ボタンボウフウ(長命草)の栽培植物化に向けた基礎研究

一谷 勝之[1]・志水勝好[2]

1. 鹿児島大学 農学部 農業生産科学科 植物育種学研究分野
〒890-0065 鹿児島市郡元１−２１−２４
TEL: ０９９−２８５−８５４７

2. 鹿児島大学 農学部 農業生産科学科 比較環境農学研究分野
〒890-0065 鹿児島市郡元１−２１−２４
TEL: ０９９−２８５−８５４２

要旨

ボタンボウフウ(*Peucedanum japonicum*)は南九州から沖縄地方にかけて海岸沿いに自生するセリ科の野草で，葉は食される．亜種レベルでボタンボウフウ(狭義) (*P. japonicum* var. *japonicum*)，コダチボタンボウフウ (*P. japonicum* var. *latifolium*)，ナンゴクボタンボウフウ (*P. japonicum* var. *australe*)に分化している．本研究では GRAS-Di®で得られていたデータに基づき，DNA マーカーを作成し，ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの遺伝的多様性と亜種分化に関する知見を得ることとした．GRAS-Di®に基づき，両亜種の DNA 塩基配列の違いを識別できる CAPS マーカー(DNA マーカーの一種)を 22 個作成した．そのうち 8 種類は両亜種を完全に識別したが，10 種類は両亜種内で DNA 多型が共有された．4 種類は遺伝子型の判別が困難であった．DNA マーカーを用いることで，亜種内ならびに亜種間の集団構造を遺伝的に理解できるようになる．これにより，ボタンボウフウの栽培植物化に向けた研究が進むことが期待される．また，本研究で用いた手法は，ゲノム解析が進んでいない作物種，在来品種の研究に有用であろう．

1 緒言

ボタンボウフウ(*Peucedanum japonicum*)は南九州から沖縄地方にかけて海岸沿いに自生するセリ科の野草である．沖縄では長命草と呼ばれ，南さつま市では市ぐるみでボタンボウフウを用いた町興しが行われている．近年になって注目を浴びるようになった植物であるため，基礎的知見に乏しい．

ボタンボウフウは亜種レベルでボタンボウフウ(狭義) (*P. japonicum* var. *japonicum*)，コダチボタンボウフウ(*P. japonicum* var. *latifolium*)，ナンゴクボタンボウフウ (*P. japonicum* var. *australe*)に分化している[1)-2)]．私達はボタンボウフウ（狭義）とコダチボタンボウフウの両亜種から DNA を抽出し，次世代シークエンサーを用いた DNA 塩基配列の外部委託解析を実施していたが，データ解析が未定であった．本研究では得られていたデータに基づき，DNA マ

ーカーを作成し，ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの遺伝的多様性と亜種分化に関する知見を得ることとした．

2 材料及び方法

2. 1 植物材料

2016 年 4 月 27 日に六田農園(南さつま市)から分譲を受けたボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウ苗を鹿児島大学農学部附属農場に移植した．ボタンボウフウ(狭義)は多年草のため，農場に移植した状態で株保存している．コダチボタンボウフウは株についた種子を混合採種し，次世代を栽培した．その後も，放任受粉によって受粉させ，混合採種することで維持している．後述するように 2019 年 1 月に栽培していた株由来の DNA を用いて委託解析に回し，2021 年に同農場で育てているボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウからそれぞれ 11 個体選び，遺伝的多様性の解析に用いた．

2.2 DNA データ

2019 年 1 月にボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウそれぞれ 2 個体から DNeasy plant Minikit (QIAGEN 社，ドイツ)を用いて DNA を抽出した．1 個体から健全な葉約 120mg を採取し，液体窒素を使って粉砕し，その後はプロトコールに従った．この方法で 1 個体あたり 10μg 以上の DNA が得られた．この DNA をユーロフィンジェノミクス(東京)に送り，GRAS-Di®による解析を委託した．GRAS-Di® は正式名称を Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct というトヨタ自動車が開発した新規 DNA 解析技術である（https://www.eurofinsgenomics.jp/jp/service/ngs/gras-di.aspx）．4 個体の合計で 90bp 以下の DNA 塩基配列情報を約 10 万個得た．この情報を基に CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence, 別名を PCR-RFLP (polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism))[3]という種類の DNA マーカーを作成した．まず，ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウとの間で全体的には類似しているが一部で差のある DNA 塩基配列の組み合わせを選抜し，その中で制限酵素によって一方が 1 箇所で切断され，もう一方が切断されない物を選抜した．次いで Primer3 (v. 0.4.0) (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)[4)-5)]を用いて塩基配列の差を挟むようにプライマーを設計した．プライマーの設計条件は，PCR 産物の大きさ 40bp-90bp の範囲，Tm 値が 57℃から 65℃の範囲でプライマー間の Tm 値の温度差が 2℃以内，プライマーの長さは 18 塩基から 30 塩基でそれ以外の条件は初期設定を維持した．BLAST+を https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download からダウンロードして研究室のパーソナルコンピュータにインストールし，プライマーをクエリ，GRAS-Di®で得た全塩基配列をサブジェクトとして相同性検索を行い，選抜した配列にしかプライマーと同じ配列が存在しないようにプライマーを設計した．もし，そのようなプライマーが設計できない場合は，対象とする DNA 塩基配列に基づくプライマーの設計を諦めた．プライマーとなるオリゴ DNA の合成はファスマック(厚木市)に委託した．

2. 3 PCR および電気泳動

5-20ng/µl の濃度に調整した DNA を鋳型として 1µl 供試し, DNA を含む全体の液量を 4-5µl に調整して PCR を行った．PCR 後，ボタンボウフウとコダチボタンボウフウの DNA 塩基配列の一方だけを切断する制限酵素を加え，制限酵素の至適温度で 2 時間処理後，アクリルアミドゲル電気泳動を行い，エチジウムブロマイドで DNA を可視化した．PCR および電気泳動の詳細は既報 [6]にしたがって行った．制限酵素処理は製造会社の発行するプロトコールに従った．プライマー設計の方法論およびその後の実験の流れについては，結果の項目で具体的に記す.

3 結果

3.1 解析結果の 1 例

Fig. 1 に GRAS-Di® の DNA 情報に基づく ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの DNA 塩基配列の違いを認識できる DNA マーカーの設計および実験の実際を示した．GRAS-Di®で解析された配列は, 互いに類似した DNA 塩基配列が隣接するように配置されているが，その中でも互いに極めて近い 2 塩基配列を目視によって選抜した．さらに，一方がボタンボウフウ(狭義)のみに見られ，もう一方がコダチボタンボウフウのみに見られる配列を選抜した. Fig. 1(A)では, AMP0099183 がコダチボタンボウフウのみに見られ, AMP0099184 がボタンボウフウ(狭義)のみに見られることを示している．次いで，タカラバイオ(草津市)が開発した制限酵素認識部位検索サイト Takara Cut-Site Navigator (https://www.takara-bio.co.jp/research/enzyme/enzyme_search.php)によって，2 塩基配列の差が制限酵素で認識されるかどうかを調査した．制限酵素で認識されない物，制限酵素で認識されても市販されていない制限酵素であったり，非常に高価な制限酵素である場合，両端から 20 塩基以内の位置に制限酵素認識部位がある場合(後述するようにプライマーでその位置を挟むことができない）は，解析から外した．Fig. 1(A)では AMP0099184 には *Hha*I という制限酵素が認識する GCGC という塩基配列が 1 箇所(赤字)だけあるが，AMP0099183 では GCAC であるため（青字)，認識されないことを示している.

次いで AMP0099184 の GCGC を挟むように Primer 3 でプライマーを設計した(Fig. 1(B)). そして，GRAS-Di®で得た全塩基配列を対象にプライマーの配列がユニークであるかどうかを検証するために BLAST で調査した(Fig. 1(C))．この図は，プライマーと同じ配列が AMP0099183，AMP0099184 以外には存在しないことを示している．これは上手く行った例であるが，プライマーと同じ配列が多数存在する場合もあり，ゲノム解析の進んでいるイネの研究で，そのようなプライマーで PCR すると不明瞭な PCR 産物が得られることが経験的に分かっていることから，以後の解析から除外した.

プライマーを設計後，そのような塩基配列をもつオリゴ DNA を外部委託し，PCR，制限酵素処理，電気泳動を行った（Fig. 1(D))．1 レーンは GRAS-Di®の解析に用いたボタンボウフウ(狭義)，2-12 は新たに DNA を抽出したボタンボウフウ(狭義)，13 レーンは GRAS-Di®の解析に用いたコダチボタンボウフウ，14-24 レーンは新たに DNA を抽出したコダチボタンボウフウ，25 レーンは DNA サイズマーカーを示している．1，13 レーンの結果から GRAS-Di®

(A)

MARKER	SEQ1	SEQ2	B4	B5	K1	K3
AMPO099181	GTGTGCACCAATCCTAGAACCATCCTTTATCAGTCTAGTACTAAAATTCAAGATGTCAAGCAGCTGGTCATTCCCAGTG	TGTTC	H	H	A	A
AMPO099183	GTGTGCAGCCAATTCACTATGATGTAATTGATTTGGCACAAATGGTTCGTCAACTGAAAGAGGAGTTTTTGAAAAATTT	TTATG	A	A	H	H
AMPO099184	GTGTGCAGCCAATTCACTATGATGTAATTGATTTGGCGCAAATGGTTCGTCAACTGAAAGAGGAGTTTTTGAAAAATTT	TTATG	H	H	A	A
AMPO099185	GTGTGCATATCTCGTTGTTTCCCTATTTTTGGCACACTTGGCAATTTCTTTTTAGTACGAAAAAAGACTAGGTTACTAG	TAGTG	A	A	H	A

Hha Iはボタンボウフウ(狭義)のGCGC(赤字)を認識し切断するが，コダチボタンボウフウのGCAC(青字)は切断しない

(B) Primer3によるプライマーの設計

```
          OLIGO            start  len      tm      gc%   any    3' seq
          LEFT PRIMER          3   24   61.26   41.67  4.00  2.00 GTGCAGCCAATTCACTATGATGTA
          RIGHT PRIMER        75   25   60.18   32.00  7.00  2.00 TTTTCAAAAACTCCTCTTTCAGTTG
          PRODUCT SIZE: 73, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
              1 GTGTGCAGCCAATTCACTATGATGTAATTGATTTGGCGCAAATGGTTCGTCAACTGAAAG
                 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>           *           <<<<<<<<<<

             61 AGGAGTTTTTGAAAAATTTGGTGGGCTCTT
                <<<<<<<<<<<<<<<
```

(C) BLASTによるプライマーの類似性検索

```
Query= AMPO099183SEQ1F
Length=24

                                                                    Score     E
Sequences producing significant alignments:                        (Bits)  Value
AMPO099184SEQ1                                                      45.4    1e-06
AMPO099183SEQ1                                                      45.4    1e-06
AMPO071867SEQ2                                                      23.3    5.3
AMPO071866SEQ2                                                      23.3    5.3
(中略)
>AMPO099184SEQ1
Length=90
 Score = 45.4 bits (24), Expect = 1e-06
 Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)
 Strand=Plus/Plus
Query  1   GTGCAGCCAATTCACTATGATGTA  24
           ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3   GTGCAGCCAATTCACTATGATGTA  26

>AMPO099183SEQ1
Length=90
 Score = 45.4 bits (24),  Expect = 1e-06
 Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)
 Strand=Plus/Plus
Query  1   GTGCAGCCAATTCACTATGATGTA  24
           ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3   GTGCAGCCAATTCACTATGATGTA  26

>AMPO071867SEQ2
Length=90
 Score = 23.3 bits (12),  Expect = 5.3
 Identities = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)
 Strand=Plus/Plus
Query  11  TTCACTATGATG  22
           ||||||||||||
Sbjct  61  TTCACTATGATG  72
(中略)
```

(D) 制限酵素*Hha* Iで消化したPCR産物の電気泳動

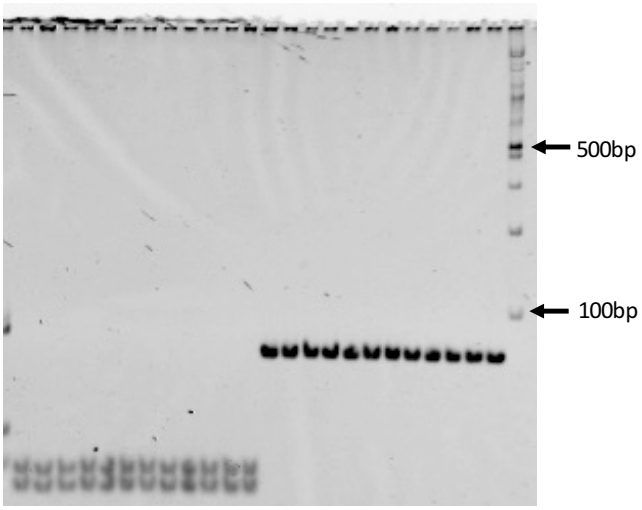


Fig. 1. Strategy for designing DNA markers potentially distinguishing the subspecies of *Peucedanum japonicum* based on GRAS-Di®. GRAS-Di® の DNA 情報に基づく ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの DNA 塩基配列の違いを認識できる DNA マーカーの設計.

(A) Examples of GRAS-Di® data. GRAS-Di® で得られた DNA 塩基配列情報の一部. MARKER

は DNA 断片名，SEQ1, SEQ2 は DNA 断片の左右両方から 90 塩基読んだ DNA 塩基配列をそれぞれ示す．紙面の都合で，SEQ1 配列のみを表示した．B4, B5, K1, K3 は GRAS-Di® 分析に供した試料名で，B4, B5 はボタンボウフウ(狭義)を，K1, K3 はコダチボタンボウフウを示す．試料名の A は左側の配列がないことを，H は左側の配列があることを示している．
(B) Primer design using Primer 3. Primer3 によるプライマーの設計. (C) Comparison of the primer sequence with the whole sequences obtained by on GRAS-Di® using BLAST. BLAST によるプライマーの類似性検索. LEFT プライマーの結果のみ記した. (D) Polyacrylamide electrophoresis of PCR products after digestion by a restriction enzyme *Hha*I. 制限酵素 *Hha*I で消化した PCR 産物のポリアクリルアミドゲル電気泳動．左から 1 から 12 レーンまではボタンボウフウ(狭義), 13 から 24 レーンまではコダチボタンボウフウを示す． 一番右のレーンは DNA サイズマーカーで，矢印のバンドが 100bp, 500bp を示す.

で得られた結果と一致して，ボタンボウフウ(狭義)の PCR 産物は制限酵素 *Hha*I で切断されて短い 2 本のバンドとして検出され，コダチボタンボウフウの PCR 産物は制限酵素 *Hha*I で切断されないため短い 1 本のバンドとして検出された．また，新たに抽出した DNA の結果は GRAS-Di®で得られた結果と一致した．すなわち，Fig. 1(A)に示したような DNA 塩基配列の違いは，両亜種を識別しうると言える．

3.2 解析結果のまとめ

Fig. 1 に示したような形で選抜した CAPS マーカーは全て 前項のようにボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウを識別することが期待されたが，実際にはそのようにはならなかった．考察を進めやすくするため，DNA マーカーを５つに分類し，それぞれの電気泳動像を Fig. 2 に示した．電気泳動の順序は 3.1 と同じで．1 レーンは GRAS-Di®の解析に用いたボタンボウフウ(狭義)，2-12 は新たに DNA を抽出したボタンボウフウ(狭義)，13 レーンは GRAS-Di®の解析に用いたコダチボタンボウフウ，14-24 レーンは新たに DNA を抽出したコダチボタンボウフウである．

(A) ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの亜種の差と完全に対応する・・・8 マーカー

(B) ボタンボウフウ(狭義)では 1 種類のバンドしか出現しないが，コダチボタンボウフウでは 2 種類出現す・・・2 マーカー

(C)コダチボタンボウフウでは 1 種類のバンドしか出現しないが，ボタンボウフウ(狭義)では 2 種類出現する・・・6 マーカー

(D) 両亜種とも 2 種類のバンドが出現する・・・2 マーカー

(E) 判別難・・・4 マーカー.

AM_44347, AM06926, AM64519 では GRAS-Di®の解析結果では制限酵素で切れないバンドだけ出現することが期待されたにもかかわらず, 解析に供したボタンボウフウ(狭義)DNA (それぞれの電気泳動写真の一番左のレーン)に制限酵素で切れなかったバンドと制限酵素で切れたバンドが共存している．これは，PCR で増幅される塩基配列が複数あることを示唆しており，遺伝子型の判別を困難にしている．AM_32558 では左から 2, 6, 8, 11 レーンのボタンボウフウ(狭義)の PCR 産物が得られなかった．これは PCR で増幅されるような DNA 塩基配列が存在していないことを示唆している．遺伝学的には劣性遺伝子として振る舞うことになるが，PCR の失敗との識別ができず，また他の DNA マーカーと比較して情報量が減り，データの取り扱いが他と異なることから，今後の研究から除外することにする．

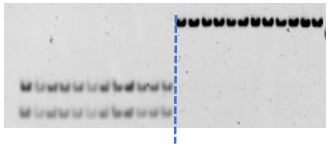
4 考察

本研究に供試した個体はボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウそれぞれ 12 個体であり．供試個体を増やすことで(A)に分類していた DNA マーカーが(B), (C), (D)に再分類されることはありうる. しかし, むしろ, 外観では明らかに判別できる典型的なボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウを供試したにもかかわらず，(B), (C), (D)の計 10DNA マーカーが両亜種間でバンドパターンを共有するのは予想外であった. 本報告書作成の時点では 22DNA マーカーしか作成していないが，DNA マーカーが作成可能と思われる DNA 多型は多数検出しており，DNA マーカーを用いることで，ボタンボウフウ（狭義），コダチボタンボウフウの亜種内の集団構造並びに亜種間の集団構造の違いを詳細に解析できると考えられる．これにより，ボタンボウフウの栽培植物化に向けた研究が進むことが期待される.

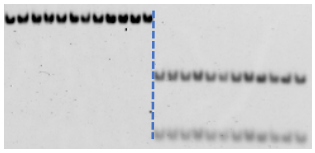
志水によるボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウ自生地の生育調査によると典型的な両種の間の中間的な外観を示す個体が出現し, 外観だけでは判断できないことがある（志水，未発表データ）．瀬尾・堀田(2000)[2)]によると，ナンゴクボタンボウフウが生育している地域の中にコダチボタンボウフウのように茎が直立し，大型になる個体からなる集団が分布しており，ボタンボウフウ（狭義），コダチボタンボウフウとナンゴクボタンボウフウの形質は連続的であり，明確には区別できない．外観形質と DNA 多型との関係を調べることで，3 亜種の分化を明瞭にすることができよう. Seo *et al.* (2001)[7)]はアイソザイム分析(植物体の酵素を抽出し，低温で電気泳動後，酵素特異的な化学反応によって酵素の生成物を染色することで酵素を DNA マーカーのように扱う手法)によってボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウ，ナンゴクボタンボウフウの遺伝的な関係を考察しているが，DNA は酵素と比べて保存しやすく試料管理が容易であり，より多くの遺伝子座を分析可能であることから，DNA マーカーによりボタンボウフウの分類学，遺伝学的研究が促進することが期待される.

(A)ボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウの亜種の差と完全に対応する

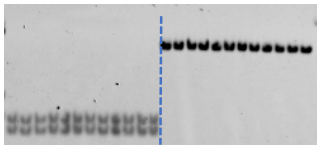
AM_06608　制限酵素 *Taq*I



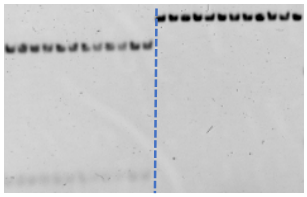
AM_42793　制限酵素 *Taq*I



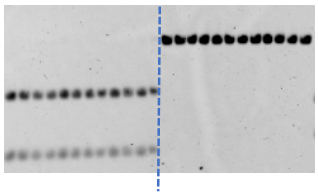
AM_99183　制限酵素 *Hha*I



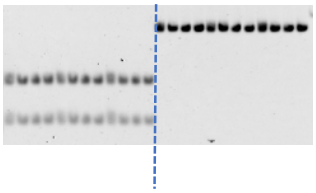
AM_35683　制限酵素 *Pst*I



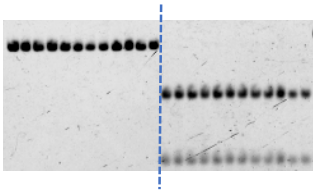
AM_06163　制限酵素 *EcoT22*I



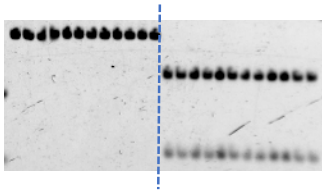
AM_33958　制限酵素 *Hae*III



AM_40666　制限酵素 *Msp*I

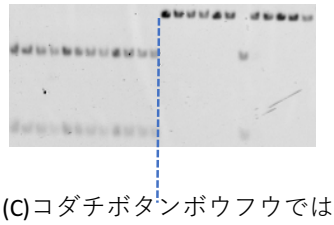


AM_74992　制限酵素 *Msp*I

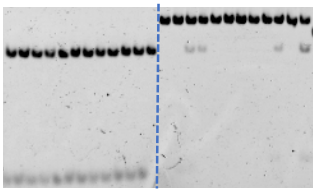


(B)ボタンボウフウ(狭義)では1種類のバンドしか出現しないが，コダチボタンボウフウでは2種類出現する

AM_05673　制限酵素 *Taq*I

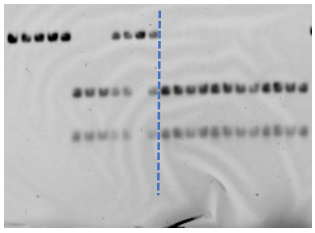


AM_90945　制限酵素 *Hha*I

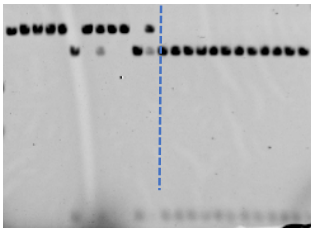


(C)コダチボタンボウフウでは1種類のバンドしか出現しないが，ボタンボウフウ(狭義)では2種類出現する

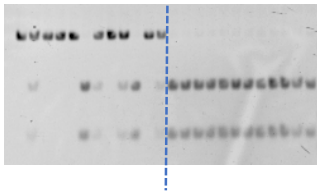
AM_42874　制限酵素 HinfI



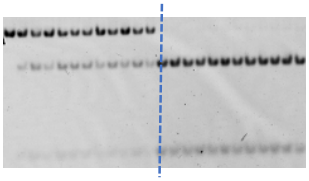
AM_24602　制限酵素 HinfI



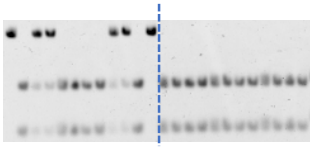
AM_17496　制限酵素 HinfI



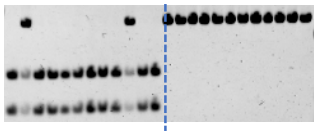
AM_42446　制限酵素 HindIII



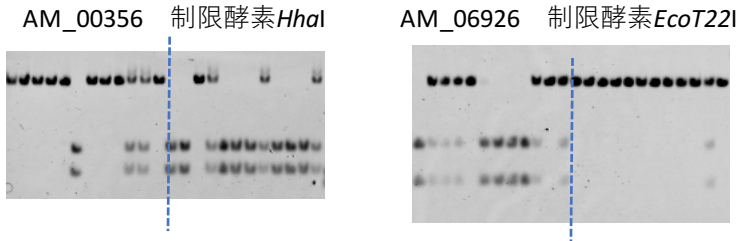
AM_80142　制限酵素HaeIII



AM_86555　制限酵素MspI



(D)両亜種とも2種類のバンドが出現する.



(E) バンドパターンの判別難

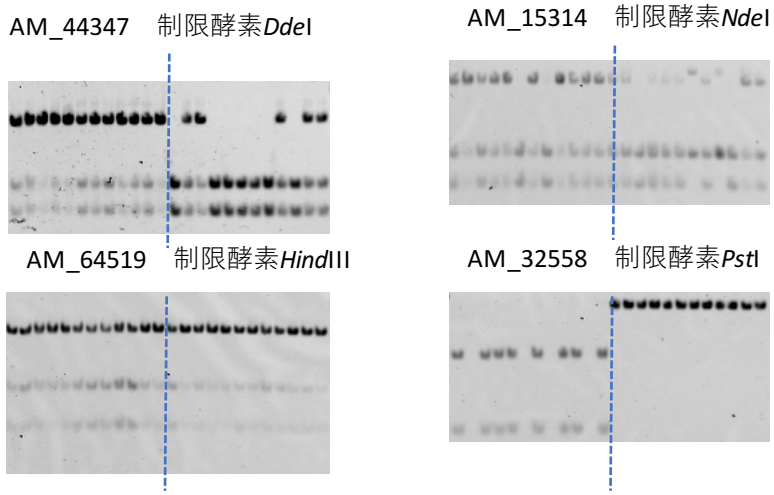


Fig. 2. Photos of polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products after digestion by restriction enzymes. GRAS-Di® の DNA 情報に基づきボタンボウフウ(狭義)とコダチボタンボウフウを識別することが期待された DNA マーカーの電気泳動写真．青の点線よりも左側の 12 個体はボタンボウフウ(狭義)，右側の 12 個体はコダチボタンボウフウの DNA を鋳型として PCR を行った．ボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウそれぞれで最も左の列は GRAS-Di® で解析したのと同じ個体であり，それよりも右の 11 個体は新しく DNA を抽出した個体である．

GRAS-Di®を使うと極めて安価で多数の DNA 塩基配列情報を得ることができる（本研究の場合，キャンペーン価格で 1 試料あたり約 1 万円）．これは，ゲノム情報がない植物種で遺伝解析のための DNA マーカー作成に有効であると思われる．九州・沖縄で利用される植物種だとスイゼンジナ，ゲットウが挙げられる．また，ゲノム解析が進んだ作物種であっても地域独自の在来品種に特異的な DNA 塩基配列を検出するのに有効であると思われる．鹿児島県においては伝統作物と言われる数多くのダイコン（桜島ダイコン，城内ダイコン，横川ダイコン，有良ダイコン，国分ダイコン），ニンジン（吉野ニンジン，唐湊ニンジン），ナス（島ナス，白ナス），ゴマ（白ゴマ）など多数有り，特に島嶼部に珍しい伝統作物が多い．それら

伝統品種の伝播を明らかにするのにも有効であり，今後の利用が期待できる．特に本研究で用いた CAPS は DNA1 塩基置換による制限酵素切断の有無の 2 パターンのため，判別しやすい，統計解析が容易である，などの利点が挙げられる．

5. 謝辞

本研究はサンケイ科学振興財団の支援を受けて行われました．ボタンボウフウ(狭義)，コダチボタンボウフウの苗は六田進，六田和志氏（六田農園，南さつま市）から分譲を受けました．DNA マーカーの解析にあたっては，鹿児島大学農学部 キョウ シンイ氏，柴田 雪花氏，内村 優斗氏，鹿児島大学農林水産学研究科 潟山祐樹氏，鹿児島大学遺伝子実験施設教授 田浦 悟 博士の協力を得ました．

6. 引用文献

1. Hotta M and Shuchi T (1996) Notes on the flora of the Ryukyu Islands 1. Two new varieties from the Tokara Islands, *Peucedanum japonicum* Thunb. var *latifolium* (Umbelliferae) and *Hydrangea involucrate* Sieb. var. *tokarensis* (Hydrangeaceae). J. Jpn Bot 71: 183-187.
2. 瀬尾明弘・堀田満 (2000) 西南日本の植物雑記 V. 九州南部から琉球列島にかけてのボタンボウフウの分類学的再検討．植物分類・地理 51: 99-116
3. 北柴大泰(2012) 第 6 章　品種の育成と登録．1. 品種および系統の判別技術．西尾剛・吉村淳編　植物育種学 第 4 版 文永堂出版．
4. Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 Bioinformatics 23(10):1289-1291
5. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15):e115
6. Ichitani K, Yamaguch D, Taura S, Fukutoku Y, Onoue M, Shimizu K, Hashimoto F, Sakata Y, Sato M (2014) Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice. Breed Sci 64: 222-230.
7. Seo A, Wtanabe M, Hotta M, Murakami N (2001)Allozyme variation of the three varieties of *Peucedanum japonicum* Thunb. in Japan. Acta Phytotax Geobot 52: 135-148.

DNA-marker based genetic study of *Peucedanum japonica* for its domesicaiton

Katsuyuki Ichitani

Laboratory of Plant Beeeding, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan
Tel +81-00-285-8547; E-mail: ichitani@agri.kagoshima-u.ac.jp

Katsuyoshi Shimizu

Laboratory of Comparative Environmental Agronomy, Faculty of Agriculture, Kagoshima University
1-21-24 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan
Tel +81-00-285-8542; E-mail: shimizuk@agri.kagoshima-u.ac.jp

Peucedanum japonicum is a species belonging to Apiaceae family. This species comprises three subspecies, *P. japonicum* var. *japonicum, P. japonicum* var. *latifolium* and *P. japonicum* var. *australe.* This study aimed to develop CAPS markers potentially distinguishing the subspecies of *P. japonicum* based on GRAS-Di®, and to clarify the genetic structure within and between subspecies. Among the 22 CAPS markers developed, eight markers completely distinguished *P. japonicum* var. *japonicum* and *P. japonicum* var. *latifolium.* DNA polymorphism was shared between the subspecies in the ten CAPS markers. The other four CAPS markers seemed not to work well because the interpretation of the banding pattern was difficult. The selected 18 CAPS markers would contribute to the genetic study of intra- and inter-population of the three *P. japonicum* subspecies, leading to domestication of *P. japonicum* as a new vegetable. The DNA marker-based strategy used in this study will be applicable to the genetic study of crop species and landraces whose genomic information is scarce.