

タイトル	ノラニンジン ( <i>Daucus carota</i> subsp. <i>carota</i> ) における種内系統識別のためのDNAマークー領域の比較解析
著者	珍田, 将; CHINDA, Sho; 中村, 亮文; NAKAMURA, Akifumi; 菊池, 康平; KIKUCHI, Kohei; 栗田, 快都; KURITA, Kaito; 茶木, 康智; CHAKI, Yasunori; 新沼, 協; NIINUMA, Kanae
引用	北海学園大学工学部研究報告(53): 63-72
発行日	2026-01-09

# ノラニンジン (*Daucus carota* subsp. *carota*) における 種内系統識別のためのDNAマーカー領域の比較解析

珍 田 将\*・中 村 亮 文\*・菊 池 康 平\*・  
栗 田 快 都\*・茶 木 康 智\*・新 沼 協\*

Comparative analysis of DNA regions for intraspecific lineage identification in  
wild carrot (*Daucus carota* subsp. *carota*)

Sho CHINDA\*, Akifumi NAKAMURA\*, Kohei KIKUCHI\*,  
Kaito KURITA\*, Yasunori CHAKI\* and Kanae NIINUMA\*

## 要 旨

北海道で拡大する外来種ノラニンジン *Daucus carota* subsp. *carota*を対象に、種内系統解析に有用なDNAマーカーの探索を行った。葉緑体の *rbcL*, *matK*, *atpB-rbcL*, *trnL* intron は、本研究の予備的評価の範囲では種内多型がほとんど確認されず、現時点での有用性は限定的と考えられた。一方、葉緑体の *trnT-trnL* spacer および *trnL-trnF* spacer では変異が認められ、とくに *trnT-trnL* spacer は比較的高い識別力を示す可能性が示唆された。ITS領域も補助指標としての有用性が示唆された。本結果は予備的知見であり、今後のサンプル拡充により一般性の評価が一層進むと考えられる。

## 1. 序論

北海道は古くから生物多様性に恵まれた自然豊かな地域であり、生物多様性保全の観点から極めて重要な地域である。しかし近年、道外から人的要因によって侵入または導入されたと考えられる外来植物が道内で生息域を拡大しており、強い繁殖力によって急速に北海道全域へ拡散し、在来の植物相を圧迫していることが報告されている。

北海道では、本道における外来種の実態を把握し、関係機関、団体等が対策を行う上での基礎資料とするため、外来種リストである「北海道ブルーリスト」を作成している。このリストには、生態系への影響が懸念される外来種が多数指定されている。

道内で生息域の拡大が確認されている外来植物の一つに、ノラニンジン (*Daucus carota* subsp. *carota*) がある。ノラニンジンはセリ科ニンジン属の一年草または多年草で、原産地は

\* 北海学園大学工学部生命工学科

\* Department of Life Science and technology, Faculty of Engineering, Hokkai-Gakuen University

ヨーロッパを含むユーラシアからアフリカ北部にかけての地域とされる<sup>1)</sup>。北海道内の初報告は1974年に発表された原<sup>2)</sup>によってなされ、2010年までに道東などの一部地域を除いた道内全域に拡散している<sup>3)</sup>。ノラニンジンは北海道ブルーリストにおいて、最も生態系への影響が懸念されるカテゴリーAのうち、A3（本道に定着しており、生態系等への影響が報告または懸念されている外来種）に指定されている<sup>3)</sup>。在来植物との競合や駆逐の懸念に加え、ノラニンジンは栽培種が野生化したものと考えられており、栽培種と交雑が農業上の問題にもなっている<sup>4)5)</sup>。北海道内でノラニンジンがどのように侵入・拡散しているかを把握することは、防除計画の立案および資源配分の最適化に直結する重要課題である。そのためには、個体群間の由来や移動を判別できる種内系統の解像が不可欠であり、信頼性の高い解析手法の確立が求められる。

ノラニンジンに関連した分子系統解析については、2000年代初頭に江口<sup>6)</sup>による報告がある。同研究はRAPD・AFLP・PCR-RFLPを用いて野生（ノラニンジン）と栽培ニンジンの遺伝的関係を検討した。その結果、RAPDおよびPCR-RFLP解析によりノラニンジン集団内で顕著な多型が確認され（RAPDでは集団内多様性が大、PCR-RFLPではABI3プロモーター領域で複数サイズの産物が出現）、種内の遺伝的変異が無視できないことが示された。

本研究では、先行研究で示された断片型マーカーの制約と種内多型の存在を踏まえ、配列ベースのDNAマーカーに着目した。ノラニンジンの種内系統解析に有効なDNA領域を探索するため、北海道内で採取した個体群を用い、*rbcL* (*ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit*), *matK* (*maturase K*), *atpB-rbcL* spacer, ITS領域 (Internal Transcribed Spacer; 以下ITS), *trnT-trnL* spacer, *trnL* intron, *trnL-trnF* spacerの計7領域について配列比較を行った。

## 2. 材料および方法

### 2.1 植物サンプル

ノラニンジンのサンプリングは2016年7月～9月および2019年7月～8月の期間に実施し、これらの一部を本研究のDNA解析に使用した（表1）。サンプルは主にDNA抽出に適した部位である葉を採取した。採取に際しては、汚れの少ない部位を選び、70%エタノールで清拭したはさみを使用して切り取った。得られた葉は個体ごとにチャック付きポリ袋（ジッパー）

表1 DNA解析に使用したサンプルの採取地点

採取地点	サンプル名
北海道	小樽 BE1, BE2, BE3, BE4, L4
	えりも GE1, GE2, GE3, GE4, 3A, 14A, 15A
	苦小牧 FA1, FA2, 4A, 6A, 7A
	千歳 11A
	函館 IA2, IB1, IB2, IC1
	網走 HA1, HA2, HA3, HB1
	利尻 LA1, LA2
	札幌 AX1, AX2, L3, L5
	釧路 L2
	富良野 L6
	不明 1A
道外 石川県	AAA1, AAB1

本研究で採取した試料のサンプル名を、採取地点ごとに示した。サンプル名は本文中でも同様の略号を用いた。

グ) に封入し, 冷蔵下で保存・搬送した.

## 2.2 分子実験手法 (DNA抽出・PCR・シーケンス)

ノラニンジンからのDNA抽出は以下の手順で行った. 葉0.1~0.2gをはさみで細切り液体窒素で凍結後, ジルコニアビーズを用いて細胞破碎装置 (MM400 株式会社レッヂ) により破碎した. その後, CTAB法 (Cetyltrimethylammonium Bromide method)<sup>7)</sup>に準じてDNAを抽出した. 抽出DNAを鋳型とし, *rbcL*, *matK*, *atpB-rbcL*, ITS, *trnT-trnL* spacer, *trnL* intron, および*trnL-trnF* spacerを対象にPCRを実施した. PCR反応はKAPATaq<sup>TM</sup> Extra DNA Polymerase (KAPA BIOSYSTEMS) を用いて行った. 本研究で用いた7領域のプライマーはすべて既報<sup>8-11)</sup>を参照し, 各プライマーの名称・配列・想定産物長・出典は表2に示した.

表2 使用プライマー一覧

領域名	プライマー名	配列 (5' → 3')	産物長 (bp)	出典
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> _F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	約600	8)
	<i>rbcL</i> _R	GTAAAATCAAGTCCACCRCG		
<i>matK</i>	3F_KIMf	CGTACAGTACTTTGTGTTACGAG	約900	8)
	1R_KIMr	ACCCAGTCCATCTGAAATCTGGTTC		
ITS	Komakusa 18s KN1	CACTCGGAAAGGATCATT	約700	9)
	ITS 3-2	TCCTCCGTTATTGATATGC		
<i>atpB-rbcL</i>	D.eximia Fw	TGTACCTCACAAAGTGACATT	約1000	10)
	D.eximia Rv	TGGTACACATAAGTCCCTCCCTA		
<i>trnT-trnF</i>	<i>trnT-L</i> Fw a	CATTACAAATGCGATGCTCT	約2000	11)
	<i>trnT-L</i> Rv d	GGGGATAGAGGGACTTGAAC		
	<i>trnT-L</i> Fw c	CGAAATCGGTAGACGCTACG		
	<i>trnT-L</i> Rv f	ATTGAACTGGTGACACGAG		

本研究で用いたPCRプライマーを一覧した. 各プライマーセットについて, 標的領域名, プライマー名, 塩基配列 (5' → 3'), 期待される增幅産物長 (bp), および出典を示す. 産物長は対象配列の挿入欠失等により変動し得るため「約」とした. 出典の番号は参考文献リストの番号に対応する.

反応液の最終容量は50μLとし, その組成は以下のとおりとした: PCR grade water 27.75 μL, 5 × KAPATaq Extra Buffer (without Mg<sup>2+</sup>) 10μL, MgCl<sub>2</sub> (25mM) 3.5μL, dNTPs (10mM each) 1.5μL, Forward primer (10μM) 2.5μL, Reverse primer (10μM) 2.5μL, テンプレートDNA 2.0μL, KAPATaq Extra DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25μL. PCR条件は各領域に最適化した. 共通の基本設定として, 初期変性94°Cで2分の後, 94°C 15秒 (変性), X°C 15

表3 本研究で用いたPCR反応条件

領域	X(℃)	Y(秒)	N
<i>rbcL</i>	55	60	35
<i>matK</i>	55	50	35
ITS	55	50	30
<i>atpB-rbcL</i>	56	60	32
<i>trnT-L</i> a-d	59	84	34
<i>trnT-L</i> c-f	57	84	34

各標的領域のPCR反応に用いたX (アニーリング温度, ℃), Y (伸長時間, 秒), N (サイクル数) の値を本表に示す.

秒（アニーリング）、72℃Y秒（伸長反応）のサイクルをN回繰り返し、最後に72℃でY秒の最終伸長を行ったのち、8℃で保持した。各領域におけるX、Y、Nの値は表3に示した。

增幅産物は2%アガロースゲル電気泳動により確認し、FastGene™ Gel/PCR Extraction kit（日本ジェネティックス株式会社）を用いて精製した。必要に応じてゲル抽出を行った。

### 2.3 配列解析

精製産物はユーロフィンジェノミクス株式会社（東京）に依頼してサンガーシーケンスを実施した。得られた配列データは両端の不安定部分をトリミングした上で、GENETYX（GENETYX Corporation）を用いて個体間で比較し、多型の有無を評価した。変異率の計算は、アライメントの評価塩基数を分母とし、分子にはSNP数に加えて挿入／欠失（indel）のイベント数を合算した変異数を用いて算出した。すなわち、1 bpの置換 = 1、連続する挿入／欠失 = 1 イベントとして計上した。

## 3. 結果および考察

本研究では、ノラニンジンの種内系統識別に有用なDNA領域を明らかにすることを目的として、北海道内各地で採取した個体群を対象に候補領域の配列解析と比較検討を行った。

### 3.1 北海道内におけるサンプリングおよび解析方針の概要

サンプリングは2016年および2019年に実施した。現地観察では、道路沿い・空き地・中央分離帯など多様な環境で出現が認められ、ノラニンジンが生育場所を選ばず高い繁殖力と環境耐性を有することが示唆された（図1）。また、釧路を含む地域で従来未報告の繁殖成立を確認した。採取した試料のうち一部（11地点および地点不明・計37個体：表1）を、種内系統識別



図1 道内で確認されたノラニンジン  
(左) 本研究でサンプリングしたノラニンジン。Scale bar = 10cm. (右) 道路沿いに繁殖を広げるノラニンジンの様子。

に向けた候補領域の検討に供した。各DNAマーカーについては、まず予備的に2～8個体を対象として解析を行い、種内変異の有無および解像度を評価した。その結果、変異が乏しかった領域は追加解析を行わず、解像度が得られた領域 (*trnT-trnL* spacerおよびITS) のみについて個体数を拡充して解析を進めた。解析対象個体数は領域ごとに異なり、詳細は各結果節に示した。

### 3.2 葉緑体コーディング領域 *rbcL* および *matK* の予備評価

ノラニンジンにおける種内系統識別に適したマーカー探索の出発点として、植物DNAバーコーディングで広く用いられる *rbcL* および *matK* を評価した<sup>8)12)</sup>。両領域は、科や目といった高次分類群の識別に有効であり、種内多型は少ないと考えられる。本研究でも、確認目的で両領域の塩基配列を苦小牧産個体FA1およびFA2を用いて解析・比較を行った。この結果、これらの2個体間で *rbcL* および *matK* における種内変異はほとんど認められなかった (*rbcL* : 変異0／評価塩基数370bp, *matK* : 0／480bp)。さらに、4個体（千歳11A, 苦小牧6A, 函館IA2, 網走HA1）を用いて、增幅産物の両側からシーケンスして評価を行ったが、*rbcL* : 0／約400bp, *matK* : 3／760bpと、変異はごく少数にとどまった。以上より、本研究の予備的評価の範囲では、葉緑体コーディング領域 (*rbcL*, *matK*) はノラニンジンの種内系統解析に対して解像度が限定的であることが確認された。この傾向は、両領域が主として種間識別に適するという一般的知見と整合する。

### 3.3 *atpB-rbcL* の予備評価

葉緑体遺伝子間スペーサーである *atpB-rbcL* は、タンパク質コード領域間に位置する非コード領域であり、*rbcL* 遺伝子や *matK* 遺伝子に比べて変異率が高いことが知られており、近縁種

表4 候補領域の種内系統判別能の予備的検討

地点	個体番号	<i>atpB-rbcL</i>	<i>trnL</i> intron	<i>trnT-L</i> spacer	<i>trnL-F</i> spacer
小樽	BE1	0	ND	ND	ND
	BE2	0	ND	0	ND
	BE3	0	0	4	1
	BE4	0	0	2	1
えりも	GE1	0	0	0	ND
	GE2	0	0	0	0
	GE3	0	0	0	1
	GE4	0	0	0	0
解析塩基数(bp)		640	600	750	850

小樽 (BE) およびえりも (GE) 産サンプルを用い、4つのDNA候補領域について種内系統判別への有効性を予備的に比較した。同一領域内で同色のセルは、同一配列であることを意味する。数値は、変異座位数を示している。ND: not determined

間あるいは同種内集団間の多様性を検出するために用いられてきた<sup>13)</sup>。この性質から、ノラニンジンにおける種内多型解析においても有用と仮定し、本研究では *atpB-rbcL* を次の解析対象とした。小樽産 4 個体 (BE1～BE4) とえりも産 4 個体 (GE1～GE4) の計 8 個体について、本領域の塩基配列を解析し比較した。*atpB-rbcL* の解析区間 (640bp) では、8 個体すべてが同一配列であり、変異は検出されなかった (表 4)。以上より、本研究の予備的評価の範囲では、*atpB-rbcL* のノラニンジンの種内系統解析に対する識別能力は限定的である可能性が示唆された。

### 3.4 *trnT-trnF* 領域を用いた解析

*trnT-trnF* 領域は、植物の葉緑体DNA上に存在し、*trnT-trnL* spacer, *trnL* intron, *trnL-trnF* spacer という連続する 3 つの領域から構成されている。いずれも非コード配列を多く含み、比較的多型が検出されやすいことが知られている<sup>11)13)</sup>。本研究では、これら 3 領域のノラニンジ

表 5 北海道各地から採集したノラニンジン個体の *trnT-trnL* spacer 領域の塩基配列

サンプル名 (採取地)	positions								変異数	ハプロタイプ	
	228	270	309	318	332～340	345	392	415			
11A (千歳), BE4 (小樽), IB1 (函館), LA1 (利尻)	C	G	C	C	CATACATAT	G	A	G	A	0	TL-1
7A (苫小牧), AAB1 (石川 県), AAA1 (石川県), LA2 (利尻), 14A (えりも), HA 1 (網走), BE2 (小樽), GE 1 (えりも), GE2 (えり も), GE3 (えりも), GE4 (えりも), L2 (釧路), L3 (札幌), L4 (小樽), L6 (富 良野)	C	G	C	C	CATACATAT	T	A	A	A	2	TL-2
IA2 (函館), IC1 (函館), HB1 (網走), 1A (不明)	C	G	C	C	CATACATAT	T	A	G	A	1	TL-3
15A (えりも)	C	G	C	C	CATACATAT	T	C	G	A	5	TL-4
3A (えりも)	C	G	C	C	-	T	A	A	A	2	TL-5
BE3 (小樽), 6A (苫小牧)	C	C	G	A	CATACATAT	T	A	G	-	5	TL-6
L5 (札幌)	A	G	C	C	CATACATAT	T	A	G	A	2	TL-7

各個体の *trnT-trnL* spacer の解析対象 750bp について、11A の配列 (図 2) を基準に、変異が検出された座位 (5' 端からの位置) を示す。CATACATAT は挿入／欠失 (indel) モチーフを表す。各群は 2 ～ 5 カ所の変異の組合せで特徴づけられ、全個体は 7 つのハプロタイプ (TL-1 ～ TL-7) に区分できた。

&gt;TrnT-L\_11A

```
GGTTGTCATCTTAAATTAAATAACTTATTGCAATTCTAGCGATTCTATTAGCTAGTCATAATCAT
AATGAATATGACTATAGAAAAAAATAAAATAGAATTGAAAGGAAATTCAAACTCATACTTACACACA
GGCCATAGAATATAACGAGAAAATCTATCGCTATAGAATTATTTTGTATTTTCTCACATCACATAGTA
TATAGCATTAACTTACAAAATAGTAGATTGATCTATTAGATTAACTATTTAGTTTGTGCTTT
CAAATGCTATTGAAAGTCTTTATTACACTCTTCTTTTATTACATACATATTAGATTTC
TATTTAAATGGAATGATTGTTCTAAATAATGAGACATTATTGCGCTTGCTTGTAAAGATGGAAG
TTCAGACGAAAAAAAGAATCGACCGTTCAAGTATTCAAATTGCTGCTAAACAGCATAAGAGAG
ACATATATATGTGGTATATCTCCATCTATATTGAATTGAGATACAGAAATGATAGAAATCTTCTGATTG
GACCAAATGTGGGTGCGGGTCTCCTATAGAAGATGAAAGATAGCCAAGAAAAAAAGAGGATAA
AAGCTTTTGAGATAGGAATCAGTATTAACTGAATTCAACGGTCCAGTAGAAATGAAATAAAAAGA
GAAOGATATCTCAATAAAAATGAGATACTAATCTCAAAACAAAAAGGGGATATGGCG
```

&gt;ITS\_11A

```
GGCCTTGGTCCCTGTCGTGAAACCCAAGGCAGGTGTCACCTTATGGTTCCCTCGCTAATAAAA
TCAACTGGCGCTAGATGCGCCAAGGAAGTAAATAATGAATTGTTGCTCGCTCGTGTGCGGGGA
AGTGGCGGGTCCAAAACACAAAATGACTCTGGCAACGGATATCCCGCTCTCGCATCGATGAAG
AACGTAGCGAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGAGAATCCGTGAACCATCGAGTCTTGAACGCA
AGTTGCGCCCGAAGCATTAGGCCAGGGCACGTCTGCGTGGGTGTCACGCATCGTGTGCGCGCTG
ACCAAACATCTCCTCGAGAGATTATTGTTGAGGGCGGAAATTGGCCTCCCGTGCCTTTGTGTG
CGGTTGGCTAAAATGAGTCTGGTGAACGGCATCAACGACATCGGTGGTTGTAAGAAGACCTCT
TGTGTCGTTGTATAACCGCGCGCAG
```

図2 ノラニンジン基準個体 (11A) における ITS および *trnT*–*trnL* spacer 領域の配列  
基準個体 11A の *trnT*–*trnL* spacer 領域およびITSの塩基配列を示す。網掛けは、種内比較において塩基置換または挿入／欠失が観察された座位を示す。これらは表5および表6の変異座位に対応している。

ンにおける種内系統解析に対する識別能力を評価した。

まず小樽およびえりもの試料について予備解析を行った。 *trnL* intronでは解析区間 (600bp)において6個体すべてが同一配列であり、種内多型は認められなかった (表4)。一方、*trnT*–*trnL* spacerでは、解析した7個体の大半で解析区間 (750bp) の配列が一致したが、小樽産BE3ではそれらの配列と比べ5'端から270bp下流のG→C, 309bpのC→G, 318bpのC→A, 415bpのA→G, 615bpのA欠損の計5カ所に変異（置換（および欠失）が見られた。また、小樽産BE4では345bpのT→G, 415bpのA→Gの2カ所に変異が見られ、これらの配列差に基づき3つのハプロタイプに区別された。また、*trnL*–*trnF* spacerでは、小樽産の同BE3およびBE4において、約400bp付近に共通の塩基置換 (T→A) が検出された。加えて、えりも産GE3では約730bp付近に別の塩基置換 (A→T) が確認され、同一地域内でも配列差に基づく系統分化が生じている可能性が示唆された。

上記の予備解析で有効性が示された領域のうち、情報量が高かった*trnT-trnL* spacerを対象とし、さらにサンプルを追加し解析を行った。石川県2個体を含めた11地点計28個体について同領域を比較した結果、アライメント長750bpのうちのべ9カ所に変異が認められた。えりも産個体3Aでは1カ所に連続塩基(332-340bp: CATACTAT)が欠失していた。以上の結果から、ノラニンジン28個体は*trnT-trnL* spacerの多型により7つのハプロタイプ(TL-1~TL-7)に区別されることが確認された(表5、図2)。

### 3.5 ITSを用いた解析

核リボソームDNA(rDNA)に存在するITSは、18S rRNA遺伝子、5.8S rRNA遺伝子および28S rRNA遺伝子の間に位置する非コード領域であり、一般にITS1およびITS2から構成される。これらの領域は進化速度が比較的速く、種内よりも種間で高い塩基配列変異を示すことから、種レベルでの識別や系統解析に広く用いられている<sup>14)15)</sup>。このことから、ITS領域はノラニンジンにおける種内DNA多型解析の候補マーカーとしても有用であると考え、本領域を対象に塩基配列解析を行った。石川県由来2個体を含めた8地点・計20個体についてITSを比較した結果、アライメント長494bpのうちのべ3カ所に変異が認められ、ノラニンジン20個体は本領域の多型により5つのハプロタイプ(ITS-1~ITS-5)に区別された(表6)。ITSは核由来で進化速度が高い領域であるが、本データでは中程度の分解能であった。

表6 北海道各地から採集したノラニンジン個体におけるITS領域の塩基配列

サンプル名(採取地)	positions			ハプロタイプ
	51	431	440	
11A(千歳), 4A(苫小牧), AX2(札幌), AX3(札幌), HA2(網走), HA3(網走), IA1(函館), IB1(函館), IB2(函館), AAB1(石川 県)	T	C	C	ITS-1
BE1(小樽), BE3(小樽), HA1(網走), LA1(利尻), LA2(利尻)	C	C	C	ITS-2
6A(苫小牧)	C	C	T	ITS-3
AAA1(石川県)	C	T	C	ITS-4
BE4(小樽), HB1(網走), IA2(函館)	Y	C	C	ITS-5

各個体のITS領域の解析対象494bpについて、11Aの配列を基準に比較した。列は変異が検出された座位(5'端からの位置)を示す。各群は1~3カ所の置換の組合せで特徴づけられ、全個体は5つのハプロタイプ(ITS-1~ITS-5)に区分できた。

表7 *trnT-trnL spacer*領域およびITS領域の系統解析結果の対応

サンプル名 (採取地)	<i>trnT-L</i> ハプロタイプ	ITS ハプロタイプ
11A (千歳), IB1 (函館)	TL-1	ITS-1
LA1 (利尻)	TL-1	ITS-2
BE4 (小樽)	TL-1	ITS-5
AAB1 (石川県)	TL-2	ITS-1
HA1 (網走), LA2 (利尻)	TL-2	ITS-2
AAA1 (石川県)	TL-2	ITS-4
HB1 (網走), IA2 (函館)	TL-3	ITS-5
BE3 (小樽)	TL-6	ITS-2
6A (苫小牧)	TL-6	ITS-3

*trnT-trnL spacer* およびITSの両領域のデータが得られた12個体について、サンプル名および採取地、各領域の塩基配列に基づくハプロタイプをまとめた。2領域の組み合わせにより、全個体は9系統群に分かれた。

### 3.6 *trnT-trnL spacer*とITSによる相互検証：系統群の細分化

上述のように、*trnT-trnL spacer*およびITSはそれぞれ、ノラニンジンの種内多型を検出し得ることを示した。両領域の塩基配列を決定できた重複12個体について、マーカー間の相互検証を行ったところ、*trnT-trnL spacer*で形成される系統群が、ITSによりさらに細分化され、9系統に区別される事例を確認した(表7)。以上より、一次スクリーニングに*trnT-trnL spacer*を用い、必要に応じてITSを補助的に追加する二段階戦略が実務上有効かもしれない。ITSは核ゲノム由来で進化速度が高い一方、本研究のデータ集合では、葉緑体由来の連結領域の方が個体群内の微細な分化の検出により寄与した可能性がある。

## 4. 総括

本研究では、ノラニンジンの種内系統識別に向けて北海道各地から採集した材料を用い、候補領域を比較検討した。その結果、*rbcL*, *matK*, *atpB-rbcL*は本研究の範囲では種内多型が乏しく、一方で*trnT-trnL spacer*は高い解像度を示し、ITSにより系統群をさらに細分化し得ることを示した。サンプル数は限られるものの、得られたハプロタイプの分布に顕著な地域偏りは認められず、この点の一般化には地域および個体数を拡充したうえでの統計的検証が必要である。なお、予備検討にとどまったく*trnL-trnF spacer*では2カ所の変異が認められており、解像度の面で*trnT-trnL spacer*に比べて劣る可能性はあるものの、今後の検討対象として一定の有

用性は排除できない。

本研究の範囲内では、同一個体で両領域 (*trnT-trnL spacer*・ITS) を決定できたサンプルが12個体に限られ、解釈の一般化が課題として残る。また、今後は、両領域を同一個体で網羅したサンプルセットを拡充し、本戦略の再現性・汎用性の評価を進める。将来的には、広域かつ時系列のサンプリングと組み合わせることで、侵入経路の推定、遺伝子流入の有無の判定、導入源の推定へと発展しうる。

### 謝辞

本研究に際し、サンプリングに協力してくださった北海学園大学工学部生命工学科の学生のみなさんに感謝いたします。

### 参考文献

- 1) Spooner, DM : *Daucus : Taxonomy, phylogeny, and distribution. The Carrot Genome (Compendium of Plant Genomes)*. Springer, Cham. pp.9–26, 2019
- 2) 原松次：いぶりの植物（予報）。自費出版。1974
- 3) 北海道：北海道ブルーリスト2010。北海道環境生活部。[PDF]。2010（最終閲覧日2025-10-16）
- 4) Heywood VH : Relationships and evolution in the *Daucus carota* complex. Isr J Bot. 32, pp.51–65, 1983
- 5) Hauser TP, Bjørn GK : Hybrids between wild and cultivated carrots in Danish carrot fields. Genet Resour Crop Evol. 48, pp.499–506, 2001
- 6) 江口郁恵：ノラニンジンの生態的特性と遺伝的多様性。つくば生物ジャーナル。2, pp.59, 2003
- 7) 島本功, 佐々木卓治：タバコのDNA・RNA単離法『新版 植物のPCR実験プロトコール 核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法』。秀潤社。pp.49–50, 1997
- 8) CBOL Plant Working Group : A DNA barcode for land plants. PNAS. 106 (31), pp.12794–12797, 2009
- 9) 杉村英憲：樽前山に生息するコマクサのITS領域のDNA多型の解析。卒業論文。北海学園大学, 2015
- 10) 紺野敬介：コマクサおよびその近縁種の判別における4つのDNAマーカーの有効性。卒業論文。北海学園大学, 2016
- 11) Borsch T, Hilu KW, Quandt D, Wilde V, Neinhuis C, Barthlott W : Noncoding plastid *trnT-trnF* sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. J Evol Biol. 16, pp.558–576, 2003
- 12) 井鷺裕司, 陶山佳久：『生態学者が書いたDNAの本 メンデルの法則から遺伝情報の読み方まで』。文一総合出版。pp148, 2013
- 13) Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL : The tortoise and the hare II : Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. Am J Bot. 92, pp.142–166, 2005
- 14) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In : PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications. Academic Press. pp.315–322, 1990
- 15) Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ : The ITS region of nuclear ribosomal DNA : a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard. 82, pp.247–277, 1995