

レトロトランスポゾンによる福岡県育成キク品種 「雪姫」, 「月姫」, 「秋華」, 「夏日和」の品種識別

平島敬太*・佐伯一直

福岡県育成のキク品種「雪姫」等の知的財産権侵害に対する抑止力を高め、適正な表示と流通を確保するために、国内で流通する主要な輪ギク品種に対するDNAマーカーによる品種識別技術の開発を行った。

キクのレトロトランスポゾン*CMRE 1*を基に設計・選定したIRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) マーカー 1種およびREMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) マーカー 9種は、輪ギク13品種間で多型を示した。本県育成の4品種「雪姫」, 「月姫」, 「秋華」, 「夏日和」は、国内で流通する主要な10品種に対して、IRAPマーカー 1種とREMAPマーカー 2種 (CRF151-827, CRF151-816) のマーカーを利用することにより識別できた。

[キーワード: キク, 品種識別, DNAマーカー, IRAP, REMAP, レトロトランスポゾン]

Discrimination of Chrysanthemum Cultivars “Yukihime”, “Tsukihime”, “Shuka” and “Natsubiyori” bred at the Fukuoka Agricultural Research Center by Retrotransposon DNA Markers. HIRASHIMA Keita and Kazunao SAEKI (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 31: 49-53 (2012)

To protect intellectual property and to ensure correct labeling of chrysanthemum varieties in the marketplace, it is important to have an accurate and reliable marker system. We developed a system to discriminate varieties of chrysanthemums using retrotransposon DNA markers. Inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) and retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers were designed from retrotransposon *CMRE1*, and showed polymorphisms among 13 chrysanthemum cultivars. Four varieties that were bred at the Fukuoka Agricultural Research Center (“Yukihime”, “Tsukihime”, “Shuka”, and “Natsubiyori”) were distinguished from 10 domestic varieties using an IRAP marker and two REMAP (CRF151-827, CRF151-816) markers.

[Key words : *Chrysanthemum × morifolium* Ramat., variety identification, DNA markers, IRAP, REMAP, Retrotransposon]

緒 言

福岡県は、輪ギク (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) 出荷量9,510万本で、愛知県に次ぐ全国第2位の生産地である(花き生産出荷統計2009年度版)。その輪ギクのうち約7割が白輪ギクである。市場に流通する白輪ギクは、海外からの輸入品増加に伴い、県産品を含めて低価格化が進行し(花きをめぐる情勢2011)、栽培農家の経営は厳しさが増す一方である。このため、輸入品や他県産の輪ギクに対抗できる本県オリジナルの品種として、2008年には「雪姫」(登録番号16874)、「秋華」(登録番号16979)が、2010年以降には「夏日和」(登録番号18908)、「月姫」(登録番号21096)が品種登録された。これらの中でも「雪姫」は、透明感のある純白で抱え咲きの大きな花形、水揚げが良い等の優れた特性を持つ品種として高い市場評価を受け、県外への栽培許諾も増加して、市場での占有率拡大が進んでいる。

この様な国内外における激しい産地間競争においては、ブランド品種の適正な表示を担保し、知的財産権(育成者権)の侵害に対する抑止力を高め、適正で公正な市場流通を確保することが重要である。そのためには、正確にオリジナル品種であることを識別する技術が必要である。

農作物の種、属、品種の識別や遺伝的な分類は、本来形態的な特徴の区別性に基づくものであるが、近

年は迅速性や客観性に優れたDNAマーカーを利用した解析手法が利用されている。キク科植物においては、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA technique : Wolffら1995, Chatterjeeら2005, Yangら2006, 吉川ら2008), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism:Wolffら1995), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat :Yangら2006), IGSAP (Intergenic Spacer region Amplified Polymorphism: 谷口2008), SSR (Simple Sequence Repeat : 江口ら2010)等の適用が報告されている。ただし、輪ギクはガンマ線やイオンビームの照射、さらには栽培ほ場での自然突然変異によっても新品種が派生し、この様なDNAレベルでの変異が極めて少ない突然変異体の識別は、上記の様な多様なDNAマーカー解析手法を利用しても困難と考えられてきた。

しかしながら、イオンビーム照射による突然変異体として得られたキク品種を識別できる手法として、レトロトランスポゾンをマーカーとする手法(阿部ら2007, 松山・白尾2009)が報告された。レトロトランスポゾンは、環境ストレス等により活性化し、転写した自身の配列を宿主ゲノムの異なる位置に挿入することで転移する遺伝子であり、一度挿入された配列は安定的に遺伝する(Kumar and Bennetzen 1999)。また、全ての真核生物のゲノムに多数のコピーが散在しているため、遺伝的多様性の評価に適する優れた遺伝子マーカーとなることが知られている(Waughら

1997, Flavellら1998, Kumar and Hirochika 2001)。キクのレトロトランスポズンは、唯一逆転写酵素に対応する配列CMRE1 (Accession No.AB033265) が登録されている。阿部ら (2007) や松山・白尾 (2009) の報告もCMRE1の散在に由来する多型検出にRBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms) のSTS (Sequence Tag Site) 化やRAPD用プライマーを組み合わせて、特定の品種に特異的なマーカーを開発したものである。この様にレトロトランスポズンは、キクの品種識別に対しても極めて有用なマーカーとなり得るが、本県で育成した品種の識別に対する適用例はない。

また、レトロトランスポズンのゲノムにおける散在性を基本とするマーカー検出手法としては、他にもS-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (REtrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) が多くの作物で報告されている (Waughら1997, Kalendarら1999, Priceら2003, 大江ら2004, Guoら2006, Biswasら2010)。その中でもIRAPとREMAPは、S-SAPに比べて制限酵素処理やアダプター配列の付加操作が不用で、基礎的なPCRと検出操作だけで完結できる等、操作が簡素な点で優れている。

そこで、本県で育成した「雪姫」等の4品種を市場に流通する主要品種に対して識別するためにIRAPやREMAPに基づくDNAマーカーの開発を試みた。

材料および方法

1 供試品種およびDNA抽出

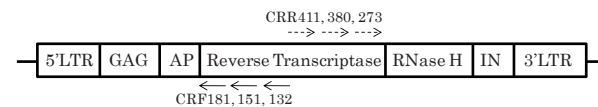
識別対象の品種は、本県で育成した「雪姫」, 「月姫」, 「秋華」, 「夏日和」の4品種とした。比較品種は、2009年に日本花普及センターがまとめた花き品種別流通動向分析調査結果に含まれる主要な品種、または上記4品種と生態的特徴が似ている10品種 (第2表) とした。

各品種から、新葉、硬化葉、花卉組織を各50mg採取し、直径5mmのジルコニアボールと共に2mLセーフロックチューブに詰めて、液体窒素で凍結した。続いて、自動破碎装置 (MM400 Mixer Mill型; Retsch GmbH & Co. KG社製) により破碎し、Mag Extractor Plant Genome Kit (TOYOBO社製) によりゲノムDNAを抽出した。その際に以下の点を添付マニュアルより変更した。①溶解液に1%濃度でβ-メルカプトエタノールを添加した。②抽出操作行程の全ての溶液量を1/2量とした。③DNA溶出液のTEを1/10濃度とした。また、抽出したDNAの濃度が50~100ng/μLの範囲、UV Ratio (A260/A280, A260/A230) がそれぞれ1.8, 2.2以上であることを確認してマーカー検出に供試した。

2 IRAPマーカー検出

キクのレトロトランスポズンCMRE1 (Reverse Transcriptase, Accession No.AB033265) の内部配列に対し、5'側および3'側の外側に向け、それぞれ3種プライマーを設計した (第1図)。これらプライマーは、第3図上に示した3種 (RF, RR, FF type) PCR産

物の生成を考慮し、5'側および3'側プライマーを組み合わせて利用した。プライマー濃度を各0.5μMとし、抽出したDNA 10ngを鋳型に、AmpliTaqGold PCR Master Mix (Applied Biosystems製) を6μL、滅菌水を加えて全量12μLとした。サーマルサイクラーのPCR反応プログラムは、1サイクル: 95°C (5min), 40サイクル: 95°C (15sec), 60°C (30sec), 72°C (1min), 1サイクル: 72°C (7min) とした。PCR反応産物は、0.9%のSeaKem GTGアガロースゲルにて80Vで電気泳動し、増幅断片の有無やサイズを画像解析装置 (Fluorchem8900:Alphainnotech社) で確認した。なお、採取時期の異なる14品種の新葉および硬化葉より個別に抽出したDNAで3回の解析を行い、各採取時期を通じて再現性の高い増幅バンドを識別マーカーとした。



第1図 Ty3-gypsy型レトロトランスポズンの構造とCMRE1に対するIRAPプライマー設計概要

- 1) ---> : 3'LTR配列下流への伸長反応用プライマー
<--- : 5'LTR配列上流への伸長反応用プライマー
LTR : Long-Terminal Repeats,
GAG : Group-specific AntiGen
AP : Aspartic Proteinase, IN : Integrase

3 REMAPマーカー検出

第3図下に示した3種 (MF, RM, MM type) PCR産物の生成を考慮して、IRAPマーカーの増幅を確認したプライマー2種 (第1表) に対し、UBCプライマーセット (The University of British Columbia製, Canada) #9の13種を用いた。IRAP用2種プライマーとUBC13種プライマーを一对とする26組み合わせをプライマーセットとし、IRAP同様の組成で全量12μLに調整した。PCR反応にはタッチダウンサイクルを加えた。すなわち、1サイクル: 95°C (5min), 6タッチダウンサイクル: 95°C (15sec), 65°C -55°C (2°C/サイクルの降温30sec), 72°C (1min), 34サイクル: 95°C (15sec), 55°C (30sec), 72°C (1min), 1サイクル: 72°C (7min) とした。PCR反応産物は、アガロース電気泳動およびマイクロチップ電気泳動装置MultiNA (島津製作所製) により、増幅断片のサイズやパターンを確認した。なお、IRAP同様に個別に3度採取抽出したDNA試料、および個別に合成したロットの異なるプライマーを用いて再現性を確認し、識別性に優

第1表 IRAP, REMAP用プライマー

プライマー	塩基配列(5'-3')	塩基数	Tm値(°C)	
IRAP	CRF151	CGGGAGTGGGTAACGGTTCT	20	59.5
	CRR411	CGCACCAGCTGTGTTTCATGG	20	59.5
REMAP	CRF151	CGGGAGTGGGTAACGGTTCT	20	59.5
	CRR411	CGCACCAGCTGTGTTTCATGG	20	59.5
	UBC810	(GA)8T	17	49.8
	UBC816	(CA)8T	17	49.8
	UBC817	(CA)8A	17	49.8
	UBC819	(GT)8A	17	49.8
	UBC821	(GT)8T	17	49.8
	UBC826	(AC)8C	17	52.2
	UBC827	(AC)8G	17	52.2

注)Tm:melting temperature

れるマーカーを選定した。

結 果

1 IRAPマーカー

CMRE1の内部配列に対し、外側に向けて設計した6種プライマーのうち、増幅産物を認めたのは、CRF151とCRR411の組み合わせであった。14品種における増幅産物の電気泳動像を第2図上段に、マーカーの識別パターンを第2表に示した。「月姫」,「神馬」,「新神」,「秀芳の力」,「山陽黄金」,「岩の白扇」,「精雲」では約3100bpの増幅産物Aが、「月姫」,「秋華」,「フローラル優香」では約2500bpの増幅産物Bが認められた。しかし、「雪姫」,「夏日和」,「精興の誠」,「精興の秋」,「精興光明」では、両増幅産物は認められなかった。14品種の中で「月姫」は、単独で増幅産物AおよびBを併せ持つことから、CRF151とCRR411を用いたIRAPにより、他の品種に対して識別できることが明

らかとなった。

なお、DNA抽出に用いた新葉、硬化葉、花卉組織の試料および採取時期の異なる新葉、硬化葉からは、いずれも同一のマーカー識別パターンが得られることを確認した。

2 REMAPマーカー

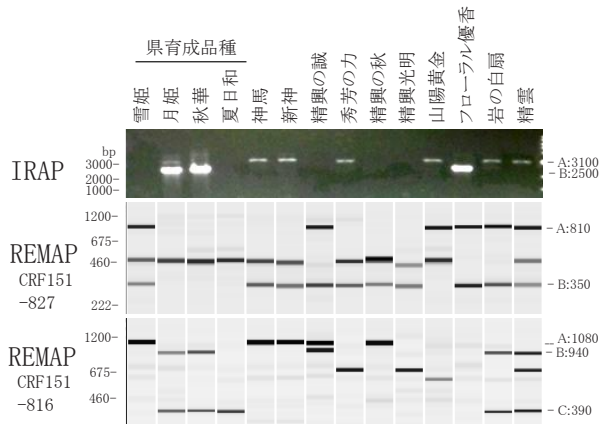
IRAPで品種間多型を示したプライマーのCRF151およびCRR411に対し、UBCプライマーセット#9の13種を組み合わせた結果、増幅産物を確認できたのは26組み合わせ中20組み合わせであり、識別性の高い品種間多型が認められたのはそのうち7種プライマー(第1表)による9組み合わせ(第2表)であった。14品種における増幅産物の電気泳動像の例を第2図中下段に、プライマーセットとの組み合わせにおけるマーカーの識別パターンを第2表に示した。

これら14品種のREMAPマーカーパターンの中で、単独で品種特定が可能なパターンを示したのは、CRF151-816における「夏日和」,「精興の誠」,CRF151-821における「精興の秋」,「山陽黄金」,CRF151-810における「精興の誠」,「山陽黄金」であった。その他の品種の識別は、「神馬」と「新神」の識別を除き、3種以上のマーカーを組み合わせることによって相互識別が可能であった。例えば、県育成の4品種を相互に、かつ他の10品種に対して識別するためには、CRF151-827, CRF151-816, CRR411-819を併用すれば可能であった。

なお、試料組織および採取時期によりマーカー識別パターンに違いがないことを確認した。

考 察

今回のキク14品種の識別性マーカー探索において、IRAPおよびREMAPマーカーは再現性の高い多型を示し、5品種については、単独のマーカーで品種固有



第2図 輪ギクの品種識別に有効な DNA マーカーの電気泳動像

- 1) IRAPは0.9%アガロースゲルでの分離
- 2) REMAPはMulti NA DNA2500 kit での分離

第2表 輪ギクの品種識別に有効な DNA マーカーの多型

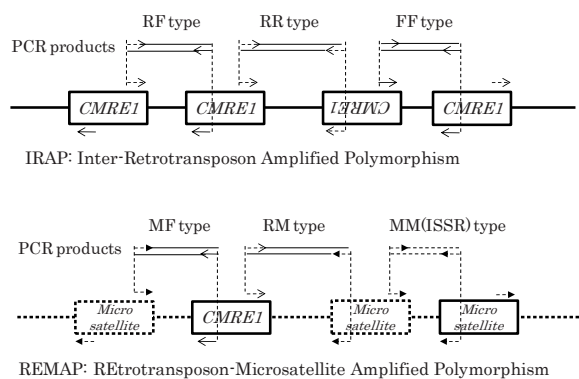
品種名	IRAP		REMAP							
	CRF151	CRF151	CRF151	CRF151	CRR411	CRF151	CRR411	CRF151	CRF151	CRR411
	-R411	-827	-816	-821	-819	-810	-817	-819	-826	-827
	A:3100	A:810	A:1080	A:610	A:740	A:640	A:530	A:1100	A:600	A:570
	B:2500	B:350	B:940	B:560	B:300	B:550	B:450	B:420	B:530	B:350
			C:390	C:180						
雪姫		AB	A		A			A	B	AB
月姫	<u>AB</u>		BC	A			A	A	B	
秋華	B		BC	A	B			A		
夏日和			<u>C</u>	A	AB			A	B	
神馬	A	B	A	C	A			A		AB
新神	A	B	A	C	A			A		AB
精興の誠		AB	<u>AB</u>	C	A	<u>A</u>		A	B	AB
秀芳の力	A	B		A	B		B	A		B
精興の秋		B	A	<u>A C</u>	AB		B	A		B
精興光明		B							B	AB
山陽黄金	A	<u>A</u>		<u>BC</u>		<u>B</u>	A	A		
フローラル優香	B	AB			A			B	AB	AB
岩の白扇	A	AB	BC		AB			B	AB	AB
精雲	A	AB	BC		A				AB	AB

- 1) アンダーラインは、単独で品種特定が可能なマーカーパターン
- 2) 神馬と新神は同じマーカーパターンを示すため、識別不可
- 3) 空白は識別マーカーが検出されないことを示す

の識別パターンを示した(第2表)。しかしながら、「雪姫」や「秋華」、他の品種においては、単独マーカーで品種固有のパターンを得ることはできず、複数マーカーのパターン比較による識別が必要であった。

IRAPは、*CMRE1*の隣接距離の相違に基づいて3タイプの増幅産物の有無やサイズが決定される多型である(第3図上)。今回キク14品種の識別性を示した増幅産物は、Aが約3100bp、Bが約2500bpであり、PCRによる検出対象としては比較的サイズが大きい。その要因としては、塩基配列情報が明らかな逆転写酵素領域にプライマーを設計したことにより、PCR産物はレトロトランスポゾン配列の中央に近い位置からLTR配列を含んで外側に向かって増幅されたため(第1図)と考えられる。PCR反応の安定性、検出と識別性を考慮すれば、識別に利用するPCR増幅産物サイズは100~1000bpの範囲が適しているため、Kalendarら(1999)やPriceら(2003)の様にレトロトランスポゾンの両端に位置するLTR配列にIRAPのプライマーを設計配置することが増幅産物サイズを小さくし、マーカーの出現頻度を高める上で望ましいと考えられる。今後はLTR配列を含む*CMRE1*の全塩基配列を取得し、新たなIRAPプライマーをより外側に設計することで、PCR増幅産物サイズが比較的小さいマーカーを追加獲得することが課題である。

REMAPは、第3図で示すように*CMRE1*やマイクロサテライト(SSR)配列の散在と隣接距離によって、IRAPの1タイプ(FF typeまたはRR type)に加えて3タイプのPCR増幅産物のサイズやパターンに相違が生じる。今回多型を示したマーカーは、SSRの散在の多様さに由来すると考えられ、レトロトランスポゾンとSSRを組み合わせたREMAPは、相乗的にマーカー出現頻度が高くなることを示している。



第3図 IRAP, REMAPにおけるプライマーのアニール位置とPCR増幅パターン

- 1) → : 3'LTR配列下流への伸長反応用プライマー
 ← : 5'LTR配列上流への伸長反応用プライマー
 → : Micro satellite 3'下流への伸長反応用プライマー
 RF: CRR-CRF primer products, RR: CRR-CRR, FF: CRF-CRF,
 MF: Micro satellite-CRF, RM: CRR-Micro satellite,
 MM: Micro satellite-Micro satellite,
 ISSR: Inter-Simple Sequence Repeat

農作物の品種識別マーカーは、理想的にはCRF151-810における「精興の誠」、「山陽黄金」の様に単一品種に対応した単独マーカーパターンが望まれる。それは、穀物や加工品など主要な農産物の流通形態として複数品種のブレンド商品が存在し、その様な商品に含

まれる品種の特定には、複数マーカーの組み合わせパターンでの識別では対応できないためである。しかしながら、キクの流通形態にその様なブレンド商品は存在しない。したがって、本研究で得られた複数マーカーの組み合わせパターン、例えば最低3マーカーCRF151-CRR411, CRF151-827, CRF151-816の併用で「雪姫」、「月姫」、「秋華」、「夏日和」の相互識別、および他10品種に対する識別パターンによる判定でも実用性に支障はない。

ちなみに、今回選定したIRAPおよびREMAPの全マーカーを用いた場合に、ある持ち込まれた異品種が比較14品種と同一のマーカーパターンを偶然に示す確率は、 $P = 1 - (1 - P_0^k)^n = 0.0069 \sim 0.000017$ (ただし、 P_0 =同一アレルの頻度=0.203~0.467, n =品種数=14, k =ローカスの数=10)であり(DNA品種識別技術検討会2003)、本研究の品種識別精度は十分に高いと考えられる。

なお、①試料は新葉、硬化葉、花卉のいずれでも対応可能で、②搬入から識別が完了するまでの所要時間は、使用するマーカーや試料の数により異なるが、24試料を本報告の手法で解析した場合は約8時間程度であり、③品種識別手法に求められる簡素な操作性や迅速性の点でも実用性が高いものとする。

これまでに、植物の遺伝的な多様性の解析や品種識別にはRFLP, RAPD, AFLP, SSR, SNP等のDNAマーカーがキクに限らず多様な作物で利用されてきた。今回利用したIRAPやREMAPは、Kalendarら(1999)によってオオムギに多数散在するレトロトランスポゾン*BARE-1*およびSSR間の多型検出法として最初に報告された手法であり、その後、アブラヤシ、カキ、イネ、カンキツ等の遺伝的類似性解析(Priceら2003, Guoら2006, Casteloら2007, Biswasら2010)等に利用された。

その特長は、緒言で述べたレトロトランスポゾンの特長に加えて、①植物に普遍的に数多く散在するSSRを活用できること、②高度に保存された塩基配列に基づく特異的プライマーを設計できること、これらを応用することにより、③基礎的なPCR操作と検出装置だけで安定したマーカーパターンが得られることなどである。キクにおいても近縁野生種のIRAP解析と品種識別適用への可能性が報告(岸脇ら2008)され、本報告においてはIRAPにREMAPを加えて主要な市場流通品種の識別を実証したものである。この様なレトロトランスポゾンの種、属、品種の識別におけるDNAマーカーとしての有用性は、特に倍数性や異質接合性の高い栄養繁殖性植物において高いとされ(大江ら2004)、他殖性6倍体のキクにおいても十分に機能したものと推察される。

今後は、単一品種に対応した単独マーカーパターンが得られなかった本県育成品種の「雪姫」や「秋華」に対し、*CMRE1*に組み合わせるSSRのプライマー種を増やすこと、*CMRE1*以外のレトロトランスポゾン配列情報を新たに取得して今回同様に新規のマーカーを探索すること、さらにはSTS化(阿部ら2007)の適用等により、各品種の固有マーカーを開発し、識別精度のさらなる向上を図ることなどが望まれる。

引用文献

- 阿部知子・松山知樹・白尾 吏・上野敬一郎 (2007) キク品種識別方法. 特許公開2007-244334A.
- Biswas MK, Xu Q, Deng XX (2010) Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. *Scientia Horticulturae* 124 : 254-261.
- Castelo J. S. Branco, Eduardo A. Vieira, Gaspar Malone, Mauricio M. Kopp, Emilia Malone, Albina Bernardes, Claudete C. Mistura, Fernando I. F. Carvalho and Costa A. Oliveira (2007) IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *J. Appl. Genet.* 48(2) : 107-113.
- Chatterjee J, Mandal AK, Ranade SA, Datta SK (2005) Estimation of genetic diversity of for Chrysanthemum mini cultivars using RAPD. *Pakistan J. Biol. Sci.* 8(4) : 546-549.
- DNA品種識別技術検討会 農林水産省生産局種苗課 (2003) 植物品種識別における品種同定理論.p3.
- 江口恭三・山川 理・金森裕之・伊川浩司・安藤 露・濱口祐子・石内美沙紀・百瀬眞幸・大塚雅子 (2010) キクの品種識別方法. 特許公開2010-35499A.
- Flavell AJ, Knox M, Pearce SR, Ellis THN (1998) Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.* 16 : 643-650.
- Guo D, Zhang H, Luo Z (2006) Genetic relationship of *Diospyros kaki* Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. *Plant Sci.* 170 : 528-533.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP : Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 704-711.
- 岸脇由季・小田雅行・森源治郎・山崎織知・中塚貴司・西原昌宏・三柴啓一郎 (2008) キクにおける Ty3/gypsy型レトロトランスポゾンの解析. *育種学研究* 10 (別 2) : 325.
- Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33 : 479-532.
- Kumar A, Hirochika H (2001) Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends Plant Sci.* 6 : 127-134.
- 松山知樹・白尾 吏 (2009) キク品種「新神 2号」の識別方法. 特許公開2009-172468.
- 農林水産省大臣官房統計部 (編) (2011) 花き生産出荷統計 (2009年度版) .p21.
- 農林水産省花き産業振興室 (編) (2011) 花きをめぐる情勢. p17.< <http://www.maff.go.jp/j/seisan/kaki/flower/pdf/meg231.pdf>> (2011年 6月24日閲覧)
- 大江夏子・田原 誠・山下裕樹・丸谷 優・蔵之内利和 (2004) レトロトランスポゾンを利用したサツマイモ加工品の原料品種判定. *育種学研究* 6:169-177.
- Price Z, Schulman AH, Mayes S (2003) Development of new marker methods an example from oil palm. *Plant. Genet. Resour.* 1 : 103-113.
- 谷口研至 (2008) キク属植物を識別する方法. 特許公開 2008-334885.
- Waugh R, McLean K, Flavell AJ, Pearce SR, Kumar A, Thomas BBT, Powell W (1997) Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol. Gen. Genet.* 253 : 687-694.
- Wolff K, Zietkiewicz E, Hofstra H (1995) Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 439-447.
- Yang W, Beverley JG, Guang YR, Yang J (2006) Molecular evidence for multiple polyploidization and lineage recombination in the Chrysanthemum indicum polyploid complex (Asteraceae). *New Phytologist.* 171 : 875-886.
- 吉川友紀・水上優子・竹内良彦・大竹良知 (2008) DNAマーカーによる愛知県育成キク品種「白粋」の品種識別. *愛知農総試研報* 40 : 29-33.