

#### 第4章 分子生物学的手法によるリンドウ属植物の系統解析

#### 第4章 分子生物学的手法によるリンドウ属植物の系統解析

##### 第1節 *G. scabra* と *G. triflora* のRAPD法およびSCARマーカによる系統識別

###### 1. 緒言

営利を目的とした園芸用のリンドウの栽培は、昭和25年頃から山採り株を栽培する形で始まり、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F<sub>1</sub>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、開花時の花器の形質に見られ、*G. triflora* では花弁の先端(花冠裂片)が外側に開かず、*G. scabra* では外側に反転する。またこれらの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、育種に利用する場合、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、両種は染色体数がいずれも2n=26であり、両種間の交雑も容易で種間のF<sub>1</sub>品種も作出され、しかもF<sub>1</sub>品種の稔性が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の考えられる。今後、種間交雑種や種内の系統間F<sub>1</sub>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の判別が種々の植物で行われている。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)、その手軽さから多数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.

現在まで, リンドウ属において, わが国以外のヨーロッパの種について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, 経済的にわが国の営利栽培用リンドウとして重要な *G. triflora* や *G. scabra* についてのDNA多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.

## 2. 材料および方法

### (1) 材料

*G. scabra* 4系統, *G. triflora* 6系統, 両種の交雑種 3系統および *G. triflora* 同士の交配種 2系統の計15系統を用いた (表 4-1) . これらはすべて岩手県園芸試験場 (現岩手県農業研究センター) および岩手県安代町花卉開発センターから入手した.

### (2) 方法

#### 1) DNAの抽出およびPCR

全DNA の抽出は, 各系統品種 (以下系統と略す) の葉片0.1g (新鮮重) を液体窒素中で凍結粉碎し, Dellaporta et al. (1983) の方法に準じて行った (表 4-2) . これを0.2~20ng/ $\mu$ lの濃度とし, 鋳型DNA として用いた. PCR

表4-1 供試材料

NO.	系統および品種名	種名	入手先
1	TO	<i>G. scabra</i>	岩手県立園芸試験場 <sup>1)</sup>
2	奥信濃	//	//
3	OZ	//	安代町花き開発センター
4	GSW100	//	//
5	IHO	<i>G. triflora</i>	岩手県立園芸試験場 <sup>1)</sup>
6	HO.214	//	//
7	松尾系	//	//
8	エゾ早生	//	//
9	Y8	//	安代町花き開発センター
10	N27	//	//
11	アルレビオ	<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	//
12	OZ × Y9	<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	//
13	GSW100 × N27	<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>	//
14	N27 × Y8	<i>G. triflora</i> × <i>G. triflora</i>	//
15	ジョバンニ	<i>G. triflora</i> × <i>G. triflora</i>	//

<sup>1)</sup> 現岩手県農業研究センター

表4-2 DNAの抽出方法<sup>1)</sup>

- 1 葉片を液体窒素で凍結して、乳鉢を用いて粉末化する。
- 2 1mlのTEN8バッファーを加えて、ホモジネートする。
- 3 1.5ml遠心チューブに移す（水中）。
- 4 微量高速遠心機で15,000rpm10分間遠心する。  
\* チューブの方向をそろえる。
- 5 約750 $\mu$ lの上清を新しい遠心チューブに取る。
- 6 50 $\mu$ lの20%SDSを加える。
- 7 ボルテックスで攪拌する。
- 8 65°Cのヒートブロックで20分間加熱する。
- 9 250 $\mu$ lの5M酢酸カリウム溶液（pH8.0）を加える。
- 10 ボルテックスで攪拌する。
- 11 水中で約20分間静置する（2hrでも可）。
- 12 微量高速遠心機で15,000rpm10分間遠心する。
- 13 約700 $\mu$ lの上清を新しいチューブに取る。
- 14 等量（約700 $\mu$ l）冷イソプロパノールを加える。
- 15 ボルテックスで攪拌する。
- 16 水中で約20分間静置する（overnightでも可）。
- 17 微量高速遠心機で15,000rpm10分間遠心する。
- 18 アスピレーターで上清を取り除く。
- 19 減圧乾燥を行う（10分間）。
- 20 沈殿を400 $\mu$ lのTEに溶解する（65°C 5~10分）。
- 21 ボルテックスで攪拌する。
- 22 等量（400 $\mu$ l）のフェノール：クロロフォルム（1：1）を加える。
- 23 ボルテックスで攪拌する。
- 24 微量高速遠心機で15,000rpm 2分間遠心する。
- 25 上層（約400 $\mu$ l）を注意深く取り、新しいチューブに移す。
- 26 40 $\mu$ lの3M酢酸ナトリウムを加える。
- 27 1mlの冷エタノール（100%）を加える。
- 28 ボルテックスで攪拌する。
- 29 水中で20分間静置する。
- 30 微量高速遠心機で15,000rpm10分間遠心する。
- 31 アスピレーターで上清を取り除く。
- 32 1mlの75%エタノールで沈殿をリンスする。
- 33 アスピレーターで上清を取り除く。
- 34 減圧乾燥を行う（10分間）。
- 35 冷凍庫で保存する。

<sup>1)</sup>Dellaporta et al. (1983)

反応液は、テンプレートDNA 1 $\mu$ l, DNA ポリメラーゼ (*Tth* polymerase, TOYOBO) 0.5 ユニット, およびプライマー1 $\mu$ lを含む合計25 $\mu$ l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、多型性を示した8種類のプライマーの塩基配列については、表4-3に示したとおりである。PCR はDNA エンジン (PTC-200, MJ Research Inc.) を用い、熱変性94 $^{\circ}$ C 2分, アニール37 $^{\circ}$ C 30秒, 伸張反応72 $^{\circ}$ 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4 $\mu$ l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。

## 2) データ解析

多型性を示した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平均距離を求め、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。

## 3) 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

表4-3 多型性を示したプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
A 06	5'-ACT GGC CGA GGG-3'
A 11	5'-ACT GAC CTA GTT-3'
A 13	5'-CTC AGC GAT ACG-3'
A 15	5'-ATC GCG GAA TAT-3'
A 23	5'-AAG TGG TGG TAT-3'
A 24	5'-GAC GGT TCA AGC-3'
A 25	5'-GGT CAG GCA CCA-3'
Kin4	5'-GAC CTC AAG CCA GAGAA-3'

マー社ABI PRISM 373Aを用い、ダイターミネーター法で行った。

#### 4) 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(表4-4)。これらのプライマーを用い、表4-1の15系統について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°C30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°C30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°C30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4  $\mu$ l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. 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種類のプライマー(表4-3)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、種間交雑種(*G. scabra*  $\times$  *G. triflora*)のアルピレオおよびGSW100 $\times$ 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*  $\times$  *G. triflora*)の2系統および*G. scabra*の0Z(尾瀬系)に観察された(図4-1)。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、それらの種間交雑系統(*G. scabra*  $\times$  *G. triflora*)の0Z $\times$ Y9でも同じバンドが観察された。プライマー

表4-4 種特異的SCARマーカーの塩基配列

名称 <sup>1)</sup>	塩基配列	種名
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'	

<sup>1)</sup>種特異的SCARマーカーの名称



図4-1 プライマーA06を用いたリンドウ15系統のRAPD分析

1 : T0 2 : 奥信濃 3 : OZ 4 : GSW100 5 : IHO 6 : HO.214  
 7 : 松尾 8 : エゾ早生 9 : Y9 10 : N27 11 : アルビレオ  
 12 : OZ×Y9 13 : GSW100×N27 14 : N27×Y8 15 : ジョバンニ  
 M : DNAサイズマーカー 右の矢印は, 400bp (A6-6) と500bp  
 (A6-7) のバンドを示す.

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, 併せて種間交雑系統の 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* の種内交雑種の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系統および両種間交雑種3系統すべてにおいて観察された.

検出された53個の共通する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(図4-2). その結果, *G. scabra* T0系, 奥信濃系, GSW100, および *G. scabra* と *G. triflora* の種間交雑種であるアルビレオ, GSW100×N27 および OZ×Y9 は1群にまとまった. 一方, それ以外の *G. triflora* IH0, HO.214, Y8 および *G. triflora* 同士の種内交雑種 N27×Y8 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, さらに *G. triflora* の N27, 松尾系, エゾ早生系, および種内交雑種のジョバンニがまとまった. *G. scabra* の OZ (尾瀬系) は *G. scabra* 群には属さず, *G. triflora* の中の前者のまとまりと近い位置に分布した. また N27×Y8 の種内交雑系統は, 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* の二つのグループに大きく分かれた(図4-3). *G. scabra* のグループには, *G. scabra* の4系統のうち T0系, 奥信濃系, GSW100の3系統と *G. scabra* と *G. triflora* の種間交雑種がまとまった. 一方, *G. triflora* のグループには *G. triflora* 6系統と *G. triflora* 種内交雑種および *G. scabra* の OZ (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

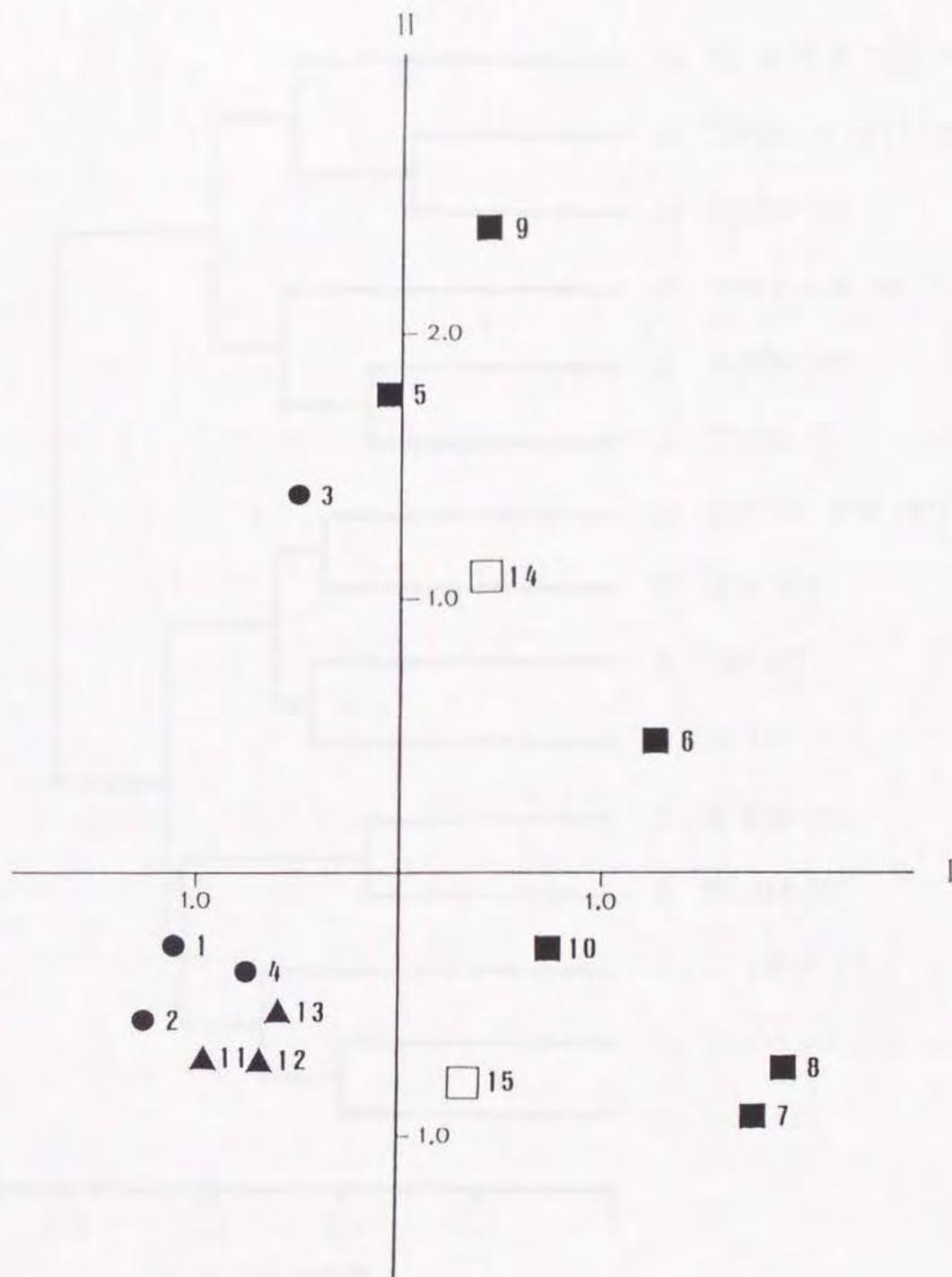


図4-2 リンドウ15系統のRAPD分析で得られたバンドの数量化理論Ⅲ類による散布図

番号は表4-1に示したものと同様である。

● *G. scabra* ■ *G. triflora* ▲ *G. scabra* × *G. triflora* の

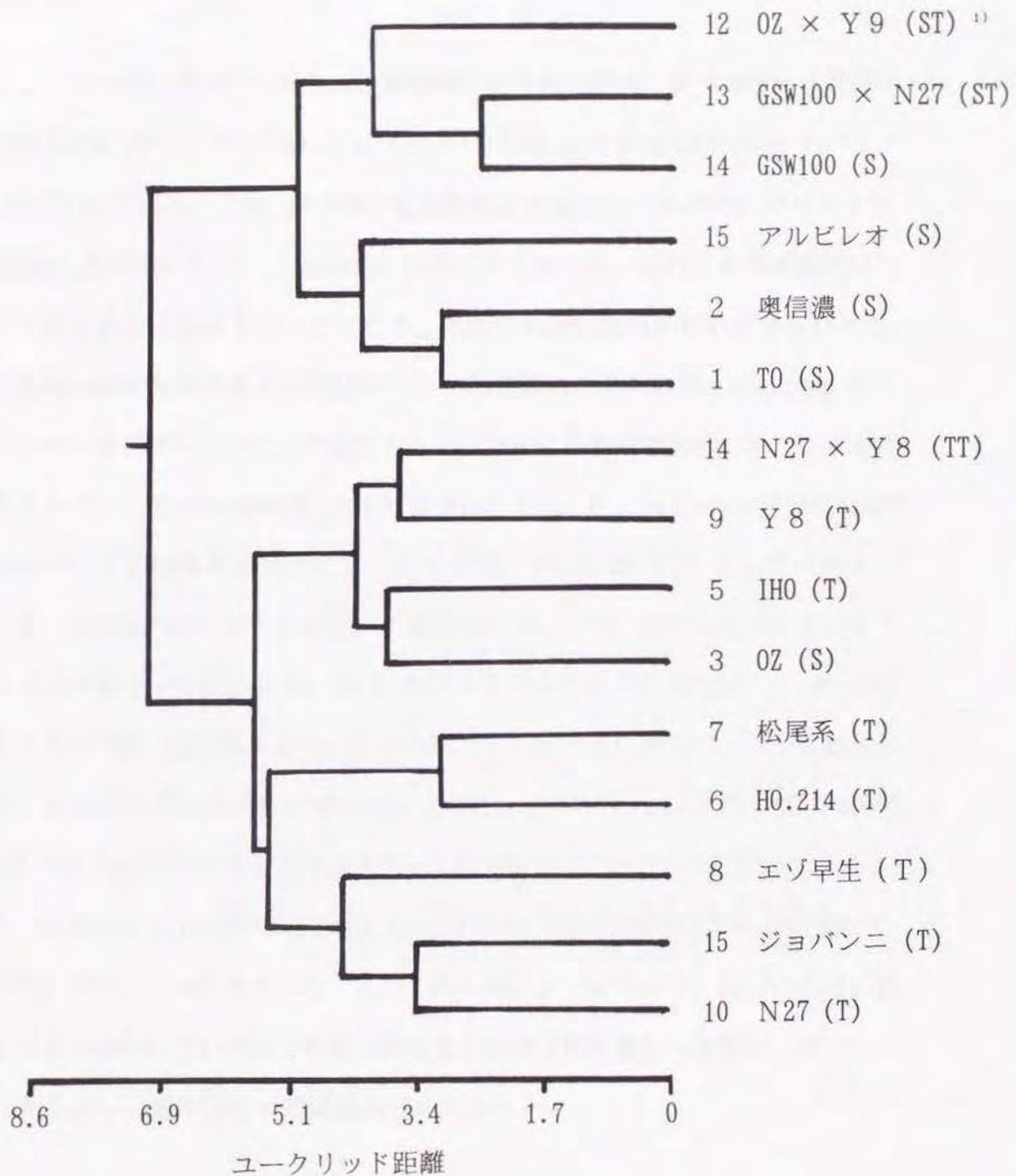


図4-3 RAPDのクラスター分析によるリンドウ属15系統の系統樹

番号は表4-1に示したものと同様である。

<sup>1)</sup> S : *G. scabra* T : *G. triflora* ST : *G. scabra* ×  
*G. triflora* TT : *G. triflora* × *G. triflora*

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 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だせなかった. これらの塩基配列をもとにSCARマーカ―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(表4-4). これらのプライマーを用いて15系統についてPCR を行った結果を図4-4および図4-5に示した. A6-6 のプライマーを用いた場合は, *G. scabra* の4系統中0Z(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. また種間交雑種(*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* 種内交雑種の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系統の異なる5株間でPCR を行った結果, 同一のバンドを示し, 個体間での差異はみられなかった.

#### 4. 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



図4-4 *G. scabra*に特異的なA6-6プライマーによるリンドウ15系統間の  
SCAR分析

1 : T0 2 : 奥信濃 3 : OZ 4 : GSW100 5 : IHO 6 : HO.214

7 : 松尾 8 : エゾ早生 9 : Y9 10 : N27 11 : アルビレオ

12 : OZ×Y9 13 : GSW100×N27 14 : N27×Y8 15 : ジョバンニ

M : DNAサイズマーカー 右の矢印は、400bpのバンドを示す。

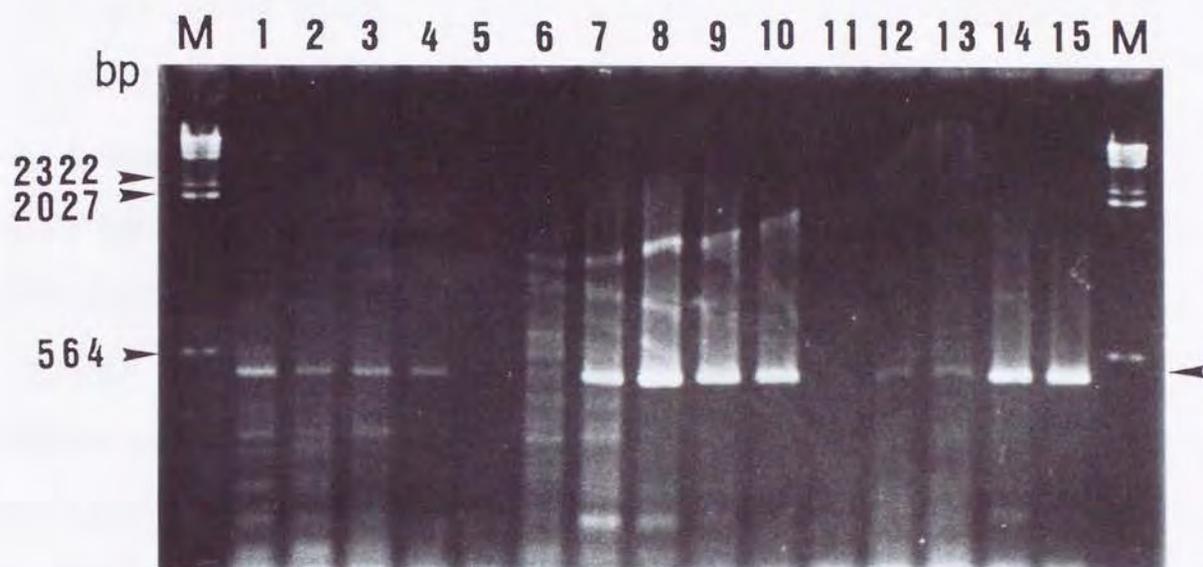


図4-5 *G. triflora*に特異的なA6-7プライマーによるリンドウ15系統間のSCAR分析

1 : T0 2 : 奥信濃 3 : OZ 4 : GSW100 5 : IHO 6 : HO.214  
 7 : 松尾 8 : エゾ早生 9 : Y9 10 : N27 11 : アルビレオ  
 12 : OZ×Y9 13 : GSW100×N27 14 : N27×Y8 15 : ジョバンニ  
 M : DNAサイズマーカー 右の矢印は、500bpのバンドを示す。

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種内交雑系統を用いて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種類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。

米澤・河野(1989)は、13種類の量的な形態的形質を用いた主成分分析を行い、これらの2種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、数量化理論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0% (尾瀬系)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類による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、供試系統数の違いも考えられるが、本研究で用いた*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*の種間雑種系統は*G. scabra*のグループに含まれた。その理由は不明であるが、RAPD分析で得られたバンドの中に細胞質ゲノムに由来するものがいくつかあり、そのため両種間

雑種系統が母親の*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た。

以上述べたように、共通する53個の多型性バンドで*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分けるのが容易であり、*G. scabra*では花弁の先端（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 マーカーによる同定ができれば、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き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全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*の6系統および同種内雑種2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つたのかもしれない。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、現在のところ種を識別するマーカーとしてある程度利用できると思

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、Geilly 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類縁関係を調査したが、これらは比較的遠縁の種間について解析した報告である。本研究の結果、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。

## 第2節 葉緑体のPS-ID配列を用いたリンドウ科植物の分子系統解析

### 1. 緒言

本章第1節では、RAPD法およびSCARマーカーによる *G. scabra* および *G. triflora* の系統解析を行い、これらの2種を識別できるプライマーの開発を行った。これにより現在切り花に多く用いられているリンドウ属2種を分子生物学的手法により識別できる可能性を示した。一方、リンドウ属にはこれら2種の他に数多くの種があり、今後新たなリンドウの品種改良を行う場合には、遺伝資源として重要なこれらリンドウ属の類縁関係を明らかにすることが不可欠である。

従来、植物の類縁関係は、形態学、細胞遺伝学およびアイソザイムなど生化学に基づく分析が行われてきた。しかし、近年分子生物学的手法の発達によりDNAの塩基配列を間接的に比較するRFLPやRAPD法に加え、塩基配列を読みとることが容易となり塩基配列を直接比較することが可能となった。例えば、核の

DNAをはじめ、ミトコンドリアおよび葉緑体DNAを直接比較することにより植物の系統分析が行われている。核のDNAを用いた例としては、トウモロコシ (Edward and Holtsford 1996) , アルファルファ (Bena et al. 1998) などがあり、ミトコンドリアDNAではマスクメロン (Eckenrode and Levings 1986, Newton 1988) , スイカ (Ward et al. 1981) などの植物で解析が行われている。

一方、葉緑体DNAも用いられており (Wolfe et al. 1987, Murakami 2000) , その中で、主にリブローズ二リン酸カルボキシラーゼ オキシゲナーゼ (Rubisco) の大サブユニット遺伝子 (*rbcl*) (長谷部 1992, Soltis et al. 1990) , およびロイシン転移RNA *trnL* (UAA) (Taberlet et al. 1991) が用いられている。しかし、*rbcl*のDNA塩基配列の比較は、分子時計として科以上の系統進化の解析には威力を発揮するが、それ以下の分類単位の (属および種レベル) では変異が十分検出されないとしている (荻原 1992) 。一方、Nakamura et al. (1997) は、葉緑体DNAの中で、種の分化にともなって同一配列から変異を蓄積した部位として *rp16-rp14*の介在配列のplastid subtype ID(PS-ID)に注目し、この配列を解析することにより植物種を同定できる可能性を示した。

本研究は、リンドウ属17種に、トルコギキョウ、エキザカム、センブリを加えたリンドウ科植物の類縁関係を明らかにするため、葉緑体のPS-ID配列による分子系統解析を試みた。

## 2. 材料および方法

### (1) 材料

実験に用いた材料は、リンドウ科のリンドウ属17種19系統、ユーストマ属

表4-5 供試材料

学名	染色体数 <sup>1)</sup>	原産地	入手先 <sup>2)</sup>
<i>Gentiana asclepiadea</i> L	2n=32,36,44	フランス中部・東部, ドイツ	1
<i>G. cruciata</i> L	2n=52	東ヨーロッパ, アルメニア	1
<i>G. dahurica</i> Fisch	2n=26	アジア, 北西中国	1
<i>G. decumbens</i> L	2n=26	中国, シベリア	1
<i>G. depressa</i> D. Don	2n=34,36,40,42	ヒマラヤ	1
<i>G. fetisowii</i> Rege et C. Winkl	2n=32~36	中国, 西シベリア	1
<i>G. frigida</i> Haenke	2n=24	西ヨーロッパ, アルプス	1
<i>G. gracilipes</i> Turrill	2n=26	北西中国, コーカサス	1
<i>G. lutea</i> L	2n=34~36,40,42	アルプス, ヨーロッパ	3
<i>G. moorcroftiana</i>	—	ヒマラヤ	1
( <i>Gentianella Moorcroftiana</i> )			
<i>G. ochrolenca</i> Froel	2n=26	テラウエア, 北フロリダ	1
(= <i>G. villosa</i> L)			
<i>G. ornata</i> Wallich ex Griseb	—	ネール中部, 中国	1
<i>G. paradoxa</i> Alboff	—	コーカサス	1
<i>G. saponaria</i> L.	2n=26	アメリカ, アパラチア山脈	1
<i>G. scabra</i> Bunge “TO”	2n=26	北アジア, 日本	2
“OK”	2n=26		2
<i>G. siphonatha</i> Maxim.	—	北西中国, チベット	1
<i>G. triflora</i> Pall “Ezowase”	2n=26	シベリア, 韓国, 日本	2
“Thatovo”	2n=26		2
<i>Exacum affine</i> Balf. “トワ-フミセツトブルー”	2n=36	地中海ヨトウ島	4
<i>Eustoma grandiflorum</i> Griseb. “霧の峰”	2n=36	北アメリカ	4
<i>Swertia japonica</i>	2n=18,20,24	日本	5

<sup>1)</sup> HAYKA(1969), 遠藤(1998), Goldblatt and Johnson(1998)

<sup>2)</sup> 1: 岩手県立花きセンター, 2: 岩手県立園芸試験場(現岩手県農業研究センター),  
3: 千葉大学園芸学部, 4: (株)サカタのタネ, 5: 東和町在来

1種, エキザカム属1種, およびセンブリ属1種合計20種22系統を用いた(表4-5)。これらの材料は, 岩手県立花きセンター, 岩手県園芸試験場(現岩手県農業研究センター), 千葉大学園芸学部, (株)サカタのタネおよび岩手県和賀郡東和町より入手した。

## (2) 方法

### 1) DNA 抽出およびPCR

DNA の抽出は, 新鮮葉0.1gを液体窒素中で凍結粉碎し, 植物DNA 抽出用キットNucleon PhytoPure(amersham pharmacia biotech)で行った。PCR 反応液は, テンプレートDNA 10-50ng, DNA ポリメラーゼ (Ex-Taq, TaKaRa) 0.5 ユニットを含む合計25 $\mu$ lとした。プライマーは, *rpl* 16および*rpl* 14から設計した36bpの3' および5' の側から増幅する2種類を用いた(表4-6)。

PCR はDNAエンジン (PTC-200, MJ Research Inc.) を用い, 熱変性94 $^{\circ}$ C 2分, アニーリング52 $^{\circ}$ C 30秒, 伸張反応72 $^{\circ}$ C 1分間を1サイクルとして38サイクル行った。なお反応終了後, PCR 増幅産物を1.5%アガロース電気泳動を用いて分離し, エチジウムブロミドで染色した。またこのPCR産物は, 分光光度計を用いてDNA 濃度を測定した。シーケンス用のDNA の増幅は, テンプレートDNA 30~90ng, プライマー (5' -ATG CCT ATA CGA ATC CAA TT-3' ) 3.2pmol, プレミックス (Perkin Elmer Japan) 8 $\mu$ lを滅菌水で20 $\mu$ lに調整した反応液を用いて行った。反応条件は, 96 $^{\circ}$ Cでホットスタートし, 熱変性96 $^{\circ}$ C 1分, アニーリング47 $^{\circ}$ C 1分, 伸張反応60 $^{\circ}$ C 2分を1サイクルとして35サイクル行った。PCRはGeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Japan) を用いた。これをシーケンス用DNA とした。

### 2) シーケンスおよびデータ解析

表4-6 PS-IDを増幅するためのプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
PS-ID3PI	5'-ATC TGC AGC ATT TAA ATG GGT CTG AGG TTG AAT CAT-3'
PS-ID5PI	5'-AAA GAT CTA GAT TCC GTA AAC AAC ATA GAG GAA GAA-3'

シーケンス用DNA は, CentriSep スピニングカラム (Perkin Elmer Japan) で精製した. 塩基配列の決定は, ABI PRISM373A (Perkin Elmer Japan) を用い, ダイターミネーター法で行った. 得られた塩基配列は, Genetyx Mac Ver.10 (ソフトウェア開発(株)) で解析し, UPGMA法により系統樹を作成した.

### 3. 結果

リンドウ科植物の22系統のPS-IDのシーケンスの結果, 得られた塩基配列は98~102bpであった (表4-7). 得られた塩基配列について, リンドウ属内17種19系統について比較したところ, *G. scabra* および *G. triflora* の同一種の2系統は同じ配列であり, また, これらの2種を含む12種 (*G. saponaria*, *G. ornate*, *G. gracilipes*, *G. moorcroftana*, *G. cruciata*, *G. dahurica*, *G. fetisowii*, *G. frigida*, *G. decumbens*, *G. ochrolenca*, *G. scabra* 2系統, *G. triflora* 2系統) は同一の塩基配列を示し, 比較的近縁種と考えられたが, ほかの5種は, 1~45個の範囲で塩基配列が異なっていた. すなわち, *G. siphonatha* では1個, *G. paradoxa* および *G. depressa* では2個, *G. asclepiadea* では28個, および *G. lutea* では45個の塩基配列の違いがみられた. また, 属の違うトルコギキョウ, エキザカムおよびセンブリでは, リンドウ属の植物と比較し多くの塩基配列の違いがみられ, *G. scabra* および *G. triflora* 群と上記の3属を比較したところ48個 (欠失は除く) の塩基配列の違いがみられた.

次に, 得られた塩基配列に基づき系統樹を作成した (図4-6, 図4-7). なお, 塩基配列が一致していたリンドウ属の12種については1種のみを用いて分析を行った. その結果, 用いた種は大きく二つのグループに分かれ, リンドウ属の6種を含む群とその他の属であるトルコギキョウ, エキザカムおよび

表4-7 リンドウ科植物の葉緑体のPS-1D塩基配列

種名	塩基配列 (bp)										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>Gentiana asclepiadea</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTCTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAT	TTTTCTTTT	TAGACAAAA	AATATTTCT	TTTTTTTCT	***
<i>G. cruciata</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. dahurica</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. decumbens</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. depressa</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. fetisowii</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. frigida</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. gracilipes</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. lutea</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	GAAAAATTT	AAAAATTTT	TCITTTTGA	CAAAAAATA	TTTCTTTT	TTTCTTTC	CTTTGAAITG	***
<i>G. moorcroftiana</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. ochroleuca</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. ornata</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. paradoxa</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. saponaria</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. scabra</i> <sup>1)</sup>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. scabra</i> <sup>2)</sup>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. siphnata</i>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. triflora</i> <sup>3)</sup>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>G. triflora</i> <sup>4)</sup>	TAAAGTATA	AAAAGAACA	CTAACAAAA	CGGTTTTTCA	TTATGAAAA	TTTTAAAAAT	TTAGACAAA	AAATATTTCT	TTTTTTTCT	TGTCCTTTC	***
<i>Exacum affine</i> <sup>5)</sup>	***AAGG*ATA	***AG*ACAA	CCAACAGAAA	AGGTTCTTCG	TTATGAAAA	AAAAATGAAA	AATGGATTT	TTAGACAAA	CAAAATATTC	TGTTTTTCT	TGG
<i>Eustoma grandiflorum</i> <sup>6)</sup>	TAA*CGG*ATA	AAA*GGACA*	CTAACAGAAA	TGGTTCTTCA	TTATGAAAA	ATTACAAGTT	TTTTTTTGA	CAAAATAAT	TICTTTTTT	CTTCTCCTT	TGC
<i>Sweetia japonica</i>	TAA**GT*TA	AAAAGA*CAA	TCAACAAAA	TGGTTCTTCA	TTATGAAAA	ATGGCAAT	TCTTTTTT	TGAGATAAAC	AATATTTCT	TTTTTTTCT	TTC

系統および品種名: <sup>1)</sup> OK, <sup>2)</sup> TO, <sup>3)</sup> エゾ早生, <sup>4)</sup> IH0, <sup>5)</sup> ドワーフミゼットブルー, <sup>6)</sup> 霧の峰,

\* : 欠失, 青色: 置換

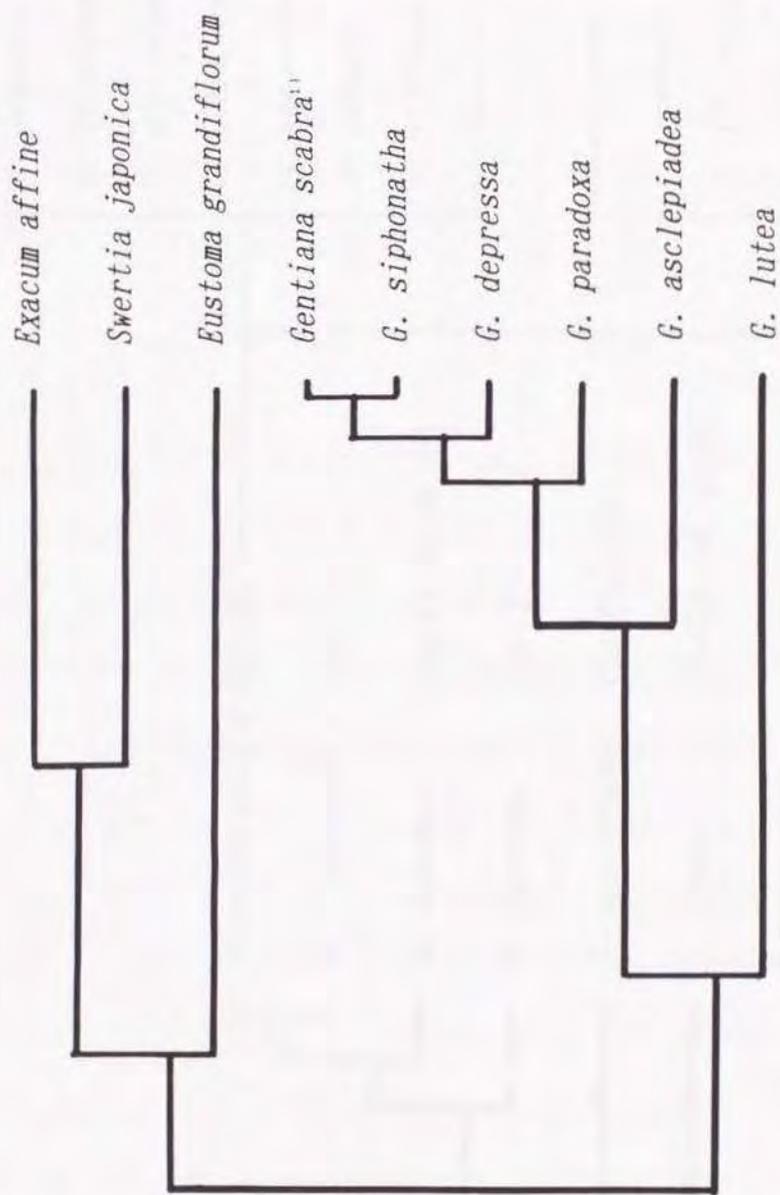


図4-6 リンドウ科植物のPS-IDの塩基配列に基づいたUPGMAによる系統樹

ここに、*G. saponaria*, *G. ornata*, *G. gracilipes*, *G. moorcroftiana*,  
*G. cruciata*, *G. dahurica*, *G. fetisowii*, *G. frigida*, *G. decumbens*,  
*G. ochrolenca*, *G. scabra* (2系統), *G. triflora* (2系統) の種が含まれる。

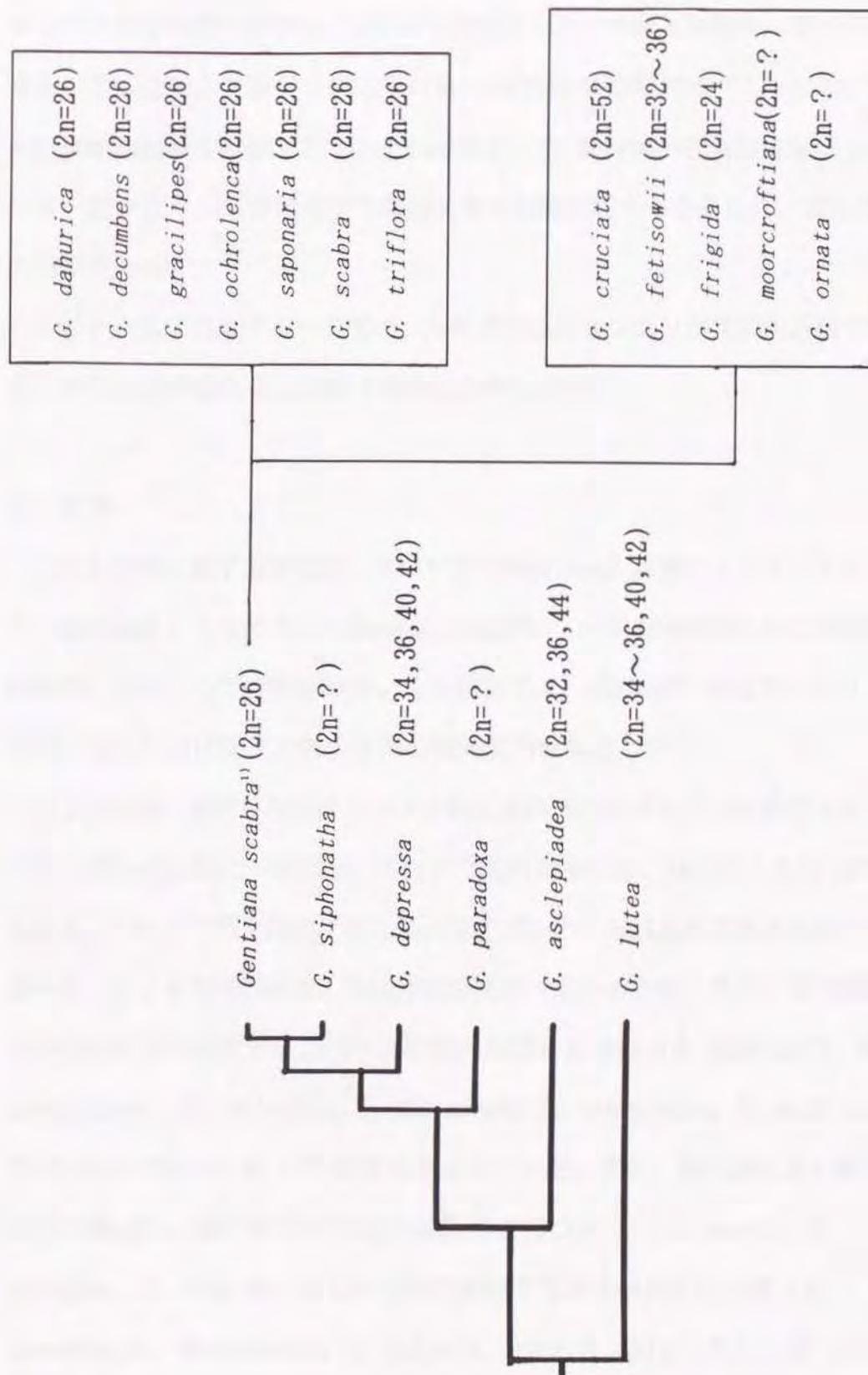


図4-7 リンドウ属植物のPS-IDの塩基配列に基づいたUPGMAによる系統樹

センブリを含む群に分かれ、後者は明らかにリンドウ属とは異なっていることを示した。また、リンドウ属内では*G. scabra*を含む12種のグループは、*G. siphonatha*と最も近縁であり、それに続き、*G. depressa*が近縁性を示した。一方、用いたリンドウ属の中で他種と最も遠縁性を示したものは、黄花の*G. lutea*であった。

リンドウ属以外のグループでは、エキザカムとセンブリが比較的近縁で、トルコギキョウがそれらと遠縁であることが示された。

#### 4. 考察

リンドウ科に属する植物は、リンドウ (*Gentiana*) 以外にも、トルコギキョウ (*Eustoma*)、エキザカム (*Exacum*) およびセンブリ (*Swertia*) などがあり、観賞用、薬用としての価値が高い。本研究では、葉緑体PS-IDを用いてリンドウ属に含まれる17種とこれら3属の類縁関係を検討した。

以上の結果、供試した種はリンドウ属とそれ以外の属の二つの群に大きく分かれ、従来の分類と一致した。リンドウ属内をみると、14は全く意同じPS-ID配列で、それらの種を識別することはできず、それらは近縁であることが示唆された。リンドウ属の種は、染色体数が異なっているものもあり、本実験結果と染色体数を比較すると、 $2n=26$ の染色体数をもつ種 (*G. saponaria*, *G. gracilipes*, *G. dahurica*, *G. decumbens*, *G. ochrolenca*, *G. scabra*, *G. triflora*) がすべて同じPS-ID配列をもっていた。また、 $2n=26$ 以外の染色体数を持つ種は $2n=26$ の群と同じ配列のPS-IDを持つ種 (*G. fetisowii*, *G. cruciata*, *G. frigida*) と1~45個の範囲で異なる配列を持つ種 (*G. depressa*, *G. asclepiadea*, *G. lutea*) に分かれた (図4-7)。特に、後者の3種の染色体数は、報告された研究者によって異なるが、いずれも $2n=36$ の

報告があり、 $2n=26$ の種のグループとは異なるものと考えられた。

また、形態的特徴などから、*G. lutea* (黄花, 草丈高, 広葉) は, 他のリンドウ属 (青~紫青花, 草丈中および低, 細葉) の一般的な形態とは明らかに異なっており, 今回のPS-IDの結果からも他の種と遠縁であることが示唆された。一方, *G. scabra*など異なるPS-ID配列をもつ*G. siphonata*, *G. depressa*, *G. paradoxa*および*G. asclepiadea*は, 形態的には*G. scabra*などのグループに類似し, 明確な差異は見い出せなかった。

従来分類 (豊国・豊国 1977) と比較すると, 同一塩基配列を示した12種のうち7種には, 1属 (チシマリンドウ属) および4節 (Kudoa節, Cruciata節, Monopodiae節, Pneumonathe節) が含まれており, また, Cruciata節に分類されている*G. depressa*は, Pneumonathe節の*G. scabra*と同一のPS-IDをもち, 同じCruciata節に含まれる*G. asclepiadea*は, *G. decumbens*と異なるPS-ID配列をもっていた。このことは, 従来分類が系統分化を反映していないことを示唆し, 今後の節の見直しが必要になるかもしれない。

一方, 核リボゾームDNAのInternal Transcribed Spacers(ITS)に基づいた系統解析(Yuan et al. 1996)では, 本実験で用いた1属4種が含まれており, *G. frigida* (*G. scabra*群) と*G. depressa*が近縁であること, *G. lutea*および*G. asclepiadea*は, これらとは遠縁であることが報告され, 本実験の結果と一致していた。また, 葉緑体DNA *trnL*(UAA)(Gielly and Taberlet 1996) では, 本実験で用いた材料のうち2属4種が含まれており, *G. asclepiadea*と*G. cruciata* (*G. scabra*群) が近縁で, それに続いて*G. frigida* (*G. scabra*群) が近縁であり, センブリは, これらリンドウ属とは遠縁であった。センブリとリンドウ属の遠縁性は, 本実験の結果と一致したが, リンドウ属3種の類縁関係は異なっていた。

以上，本実験からPS-IDによりリンドウ属17種とエキザカム，トルコギキョウおよびセンブリの類縁関係を明らかにした．この中でリンドウ属14種は全く同一のPS-ID配列をもち，それらの種の近縁性が示唆され，交配などにより，園芸用リンドウと遺伝子交換が可能と考えられた．今後，PS-ID以外の配列を用いて解析することにより，リンドウ属内の種間およびリンドウ科内の属間の系統分化の実体が明確になるものと思われる．