

Cyclamen spp. の RAPD および ISSR マーカーによる類縁関係の評価

和久井健司*・岡部慎也**・小松憲治*・丹羽克昌**・藤垣順三***

(平成 24 年 8 月 22 日受付/平成 24 年 10 月 19 日受理)

要約：RAPD および ISSR 法により、シクラメン (*Cyclamen*) 属内における種および個体間の遺伝的変異を評価し、類縁関係を推定した。シクラメン属野生種 (*C. persicum*, *C. coum*, *C. purpurascens*, *C. africanum*, *C. hederifolium*, *C. graecum* および *C. rohlfsianum*) および園芸品種 (*C. persicum* cv. カールソ, ネオゴールデンデングール) の計 7 種 24 個体について、17 種のランダムプライマーおよび 11 種の ISSR プライマーを用いた多型解析の結果、453 のバンドが検出され、全てのバンドで多型がみられた。そのうち、55 のバンドは種特異的であった。多型データに基づく AMOVA 解析の結果、遺伝的変異は種内と比べて種間で大きく、種の分化が明確に示された。同データによる数量化理論Ⅲ類より 7 種は 4 つのグループに分けられた。そこで、野生種のみを用いた UPGMA 法によるクラスター解析を行った結果、7 種は 3 つのクラスターを構成し、シクラメン属内の亜属を *Psilanthum*, *Gryophoebe*, *Cyclamen* および *Eucosme* とする、既報の分類仮説と一致した。本研究は、RAPD および ISSR マーカーを用いてシクラメン属内の類縁関係を示した最初の報告であり、これらマーカーによるシクラメン種の識別の可能性を示唆した。

キーワード：Cyclamen 属, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Inter simple sequence repeat (ISSR)

緒 言

シクラメン (*Cyclamen*) は、サクラソウ科シクラメン属に属し、塊茎を持つ多年草植物で、地中海沿岸を中心に自生しており、地理的分布が限られていることから、共通した形態的、生態的特徴を有している^{1,2)}。野生種は 20 種程度存在し、その中には芳香性のもつもの (*C. purpurascens*, *C. pseudibericum* 等)、耐寒性のもの (*C. coum* 等)、花卉基部に突起があるもの (*C. africanum* 等)、葉型が変わっているもの (*C. rohlfsianum*)、花色が花卉先端に向かって濃くなるもの (*C. libanoticum*) などがみられる¹⁾。

日本では冬季に花を咲かせることから人気が高く、国内では 200 ha を超える面積で栽培され、年間 2000 万鉢が出荷されている³⁾。シクラメンは自殖弱勢が顕著であるため、早くから F₁ 育種が進められ、1965 年にサカタ種苗より複輪種が最初に発表された⁴⁾。さらに、耐暑性、耐寒性、芳香性や花色についても改良が進められてきた^{2,4)}。現在栽培されているシクラメンは、地中海東部原産の原種 (*C. persicum*) が改良されてきた品種であるが⁵⁾、近年では園芸種だけでなく野生種 (*C. persicum*) も「原種シクラメン」として人気が高まり市場に出回るようになると同時に、*C. hederifolium*, *C. coum* など他の野生種も流通するようになった。さらに、胚培養により園芸種と野生種によ

る種間雑種も作出され⁶⁾、シクラメンの遺伝的多様性が増している。その一方、これまでにシクラメンの遺伝的な評価に関する研究はほとんど行われていない。

DNA 多型を利用した類縁関係の解析や品種識別が種々の植物で行われている^{7,8)}。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⁹⁾、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¹⁰⁻¹⁴⁾。同様に ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) も RAPD マーカーと同様の取り扱いで、ゲノム内の SSR (Simple sequence repeat) 間領域を増幅することができ、RAPD と共に事前にゲノムの DNA 配列情報を必要とすることなく、市販のプライマーセットで研究に取り掛かることができたため、比較的低コストな手法として多型解析に利用されている^{15,16)}。

シクラメンの系統分類は、これまで形態および生態的要因や染色体数に基づいて、亜属の分類が行われてきた^{17,18)}。現在までにシクラメン属を 4 亜属とする 2 つの報告がなされており、一方は、先に提唱された *Psilanthum*, *Gryophoebe*, *Cyclamen* および *Eucosme* 亜属とする説であり¹⁷⁾、他方は、*Psilanthum*, *Gryophoebe*, *Cyclamen* および *Persicum* 亜属とする説である¹⁾。両説で大きく異なる点は、前者の分類の *Eucosme* 亜属 (*C. persicum*, *C. graecum* および *C. rohlfsianum*

* 東京農業大学短期大学部生物生産技術学科

** 東京農業大学農学部農学科

*** 東京農業大学名誉教授

を含む)のほとんどの種を後者の分類では *Cyclamen* 亜属に含め、*C. persicum* を *Persicum* 亜属として分けていることである。こうした現状において、DNA マーカーを用いた系統分類は、5.8S リボソーム遺伝子および ITS (Internal Transcribed Spacer) 領域の多型解析に基づく報告のみであり、ほとんどなされていない¹⁹⁾。

そこで、本研究では国内で遺伝的多様性が高まるシクラメンについて、種の識別や遺伝的評価を可能にすることを将来的な目標とし、シクラメン属7種を供試し、RAPD および ISSR 法を用いて種内・間の遺伝的変異を検出し、種の類縁関係を評価した。

材料および方法

供試材料として、東京農業大学短期大学部生物生産技術学科植物資源利用学研究室で保存の、シクラメン属野生種 *C. persicum*, *C. coum*, *C. purpurascens*, *C. africanum*, *C. hederifolium*, *C. graecum*, *C. rohlfsianum* および園芸品種 *C. persicum* cv. カールソ, ネオゴールドンガールの計7種24個体を用いた。

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、ISOPLANT II (ニッポンジーン)の抽出キットを用いて行った。これを10ng/μlの濃度とし、鋳型DNAとして用いた。PCR反応液は鋳型DNA 2μl, 10xバッファー 2μl, dNTP ミクスチャー 1.6μl, 滅菌水 13.3μl, プライマー 1μl, DNAポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq) 0.5ユニットを含む合計20μlとした。プライマーは、ランダムプライマーであるOPA01~20 (Operon Co.) 及びISSRプライマーであるUBC801~900 (The University of British Columbia) で予備実験をし、明瞭なバンドが得られた計28プライマーを用いた (Table 1)。PCRサイクルは、ランダムプライマーを用いた場合、熱変性94℃ 1分、アニーリング38℃ 1分、伸長72℃ 1分を1サイクルとして35サイクル行った。一方、ISSRプライマーを用いた場合、熱変性94℃ 30秒、アニーリング53℃ 1分、伸長72℃ 2分を1サイクルとして35サイクル行った。なお、PCRにはPTC-100 (MJ Research Inc.) を用いた。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にて分離し、エチジウムブロマイドで15分間染色した後、UV照射下で撮影をした。なお、上記の実験は3回反復した。

多型を示した明瞭なバンドについてのみ、その有無に基づいて、1-0データマトリックスを作成した。それをもとに各種間及び種内の遺伝的多様度を求めるため、アプリケーションソフト GenAlEx²⁰⁾ を用いて、AMOVA解析 (Analysis of Molecular Variance) を行った。得られた分散成分は999回のランダムパーミュテーションテストで検定した。さらに、各個体間のユークリッド距離に基づいて数量化理論Ⅲ類²¹⁾を行うとともに、UPGMA法 (unweighted pair-group method with arithmetic mean) により系統樹を作成した。

結果および考察

供試したシクラメン7種において、17個のランダムプ

ライマーと、11個のISSRプライマーを用いてPCRを行った結果、すべてのプライマーで合計453個の増幅断片が得られた (Table 1)。検出された断片のすべてが多型を示し、プライマー当たりの多型バンド数の平均は16.3個であった。

検出されたバンドの多型性により、各種内の個体間に遺伝的な差異がみられた一方、各種の個体に共通してみられる種特異的バンドが検出された (Fig. 1)。用いたプライマー28個のうち、23プライマーで種特異的なバンドが計55個検出された (Table 1)。

この多型データに基づいたAMOVAにより、遺伝的な分散を解析した結果、種間の分散成分が全分散の68.5%を占めており、種内の値(31.5%)よりも有意 ($p < 0.01$) に高かった。このことは、シクラメン属内で明確な種分化が生じていることを示している (Table 2)。

検出された多型データをもとに数量化理論Ⅲ類を用いて、各種間の類縁性を調査した。その結果、各個体が種ごとにまとまり、種の違いが明確に位置づけられた (Fig. 2)。第1軸に沿って *C. persicum* とそれ以外の種で大きく別れ、*C. persicum* では原種と園芸品種の個体群が明確に分かれ

Table 1 Sequence of primers employed and the number of scored total and polymorphic bands based on RAPD and ISSR analyses.

Name of primers	Sequences (5' - 3')	Total no. of bands	No. of polymorphic bands	No. of specific bands for species
OPA01	CAGGCCCTTC	24	24	2
OPA02	TGCCGAGCTG	14	14	1
OPA03	AGTCAGCCAC	16	16	3
OPA04	AATCGGGCTG	16	16	1
OPA05	AGGGGTCTTG	11	11	3
OPA07	GAAACGGGTG	15	15	0
OPA08	GTGACGTAGG	21	21	4
OPA09	GGGTAACGCC	13	13	1
OPA10	GTGATCGCAG	19	19	6
OPA11	CAATCGCCGT	18	18	5
OPA12	TCGGCGATAG	14	14	1
OPA13	CAGCACCCAC	14	14	1
OPA15	TTCCGAACCC	13	13	5
OPA16	AGCCAGCGAA	14	14	0
OPA18	AGGTGACCGT	17	17	1
OPA19	CAAACGTCGG	13	13	2
OPA20	GTTGCGATCC	17	17	1
UBC-807	(AG) ₈ T	26	26	2
UBC-808	(AG) ₈ C	21	21	1
UBC-809	(AG) ₈ G	18	18	2
UBC-811	(GA) ₈ C	22	22	3
UBC-826	(AC) ₈ C	13	13	0
UBC-834	(AG) ₈ YT	19	19	3
UBC-836	(AG) ₈ YA	19	19	2
UBC-842	(GA) ₈ YG	20	20	1
UBC-861	(ACC) ₆	6	6	0
UBC-888	BDB(CA) ₇	11	11	3
UBC-889	DBD(AC) ₇	9	9	1
Total		453	453	55
Average		16.3	16.3	1.9

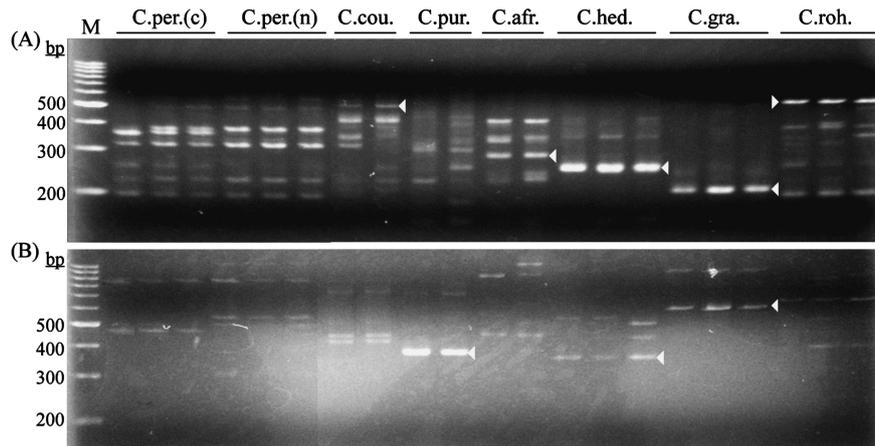


Fig. 1 RAPD banding patterns produced by OPA-11 (A) and UBC-808 (B) with individual samples of *Cyclamen* seven species. The arrow shows the specific band for each species. M is a 100 bp ladder DNA. C. per. (c) : *C. persicum* cv. Carlso, C. per. (n) : *C. persicum* cv. Neo-golden-girl, C. cou. : *C. coum*, C. pur. : *C. purpurascens*, C. afr. : *C. africanum*, C. hed. : *C. hederifolium*, C. gra. : *C. graecum*, C. roh. : *C. rohlfsianum*.

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) for RAPD data sets showing the variation apportioned among and within species.

Source of variation	d. f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	Probability
Among species	7	912.333	38.461	68.5	<0.01
Within species	16	283.167	17.698	31.5	
Total	23	1195.500	56.159		

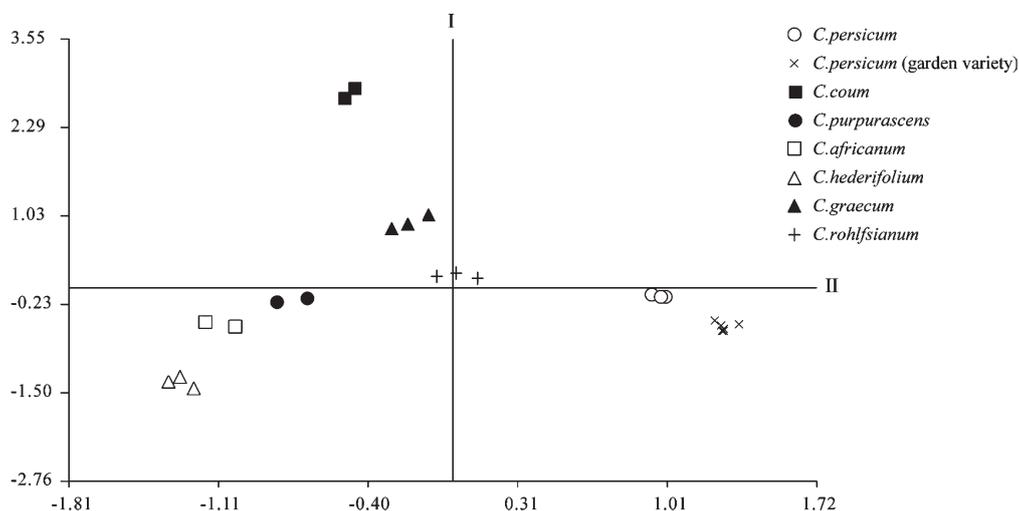


Fig. 2 Quantification theory (Suryoka) III based on polymorphic data of seven species of *Cyclamen* by using RAPD and ISSR markers.

遺伝的に区別された。第2軸の方向には *C. persicum* 以外の種が展開した。*C. graecum* および *C. rohlfsianum*, 並びに *C. africanum*, *C. hederifolium* および *C. purpurascens* がそれぞれ比較的近くに位置づけられた。その一方, *C. coum* は特に離れて位置づけられた。

野生種間における類縁性を評価するため, *C. persicum* の

園芸品種を除いたデータを用いてクラスター解析を行った (Fig. 3)。その結果, *C. coum* を除き, 大きく2つのグループに分かれた。一方は, *C. persicum*, *C. rohlfsianum* および *C. graecum* からなり, 他方は *C. africanum*, *C. hederifolium* および *C. purpurascens* からなった。前者のグループは, *C. persicum* と *C. graecum* から成るクラスターに *C. rohlfsia-*

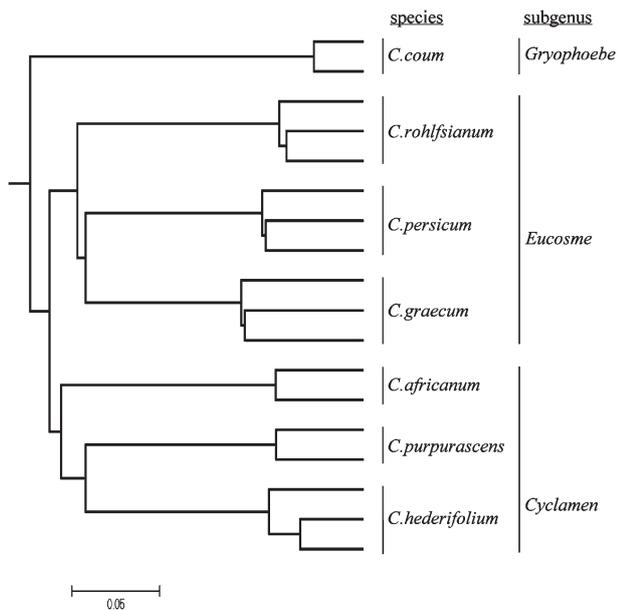


Fig. 3 UPGMA dendrogram based on genetic distance estimated by using RAPD and ISSR among seven *Cyclamen* species.

numが繋がった。一方、後者のグループは*C. hederifolium*と*C. purpurascens*から成るクラスターに*C. africanum*が繋がって構成された。本研究では、*Psilanthum* 亜属とされる種は供試していないものの、用いた種におけるクラスターの構成は、シクラメン属を*Psilanthum*, *Gryophoebe*, *Cyclamen* および *Eucosme* の4亜属とする説を支持する結果となった。すなわち、*C. persicum*は独立してクラスターを形成することなく、*C. rohlfianum* および *C. graecum* と共にまとまる一方、*C. africanum*, *C. hederifolium* および *C. purpurascens* の3種は一つのクラスターを形成し、各クラスターを構成する種が、それぞれ *Eucosme* 亜属および *Cyclamen* 亜属とする ANDERBERG (1994) の説と一致した。さらに *C. coum* は他の種から離れて位置づけられ、*Gryophoebe* 亜属として別亜属とすることが相当な結果であった。また、本結果は5.8Sリボソーム遺伝子およびITS領域の多型解析に基づく結果とも一致した¹⁹⁾。*C. persicum*, *C. graecum* および *C. rohlfianum* の染色体数は、それぞれ $2n=48$, 84 および 96 であり、基本染色体数 $x=12$ の倍数種からなる亜属 (*Eucosme*) として位置づけることができる¹⁹⁾。一方、*C. hederifolium* と *C. purpurascens* はともに $2n=34$ であり、*C. africanum* は $2n=34$ または 68 であり、 $x=17$ の倍数種からなる亜属 (*Cyclamen*) としてまとまる。他方、*C. coum* は $2n=30$ ($x=15$) として、両亜属の種とはさらにことなる染色体構成であるということも、本クラスター解析で形成されたグループの結果を支持している。

以上のことから、RAPD および ISSR 法により、シクラメン属の種の類縁関係を推定できることが示された。特に5.8Sリボソーム遺伝子およびITS領域の多型解析に基づく結果と一致したこのことは、RAPD および ISSR マーカー

による種の遺伝的評価の有効性を示している。このことは、本研究で得られた種特異的なマーカーの有効性を示唆するものでもある。種間交雑などにより遺伝的多様性が増しているシクラメンにおいては、将来的に雑種の遺伝的評価の重要性が増すものと考えられる。すなわち、種を簡便に識別することが可能となれば、作出した個体や系統における雑種性の確認のみならず、系統の保護や維持・管理の点においても有効となる。特に、RAPD および ISSR 法は安価に、且つ手軽に行うことができることから利便性が高いといえる。本研究で得られた種特異的なマーカーの実用性をさらに高めるため、現在、マーカーのSTS (sequence tag site) 化を試みている。

引用文献

- 1) GREY-WILSON C (1988) *Cyclamen*. A guide for gardeners, horticulturists and botanists. Timber press, Portland, Oregon.
- 2) 宮島郁夫 (1993) シクラメンの育種と大量増殖. 育種の現状と展望. 農耕と園芸 48 (9) : 122-125.
- 3) 農林水産省大臣官房統計部 (2010) 平成 21 年産花きの作付 (収穫) 面積及び出荷量. 農林水産省統計 1-28.
- 4) 長村智司 (1996) 花き産業の現状と将来展望. わが国の花き生産の現状と動向. シクラメン. 農業および園芸 71 (1) : 219-223.
- 5) 柴田道夫 (1993) シクラメンの育種と大量増殖. 大量増殖の現状と展望. 農耕と園芸 48 (9) : 130-133.
- 6) ISHIZAKA H (2008) Interspecific hybridization by embryo rescue in the genus *Cyclamen*. *Plant Biotech.* 25 : 511-519.
- 7) Semagn K, BJØRNSTAD Å, NDJONDJOP MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotech.* 5 (25) : 2540-2568.
- 8) AGARWAL M, SHRIVASTAVA N, PADH H (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27 : 617-631.
- 9) WILLIAMS JG, KUBELIK AR, LIVAK KJ, RAFALSKI JA, TINGEY S.V (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535.
- 10) RUAS PM, BONIFACIO A, RUAS CF, FAIRBANKS DJ, ANDERSEN WR (1999) Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). *Euphytica* 105 (1) : 25-32.
- 11) JOMORI H, NAKAMURA I, KAMEYA N, TAKAHATA Y (2000) RAPD analysis of *Gentiana scabra* and *G. triflora* and detection of species of species-specific SCAR markers. *Jpn. Soc. Breed.* 2 : 81-87.
- 12) BUSSELL JD, WAYCOTT M, CHAPPILL JA (2005) Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Persp. Plant Ecol. Evol. Sys.* 7 : 3-26.
- 13) BISWAS MD S, AKHOND MD AY, AL-AMIN MD, KHATUN M, KABIR MR (2009) Genetic relationship among ten promising eggplant varieties using RAPD markers. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 19 (2) : 119-126.
- 14) MAYA MA, RABBANI MG, MAHBOOB MG, MATSUBARA Y (2012) Assessment of genetic relationship among 15 Citrus fruits using RAPD. *Asian J. Biotech.* 4 (1) : 30-37.
- 15) BORNET B, BRANCHARD M (2004) Use of ISSR fingerprints of detect microsatellites and genetic diversity in several related Brassica taxa and *Arabidopsis thaliana*. *Hereditas*

- 140 : 245-238.
- 16) LU X, LIU L, GONG Y, ZHAO L, SONG X, ZHU X (2009) Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers. *Sci. Hor.* **122** : 645-648.
 - 17) ANDERBERG A A (1994) Phylogeny and Subgeneric Classification of *Cyclamen* L. (*Primulaceae*). *Kew. Bull.* **49** : 455-467.
 - 18) YESSON C, TOOMEY NH, CULHAM A (2009) Cyclamen : time, sea and speciation biogeography using a temporallycalibrated phylogeny. *J. Biogeogr.* **36** : 1234-1252.
 - 19) ANDERBERG A A, TRIFT I, KÄLLERSJÖ M (2000) Phylogeny of *Cyclamen* L. (*Primulaceae*) : Evidence from morphology and sequence data from the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* **220** : 147-160.
 - 20) PEAKALL R, PETER E S (2006) Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Eco. Notes* **6** : 288-295.
 - 21) HAYASHI C (1950) On the quantification of qualitative data from the mathemeticostatistical point of view. *Ann. Inst. Statist. Math.* **2** : 35-47.

Genetic Relationship Based on RAPD and ISSR Analyses in *Cyclamen* ssp.

By

Kenji WAKUI*, Shinya OKABE**, Kenji KOMATSU*, Katsumasa NIWA**
and Junzo FUJIGAKI***

(Received August 22, 2012/Accepted October 19, 2012)

Summary : Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) techniques were employed to estimate the genetic variation and relationship among and within species in seven species of *Cyclamen*. 453 bands were scored by 17 random primers and 11 ISSR primers used for analysis, with all bands (100%) being polymorphic and 55 bands specific for a species. Based on the polymorphic data, the among-species variation was larger than the within-species variation. Quantification theory (Suryoka) III showed that seven species were divided into four separate groups. Furthermore, unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis based on the data of only wild species formed three subclusters, which agreed with one of the hypotheses classified within *Cyclamen* genus. Our results indicate, for the first time, the genetic relationships within *Cyclamen* genus following the application of a RAPD and ISSR marker, and the efficacy of RAPD and ISSR markers to distinguish species in *Cyclamen*.

Key words : *Cyclamen*, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Inter simple sequence repeat (ISSR)

* Department of Bioproduction Technology, Junior College of Tokyo University of Agriculture

** Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

*** Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture