銀染色キット(Promega 社製)を一部改変した方法に従った。バンドは 100~500bp の範囲のものを目視にて読み取った。集団レベルのクラスター図は POPGENE 1.32 にて Nei(1978)の不偏遺伝距離を算出し、Clustering Calculator に入力することで作成した。個体レベルのクラスター図は、Clustering Calculator の Sorensen Similarity(Dice Similarity)を用いて作成し、ブーツストラップを実施した。また、Hickory 1.0 を用いて遺伝子多様度を算出した。

[結果および考察] 3 草種の集団ごとのクラスター図を作成したところ(図 1)、アゼナの全集団(pop1--)は、アメリカゼナ(pop2--)・タクトアゼナ(pop3--)から大きく離れて 1 つにまとまった。また、アメリカゼナとタクトアゼナの集団もそれぞれまとまったが、不連続に分かれるかどうか判別できなかった。

そこで、アメリカゼナおよびタクトアゼナの個体ごとのクラスター図を作成したところ(図 2)、ほとんどの個体がアメリカゼナ(ind2---)とタクトアゼナ(ind3---)とに分離した。また、分離する境界(図中の中央あたり)では、ブーツストラップにより 90%以上の値を多く算出した。さらに、どのプライマーの多型遺伝子座の割合についても(表 2)、アメリカゼナ・タクトアゼナ間の値は、アメリカゼナ内、タクトアゼナ内およびアメリカゼナ・タクトアゼナ合計よりも高い値を示した。これらのことから、アメリカゼナとタクトアゼナは、葉の基部の分類形質と一致して遺伝的にも区別できることが示唆された。ただし、逆のまとまりに入っている個体(ind2032, ind2091)や両草種の間位置する個体(ind3103, ind3181, ind3183, ind3121)が少数みられ、このことから、アメリカゼナとタクトアゼナの交雑による中間的なタイプ、あるいは *L. dubia* のさらに別のタイプの可能性などが考えられるかもしれない。しかしながら、これらの例外は少数であり、ほかの大部分は不連続に分離することから、分類階級を設ける意義は十分にあると考えられる。その場合には、中間的な個体による遺伝子交流の可能性や遺伝距離、また形態の相違や分類形質などを考慮すると、変種程度が適当ではないかと考えられる。

また、アゼナは在来種であり、アメリカゼナとタクトアゼナはそれぞれ 1930 年代、1960 年代から確認されている帰化草種であるが、多型遺伝子座の割合はアゼナが大きいものの(表 2)、今回の実験からは、遺伝子多様度について帰化・定着年数との関係は見られなかった(表 3)。

Yoshino, N., G. -X. Wang and M. Ito: Does *Lindernia dubia* really have two types in Japan? —— verified by DNA-AFLP method.

表1 日本産アゼトウガラシ属(*Lindernia*)の供試材料

草種	集団 ^a	植生	由来 ^b	図1での番号	図2での番号
アゼナ <i>L. procumbens</i>	北海道札幌市	水田	1999年種子	pop101	
	山形県長井市	休耕田	1999年種子	pop105	
	茨城県つくば市	休耕田	1999年種子	pop109	
	京都府京都市	水田	2002年採集	pop112	
	京都府宇治市	休耕田	2002年採集	pop113	
	岡山県備前市	休耕田	1999年種子	pop114	
	広島県本郷町	減反田	1999年種子	pop115	
	福岡県勝山町	水田	2001年土壌	pop116	
	鹿児島県日吉町	水田	2001年土壌	pop119	
アメリカアゼナ <i>L. dubia</i> C type	宮城県大和町	減反田	1999年種子	pop203	ind203-
	山形県朝日町	休耕田	1999年種子	pop206	ind206-
	山形県川西町	休耕田	1999年種子	pop207	ind207-
	福島県矢吹町	アヤマ水田	1999年種子	pop208	ind208-
	茨城県つくば市	休耕田	1999年種子	pop209	ind209-
	滋賀県大津市	水田	2002年採集	pop211	ind211-
	京都府京都市	水田	2002年採集	pop212	ind212-
	京都府宇治市	休耕田	2002年採集	pop213	ind213-
	大分県山香町	休耕田	2001年土壌	pop217	ind217-
	鹿児島県枕崎市	水田	2001年土壌	pop218	ind218-
	青森県横浜町	減反田	1999年種子	pop302	ind302-
タケトアゼナ <i>L. dubia</i> R type	秋田県森吉町	減反田	1999年種子	pop304	ind304-
	福島県矢吹町	アヤマ水田	1999年種子	pop308	ind308-
	茨城県つくば市	休耕田	1999年種子	pop309	ind309-
	愛知県弥富町	減反田	1999年種子	pop310	ind310-
	京都府京都市	水田	2002年採集	pop312	ind312-
	京都府宇治市	休耕田	2002年採集	pop313	ind313-
	広島県本郷町	減反田	1999年種子	pop315	ind315-
	福岡県勝山町	水田	2001年土壌	pop316	ind316-
	鹿児島県枕崎市	水田	2001年土壌	pop318	ind318-

^a 同じ産地は同所的に分布する複草種を採集した^b 1999年種子: 同年に採集した種子を2002年に栽培、採集。

2001年土壌: 同年に採集した土壌から2002年に自然発生させ、栽培、採集。

2002年採集: 同年に直接フィールドにて採集

図1 日本におけるアゼナ(pop1--), アメリカアゼナ(pop2--), およびタケトアゼナ(pop3--), の集団ごとのクラスター図。NJ法により作成。バーはNei(1978)の不偏遺伝距離を示す。

表2 プライマーごとの多型/バンド数および多型遺伝子座の割合(P)

草種の組み合わせ	プライマーの組み合わせ(EcoRI/MseI)							
	AGC/CTA		AGC/CTG		ATC/CTC		Total	
	多型 バンド 数	P (%)	多型 バンド 数	P (%)	多型 バンド 数	P (%)	多型 バンド 数	P (%)
アゼナ内	9.7	25.4	7.1	31.6	3.8	13.5	21.2	24.0
アメリカアゼナ内	5.7	26.5	3.5	19.7	5.8	13.0	15.1	18.8
タケトアゼナ内	4.6	22.7	5.7	25.2	8.5	18.1	18.2	21.2
アメリカアゼナ・タケトアゼナ間	7.6	34.8	12.1	52.1	22.2	44.7	41.5	45.1
アメリカアゼナ・タケトアゼナ合計	6.4	29.8	8.4	37.4	14.8	30.3	29.1	32.6
アゼナ・アメリカアゼナ間	39.7	88.2	31.8	99.1	54.3	91.9	124.1	92.2
アゼナ・タケトアゼナ間	40.5	89.4	33.7	95.4	51.3	90.3	124.3	91.1
合計	20.5	53.8	19.0	63.3	30.7	55.9	68.1	56.6

表3 各草種内の全集団の遺伝子多様度(H_T)

	H_T
アゼナ	0.2252 (0.0094)
アメリカアゼナ	0.1886 (0.0053)
タケトアゼナ	0.2200 (0.0068)
アメリカアゼナ・タケトアゼナ合計	0.1964 (0.0046)

()内は標準偏差を示す

図2 日本におけるアメリカアゼナ(ind2--), およびタケトアゼナ(ind3--), の個体ごとのクラスター図。NJ法により作成。バーはDice Similarityを示す。斜体の数字は1000回のブートストラップにより50%以上の値を示したもののみ、その値(%)を示す。