

ボタンにおける DNA マーカーの活用に関する研究

Study on the Application of DNA Markers in Tree Peony Cultivars

持田 耕平

2023

ボタンにおける DNA マーカーの活用に関する研究

Study on the Application of DNA Markers in Tree Peony Cultivars

緒言	1
第 1 章 ボタンの品種発達史と島根県におけるボタン生産	6
第 1 節 ボタンの原種および品種発達と各品種群の特徴	6
第 2 節 島根県におけるボタン栽培の現状	19
第 2 章 RAPD マーカーを用いた実用的な品種識別法の確立	27
第 1 節 RAPD 解析による品種識別	27
第 2 節 開発した RAPD マーカーの実用性の検討	42
第 3 章 品種発達に関与する種間・亜属間雑種識別マーカーの開発	48
第 1 節 RAPD マーカーデータを用いた系統解析	49
第 2 節 品種群特異的 STS マーカーの解析	56
総合考察	68
摘要	76
引用文献	81
Summary	88
学会誌公表リスト	94
謝辞	95
別表	97

緒言

「立てば芍薬，座れば牡丹」や「百花の王」とうたわれるボタンは，花が大きく，花型と花色のバリエーションが非常に豊富なことから，富貴，吉祥，幸福のシンボルとして，昔から親しまれている（劉，2003）．観賞上利用されるボタン（Tree peony, *Paeonia suffruticosa* Andr.）は中国起源のボタン科（*Paeoniaceae*）ボタン属（*Paeonia*）の落葉性低木である．中国では古来より根皮が漢方薬の材料として利用され，その後美しい花の観賞価値にも着目されるようになった．ボタンは薬用や観賞用として中国から世界に輸出され，現在では30か国以上で栽培されている．2000年近い栽培の歴史のなかで中国を中心に多数の品種が生まれ，世界中に1500~2000品種が存在すると言われている（Cheng, 2007; Zhangら, 2012; Zhaoら, 2019）．

中国では唐の時代（618-906）にボタンの観賞が宮中から民衆に広がり，長安（現在の陝西省西安）で盛んに栽培された．その後各地域で観賞用ボタンの栽培が盛んになり，実生からの花の選抜も行われた．10世紀から13世紀に育成された古い品種が現在も残っている．中国名の

牡丹の読み *Mudan* が日本では「ぼたん」や「ほうたん」に、西洋では「*Moutan*」と翻訳された（宮澤，1940；Hosokura，1997a；Cheng，2007；細木，2016）。英名の「*Tree Peony*」はギリシャ神話の医薬を司る神 *Paeon* または美しい妖精 *Paeonia* が由来とされる。

ボタンの日本への伝来は薬用と観賞用のどちらが先に導入されたかは定かではないが、観賞用のボタンは平安時代（794-1192）には既に栽培されていたと考えられる（橋田，1983）。観賞用ボタンの栽培は江戸時代には庶民に広がり、明治・大正時代に生産が盛んになった（橋田，1990）。戦後になると島根県の大根島（松江市八束町）が日本のボタン生産の中心になった（しまねの園芸研究，2019）。

日本への導入以降，1000年を超えるボタン栽培の歴史のなかで観賞性に関する選抜が行われ，花が巨大化し，花弁数や花弁色の濃淡の多様性が増加した。しかし，時代による花容の大きな変化はなく，江戸時代に育成された品種が現在でも一般的な品種として栽培されている。選抜育種と交雑育種がボタン属において最も一般的な育種手法であり（Yangら，2020），既存の品種をベースにした交配が繰り返されていることで目新しい新花の育成

はほとんどない。そのようなボタン育種の状況において、1880年代にそれまでのボタンとは花色が異なる黄色（*P. lutea*）や濃紫～暗赤色（*P. delavayi*）の2種類の原種が発見され、それらを交配材料に利用した種間交雑によりフランスやアメリカ合衆国で新品種が育成された。また1950年ごろにはシャクヤクを用いた亜属間交雑によりシャクヤクとボタンの雑種が育成された。これらの種間雑種、亜属間雑種はそれまでにない画期的な新しい花色や花容を示すため人気が高い。ボタンの育種において、これまでに育成された品種の系譜が分かることで今後の育種の交配親選定や交配組み合わせ検討に利用でき、育種の効率化が期待される。

一方、日本のボタンの生産現場では産地間の交流による新規品種の導入や多数の育種家による新品種育成により、形態的特徴あるいは名称が類似した品種が多く、しばしば品種の混同が起こる。品種の混同や取り違えは産地の信頼に関わる大きな問題であるため、品種管理が重要な課題となっている。現在ではDNAを用いた解析が一般的であり、DNAマーカーを用いたボタン属の類縁関係の解析および品種や雑種の識別には Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）（Hosokiら，1997a）、Simple

Sequence Repeat (SSR) (Zhang ら, 2012), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) (Suo ら, 2005) や Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) (Han ら, 2008; Hao ら, 2008) の有効性が報告されている (持田ら, 2020). しかし, DNA マーカーを用いて多数のボタン品種を簡便にかつ網羅的に鑑定する手法は確立されていないことから, ボタンの品種管理に利用可能な DNA マーカーの開発が求められていた. また, ボタンの品種発達に関与した原種やシャクヤクとの交雑を識別する DNA マーカーができれば, 革新的な育種背景を裏付けることが可能となり, さらには今後のボタン育種における有力なツールとなりうる.

本研究では, DNA マーカーを用いた品種管理の向上に向けた新しい品種鑑定方法の確立および品種発達の歴史を紐解く DNA マーカーの作成について取り組むことで, 生産現場の抱える品種管理の課題や育種における問題点の解決を目指した. 本論文の構成と各章の概要を以下に示す.

第 1 章ではボタンの品種発達の歴史と各品種群の特徴および栽培の現状について概説し, 生産や育種における課題を提起した.

第 2 章ではボタンにおける DNA マーカーの利用を検討し，実用的な品種識別法を確立した．また，実際の利用現場における開発 DNA マーカーの実用性についても評価した（持田ら，2020）．

第 3 章では DNA マーカーデータをもとに *P. lutea* や *P. delavayi* との種間雑種やシャクヤクとの亜属間雑種を識別する DNA マーカーの開発を行い，品種群の分類に適用した（Mochida ら，2022）．

第 1 章

ポタンの品種発達史と島根県におけるポタン生産

本章では様々な原種を利用して発達してきたポタンの品種発達史と世界各国で生まれた品種群の特徴をとりまとめた。また、国内最大の生産地である島根県における生産の現状について概説し、生産や育種における課題を提起した。

第 1 節

ポタンの原種および品種発達と各品種群の特徴

近年の分子遺伝学研究によると、日本や中国ポタンの園芸品種は今まで考えられていたような 1 原種由来ではなく数種の原種が関与して成立したと考えられている。この原種グループとは別に欧米ポタンの品種成立に関与した原種グループや、園芸化されていない原種などがある (Zhou ら, 2014)。ここでは本論文に関わる原種と、複数の原種が関与し複雑な品種群を構成しているポタンの品種発達史と各品種群の特徴について、形態的分類(細

木，2009）と分子分類（Cheng，2007；Xueら，2021）に基づき整理した．

1. 原種の種類

ボタン属（*Paeonia*）は分類学的に木本性のボタン（*Moutan* 節）と草本性のシャクヤク（*Onaepia* 節，*Paeon* 節）に大別される．シャクヤクの *Onaepia* 節は北アメリカに分布するグループで構成され，*Paeon* 節はヨーロッパを起源とする *P. officinalis* と中国を起源とする *P. lactiflora* Pall.を含むグループで構成される．ボタンとシャクヤクの最も大きな違いは，ボタンは冬芽が地上部の木質化した枝に形成されるのに対して，シャクヤクは冬芽が地下茎に形成されることである．ボタンはさらに2つの亜節：*Delavayanae* と *Vaginatae* で構成される（Stern，1943；Cheng，2007；Zhao，2008；Xueら，2021）．ボタン原種の分類は，新たな原種が発見される度に議論されてきたが（Yangら，2020），近年はDNAマーカーを用いた原種と品種間の系統関係の詳細な解析により，新たな分類が提案されている．最近ではXueらが原種の分類について以下のような2つの亜節に9種類の原種が存在すると報告している（Xueら，2021）．

Delavayanae 亜節

- *P. delavayi* Franch.
- *P. lutea* Delav. Ex Franch.
- *P. potaninii* Kom.
- *P. ludlowii* (Stern & G. Taylor) D. Y. Hong

Vaginatae 亜節

- *P. spontanea* Rehd.
- *P. qiui* Y. L. Pei et Hong
- *P. ostii* T. Hong et J.X. Zhang
- *P. rockii* (Haw et Lauener) Hong et Li subsp. *rockii*
- *P. decomposita* Hand.-Mazz.

これらの原種のなかで本研究に関連する原種は以下の2種類であり，それぞれの特徴を示す．

- (1) *P. lutea* Delav. Ex Franch. または *P. delavayi* var. *lutea* (Franch.) Finet. & Gagnep.

花色が黄色で当年枝に複数の花が垂れて咲く．形態は *P. delavayi* に似ており，遺伝的にも非常に近い．がく下に8～12枚の総包がある点で *P. delavayi* と異なる．1883

年にフランスの神父 P. Delavay により発見された。分布は雲南省，四川省南部，チベット南部である（第 1-1-1 図，下段中央）。

(2) *P. delavayi* Franch.

花色は濃紫～暗赤色（栗色）で，当年枝に数輪の花が咲き，花首が垂れる。1884年に Delavay（前出）が中国雲南省で発見した。分布は同省の西北部，四川省南部およびチベット南東部の 2300～3700m の山岳地で日当たりの良い傾斜地および草原である（第 1-1-1 図，下段左）。



第1-1-1図 ボタン原種（Xueら，2021）

○ *P. suffruticosa* Andr.

日本や中国ボタンの園芸品種の成立は，これまで *P. suffruticosa* の 1 原種由来と考えられてきたが，近年の DNA マーカーによる解析により，現在は *Vaginatae* 亜節の原種が複数関与してできたと考えるのが一般的である (Cheng, 2007; Zhou ら, 2014). そのため本論文では，*P. suffruticosa* を原種ではなく栽培ボタンとして日本や中国の栽培品種全体を示す学名として用いた.

2. 品種群とその特徴

ボタンの園芸品種は，形態的特徴や育成地の地理的な分類により 4 つのグループ；中国品種群，日本品種群，フランス品種群およびアメリカ品種群に大別される (劉, 2003; Wang ら, 2014). これらの品種群の特徴を以下に概説する.

(1) 中国ボタン品種群

P. suffruticosa Andr.

中国では薬用として数千年の歴史があるが，5 世紀に薬用のものから観賞用のボタンが育成されたと考えられる (Hosoki ら, 1997b). 中国ボタンの形態的特徴として一重咲きから万重咲きまであり，花卉数は多いものでは

200枚以上になる（第1-1-2図）。花型は日本ボタンにはない盛り上がり咲きが中国ボタン独特の咲き方である。花色は現代では紅，白，桃，黄，紫，藍，緑，黒と複色の9大色系がある。花弁数が多い盛り上がり咲きでは自重で花が垂れ下がる（Hosokiら，1991）。中国ボタンと原種との関係性について，葉緑体と核の遺伝子の分析により，中国ボタンの成立には *Vaginatae* 亜節の複数の原種が関与した可能性を示唆されている（Zhouら，2014）。中国ボタンは地理的分布からさらに4つのグループに分類される（Cheng，2007）が，本論文では中国ボタンを一つの品種群として扱った。



第1-1-2図 中国ボタン品種‘玉楼春’（左）と‘緑胡蝶’（右）

(2) 日本ボタン品種群

P. suffruticosa Andr.

ボタンの日本への伝来は薬用として奈良時代または平安時代に導入されたと考えられるが定かではない。日本においてボタンは室町時代から桃山時代にかけて寺院や庭園に多く植えられ、これを描いた襖絵や屏風画が多く残されている（細木，2009）。江戸期の生産は大阪府の池田市や兵庫県宝塚市が中心であったが，明治期になると新潟県の新潟市や五泉市で生産が盛んになった。戦後になると池田や宝塚の生産は連作障害などで衰退し，昭和40年ごろから島根県の大根島の生産量が日本一となった（細木，2016）。



第1-1-3図 大輪系日本ボタン品種‘天衣’（左）と‘島大臣’（右）

日本品種群と中国品種群は *P. suffruticosa* の種内変異を利用して成立したとされ，ルーツが同じであるにもかかわらず育成方針が異なることで品種群として分離したと考えられる．花弁数が多いことを重視する中国の育成方針に対して，日本では中国からのボタンの導入以降，大きな花容，花の大きさ，横への広がりをも重視した独自の育種方針で育成されてきた結果，上向きで花の直径が大きい品種群となった．そのなかで花の直径が 30～40 cm にもなる巨大輪の品種も育成された（劉，2003；第 1-1-3 図）．

(3) フランスボタン品種群

P. lutea × *P. suffruticosa*



第1-1-4図 フランスボタン品種‘金晃’（左）と‘金鷄’（右）

20世紀の前半にフランスの E. Lemoine や L. Henry により, *P. lutea* と中国ボタンや日本ボタンが交雑されてフランスボタンが作出された。いずれの品種も *P. lutea* の黄色色素カルコンを受け継いでおり, 日本や中国ボタンにはない鮮やかな黄色を示す (Hosoki ら, 1991)。日本に導入された, ‘Alice Harding’ は ‘金晃’, ‘L. Esperance’ は ‘金帝’, ‘Souvenir de Maxime Cornu’ は ‘金閣’, ‘Chromatella’ は ‘金鵝’ と和名がつけられて普及した (第 1-1-4 図)。

(4) アメリカボタン品種群

(*P. lutea* または *P. delavayi*) × *P. suffruticosa*



第1-1-5図 アメリカボタン品種 ‘ハイヌーン’ (左)
と ‘チャイニーズドラゴン’ (右)

20世紀中頃にアメリカ合衆国の A. P. Saunders (1869-1953) が暗赤色花の *P. delavayi* と日本ボタンを交雑してアメリカボタンの赤色系品種を作出した。また, Saunders は同時期に黄色花の *P. lutea* と日本ボタンを交雑して多くのアメリカボタンの黄色系品種を作出した。これらのほとんどの品種が *P. lutea* と *P. delavayi* からカルコンを受け継いでおり, 日本や中国ボタンにはない鮮やかな黄色や黄色色素と混合したオレンジや栗色等のユニークな花色を呈す (Hosoki ら, 1991; 第 1-1-5 図)。

ボタン品種群は以上の 4 つの他に, 品種群間のハイブリッドやシャクヤクとボタンの雑種グループがある。それらの特徴を以下に示す。

(5) ダフニスハイブリッド

$\{ (P. lutea \text{ または } P. delavayi) \times P. suffruticosa \} \times P. suffruticosa$

Saunders の業績を引き継いだ N. Daphnis が育成した雑種品種群を示す。フランスやアメリカ品種はその希少な花色で人気があるが, 花が小さく花首が垂れる欠点があった。そのため, Daphnis は花を上向きで保持する強い茎

をもつ日本ボタンをアメリカボタンに戻し交雑するなどして，上向きで様々な花色をもつダフニスハイブリッドと呼ばれる雑種品種群を育成した（細木，2009；Haoら，2013）．これらは花首が立ち，剛直で，フランスやアメリカ品種群の欠点を補う優れた形質を持つ．島根県の大根島で育成，2003年に品種登録された‘黄冠’はアメリカボタン‘ハイヌーン’に日本ボタンを交配したダフニスハイブリッドタイプの人気品種である（第1-1-6図）．



第1-1-6図 ダフニスハイブリッド‘黄冠’

(6)伊藤ハイブリッド

P. lactiflora × (*P. lutea* × *P. suffruticosa*)

東京都の植木屋伊藤東一(1895-1955)によって育成されたシャクヤクとボタンの亜属間雑種品種群であり、育成者に敬意を表してこの亜属間雑種を伊藤ハイブリッドと呼ぶ。1948年にシャクヤク‘花香殿’×フランスボタン‘金晃’の交配で実生を得て、そこから10年の歳月を経て氏の没後1954年に開花したものをL. Smirnovがアメリカ合衆国に持ち帰り‘オリエンタルゴールド’として発表した。種子の得にくい遠縁交雑において*P. lutea*を橋渡し役にした同様の交配方法により複数の亜属間雑種品種が育成された。これらはいずれもシャクヤクとボ



第1-1-7図 伊藤ハイブリッド‘オリエンタルゴールド’

タンの中間の開花時期であり，冬季には木本性のボタンと草本性のシャクヤクの中間的な性質を示し，地際部に芽をつける．これまで草本性のシャクヤクと木本性のボタンの雑種は種間雑種と表現されてきたが，近年，亜属間雑種と修正された（Zhouら，2020；Hong，2021）ため，本論文においても亜属間雑種として扱った．

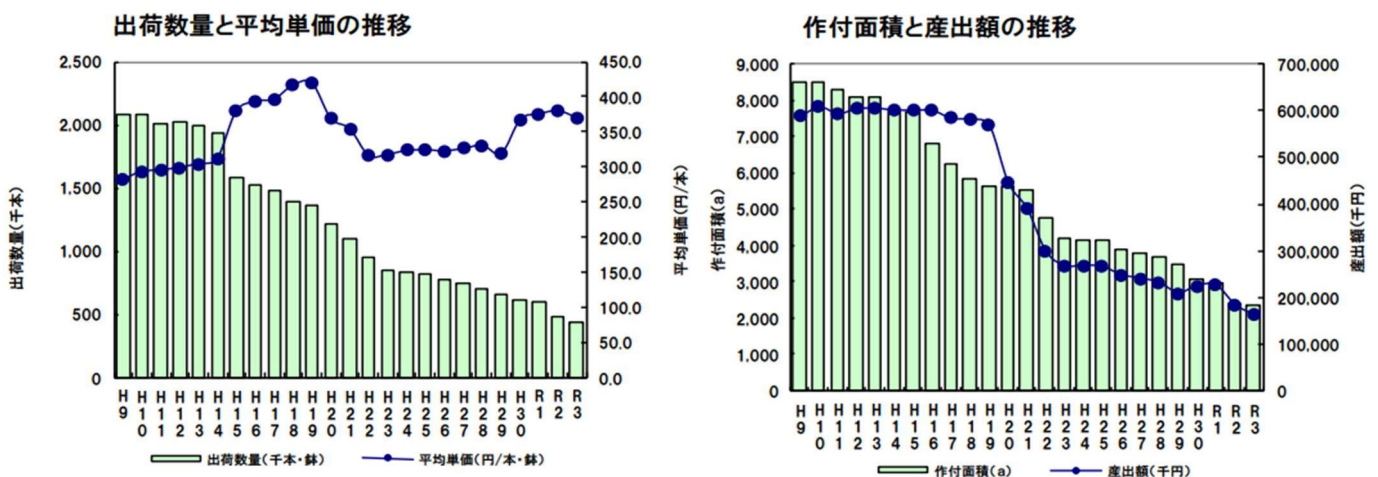
欧米のボタンは20世紀半ばに黄色花の *P. lutea* や暗赤色花の *P. delavayi* に中国や日本品種が交雑されて成立し，それまでのボタンにはなかったオレンジ色などの新たな花色が加わった（細木，2009）．フランスやアメリカボタンのような新たに発見された原種からの黄色色素導入やシャクヤクとの亜属間交雑は，ボタンの花色や品種の多様性を増大させ，目覚ましい品種発達を遂げた．本研究ではボタンにおける革新的な品種発達をもたらした原種との種間交雑やシャクヤクとの亜属間交雑に着目して品種発達との関連性について調査を行った．

第2節 島根県におけるボタン栽培の現状

日本におけるボタンの生産は江戸時代に現在の大阪府や兵庫県で始まり，その後，新潟県と島根県に主産地を移していった．歴史的な生産地である大阪府池田市や兵庫県宝塚市は戦後には連作障害などにより次第に衰退し，今ではボタンの商業生産はなくなった．本節では著者の出身地ならびに勤務地である島根県のボタン生産の現状を総括し，本論文に関わる課題を提起した．

1. 栽培状況（具体的データ）

島根県の県花であるボタンは2021年（令和3年）の調査では，作付面積が約24haで，県主要花き品目のなかで

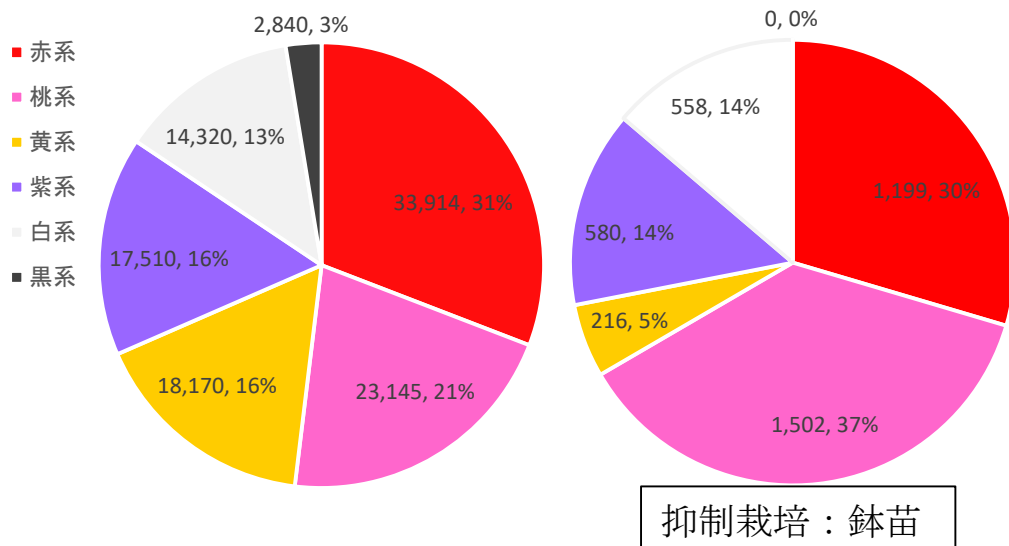


第1-2-1図 島根県におけるボタン生産状況(H9:1997～R3:2021)
 (島根県農林水産部産地支援課，2022)

70.5%の作付面積割合を占めていた。また、産出額は約1億6千万円であり、県主要花き品目のなかで33.7%の産出額割合であった（島根県令和3年産花き生産状況調査）。島根県のボタン苗出荷数量は1980年代前半に急増して横ばいとなった後、徐々に減少しているが、ピーク時には200万本以上の生産があった（鄭，1993）。2020年は年間約50万本のボタン苗の生産があり、その内訳は苗木が40万3千本、鉢物7万7千本、切り花2千本であった。ボタンは県の主要花き品目であるものの、生産者の高齢化や後継者不足、円高や景気低迷により2003年（平成15年）以降急激に出荷数量が減少している。また近年は生産者の高齢化による作付けの減少と2019年（令和元年）からの新型コロナウイルス感染症の影響による販売機会の喪失により作付面積や出荷量が大幅に減少した（第1-2-1図）。

2. 色別販売数量

日本でのボタン販売流通における花色の分類は概ね 6 系統であり，2021 年産のボタン苗における色別の販売数量をみると，多い方から順に赤系，桃系，黄系，紫系，白系，黒系であった．鉢苗を冷蔵し，一年を通して開花させることが可能な抑制栽培では退色の少ない桃系が多くなり，黒系の取り扱いはなかった（第 1-2-2 図）．



第1-2-2図 2021年(令和3年)産色別ボタン苗委託販売数量
(JAしまねくにびき地区本部八束支所，2022)

3. 品種

ボタンではかつては赤花や白花などの花色による販売が行われてきたが、最近ではインターネットなどによる詳細な園芸情報の取得により、品種名を指定した流通が主流である。2021年産の全体の流通量のうちボタン苗共販出荷における品種別の販売数量は赤系の‘新日月’を筆頭に黄系のダフニスハイブリッド‘黄冠’、紫系の‘島大臣’、黄系のアメリカボタン‘ハイヌーン’が続いた（第1-2-1表）。黄系を除き、いずれも日本ボタンに属す。各色系統で取り扱われている品種数は、桃系30品種、赤系20品種、白系19品種、紫系13品種、黒系7品種、黄系5品種であった（JAしまねくにびき地区本部八束支所）。

第1-2-1表 2021年(令和3年)産品種別ボタン苗販売数量上位10品種
(JAしまねくにびき地区本部八束支所)

品種	色系統	販売数量 (本)
新日月	赤系	8,030
黄冠	黄系	7,880
島大臣	紫系	7,030
ハイヌーン	黄系	4,940
島の藤	紫系	4,230
八千代椿	桃系	3,850
島錦	赤系	3,800
大喜紅	赤系	3,690
五大州	白系	3,550
紫晃	紫系	2,550

4. 海外への輸出

島根県で生産されるボタン苗は国内流通が主流であるが、海外への輸出も積極的に行っている。1955年（昭和30年代）頃から始まったボタン苗木の輸出は出荷量のおよそ30~40%を占め、最盛期である2004年（平成16年）には59万本の接ぎ木一年生苗がアメリカ合衆国、オランダ、ロシアや台湾へ輸出され、その品質や花容の多様性は評価も高い（私信）。海外への流通は現在も継続されており、2021年産は計約86,000本が輸出された（第1-2-2表）。

第1-2-2表 ボタン苗の海外輸出実績（JAしまねくにびき地区本部八束支所）

年次	本数(本)							計
	アメリカ	カナダ	オランダ	イタリア	ドイツ	ロシア	台湾	
2016	39,140	22,601	117,890	0	2,475	— ²	1,820	183,926
2017	28,650	22,500	136,380	640	2,805	—	1,200	192,175
2018	33,205	20,600	90,780	645	1,835	2,275	1,400	150,740
2019	22,600	14,733	83,335	3,320	2,950	0	1,520	128,458
2020	20,800	8,600	68,105	0	1,905	0	720	100,130
2021	20,425	9,800	55,080	0	460	500	600	86,865

² 調査なし

5. 育種

ボタンは毎年新品種が発表されて品種数は増加しており，日本に現存するボタン品種は500以上とされる．そのなかには国外で育成され，日本へ導入された中国，フランスやアメリカ品種が含まれる．日本で育成された品種のほとんどは，*P. suffruticosa*の同一種内の交雑で得られた実生からの選抜によって育成されており，‘黄冠’のような異種間の交雑品種は稀である．そこには種間交雑ではほとんど種子が得られないボタンの種間交雑の難しさが起因している．そのため一部の育種家を除き，限られた遺伝資源を用いて品種育成が行われてきたことで，種間雑種や亜属間雑種を除いて目新しい品種がないのが現状である．

6. 品種整理を目的とした『牡丹名鑑』の発刊

数多あるボタン品種は生産者が各自で保有する母樹園のほか，植物園，公園，神社や寺院などの品種園で維持されているが，形態的特徴あるいは名称が類似した品種が多く，しばしば品種の混同が起こる．また，多数の品種を保有するボタン園などではラベルの脱落や破損により品種名が不明となった個体の鑑定に苦慮している．

このような状況を打開するべく松江大根島牡丹協議会を中心としたボタンプロジェクトは、ボタン品種の整理や保存・普及を目的に『牡丹名鑑』（松江大根島牡丹協議会，2015）を作成した。本名鑑中には日本ボタンおよび中国ボタン，フランスボタン，アメリカボタンやシャクヤクとボタンの交雑種などの各品種群から353品種が記載されており，これらの品種情報により形態的特徴に基づく品種管理が改善された。しかし形態的特徴が似た品種の識別や，流通段階における形態的特徴の差異が乏しい素掘り苗の品種識別など，品種識別が困難な事例があり，新たな品種識別方法の確立が求められてきた（持田ら，2020）。

以上のように，ボタンは中国を原産とする原種との遠縁交雑を利用して新しい品種群を形成し，発展してきた。世界各国で育成され，成立した品種群は現在では産地間の交流があり，日本においては各品種群が生産されている。このような状況のなか，生産現場では多数の品種が混在することで起こる品種の混同や類似品種の品種鑑定の課題であることが判明した。また，育種においてはこれまでになく特徴を持つ品種を育成するため，各品種群

の類縁関係や系譜を把握した上で，種間雑種や亜属間雑種に由来する多様な新品種の育成を進める必要がある．

第 2 章

RAPD マーカーを用いた実用的な品種識別法の確立

ボタンの生産現場における品種管理は，形態的特徴が詳細に示された『牡丹名鑑』（2015）により改善された。しかし，依然として形態的特徴だけでは品種識別が困難な事例があり，新たな品種識別方法の確立が求められていた。

そこで，本章ではボタン品種の識別方法を確立するため，第 1 節では『牡丹名鑑』掲載品種について DNA マーカーによる品種識別を試みた。また，第 2 節では開発した RAPD マーカーの実用性を検討した。

第 1 節 RAPD 解析による品種識別

ボタン品種における形態的特徴に頼らない新しい識別方法を確立するため，日本における現存品種の大半を網羅する『牡丹名鑑』掲載品種について RAPD 法を用いた品種識別を試みた。また，作成したマーカーの有効性を確認するため，本研究で得られた多型を用いて供試品種

に含まれる枝変わり品種や類似品種の関係性を検証した。

材料および方法

1. 植物材料と DNA 抽出

植物材料として、『牡丹名鑑』に掲載されている 353 品種（第 2-1-1 表）を供試した。品種群の分類は『牡丹名鑑』や 1 章で述べた細木（2009）に従い、一部来歴の不明確な品種は来歴不詳とした。DNA 抽出には大根島で栽培され、『牡丹名鑑』作成時において、品種の特徴を記述する際の調査個体もしくは形態的特徴により品種確認され、各品種園に保存されている個体を用いた。DNA 抽出は、2011～2017 年に各品種の芽鱗片を取り除いた越冬芽を用いて行った。全 DNA を CTAB miniprep 法を改変した杉山（2004）の方法により抽出し、TE バッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0）に溶解した。抽出した全 DNA について濃度を $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ に調整後、 -30°C で保存しそれぞれ試験に供試した。

2. RAPD マーカー解析

各品種の全 DNA をテンプレートとして RAPD マーカーによる品種識別を行った。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal cycler Dice TP600 (タカラバイオ (株)) を使い、最初に 94℃ で 3 分の熱変性を行った後、94℃ で 45 秒の熱変性、42℃ で 1 分のアニーリングと 72℃ で 1 分の伸長反応を 45 サイクル行った。反応を 10 μ L の系で行い、その組成は、10 mM Tris-HCl (pH8.3)、2.5 mM MgCl₂、50 ng DNA、0.2 mM dNTPs、0.5 μ M プライマーおよび 0.5 unit rTaq DNA ポリメラーゼ (東洋紡 (株)) とした。得られた増幅産物について、0.25 μ g \cdot mL⁻¹ のエチジウムブロマイドを添加した 2% アガロースゲルを使い、TAE バッファー中で 100 V、30~45 分間の電気泳動を行った。泳動終了後、UV 照射下で増幅バンドを検出した。はじめに、各品種群を含む 48 品種を供試し、10 塩基のランダムプライマー 58 種類 (オペロンバイオテクノロジー (株)、現ユーロフィンジェノミクス (株)) を用いたプライマー選定を行った。バンドが不明瞭な一部のプライマーには 1~3 塩基を付加し、計 178 種類のプライマーを用いて PCR を試行した。最終的に明瞭な増幅バンドが得られた 29 種類のプライマーに絞り込み、分析に用いた (第 2-1-

2 表)。RAPD バンドの再現性は解析を 2 回以上反復することで確認した。得られた多型により品種間の識別可否を判断した。

結果

1. RAPD 解析による『牡丹名鑑』掲載品種の品種識別

使用したランダムプライマー 178 種類のうち、29 種類のプライマーからボタン品種間で多型を示す明瞭な増幅バンドが合計 48 本得られた（第 2-1-3 表）。これら 48 個の多型マーカを用いて『牡丹名鑑』掲載の 353 品種を解析した結果、得られた多型により、枝変わり品種とその原品種間および 1 組 2 品種間を除くその他すべての品種の識別が可能であった。枝変わりと記載されている 8 組 18 品種、すなわち‘太陽’を原品種とする‘島錦’、‘皇嘉門’を原品種とする‘黒洋錦’、‘島の藤’を原品種とする‘藤錦’、‘花王’を原品種とする‘王華錦’、‘島大臣’を原品種とする‘翠嵐’、‘紫禁城’と‘越の舞姫’、‘花競’を原品種とする‘瑞雲’、‘御国の旗’を原品種とする‘御国の曙’および‘金閣’を原品種とする‘金鷄’は、それぞれの枝変わり品種と原品種間において同

一のバンドパターンを示した(第 2-1-1 図, 第 2-1-3 表). 後藤ら(1997)の方法に従い, ある品種が特定の品種と同じ DNA 型となる確率(以下危険率と呼ぶ)を特定品種における各マーカーの出現頻度(もしくは出現しない頻度)で算出した場合, 本試験で供試した枝変わり品種と原品種のうち最も高い危険率を示したのは‘島大臣’を原品種とする枝変わり品種グループであり, 危険率は 1×10^{-11} (1000 億分の 1) であった(第 2-1-3 表).

本研究に供試した親子関係やきょうだい関係にある品種を含む日本ボタン品種およびその他の品種群の各品種の計 60 品種のバンドパターンを第 2-1-4 表に示した. 多型が得られた品種間の多型バンド数は, ‘藤の香’と‘桜の輝’間(第 2-1-4 表), ‘五節の舞’と‘花の帝’間, ‘磯の波’と‘桜鏡’間および‘大正の誇’と‘錦獅子’間(別表 1)で最も少なく, それぞれ 1 本であった. 一方, 日本ボタンの‘新菊牡丹’とフランスボタンの‘金陽’間(第 2-1-4 表)で最も多い 33 本の多型バンドが得られた. 多型の得られた品種間における多型バンド数の平均は 13.9 本であった. 日本ボタン品種群で親子関係にある品種間では, ‘胡蝶の舞’の実生‘N オーロラ’は 48 個中 6 個のマーカーで, ‘花競’の実生‘八束獅子’

は 4 個のマーカで、また‘シャントール’の実生‘新世界’と‘ホワイトポラリス’はそれぞれ 5, 10 個のマーカで親品種と識別が可能であった。きょうだい関係にある‘新世界’と‘ホワイトポラリス’間は 12 個のマーカで識別が可能であった(第 2-1-4 表)。一方、きょうだい品種とされていた‘花の里’と‘明日香’は、バンドパターンに差がなく識別ができなかった(別表 1)。形態的特徴による識別が困難とされる品種間、すなわち‘深輝門’と‘芳紀’間、‘芳寿’と‘大華’間および‘写楽’と‘貴城殿’間では、48 個中それぞれ 12, 9 および 12 個のマーカで識別が可能であった(第 2-1-4 表)。

各品種・品種群ごとのバンドパターンをみると、日本ボタンや中国ボタンでは検出されず、フランスボタンとアメリカボタンに共通して検出されるマーカが OPB18g_1200 と OPC14c_1100 の 2 個得られた(第 2-1-4 表)。この 2 個のマーカは、ダフニスハイブリッドの‘黄冠’と‘トリビュート’や伊藤ハイブリッドの‘オリエンタルゴールド’(Punina, 2017)においても検出された。なお、‘オリエンタルゴールド’では、48 個中 3 個のマーカで、他の品種と異なるバンドパターンが認められた。すなわち本品種のみで OPA08_800 と

OPA11_500 が検出され，本品種以外で OPA11_1500 が検出された（第 2-1-4 表）。

考 察

ボタン品種には，枝変わり品種と原品種の関係やきょうだい品種とされるもの，また品種間で形態的特徴が類似しているものが存在する。それらの多くは，品種育成年代が古い，あるいは育成記録がないことなどから真偽の検証が難しい。そこで本章ではそれらの品種間の関係性を検証可能な DNA マーカーの開発を行い，その開発したマーカーの正確性と再現性を確認した。

今回開発した 29 種類のプライマーにおける 48 個のマーカー解析では，8 組 18 品種の枝変わり品種とその原品種および 1 組 2 品種を除くすべての品種について 1～33 個のマーカーで識別が可能であった。一般的に識別に使用するプライマー数は少ないほど効率的であるが，マーカー数が少ない場合，異なる品種を同一のものと誤って識別する危険性が高くなる。後藤ら（1997）の方法で各品種の危険率を求めた結果，最も高い危険率は‘芳紅’の 6.2×10^{-7} （約 160 万分の 1）であり（データ略），本研

究の 48 個のマーカによる解析では，誤った識別結果となる可能性は非常に低いと考えられる．これらの結果から，本研究により開発された RAPD マーカーは現存するボタン品種の識別に幅広く有効であると考えられる．

14 個の RAPD マーカー（杉山，2004）や SSR 解析（Gao ら，2013）で枝変わりの関係であると既に報告されている‘島錦’とその原品種である‘太陽’を用いて，48 個のマーカによる品種識別を行った結果，2 品種間で同一のバンドパターンを示した．さらに原品種と花卉の色や形などにおいて明確な違いが認められているが，これまで DNA マーカー解析されていない 9 個の枝変わり品種について品種識別を行った結果，いずれの枝変わり品種においてもそれぞれの原品種と同一のバンドパターンを示した．RAPD マーカー解析でのバンドパターンに違いがないことといずれの組み合わせにおいても 2 品種間で形態的に明確な違いがあることから，今回新しく調査した 9 個の枝変わり品種はいずれの品種も原品種と枝変わりの関係にあることが確認された．一般的に枝変わり品種は原品種のゲノム情報の一部の変異が起るため，DNA マーカーの遺伝子座がその変異領域にない限り，枝変わり品種と原品種は同一のバンドパターンを示

す．本研究においても枝変わり品種と原品種のバンドパターンが全く一致しており，本研究で開発した RAPD マーカーによる解析方法は，正確性および再現性が高いことが示された．一方，きょうだい品種とされていた‘花の里’と‘明日香’は，バンドパターンに差がなく形態的特徴による識別も困難なことから，異名同品種の可能性が示唆された．

P. lutea または *P. delavayi* を祖先に持つフランスボタン，アメリカボタン，ダフニスハイブリッドおよび亜属間雑種‘オリエンタルゴールド’に共通して検出される 2 個のマーカー（OPB18g_1200，OPC14c_1100）が得られた．この 2 個のマーカーは，*P. lutea* または *P. delavayi* と遺伝的関与のないとされる日本ボタンや中国ボタンで検出されないことから，日本ボタン品種群および中国ボタン品種群と *P. lutea* または *P. delavayi* を祖先に持つ品種群を明確に分類することが可能であった（第 2-1-4 表）．この 2 個のマーカーについては第 3 章で STS マーカーの作成に利用した．来歴が不詳である‘シルバーリバー’では *P. lutea* や *P. delavayi* 由来と推定される上述の特異マーカーが検出された．このことから本品種は *P.*

lutea または *P. delavayi* の雑種後代の可能性が示唆された。

第2-1-1表 RAPD解析に用いたボタン353品種²

日本ボタン (309品種) <i>P. suffruticosa</i>
赤色系 (88品種)
‘朝陽’, ‘朝日港’, ‘アスリー’, ‘紅麒麟’, ‘紅小町’, ‘紅珊瑚’, ‘紅椿’, ‘美玉’, ‘美装’, ‘大神楽’, ‘大喜紅’, ‘大松山’, ‘富錦紅’, ‘牙城門’, ‘宜秋門’, ‘博愛’, ‘日暮’, ‘緋の司’, ‘緋扇’, ‘芳寿’, ‘芳紀’, ‘伯耆紅’, ‘芳紅’, ‘宝灯’, ‘百花撰’, ‘日向’, ‘今猩々’, ‘殷富門’, ‘出雲美人’, ‘日月錦’, ‘関西乙女の舞’, ‘花王’, ‘華王殿’, ‘金華殿’, ‘希世紅’, ‘幸華’, ‘兎花殿’, ‘紅輝獅子’, ‘光彩’, ‘向陽’, ‘兎耀殿’, ‘光山’, ‘舞華’, ‘満天紅’, ‘美濃’, ‘都錦’, ‘明紅の誉’, ‘浪花錦’, ‘錦獅子’, ‘錦の褥’, ‘日照’, ‘花魁’, ‘織姫’, ‘左大臣’, ‘彩霞’, ‘七宝殿’, ‘島娘’, ‘島の華’, ‘島の輝’, ‘島津紅’, ‘新菊牡丹’, ‘新鏡’, ‘新神楽’, ‘深輝門’, ‘新日月’, ‘新七福神’, ‘新島輝’, ‘祥花紅’, ‘昌運の華’, ‘昭陽殿’, ‘朱玉殿’, ‘淑婉’, ‘春光’, ‘春彩’, ‘新阿房宮’, ‘太平洋’, ‘大華’, ‘大正の光’, ‘太陽’, ‘宝船’, ‘帝冠’, ‘綴錦’, ‘山姥’, ‘淀の紅’, ‘楊貴妃’, ‘世々の誉’, ‘夕焼け空’, ‘瑞祥’
桃色系 (88品種)
‘明日香’, ‘明石獅子’, ‘明石湯’, ‘暁の雪’, ‘安嘉門’, ‘有明’, ‘阿蘇の司’, ‘綾衣’, ‘千代の舞’, ‘長寿楽’, ‘大門桜’, ‘談天門’, ‘栄冠’, ‘絵の姿’, ‘富貴獅子’, ‘福寿殿’, ‘二上の夕映’, ‘月桂冠’, ‘五節の舞’, ‘御所桜’, ‘花恵比須’, ‘花心’, ‘花衣’, ‘花鏡’, ‘花の瞳’, ‘花の帝’, ‘花の里’, ‘花遊’, ‘花売り娘’, ‘平成桜’, ‘平和の春’, ‘卑弥呼’, ‘鳳王城’, ‘宝来紅’, ‘百花殿’, ‘海峰’, ‘花貴獅子’, ‘神姫’, ‘春日’, ‘春日野’, ‘霞ヶ関’, ‘桂獅子’, ‘花遊仙’, ‘傾国花’, ‘君の恵’, ‘麒麟獅子’, ‘胡蝶の舞’, ‘越の舞姫 (春の粧)’, ‘舞姫’, ‘桃山’, ‘向原’, ‘村松の誇’, ‘村松の桜’, ‘娘花桜’, ‘妙舞’, ‘Nオーロラ’, ‘西の海’, ‘錦島’, ‘踊り子’, ‘王妃’, ‘思の儘’, ‘佐保姫’, ‘桜御前’, ‘桜獅子’, ‘桜鏡’, ‘桜の輝’, ‘宣陽門’, ‘七福神’, ‘島美人’, ‘島根聖代’, ‘島の響’, ‘新世界’, ‘新桃園’, ‘獅子頭’, ‘春光寿’, ‘藻壁門’, ‘玉芙蓉’, ‘天衣’, ‘千島桜’, ‘鶴羽’, ‘薄化粧’, ‘八千代獅子’, ‘八千代椿’, ‘八重桜’, ‘八束獅子’, ‘八束の香’, ‘養神’, ‘吉野川’
白色系 (44品種)
‘貴婦人’, ‘大極殿’, ‘富士の峰’, ‘不老門’, ‘扶桑の司’, ‘二上’, ‘冬物語’, ‘冬の火花’, ‘玉天集’, ‘白香山’, ‘白鵬’, ‘白珠門’, ‘白雲格’, ‘白雲山’, ‘白翁殿’, ‘白王獅子’, ‘白楽殿’, ‘白神’, ‘比良の雪’, ‘飛翔’, ‘ホワイトボラリス’, ‘建春門’, ‘小町白’, ‘越の雪’, ‘御国の曙’, ‘御国の旗’, ‘明皇の宝’, ‘中村白’, ‘雪白山’, ‘島根白雁’, ‘島根連鶴’, ‘島根玉簾’, ‘新扶桑’, ‘新八束’, ‘白鷺’, ‘翔鶴’, ‘玉兔’, ‘天空’, ‘冬風華’, ‘渡世白’, ‘月世界’, ‘八十翁’, ‘雪燈籠’, ‘瑞星’
紫色系 (51品種)
‘右大臣’, ‘美福門’, ‘豊楽門’, ‘千歳藤’, ‘大紫殿’, ‘藤の香’, ‘藤染衣’, ‘不惜金’, ‘二上時雨’, ‘群芳殿’, ‘花大臣’, ‘春霞’, ‘平成の夢’, ‘平成紋り’, ‘豊麗’, ‘磯の波’, ‘鎌田藤’, ‘鎌田錦’, ‘貴城殿’, ‘紫式部’, ‘中村藤’, ‘南部の里’, ‘新潟紫雲殿’, ‘大藤錦’, ‘大紫’, ‘パープルエリナ’, ‘麟鳳’, ‘彩雲’, ‘紫苑’, ‘紫城殿’, ‘紫禁城’, ‘紫見’, ‘紫紅殿’, ‘島大臣’, ‘島根紫雲殿’, ‘島の藤’, ‘島の司’, ‘新鎌田’, ‘新国色’, ‘紫王殿’, ‘紫仙’, ‘昭和の夢’, ‘春興殿’, ‘島根長寿楽’, ‘染井殿’, ‘写楽’, ‘大正の誇’, ‘常磐津’, ‘八雲’, ‘社’, ‘夜鳥’
黒色系 (15品種)
‘古里’, ‘不夜城’, ‘初鳥’, ‘烏ケ仙’, ‘皇嘉門’, ‘黒光の司’, ‘黒鳥’, ‘黒芳殿’, ‘黒龍錦’, ‘崑崙獅子’, ‘黒の司’, ‘綾綺門’, ‘深夜星’, ‘墨流し’, ‘墨の一’
絞り系 (6品種)
‘王華錦’, ‘藤錦’, ‘黒洋錦’, ‘島錦’, ‘翠嵐’, ‘瑞雲’
寒牡丹 (17品種)
‘寒紅錦’, ‘冬の嘉門’, ‘玄輝門’, ‘白峰’, ‘初日’, ‘初霜錦’, ‘龐飛羽’, ‘豊明’, ‘出雲の誇’, ‘寒桜獅子’, ‘錦王’, ‘群鳥’, ‘流れ星’, ‘二季の華’, ‘珊瑚界’, ‘太秋’, ‘戸川寒’
中国ボタン (16品種) <i>P. suffruticosa</i>
‘縁結び’, ‘玉楼春’, ‘緋王’, ‘寿老’, ‘架け橋’, ‘倚緑’, ‘まりも’, ‘緑胡蝶’, ‘仙鶴白’, ‘雪連’, ‘紫上’, ‘芝上楼’, ‘心紅’, ‘首案紅’, ‘桃源郷’, ‘豆緑’
フランスボタン (5品種) <i>P. lutea</i> × <i>P. suffruticosa</i>
‘金閣’, ‘金兎’, ‘金鶏’, ‘金帝’, ‘金陽’
アメリカボタン (17品種) (<i>P. lutea</i> または <i>P. delavayi</i>) × <i>P. suffruticosa</i>
‘カナリーイエロー’, ‘バンクエット’, ‘ブラックバンサー’, ‘ブラックパイレート’, ‘チャイニーズドラゴン’, ‘ゴールデンアイズ’, ‘ゴールデンボール’, ‘ハイヌーン’, ‘ライトパープルバンケット’, ‘マーチオネス’, ‘ミステリー’, ‘リージェント’, ‘リナウン’, ‘スプリングカーニバル’, ‘サンシャイン’, ‘サンダーボルト’, ‘ベズビアン’
ダフニスハイブリッド (2品種) { (<i>P. lutea</i> または <i>P. delavayi</i>) × <i>P. suffruticosa</i> } × <i>P. suffruticosa</i>
‘黄冠’, ‘トリビュート’
伊藤ハイブリッド ³ (1品種) <i>P. lactiflora</i> × (<i>P. lutea</i> × <i>P. suffruticosa</i>)
‘オリエンタルゴールド’
来歴不詳 (3品種)
‘シャントール’, ‘パープルヌーン’, ‘シルバーリバー’

²品種分類は松江大根島牡丹協議会 (2015) および細木 (2009) に従った

³シャクヤク×ボタン (Puninaら, 2017)

第2-1-2表 RAPD解析に用いたプライマーの塩基配列

プライマー	配列 (5' -3')
OPA03g	AGTCAGCCACG
OPA07a	GAAACGGGTGA
OPA08	GTGACGTAGG
OPA11	CAATCGCCGT
OPA16	AGCCAGCGAA
OPA19	CAAACGTTCGG
OPB01g	GTTTCGCTCCG
OPB11c	GTAGACCCGTC
OPB18a	CCACAGCAGTA
OPB18g	CCACAGCAGTG
OPC06cg	GAACGGACTCCG
OPC06cga	GAACGGACTCCGA
OPC06cgg	GAACGGACTCCGG
OPC09	CTCACCGTCC
OPC13a	AAGCCTCGTCA
OPC14c	TGCGTGCTTGC
OPF14	TGCTGCAGGT
OPN08tt	ACCTCAGCTCTT
OPN11tt	TCGCCGCAAATT
OPN15g	CAGCGACTGTG
OPN15ga	CAGCGACTGTGA
OPN17	CATTGGGGAG
OPN19ag	GTCCGTAAGT
OPN19at	GTCCGTAAGT
OPO03	CTGTTGCTAC
OPO03g	CTGTTGCTACG
OPO03c	CTGTTGCTACC
OPO03t	CTGTTGCTACT
OPO04	AAGTCCGCTC

第2-1-3表 RAPDマーカーによる枝変わり品種と原品種のDNAタイピング

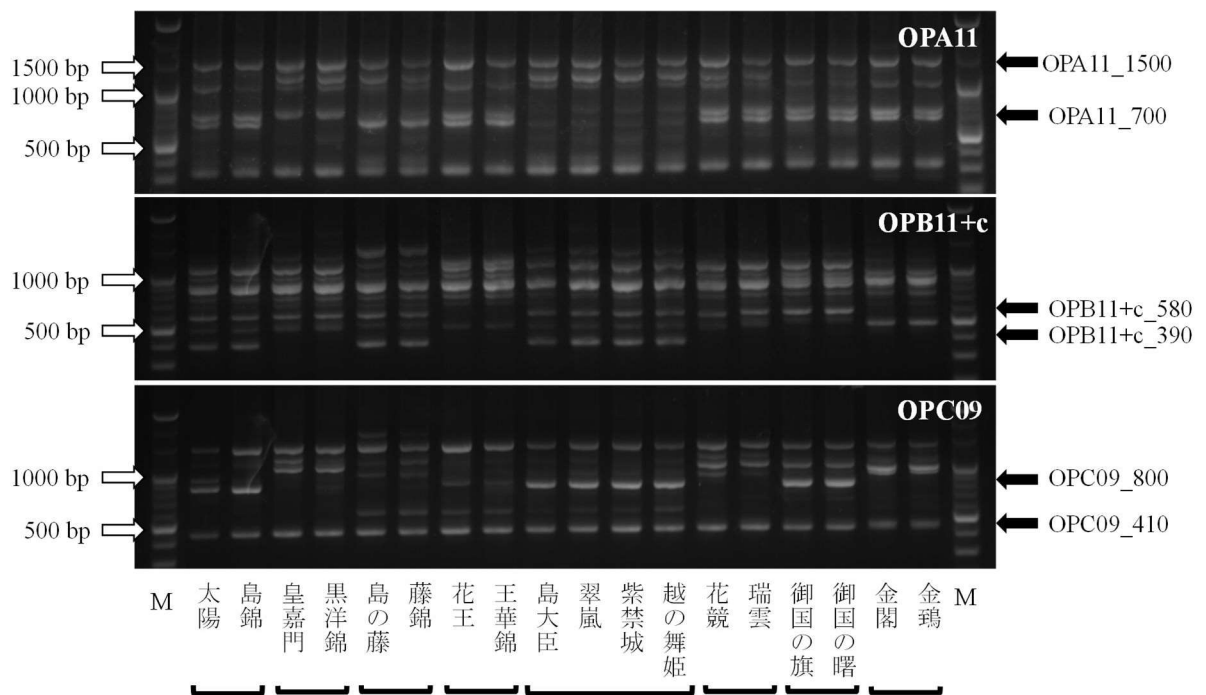
マーカー ^z	各品種におけるバンドパターン ^y												マーカーの出現頻度 ^x							
	原品種	枝変わり	原品種	枝変わり	原品種	枝変わり	原品種	枝変わり	原品種	枝変わり	原品種	枝変わり	出現する	出現しない						
	太陽	島錦	皇嘉門	黒洋錦	島の藤	藤錦	花王	王華錦	島大臣	翠嵐	紫禁城	越の舞姫			花鏡	瑞雲	御国の旗	御国の曙	金閣	金鷲
OPA03g_670	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.884	0.116
OPA07a_690	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.853	0.147
OPA08_800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.414	0.586
OPA08_760	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0.524	0.476
OPA08_460	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.997	0.003
OPA11_1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.552	0.448
OPA11_700	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0.133	0.867
OPA11_500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.003	0.997
OPA11_450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.026	0.974
OPA16_800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.450	0.550
OPA19_550	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0.762	0.238
OPB01g_1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.003	0.997
OPB01g_310	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.023	0.977
OPB11c_580	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.728	0.272
OPB11c_390	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0.564	0.436
OPB18a_580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.057	0.943
OPB18a_320	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0.453	0.547
OPB18g_1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.080	0.920
OPB18g_440	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.793	0.207
OPB18g_400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.122	0.878
OPC06cg_800	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.734	0.266
OPC06cg_600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.070	0.930
OPC06cga_650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.643	0.357
OPC06cgg_730	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0.564	0.436
OPC09_800	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0.592	0.408
OPC09_430	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.008	0.992
OPC09_410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.997	0.003
OPC13a_730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.960	0.040
OPC13a_700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.737	0.263
OPC14c_1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.080	0.920
OPC14c_880	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.020	0.980
OPC14c_660	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.490	0.510
OPF14_1000	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.666	0.334
OPN08tt_710	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0.756	0.244
OPN11tt_760	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.739	0.261
OPN15g_600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.878	0.122
OPN15g_420	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0.612	0.388
OPN15ga_730	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.878	0.122
OPN17_1200	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0.439	0.561
OPN17_660	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.983	0.017
OPN19ag_560	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.524	0.476
OPN19at_680	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.507	0.493
OPN19at_490	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0.422	0.578
OPO03_900	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0.830	0.170
OPO03g_1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.929	0.071
OPO03c_600	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0.592	0.408
OPO03t_890	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0.975	0.025
OPO04_820	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0.258	0.742
危険率 ^w	9×10 ⁻¹²		3×10 ⁻¹²		4×10 ⁻¹³		1×10 ⁻¹⁴		1×10 ⁻¹¹			2×10 ⁻¹¹		3×10 ⁻¹²		3×10 ⁻²⁴				

^zプライマー名に付加した数字は目的バンドの推定サイズ (bp) を示す

^y0がバンド無し, 1がバンド有りを示す

^x353品種を供試した際の出現頻度

^w任意の品種と同じDNA型となる確率: 各品種においてマーカーごとのバンドの出現する(1)頻度, もしくは出現しない(0)頻度を掛け合わせて求めた



第2-1-1図 枝変わり品種および原品種における3種類のプライマーを用いたPCR産物の電気泳動結果
 M: サイズマーカー, 黒矢印はマーカー名を示す, 品種名下部のバーは枝変わり品種と原品種の関係であることを示す, 各写真右上の英数字はプライマーを示す

第 2 節 開発した RAPD マーカーの実用性の検討

第 1 節では『牡丹名鑑』掲載品種を識別，判別が可能となる 48 個の RAPD マーカーを開発した。また，すべてのマーカーを用いた場合，間違った鑑定結果になる確率は非常に低いことが示唆された。しかし，『牡丹名鑑』に記載されていない品種は多数あり，実際の現場における品種の識別は，それらを含めた膨大な品種数のなかから特定の品種を識別する必要がある。そこで，開発した RAPD マーカーを用いて，実際のボタン園における品種鑑定を行いマーカーの実用性について検討した。

材料および方法

島根県内 A ボタン園（出雲市）に植栽されたボタンを用いて品種鑑定を行った。植物材料として，導入時のラベル記載品種名が明確な 35 個体と導入後に品種名が不明確になった個体，すなわち導入時のラベル記載品種名がわからなくなり，形態的特徴や植栽位置などに基づき推定された品種名が新たにラベルに記されている 43 個体の計 78 個体を用いた。これらの材料について，第 2 章

第 1 節と同様の方法で分析を行った。分析結果について第 2 章第 1 節の RAPD マーカー解析で得られた各品種のバンドパターンと比較し、品種照合した。

結 果

A ボタン園の品種のうち導入時のラベル記載品種名が明確なもの 35 個体について、RAPD マーカーに基づく品種の推定を行った結果、91.4% にあたる 32 個体で、RAPD マーカーにより推定される品種名とラベルの品種名とが一致した(第 2-2-1 表)。残りの 3 個体(8.6%)は RAPD マーカーにより推定される品種名とラベルの品種名とが異なった。このうち‘日月錦’と記載された 1 個体は 3 個のマーカーで‘日月錦’と異なり、‘新日月’と同一パターンを示した。一方、導入後に品種名が不明確となり形態的特徴などにより推定された品種名が新たにラベルに記されている 43 個体については 29 個体(67.4%)でマーカーにより推定される品種名とラベルの品種名とが一致した。残りの 14 個体は推定される品種名とラベルの記載品種とが異なった。

考察

本研究で調査した A ボタン園では，導入時の品種名がしっかりと把握されている個体と，ラベルの脱落や破損により，導入時の品種名が不明となり，推定により品種名がラベルに記された個体が存在する．本研究では，開発した RAPD マーカーの実用性の検証を目的に，A ボタン園の 2 種類のボタン個体群，すなわち導入時のラベル記載品種名が明確な個体と導入後に品種名が不明確になり，推定により品種名がラベルに記された個体を用いて，品種鑑定を行った．その結果，導入時の品種名が明確な個体の 91.4% において，マーカーのバンドパターンから推定される品種名とラベルに記載された品種名が一致した．このことから本研究で開発した RAPD マーカーを用いれば，高い精度で品種の特定を行うことができることが示された．マーカーにより推定される品種名とラベルの記載品種名が一致しなかった 3 個体 (8.6%) について，1 個体は‘新日月’を‘日月錦’とした誤りであり，類似した品種名に起因するものと考えられた．残りの 2 個体はマーカーによるバンドパターンがラベルの品種だけでなく，調査したいずれの品種とも一致しなかった．この

2 品種は RAPD マーカー開発に供試した品種以外の品種であった可能性がある。供試個体の 9 割以上で品種特定が可能であったことから、開発した RAPD マーカーの実用性は高いと考えられる。

一方、品種名が不明確となり形態的特徴などにより推定された品種名が新たにラベルに記されている個体の 32.6% において、ラベルの記載品種名が RAPD マーカー解析により推定される品種名と異なった。上述で示したように、RAPD マーカーの品種識別の精度が非常に高いことからラベル記載の品種名ではなく、RAPD マーカーで推定される品種名が正しい可能性が高いと考えられる。

開発した新しい品種識別方法は、実際の生産場面でも活用されている。松江市の大根島で毎年開催されるボタン切り花品評会において、出品された品種名と実際の品種名が異なる（誤品種）が疑われる出品試料について RAPD マーカーによる品種鑑定を行った。2018 年度には誤品種の疑いのあった 8 個体を鑑定し、5 個体の正しい品種名を特定した。また、品種不明の 3 個体の品種を特定した。2019 度には 1 個体の品種名の誤りを特定した（データ未掲載）。また、切り花品評会では、育成された

新品種の品評会も同時に行っており，新品種賞を受賞した品種は，RAPD マーカーの遺伝子情報を得るとともに既存品種との違いを確認している．

永年性作物であるボタンの全国各地の品種園では，長期間に及ぶ展示栽培により，品種ラベルの劣化や欠落が起こりやすい．そのため品種名が不明確になった個体について，形態的特徴や植栽場所などをもとに品種名が推定され，ラベルに記入されることがある．開花期以外に形態的特徴の差異が乏しいボタンでは，このような状況では誤った品種名がラベルに記される危険性が伴う．形態的特徴や植栽場所などだけに基づく品種の推定は誤る可能性が高いため，品種の推定をする場合は，今回開発した RAPD マーカーを用いて確認をする必要がある．

以上のことから，本章で開発した RAPD マーカーを用いたボタンの品種識別方法は、『牡丹名鑑』掲載品種についてだけでなく，世界中に存在する品種や今後育成される品種についても鑑定が可能であり，ボタンの品種管理に有用であると考えられる．

第2-2-1表 Aボタン園のボタン個体を用いたRAPDマーカーの品種識別能力の検証

材料	供試 個体数	RAPD解析による推定品種名と ラベル記載品種名との一致率	
		一致 (%)	不一致 (%)
導入時の記載品種名が明確な個体	35	32 (91.4)	3 (8.6)
導入後に改めて品種名の 推定を行った個体 ²	43	29 (67.4)	14 (32.6)

²導入時のラベル記載品種名がわからなくなり、形態的特徴や植栽位置などに基づき推定された品種名がラベルに記されている個体

第 3 章

品種発達に關与する

種間・亜属間雜種識別マーカーの開発

第 1 章で述べたように，ボタンは大きく 4 つの品種群に大別され，そのほかにも品種群間の雜種や亜属間の雜種などいくつかの雜種グループが存在する．それらが混在している状況下において，各品種の系統關係や育成の過程を明らかにすることが，今後の育種における方向性や交配親選定のためにも重要である．そこで，本章では第 2 章で作成した RAPD マーカーを用いて，第 1 節ではボタン品種群のクラスター解析を行った．第 2 節では得られたクラスターに特異的に認められるバンドについて STS マーカー化を行い，*Paeonia* 属原種と各品種群におけるバンドの保有を解析することによりボタン品種の発達史の背景との關係性を検討した．

第 1 節 RAPD データを用いた系統解析

ボタン各品種群の遺伝的な距離や関係性を明らかにするため第 2 章で開発した 48 個の RAPD マーカーを用いて、原種、シャクヤクやボタン各品種群の系統樹を作成し、それらの遺伝的な距離や系統関係の評価を行った。

材料および方法

1. 植物材料と DNA 抽出

植物材料は第 2 章で用いた品種に加えて、ボタン属の 2 つの原種 (*P. lutea* および *P. delavayi*)、シャクヤク 4 品種、シャクヤクとボタンの亜属間雑種 13 品種を富山中央植物園 (富山県富山市)、しまね花の郷 (島根県出雲市) と島根大学生物資源科学部植物育種研究室のボタン遺伝資源コレクションから新たに採取した (第 3-1-1 表)。第 2 章と同じ品種はその DNA サンプルを用い、新たに追加した品種からは改めて DNA を抽出した。DNA 抽出は、2 種類の原種からは新葉を用いて Kobayashi ら (1998) の方法で行い、シャクヤクおよび亜属間雑種品種からは越冬芽を用いて第 2 章と同様に改変 CTAB 法で行った。

2. RAPD マーカーを用いたクラスター解析

第 2 章で開発した 48 個の RAPD マーカーを用いて，2 種類の原種の他にシャクヤク，シャクヤクとボタンの亜属間雑種，日本ボタン，中国ボタン，アメリカボタンとフランスボタンを含む 56 品種系統の系統関係の分析を行った．第 2 章の品種データに新たに加えた品種のデータを追加して解析した．多型を示したバンドの有無に基づく 1-0 データマトリックスを作成し，各品種間の平方ユークリッド距離を算出後，

統計解析プログラム Black-Box

<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html>

により，ウォード法でクラスター分析し，系統樹を作成した．

結果

1. RAPD データを用いたクラスター解析

RAPD 分析で得られたバンドパターンを基に系統樹を作成した（第 3-1-1 図）．48 個の RAPD マーカーを用いて新しく追加した原種，亜属間雑種やシャクヤクを含む，

2 組の枝変わり品種間を除くすべての品種の識別が可能であった。2 組の枝変わり品種間‘金閣’を原品種とする‘金鵝’，‘オリエンタルゴールド’を原品種とする‘オリエンタルホワイト’は，それぞれの枝変わり品種と原品種間において同一のバンドパターンを示した。系統樹は大きく 2 つのクラスターに分類された。クラスター I は日本ボタンと中国ボタンの属する *P. suffruticosa* の品種で構成された。クラスター II には原種，フランスボタン，アメリカボタン，シャクヤクとボタンの亜属間雑種とシャクヤクが含まれた。アメリカボタンと日本ボタンの雑種であるダフニスハイブリッドもクラスター II に分類された。

考 察

新しく追加した原種，亜属間雑種やシャクヤクを含めて，開発した RAPD マーカーによって枝変わりは枝変わりとしてすべての品種の識別ができ，この RAPD マーカーがボタン属の識別に有効であることが示された。日本ボタンと中国ボタンが同じクラスター I に分類され，2 つの品種群は他の品種群よりも遺伝的に近いことが示唆

された。 *P. suffruticosa* に属する日本ボタンと中国ボタンが原種 *P. lutea* や *P. delavayi* を含むそのほかのボタン品種群と遺伝的に遠縁であることは、浜田ら（1989）の行った形態的特徴による分類や細木ら（1997a）や Zhang ら（2012）が行った遺伝的な分類の結果と一致している。

P. lutea や *P. delavayi* は日本ボタンおよび中国ボタン品種群の発達には関与していないとされており（Hao ら，2013），DNA マーカーを用いた分析においても *P. suffruticosa* の栽培品種は *P. lutea* や *P. delavayi* と異なる *Vaginatae* 亜節の複数の原種が関与して成立していると考えられる（Zhou ら，2014）。このことから、クラスター解析による *P. suffruticosa* に属す日本ボタンや中国ボタン品種群のクラスター I とクラスター II が類別されたことは、関わった原種の違いを明確に表しているものと思われる。品種群の成立の過程を見ると、フランス、アメリカボタン品種群やダフニスハイブリッドは中国ボタンとの交雑または日本ボタンとの交雑および戻し交雑により育成されているため、*P. suffruticosa* の血を 50～87.5% 含む。これらのフランスやアメリカ品種群はいずれも *P. lutea* または *P. delavayi* が関与しており、遺伝的に近縁であるため *P. suffruticosa* に属す日本ボタンや中

国ボタン品種群のクラスターと異なるクラスターを形成したと考えられた。

一方で、遺伝的に遠縁な関係であると考えられるシャクヤクやシャクヤクとボタンの亜属間雑種がフランスやアメリカの品種群と同一のクラスターⅡに分類され、シャクヤクや亜属間雑種については本来の遺伝的距離を正確に示したものではないと考えられた。これは今回開発した RAPD マーカーがボタン品種の品種識別に特化したものであり、ボタン品種間で多型が得られるプライマーを選定し、多型バンドをマーカーとして選抜する一方で、ボタン品種またはシャクヤク品種に共通のバンド等をマーカーとして選抜しなかったことが原因と考えられた。本研究においては品種識別マーカーとしては選抜しなかった、ボタンやシャクヤクそれぞれに共通のバンドや品種群特異的なバンドをマーカーとして採用することで、より詳細な遺伝距離の解析や系統解析を行うことが可能であると考えられる。

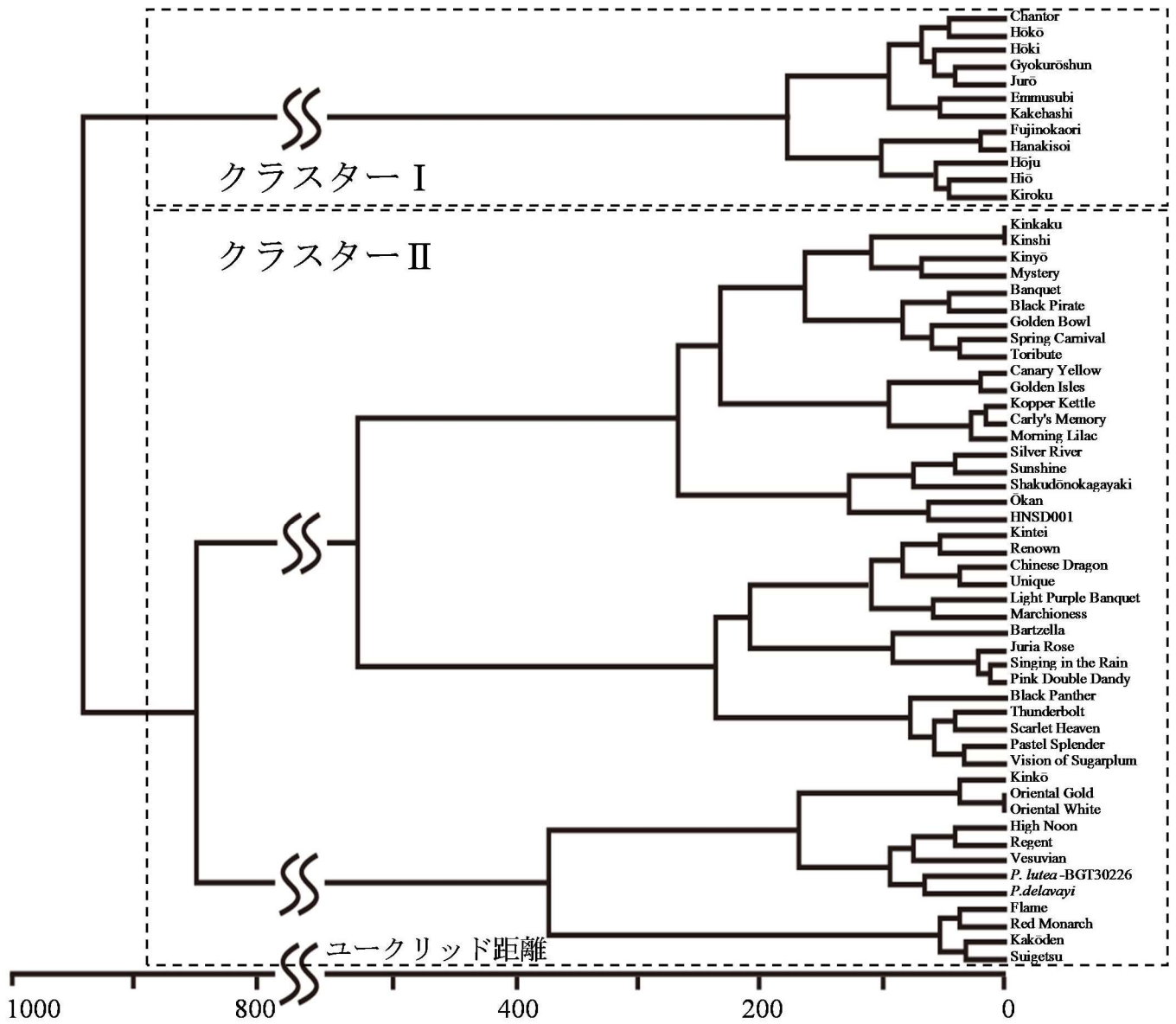
第3-1-1表 クラスタ分析に用いたボタン属原種および品種

供試材料	種・品種群 ^z
Chantor(シャントール)	日本
Fujinokaori(藤の香)	日本
Hanakisoi(花競)	日本
Hōju(芳寿)	日本
Hōki(芳紀)	日本
Hōkō(芳紅)	日本
Emmusubi(縁結び)	中国
Gyokurōshun(玉楼春)	中国
Hiō(緋王)	中国
Jurō(寿老)	中国
Kakehashi(架け橋)	中国
Kiroku(倚緑)	中国
Kinkaku(金閣)	フランス
Kinkō(金晃)	フランス
Kinshi(金鴉)	フランス
Kintei(金帝)	フランス
Kinyō(金陽)	フランス
Banquet(バンクエット)	アメリカ
Black Panther(ブラックパンサー)	アメリカ
Black Pirate(ブラックパイレート)	アメリカ
Canary Yellow(カナリーイエロー)	アメリカ
Chinese Dragon(チャイニーズドラゴン)	アメリカ
Golden Bowl(ゴールデンボール)	アメリカ
Golden Isles(ゴールデンアイズ)	アメリカ
High Noon(ハイヌーン)	アメリカ
Light Purple Banquet(ライトパープルバンケット)	アメリカ
Marchioness(マーチオネス)	アメリカ
Mystery(ミステリー)	アメリカ
Regent(リージェント)	アメリカ
Renown(リナウン)	アメリカ
Silver River(シルバーリバー)	アメリカ
Spring Carnival(スプリングカーニバル)	アメリカ
Sunshine(サンシャイン)	アメリカ
Thunderbolt(サンダーボルト)	アメリカ
Vesuvian(ベズビアン)	アメリカ
Ōkan(黄冠)	ダフニスハイブリッド ^y
Toribute(トリビュート)	ダフニスハイブリッド
Shakudōnokagayaki(赤銅の輝)	ダフニスハイブリッド
HNSD001(Lutea Hybrid)	ダフニスハイブリッド
Oriental Gold(オリエンタルゴールド)	伊藤ハイブリッド ^x
Oriental White(オリエンタルホワイト)	伊藤ハイブリッド
Kopper Kettle(コッパケトル)	伊藤ハイブリッド
Carly's Memory(カーリースメモリー)	伊藤ハイブリッド
Morning Lilac(モーニングライラック)	伊藤ハイブリッド
Unique(ユニーク)	伊藤ハイブリッド
Bartzella(バートゼラ)	伊藤ハイブリッド
Juria Rose(ジュリアローズ)	伊藤ハイブリッド
Singing in the Rain(シンギングインザレイン)	伊藤ハイブリッド
Pink Double Dandy(ピンクダブルダンディ)	伊藤ハイブリッド
Scarlet Heaven(スカーレットヘブン)	伊藤ハイブリッド
Pastel Splendor(パステルスプレンドー)	伊藤ハイブリッド
Vision of Sugarplum(ビジョンオブシュガープラム)	伊藤ハイブリッド
Flame(フレイム)	シャクヤク
Kakōden(花香殿)	シャクヤク
Red Monarch(レッドモナーク)	シャクヤク
Suigetsu(酔月)	シャクヤク
<i>P. lutea</i> (BGT30226)	<i>P. lutea</i>
<i>P. delavayi</i>	<i>P. delavayi</i>

^z 品種分類は松江大根島牡丹協議会 (2015) および細木 (2009) に従った

^y { (*P. lutea* or *P. delavayi*) × *P. suffruticosa* } × *P. suffruticosa*

^x *P. lactiflora* × (*P. lutea* × *P. suffruticosa*)



第3-1-1図 ボタン属試料における48RAPDマーカーのクラスター分析結果

第 2 節 品種群特異的 STS マーカーの解析

第 1 節のクラスター分析では日本ボタンおよび中国ボタン品種群が属す *P. suffruticosa* の品種群とシャクヤクや原種，フランス，アメリカ品種群，およびそれらの交雑後代や亜属間雑種を含むクラスターとに大別された。この類別は品種群の成立に関わった原種の違い，特に *P. lutea* や *P. delavayi* との関係性が大きく影響したと考えられた。また，第 2 章における RAPD マーカーによるボタン属品種の解析では，アメリカおよびフランス品種群やシャクヤクとボタンの亜属間雑種に特異的にバンドが認められるマーカーを見出した。同時にシャクヤクとボタンの交雑品種である‘オリエンタルゴールド’に特異的に認められるマーカーも見出した。そこで，これらのバンドを用いて成立過程の異なる品種群を分類する DNA マーカーの開発を行った。

材料および方法

1. 品種群特異的な RAPD バンドを用いた STS プライマーの作成

第 2 章の RAPD 分析において，品種群特異的であった RAPD マーカー OPC14c_1100，および OPA11_1500 を用いて STS プライマーを作成した．RAPD マーカー OPC14c_1100 はフランス，アメリカボタン品種群，ダフニスハイブリッドと‘オリエンタルゴールド’に特異的にバンドが検出され，OPA11_1500 はほぼすべてのボタン品種で 1500bp のバンドが検出されたが，シャクヤクとボタンの亜属間雑種である‘オリエンタルゴールド’に特異的にバンドが検出されなかった．RAPD マーカー OPA11_1500 は，バンドが検出された日本ボタンのバンドの塩基配列情報を基に STS プライマー作成を試みた．フランスとアメリカ品種群特異的な RAPD バンド OPC14c_1100 および品種（‘オリエンタルゴールド’）特異的な RAPD バンド OPA11_1500 を，それぞれアガロースゲルから切り出し，LaboPass Gel（北海道システム・サイエンス株式会社）を用いて精製した．その後，それらを Mighty cloning kit（TaKaRa）によってクローニングした．インサートが確認できた大腸菌から Xprep Plasmid DNA Mini Kit（PhileKorea, Inc.）を用いて Plasmid DNA を精製した．DNA シーケンスは北海道システム・サイエンス株式会社（<http://www.hssnet.co.jp>）に外注により行

った。得られた塩基配列情報を基に Primer3 Plus (<http://primer3plus.com/>) を利用し STS プライマー LuDeB および HPB を設計した (第 3-2-1 表)。 *P. lutea* と *P. delavayi* の特異的バンドを検出する LuDeB (**Lutea Delavayi Band**) マーカー, 並びにシャクヤクのバンドを検出する HPB (**Herbaceous Peony Band**) マーカーとして開発した。また, 得られた塩基配列は National Center of Biotechnology Information (NCBI; <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) の BLAST による相同性検索を行った。

2. STS マーカー分析

作成した 2 種類の STS プライマーを用いて, 2 原種と 78 品種について分析を行った。PCR は 0.25 unit の TaKaRa Ex Taq polymerase (タカラバイオ (株)) を用い, 50 ng のゲノミック DNA, 1×Ex Taq Buffer, 2 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs および 1 pmoles の各プライマーを含む計 10 μl の反応系で行った。PCR 反応には TaKaRa PCR Thermal cycler Dice TP600 (タカラバイオ (株)) を用い, 最初に 94°C で 3 分の熱変性を行った後, 94°C で 1 分の熱変性, 61°C で 1 分のアニーリングと 72°C で 2 分の伸長反応を

35 サイクル行った。その後最終伸長を 72℃で 4 分を行った。得られた増幅産物は、2% アガロースゲルに $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ のエチジウムブロマイドを添加し、TAE バッファー中で 100 V, 50 分間 (LuDeB) または 35 分間 (HPB) の電気泳動を行った。泳動終了後、UV 照射下で増幅バンドを検出した。

結果

1. 品種特異的 DNA マーカーの解析

STS プライマー LuDeB を用いて PCR を行った結果、*P. lutea*, *P. delavayi* に加えてフランス、アメリカ品種および *P. lutea* や *P. delavayi* の交雑品種で想定された 263bp 付近に明瞭なバンドが検出された (第 3-2-1 図)。一方、日本ボタン、中国ボタンやシャクヤクでは 263bp 付近にバンドは検出されなかった (第 3-2-2 表, 第 3-2-1 図)。LuDeB マーカーにおけるバンドの有無は、RAPD マーカー OPC14c_1100 の分析結果と一致した。

STS プライマー HPB を用いて PCR を行った結果、原種、フランスボタン、アメリカボタン、ダフニスハイブリッド、日本ボタンと中国ボタンで想定された 502bp に

明瞭なバンドが検出された。一方，シャクヤク 4 品種および亜属間雑種 13 品種では日本ボタン品種で想定されたバンドサイズより 100bp 程度短い 395bp に明瞭なバンドが検出された（第 3-2-2 表，第 3-2-1 図）。HPB マーカーにおける 502bp のバンドの有無は，RAPD マーカー OPA11_1500 の分析結果と一致した。

供試したすべての原種および品種は LuDeB マーカーのバンドの有無で 2 つのグループに，HPB で得られるバンドサイズで 2 つのグループに分類でき，計 4 つのグループに分類された（第 3-2-2 表）。すべてのシャクヤクとボタンの亜属間雑種は LuDeB が（+）型であり，HPB では 395bp のバンドが検出された。供試したすべての原種およびフランス品種，アメリカ品種とダフニスハイブリッドは LuDeB が（+）型であり，HPB では 502bp のバンドが検出された。供試したすべてのシャクヤク品種は LuDeB が（-）型であり，HPB では 395bp のバンドが検出された。供試したすべての日本ボタンと中国ボタンは LuDeB が（-）型であり，HPB では 502bp のバンドが検出された。

2. 相同性検索結果

STS プライマー LuDeB を作成する基となった RAPD マーカー OPC14c_1100 のバンドの塩基配列を NCBI データベースで相同性検索した結果，相同性の高い配列は検出されなかった．一方，STS プライマー HPB を作成する基となった RAPD マーカー OPA11_1500 のバンドの塩基配列は，ボタンの葉緑体 DNA (*P. suffruticosa* chloroplast MH793271) と高い相同性 (98% ; 860/874) を示した．

考察

P. lutea や *P. delavayi* は交配親として用いられ，ボタンにおける黄色花品種の育成やオレンジ色や栗色等ユニークな花色の品種育成に貢献している．LuDeB マーカーは原種である *P. lutea* と *P. delavayi* とそれらの後代であるフランス，アメリカ品種や *P. lutea* や *P. delavayi* を祖先に持つダフニスハイブリッドでバンドが検出された．このバンドはシャクヤクを種子親とし，フランスボタン品種‘金晃’を花粉親とする亜属間雑種‘オリエンタルゴールド’でも検出された．LuDeB マーカーのバンドは *P. lutea*，*P. delavayi* やその交雑後代で特異的に検出さ

れ， *P. lutea* と *P. delavayi* が品種の発達に関与していないとされる日本ボタンと中国ボタン（Haoら，2013）では検出されないことから，LuDeB マーカーは原種である *P. lutea* と *P. delavayi* の遺伝子導入を判別可能であると考えられた．そのため，本研究で開発した LuDeB マーカーは，黄色色素を持った品種の品種発達において *P. lutea* と *P. delavayi* の遺伝的関与を判別するマーカーであるといえる．

ボタンとシャクヤクの亜属間雑種は，花が美しいことに加えて，病害抵抗性や成長能力が高いことや，開花時期がシャクヤクに近くボタンと異なること，適応性が高いことや花数が豊富であるといったシャクヤクとボタンの特徴を併せもっているため利用価値が高い（Maら，2012；Yangら，2020；Sunら，2021）．シャクヤク葉緑体 DNA の塩基配列情報（*P. lactiflora* chloroplast MK860971）と HPB のプライマーの配列から HPB プライマーによってシャクヤク葉緑体 DNA で増幅される想定バンドサイズは 395bp であった．HPB プライマーで得られる 2 つのバンド（502bp および 395bp）は，いずれも葉緑体 DNA と高い相同性を有していた．ボタンとシャクヤクの葉緑体 DNA の配列情報から，HPB プライマーで得ら

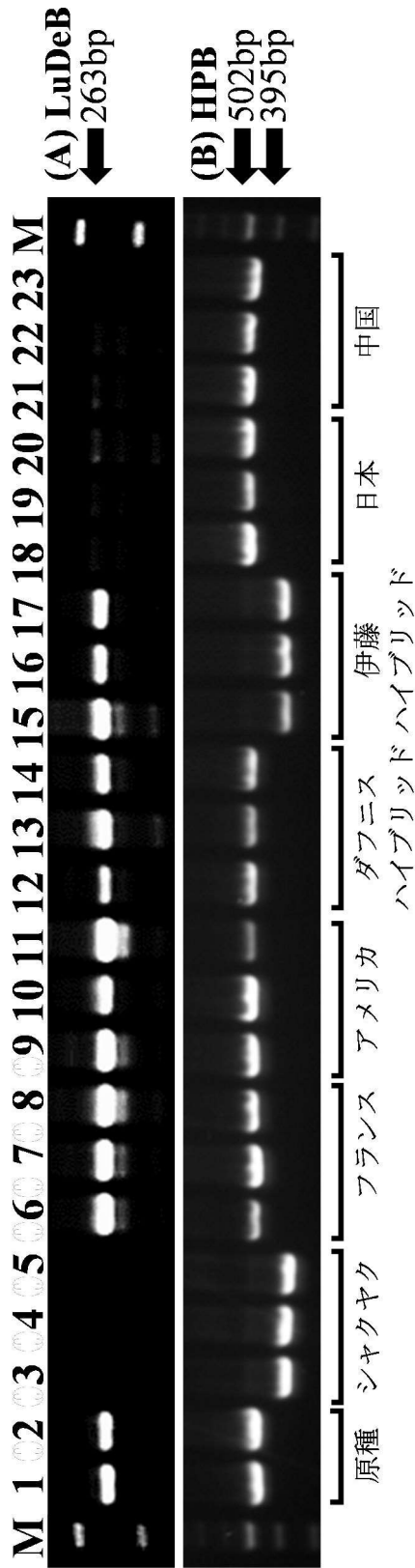
れるサイズの異なる 2 つのバンドは同じ領域のものであり、シャクヤクにはその領域に 107bp の欠失があることが分かった。その結果 502bp のバンドはボタンに特異的に認められるボタン型の葉緑体 DNA を示し、395bp のバンドはシャクヤクに特異的に認められるシャクヤク型の葉緑体 DNA を示すと考えられた。この HPB プライマーで得られる 2 種類のバンドは葉緑体 DNA 由来のため母性遺伝する (Kobayashi ら, 2013) ことから、HPB マーカーは亜属間雑種において種子親の推定にも利用可能であると考えられる。

LuDeB マーカーのバンドの有無により原種の *P. lutea*, *P. delavayi* とフランス、アメリカ品種およびその交雑後代が一つのグループに、シャクヤク、日本ボタンと中国ボタンがもう一つのグループに大別された。LuDeB マーカーのバンドの有無によって分類された 2 つのグループは、HPB マーカーで得られるバンドサイズによりさらに 2 つに分かれ、最終的に 4 つのグループに分類された。HPB マーカーでは、シャクヤクおよびシャクヤクとボタンの亜属間雑種のグループと、*P. lutea*, *P. delavayi* やシャクヤクが品種群の成立に関わっていないボタン品種のグループに分類された。

これらのことから LuDeB マーカーは，ボタン品種における *P. lutea* および *P. delavayi* との遺伝的関係を証明するマーカーであり，HPB マーカーはシャクヤクとボタンの亜属間交雑の遺伝的関係を判定するマーカーであることが示された．また，2 つのマーカーを用いた分析により，品種群の成立に関わった原種や種ごとに 4 つのグループに分類されることが明らかとなった．

第3-2-1表 本研究で開発したSTSプライマーの塩基配列

プライマー	配列 (5' - 3')		サイズ (bp)
	Forward	Reverse	
LuDeB	GATCGATTTGCGTGCTTGCA	CCCTCTTCCAACGCATCCTC	263
HPB	TACGCACTTTCGTGAGGGTG	TCTCTTTCAAGGAGGCAGCG	502 または 395



第3-2-1図 開発したSTSプライマー：(A) LuDeB, (B) HPBにおけるPCR産物の電気泳動結果

M: サイズマーカー, 1: *P. lutea*, 2: *P. delavayi*, 3: 花香殿, 4: フレーム, 5: 酔月, 6: 金閣, 7: 金晃, 8: 金帝, 9: ハイヌーン,
 10: ベズビアエン, 11: ミステリー, 12: 黄冠, 13: トリビュート, 14: 赤銅の輝, 15: オリエンタルゴールド, 16: パートセラ,
 17: コッパケトル, 18: 花競, 19: 芳寿, 20: 貴城殿, 21: 玉楼春, 22: 緋玉, 23: 寿老; 矢印は推定されるバンドサイズを示す

総合考察

本研究では、ボタンの生産現場の抱える品種管理の課題や育種における問題点の解決を目指し、DNAマーカーを用いた品種管理の向上に向けた新しい品種鑑定方法の確立および品種発達の歴史を紐解くDNAマーカーの作成について取り組んだ。各研究項目や課題に関する総合的な考察を以下に述べる。

1. 本研究の成果

本研究では、『牡丹名鑑』掲載の353品種を用いてRAPD分析を行い、品種間で多型を示す48個のRAPDマーカーを開発した。これらのマーカーを用いた品種識別方法は高い正確性と再現性を示し、また、誤った判定となる可能性が低く、さらに遺伝的關係が近い親子品種やきょうだい品種の識別が可能であったことから、形態的特徴による鑑定と合わせて、より確実な品種鑑定を可能とし、生産現場の品種管理が向上した。

また、フランス、アメリカ品種群およびそれらとの交雑により得られた雑種グループや亜属間雑種品種群それぞれに特異的なRAPDマーカーを用いて、*P. lutea*と*P.*

delavayi の遺伝的関係を検出する LuDeB マーカー，およびボタンまたはシャクヤク型の葉緑体 DNA を判別する HPB マーカーを開発した．2 つの DNA マーカー LuDeB，HPB はボタンの品種発達史における新しい形質を導入するために重要な役割を果たした，種間交雑や亜属間交雑を判定するマーカーであり，分析結果は品種発達の歴史を裏付ける貴重なデータとなった．

2. RAPD マーカーによる品種識別

本研究で開発した RAPD マーカーを用いた品種識別方法は『牡丹名鑑』掲載の 353 品種の識別が可能であった．また，この品種識別方法は，実際のボタン園や切り花品評会において高い実用性を示した．

これまでボタン品種の形態的な特徴など大部分の情報は生産者が保有するものしかなかったが，『牡丹名鑑』の発刊により情報の共有が図れるようになった．形態的特徴によるボタンの品種鑑定は花容による鑑定が主要となるが，開花時期が限られるため開花時の写真や蕾の状態または開花後の株を見て鑑定することが多く，正確な品種の判定は非常に難しい．一方，DNA 情報を用いた品種鑑定は栽培条件，採取部位や時期などによる違いがなく，

いつでも鑑定が可能である。また RAPD 解析は高額な分析機器を必要とせず、小さな実験室レベルでも実施できるため、実際の利用を考えた場合において、より実用的である。形態的特徴の情報に、RAPD 解析により得られた DNA 情報を加えることで、より確実な鑑定が可能になり、品種管理を行ううえで重要な手段になると考えられる。

3. ボタンの品種発達史の裏付け

ボタンの原種 *P. lutea* または *P. delavayi* はフランス品種やアメリカ品種の育成に利用され、黄色色素を合成する遺伝子の導入など遺伝的に関与している。また、ダフニスハイブリッドやシャクヤクとボタンの亜属間雑種も、*P. lutea* または *P. delavayi* が関係して育成されている。本研究では *P. lutea* または *P. delavayi* の遺伝的関与を判別する LuDeB マーカーおよび保有する葉緑体がボタン型かシャクヤク型かを判別する HPB マーカーを確立した。

ボタンの品種発達において、原種からの黄色遺伝子の導入はボタン花色の多様性獲得に大きく貢献し、またシャクヤクとの亜属間交雑はシャクヤクの有用な特性をボ

タンに導入することに成功した。これまで、フランスやアメリカボタンの育成には *P. lutea* または *P. delavayi* が関わっていることや、シャクヤクとボタンの亜属間雑種の育成には、種子親をシャクヤクとし、花粉親を *P. lutea* の交雑後代であるボタン品種を用いていると言われてきた (Yang ら, 2020)。今回開発した 2 つの DNA マーカーによる検出結果は、*P. lutea* または *P. delavayi* がフランスやアメリカ品種の発達に関与していること、*P. lutea* がシャクヤクとボタンの亜属間雑種の橋渡し植物として寄与していることの裏付けとなった。これまで形態的特徴を基に推察されてきたボタン属における革新的な品種発達が DNA マーカーを用いて証明できた。

4. ボタン栽培への提言

島根県の県花であるボタンは花き生産においてキク、バラ、トルコギキョウやシクラメンに並び県主要花き品目の一つとして挙げられている。近年の生産者の高齢化や後継者不足、円高や景気低迷により作付面積や産出額は漸減傾向にあるが、県の花き生産において重要な品目であることに変わりはない。

ボタン生産者は各自で接ぎ木用の穂木を採取する母樹を植栽した品種園をもち、花のない時期に採穂しているため、多数の品種を扱う場合には品種の混同や異品種の混入が起きやすい。今後は産地としてそれらの問題を防ぐため、形態的特徴とDNAマーカーを用いた品種鑑定により、母樹園の品種を確認し、品種名の明らかとなった母樹から採穂することや、生産者間で共通の母樹から採穂するなど、体系化した取り組みが必要である。

松江市の大根島では一部の生産者は独自で品種育成し、増殖や販売をしているが、それらの品種は個人で所有しているにとどまっており、産地として保存・管理していない。こういった品種が多数あることが異名同品種など品種園の混乱を招く一因と考えられる。一方、大根島において育成されたダフニスハイブリッドタイプである‘黄冠’は育成者の意向もあり、大根島全体で栽培されている。また、‘黄冠’は2003年に品種登録されたボタンの登録第1号であるが、それから2022年6月現在まで登録出願されたのは出願取り下げも含めて6品種と少ない。切り花品評会で新品种賞を獲得した品種など優れたものは種苗管理の面からも‘黄冠’のように品種登

録して産地全体で栽培していくような仕組みづくりも必要であろう。

ボタンは各地で育種され毎年新しい品種が生まれている。今回開発した RAPD マーカーは識別能力が高く、48 個のマーカーを用いた場合に誤った判定となる可能性は極めて低い。しかし、品種の鑑定はデータベースに登録した品種に限られるため、既存品種だけでなく、新たに育成された品種のデータを採取し、データベースを随時更新することで品種鑑定の精度の向上が期待できる。

5. 産地間の種苗管理

日本におけるボタン栽培は産地間の品種交流が行われ、複数の産地で多数の同名品種が扱われている。その結果、一部の品種では産地間で同名異品種と思われる事例がある。今後、品種の管理や保存をしていくうえで正しい品種の特定は、DNA マーカーが有用であり、産地間の同名異品種の鑑定など品種の整理に取り組む必要がある。

6. 今後の育種への提言

これら 2 つの原種の発見と種間交雑，亜属間交雑への利用はボタン属において革新的であり，花色の増加，品種の多様性の増大をもたらした．当時革新的であったこれらの品種は現在でも消費者に人気がある．同様の育種手法は現在でも一部で行われているが，種間交雑や亜属間交雑は種子の獲得が難しく，正常種子の獲得率は極端に低い．そのうえ獲得した種子を播種し，実生が得られたとしても開花するまでに 3～5 年，組み合わせによっては 10 年以上かかることなどから新品種の育成にまで至るケースは稀である．育種手法として，変異原や放射線を使った突然変異育種も行われているが成果はあまりない（Cheng, 2007）．そのため，今後のボタンの育種は既存の種間雑種品種を用いた自殖や戻し交雑が有効であると考えられる．開花までの期間が長いボタンの育種では，多数の実生を栽培する必要があるため一定程度の圃場面積が必要である．そうした場合に今回開発した DNA マーカーは原種の遺伝子導入を判定するマーカーであるため，選抜の効率化への利用が期待される．

一方で新しく見つかった原種のなかで，まだ育種利用されていない原種との交配による新規形質の獲得が期待

できる。しかし、中国国内でこれまで発見されたボタン原種は絶滅危惧種や準絶滅危惧種に指定されており（Liら，2018），新しく入手するのは困難である。そのため日本国内での限られた遺伝資源を用いて多様性を獲得していく必要がある。

今後，本研究で開発した品種識別方法や種間雑種，亜属間雑種判別 DNA マーカーを用いて，ボタン生産・育種の発展に寄与することを期待する。

摘要

ボタン (*Paeonia* spp.) は中国を原産とする観賞価値の高い植物であり、複数の原種が関係して多様な品種群が発達している。観賞用のボタンは日本においても昔から親しまれており、1000年を超える栽培の歴史がある。戦後からは島根県の大根島（松江市八束町）が日本のボタン生産の中心となっている。大根島では毎年数十万本ものボタン苗生産があり、県の主要な花き品目の一つである。一方でボタンの生産現場では品種管理の課題や育種における問題点を抱えている。

本研究では、はじめにボタンの品種発達の歴史を概説し、島根県における生産の現状と問題点を提起した。次に、それらの課題を解決するため、DNAマーカーを活用して、品種管理の向上に向けた新しい品種鑑定方法を確立した。さらに、原種の遺伝的関与を検出するマーカーの開発を行い、遠縁交雑により育成された品種を解析して発達史を考察した。

第1章では、本論文に関わる原種の特徴とボタン各品種群の品種発達の歴史、および我が国最大の生産地であ

る島根県のボタン生産の課題について総括した。ボタン品種は形態的特徴や地理的な背景，および育成に関係した原種によって中国，日本，フランス，アメリカの4つの品種群に大別される。これらの4品種群の他に，品種群間の雑種やシャクヤクとボタンの雑種グループがある。そのなかでフランス品種やアメリカ品種の成立には，黄花の *P. lutea* または濃紫花の *P. delavayi* と *P. suffruticosa* に属す日本ボタンや中国ボタンが関わっていること，シャクヤクとボタンとの亜属間雑種育成においても *P. lutea* が関与していることを詳説した。次に，島根県のボタン生産の現状について，生産現場では形態的特徴が類似した品種や品種名が類似していることによる品種の混同や混入などの問題が起こっていることから，品種管理の向上の必要性を提起した。また，育種面では主に同一種内の交雑によって品種育成が行われてきたことで，種間雑種や亜属間雑種を除いて目新しい品種がないことから，将来に向けた種間雑種や亜属間雑種に由来する多様な新品種育成のため各品種群の系統関係や系譜の把握の必要性を提起した。

第 2 章では，ボタンにおける実用的な品種識別方法を開発するため，品種図鑑『牡丹名鑑』（松江大根島牡丹協議会，2015）に掲載されている 353 品種について RAPD 分析を行った．29 種類のプライマーから品種間で多型を示す 48 個の RAPD マーカーが得られた．これらのマーカーを用いることにより，8 組 18 品種の枝変わりと原品種および異名同品種と示唆される 1 組 2 品種を除く，すべての品種の識別が可能であった．さらに遺伝的關係が近い親子品種やきょうだい品種の識別が可能であった．

各品種群の品種ごとのバンドパターンデータを比較した結果，フランス，アメリカ品種群やボタンとシャクヤクとの亜属間雑種が関連した品種群に特異的な RAPD バンドが検出された．

開発したマーカーの生産現場での有効性を検証するために，ボタン品種園における品種鑑定を行った結果，ほぼすべての調査個体において，RAPD マーカーのバンドパターンから推定される品種名とラベルに記載された品種名が一致した．

以上のことから，本章で開発した RAPD マーカーがボタンの品種管理に有用であることが示された．

第 3 章では第 2 章で得られた RAPD データを用いて系統樹を作成し，ボタン属各品種群の系統関係の評価を行った．さらに，フランス，アメリカ品種群およびそれらとの交雑により得られた雑種品種群や亜属間雑種品種群それぞれに特異的な RAPD マーカーを用いて，*P. lutea* と *P. delavayi* の遺伝的関係を検出する LuDeB マーカー，およびボタンまたはシャクヤク型の葉緑体 DNA を判別する HPB マーカーを開発した．LuDeB マーカーは *P. lutea* および *P. delavayi* との交雑によりこれまでになかった黄色の花色をもたらした遺伝的背景を証明するマーカーであることが示唆された．一方，HPB マーカーはシャクヤクの優れた形質をボタンに導入した，シャクヤクとボタンの亜属間交雑の判定が可能であると示唆された．

ボタン品種の発達史においては，異なる種や亜属との交雑による遺伝子導入によって，革新的な品種改良がなされた．LuDeB および HPB の 2 種類の DNA マーカーは，それらボタンの品種発達史における特記すべき品種改良を識別可能な画期的なマーカーである．これらのマーカーは異なる種からの遺伝子導入を判定できることから，種間交雑や亜属間交雑が難しいボタン育種において，効率的な選抜マーカーとしての活用が考えられる．

本研究の結果から，今回開発した RAPD マーカーを用いた品種識別方法は生産現場でのより確実な品種管理を可能とするものであることが示された．また，LuDeB，HPB の 2 種類の DNA マーカーによる分析結果は，ボタンの品種発達史において，新しい形質を導入するために重要な役割を果たした革新的な種間交雑や亜属間交雑の遺伝子導入を裏付けた．

これらのマーカーの活用により，ボタンの生産現場だけでなく流通，販売やボタン園等における品種管理の向上や，種間交雑や亜属間雑種を用いた新しい育種の切り口となることが期待される．

引用文献

- Cheng, F. 2007. Advanced in the breeding of tree peonies and a cultivar system for the cultivar group. *Int. J. Plant Breed.* 90-102.
- Gao, Z., J. Wu, Z. Liu, L. Wang, H. Ren and Q. Shu. 2013. Rapid microsatellite development for tree peony and its implications. *BMC Genomics* 14: 886-896.
- 後藤 晋・渡辺 敦史・池田 浩一 . 1997. RAPD マーカーによるハゼノキの品種識別 . *日林誌* . 79: 229-233.
- 浜田 守彦・細木 高志・稲葉 久仁雄 . 1989. 多変量解析によるボタン品種の形態的分類 . *園学雑* . 58: 697-704.
- Han, X. Y., L. S. Wang, Q. Y. Shu, Z. A. Liu, S. X. Xu and T. Tetsumura. 2008. Molecular characterization of tree peony germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Biochem. Genet.* 46: 162-179.
- Hao, Q., N. Aoki, J. Katayama, T. Kako, K. S. Cheon, Y. Akazawa and N. Kobayashi. 2013. Crossability of American tree peony 'High Noon' as seed parent with

- Japanese cultivars to breed superior cultivars.
Euphytica 191: 35-44.
- Hao, Q., Z. A. Liu, Q. Y. Shu, R. Zhang, J. D. Rick and
L. S. Wang. 2008. Studies on *Paeonia* cultivars and
hybrids identification based on SRAP analysis.
Hereditas 145: 38-47.
- 橋田亮二．1983．ぼたん栽培の歴史をたどる．植物と自
然．17: 8-12．
- 橋田亮二．1990．現代日本の牡丹・芍薬大図鑑．p. 9-182,
p. 242-246．日本ぼたん協会編著．講談社．東京．
- Hong, D. Y. 2021. *Peonies of the World, Part III:
Phylogeny and Evolution*. Royal Botanic Gardens,
Kew.
- 細木高志．2009．ボタンの研究（1）－ボタンの原種およ
び栽培品種の歴史と育種－．農業および園芸．84:
1141-1152．
- 細木高志．2016．第9章ボタン．p. 207-230．柴田道夫
編．花の品種改良の日本史．悠書館．東京．
- Hosoki, T., M. Hamada, T. Kando, R. Moriwaki and K.
Inaba. 1991. Comparative study of anthocyanins in

tree peony flowers. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60: 395-403.

Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki. 1997a. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 66: 393-400.

Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki. 1997b. Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Sci. Hortic. 70: 67-72.

Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa and K. Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. Plant Tissue Cult. Biotechnol. 4: 76-80.

Kobayashi, N., M. Matsunaga, A. Nakatsuka, D. Mizuta, M. Shigyo and M. Akabane. 2013. Chimeric inheritance of organelle DNA in variegated leaf

- seedlings from inter-subgeneric crossing of azalea.
Euphytica 191: 121-128.
- 劉政安．2003．ボタンの促成並びに抑制栽培に関する研究．鳥取大学大学院連合農学研究科学位論文．
- Ma, J., N. Aoki and Q. Hao. 2012. Abilities of forcing culture of hybrid tree peony 'Oriental Gold' for December shipping. *J. Japan. Soc. Agr. Tech. Man.* 18: 197-203.
- 松江大根島牡丹協議会．2015．牡丹名鑑．松江大根島牡丹協議会．島根．
- 宮澤文吾．1940．花木園芸．p. 35-38．養賢堂．東京．
- 持田耕平・加古哲也・杉山万里・中務明・小林伸雄．2020．ボタンにおける RAPD マーカーを用いた実用的な品種識別方法の確立．園学研．19: 121-129.
- Mochida, K., A. Nakatsuka, T. Kako and N. Kobayashi. 2022. Development of DNA Markers for Interspecific and Intersubgeneric Hybrids Involved in Tree Peony Cultivar Groups. *Hort. J.* 91: 382-387.
- Punina, E. O., E. M. Machsa, E. E. Krapivskayaa and A. V. Rodionova. 2017. Polymorphic sites in transcribed spacers of 35S rRNA genes as an indicator of origin

- of the *Paeonia* cultivars. Russian J. Genet. 53: 202-212.
- しまねの園芸研究. 2019. 『牡丹名鑑』の編纂とDNAマーカーを用いたボタンの品種識別. P. 43.
- Stern, F. C. 1943. Genus *Paeonia*. J. R. Hortic. Soc. 68: 124-131.
- 杉山万里. 2004. RAPDマーカーを利用したボタン主要品種の識別. 島根農試研報. 35: 53-66.
- Sun, M., Y. Z. Wang, Y. Yang, M. W. Lv, S. S. Li, J. A. Teixeira da Silva, L. S. Wang and X. N. Yu. 2021. Analysis of chemical components in the roots of eight intersubgeneric hybrids of *Paeonia*. Chem. Biodivers. 18: e2000848. DOI: 10.1002/cbdv.202000848.
- Suo, Z., W. Li, J. Yao, H. Zhang, Z. Zhang and D. Zhao. 2005. Applicability of leaf morphology and intersimple sequence repeat markers in classification of tree peony (*Paeoniaceae*) cultivars. HortScience 40: 329-334.
- Wang, S., J. Xue, N. Ahmadi, P. Holloway, F. Zhu, X. Ren and X. Zhang. 2014. Molecular characterization and expression patterns of *PsSVP* genes reveal distinct

- roles in flower bud abortion and flowering in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Canadian J. Plant Sci. 94: 1181–1193.
- Xue, Y., R. Liu, J. Xue, S. Wang and X. Zhang. 2021. Genetic diversity and relatedness analysis of nine wild species of tree peony based on simple sequence repeats markers. Hort. Plant J. 7: 579–588.
- Yang, Y., M. Sun, S. Li, Q. Chen, J.A. Teixeira da Silva, A. Wang, X. Yu and L. Wang. 2020. Germplasm resources and genetic breeding of *Paeonia*: a systematic review. Hort. Res. 7: 107. DOI: 10.1038/s41438-020-0332-2.
- Zhang, J. J., Q. Y. Shu, Z. A. Liu, H. X. Ren, L. S. Wang and E. De Keyser. 2012. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. Plant Cell Rep. 31: 299–310.
- Zhao, M. and S. P. Wu. 2019. A review of the ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of tree peony (Sect. Moutan). South African J. Bot. 124: 556–563.
- Zhao, X., Z. Q. Zhou, Q. B. Lin, K. Y. Pan and M. Y. Li. 2008. Phylogenetic analysis of *Paeonia* sect. *Moutan*

(Paeoniaceae) based on multiple DNA fragments and morphological data. *J. Syst. Evol.* 46: 563–572.

鄭光中．1993．島根県八束町におけるボタンと薬用人参の生産．*季刊地理学*．45: 98–110．

Zhou, S. L., C. Xu, J. Liu, Y. Yu, P. Wu, T. Cheng and D. Y. Hong. 2020. Out of the Pan-Himalaya: evolutionary history of the Paeoniaceae revealed by phylogenomics. *J. Syst. Evol.*
DOI: 10.1111/jse.12688.

Zhou, S.L., X. H. Zou, Z. Q. Zhou, J. Liu, C. Xu, J. Yu, Q. Wang, D. M. Zhang, X. Q. Wang, S. Ge, T. Sang, K. Y. Pan and D. Y. Hong. 2014. Multiple species of wild tree peonies gave rise to the ‘king of flowers’, *Paeonia suffruticosa* Andrews. *Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sci.* 281(1797). 20141687.
DOI: 10.1098/rspb.2014.1687.

Summary

Tree peony (*Paeonia* spp.) is a shrub with high ornamental value originally from China. Several cultivar groups have developed involving several wild species. The ornamental tree peony has been popular in Japan from ancient times and has a cultivation history of more than 1000 years. After World War II, Daikonshima Island in Shimane Prefecture has been the center of tree peony production in Japan. Currently, hundreds of thousands of tree peony nurseries were produced in the island each year. Tree peony is the main floricultural products of Shimane prefecture. Some problems in curation of cultivars and breeding program are included in the production field.

In this thesis, the history of tree peony cultivars and their development were reviewed, firstly. The current status and problems of tree peony production in Shimane Prefecture were also explained.

And the practical method to identify cultivars using DNA markers was developed for improving the curation of tree

peony cultivars. In addition, the DNA markers to detect the genetic involvement of the wild species were developed, and the genetic background of cultivars bred by distant hybridization were analyzed.

In Chapter 1, the characteristics of the wild species involved in this thesis and the history of cultivar development of each group of tree peony cultivars were summarized. The problems of tree peony production in Shimane Prefecture, the Japanese largest production area, are also explained.

The tree peony cultivars can be divided into four main groups; Chinese, Japanese, French, and American, according to their morphological characteristics and geographical background, as well as wild species involved in their breeding. In addition to these four cultivar groups, a hybrid group between the groups, and a group of inter-subgeneric hybrids between herbaceous and tree peony were bred. The French and American cultivars were developed by crossing *P. lutea* and *P. delavayi* with Japanese and Chinese cultivars belongs to *P. suffruticosa*.

P. lutea was also involved in breeding of inter-subgeneric hybrids between herbaceous and tree peony.

Next, two problems in the current status of tree peony production in Shimane Prefecture were raised. One is the confusion and contamination of cultivars due to similar phenotypes and similar cultivar names in the production field. Another is the lack of cultivar innovation because of breeding based on cross progenies within *P. suffruticosa*, except for inter-specific and inter-subgeneric hybrids.

In Chapter 2, to develop a practical method to identify tree peony cultivars, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis were attempted to distinguish 353 tree peony cultivars cited in the “Botan meikan” directory (Matsue Daikonshima Tree Peony conference, 2015). Using 29 primers, 48 RAPD markers that identify polymorphisms among peony cultivars were obtained. All of the cultivars, except eight bud mutation groups and two presumed synonymous cultivars, could be distinguished using the 48 RAPD markers. Parents, offspring, and

sibling cultivars could be distinguished using these markers.

On the comparison of RAPD band patterns between cultivar groups, specific bands of American and French cultivar groups, and the cultivar group of inter-subgeneric hybrids with herbaceous peonies were obtained. To confirm the effectiveness of the developed markers in the field, cultivar identification was performed using specimens in an exhibition garden. The cultivar names inferred from RAPD markers were matched with the labeled names almost of all of the tested individuals.

These results indicate that the RAPD markers developed in this chapter are effective for the curation of tree peony cultivars.

In Chapter 3, phylogenetic relationships among major cultivar groups in the genus *Paeonia* L. were evaluated using a dendrogram reconstructed from band pattern data of RAPD markers developed in a Chapter 2. Two sequence tagged site (STS) markers were also developed using RAPD

markers specific to the French and American cultivar groups and an inter-subgeneric hybrid. The developed LuDeB marker was suggested to be a marker to prove the genetic background of the introduction of the innovative yellow flower color from the crosses with *P. lutea* and *P. delavayi*. The HPB marker was suggested to be a marker to identify the cpDNA of herbaceous peony in inter-subgeneric hybrid cultivars between herbaceous and tree peony which introduced superior traits of herbaceous peonies into tree peonies.

In the developmental history of cultivars of the genus *Paeonia*, innovative improvements were made by introducing genes through inter-specific and/or inter-subgeneric crossing. The developed two DNA markers; LuDeB and HPB, are innovative markers that can identify notable crossbreeding achievement in the history of peony cultivars. The DNA markers of identification of gene introduction from different species, are useful as selection markers in inter-specific and inter-subgeneric crosses for efficiency in the future tree peony breeding.

The results of this thesis indicate following. A new method to identify tree peony cultivars using RAPD markers which developed in this study, can be able to more certain curation of tree peony in the fields. The results of the analysis with two developed DNA markers; LuDeB and HPB, supported the introduction of innovative inter-specific and inter-subgeneric hybrid genes that played an important role in introducing new traits in the breeding history of cultivar development in the genus *Paeonia*.

The utilization of the developed DNA markers is expected to improve curation of cultivars not only fields but also distribution, sales and gardens, and to open the way for new breeding using inter-specific hybrids and inter-subgeneric hybrids of tree peony.

本論文の基礎となった学会誌公表論文リスト

第 2 章

持田 耕平・加古 哲也・杉山 万里・中務 明・小林 伸雄．2020．
ボタンにおける RAPD マーカーを用いた実用的な品種識
別法の確立．園芸学研究．19：121-129．

第 3 章

Kohei Mochida, Akira Nakatsuka, Tetsuya Kako and Nobuo
Kobayashi. 2022. Development of DNA Markers for
Interspecific and Intersubgeneric Hybrids Involved in
Tree Peony Cultivar Groups. The Horticulture Journal. 91:
382-387.

謝 辞

本論文のとりまとめに際し，ご親切なるご指導とご高
関を賜った島根大学生物資源科学部教授 小林伸雄博士
に厚くお礼申し上げます．

島根大学生物資源科学部准教授 中務明博士には多大
なるご助言と激励を，鳥取大学副学長 田村文男博士，
鳥取大学農学部准教授 田中裕之博士，島根大学生物資
源科学部助教 足立文彦博士には貴重なご助言とご鞭撻
を賜った．感謝の意を表します．

本試験の計画および遂行にあたってボタンの品種，栽
培，歴史に関して教示いただいた松江市花きセンター所
長 桑垣一成氏，松本農園 松本康市氏，元新潟県立植
物園園長 倉重祐二氏，島根県農業技術センター 加古
哲也博士，ボタンのDNA分析に関するご教示をいただい
た元島根県農業技術センター 杉山万里博士に心より感
謝申し上げます．

供試材料の採取に関してご協力いただいた島根県農林
水産部 平佐聡尚氏，松本農園 松本悠太氏に深く感謝
申し上げます．また，富山県中央植物園，しまね花の郷
から材料提供いただきました．厚くお礼申し上げます．

本試験遂行にあたって，多大なるご協力いただいた JA
しまねくにびき地区本部八束特産事業所の皆様，松江大
根島牡丹協議会の皆様に深く感謝申し上げます．

社会人学生としての勉学，職場での試験の遂行にあたり，
多大なるご協力および激励をいただいた島根県農業
技術センター 塚本俊秀氏，金森健一氏，椋重芳氏，郷
原優博士，元特産開発科および水田園芸科の皆様に深く
感謝申し上げます．また，吉田政昭元所長，長野正己元
所長，鳥屋尾健史元所長には，通学や研究遂行にあたり
ご理解，ご高配をいただいた．深く感謝の意を表します．

最後に，社会人学生としての研究生活を支え，応援し
てくれた家族に心から感謝します．

