

## 北海道におけるオオサクラソウ (*Primula jesoana*) の 葉緑体ゲノムの遺伝的変異

佐藤由佳<sup>1)</sup>・我妻尚広<sup>2)</sup>・岡本吉弘<sup>3)</sup>

Genetic diversity of chloroplast genome *Primula jesoana* in Hokkaido

Yuka SATO, Takahiro WAGATSUMA and Yoshihiro OKAMOTO  
(Accepted 20 July 2010)

### 緒 言

近年、急激な開発にともない地球環境は悪化し、生物多様性の消失が危惧されている。生物多様性とは、すべての生物の変異性を示すものとし、種内の多様性、種間の多様性および生態系の多様性を含むと定義されている(高橋 2004)。生物多様性は人間生存の基盤であり、現存する生物多様性の保全に加えて、失われた自然の再生を積極的に推進する必要がある。現存する生物多様性の保全を図り、失われた自然を再生するためには、地域の生物多様性を反映する特定の種を指標とし、それらの個体数や生育・繁殖状況、内包する遺伝的多様性の変化などを調査し、その種を絶滅させないような保全管理を行うことが有効である(鷺谷 1999)。その指標種には特定の生息・生育場所と結びつきの強い生態的指標種、絶滅危惧種、地理的固有性の高い種などを用い、その地域の生物多様性の指標にしている。鷺谷・矢原(1996)は個体数が極端に減少または絶滅した集団の再生を目的に、わずかに残された個体の増殖や、土壌中の埋土種子からの個体再生、あるいは別の生育地からの個体移動や、新たな場所への個体移動などの取り組みを報じている。

一方、松田(2002)は個体を移動する場合には、地域集団の遺伝的構成を大きく変えるような移動は避ける必要があると指摘している。生物種は、同種であっても地域的に固有の遺伝的変異を保有している場合があり、このような遺伝的分化が認められる

場合には、それをもたらした進化的背景の尊重や各場所の環境条件に適応した遺伝的構成の保全と言う視点から、各地域の遺伝的固有性を保全することが重要である。遺伝的に分化した個体間で交雑が起こると、その場所の環境に適応した遺伝子の割合が低下したり、遺伝子間相互作用の崩壊などによって適応的な遺伝子構成が壊れたりすることで、交雑後代の適応度が低下する場合がある(Hufford and Mazer 2003)。

これらの観点から、我が国における生物多様性保全の指標種として、鷺谷を中心とした研究グループは、サクラソウ (*Primula sieboldii* E. Morren) に注目し、その保全方法や遺伝的多様性の把握を試みている。サクラソウの花柱性(Washitani *et al.* 1994)や受粉(Washitani *et al.* 1995)、種子発芽(Washitani and Kabaya 1988)、繁殖(Washitani *et al.* 1994)などの研究を行い、サクラソウの保全には、生物間相互作用で結ばれた地域全体の生物多様性を保全することが不可欠であると報じている(鷺谷・大串 2006)。このような研究を経てサクラソウは生物多様性保全の指標種として位置づけられ、利用されている。しかし、北海道ではサクラソウは道南から日高の限定的な地域にしか分布しておらず、指標種としての利用地域は限られる。北海道ではサクラソウに比較し、近縁のオオサクラソウが広く分布している。オオサクラソウ (*Primula jesoana* Miq var. *jesoana*) は、サクラソウ科のサクラソウ属で、北海道、本州中部以北に分布する多年草で垂

<sup>1)</sup> 2009年度酪農学園大学大学院酪農学研究科酪農学専攻修士課程修了生  
Forage Feed Crops Science, Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>2)</sup> 酪農学園大学短期大学部酪農学科資源植物学研究室  
Plant Genetics and Physiology, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

<sup>3)</sup> 酪農学園大学短期大学部酪農学科植物育種学研究室  
Plant Breeding, Department of Dairy Science, Rakuno Gakuen University Dairy Science Institute, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

高山の林縁や谷沿いの湿気の多い場所にはえる（佐竹ら 1981）。北海道や朝鮮には、オオサクラソウの変種であるエゾオオサクラソウ (*Primula jesoana* Miq var. *pubescens* Takeda et Hara) が分布している。エゾオオサクラソウは、オオサクラソウによく似ているが、葉柄や花茎に縮れ毛が生えているため容易に区別がつく（佐竹ら 1981）。また、オオサクラソウとエゾオオサクラソウは、北海道のレッドデータブックに希少種として記載され（北海道 2001）、地域の生物多様性を反映する指標種として期待される。

一方、種内の集団間や集団内における遺伝的変異を把握するうえで、環境変異の影響を受けづらい分子マーカーの利用は有効であるとの報告されている（津村 2001）。特に、葉緑体ゲノムは、保存性が高いため、これまでは主に種間や属間などの分類群間での変異を検出する遺伝マーカーとして用いられてきた（Newton *et al.* 1999）。さらに、近年の研究において葉緑体ゲノムの遺伝子間領域に変異が多く見られ、種内変異を把握する遺伝マーカーとして有効であることが報告された（Okuhara and Harada 2002）。また、葉緑体ゲノムは被子植物では母性遺伝するため地理的変異を解明するのに適していると言われている（Amoatey and Tilney-Bassett 1994）。サクラソウでは、Honjo *et al.* (2004) により葉緑体ゲノムを用いた系統地理学的解析がなされた。しかし、筆者の知るかぎり北海道に分布するオオサクラソウに焦点をあてたこのような研究は見られない。

そこで、本研究では葉緑体ゲノム変異を指標として、北海道のオオサクラソウとエゾオオサクラソウ野生集団が保有する遺伝的多様性とその地理的分布の把握を試みた。

### 材料および方法

調査は 2009 年 5 月 21 日に日高で、5 月 28 日に釧路と根室で、6 月 24 日に北空知で行なった。調査対象は日高の 3 集団 60 個体、釧路の 6 集団 118 個体と根室の 2 集団 40 個体、北空知の 3 集団 60 個体とした。葉を採取する前に各個体の花柱性を調査した。葉は 1 個体ごと 3 枚採取して、1 枚ずつ茶袋に入れ、シリカゲルを入れたポリエチレン製ジッパー付きの

袋に入れて研究室に持ち帰った。葉は実験に供すまで  $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫に入れ保存した。

葉緑体ゲノムの塩基配列の決定には、調査対象とした個体から、日高の 3 集団から 20 個体、釧路の 6 集団から 21 個体と根室の 2 集団から 8 個体、北空知の 3 集団から 10 個体をランダムに抽出して供試した。DNA 抽出は SDS 0.30%, NaCl 400 mM, EDTA 5mM, Tris-HCl 20mM で構成される SNET と Proteinase K を 50:1 の割合で混合した溶解液を用い、 $55^{\circ}\text{C}$  1 時間の加熱抽出法で行った。抽出した DNA はフェノール抽出とエタノール沈殿によって精製し、PCR 法によって目的の領域を増幅した。PCR 反応は Amplitaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, WI) を用いて行なった。プライマーには Honjo *et al.* (2004) がサクラソウで多くの種内変異がみられたと報告した *trnH-psbA* 領域および *trnL* intron 領域を増幅する 2 組の葉緑体ゲノムプライマーを用いた（表 1）。PCR 反応の条件は  $95^{\circ}\text{C}$  で 10 分間熱変性により DNA ポリメラーゼの活性化を行った後、熱変性を  $94^{\circ}\text{C}$  で 30 秒間、アニーリングを 1 分間、伸長反応を  $72^{\circ}\text{C}$  で 1 分間行なうサイクルを 40 回繰り返した。その後、 $72^{\circ}\text{C}$  で 7 分間の伸張反応を行った。PCR によって得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法により分離し、目的の DNA 断片を回収し、スピнкаラム法で DNA を精製した。この精製 DNA をシーケンスのテンプレートとして使用した。シーケンスは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で、前述の葉緑体ゲノムプライマーと Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, WI) を用いて、塩基配列を決定した。

分子系統解析は、MEGA4 を用いて行った（Tamura *et al.* 2007）。分子系統樹 Kimura (1980) の二変数法を用い、葉緑体ゲノムの塩基置換、欠失・挿入から、近隣結合 (NJ) 法 (Saitou and Nei 1987) によって系統樹を作成した。系統樹の信頼性はブートストラップ値 (10,000 反復) によって評価した。

表 1. 実験に用いた葉緑体ゲノムプライマー

領域	プライマー配列
<i>trnH</i> (GUG)	ACGGGAATTGAACCCGCGCA
<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG
<i>trnL</i> (UAA) intronF	CGAAATCGGTAGACGCTACG
<i>trnL</i> (UAA) intronR	GGGGATAGAGGGACTTGAAC

**結果および考察**

供試したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウの花柱性を表2に示す。日高で採取した個体は、すべてオオサクラソウであった。釧路、根室、北空知で採取した個体は、花茎や葉柄に縮れ毛が密生していたことから、すべてエゾオオサクラソウであった。日高で採取したオオサクラソウでは、短花柱花が37個体、長花柱花が23個体であった。釧路で採取したエゾオオサクラソウでは、短花柱花が67個体、長花柱花が51個体であった。根室で採取したエゾオオサクラソウでは、短花柱花が13個体、長花柱花が27個体であった。北空知で採取したエゾオオサクラソウの花柱性は、採取日が遅くなり、花の時期が終わっていたため確認することはできなかった。

*trnH-psbA* 領域の塩基配列の変異を表3に、*trnL intron* 領域の塩基配列の変異を表4に示す。2領域の塩基配列を決定して比較したところ、オオサクラソウとエゾオオサクラソウには六つのハプロタイプが存在することが明らかになった。葉緑体ゲノムの

2領域の塩基配列にもとづくハプロタイプの地理的分布を図1に示す。日高の個体はすべてハプロタイプFであった。釧路では、4集団がハプロタイプAであり、内陸側の2集団で、ハプロタイプAとハプロタイプBが1:3の割合で混在する集団と、1:2の割合で混在する集団が各1集団あった。また、根室ではすべての集団がハプロタイプAであった。北空知では、ハプロタイプC、D、Eが1:1:1の割合で混在する集団、ハプロタイプCとDが3:1の割合で混在する集団およびすべての個体がハプロタイプCである集団に分かれた。

オオサクラソウとエゾオオサクラソウの葉緑体ゲノム2領域の塩基配列変異から得られた遺伝距離を表5に示す。オオサクラソウのハプロタイプFとエゾオオサクラソウのハプロタイプA、B、C、D、E間の距離は最も遠く、それぞれ0.002522, 0.002558, 0.002642, 0.003789, 0.002639であった。次に、北空知に見られたハプロタイプDとハプロタイプA、B、C、E間が遠く、それぞれ0.001261, 0.001278, 0.001319, 0.001319であった。その他の

**表2.** 供試したオオサクラソウおよびエゾオオサクラソウの花柱性

所在	種名 (変種名)	集団数	個体数	花柱性 (個体数)	
				短花柱花	長花柱花
北空知	エゾオオサクラソウ	3	60	未確認	
日高	オオサクラソウ	3	60	37	23
釧路	エゾオオサクラソウ	6	118	67	51
根室	エゾオオサクラソウ	2	40	13	27

**表3.** *trnH-psbA* 領域の塩基配列の変異

	161-169	195-203	398-447
ハプロタイプA	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATGTAAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA
ハプロタイプB	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATGTAAATAAAAAACGACT-----ATAACTAATAA
ハプロタイプC	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATG-----TAA
ハプロタイプD	TTTAGTTCA	AATAGTAAG	TATGTAAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA
ハプロタイプE	TTTAGTTCA	AATATTAAG	TATG-----TAA
ハプロタイプF	TTTAATTCA	AATATTAAG	TATGTAAATAAAAAACGACTATAACTAATAAATAACTAATAA

表中の数字はタバコ葉緑体ゲノム上での位置を示す

**表4.** *trnL intron* 領域の塩基配列の変異

	49593-49630
ハプロタイプA	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプB	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプC	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAA-GAGA
ハプロタイプD	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAA-GAGA
ハプロタイプE	CGCATATGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAAAGAGA
ハプロタイプF	CGCATGTGTACTGAAATACTATATCATCAAAAATAAAATGTTTATTTTTTCTATAAAAAAAGAGA

表中の数字はタバコ葉緑体ゲノム上での位置を示す



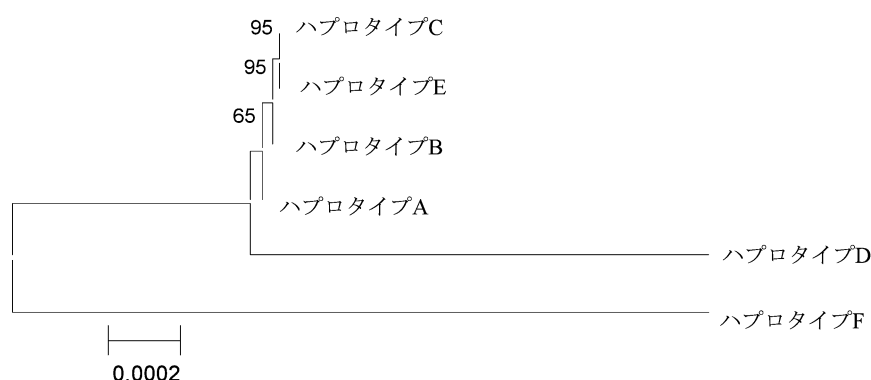


図 2. 2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプの近隣結合法により構築された系統樹。枝上の数字はブートストラップ値 (10,000 回) を表す。

二つの塩基置換と一つの挿入・欠失, *trnL* intron 領域では一つの塩基置換と一つの挿入・欠失が見出された。*trnH-psbA* 領域は, これまでに 816 種の植物で塩基配列の決定がされており, そのうち 641 種で特異的な配列が認められている (松木ら 2008)。また, *trnL* intron 領域は, カヤツリグサ科で多くの多型が検出されている (Senni *et al.* 2005)。平原ら (2007) が行った研究では, 10 種のカヤツリグサ科ビャッコイ属で 647 bp 中 109 bp もの変異が認められたと報告している。2 領域ともに種間や種内において多くの変異が認められ, 多くの研究に用いられている (Fujii 2003, Kondo *et al.* 2007)。しかし, Honjo *et al.* (2004) が行ったサクラソウの 2 領域の葉緑体ゲノムの塩基配列では, *trnH-psbA* 領域に三つの塩基置換と一つの挿入・欠失, *trnL* intron 領域においても三つの塩基置換と一つの挿入・欠失が見出され, 本研究の結果とそれほど差はなかった。本研究で見出された六つのハプロタイプは特異的な地域分布をしており, 北空知に三つ, 日高に一つ, 釧路と根室に二つのハプロタイプが存在した。Honjo *et al.* (2004) は 3 領域の葉緑体ゲノム領域の塩基配列から 35 個のハプロタイプを見出した。このことは, 本研究において同じハプロタイプであると判断された個体でも, さらに他の領域の塩基配列を比較することで異なるハプロタイプに位置づけられる可能性を示唆している。

一方, 2 領域の塩基配列にもとづく葉緑体ゲノムハプロタイプから構築された系統樹の結果から, オオサクラソウとエゾオオサクラソウが分岐していることが判明したが, 遺伝距離は 0.002522~0.003789 であった。Suyama *et al.* (1992) が解析したオオシラビソの 3 地域間の遺伝距離は 0.007~0.012 を示し, これと比較すると, オオサクラソウとエゾオオサクラソウの遺伝距離は非常に近いものであること

がわかった。しかし, 葉緑体ゲノムは突然変異率が低く, いくつかの植物では種内変異が見出されなかったという報告もあることから (Fujii *et al.* 1996), 本研究で行った 2 領域の葉緑体ゲノム解析の結果のみでは, 遺伝距離を過少に評価する可能性がある。オオサクラソウとエゾオオサクラソウのハプロタイプ間の遺伝距離は非常に近いものの, 両種のハプロタイプは特異的に地域分布しており, 環境に適応して遺伝子の分化も生じている可能性がある。今後は供試個体数や採取地域, 比較領域を増やし, これらの関係や分化を明確にする必要がある。一方, 本研究の結果, オオサクラソウやエゾオオサクラソウのハプロタイプは地域的に特異性を有することが明らかになった。このことから, 保全や復元のためでも地域間で個体を移動する場合, 慎重に検討を行う必要性が示唆された。

#### 引用文献

- Amoatey, H.M. and R.A.E. Tilney-Bassett (1994) A test of the complementary gene model for the control of biparental plastid inheritance in Zonal pelargoniums. *Heredity* 72: 89-77.
- Fujii, N., K.Ueda and T.Shimizu (1996) Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in Japanese alpine plants. *Journal of Phytogeography and Taxon* 44: 72-81.
- Fujii, N. (2003) Chloroplast DNA Phylogeography of *Pedicularis resupinata* (Scrophulariaceae) in Japan. *Acta phytotaxonomica et geobotanica* 54: 163-175.
- 平原友紀・矢野興一・星野卓二 (2007) 絶滅危惧種ビャッコイ (*Isolepis crassiuscula* Hook. f.) の染色体と葉緑体遺伝子の分析. *Bunrui* 7: 23-30.
- 北海道 (2001) "北海道の希少野生生物 北海道レッ

- ドデータブック”, 北海道環境生活部環境室自然環境課, 北海道. 134-135.
- 本城正憲・大澤良・鷺谷いづみ (2002) 岩手大学滝沢演習林におけるサクラソウ個体群の現状とその保全に向けて. 岩手大学農学部 演習林報告 33: 61-64.
- Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Hsawa (2004) Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological Conservation* 120: 211-220.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kondo, K., M. Shiba, H. Yamaji, T. Morita, C. Zhengmin, P. Huixia and Y. Shoyama (2007) Species Identification of Licorice Using nrDNA and cpDNA Genetic Markers. *Biological & pharmaceutical bulletin* 30: 1497-1502.
- 丸井英幹・鷺谷いづみ (1993) 霞ヶ浦におけるアサザの異型花柱性と種子繁殖. *種生物学研究* 17: 59-63.
- 松田裕之 (2002) 野生生物を救う科学的思考とは何か?, “「保全と復元の生物学」野生生物を救う科学的思考”, 種生物学会編, 文一総合出版, 東京. 19-36.
- 松木史弓・阿部聖哉・島野光司・竹内亭・梨本真 (2008) 植物 *rbcL* 遺伝子データベースの構築と植食性動物の食性解析への適用. *日本生態学会誌* 58: 105-112.
- Newton, A.C., T.R. Allnutt, A.C.M. Gillies, A.J. Lowe and R.A. Ennos (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 140-145.
- Okuhara, T. and K. Harada (2002) Phylogeographical structure revealed by chloroplast DNA variation in Japanese beech (*Fagus crenata* Blume). *Heredity* 88: 193-208.
- 佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・亘理俊次・富成忠夫 (1981) サクラソウ属. “日本の野生植物 草本III 合弁花類”, 平凡社, 東京. 21-23.
- Senni, K., N. Fujii, H. Takahashi, T. Sugawara and M. Wakabayashi (2005) Intraspecific chloroplast DNA variations of the alpine plants in Japan. *Acta phytotaxonomica et geobotanica* 56: 265-275.
- Suyama, Y., Y. Tsumura and K. Ohba (1992) Inheritance of Isozyme Variants and Allozyme Diversity of *Abies mariesii* in Three Isolated Natural Forests. *Japanese Forestry Society* 72: 65-73.
- 高橋進 (2004) 国際環境政策としての生物多様性概念の変遷, 共栄大学研究論集 3: 81-105.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumer (2007) *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- 津村義彦 (2001) プロローグ: 遺伝的多様性研究ガイド, “森の分子生態学”, 種生物学会編, 文一総合出版, 東京. 158-169.
- 上杉龍士・西廣淳・鷺谷いづみ (2009) 日本における絶滅危惧水生植物アサザの個体群の現状と遺伝的多様性. *保全生態学* 14: 13-24.
- Washitani, I. and H. Kabaya (1988) Germination responses to temperature responsible for the seedling emergence seasonability of *Primula sieboldii* E. Morren in its natural habitat. *Ecological Research* 3: 9-20.
- Washitani, I., H. Namai, R. Osawa and M. Niwa (1991) Species biology of *Primula sieboldii* for the conservation of its lowland-habitat population: I. Inter-clonal variations in the flowering phenology, pollen load and female fertility components. *Plant Species Biology* 6: 27-37.
- Washitani, I., R. Osawa, H. Namai and, M. Niwa (1994) Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology* 82: 571-579.
- Washitani, I., M. Kato, J. Nishihiro and K. Suzuki (1995) Importance of queen bumble bees as pollinators facilitating inter-morph crossing in *Primula sieboldii*. *Plant Species Biology* 9: 169-176.
- 鷺谷いづみ・矢原徹一 (1996) 種の機能と指標性, “保全生態学入門—遺伝子から景観まで—”, 文一総合出版, 東京. 63-71.
- 鷺谷いづみ (1999) 生物多様性保全のための管理と計画 “生態保全の生態学”, 共立出版, 東京,

122-161.  
鷺谷いづみ・大串隆之 (2006) サクラソウをめぐる  
生物間相互作用, “サクラソウの分子遺伝生態学  
—エコゲノム・プロジェクトの黎明”, 鷺谷いづ  
み編, 東京大学出版会, 東京, 84-96.

### 要 約

北海道に自生しているオオサクラソウの2変種は、北海道のレッドデータブックには希少種として記載されている(北海道2001)。本研究では、北海道で採取したオオサクラソウの2変種の葉緑体ゲノムを調査し、野生集団が保有する遺伝的多様性とその地理的分布の把握を試みた。

その結果、オオサクラソウでは一つのハプロタイプであったのに対し、エゾオオサクラソウには五つのハプロタイプが見られた。特にエゾオオサクラソウで見られた五つのハプロタイプの出現頻度には、採取した集団と地域間に違いが認められた。すなわち、北空知で採取したエゾオオサクラソウにはハプロタイプC, D, Eが1:1:1の割合で混在する集団と、ハプロタイプC, Dが3:1の割合で混在する集団と、すべての個体がハプロタイプCの集団が、

それぞれ1集団ずつあった。日高で採取したオオサクラソウはすべてハプロタイプFであった。また、釧路で採取したエゾオオサクラソウはハプロタイプAが4集団、ハプロタイプAとハプロタイプBが1:2の割合で混在する集団と1:3の割合で混在する集団がそれぞれ1集団ずつあった。根室ではすべての個体がハプロタイプAであった。本研究で明らかにした六つのハプロタイプを近隣結合法により分子系統樹を作成した。その結果、はじめに、ハプロタイプA, B, C, D, EのグループからハプロタイプFが分化し、次にハプロタイプDとハプロタイプA, B, C, Eの分化が起こり、その後、ハプロタイプAからハプロタイプBが分化し、さらにハプロタイプAからハプロタイプC, Eが分化したものと考えられた。

### 謝 辞

調査に際し、ご協力、ご助言して頂きました霧多布湿原センターの河原淳氏、高井文子女史に心より深く感謝いたします。なお、本研究の一部は平成20, 21年度、霧多布湿原学術研究助成をうけて実施いたしました。

### Summary

Two varieties of *Primula jesoana* inhabiting Hokkaido are described as rare species in Hokkaido in the Red Data Book of Hokkaido (Hokkaido 2001). The variation of chloroplast DNA (cpDNA) in the two varieties of *Primula jesoana* collected in Hokkaido were examined focusing on the relation between gene phylogeny and geographic distribution of the habitats in this study.

In *Primula jesoana* Miq. var. *jesoana* only one haplotype of cpDNA was found and in *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* five haplotypes of cpDNA, whose types varied with the collected population and the locality were found. *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* in Kita-sorachi district were classified into three groups according to the combination of the haplotypes: one had three haplotypes, C, D and E at a ratio of 1:1:1, one had two haplotypes C and D at a ratio of 3:1 and one had only one haplotype C. *Primula jesoana* Miq. var. *jesoana* collected in Hidaka had only one haplotype named F in this study. *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* collected in Kushiro consisted of four populations having only one haplotype A, one populations having two haplotypes A and B at a ratio of 1:2 and one population having two haplotypes were A and B at a ratio of 1:3. Only one haplotype A was found in *Primula jesoana* Miq. var. *pubescens* collected in Nemuro.

The results of neighbor joining analysis of the six cpDNA haplotypes (A, B, C, D, E, F) of *Primula jesoana* found in this study showed that F was specialized first, and then D was differentiated from A, B, C and E. After this, B differentiated from A and then C and E differentiated from A.