RAPD 法による *Cattleya* 属およびその近縁属の系統分類

金 国光¹・内藤俊栄^{2**}・松井鑄一郎^{2*}

¹ 岐阜大学大学院連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸

² 岐阜大農学部 501-1193 岐阜市柳戸

Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis for Establishing Phylogenetic Relationships
among *Cattleya* and its Allied Genera

Guoguang Jin¹, Toshie Naito^{2**} and Shuichiro Matsui^{2*}

¹ The United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

² Faculty of Agriculture, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

Summary

Nine *Cattleya* species and their allied genera and 36 species of *Cattleya* were examined to clarify phylogenetic relationships within *Cattleyae* and *Cattleya* by using RAPD analyses. Fifteen random primers yielded 70 RAPD markers from 15 species of *Cattleya* and their allied genera. UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) calculation presented three clusters, among genera with four pollinia which indicate that *Cattleya* was close to *Epidendrum secundum*, but distantly related to *Encyclia cordigera*. Among the eight pollinia genera, 4 genera, namely, *Brassavola*, *Laelia*, *Rhyncholaelia*, and *Sophranitis*, formed one cluster. Cluster analysis shows that *Sophranitis* is close to *Leptotes bicolor* having six pollinia. Ninety three RAPD markers obtained from 36 *Cattleya* species by using 9 random primers presented clusters similar to the morphological classification of *Cattleya* species proposed by Brieger et al. who recognized 4 subgenera, namely, *Cattleya*, *Diphyllae*, *Skinneri*, and *Rhisanthemum*. In the *Diphyllae* section, *Guttatae* was further separated into two clusters, *C. guttata* and *C. schilleriana*. *C. kerrii* ranked between subgenera *Cattleya* and *Diphyllae*. Therefore, further studies on genetic information of species belonging to subgenus *Diphyllae* are needed.

Key Words: *Cattleya*, Epidendrinae, phylogenetic relationship, RAPD.

緒 言

洋ランの代名詞とされる *Cattleya* 属はシダなどとともにブラジルからイギリスにもたらされ、園芸家 Cattley により開花したのは 1821 年であり、*Cattleya labiata* と Lindley によって命名された。その後、愛好家の増加に伴い同様の美しい花を咲かせる *Cattleya* はイギリスやベルギーに多量に輸入され、どれが真の *C. labiata* か問題となった。植物学者により *C. labiata* var. *mossiae* などと命名され、単葉種は *C. labiata* グループと呼ばれた (Northen, 1970)。

Cattleya 属は Brieger ら (1981) のまとめた Schlechter's Die Orchideen では 4 つの亜属、すなわち、1 葉の *Cattleya*

亜属 (単葉種)、2~3 葉性で葉は比較的大きく、偽球茎上のシースは葉身をもたない *Diphyllae* 亜属 (*Intermedia* 節, *Guttatae* 節, *Acranthemum* 節)、同様に 2~3 葉性で葉は比較的小さく、各節につくシースは葉身部をもち、また、上位節のものほど大きくなり、花は多輪の *Skinneri* 亜属 (*Skinneri* 節, *Aurantiaca* 節)、花序を葉の退化したシュートにつけ、その後 1~2 葉をつける栄養茎を発育させる *Rhisanthemum* 亜属 (*C. walkeriana*, *C. nobilior*) に分類されている。Withner (1988) は近年リップの形態から *Cattleya* 亜属をさらに *Cattleya* 亜属 (*Cattleya* 節, *Xantheae* 節, *Maximae* 節) と *Stellata* 亜属に区別し、また、*Laelia* 属と *Cattleya* 属の自然雑種とされることもある *C. dormaniana* を *Laelioidea* 亜属に、*Diphyllae* 亜属を *Aclandia* 亜属, *Intermedia* 亜属, *Schomburgkoidea* 亜属, *Falcata* 亜属 (*Guttatae* 節, *Granulosae* 節) に再分類した。

Cattleya 属とその近縁属の花粉塊は常に花粉塊柄 (caudicle) をもち、顕著な脚と粘着体 (viscidium) がある

2003 年 7 月 29 日 受付. 2003 年 11 月 25 日 受理.

* Corresponding author.

** 現在: 岐阜県立関養護学校.

Epidendrinae 亜連に分類されている (Brieger ら, 1981). この中には唇弁は完全にずい柱から遊離または最大でずい柱の下半分でこれと合着する *Cattleyae* (*Cattleya*, *Laelia* などの属), 唇弁はずい柱とその先端まで合着し, 筒を形成する *Epidendra* (*Epidendrum* 属など) のほか, *Poneræ* や *Hexiseae* を含む. *Cattleyae* は葉の着生部位, 偽球茎の匍匐性, ついで花粉塊数で細分されている. 一方, Pabst・Dungs (1977) は *Epidendra* の属を花顎 (mentum) の有無で分類し, ついで花粉塊数で分類した. これらのランは, 植生地の地勢的变化や地理的分布域のみならず交配媒介者の種類についても多様であり, 種の分化が著しいことを示し, Dressler (1993) は *Laeliinae* (*Epidendrinae*) 亜連として, 43 属, 466 種をあげている. 自然界に種間のみならず属間雑種が存在し, さらに容易に人工的な雑種ができることは分類が不完全であるためとの指摘がある (Bechtel ら, 1981; 里見・土肥, 1972; Withner, 1988).

植物分類では従来の形態分類から PCR に基づいた DNA 多型解析法 (Williams ら, 1990), DNA 塩基配列法 (Van den Berg ら, 2000) などによる結果が最近報告されている. *Cattleya* 属を含む *Laeliinae* (Brieger ら (1981) の分類では *Epidendrinae*) 亜連の分類に関しては核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列法 (Van den Berg ら, 2000) による分子系統樹が報告されている. しかしながら, より精度の高い系統仮説を提示するためには ITS 領域のみならず複数の遺伝子領域またはゲノム全体を対象にした分析が必要と思われる. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 分析はゲノム全体を対象にした最も簡便な DNA 多型解析法であり, 植物の系統分類に有効な手段として用いられている. 本報告では RAPD 分析によって *Cattleya* 属とその近縁属間の類似関係および *Cattleya* 属の 4 亜属に属する種間の関係を調べ, その結果を Brieger ら (1981) の形態分類と比較し, さらに Van den Berg ら (2000) の核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列決定法による結果とも比較検討し, *Epidendrinae* 亜連内の属および種間の類似関係を解明しようとした.

材料および方法

1. 植物材料

Cattleya 属とその近縁属の類縁を分析するために 9 属の 15 種を用いた. Brieger ら (1981) の分類に合わせて第 1 表に示した. *Cattleya* 属内の分析には 36 種 (40 個体) を供試した. 4 亜属, 7 節に分けて第 2 表に示した. 材料はカトレアを主に栽培するアマチュアから提供を受けたほか, ラン種苗会社 (国際園芸; 大場蘭園; 山田ラン園) から購入したものおよび岐阜大学附属農場で保存するものを用いた. 学名は Brieger ら (1981) と Withner (1988, 1998) に準拠した.

2. DNA の抽出および PCR

Kobayashi ら (1998) の改変 CTAB 法 (セチルトリメチ

ルアンモニウムブロマイド試薬を 0.1% から 0.61% に変更) により, DNA を抽出した. *Cattleya* 属とその近縁属の類縁の分析にはオペロン製の 10 塩基ランダムプライマー 6 種 (OPR06, OPR08, OPR10, OPR11, OPR13, OPE02), 和光純薬製の 12 塩基ランダムプライマー 9 種 (A01~A09), 合わせて 15 種, *Cattleya* 属内の分析にはオペロン製の 10 塩基ランダムプライマー 9 種 (OPE01, OPE06, OPE14, OPE16, OPE17, OPE20, OPR06, OPR11, OPR13) を用いた (第 3 表). PCR 反応液セット (TaKaRa, Taq^{TM}, Code No. R001B) を用い, *Cattleya* 属とその近縁属の類縁の分析では, 94°C, 5 分間の前処理後, 始めの 2 サイクルは 94°C で 1 分間変性, 45°C で 2 分間アニーリング, 72°C で 3 分間伸長反応を繰り返し, その次の 40 サイクルはアニーリングを 1 分間, 伸長反応を 2 分間に変更した. 最後に 72°C で 10 分間の伸長反応を行った (Sanyo, DNA Amplifier MIR-40); *Cattleya* 属内の分析では, 上述のアニーリング温度を 40°C に下げ, 始めの 2 サイクルを 1 サイクルに, その次を 44 サイクルに変更した. PCR 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動した後, エチジウムブロマイド溶液で染色した. 泳動像は DNA 電気泳動ゲルドキュメンテーションシステムで撮影・記録した. RAPD マーカー (個体間の多型を示す PCR 産物) に基づいて, 品種間の類似度係数 (Sorenson 係数) を求め, UPGMA 法によりクラスター分析を行い (Romesburg, 1992), コーフェン相関係数を算出し, デンドログラムを作成して類似関係を推定した.

結 果

1. *Cattleya* 属とその近縁属

Cattleya 属とその近縁属など合わせて 9 属の 15 種を対象に 10 塩基ランダムプライマー 6 種と 12 塩基ランダムプライマー 9 種を用いて PCR を行った結果, 全ての種が持つ共通バンドは見られず, 検出されたバンドは全て多型であった. OPR13 で得られるバンドを第 1 図に示した. その中で再現性の高い 70 個の RAPD マーカーが得られ (第 3 表), 種間の類似程度を示す類似度係数を求めた. *Cattleya* 属内の 5 種間の類似度係数は 0.5~0.754, *Laelia* 属内の 3 種間は 0.609~0.75 と高く, 他の属間より近縁であることを示した. 属間では, *Rhyncholaelia* 属と *Brassavola* 属は類似度係数が高く (0.615), *Cattleya* 属は *Laelia* 属 (0.318~0.52), *Sophronitis* 属 (0.302~0.435), *Brassavola* 属 (0.318~0.449), *Epidendrum* 属 (0.318~0.378) との類似度係数が比較的高かった. *Sophronitella* 属は *Leptotes* 属, *Sophronitis* 属との類似度係数が高く, *Epidendrum* 属は *Cattleya* 属のつぎに *Encyclia* 属, *Sophronitella* 属と高かった. この類似度係数を基に UPGMA 法によるクラスター分析を行ってデンドログラムを作成した. 類似度係数 0.505 レベルで 8 グループに分かれ, 属間の区別が可能であった (第 2 図). 類似度マトリックスとデ

Table 1. Cattleyae and *Epidendrum* were sampled for RAPD analysis. Classification follows Brieger et al. (1981).

Taxa	Distribution	Diagnostic characters of each genus	Source
1. Lip entirely free from column or connate maximally with lower half of the column		Cattleyae	
2. Stem not so much compressed or not thick cylindrical; pollinia 4 or 8			
3. Pollinia 8; caudicle bridge present			
4. Ovary with a short neck under the corolla			
<i>Sophranitis coccinea</i> (Lindl.) Rchb. f.	Eastern Brazil	Clinandrium walls relatively small; anthers lie on the upper surface; very small pseudobulb with 1 leaf; leaf lance shape, upright; inflorescence nearly present with flowers bright red to salmon	OBk ^y
<i>Laelia anceps</i> Lindl. var. <i>veitchiana</i> 'B'. ^z	Mexico	Clinandrium walls relatively small; anthers lie on the upper surface; inflorescence always with an obvious stalk. sometimes with a long peduncle; pseudobulb greater than 25 cm; lip completely free from column (except <i>L. perrinii</i>); sepal and petal flat, or rarely wavy	Lf ^x
<i>Laelia dayana</i> Rchb. f. 'Dose'	Brazil		Lg ^x
<i>Laelia purpurata</i> Lindl. var. <i>anelata</i> 'Adam's I'	Brazil		Lh ^x
<i>Sophranitella violacea</i> (Lindl.) Schltr.	Eastern Brazil	Column with two projecting wings (clinandrium walls); between them, an anther, upright	YTm ^w
4'. Ovary with a long neck under the corolla			
<i>Brassavola cucullata</i> (L.) R. Br.	From Mexico to Honduras and the north part of south America	Shoot axis cylindrical, with uniform diameter; apical leaf cylindrical–needle shape, succulent; inflorescence, a racemose of a few flowers; axis spur very long; flower not lobed	Bi ^x
<i>Rhyncholaelia digbyana</i> (Lindl.) Schltr. 'York'	Mexico, Honduras	Shoot axis fusiform, ligneous; apical leaf flat, broad oval; cluster short, with 1, to few flowers; flowers very large, not lobed	Rj ^x
3'. Pollinia 4, caudicle bridge present			
<i>Encyclia cordigera</i> (H. B. K.) Dressler var. <i>album</i> 'Henrique'	Mexico, Central America, Colombia, Venezuela	Column without long upright wings; anther present on an upper side of column; pseudobulb pear-shaped, lip trilobed	Enl ^x
<i>Cattleya maxima</i> Lindl.	Ecuador, Colombia, Peru		CCa ^x
<i>Cattleya bowringiana</i> Veitch. var. <i>coerulea</i>	Guatemala, Belize		CSb ^x
<i>Cattleya aurantiaca</i> (Batem. ex Lindl.) Don.	Guatemala, Mexico, Honduras, Salvador	Column without long upright wings, anther not present on a dorsal side of column without a keel; trilobed	CSc ^x
<i>Cattleya skinneri</i> Batem. 'Casa Luna'	Central America		CSd ^x
<i>Cattleya walkeriana</i> Gardn. var. <i>coerulea</i>	Brazil		CRc–S7 ^v
2'. Stem strongly compressed, thick cylindrical, with a thick needle-like leaf; pollinia 6			
<i>Leptotes bicolor</i> Lindl.	Eastern Brazil		LPn ^x
1'. Lip connate with a whole column, forming a cylinder		Epidendra	
<i>Epidendrum secundum</i> Jacq. var. <i>album</i>	Peru, Bolivia, Colombia, Ecuador, Venezuela	Pollinia 4 with caudicle bands without visidium; stem cylindrical with leaves	EPo ^x

^z Coloration epithet and cultivar epithet.^y Ohba Orchid Nursery.^x The Exp. Farm, Gifu Univ.^w Yamada Orchids.^v Amateur.

ンドログラムを比較するコーフェン相関係数は0.851で、両者の歪みは大きくなかった。*Cattleya*属の5種は類似度係数0.563~0.754範囲で形態的な性状による分類、すなわ

ち *Cattleya* 亜属 (*C. maxima*), *Skinneri* 亜属, *Rhizanthemum* 亜属の分類と同じ結果が得られた。

Table 2. Plant materials of *Cattleya* species used for RAPD analysis. Classification follows Brieger et al. (1981).

Taxa	Distribution	Source
No sprout dimorphism		
Subgenus <i>Cattleya</i> : Pseudobulb fusiform, laterally compressed, 1 leaf, side lobes almost not distinctively separated from the middle lobe; flowers large (except <i>C. luteola</i>)		
<i>C. quadricolor</i> Batem.	Colombia	CC2 ^x
<i>C. aurea</i> Linden. 'Scully' s Tipperary'	Colombia	YT3 ^w
<i>C. gaskelliana</i> Rchb. f. var. <i>alba</i>	Colombia, Venezuela	CC4 ^x
<i>C. labiata</i> Lindl. var. <i>amoena</i> 'Fowleiana'	Brazil	CC7 ^x
<i>C. luteola</i> Lindl.	Brazil, Peru, Ecuador, Bolivia	YT8 ^w
<i>C. mossiae</i> Parker (var. <i>semialba</i> × var. <i>semialba</i> 'Idem')	Venezuela	YT9 ^w
<i>C. percivaliana</i> (Rchb.f.) O' Brien. 'Summit'	Venezuela	CC10 ^x
<i>C. rex</i> O' Brien.	Colombia, Peru, Brazil	IN11 ^z
<i>C. schroederiae</i> (Rchb. f.) Hort. 'C. Arango' × 'G. Misas'	Colombia	IN12 ^z
<i>C. trianaei</i> Linden & Rchb. f. 'Junio'	Colombia	CC13 ^x
<i>C. trianaei</i> Linden & Rchb. f. 'Dan'	Colombia	CC14 ^x
<i>C. trianaei</i> Linden & Rchb. f. var. <i>amesiana</i> 'Floralia'	Colombia	CC15 ^x
<i>C. warneri</i> T. Moore	Brazil	CC16 ^x
<i>C. warscewiczii</i> Rchb. f. var. <i>semialba</i>	Colombia, Brazil	CC5 ^x
<i>C. warscewiczii</i> Rchb. f. ('Low' s' × 'Sanderiana')	Colombia, Brazil	CC6 ^x
<i>C. warscewiczii</i> Rchb. f. var. <i>alba</i> 'Leo Holguin'	Colombia, Brazil	CC17 ^x
<i>C. iricolor</i> Rchb. f.	Ecuador, Colombia, Peru	YT18 ^w
<i>C. jenmanii</i> Rolfe var. <i>alba</i> 'Fuchs Snow'	Venezuela	IN19 ^z
Subgenus <i>Diphyllae</i> : Pseudobulb cylindrical to clavate, very ligneous, 2–3 leaves (<i>C. kerrii</i> largely 1 leaf); leaf sheath of pseudobulbs without leaf lamina; flowers relatively large, with thick texture		
Section <i>Intermedia</i> : Side lobes of lip large, round, the middle lobe present		
<i>C. kerrii</i> Breiger & Bacal.	Brazil	YT1 ^w
<i>C. intermedia</i> Graham var. <i>aquinii</i> 'Boa Vista'	Brazil	OB20 ^y
<i>C. harrisoniana</i> (Batem.) Lindl. 'Shonan'	Brazil	OB21 ^y
<i>C. forbesii</i> Lindl. var. <i>alba</i>	Brazil	YT24 ^w
<i>C. loddigesii</i> Lindl.	Brazil, Argentina	CI27 ^x
<i>C. × dolosa</i> Rchb. f. var. <i>alba</i>	Brazil	YT28 ^w
Section <i>Guttatae</i> : Side lobes of lip large, obtusely pointed; the middle lobe with longer and band-form to bent clavate process		
<i>C. guttata</i> Lindl. 'Nakajima'	Brazil	OB22 ^y
<i>C. elongata</i> Barb. Rodr.	Brazil	OB23 ^y
<i>C. leopoldii</i> Versch.	Brazil	IN25 ^z
<i>C. amethystoglossa</i> Linden & Rchb. f.	Brazil	CG26 ^x
<i>C. porphyroglossa</i> Linden & Rchb. f.	Brazil	YT31 ^w
<i>C. schilleriana</i> Rchb. f. 'Sanderiana'	Brazil	YT32 ^w
<i>C. violacea</i> (H.B.K.) Rolfe	Guyana to Peru, including Venezuela, Ecuador, Brazil	YT33 ^w
Section <i>Acranthemum</i> : Side lobes small, round or absent, middle lobe with long, bent wedge-shaped lower part of it		
<i>C. aelandiae</i> Lindl.	Brazil	YT29 ^w
<i>C. bicolor</i> Lindl.	Brazil	CA30 ^x
Subgenus <i>Skinneri</i> : Leaf sheaths with lamina which become large to the top end; leaves relatively smaller, with delicate texture		
Section <i>Skinneri</i> : Flower intermediate size (sepals about 45mm long); labellum trilobed		
<i>C. skinneri</i> Batem. 'Blumen Insel'	Guatemala to Panama	IN34 ^z
<i>C. bowringiana</i> Veitch var. <i>coerulea</i>	Guatemala, Belize	YT35 ^w
<i>C. deckeri</i> Klotsch. 'Brecht'	Guatemala to Panama, Colombia, Venezuela, Trinidad	CS36 ^x
Section <i>Aurantiaca</i> : Flower small (sepals about 25 mm long); labellum not split		

(Continue to next page)

Table 2. (Continued)

Taxa	Distribution	Source
<i>C. aurantiaca</i> (Batem. ex Lindl.) Don. 'Marigold'	Mexico, Guatemala, El Salvador, Honduras	YT37 ^w
<i>C. × guatemalensis</i> T. Moore	Guatemala	YT38 ^w
Dimorphism present; Inflorescence on specific leafless, in general, sprouts in sympodial branching system; Subgenus Rhizanthemum: 1 or 2 leaves; side lobes of lip small and rounded		
<i>C. walkeriana</i> Gardn. var. <i>coerulea</i> 'Azul Perfecta'	Brazil	CR39 ^x
<i>C. nobilior</i> Rchb. f. var. <i>coerulea</i>	Brazil	ST40–S27 ^v

^z Kokusai Eengei Co.^y Ohba Orchid Nursery.^x The Exp. Farm, Gifu Univ.^w Yamada Orchids.^v Amateur.

Table 3. Random primers used for RAPD analysis and numbers of markers obtained.

Primer	Sequence (5'–3')	Numbers of markers	
		Genera	<i>Cattleya</i>
A01 ^z	TGCACTACAACA	2	–
A02 ^z	GGCATCGCCTTT	6	–
A03 ^z	CGACGACGACGA	7	–
A04 ^z	ATCAGCGCACCA	3	–
A05 ^z	AGCAGCGCCTCA	9	–
A06 ^z	GCCAGCTGTACG	4	–
A07 ^z	TGCCTCGCACCA	4	–
A08 ^z	GCCCCGTTAGCA	5	–
A09 ^z	CCGCAGTTAGAT	6	–
OPE01 ^y	CCCAAGGTCC	–	11
OPE02 ^y	GGTGC GGGA	1	–
OPE06 ^y	AAGACCCCTC	–	13
OPE14 ^y	TGCGGCTGAG	–	7
OPE16 ^y	GGTGACTGTG	–	14
OPE17 ^y	CTACTGCCGT	–	3
OPE20 ^y	AACGGTGACC	–	15
OPR06 ^y	GTCTACGGCA	2	9
OPR08 ^y	CCCGTTGCCT	4	–
OPR10 ^y	CCATTCCCCA	8	–
OPR11 ^y	GTAGCCGTCT	3	10
OPR13 ^y	GGACGACAAG	6	11
Total		70	93

^z Wako Pure Chemical Inc.^y Operon Tech. Inc.

2. *Cattleya* 属内

Cattleya 属の 40 種を対象に 10 塩基ランダムプライマー 9 種を用いて PCR を行った結果、全種が持っている共通バンドは OPR13 プライマーによって 960 bp に出現するバンド 1 個のみ (OPR13–960) であり (第 3 図), 他は多型を示した。多型バンド中で再現性が高い 93 個の RAPD マーカーが得られた (第 3 表)。これらのクラスター分析結果から類似度係数が 0.413 レベルで, *C. kerrii* を除く 4 つの亜属間区別ができた (第 4 図)。類似度マトリックスとデンド

Fig. 1. RAPD profiles obtained from *Cattleya* and allied genera using OPR13 primer. M: 100bp DNA ladder, 01: *Cattleya maxima*, 02: *Cattleya bowringiana*, 03: *Cattleya aurantiaca*, 04: *Cattleya skinneri*, 05: *Cattleya walkeriana*, 06: *Laelia anceps*, 07: *Laelia dayana*, 08: *Laelia purpurata*, 09: *Brassavola cucullata*, 10: *Rhyncholaelia digbyana*, 11: *Sophranitis coccinea*, 12: *Encyclia cordigera*, 13: *Sophranitella violacea*, 14: *Leptotes bicolor*, 15: *Epidendrum secundum*. Arrows indicate markers-used for UPGMA analysis.

ログラムを比較するコーフェン相関係数は 0.811 であった。*Cattleya* 亜属 (類似度係数は 0.461–0.870) では, *C. trianaei* の 3 品種は 0.786 レベルの比較的高い類縁関係で同じクラスターにまとめられ, *C. warscewiczii* の 3 品種の中, var. *semialba* と var. *alba* 'Leo Holguin' は比較的近い関係を示したが, 'Low's' × 'Sanderiana' は遠かった。*Diphyllae* 亜属では *Intermedia* 節の 3 種は同じクラスターを作ったが, *C. loddigesii* は離れたクラスターに入った。なお, これと血縁関係を持っている *C. × dolosa* var. *alba* (*C. loddigesii* × *C. walkeriana* の天然雑種とされる) とは近い関係を示した。また *C. kerrii* は *Intermedia* 節の種がすべて持っている OPE17–830 バンドを持っていなかった。*Guttatae* 節の 7 種は 2 つのグループに分かれた。すなわち, *C. guttata* 'Nakajima', *C. elongata*, *C. leopoldii* および *C. amethystoglossa* の 4 種は *Intermedia* 節と相対的に近い類縁を示し, *C. porphyroglossa*, *C. schilleriana*

Fig. 2. A dendrogram of *Cattleya* and allied genera based on UPGMA analysis system using 15 primers.

Fig. 3. RAPD profiles obtained from *Cattleya* species using OPR13 primer. M: 100 bp DNA ladder, 01: *C. kerrii*, 02: *C. quadricolor*, 03: *C. aurea* 'Scully' s Tipperary, 04: *C. gaskelliana* var. *alba*, 05: *C. warscewiczii* var. *semialba*, 06: *C. warscewiczii* ('Low's' × 'Sanderiana'), 07: *C. labiata* var. *amoena* 'Fowleiana', 08: *C. luteola*, 09: *C. mossiae* (var. *semialba* × var. *semialba* 'Idem'), 10: *C. percivaliana* 'Summit', 11: *C. rex*, 12: *C. schroederiae* 'C. Arango' × 'G. Misas', 13: *C. trianaei* 'Junio', 14: *C. trianaei* 'Dan', 15: *C. trianaei* var. *amesiana* 'Floralia', 16: *C. warneri*, 17: *C. warscewiczii* var. *alba* 'Leo Holguin', 18: *C. iricolor*, 19: *C. jenmanii* var. *alba* 'Fuchs Snow', 20: *C. intermedia* var. *aquinii* 'Boa Vista', 21: *C. harrisoniana* 'Shonan', 22: *C. guttata* 'Nakajima', 23: *C. elongata*, 24: *C. forbesii* var. *alba*, 25: *C. leopoldii*, 26: *C. amethystoglossa*, 27: *C. loddigesii*, 28: *C. × dolosa* var. *alba*, 29: *C. aelandiae*, 30: *C. bicolor*, 31: *C. porphyroglossa*, 32: *C. schilleriana* 'Sanderiana', 33: *C. violacea*, 34: *C. skinneri* 'Blumen Insel', 35: *C. bowringiana* var. *coerulea*, 36: *C. deckeri* 'Brecht', 37: *C. aurantiaca* 'Marigold', 38: *C. × guatemalensis*, 39: *C. walkeriana* var. *coerulea* 'Azul Perfecta', 40: *C. nobilior* var. *coerulea*.

'Sanderiana' および *C. violacea* の3種は相対的に *Acranthemum* 節に近いクラスターを形成した。 *Skinneri* 亜属 (類似度係数は 0.492~0.723) では, *C. bowringiana* と *C. deckeri* 'Brecht' は近い関係を示し, *C. × guatemalensis* (*C. skinneri* と *C. aurantiaca* の天然雑種とされる) は *C. aurantiaca* 'Marigold' より *C. skinneri* 'Blumen Insel' に近かった。 *Rhizanthemum* 亜属の *C. walkeriana* var. *coerulea* 'Azul Perfect' と *C. nobilior* var. *coerulea* の2種は 0.9 の高い類似度係数を示し, 他の種と明確に分かれた。

考 察

RAPD 分析はランでは *Cymbidium* 属 (Choi ら, 1998), *Calanthe* 属 (Hyun ら, 1999), *Phalaenopsis* 属 (Kim ら, 2001) などの属内種間類縁関係の推定に有効であることが明らかになっている。本研究では *Cattleya* 属とその近縁8属15種から得られた PCR 産物には全ての種に共通なバンドは皆無で, 全てが多型を示し, これらの属は遺伝的な分化の大きいことが示された。クラスター分析により8グループに分かれた結果は, 第1表に示す花粉塊数を4と8のものと花粉塊数6のものとの区分し, さらに花粉塊数4と8を区別する分類 (Brieger ら, 1981) にほぼ合致する属

Fig. 4. A dendrogram of *Cattleya* species based on UPGMA analysis system using 9 primers.

間の類別を示した。したがって、同じ8個の花粉塊数を持ち、属間の交配が容易である *Laelia* 属, *Sophranitis* 属, *Rhyncholaelia* 属および *Brassavola* 属は近い関係を示した。交配親和性の高い種間で類縁関係が近いことはシュランと他のシンビジウム属間の RAPD 分析で得られている (Choi ら, 1998)。しかしながら、核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析を基に得られた花粉塊8個の *Brassavola* 属と *Rhyncholaelia* 属が花粉塊4の *Cattleya* 属と同じグループに入る系統樹 (Van den Berg ら, 2000) と本研究の結果は大きく異なった。

本研究にも形態的分類と合致しない点がいづらかあった。*Sophranitella* 属は *Sophranitis* 属と同じ花粉塊数を持ち、花被の下に花床の首部が短い点で形態的に似ているが、遠縁関係を示した。かえって花粉塊6 (4個は大きく、2個は小さい) の *Leptotes* 属に近かった。両者はわい性で、匍匐茎を持ち、葉より短い花序と1~数花を着け、唇弁とずい柱も似ている (Bechtel ら, 1981)。もう1つの相違点は *Cattleya* 属と *Epidendrum* 属または *Encyclia* 属との類縁であった。これらは花粉塊が4で類似し、棒状の茎で多花性の *Epidendrum* 属は球形の偽球茎の頂端に数葉を着ける *Encyclia* 属より *Cattleya* 属に近縁であった。この点は RAPD 分析と形態的分類の最も大きな相違点であった。類似する結果は Van den Berg ら (2000) の *Laeliinae* 亜連の核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析で報告されている。また、Yukawa ら (1993) は葉緑体 DNA の RFLP 分析により *Dendrobiinae* 亜連で異なる属のものが

Dendrobium 属に包含され、*Dendrobiinae* 亜連に属するものが他の連のものである可能性を述べている。

Laelia 属は3種のみを用いたが、節のある長い花序を持つ *Laelia* 亜属に属す *L. anceps* と、*Brasilienses* 亜属に属し、常に1葉でシースが剛直な *L. purpurata* と *L. dayana* は分離した。Van den Berg ら (2000) は *Laelia* 属は polyphyletic な結果を示し、ブラジル産 *Laelia* 属は *Cattleya* 属と極めて近縁であるが、メキシコ産のそれ (上記 *L. anceps* も含まれる) は分離したクラスターを作り、*Laelia* 属は多系統群であろうとしている。供試した種の数が少なかったものでさらに近縁の属と属内の種を加えて *Laelia* 属として1つのクラスターを作るか検討する必要がある。

Cattleya 属の4つの亜属を含む36種 (40個体) は共通バンドが1つで、他は多型を示し、*Cattleya* 亜属 (14種)、*Diphyllae* 亜属 (14種)、*Skinneri* 亜属 (5種)、*Rhizanthemum* 亜属 (2種) と *C. kerrii* の5つのクラスターに分かれた。*C. kerrii* を除くとこの結果は Brieger ら (1981) の形態的な分類および Van den Berg ら (2000) の ITS 領域の DNA 配列分析結果で示される4亜属に区別できる点で一致したが、亜属内の種間関係で異なる結果が示された。

C. kerrii はブラジルに自生する稀少な着生種で、1~2葉、茎は細く、形態的な分類と核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析 (Van den Berg ら, 2000) と一致し、*Diphyllae* 亜属 *Intermediae* 節に属した。しかし、RAPD 分析では *Diphyllae* 亜属と *Cattleya* 亜属の中間に位置する際立った差異が見られた。*Cattleya* 亜属内では *C. labiata*

と近縁なものとして *C. trianaei*, *C. warneri*, *C. percivaliana* など 5 種があり, *C. aurea* と *C. warscewiczii* の類縁性は産地の地理的なつながり (Brieger ら, 1981; 第 2 表) と関連すると思われる。また, *C. luteola* と *C. iricolor* は花径が小さく, 側花弁の幅が狭く, 唇弁が他の *Cattleya* 亜属のものと大きく異なり (Bechtel ら, 1981), 地理的にも近く分布する (第 2 表)。Withner (1988) は *Stellata* 亜属としているが, RAPD 分析はこの分類を支持する結果であった。また, 核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析 (Van den Berg ら, 2000) とも一致した。*Diphyllae* 亜属の *Intermedia* 節の 5 種, *Guttatae* 節の 7 種および *Acranthemum* 節の 2 種は 2 つのクラスターに分離し, 節間の区別と異なった。核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析でも *Diphyllae* 亜属は 4 つの小グループに分かれ, 形態的な分類と異なることを示し, この亜属については形態的のみならず, DNA 遺伝情報の観点からも再考される必要があろう。本研究結果と核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列分析結果 (Van den Berg ら, 2000) と大きく相違する点はいくつか存在し, *C. maxima* と *C. bowringiana* は本研究ではともに *Cattleya* 属に属したが, 後者の結果では *C. maxima* はブラジル産 *Laelia* 属や *Sophranitis* 属に近く, *C. bowringiana* と *Skinneri* 節の間に *Rhyncholaelia* 属が分布した。Van den Berg ら (2000) は *Cattleya* 属の単葉と複葉種については単一属でよいが, *Skinneri* 節は新属とするか *Rhyncholaelia* 属に移すべきであると述べている。提示された系統分類は Brieger ら (1981) の花粉塊数による分類体系と一致しない。しかし, 本研究の場合でも前述のように *Cattleya* 属, *Encyclia* 属と *Epidendrum* 属の結果は上記の分類と異なった。Brieger (1975) は花粉塊数の形質はしばしば平行進化を起こすので, 他の際立った形質が伴わないとき, 花粉塊数は種レベルの特徴的な形質に過ぎないと述べている。

以上のように *Cattleya* 属が大きく 4 つの系統に分かれることにおいて, Brieger ら (1981) の分類と本研究および Van den Berg らの ITS 領域の塩基配列分析とは一致した。しかし, 属間や種間関係では異なることが多く示された。ゲノム全体を対象にした DNA 多型法である RAPD 分析は広い範囲で検討する利点がある一方, 再現性は他の AFLP 分析や RFLP 分析より低く, 類縁関係が遠い属間関係では同じサイズのバンドの中でも遺伝子型がヘテロの場合は検出されるバンドの同一性が不明確となり, 属間の類別するバンドの検出率も低いことから精度も近縁関係の解析より低くなる。したがって, AFLP (Qamaruz-Zaman ら, 1998,) や葉緑体 DNA の RFLP (Yukawa ら, 1993), 核リボソーム DNA ITS 領域の塩基配列 (Bateman ら, 1997, Van den Berg ら, 2000) 法など, 複数の独立な遺伝子マーカーに基づいた結果を検討することが必要である。

摘 要

Cattleya 属とその近縁属間, *Cattleya* 属内の亜属間および種間関係を明らかにする目的で RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 分析を行った。*Cattleya* 属とその近縁属を含む 9 属の 15 種からランダムプライマー 15 種により 70 個の RAPD マーカーが得られ, クラスター分析により 3 個の系統に区別された。4 花粉塊をもつ属のうちで *Cattleya* 属は *Epidendrum secundum* と近縁であったが *Encyclia cordigera* とは遠縁であった。また, *Sophranitella violacea* を除き, 8 個の花粉塊の *Laelia* 属, *Sophranitis* 属, *Rhyncholaelia* 属および *Brassavola* 属は近縁であった。*Sophranitella violacea* と 6 花粉塊の *Leptotes bicolor* は近縁で, 別のクラスターを作った。*Cattleya* 属の 36 種からはランダムプライマー 9 種により 93 個の RAPD マーカーが得られ, Brieger ら (1981) の示す形態的分類に近いクラスターが得られた。*Cattleya* 属は *Cattleya* 亜属, *Diphyllae* 亜属, *Skinneri* 亜属および *Rhisanthemum* 亜属の 4 つに分かれた。*Diphyllae* 亜属内の *Guttatae* 節は *C. guttata* を代表する種群と *C. schilleriana* を代表する種群の 2 つのクラスターに分かれ, *C. kerrii* は *Cattleya* 亜属と *Diphyllae* 亜属の中間に位置した。したがってこの亜属内の種間関係はさらなる検討が必要と思われる。

引用文献

- Bateman, R. M., A. M. Pridgeon and M. W. Chase. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 2. Intra-generic relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana* 12: 113-141.
- Bechtel, H., P. Cribb and E. Launert. 1981. The manual of cultivated orchid species. MIT Press, Cambridge.
- Brieger, F. G. 1975. On the orchid system: General principles and the distinction of subfamilies. *Proc. 8th World Orchid Conf.* p. 488-504.
- Brieger, F. G., R. Maatsch and K. Senghas. 1981. Schlechter's Die Orchideen 3. Vollig neubearbeitete Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Choi, J., I. So, C. Pak and B. Kwack. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis on compatibility of Korean native *Cymbidium goeringii* with other *Cymbidium* species. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* 16: 361-363.
- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- Hyun, M., J. Choi, J. Suh, I. So and J. Lee. 1999. Isozyme and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

- analysis for genetic relationship among *Calanthe discolor*, *C. sieboldii* and *C. bicolor* native to Cheju Island. Kor. J. Hort. Sci. & Tech. 17: 141–143.
- Kim, H., A. Na, J. Kim and C. Been. 2001. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for genetic analysis of *Phalaenopsis* species. Proc. 7th Asian Pacific Orchid Congress, Nagoya, Japan. p. 220–223.
- Kobayashi, N., T. Horiloshi, H. Katsuyama, T. Handa and K. Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. Plant Tissue Cult. Bio. 4: 76–80.
- Northen, R. T. 1970. Home orchid growing. Van Nostrand Reinhold., New York.
- Pabst, G. F. J. and F. Dungs. 1977. Orchidaceae Brasilienses Band II. p. 333–352. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Qamaruz-Zaman, F., M. F. Fay, J. S. Parker and M. W. Chase. 1998. The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: A case study of *Orchis simia* (Orchidaceae). Lindleyana 13: 125–133.
- Romesburg, H. C. 1992. 実例クラスター分析 (西田英朗・佐藤嗣二共訳). p. 11–34, p. 177–202. 内田老鶴圃. 東京.
- 里見信生・土肥 尚. 1972. ランの分類. p. 89–94. 日本ラン協会編 洋ラン. 誠文堂新光社. 東京.
- Van den Berg, C., W. E. Higgins, R. L. Dressler, W. M. Whitten, M. A. S. Arenas, A. Culham and M. W. Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Lindleyana 15: 96–114.
- Williams, J. G. K., 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.
- Withner, C. L. 1988. The cattleyas and their relatives. I. The cattleyas. Timber Press, Portland.
- Withner, C. L. 1998. The cattleyas and their relatives. II. The laelias. Timber Press, Portland.
- Yukawa, T., S. Kurita, M. Nishida and M. Hasebe. 1993. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in subtribe Dendrobiinae (Orchideaceae). Lindleyana 8: 211–221.