

PCR法を用いた近畿に生息する巨大タンポポの母系祖先種調査

六甲アイランド高等学校 総合科学系19期 14期



Introduction

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。ロクアイタンポポとは、2004年に六甲アイランドで発見された直径5cmの花をもつ巨大なタンポポのことである。さらに、近年西日本各地でロクアイタンポポに似た巨大なタンポポが発見されている。また、先行研究ではロクアイタンポポの葉緑体DNAがカンサイタンポポと同型であることが分かっており、ロクアイタンポポの母系祖先種がカンサイタンポポであることが示唆されている。本研究では、ポートアイランドをはじめとする近畿各地で採取した未同定の巨大タンポポがロクアイタンポポと同じような遺伝的背景をもつのか、葉緑体DNAを調べることで明らかにすることを目的とした。

目的

未同定の巨大タンポポの母系祖先種を明らかにする

Method

1. 遺伝情報が既知のタンポポ (カンサイタンポポ、セイヨウタンポポ) と未同定のタンポポ(表1)を採取した。
2. 採取したタンポポの葉を3mm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。
3. 1のチューブに100μLの溶解バッファを加える。
(溶解バッファ)
100mM TrisHCl (pH9.5)
1MKCl
10mM EDTA
4. 2を95℃で10分間インキュベートする。
5. 3の溶液20μLを取り、0.5mLチューブに移し変え、そこに100μL純水を加えて、よく混ぜ、これをDNAテンプレートとする。以下の組成で、PCRmixを調整し、1μLのDNAテンプレートを加えて、PCRサンプルを作製した。

(PCRmixの組成)	Total	17.6μL
2.0mM dNTPs	3.0μL	
純水	2.3μL	
10mM Fw プライマー (trnL3')	2.25μL	
10mM Revプライマー (trnF5')	2.25μL	
2×バッファー(for KOD FX Neo)	7.5μL	
DNAポリメラーゼ(KOD FX Neo)	0.3μL	

(DNAプライマー)
trnL3'-for GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
trnF5'-rev ATTTGAACTGGTGACACGA
以下のプログラムでPCRを行った。

40 cycle

95℃ → 95℃ → 55℃ → 72℃ → 10℃
15秒 15秒 60秒 ∞

6. PCRサンプルを電気泳動し、各サンプルのバンドを比較した。

サンプル	サンプル採集地	日付	状態	サンプル	サンプル採集地	日付	状態
1 未同定	ファミリーマート六甲アイランド店前	2018/1/19	生葉	8 未同定	京コンピュータ前	2017/3/17	生葉
2 未同定	ファミリーマート六甲アイランド店前	2017/2/16	乾燥標本	9 未同定	有馬富士	2018/4/5	乾燥標本
3 未同定	奈良		生葉	10 未同定	有馬富士	2018/4/5	乾燥標本
4 未同定	北ふとう駅前	2017/3/17	生葉	11 未同定	有馬富士	2018/4/5	乾燥標本
5 カンサイ	六甲アイランド高校	2018/2/16	生葉	12 未同定	六甲アイランド高校テニスコート	2018/6/1	生葉
6 キビシロ	六甲アイランド高校	2018/2/16	生葉	13 未同定	六甲アイランド高校駐車場	2018/6/1	生葉
7 セイヨウ	六甲アイランド高校	2018/2/16	生葉				

表1 PCRに用いたサンプル

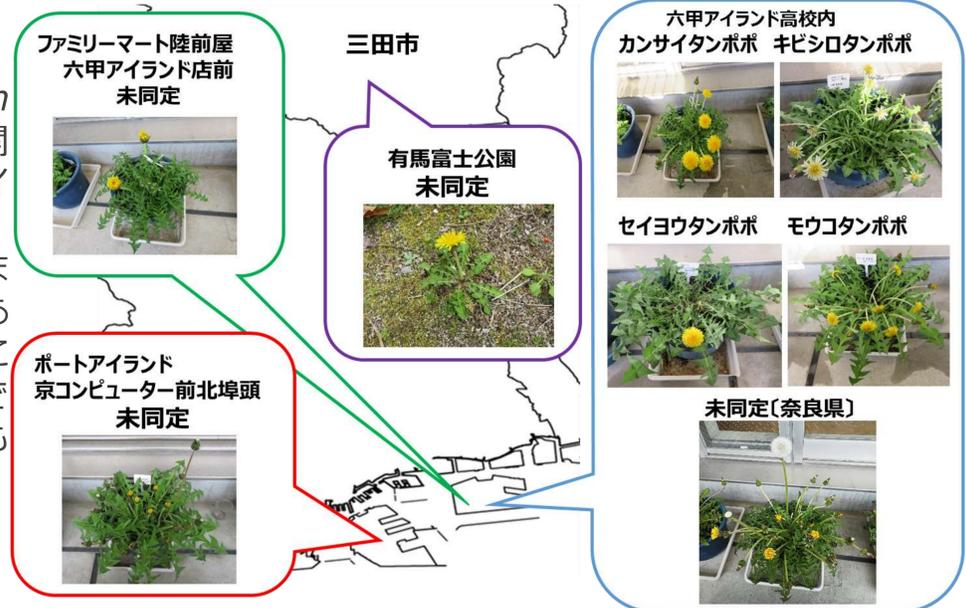
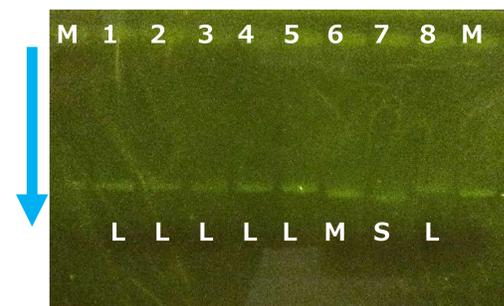


図1 タンポポ採集地

Result



M : DNAマーカー (大阪府立大学, 2月17日)

図2 電気泳動の結果

サンプル	同定/未同定	DNA断片長	泳動速度
1	未同定	L	S
2	未同定	L	S
3	未同定	L	S
4	未同定	L	S
5	カンサイ	L	S
6	キビシロ	M	M
7	セイヨウ	S	F
8	未同定	L	S

表2 電気泳動のサンプル

- ・バンドが下にあるほど、DNA鎖が短いことを示している
- ・1~8全てのバンドが出た。そのうち、S,M,Lの3種類の長さのDNA断片が検出された。
- ・未同定の巨大タンポポのDNAはL型だった。



(六甲アイランド高校, 6月28日)

図3 電気泳動の結果

サンプル	同定/未同定	DNA断片長	泳動速度
9	未同定	S	F
10	未同定	L	S
11	未同定	L	S
12	未同定	L	S
13	未同定	X	X

表3 電気泳動のサンプル

- ・9はS, 10, 11, 12はL型のバンドが出た。
- ・13はバンドが出なかった。

Discussion

今回の実験結果より1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12の未同定のタンポポのDNA型は、ロクアイタンポポと同様に、カンサイタンポポのDNA型と同じL型であることが推測された。9のタンポポはセイヨウタンポポと同じS型であったため、母系祖先種がセイヨウタンポポでないかと推測された。13はバンドが出なかったのはDNAの量が少なかった可能性がある。実験結果と先行研究より1, 2, 3, 4, 8, 10, 11, 12の未同定のタンポポも形態的特徴と母系祖先種の遺伝子型の両面からロクアイタンポポであると推定される。

Conclusion :

未同定のタンポポとロクアイタンポポは同じDNA型を持つ可能性がある。

References

- 「徳島県立博物館」 www.museum.tokushima-ec.ed.jp/
 「Hybridization between European and Asian dandelions」 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579356>
 「universal primers for amplification of three non-coding regions」 <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00037152>