

KiKw-1a	C A C A A C G T G T G C C A A G G A A A A C T A A A C T C A A G A A G G C T C G	200
KiKw-1b	.	200
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	200
KiKw-3a	.	200
KiKw-3b	.	200
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	200
KiKw-4b	.	200
KiKw-5a,6a	.	200
KiKw-6b	.	200
KiKw-9a	.	200
KiKw-10a,b	.	200
KiKw-11a	.	200
KiKw-11b	.	200
indicum-a	.	200
morifolium-a	.	199
morifolium-b	.	199
morifolium-c	.	199
KiKw-1a	T T T C A T G A T G C C C C C G T T C G C G G T G T G C T C A T G G G A T G T G	240
KiKw-1b	.	240
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	240
KiKw-3a	.	240
KiKw-3b	.	240
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	240
KiKw-4b	.	240
KiKw-5a,6a	.	240
KiKw-6b	.	240
KiKw-9a	.	240
KiKw-10a,b	.	240
KiKw-11a	.	240
KiKw-11b	.	240
indicum-a	.	240
morifolium-a	.	239
morifolium-b	.	239
morifolium-c	.	239
KiKw-1a	G C T T C T T T A T A A T C A	255
KiKw-1b	.	255
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	255
KiKw-3a	.	255
KiKw-3b	.	255
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	255
KiKw-4b	.	255
KiKw-5a,6a	.	255
KiKw-6b	.	255
KiKw-9a	.	255
KiKw-10a,b	.	255
KiKw-11a	.	255
KiKw-11b	.	255
indicum-a	.	255
morifolium-a	.	254
morifolium-b	.	254
morifolium-c	.	254

Fig. 5-4 続き

KiKw-1a,b	G A C T T T T G T C T G A T T G T A T A G G A G T A G T T T T T G A A C T A A A	40
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	40
KiKw-3a	.	40
KiKw-4a,5a	.	40
KiKw-4b,6a	.	40
KiKw-6b	.	40
KiKw-7b	. . T .	40
KiKw-9b,11b	.	40
KiKw-11a	.	40
morifolium-1	.	40
morifolium-2	.	40
indicum-2	.	40
indicum-1	.	40
indicum-3	.	40
indicum-4	.	40
KiKw-1a,b	A A A G G A G C A A T A G C T T T C C T C T T G T T T T A T C A A G A G G G C G	80
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	80
KiKw-3a	.	80
KiKw-4a,5a	.	80
KiKw-4b,6a	.	80
KiKw-6b	.	80
KiKw-7b	.	80
KiKw-9b,11b	.	80
KiKw-11a	.	80
morifolium-1	.	80
morifolium-2	.	80
indicum-2	.	80
indicum-1	.	80
indicum-3	.	80
indicum-4	.	80
KiKw-1a,b	T T A T T G C T C C T T T T T T A T T T A G T A C T A T T T G C C T T A C A C	120
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	120
KiKw-3a	.	120
KiKw-4a,5a	.	120
KiKw-4b,6a	.	120
KiKw-6b	.	120
KiKw-7b	.	120
KiKw-9b,11b	.	120
KiKw-11a	.	120
morifolium-1	.	120
morifolium-2	.	120
indicum-2	.	120
indicum-1	.	120
indicum-3	.	120
indicum-4	.	120
KiKw-1a,b	A G T T T C T T T A A A A A T A T T T T A T A G T T T G G T T C G A T T C G C G	160
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	160
KiKw-3a	.	160
KiKw-4a,5a	.	160
KiKw-4b,6a	.	160
KiKw-6b	.	160
KiKw-7b	.	160
KiKw-9b,11b	 G .	160
KiKw-11a	.	160
morifolium-1	.	160
morifolium-2	.	160
indicum-2	.	160
indicum-1	.	160
indicum-3	.	160
indicum-4	.	160
KiKw-1a,b	T G T T T T C T C T T T G T A T T C A T A T T T A T T T A T A T T A T A G G T T	200
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	 C .	200
KiKw-3a	 C .	200
KiKw-4a,5a	 C .	200
KiKw-4b,6a	 C .	200
KiKw-6b	 C .	196
KiKw-7b	 C .	200
KiKw-9b,11b	 C .	200
KiKw-11a	 Y .	200
morifolium-1	 C .	200
morifolium-2	 C .	200
indicum-2	 C .	200
indicum-1	 C .	200
indicum-3	 C .	200
indicum-4	 C .	200

Fig. 5-5 キクカ市場品の *trnH-psbA* IGS 配列と INSD に登録されている *Chrysanthemum indicum* 及び *C. morifolium* の配列との比較

KiKw-1a,b	T G T A T A T T C T A T T C C A A A T T T T T A T G A A G T T T G A T T T C C	240
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	240
KiKw-3a	.	240
KiKw-4a,5a	.	240
KiKw-4b,6a	.	240
KiKw-6b	- - - -	232
KiKw-7b	.	240
KiKw-9b,11b	.	240
KiKw-11a	.	240
morifolium-1	.	240
morifolium-2	.	240
indicum-2	.	240
indicum-1	.	240
indicum-3	.	240
indicum-4	.	240
KiKw-1a,b	A A T T C A A T T T C A A A C C A A A A T A T A T A A A A A T G G A A T T T T T	280
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	280
KiKw-3a	.	280
KiKw-4a,5a	.	280
KiKw-4b,6a	.	280
KiKw-6b	.	272
KiKw-7b	.	280
KiKw-9b,11b	.	280
KiKw-11a	.	280
morifolium-1	.	280
morifolium-2	.	280
indicum-2	.	280
indicum-1	.	280
indicum-3	.	280
indicum-4	.	280
KiKw-1a,b	G C T T A T T T A T T A C T - - - - - - - - - - - - - - - T T G A T T T C	302
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	302
KiKw-3a	.	302
KiKw-4a,5a	.	302
KiKw-4b,6a	.	302
KiKw-6b	.	294
KiKw-7b	.	302
KiKw-9b,11b	.	320
KiKw-11a	.	302
morifolium-1	.	302
morifolium-2	.	302
indicum-2	.	302
indicum-1	.	302
indicum-3	.	302
indicum-4	.	302
KiKw-1a,b	A T A A A T A A A A A G A A A T A A T A T G C T C T T T T T T A T G T T G A G	342
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	342
KiKw-3a	.	342
KiKw-4a,5a	.	342
KiKw-4b,6a	.	342
KiKw-6b	.	334
KiKw-7b	.	342
KiKw-9b,11b	.	360
KiKw-11a	.	342
morifolium-1	.	342
morifolium-2	.	342
indicum-2	.	342
indicum-1	.	342
indicum-3	.	342
indicum-4	.	342
KiKw-1a,b	G T A A A A A T A T A G A T A A T G C T A G A T A	367
KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	367
KiKw-3a	.	367
KiKw-4a,5a	.	367
KiKw-4b,6a	.	367
KiKw-6b	.	359
KiKw-7b	.	367
KiKw-9b,11b	.	385
KiKw-11a	.	367
morifolium-1	.	367
morifolium-2	.	367
indicum-2	.	367
indicum-1	.	367
indicum-3	.	367
indicum-4	.	367

Fig. 5-5 続き

6. キジツ

Table 6-1 生薬「キジツ」市場品 モデル試料一覧

管理番号	モデル試料 提供時形態	試料片数	産地	等級等	提供社	モデル試料 入手年
NIB-0813	2つ割り	3	中国江西省		A社	
NIB-0814	2つ割り	3	日本	ナツミカン	A社	
NIB-0815	刻み	刻	中国江西省	K070066-3	B社	
NIB-0816	生	2	中国浙江省		C社	2011
NIB-0817	刻み	刻	四国		D社	2003
NIB-0818	小割	4	中国広西省	参考	D社	2005
NIB-0819	刻み	刻	中国浙江省		D社	2006
NIB-0820	小割	4	中国広西省	参考	D社	2006
NIB-0821	刻み	刻	四国		D社	2006
NIB-0822	刻み	刻	中国浙江省		D社	2006
NIB-0823	刻み	刻	四国		D社	2007
NIB-0824	刻み	刻	四国		D社	2008
NIB-0825	刻み	刻	中国浙江省		D社	2008
NIB-0826	刻み	刻	四国		D社	2009
NIB-0827	刻み	刻	中国浙江省		D社	2010
NIB-0828	小割	1	中国浙江省	3.2~4.0cm	D社	2010
NIB-0829	刻み	刻	中国浙江省		D社	2011
NIB-0830	半割	無	四国	少量のため無	D社	2011
NIB-0831	小割	3	中国広西省	参考	D社	2011
NIB-0832	小割	7	中国広西省	参考	D社	2013
NIB-0833	刻み(大)	2	日本和歌山県		E社	2011
NIB-0834	全形	2	中国浙江省	キジツ(枳殻)	F社	2013
NIB-0835	全形	3	中国浙江省	キジツ(枳実)	F社	2013
NIB-1122	刻み	刻	中国浙江省		G社	2012

Table 6-2 Yamajiら*により報告されたカンキツ類 ITS1 領域の変異点 (抜粋)

Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237
<i>C. hassaku</i>	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
<i>C. natsudaikai</i>	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C
<i>C. aurantium</i>	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
<i>C. sinensis</i>	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
<i>C. unshiu</i>	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
<i>C. reticulata</i>	K	R	C	R	Y	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C

*文献1: Yamaji H., Kondo K., Kuniga T., Nesumi H., Yoshida T., Hashimoto K., and Takeda O.,
J. Jpn. Bot., **88**: 222-238 (2013).

塩基番号は、本文献の Fig. 1 に従った。

Table 6-3 キジツモデル試料の ITS1 領域の変異点情報

(基原植物種鑑別に肝要な変異点を示す)

(1) ダイレクトシーケンシング及びクローニング&シーケンシング解析サンプル

Direct Sequencing															
Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge
NIB-0815	1	K	R	Y	G	T	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
中国江西省	2	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
NIB-0822	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-1122	1	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C
中国浙江省	2	K	R	C	R	T	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
Cloning & Sequencing															
Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge
NIB-0815	1	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
中国江西省	2	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
NIB-0822	1	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	3	K	R	C	G	Y	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-1122	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
中国浙江省	2	K	R	C	R	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C

(2) ダイレクトシーケンシング解析サンプル

Nucleotide positions	64	65	66	69	71	77	104	116	135	197	203	209	225	237	Judge
NIB-0813	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
中国江西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
NIB-0814	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
日本	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
NIB-0816	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-0817	Not amplified														2003
四国															
NIB-0818	1	K	R	Y	G	Y	R	Y	A	Y	Y	Y	C	Y	C
中国広西省															C. sinensis
NIB-0819	3	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-0820	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
NIB-0821	Not amplified														2006
四国															
NIB-0823	3	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
四国	4	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
NIB-0824	1	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
四国	2	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
NIB-0825	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-0826	1	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
四国	2	G	A	C	G	T	G	C	A	Y	Y	Y	C	Y	C
NIB-0827	1	K	R	C	G	T	R	Y	M	Y	C	C	C	Y	C
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
NIB-0828	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-0829	3	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	4	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	Y
NIB-0831	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
NIB-0832	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
中国広西省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	C	Y	Y	C	C	C
NIB-0833	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
和歌山県	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	C	Y	C
NIB-0834	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
NIB-0835	1	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y
中国浙江省	2	K	R	C	G	T	R	Y	A	Y	C	C	M	Y	Y

塩基番号は、文献1の Fig. 1 に従った。

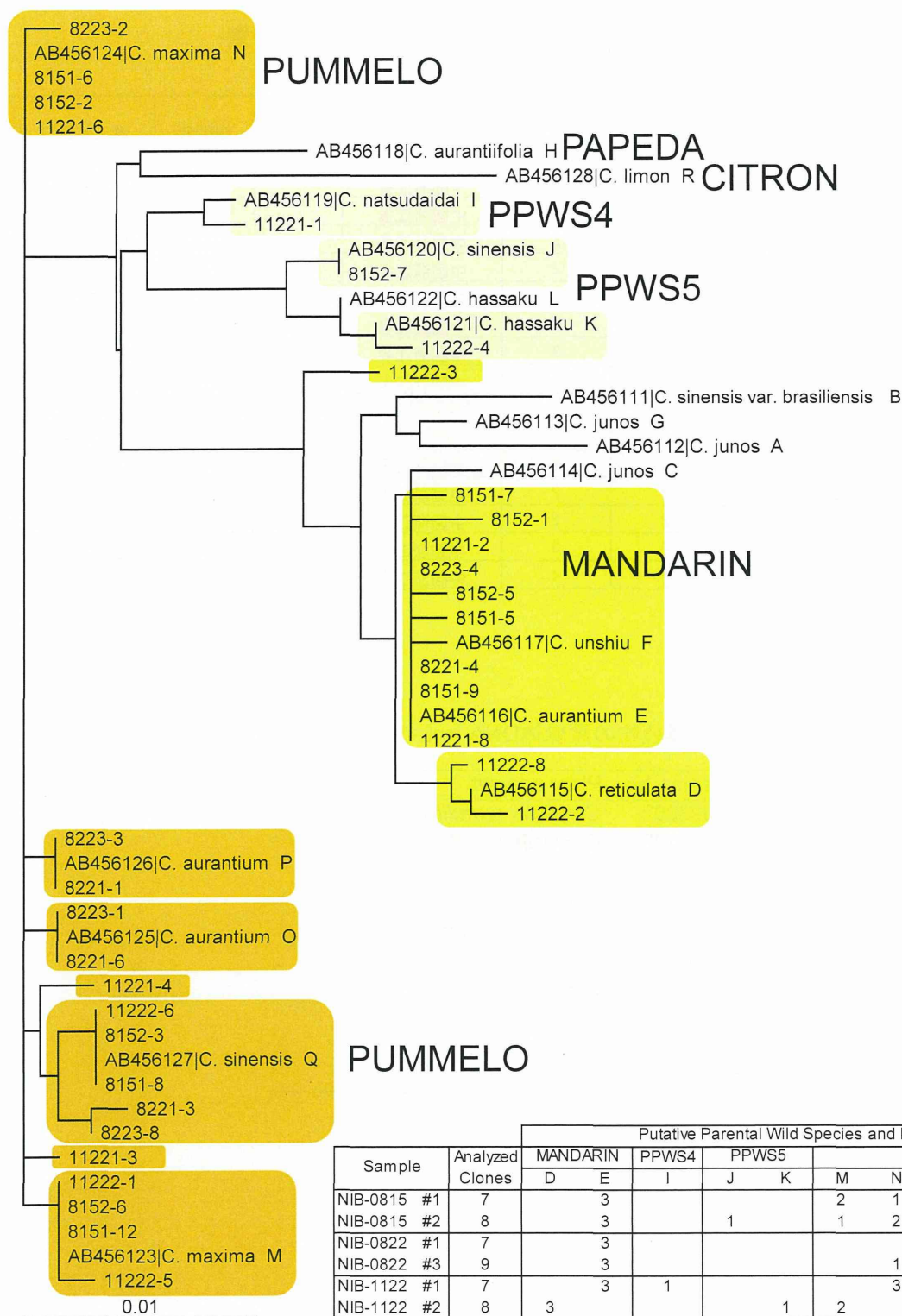


Fig. 6-1 カンキツ類の推定交配親（文献1）とモデル試料の ITS 領域の分子系統樹及びリボタイプの出現頻度

文献1 記載の交配親 Ribotype 18種とモデル試料 NIB-0815、0822、1122 由来のリボタイプの分子系統樹。学名の前の記番号は accession no. を、後の英字は Ribotype を示す。

クローン名は試料番号、枝番、クローン番号の順である。（例 11222-2: 試料番号 NIB-1122 検体 #2 クローン #2 の ITS 領域の配列の意。表は、各検体におけるリボタイプの出現頻度を示す。

相同性の高いクローンは同じリボタイプに分類した。

7. エンゴサク

Table 7-1 生薬「エンゴサク」市場品 モデル試料一覧

管理番号	モデル試料 提供時形態	試料片数	供試検体数	塩基配列 情報取得 検体数	産地	等級等	提供者	導入年月日	モデル 試料 入手年
NIB-0783	刻	刻	4	4	中国浙江省		A社	01-Aug-13	2011
NIB-0784	原形	9	4	3	中国浙江省		B社	01-Aug-13	
NIB-0785	生	17	2	2	中国浙江省		C社	01-Sep-13	2011
NIB-0786	刻み	刻	4	2	中国浙江省		D社	01-Sep-13	2013
NIB-0890	原形	3	4	1	中国浙江省	乙級	E社	01-Sep-13	1987
NIB-0891	原形	9	2	2	中国浙江省		E社	01-Sep-13	2001
NIB-0892	原形	5	4	3	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2003
NIB-0982	原形	7	4	4	中国浙江省	乙級	E社	01-Sep-13	2005
NIB-0983	原形	3	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2006
NIB-0984	原形	4	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2011
NIB-0985	原形	5	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2012
NIB-0986	原形	5	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-0987	原形	6	2	2	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-0988	原形	5	4	3	中国浙江省	甲	E社	01-Sep-13	2013
NIB-1131	刻み	刻	4	4	中国浙江省		F社	01-Jan-13	2012

Table 7-2 *Corydalis*属植物の葉緑体DNA *trnL-trnF*領域のDDBJ登録配列

Accession No.	Plant species
AY328202	<i>Corydalis temulifolia</i>
AY328203	<i>Corydalis</i> sp. Gong 20020431
DQ912916	<i>Corydalis ambigua</i>
DQ912917	<i>Corydalis incisa</i>
EU326049	<i>Corydalis falconeri</i>
FJ626561	<i>Corydalis</i> sp. Hong 99105
HE603349	<i>Corydalis cheilanthifolia</i>
HE603350	<i>Corydalis paczoskii</i>
HE603351	<i>Capnoides sempervirens</i>
KF849816	<i>Corydalis incisa</i>

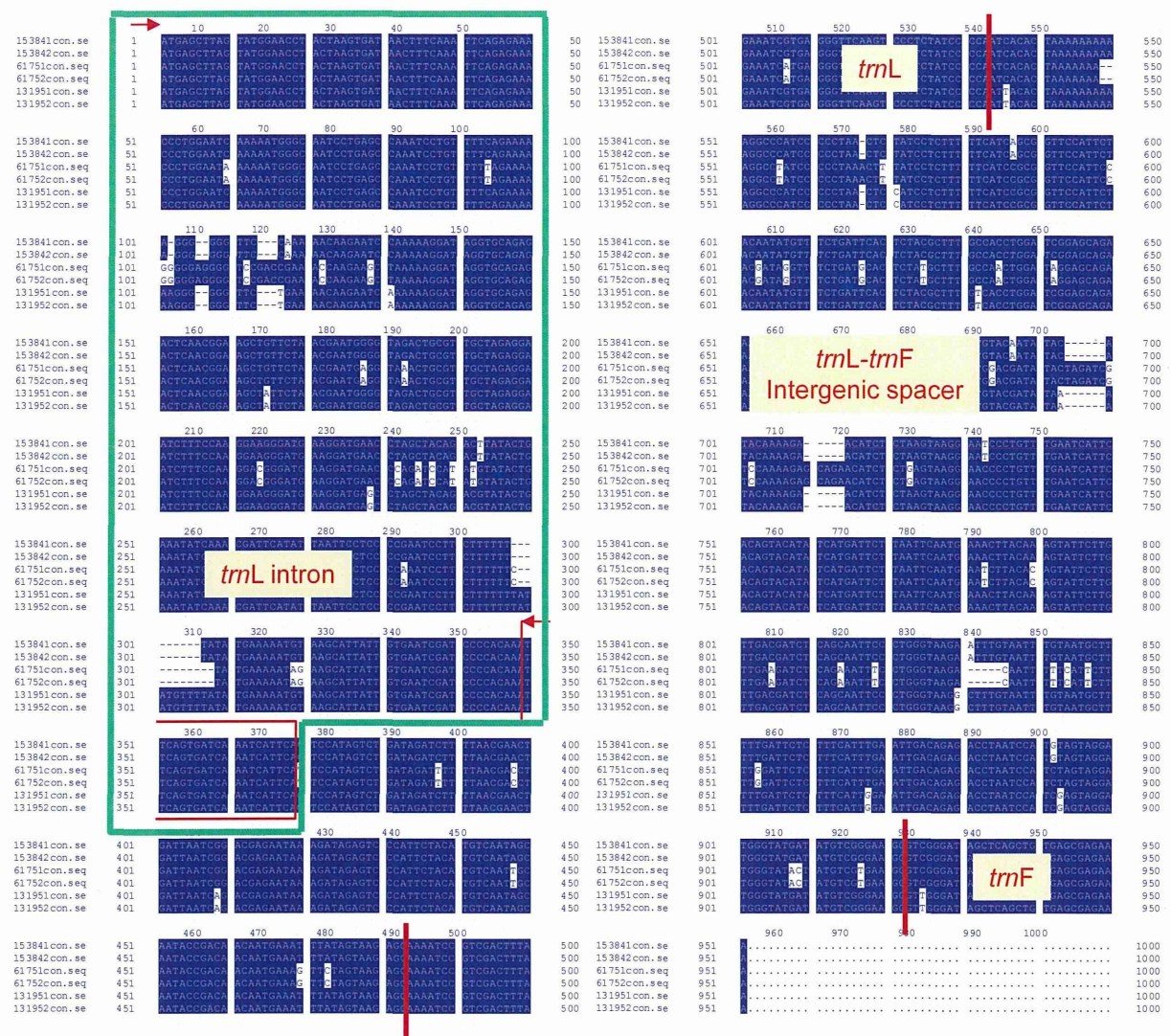


Fig. 7-1 *Corydalis* 属植物葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の塩基配列アラインメント

薬用植物資源研究センター北海道研究部保有のエンゴサク(15384:中国)、コウライエンゴサク(6175:韓国)、エゾエンゴサク(13195)の3種各2検体より得られた葉緑体 DNA *trnL-trnF* 領域の塩基配列情報。

上段からエンゴサク(中国) *Corydalis turtschaninovii*、コウライエンゴサク(韓国) *C. nakaii* (*C. ternate*)、エゾエンゴサク *C. ambigua* それぞれの2検体の塩基配列を示す。

3'末端より 301 bp の *trnL*-intron 領域についてモデル試料の塩基配列情報を収集した。

赤枠部は *trnL*-intron 領域の増幅に使用したアンチセンスプライマーの位置を示す。赤の縦線は、*trnL* intron、*trnL*、*trnL-trnF* intergenic spacer、*trnF* 各領域の境界を示す。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究
ー生薬、カンキョウの遺伝子情報についてー

研究分担者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

市場に流通するカンキョウの遺伝子情報の整備を目的に、葉緑体 DNA の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、前者の領域で、全 17 検体中 7 検体、後者の領域で、12 検体の塩基配列を決定出来た。その内部配列は、国際塩基配列データベース上の *Z. officinale* の配列と一致あるいは、ほぼ一致し、JP16 で規定されている基原植物からなることが確認された。

塩基配列が決定出来なかった検体が多数、見出された要因としては、調製時における熱処理による DNA の分解（断片化）が考えられる。また、比較的多くの検体で塩基配列の決定が可能であった *trnL-trnF* IGS 領域においても、入手年の古い検体では、PCR 増幅が出来ず、塩基配列が決定出来なかったことから、これらの検体では、時間経過による DNA の分解も、起因していると思われる。

以上のことから、PCR 増幅の成功率も考慮すると、カンキョウの基原種鑑別には、*trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析が有用であると考えられた。

A. 研究目的

「漢方薬に使用される薬用植物の総合データベース」のコンテンツの一つとして、生薬、カンキョウの遺伝子情報の整備を目的とした。

カンキョウは、温補薬に分類される生薬の一つであり、一般用漢方処方の承認審査基準に収載される 294 処方のうち、約 10% の処方に配合される重要生薬である。

第十六改正日本薬局方（JP16）において、カンキョウは、ショウガ *Zingiber officinale* Roscoe（Zingiberaceae）の根茎を湯通し又は蒸したものであると定義されている。一方、同じショウガを基原とする生薬として、ショウキョウがあり、このものは、JP16 に

において、*Z. officinale* Roscoe の根茎で、ときに周皮を除いたものであると規定されている。

本研究班では、既にショウキョウの遺伝子情報が取得済みであり、10 検体のショウキョウについて、葉緑体 DNA の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列が、データベースに登録されていることから、本研究では、カンキョウについても、上記の塩基配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 1 にまとめた。これらの試料は、データベー

ス構築のために国内の生薬メーカーより(独)医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。

2. 実験方法

2-1. 塩基配列解析

各試料を、MM-300 (Qiagen) により粉砕し、試料の粉末、約 20 mg を TE buffer 300 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、葉緑体 DNA の *trnL* 領域の exon 1, 2 及び *trnF* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域を含む DNA 断片をそれぞれ別々に増幅した。ただし、*trnL* intron 領域に関しては、nested PCR を用いたため、5'側の 23 塩基が欠けた部分配列を増幅した。PCR に使用された各プライマーの配置及び配列を Fig. 1 に示した。PCR は、酵素に、BIOTAQ Hot Start DNA Polymerase (Bioline) を、PCR 試薬として Ampdirect plus (Shimadzu) を用いて、以下の温度プログラムにより行われた: 95°C 10 min; 95°C 30 sec, 50°C 30 sec, 72°C 45 sec, 50 cycle; 72°C 7min. 得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C. 研究結果

TrnL intron 領域の部分配列は、全 17 検体中、7 検体 (RgKw-6, 9, 10, 13-15, 17) で

塩基配列を決定出来た。全ての配列が一致し、全長は、496 bp であった。この配列について、Blast Search Program による相同性検索を行ったところ、国際塩基配列データベース (INSD) 上の *Z. officinale* の配列 3 種 (Acc. Nos.: HM567394-96) と一塩基を除き、一致した。

一方、*trnL-F* IGS 領域は、12 検体 (RgKw-1, 3, 6, 9-17) で塩基配列を決定出来た。本領域についても、全検体中において、同一の塩基配列を示し、全長は、328 bp であった。相同性検索の結果、データベース上の *Z. officinale* の配列 5 種 (Acc. Nos.: KF694893, HM567394-97) と完全に一致した。また、上記の配列は、いずれも本研究班で既に塩基配列解析が終了しているショウキョウ由来の配列と一致した。

D. 考察

市場に流通するカンキョウの *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った結果、前者の領域において、10 検体、後者の領域において、5 検体が、PCR 増幅が出来ず、塩基配列の決定が不可能であった。既に遺伝子情報の取得が終了しているショウキョウの塩基配列解析では、いずれの試料においても、上記の 2 領域を一度の PCR で増幅出来ており、今回、各領域に分けて PCR 増幅を行ったにもかかわらず、PCR 産物が得られない試料が多く見出された背景には、カンキョウの調製時における熱処理による DNA の分解 (断片化) があると推察される。また、*trnL-trnF* IGS 領域において塩基配列が決定出来なかった 5 検体のうち、RgKw-4, 5, 7, 8 は、いずれも今回の試料の中では、入手年が古いものであることから (RgKw-2 は、入手年不明)、これらの検体では、時間経過により、試料中の DNA の分解が、他の試料よりも進んでいたため、PCR 増幅が出来なかったと推

察された。*trnL-trnF* IGS 領域に比べ、*trnL* intron 領域において、PCR の成功率が低かった点については、後者の領域の方が、より長い配列を有していたことが要因と思われる。

塩基配列の決定が可能であった各検体における内部配列については、どちらの領域においても、JP16 で規定する基原植物である *Z. officinale* の配列と一致あるいは、ほぼ一致した。また、前述の通り、ショウキョウの国内市場品由来の配列とも完全に一致しており、生薬、ショウキョウ及びカンキョウの調製に用いられる *Z. officinale* の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列は、安定していることが明らかになった。

INSD に登録されている *Zingiber* 属植物 5 種 (*Z. cylidricum*, *Z. junceum*, *Z. nimmonii*, *Z. odoriferum*, *Z. parishii*) の *trnL-trnF* IGS 領域の配列を、今回の研究で得られた同領域の塩基配列と比較した結果、*Z. officinale* と他の同属植物は、十分に区別可能であった。このことから、PCR 増幅の成功率も考慮す

ると、カンキョウの基原植物の鑑別には、*trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析が有用であると考えられる。

E. 結論

市場に流通するカンキョウの遺伝子情報の整備を目的に、葉緑体 DNA の *trnL* intron 領域及び *trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、カンキョウの基原植物の鑑別には、PCR 増幅の成功率も考慮すると、*trnL-trnF* IGS 領域の塩基配列解析が有用であると考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

なし

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Details of processed ginger used in this study.

Sample no.	Vouchor no.	Name	Locality	Form	date	description
RgKw-1	NIB-0787	カンキョウ		生		16126
RgKw-2	NIB-0788	カンキョウ	広西省	原形		
RgKw-3	NIB-0789	カンキョウ	広西壮族自治区	刻み	2013.01	
RgKw-4	NIB-0790	カンキョウ	四川省	原形	1990頃	
RgKw-5	NIB-0791	カンキョウ	広東省	原形	1996.05	赤肉
RgKw-6	NIB-0792	カンキョウ	広東省	原形	2002.03	赤肉
RgKw-7	NIB-0793	カンキョウ	広東省	原形	2002.1	赤肉
RgKw-8	NIB-0794	カンキョウ	四川省	原形	2002.12	赤肉
RgKw-9	NIB-0795	カンキョウ	広東省	原形	2006.01	赤肉
RgKw-10	NIB-0796	カンキョウ	広東省	原形	2009.03	赤肉
RgKw-11	NIB-0797	カンキョウ	広東省	原形	2009.11	赤肉
RgKw-12	NIB-0798	カンキョウ	広東省	原形	2010.04	赤肉
RgKw-13	NIB-0799	カンキョウ	広東省	原形	2011.06	赤肉
RgKw-14	NIB-0800	カンキョウ	広東省	原形	2012.08	赤肉
RgKw-15	NIB-0801	カンキョウ	雲南省	刻み	2013	
RgKw-16	NIB-0802	カンキョウ(赤肉)	広西省	刻み	2013.01	
RgKw-17	NIB-1115	カンキョウ	広西壮族自治区	刻	2012	

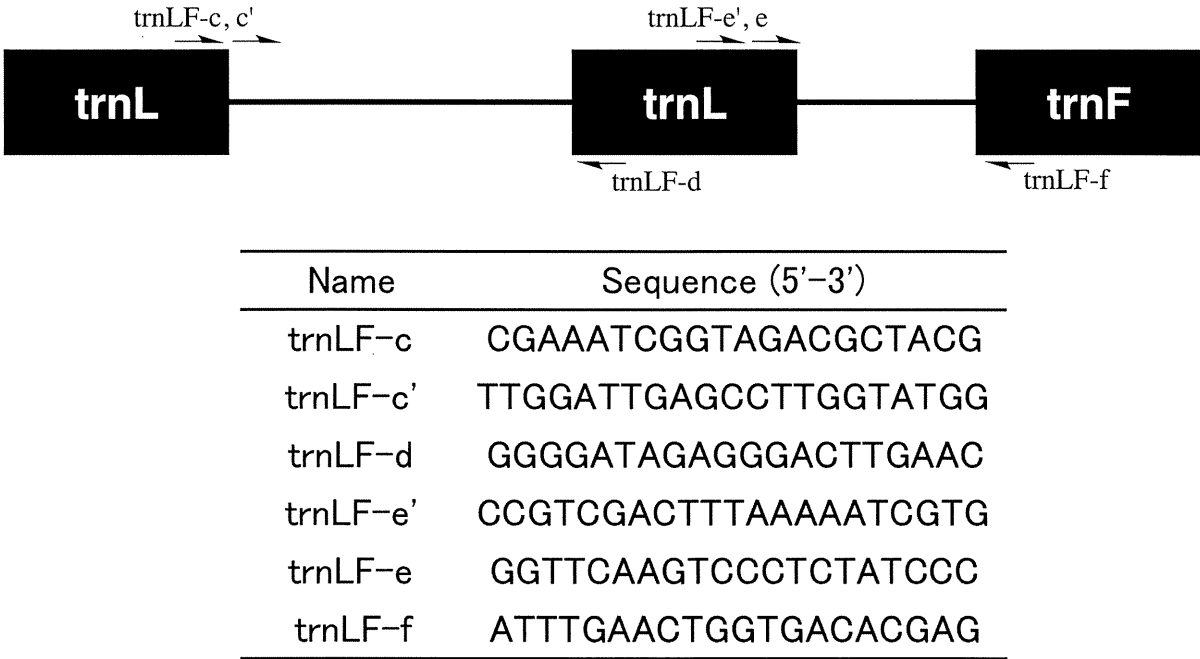


Fig. 1 Schematic and sequences of each primer used in this study

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
薬用植物栽培並びに関連産業振興を指向した薬用植物総合情報データベースの
拡充と情報整備に関する研究（H25-創薬-指定-006）
分担研究報告書

分担研究課題 遺伝子鑑別情報の集積と解析に関する研究
－生薬、キクカの遺伝子情報について－

研究分担者 丸山 卓郎 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部 室長

国内の市場に流通するキクカの遺伝子情報の整備を目的に、核 rDNA の ITS1 領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、解析可能だった 22-23 個体より、前者の配列において、13 個の遺伝子型、後者の配列において、9 つの遺伝子型が認められた。外部形態観察から、キク由来及びシマカンギク由来と推定された各試料間の比較では、キク由来の試料の方が、遺伝的多様性が小さく、特に *trnH-psbA* IGS 配列では、キク由来試料は、全て同一の遺伝子型に帰属された。これは、栽培に起因する現象と推定される。一方、上記の領域を用いた基原種鑑別については、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium* の複雑な種分化の過程などの要因により、不可能であった。

A. 研究目的

「漢方薬に使用される薬用植物の総合データベース」のコンテンツの一つとして、生薬、キクカの遺伝子情報の整備を目的とした。

キクカは、辛涼發表薬に分類される生薬の一つであり、主な薬理活性として清熱、明目作用が知られている。また、一般用漢方処方承認審査基準に収載される 294 処方のうち、6 処方に配合される生薬である。

第十六改正日本薬局方 (JP16) において、キクカは、キク *Chrysanthemum morifolium* Ramatulle 又はシマカンギク *Chrysanthemum indicum* Linné (Compositae) の頭花であると定義されている。

本研究では、国際塩基配列データベース (INSD; DDBJ/EMBL/GenBank) 中の *C. morifolium*, *C. indicum* の登録情報を検索し

た上で、鑑別情報を得るために、適切と考えられた遺伝子領域について、塩基配列解析を行った。

B. 研究方法

1. 実験材料

本研究に使用された試料の詳細を Table 1 にまとめた。これらの試料は、データベース構築のために国内の生薬メーカーより (独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センターが提供を受けた試料の一部を譲渡されたものである。

JP16 では、キク及びシマカンギク由来のキクカの性状を下記のように規定している。

キク由来：本品は径 15～40mm の頭花で、総ほうは 3～4 列の総ほう片からなり、総ほう外片は線形～ひ針形、内片は狭卵形～卵形を呈する。舌状花は多数で、類白色～黄

色、管状花は少数で淡黄褐色を呈し、ときに退化して欠くことがある。総ほうの外面は緑褐色～褐色を呈する。質は軽く、砕きやすい。本品は特有のにおいがあり、味はわずかに苦い。

シマカンギク由来：本品は径 3～10mm の頭花で、総ほうは 3～5 列の総ほう片からなり、総ほう外片は線形～ひ針形、内片は狭卵形～卵形を呈する。舌状花は一輪で、黄色～淡黄褐色、管状花は多数で淡黄褐色を呈する。総ほうの外面は黄褐色～褐色を呈する。質は軽く、砕きやすい。本品は、特有のにおいがあり、味はわずかに苦い。

この記述に基づき、試料を確認した結果、KiKw-2, 8, 10, 12 が、キク由来、その他が、シマカンギク由来であると判断された (Fig. 1)。

2. 実験方法

2-1. INSD 検索

DDBJ のホームページ上で、提供されているサーチエンジン (<http://arsa.ddbj.nig.ac.jp/html/>) を用い、*C. morifolium*, *C. indicum* の配列情報を検索した。

2-2. 塩基配列解析

各試料、2 個体を、別々に、MM-300 (Qiagen) により粉碎し、試料の粉末、約 10mg を TE buffer 200 μ L に懸濁した。この懸濁液を、Maxwell 16 tissue DNA Purification Kit (Promega) に加え、自動核酸抽出装置、Maxwell 16 Instrument (Promega) により、genomic DNA を抽出、精製した。

このものを鋳型とし、植物の核 rDNA 領域及び葉緑体 DNA の *trnH*, *psbA* 領域に保存性の高い配列に設計されたプライマーを用いて PCR を行うことにより、目的とする核 rDNA ITS 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域を含む DNA 断片を増幅した。PCR は、KOD

FX DNA Polymerase (Toyobo) を用いて、以下の温度プログラムにより行われた：94°C 2 min; 98°C 10 sec, 50°C 30 sec, 68°C 30 sec, 50 cycle; 68°C 2 min。得られた PCR 産物を MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) により精製した後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。PCR による目的遺伝子領域の増幅、塩基配列解析のプロセスは、各個体、2 回行い、PCR 酵素による塩基の取り込みミスが疑われた試料については、3 回目の解析を行った。塩基配列解析は、fasmac 社の受託解析により行われた。得られた塩基配列の多重整列解析は、Clustal W プログラムにより行った。

C. 研究結果

1. INSD 検索

キク属の学名については、日局で使用されている *Chrysanthemum* 属の他に、Flora of Japan では、*Dendranthema* 属が使用されている。そこで、双方の属名を用いて、DDBJ のサーチエンジンにより、検索をかけた結果、'Dendranthema' を用いた場合においても、*Chrysanthemum* 属として登録されている配列のみが、結果として得られたことから、検索は、'Chrysanthemum' を用いて行うこととした。

C. morifolium, *C. indicum* 由来の塩基配列情報を検索した結果、それぞれ、8023, 1783 件が見出された。この内、植物の分類に用いられる遺伝子領域の情報は、核 rDNA の ITS 領域に関するものが、194 及び 420 件、*trnL-trnF* IGS 領域に関するものが、7 及び 404 件、*trnH-psbA* IGS 領域に関するものが、9 及び 388 件であった。

TrnL-trnF 領域及び *trnH-psbA* IGS 領域について、Liu ら¹⁾ 及び Zhao ら²⁾ が、論文報告している配列を抽出し、系統樹を作成したところ、Figs. 2, 3 のような結果となった。*TrnL-trnF* 領域が、アウトグループとし

て使用した *Artemisia* 属植物の配列と入り組んだ樹形を示したのに対し、*trnH-psbA* IGS 領域では、アウトグループである *Artemisia* 属植物の配列が、他の配列と最も離れた位置に配置され、*C. morifolium* の 2 つの配列との間に、*C. indicum* の 4 つの配列が位置する結果となった。

上記の結果から、本研究では、核ゲノム遺伝子領域である ITS1 領域に加え、葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の配列解析を行うこととした。

2. ITS 塩基配列解析

医薬基盤研究所より提供を受けたデータベース用の試料 12 検体について、INSDB の登録数が最も多かった ITS 配列の内、ITS1 領域を解析した。ただし、KiKw-5, 7 は、3 個体を試験に供したが、PCR 産物が得られたのは、1 個体のみであった。塩基配列解析の結果を Fig. 4, Table 2 にまとめた。解析可能だった 22 個体より、13 個の遺伝子型が見出され、その全長は、いずれも 255 bp であった。変異は、13 箇所で見られ、そのすべてが、いずれかの遺伝子型で塩基の重複を示す部位であった。最も多くの個体が帰属された遺伝子型は、genotype 3 の 5 個体であり、この遺伝子型を持つものは、いずれもキク由来の試料であった。同一ロット内の 2 個体で、同じ遺伝子型を示したものは、KiKw-2, 8, 10 の 3 検体であった。Blast search program による相同性検索の結果、いずれの遺伝子型も、データベース上の *C. vestitum*, *C. rhombifolium*, *C. lavandulifolium*, *C. indicum*, *C. morifolium* などの配列と非常に高い相同性を示した。登録配列数が膨大なため、全てを確認することは不可能だったが、確認した限りにおいては、塩基の重複が見られた部位を除き、一致する配列であった。

3. *TrnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析

ITS1 領域と同様の方法で、*trnH-psbA* 領域の塩基配列解析を行った。ただし、このものについても、ITS1 領域と同様、KiKw-7 は、1 個体のみ解析に留まった。解析結果を Fig. 5, Table 3 にまとめた。解析可能だった 23 個体より、9 つの遺伝子型が認められた。この内、197-204 番目の塩基に欠失が見られた genotype 6 は、全長 359 bp, 295-312 番目の塩基に挿入が見られた genotype 8 は、全長 385 bp であり、その他は、いずれも全長 367 bp であった。最も多くの個体が帰属された遺伝子型は、genotype 2 であり、約半数の 11 個体が、この配列を示し、特にキク由来の試料である KiKw-2, 8, 10, 12 は、全てこの遺伝子型に帰属された。同一ロット内の 2 個体が、同じ遺伝子型を示したのは、KiKw-1, 2, 8, 10, 12 の 5 検体であった。Blast search program による相同性検索の結果、*C. boreale*, *C. vestitum*, *C. lavandulifolium*, *C. indicum*, *C. zawadskii*, *C. rhombifolium*, *C. x morifolium* として登録されている配列などと一致するかあるいは、非常に高い相同性を示した。ただし、塩基の挿入／欠失が見られた genotypes 6, 8 並びに、塩基の重複が見られた genotype 9 には、一致する配列は、認められず、特に genotypes 6, 8 は、他の遺伝子型に比べ、相同性は、低値に留まった。

D. 考察

市場に流通するキクカの ITS1 配列及び *trnH-psbA* IGS 配列を解析した結果、いずれの領域の配列においても、わずかな違いを持つ多くの遺伝子型が認められた。ITS1 配列と *trnH-psbA* IGS 配列との比較では、前者が、13 個の遺伝子型、後者が 9 つの遺伝子型であり、後者の配列のほうが、多様性がやや小さかった。同一ロット内の 2 個体で、同一の遺伝子型を示した検体は、ITS1

配列では、KiKw-2, 8, 10, *trnH-psbA* IGS 配列では、KiKw-1, 2, 8, 10, 12 であった。この内、KiKw-2, 8, 10, 12 は、いずれも性状からキク由来と判断された試料である。このことは、キク由来の試料のほうが、シマカンギク由来のものに比べて、遺伝的背景が安定していることを示唆している。キク由来の試料で唯一、2 個体間での配列が異なっていた KiKw-12 の ITS1 配列においても、違いは、1 塩基のみであることも上記の考察を支持するものである。恐らくは、栽培により遺伝的多様性が小さくなっていることに起因すると想像された。

今回解析に用いた遺伝子領域による基原種鑑別については、多数の近縁植物の存在、倍数性、*Chrysanthemum x morifolium* の複雑な種分化の過程などの要因により、不可能であった。

E. 結論

市場に流通するキクカの遺伝子情報の整備を目的に、核 rDNA の ITS1 領域及び葉緑体 DNA の *trnH-psbA* IGS 領域の塩基配列解析を行った。その結果、栽培品が主であると思われるキク由来の試料において、遺伝的多様性が小さいことを示す結果を得たが、基原種鑑別法に繋がる情報は得られなかった。

F. 研究発表

1. 学会発表

丸山卓郎, 河野徳昭, 朱姝, 小松かつ子, 川原信夫, 合田幸広, 薬用植物総合情報データベースの構築－カッコンの遺伝子情報－, 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 2014 年 10 月, 東京.

2. 論文発表

なし

G. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

参考文献

- 1) Liu P.-L. *et al.*, Phylogeny of the genus *chrysanthemum* L.: evidence from single-copy nuclear gene and chloroplast DNA sequences, *PLoS ONE*, **7**, E48970 (2012).
- 2) Zhao H.-B *et al.*, Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *trnL-F* IGS sequences, *Plant Syst. Evol.*, **284**, 153-169 (2010).

Table 1 Details of Chrysanthemum flower used in this study.

Sample no.	Vouchor no.	Name	Locality	Form	Date	Description	頭花の性状から推定
KiKw-1	NIB-0803	キクカ	湖南省	原形			シマカンギク
KiKw-2	NIB-0804	キクカ	浙江省	刻み		K070066-2	キク
KiKw-3	NIB-0805	キクカ	広東省	原形	2010.02	甘	シマカンギク
KiKw-4	NIB-0806	キクカ	広東省	原形	2011.02	甘	シマカンギク
KiKw-5	NIB-0807	キクカ	広東省	原形	2012.05	甘	シマカンギク
KiKw-6	NIB-0808	キクカ	広東省	原形	2013.02	甘	シマカンギク
KiKw-7	NIB-0809	キクカ	河南省	原形	2013	漢菊花(野生品)	シマカンギク
KiKw-8	NIB-0810	キクカ	浙江省	刻み	2013	杭菊花(栽培品)	キク
KiKw-9	NIB-0811	キクカ(甘)	広東省	全形	2012.03		シマカンギク
KiKw-10	NIB-0812	キクカ(杭)	浙江省	全形	2012.06		キク
KiKw-11	NIB-1120	キクカ	安徽省	刻み	2012	甘	シマカンギク
KiKw-12	NIB-1121	キクカ	山西省	刻み	2012	杭	キク

Table 2 The ITS1 genotypes and its variable sites found in this study.

genotype	sample	aligned position															Acc. No.
		14	34	52	64	83	100	101	106	107	109	113	119	128	138	140	
1	KiKw-1a	A	C	Y	A	C	G	C	R	C	C	T	C	T	R	T	
2	KiKw-1b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	M	.	.	.	G	.	
3	KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	.	
4	KiKw-3a	.	.	.	R	Y	.	.	A	S	.	.	.	.	.	.	
5	KiKw-3b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	Y	.	.	.	.	
6	KiKw-4a,7b,9b,12b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	Y	Y	.	.	.	
7	KiKw-4b	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	Y	Y	K	.	.	
8	KiKw-5a,6a	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	
9	KiKw-6b	.	.	.	.	.	.	M	A	.	.	.	.	.	.	.	
10	KiKw-9a	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	S	.	.	.	
11	KiKw-10a,b	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	Y	.	.	.	
12	KiKw-11a	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	.	.	Y	
13	KiKw-11b	.	.	.	.	Y	.	.	A	.	M	Y	.	.	.	.	
	C. indicum-a	A	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577298
	C. morifolium-a	-	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577310
	C. morifolium-b	-	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	EF577311
	C. morifolium-c	-	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	EF577312

Table 3 The *trnH-psbA* genotypes and its variable sites found in this study.

genotype	sample	aligned position										Acc. No.
		3	135	184	197-204	214	267	272	273	274	295-312	
1	KiKw-1a,b	C	T	T	GGTTTGTA	C	A	G	G	A	-	
2	KiKw-2a,b,3b,5c,8a,b,9a,10a,b,12a,b	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	
3	KiKw-3a	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	
4	KiKw-4a,5a	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	
5	KiKw-4b,6a	.	.	C	.	.	.	T	.	C	.	
6	KiKw-6b	.	.	C	-	.	.	T	A	.	.	
7	KiKw-7b	T	.	C	.	.	.	T	.	.	.	
8	KiKw-9b,11b	.	G	C	.	.	.	T	.	C	TTGATTTCATAAAATAAT	
9	KiKw-11a	.	.	Y	.	.	.	K	.	.	.	
	morifolium-1, 2	.	.	C	.	T	T	T	.	.	.	JF940267-68
	indicum-1	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	JF940259
	indicum-2	.	.	C	.	.	T	T	.	.	.	JF940260
	indicum-3	.	.	C	.	.	T	T	.	C	.	JF940261
	indicum-4	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	JF940262



Fig. 1 Pictures of Chrysanthemum flower used in this study
Scale span is 1 mm

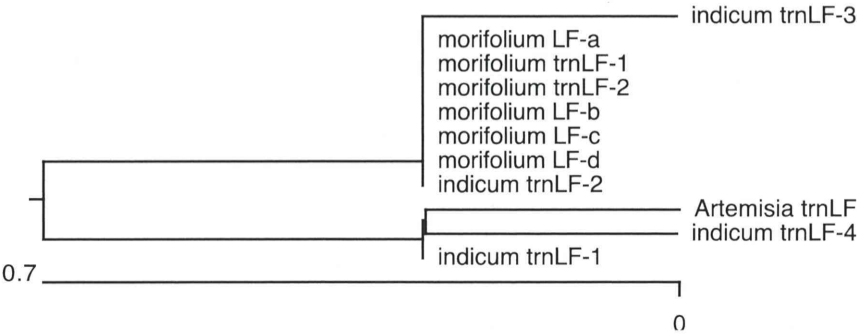


Fig. 2 NJ tree constructed from some *trnL-trnF* sequences of *Chrysanthemum* plants in INSD

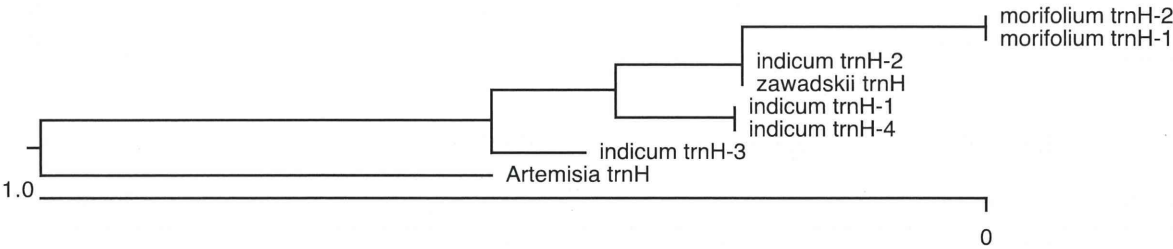


Fig. 3 NJ tree constructed from some *trnH-psbA* sequences of *Chrysanthemum* plants in INSD

KiKw-1a	T C G A A C C C T G C A A A G C A G A A C G A C C C G T G A A C A C G T A A A A	40
KiKw-1b	.	40
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	40
KiKw-3a	.	40
KiKw-3b	.	40
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	40
KiKw-4b	.	40
KiKw-5a ,6a	.	40
KiKw-6b	.	40
KiKw-9a	.	40
KiKw-10a ,b	.	40
KiKw-11a	.	40
KiKw-11b	.	40
indicum-a	.	40
morifolium-a	.	39
morifolium-b	.	39
morifolium-c	.	39
KiKw-1a	A C A A C C G A G T G Y T G A G A G G A C C A A G C T C C T G T T T G A T C C T	80
KiKw-1b	.	80
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	80
KiKw-3a	.	80
KiKw-3b	.	80
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	80
KiKw-4b	.	80
KiKw-5a ,6a	.	80
KiKw-6b	.	80
KiKw-9a	.	80
KiKw-10a ,b	.	80
KiKw-11a	.	80
KiKw-11b	.	80
indicum-a	.	80
morifolium-a	.	79
morifolium-b	.	79
morifolium-c	.	79
KiKw-1a	C T C G A C G C T T T G T C G A T G C G C A T T T R C T C G A G T C C T T T C G	120
KiKw-1b	.	120
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	120
KiKw-3a	.	120
KiKw-3b	.	120
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	120
KiKw-4b	.	120
KiKw-5a ,6a	.	120
KiKw-6b	.	120
KiKw-9a	.	120
KiKw-10a ,b	.	120
KiKw-11a	.	120
KiKw-11b	.	120
indicum-a	.	120
morifolium-a	.	119
morifolium-b	.	119
morifolium-c	.	119
KiKw-1a	G A C C T T G T G A A T G T G T C R T T G G C G C A T T A A C A A C C C C C G G	160
KiKw-1b	.	160
KiKw-2a ,b ,8a ,b ,12a	.	160
KiKw-3a	.	160
KiKw-3b	.	160
KiKw-4a ,7b ,9b ,12b	.	160
KiKw-4b	.	160
KiKw-5a ,6a	.	160
KiKw-6b	.	160
KiKw-9a	.	160
KiKw-10a ,b	.	160
KiKw-11a	.	160
KiKw-11b	.	160
indicum-a	.	160
morifolium-a	.	159
morifolium-b	.	159
morifolium-c	.	159

Fig. 4 ITS1 sequence alignment for Chrysanthemum flower

KiKw-1a	C A C A A C G T G T G C C A A G G A A A A C T A A A C T C A A G A A G G C T C G	200
KiKw-1b	.	200
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	200
KiKw-3a	.	200
KiKw-3b	.	200
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	200
KiKw-4b	.	200
KiKw-5a,6a	.	200
KiKw-6b	.	200
KiKw-9a	.	200
KiKw-10a,b	.	200
KiKw-11a	.	200
KiKw-11b	.	200
indicum-a	.	200
morifolium-a	.	199
morifolium-b	.	199
morifolium-c	.	199
KiKw-1a	T T T C A T G A T G C C C C C G T T C G C G G T G T G C T C A T G G G A T G T G	240
KiKw-1b	.	240
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	240
KiKw-3a	.	240
KiKw-3b	.	240
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	240
KiKw-4b	.	240
KiKw-5a,6a	.	240
KiKw-6b	.	240
KiKw-9a	.	240
KiKw-10a,b	.	240
KiKw-11a	.	240
KiKw-11b	.	240
indicum-a	.	240
morifolium-a	.	239
morifolium-b	.	239
morifolium-c	.	239
KiKw-1a	G C T T C T T T A T A A T C A	255
KiKw-1b	.	255
KiKw-2a,b,8a,b,12a	.	255
KiKw-3a	.	255
KiKw-3b	.	255
KiKw-4a,7b,9b,12b	.	255
KiKw-4b	.	255
KiKw-5a,6a	.	255
KiKw-6b	.	255
KiKw-9a	.	255
KiKw-10a,b	.	255
KiKw-11a	.	255
KiKw-11b	.	255
indicum-a	.	255
morifolium-a	.	254
morifolium-b	.	254
morifolium-c	.	254

Fig. 4 Continued