

原 著 論 文

ササリンドウ (*Gentiana scabra*) およびエゾリンドウ (*G. triflora*) の RAPD 法および SCAR マーカーによる系統識別城守 寛^{*1)}・中村郁郎²⁾・亀谷七七子³⁾・高畑義人¹⁾¹⁾ 岩手大学農学部, 盛岡市, 〒020-8550, ²⁾ 千葉大学大学院自然科学研究科, 松戸市, 〒271-0092, ³⁾ 岩手生物工学研究センター, 北上市, 〒024-0003, * 現岩手県立宮古北高等学校)

摘 要

現在園芸用のリンドウの育種に利用されている *Gentiana triflora* と *G. scabra* の種内および種間の変異性を明らかにするため, *G. scabra* 4系統, *G. triflora* 6系統, 両種の交配種 3系統および *G. triflora* 同士の交配種 2系統の合計 15系統を用い RAPD 法により解析した. 用いた 36個のプライマーのうち, 8個のプライマーで 53の多型を示すバンドが得られ, 種間変異と同様に種内変異が存在していた. 数量化理論Ⅲ類およびクラスター分析を行った結果, 用いた系統は *G. scabra* と *G. triflora* の2群に分かれた. ただし, *G. scabra* の1系統 Oz(尾瀬系)のみは *G. triflora* のグループに属した. また, 両種の交配系統 (*G. scabra* × *G. triflora*) は *G. scabra* と同じグループに属した. 次に, 両種を識別するための SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカー化を試みた. それぞれの種に最も特異的な多型バンドの塩基配列を決定し, 新たな2組の SCAR プライマーをデザインした. これらのプライマーのうち *G. triflora* に特異的なものは, 同種および同種内の交配系統 8系統のうち 6系統で特異断片を増幅し, *G. scabra* に特異的なプライマーは, RAPD 法で疑問が出ている Oz を除きすべての系統で特異断片を安定して増幅した. これらの SCAR プライマーについては, さらに多くの系統を調査してその安定性を明らかにする必要があるが, 現在のところある程度種を識別できるマーカーとして利用できると考えられた.

キーワード: リンドウ, *Gentiana scabra*, *G. triflora*, 系統分類, RAPD, SCAR

緒 言

リンドウ属 (*Gentiana*) は, 361 種からなり, リンドウ科 (*Gentianaceae*) の中で最も大きな属である (Ho and Liu 1990). わが国には, その中の 13 ~ 18 種 (研究者によって分類が異なる) が山野に自生しており, 古くから庭園

の花壇や鉢植えとして鑑賞されたり, 根茎を‘竜胆’として薬用に利用していた.

一方, 営利を目的とした園芸用のリンドウの栽培は, 昭和 25 年頃から山採り株の栽培という形で始まり, 現在まで主に *G. triflora* (エゾリンドウ, エゾオヤマリンドウ) と *G. scabra* (リンドウ, ササリンドウ) の 2 種を用いて系統選抜や種内および種間の系統間での F₁ 品種育成による育種が行われてきた (吉池 1991, 1992). これら *G. triflora* および *G. scabra* の形態的な特徴の違いは, 開花時の花器形質に見られ, *G. triflora* では花卉の先端 (花冠裂片) が外側に開かず, *G. scabra* では外側に反転する. またこの 2 種はそれぞれ自生地間でかなりの変異が存在することが知られており, これらを育種に利用するためにはそれらの間の遺伝的差異を明らかにすることが不可欠である. また, 両種は染色体数が 2n=26 と同数であり, 両種間の交雑も容易で種間の F₁ 品種も作出され F₁ 品種の稔性もある程度あることから, ゲノム的にはかなり類似していると考えられる. 今後, 種間雑種による変異性の増大や種間の系統間での F₁ 品種開発の増加が予想され, それに伴って両種の雑種を簡便に判別する方法を開発することが重要である.

最近, DNA 多型を利用した類縁関係の解析や品種判別がいろいろな植物で行われるようになってきている. 特に RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法は, ゲノム中の任意の DNA 部分を増幅することを前提として考案され (Williams *et al.* 1990), その手軽さから数多くの植物の品種および系統の識別, 系統分類などに用いられてきた. しかし RAPD 法は再現性の問題が指摘されていることから, RAPD マーカーをもとにより安定性のある SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) 化が行われている (Paran and Michelmore 1993). SCAR マーカーは, RAPD により検出した特異的な DNA 断片の塩基配列を決定後, その内部配列を増幅できるような 20mer 程度の新たなプライマーを設計し, PCR 反応により目的とする DNA マーカーを増幅できるようにしたものである.

リンドウ属において, ヨーロッパの種やわが国以外の種について DNA 多型を利用した解析が行われている (Gielly and Taberlet 1996, Yuan *et al.* 1996). しかし, 経済的に重要な *G. triflora* や *G. scabra* についての DNA 多

Table 1. Plant materials used in the present study

No.	Line		Species	Origin
1	Tottori	(Sasarindou)	<i>G. scabra</i>	Iwate Pref. Agr. Res. Center
2	Okushinano	(〃)	〃	〃
3	Oz	(〃)	〃	Ashiro Flower Res. Center
4	GSW100	(〃)	〃	〃
5	IHO	(Ezorindou)	<i>G. triflora</i>	Iwate Pref. Agr. Res. Center
6	HO.214	(〃)	〃	〃
7	Matuo	(〃)	〃	〃
8	Ezo-wase	(〃)	〃	〃
9	Yahaba8	(〃)	〃	Ashiro Flower Res. Center
10	N27	(〃)	〃	〃
11	Aluvireo		<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	〃
12	Oz×Yahaba9		<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	〃
13	GSW100×N27		<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	〃
14	N27×Yahaba8		<i>G. triflora</i> × <i>G. triflora</i>	〃
15	Jovanni		<i>G. triflora</i> × <i>G. triflora</i>	〃

型を利用した解析はほとんど行われていない。本研究では、RAPD法を用い、*G. triflora*と*G. scabra*の種間および種内の遺伝的変異性を明らかにするとともに、両種を識別できるSCARマーカーの構築を試みた。

材料および方法

1. 植物材料

*Gentiana scabra*4系統、*G. triflora*6系統、両種の交配種3系統および*G. triflora*同士の交配種2系統の合計15系統を用いた(Table 1)。これらはすべて岩手県農業研究センターおよび岩手県安代町花き開発センターから入手した。

2. DNAの抽出およびPCR

全DNAの抽出は、各系統の葉片0.1g(新鮮重)を液体窒素中で凍結粉砕し、Dellaporta *et al.* (1983)の方法に準じて行った。これを0.2~20ng/μlの濃度とし、鋳型DNAとして用いた。PCR反応液は、テンプレートDNA 1μl, DNAポリメラーゼ(*Tth* polymerase, TOYOBO) 0.5ユニット含む合計25μlとした。プライマーとして、32種類のCOMMONプライマー((株)ベックス)(A01~A32)と4種類の任意に合成したプライマーを用いた。なお、多型を示した8つのプライマーの塩基配列については、Table 2に示した。PCRはDNAエンジン(PTC-200, MJ Research Inc.)を用い、熱変性94°C 2分、アニーリング37°C 30秒、伸張反応72°C 1分を1サイクルとして38サイクル行った。反応終了後、PCR増幅産物4μlを1.5%アガロースゲル電気泳動法を用いて分離し、エチジウムブロミドで10分間染色した。

3. データ解析

多型を示したDNA断片のバンドの有無に基づいて

1-0 データマトリックスを作成し、それをもとに各系統間のユークリッド距離を求め、数量化理論Ⅲ類(Hayashi 1950)およびクラスター分析(Ward法)(Ward 1963)を行った。なお、解析には、多変量解析ソフトStatPartner Ver.2((株)日本電気ソフトウェア)を使用した。

4. 種特異性を示したDNA断片の塩基配列の決定

*G. scabra*と*G. triflora*間で多型性を示したバンドのうち、プライマーA06により増幅された2つのバンドをアガロースゲルより切り出し、DNAの回収を行い、得られたDNAをTAクローニング法(TA Cloning Kit, Invitrogen)により、クローニングを行った。大腸菌は、MacCONKEY AGER培地(50g/l)で組換えプラスミドを持つ大腸菌のコロニーを選抜した。大腸菌からのDNAの抽出はアルカリミニプレップ法により行った。DNAの塩基配列決定は、パーキンエルマー社ABI PRISM 373Aを用い、ダイターミネーター法で行った。

5. 種特異的DNA断片の増幅

得られたDNA断片の塩基配列から新たなプライマーをデザインした(Table 3)。これらのプライマーを用いて、Table 1の15系統でPCRを行った。なお反応条件はA6-6では熱変性94°C 1分30秒、アニーリング62°C 30秒、伸張反応72°C 1分を1サイクルとして6サイクル行い、その後熱変性94°C 1分30秒、アニーリング58°C 30秒、伸張反応72°C 1分を1サイクルとして36サイクル行った。A6-7では、熱変性94°C 1分30秒、アニーリング52°C 30秒、伸張反応72°C 1分を1サイクルとして38サイクル行った。反応終了後、PCR増幅産物4μlを1.5%アガロースゲル電気泳動法を用いて分離し、エチジウムブロミドで10分間染色した。

結果

1. RAPD 分析

供試したリンドウ 15 系統において、合計 36 個のプライマーを用いて PCR を行った結果、18 個のプライマーで合計 98 の増幅バンドが得られた。それらのうち、多型性を示したのは 8 個のプライマー (Table 2) で、53 のバンドであった。プライマー A06 を用いた時、約 400bp のバンドが *G. scabra* の 4 系統中 3 系統、交配種 (*G. scabra* × *G. triflora*) の Aluvireo (アルビレオ) および GSW100 × N27 で特異的に観察された。また同じく約 500bp のバンドは *G. triflora* のすべての系統、交配種 (*G. triflora* × *G. triflora*) の 2 系統および *G. scabra* の Oz (尾瀬系) に観察された (Fig. 1)。プライマー A11 では、約 1,000bp のバンドが *G. scabra* の 4 系統すべてに特異的に観察され、その交配種 (*G. scabra* × *G. triflora*) の Oz × Yahaba9 でも同じバンドが観察された。プライマー A23 では約 1,800bp のバンドが *G. scabra* の 4 系統中 3 系統で観察され、併せて交配種の GSW100 × N27 でも観察された。一方、プライマー A24 では、約 1,000bp のバンドが *G. triflora* 3 系統と *G. triflora* 間の交配種の Giovanni (ジョバンニ) で特異的に観察された。プライマー A25 では、約 1,000bp のバンドが *G. scabra* の 4 系統および両種間の交配種 3 系統すべてにおいて観察された。

検出された 53 個の共通バンドの多型の割合をもとに数量化理論Ⅲ類を用いて各系統間の類縁性を調査した (Fig. 2)。その結果、*G. scabra* の Tottori (鳥取系)、Okushinano (奥信濃系)、GSW100、および *G. scabra* と *G. triflora* の交配種であるアルビレオ、GSW100 × N27 および Oz × Yahaba9 は 1 群にまとまった。一方、それ以外の *G. triflora* および *G. triflora* 同士の交配種は、*G. scabra* の群とは異なりⅡ軸で大きな変異を示した。その中でも、*G. triflora* の N27, Matuo (松尾系), Ezo-wase (エゾ早生

Table 2. List of RAPD primers showing polymorphism

Primer	Sequence
A06	5'-ACT GGC CGA GGG-3'
A11	5'-ACT GAC CTA GTT-3'
A13	5'-CTC AGC GAT ACG-3'
A15	5'-ATC GCG GAA TAT-3'
A23	5'-AAG TGG TGG TAT-3'
A24	5'-GAC GGT TCA AGC-3'
A25	5'-GGT CAG GCA CCA-3'
Kin4	5'-GAC CTC AAG CCA GAGAA-3'

系)、および交配種のジョバンニがまとまり、また IHO (北海道系)、HO. 214 (北海道系)、Yahaba8 (矢巾系) および N27 × Yahaba8 が別のまとまりを形成した。*G. scabra* の Oz は *G. scabra* 群には属さず、*G. triflora* の中の後者のまとまりと近い所に分布した。また N27 × Yahaba8 の交配系統は、両親系統の中間に位置した。同様のデータを用いてクラスター分析を行ったところ、数量化理論Ⅲ類と類似した結果が得られ、*G. scabra* と *G. triflora* の 2 つのグループに大きく分かれた (Fig. 3)。*G. scabra* のグループには、*G. scabra* の 4 系統のうち鳥取系、奥信濃系、GSW100 の 3 系統と *G. scabra* と *G. triflora* の交配種がまとまった。一方、*G. triflora* のグループには *G. triflora* 6 系統と *G. triflora* 同士の交配種および *G. scabra* の尾瀬系が入った。

2. 特異的な DNA 断片のクローニング、シーケンスおよび SCAR マーカーの作成

プライマー A06 を用いて得られた増幅 DNA 断片の中から、*G. scabra* に特異的な約 400bp のバンド (A6-6) および *G. triflora* に特異的な約 500bp のバンド (A6-7) に注目し、これらの DNA の塩基配列を決定した。約 400bp

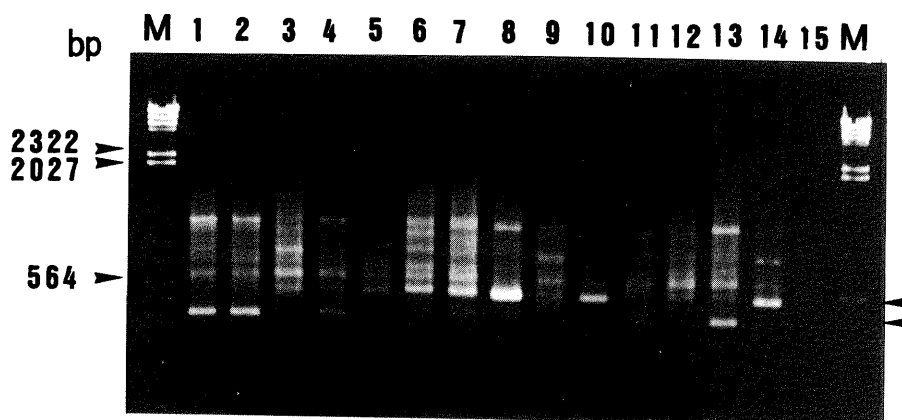


Fig. 1. RAPD profiles of 15 gentian lines using primer A06. 1: 'Tottori', 2: 'Okushinano', 3: 'Oz', 4: 'GSW100', 5: 'IHO', 6: 'HO.214', 7: 'Matuo', 8: 'Ezo-wase', 9: 'Yahaba8', 10: 'N27', 11: 'Aluvireo', 12: 'Oz' × 'Yahaba9', 13: 'GSW100' × 'N27', 14: 'N27' × 'Yahaba8', 15: 'Giovanni', M: DNA size marker. Arrow heads on the right side show the positions of polymorphic 400bp and 500bp bands.

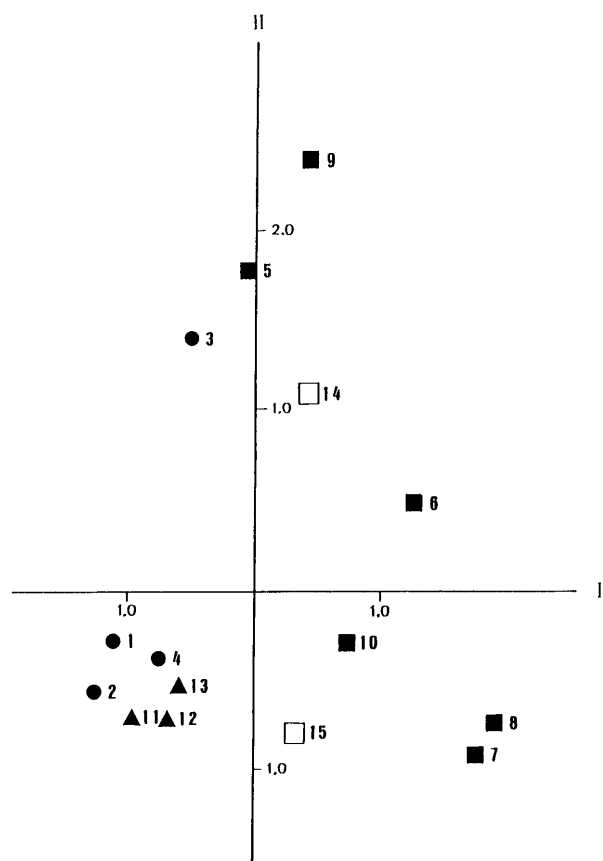


Fig. 2. The scattergram of 15 gentian lines projected on the first and second axes of quantification theory (Suryoka) III. The numbers beside the symbols correspond to those shown in Table 1. ● *G. scabra*, ■ *G. triflora*, ▲ Hybrid between *G. scabra* and *G. triflora*, □ Hybrid between lines of *G. triflora*.

のバンドは403bp, 約500bpのバンドは500bpのサイズであった。これらの塩基配列についてホモロジー検索を行ったところ、相同性の高い配列は見い出せなかった。これらの塩基配列をもとにSCARマーカー化を試み、2対の19ないし20bpのプライマーをデザインした。すなわち *G. scabra* に特異的な403bpのバンドを増幅するプライマーをA6-6/5PおよびA6-6/3Pとし、*G. triflora* に特異的な500bpのバンドを増幅するプライマーをA6-7/5PおよびA6-7/3Pとした。これらのプライマーを用いて15系統についてPCRを行った結果をFig. 4およびFig. 5に示した(Table 3)。A6-6のプライマーを用いた場合は、*G. scabra* の4系統中尾瀬系を除いた3系統で400bp付近の同じバンドが増幅された。また交配種

Table 3. SCAR primers for species-specific markers

Name	Sequence	Species
A6-6/5P	5'-ATC ACT TAG ACA AGG AGG CA-3'	<i>G. scabra</i>
A6-6/3P	5'-ATT GAT AAA GAA GAC AGA GC-3'	
A6-7/5P	5'-CGA GTA ACG GTG ATT TTG GA-3'	<i>G. triflora</i>
A6-7/3P	5'-GCG GCC TAC CAC TGT TGA T-3'	

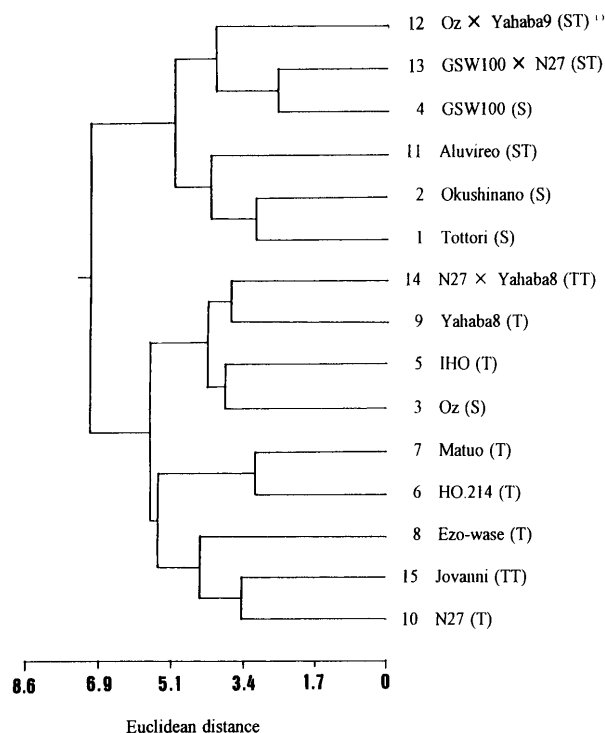


Fig. 3. Dendrogram of 15 gentian lines based on cluster analysis of RAPD data. The numbers beside the line names correspond to those in Table 1. ¹⁾ S: *G. scabra*, T: *G. triflora*, ST: *G. scabra* × *G. triflora*, TT: *G. triflora* × *G. triflora*.

(*G. scabra* × *G. triflora*) のアルビレオおよび GSW100 × N27 でも同様のバンドが観察された。一方、A6-7 のプライマーを用いた場合は、*G. triflora* の6系統中4系統、*G. triflora* 同士の交配種の2系統において500bpのバンドが観察された。またこれらのバンドについて、*G. triflora* および *G. scabra* それぞれ3系統の異なった5株間でPCRを行い、個体間差異の有無を調査したところ、同一のバンドを示し、株間での差はみられなかった。

考 察

RFLP法(Botstein *et al.* 1980)およびRAPD法(Williams *et al.* 1990)が開発されて以来、多くの作物でDNA多型に基づいた品種識別や系統解析が行われている。花卉類についても、ペチュニア(Cerny *et al.* 1996)、バラ(Millan *et al.* 1996)、ボタン(Hosoki *et al.* 1997)、ユリ(Yamagishi 1995)などでこれらの方法が種間の類縁関係や品種識別に有用であることが報告されている。本研究では園芸用のリンドウの主要な育種素材であるエゾリンドウ(*G. triflora*)とササリンドウ(*G. scabra*)およびそれらの種間および系統間交雑系統を用いてRAPD分析を行い、両種間の類縁関係や遺伝的な変異性について調査した。18種の任意プライマーで計98個のバンドが検出され、そのうち53個(54%)で多型性が認められ、これら植物種にはかなりの遺伝的変異が内在していると考えられた。

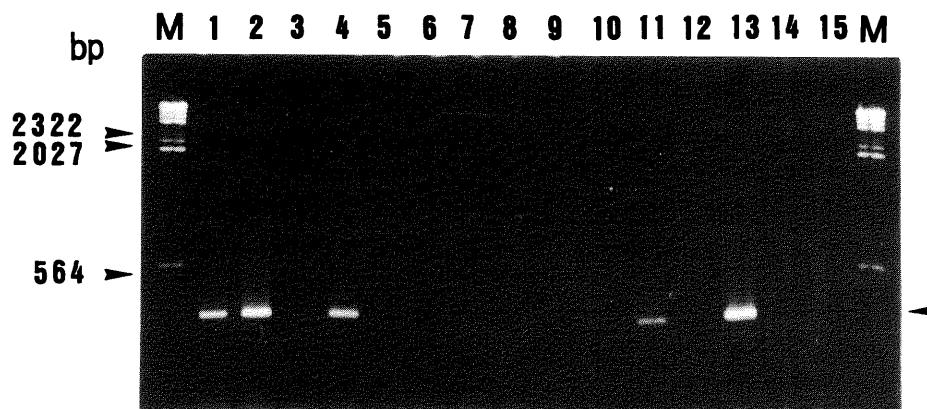


Fig. 4. SCAR profiles of 15 gentian lines using the primer pair, A6-6, that amplify *G. scabra* specific fragments. 1: 'Tottori', 2: 'Okushinano', 3: 'Oz', 4: 'GSW100', 5: 'IHO', 6: 'HO.214', 7: 'Matuo', 8: 'Ezo-wase', 9: 'Yahaba8', 10: 'N27', 11: 'Aluvireo', 12: 'Oz'×'Yahaba9', 13: 'GSW100'×'N27', 14: 'N27'×'Yahaba8', 15: 'Jovanni', M: DNA size marker. Arrow heads on the right side show the positions of polymorphic 400bp and 500bp bands.

米澤・河野(1989)は、量的な形態形質13形質を用いた主成分分析において、これらの2種類は重複した分布を示すことを報告している。本研究では得られた多型バンドのパターンに基づいて、数量理論Ⅲ類およびクラスター分析を用い両種間の変異性と類縁性の程度をみたところ、両分析法において *G. scabra* と *G. triflora* は異なるグループに分けることができたが、*G. scabra* 系統のうちOzは *G. triflora* のグループに属した。これらの結果は、形態的形質では連続的変異を示して識別が困難な場合でも、DNA多型によって種の識別が可能であることを示している。すなわち、形態的には連続的変異を示す系統群の識別に、DNA多型の利用が非常に有効であった。数量化理論Ⅲ類の散布図でみた両種の変異性は、*G. scabra* の3系統が小さく、*G. triflora* が大きい傾向にあった。その理由として、用いた系統数の違いも考えられるが、今回用いた *G. triflora* に含まれた系統の中には、従来エ

ゾオヤマリンドウ (*G. triflora* f. *montana*) として分類されていたものを含んでいる可能性があるためと推察された。*G. scabra*×*G. triflora* の雑種系統は *G. scabra* のグループに含まれた。その理由は不明であるが、もしかしたらRAPDのバンドの中に細胞質ゲノムに由来するものがあるのかもしれない。一方、*G. scabra* のグループに入ったのかもしれない。一方、*G. scabra* の選抜系統と考えられているOz(尾瀬系)は *G. scabra* よりむしろ *G. triflora* に近く、*G. triflora* と移入交雑した可能性も考えられ、さらに検討する必要があると思われる。

以上述べたように、53個の多型バンドで *G. scabra* と *G. triflora* に分けることができたが、両種を識別できるDNAマーカーを見出すことができれば、育種を行う上で様々な利点がある。*G. scabra* と *G. triflora* の分類は、従来形態学的な形質を用いており、特に花器の形質で見

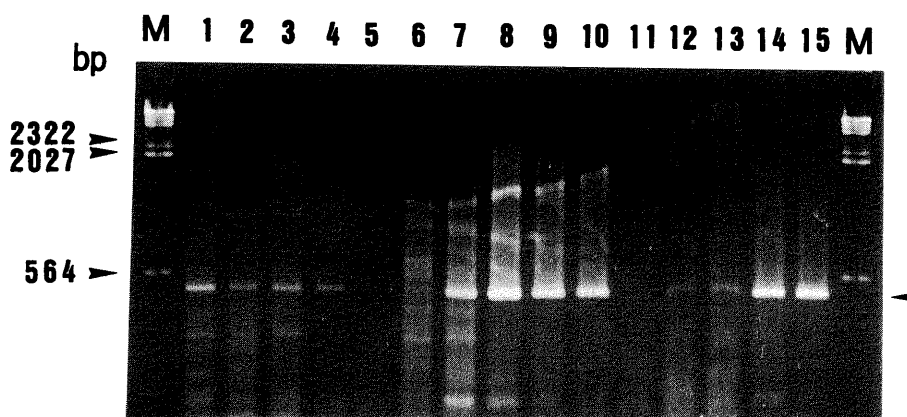


Fig. 5. SCAR profiles of 15 gentian lines using the primer pair, A6-7, that amplify *G. triflora* specific fragments. 1: 'Tottori', 2: 'Okushinano', 3: 'Oz', 4: 'GSW100', 5: 'IHO', 6: 'HO.214', 7: 'Matuo', 8: 'Ezo-wase', 9: 'Yahaba8', 10: 'N27', 11: 'Aluvireo', 12: 'Oz'×'Yahaba9', 13: 'GSW100'×'N27', 14: 'N27'×'Yahaba8', 15: 'Jovanni', M: DNA size marker. Arrow heads on the right side show the positions of polymorphic 400bp and 500bp bands.

分けるのが容易であり, *G. scabra* では花卉の先端(花冠裂片)が外側に開き, *G. triflora* ではほとんど開かない(吉池 1992)。この識別法は簡便であるが, 開花期まで待つ必要があり, 種特異的 DNA マーカーが同定できれば, 早期識別が可能となる。しかし, RAPD マーカーに関しては, 再現性の問題が常に指摘されているのが現状である。そこで, 多型性を示した 53 個の DNA 断片の中で, それぞれの種にとって最も特異的と思われた DNA 断片をそれぞれクローニングして塩基配列を解読した。次いで解読した塩基配列に基づいて新たなプライマーをデザインして SCAR マーカー化を試みた。*G. scabra* に特異的な A6-6 プライマーは, 分類に疑問が出ている尾瀬系を除きすべての系統で特異断片を安定して増幅した。*G. triflora* に特異的な A6-7 プライマーは, *G. triflora* と同種内の雑種 8 系統のうち 6 系統で特異断片を増幅したが, RAPD 法で特異的バンドが出た *G. triflora* 2 系統では増幅しなかった。この原因は不明であるが, 新たに設計した SCAR プライマーが数塩基異なっていたため他の系統ではアニールできなかったかもしれない。したがってこれらの SCAR マーカーについては, さらに多くの系統を調査してその安定性を明らかにする必要があるが, 現在のところある程度種を識別できるマーカーとして利用できると考えられる。

最近, リンドウ属について, Yuan *et al.* (1996) がわが国以外の 20 種についてリボソーム DNA の ITS (Internal transcribed spacers) の塩基配列を解析し, Gielly and Taberlet (1996) はヨーロッパの野生種について葉緑体 DNA *trnL* (UAA) のイントロン塩基配列から系統関係を調査したが, これらは比較的遠縁な種間の類縁関係を解析した報告である。本研究では RAPD 法や SCAR 法を用いることにより, エゾリンドウとササリンドウという非常に近縁な種間を識別できることを示しており, リンドウの育種を進める上で有用な技術となると考えられる。

謝 辞

本研究を取りまとめるに当たり, 岩手大学海妻矩彦学長, 山形大学農学部今西 茂教授にご助言をいただいた。また材料を提供いただいた岩手県農業研究センター, 岩手県安代町花き開発センター吉池貞蔵所長, 日影孝志副所長に感謝の意を表す。(財)岩手生物工学研究センター江井 仁所長, 岩手県立宮古北高等学校鈴木 浩校長には研究の機会を提供していただき感謝の意を表す。

引用文献

- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R.W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Cerny, T. A., G. Caetano-Anolles, R. N. Trigiano and T. W. Starman (1996) Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of *Petunia* taxa. *Theor. Appl. Genet.* 92: 1009-1016.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) Plant DNA mini-preparation, version I. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Gielly, L. and P. Taberlet (1996) A phylogeny of the European gentians inferred from chloroplast *trnL* (UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 120: 57-75.
- Hayashi, C. (1950) On the quantification of qualitative data from the mathematico-statistical point of view. *Ann. Inst. Statist. Math.* 2: 35-47.
- Ho, T. N. and S. H. Liu (1990) The infrageneric classification of *Gentiana* (Gentianaceae). *Bull. Brit. Museum Nat. Hist. (Botany)* 20: 169-192.
- Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997) Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 66: 393-400.
- Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. M. Torres and J. I. Cubero (1996) Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 273-277.
- Paran, I. and R. W. Michelmore (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Yamagishi, M. (1995) Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.* 91: 830-835.
- 米澤信道・河野昭一(1989)日本産リンドウ属リンドウ節植物の変異性と分類学的位置. 植物分類, 地理 40: 13-30.
- 吉池貞蔵(1991)リンドウの育種. 育種学最近の進歩第 33 集. 養賢堂, 東京. 66-76.
- 吉池貞蔵(1992)花専科育種と栽培リンドウ, 誠文堂新光社, 東京. 177.
- Yuan, Y., P. Kupfer and J. J. Doyle (1996) Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 83: 641-652.
- Ward, J. H. Jr. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Statist. Ass.* 58: 236-244.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S.V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

RAPD Analysis of *Gentiana scabra* and *G. triflora* and Detection of Species-specific SCAR Markers

Hiroshi Jomori^{*1)}, Ikuo Nakamura²⁾, Nanako Kameya³⁾ and Yoshihito Takahata¹⁾

¹⁾ Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

²⁾ Graduate School of Science and Technology, Chiba University, Matsudo, Chiba 271-0092, Japan

³⁾ Iwate Biotechnology Research Center, Kitakami, Iwate 024-0003, Japan

* Present address Miyako-Kita High School, Tarou, Iwate 027-0352, Japan

The interspecific relationship between *Gentiana scabra* and *G. triflora* and their intra-specific variation were investigated by RAPD analysis using 15 strains composed of 4 *G. scabra* lines, 6 *G. triflora* lines, 3 interspecific hybrids and 2 intra-specific hybrids of *G. triflora*. Out of 36 primers used for RAPD analysis, 8 primers generated 53 polymorphic DNA fragments, among them. Quantification theory (Suryoka) III and cluster analysis based on the polymorphic data showed that these two species were divided into two separate groups except for one *G. scabra* strain, 'Oz' which belongs to the *G. triflora* group. All the hybrid lines between *G. scabra* and *G. triflora* could be classified into the *G. scabra* group. RAPD fragments specific to each species were cloned and sequenced. The sequences were further used

to design SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) primer sets for discriminating between the two species. The SCAR primer set specific to *G. scabra*, amplified a specific fragment in all the strains of *G. scabra* except for the 'Oz' line, and the primer set specific to *G. triflora* gave a specific fragment in 6 out of 8 *G. triflora* strains and the intraspecific hybrids. These results indicated that the SCAR markers may be good indicators for discriminating between the two *Gentiana* species.

Key Words: gentian, *Gentiana scabra*, *G. triflora*, genetic relationship, RAPD, SCAR.