

遺伝学的手法を用いたロクアイタンポポ(仮称)の同定法について

神戸市立六甲アイランド高校
井上真緒 沙原杏樹 辻青空

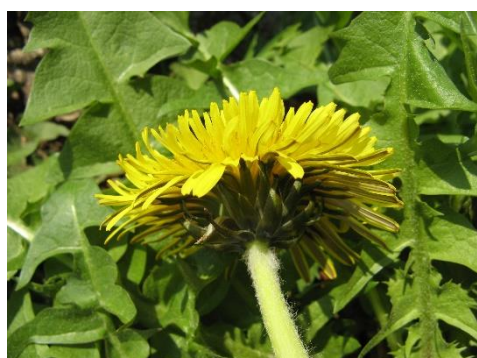
1. 研究背景

2004年六甲アイランド高校の校内と周辺で発見されたロクアイタンポポ(仮称)は、雑種タンポポの可能性が高いが、いまだにはっきりした定義がされていない。特徴は直径約6cmの黄色の頭花をもつ巨大タンポポで、総苞外片は幅が広く、先端部はわずかに角状突起があり、反り返らない。花粉の大きさと形は不均一である。花茎の長さが約80cm、葉も30cmほどの大きさになり、株自体も大きくなる。兵庫のほか滋賀、奈良、岡山、広島、佐賀など全国各地で見られるようになっている。

2. 研究目的

本研究では、ロクアイタンポポ(仮称)、カンサイタンポポ(*Taraxacum japonicum*)およびセイヨウタンポポ(*Taraxacum officinale*)の系統関係についてPCR法を用いて解析した。近年隣の人工島であるポートアイランドでもロクアイタンポポに似た巨大タンポポが発見されている。すでに先行研究からロクアイタンポポはカンサイタンポポと外来種であるセイヨウタンポポの雑種と考えられてきた。しかし、遺伝学的視点からこれらの巨大タンポポの系統関係は明らかにされていない。

本研究の目的は、ロクアイタンポポのDNA解析を行い、各地で見つかる在来種型雑種との比較検討を行い、その同定方法を確立することである。



ロクアイタンポポ(仮称)



頭花の比較

左:ロクアイ 中央:セイヨウ 右:カンサイ



葉の大きさの比較

左:ロクアイ 中央:セイヨウ 右:カンサイ



花茎の長さの比較

表1 ロクアイタンポポ(仮称)の発見から現在までの状況(時系列)

	明らかになったこと
2004年	校内で頭花の大きなタンポポを発見、総苞外片はカンサイ型
2005年	神戸学の授業で、校内と周辺で謎の巨大タンポポ調査を開始
2007年	島内のロクアイタンポポ(仮称)は同じクローンである可能性
2008年	AAT 酵素多型の解析により、外来種タンポポの遺伝子を持つ
2010年	核DNAのITS領域の解析により在来タンポポ型(J)と外来タンポポ型(E)の両方の遺伝子を持つ
2011年	六甲アイランド島内のロクアイタンポポの個体数は増加している ロクアイタンポポの体細胞の染色体数は24本の三倍体雑種
2014年	葉緑体DNAのtrnL_trnF領域のPCR断片長 ニホン型441bp(L), モウコ型395bp(M), セイヨウ型364bp(S) ロクアイタンポポはL
2016年	ロクアイタンポポの根の煮汁には乳酸菌の増殖促進作用がある
2017年	兵庫、滋賀、奈良、岡山、広島の外に佐賀に新たに分布している 簡便法による葉緑体DNAの解析を行う

3. 方法 簡便法による葉緑体 DNA の解析

(DNA の抽出)

1. 採集したタンポポの葉を 5mm 角に切り取り、1.5mL チューブに入れる。
葉は葉脈の部分は入れないようにする。
2. 1 のチューブに 100 μ L の溶解バッファーを加える。

溶解バッファー

100mM Tris HCl (pH9.5)

1M KCl

10mM EDTA

3. 2 を 95°C で 10 分間インキュベートする。
4. 3 の溶液 20 μ L を取り、0.5mL チューブに移し変え、そこに 100 μ L 純水を加えて、よく混ぜ、これを DNA テンプレートとする。

(PCR)

1. 以下の組成で PCRmix を調整し、DNA テンプレート 1 μ L を加えて、PCR サンプルとした。

PCRmix の組成

dNTPs	3.0 μ L
純水	2.3 μ L
Fw プライマー (trnL3')	2.25 μ L
Rev プライマー (trnF)	2.25 μ L
バッファー(for KOD FX Neo)	7.5 μ L
<u>KOD FX Neo(ポリメラーゼ)</u>	<u>0.3 μL</u>
Total	17.6 μ L

DNA プライマー

trnL3' -for GGTCAAGTCCCTCTATCCC

trnF-bac ATTTGAACTGGTGACACGA

2. 8 サンプル分の PCR mix について次のプログラムで PCR を行う。

94°C → 94°C → 55°C → 72°C → 10°C

2min.

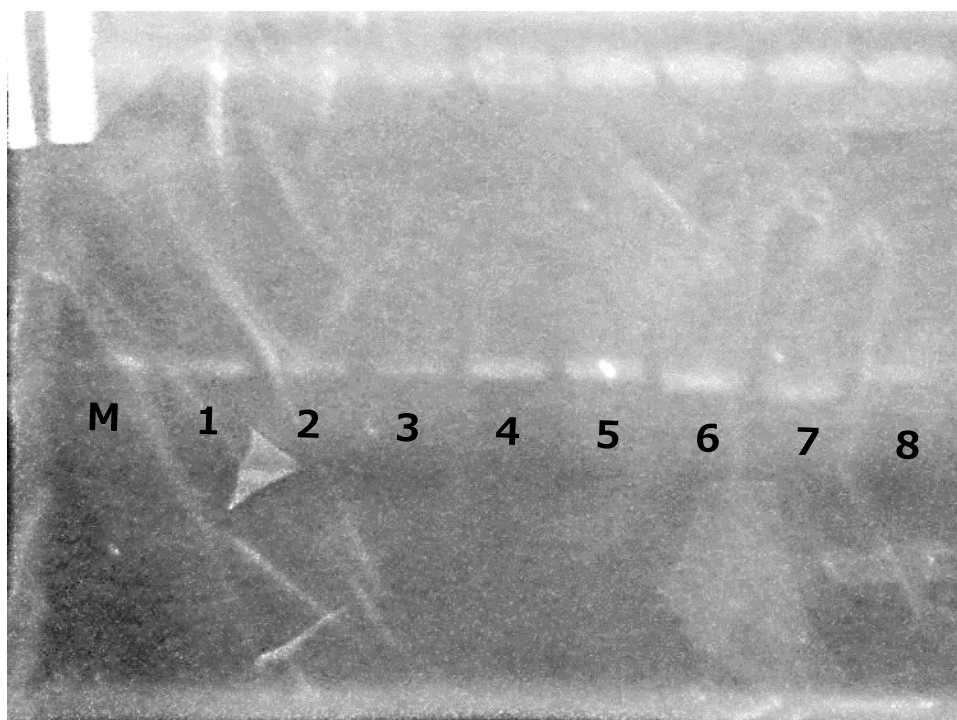
30sec.	30sec.	30sec.
--------	--------	--------

(35cycle)

3. PCR サンプルを電気泳動する。

4. 結果

葉緑体 DNA の解析結果



左から			泳動速度	DNA 断片長
マーカー				
1	ロクアイ	ファミマ前 生葉	S	L型
2	ロクアイ	ファミマ前 乾燥標本	S	L型
3	ロクアイ	奈良 生葉	S	L型
4	ロクアイ?	北埠頭駅前 生葉(謎のポーアイ)	S	L型
5	カンサイ	生葉	S	L型
6	キビシロ	生葉	M	M型
7	セイヨウ	生葉	F	S型
8	雑種?	生葉 京コンピュータ前	S	L型

ゲルは下向きにしているのので、下ほど早く進んでいる。泳動速度は Fast Middium, Slow として、F、M、S としている。

葉緑体 DNA の trnL_trnF 領域の PCR 断片長は ニホン型 441bp(L型), モウコ型 395bp(M型), セイヨウ型 364bp(S型)である。

葉緑体 DNA に注目したのは、葉緑体 DNA は母性遺伝し、倍数性の変化の影響を受けないため、高次倍数性の種でも解析しやすいこと。母系祖先種を明らかにすることが

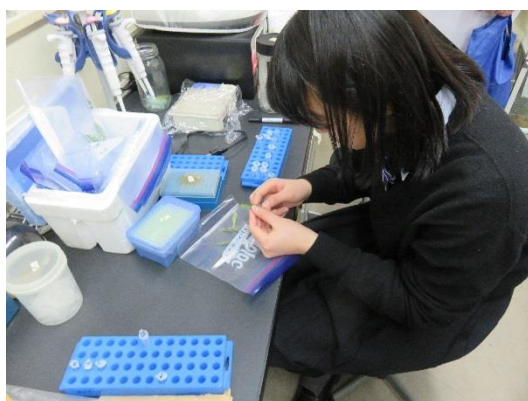
できること。遺伝子間領域は遺伝子領域に比べて進化速度が速く、近縁種の系統解析に有効であるためである。今回は trnL_trnF 領域を使用した。

5. 考察

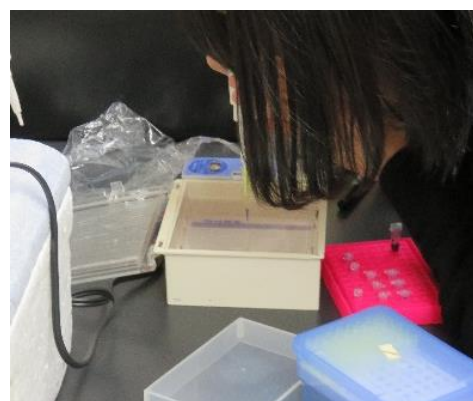
簡便法による葉緑体 DNA の解析の結果、ロクアイタンポポの泳動速度はすべて Slow で、DNA 断片長は L 型であった。カンサイの泳動速度は Slow で、DNA 断片長は L 型であった。カンサイなどの日本産二倍体種では、この領域は 440bp くらいで泳動速度が遅い。このことから、ロクアイタンポポの母系祖先種は在来種であることが確認できた。

セイヨウの泳動速度は Fast で、DNA 断片長は S 型であった。この試料は北海道産の純系を使用した。今回の実験でも典型的なセイヨウであることが確かめられた。キビシロの泳動速度は Medium で、DNA 断片長は M 型であった。これはモウコタンポポを示している。ポートアイランドの謎のロクアイや京コンピューター前の雑種? は、泳動速度は Slow で、DNA 断片長は L 型であった。カンサイと同じ位置にあるので、雑種タンポポの可能性はある。

ロクアイタンポポは形態比較と簡便な葉緑体 DNA の解析により近縁種との系統解析を進めることができる。核 DNA の解析も加わるとさらに明確になると思われる。



葉からの DNA 抽出



電気泳動

本研究により都市部の公園・道端にも普通に見られるタンポポにさらに興味・関心をもつ児童生徒・市民がふえることを期待している。

6. 引用文献、参考文献

タンポポ調査・近畿 2005 最終報告書

タンポポ調査・西日本 2015 調査報告書

兵庫県および京都府北西部の在来タンポポの分布(鈴木ら、2012)

雑種タンポポの識別と全国分布(芝池、2003)

タンポポハンドブック 文一総合出版(2016)