



Title	分子マーカー利用によるイネ穀粒形質の遺伝分析（予報）
Author(s)	洪, 梅珠; 高牟禮, 逸朗; 木下, 俊郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 19(9), 649-666
Issue Date	1996-03-29
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12172
Type	bulletin (article)
File Information	19(9)_p649-666.pdf



[Instructions for use](#)

分子マーカー利用によるイネ穀粒形質の遺伝分析(予報)¹⁾

洪 梅珠²⁾・高牟禮逸朗・木下 俊郎

(北海道大学農学部植物育種学講座)

(平成8年1月31日受理)

Genetical Study on the Grain Characters by the Use of Molecular Markers in Rice (Preliminary report)

Mei-Chu HONG, Itsuro TAKAMURE and Toshiro KINOSHITA

(Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

緒 言

高等植物においては、分子マーカーによる高密度の連鎖地図を用いて、量的遺伝子座 (Quantitative trait loci: QTL) を高精度で染色体上の区分された領域にマッピングできる¹⁹⁾。最もよく用いられている分子マーカーである制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism: RFLP) は農業形質に影響がなく、共優性を示し、環境や器官分化のステージ、他の遺伝子の影響を受けないなどの利点を有する²⁰⁾。また任意の塩基配列をプライマーとするPCR法 (Polymerase chain reaction) により増幅するDNA断片のRAPD (Random amplified polymorphic DNA) や AFLP (Amplified fragment length polymorphism) は必要とされるDNA量がRFLPより格段に少なく、PCR法によって増幅されたDNAを電気泳動しただけで検出できるため、プロットングやサザンハイブリダイゼーションの操作が不必要となり、労力や時間が少なくて済む。また、F₂、F₃ 集団などでの大量個体の解析のためには極めて有利である。さらに塩基配列の微妙な変化に反応してバンドパターンが変わるために、近縁系統間においても多型を検出し易いといった利点がある^{5,24)}。

最近におけるイネの品種改良では、穀粒の成分・品質に加えて食味が重視される。そこで本研究ではかかる穀粒形質の育種の基礎となるQTL分析を計画した。まず、12種の親系統についてRFLPマーカーの多型性に基づき系統間の類縁関係を調べ、さらに*sd-1* (半矮性) を有する「しおかり」の準同質遺伝子系統であるID-47と米国系統83N1168間の交雑F₂集団を用いてRFLPおよびRAPDマーカーを用いた連鎖分析を行うと共に、使用可能な分子マーカーによる予備的なQTL分析を試みた。

本文に入るに先立ち、RFLPプローブを戴いたアメリカ合衆国コーネル大学教授のTANKSLEY博士、ルイジアナ大学クロリー稲試験所で保存しているJODON博士の検定系統を分譲して戴いたNOWICK博士並びに連鎖分析のプログラムMAPLを使用させて戴いた東京大学農学部教授の鶴飼保雄博士、さらに穀粒成分の分析にご協力戴いた北海道立上川農業試験場の研究員の方々に深く感謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試系統

実験に用いた系統をTable 1に示す。米国系統はいずれもJODON博士が遺伝子分析の傍ら、連鎖検定のために複数遺伝子を集積せしめた系統である。日本型系統の中には北海道の優良品種「きらら397」、IR8を一回親並びに「しおかり」を反覆親とする連続戻交雑法により作成した*sd-1* (半矮性) を持

1) 北海道大学農学部植物育種学教室業績

2) 現住所：台中区農業改良場，彰化縣大村郷田洋村
茄苳路一段361巷200号，台湾省，中華民國

Table 1. List of lines used

Line	Marker gene	Origin
American Lines		
83N1038	<i>gh, gl</i>	Jodon's tester
83N1072	polyhusk, <i>Rd</i>	do.
83N1116	<i>d</i>	do.
83N1154	<i>d, nal</i>	do.
83N1202	<i>d, Ps</i>	do.
83N1209	<i>d, nal</i>	do.
83N1168	big grain	do.
<i>japonica</i> lines		
ID-47	<i>sd-1</i>	Isogenic line of Shiokari
Kirara 397		Hokkaido cultivar
IRAT 13	<i>lk-i</i>	Introduced from IRRI
No. 56	<i>Mi, Lk-f. ux</i>	Linkage tester
<i>indica</i> line		
Surjamkhi		Indian variety

つ準同遺伝子系統の ID-47⁸⁾、連鎖検定系統の No. 56、そのほかフィリピン国際稲研究所 (IRRI) より導入された大粒系統の IRAT13 もここでは日本型に分類した。さらに典型的なインド型系統としては Surjamkhi を用いた。

供試材料はいずれも北海道大学農学部温室内にポット植えし、DNA 抽出のために生育に影響を与えないように葉を採取した。登熟後に採種して種子稔性を調べ、マイクロメーターを用いて、1 個体 5 粒につき粒長および粒幅を 0.1 mm 単位で計測して平均値を算出した。胚乳のアミロース含量については北海道立上川農業試験場の協力を得て、テクニコン社製のオートアナライザーを用いて測定した。

2. RFLP 分析

RFLP 分析のためのプローブには IR36 (インド型) の *Pst* I ゲノミックライブラリーから選ばれた単一コピーのクローン¹²⁾ を、各染色体について 2~6 個ずつ、計 53 種を本研究に用いた (Table 2)。なお、クローンの増幅は PCR 法^{3), 18)} で行い、DNA の抽出は CTAB 法^{4), 13)} によった。サザンプロットとハイブリダイゼーションでは、まず *Eco*RI または *Hind*III の制限酵素により切断した DNA 各 2 μ g を 0.8% アガロースゲル、80V 定電圧下で電気泳動を行った。次いで 0.25N の HCl に 10 分間浸漬して脱プリン化を行い、さらに 1.5M の NaCl、0.5M の NaOH 液および 1.5M の NaCl、0.5M の Tris-HCl

(pH7.5) 液に各 40 分間ずつ浸漬して DNA を変性中和させ、キャピラリープロットングにより DNA をゲルからナイロンメンブラン (Biodyne B 0.45 μ) にトランスファーした。その後、0.4M の NaOH 液を浸した 3 mm 濾紙上に 10 分間放置して DNA を固定し、最後に 5 \times SSC (750 mM NaCl, 75 mM クエン酸ナトリウム Z) で 1 分間洗浄した。プレハイブリダイゼーションにはあらかじめ 42 $^{\circ}$ C に加温したハイブリダイゼーション溶液を用いて 1 時間処理した。ハイブリダイゼーションは 200 ng のプローブを 95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性させた後、標識試薬 (ECL Kit) とグルタルアルデヒドを加えて、非放射性プローブとした。このプローブを加えた後 42 $^{\circ}$ C で 15 時間以上ハイブリダイゼーションを行った。フィルターの洗浄には一次洗浄液 (6M 尿素, 0.4% SDS, 0.5 \times SSC) 中で 42 $^{\circ}$ C 30 分間の洗浄を 2 回、2 \times SSC 中で室温 5 分間の洗浄を 2 回行った後、検出試薬 (ECL kit) に 1 分間浸漬処理し、X 線フィルムに感光させてバンドを検出した。

3. F₂ 集団の RFLP および RAPD 分析

交雑組合せ ID-47 \times 83N1168 の両親, F₁ 個体および F₂ 集団 (125 個体) を北海道大学農学部温室において播種、育苗した後、2 リットルポットに 2 個体植えとして、ビニールハウス内で栽培した。DNA 抽出のためには、適時に葉を採取した。個体ごとに出穂日を記録し、登熟後に稈長、穂長、穂数、一穂頭花数、粒長、粒幅、千粒重、アミロース含量、種子稔性を調査した。

DNA は CTAB 法による新鮮葉の凍結乾燥試料から抽出し、*Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Bam*HI, *Sst*I および *Xho*I の 6 種の制限酵素により切断した。まず各染色体から選ばれた 121 種の RFLP プローブについて両親の多型を検定した。これらのプローブは IR36 の *Pst*I ゲノミックライブラリーから選抜された単一コピークローンが 81 種、cDNA ライブラリーから選抜されたクローンが 33 種、エンバク cDNA ライブラリーから選抜されたクローンが 7 種の計 121 種である (Table 2)。両親において多型を検出できた RFLP プローブについて F₂ 個体について RFLP 分析を行った。なお RFLP 分析の手法は前述に準じた。

RAPD 分析については RFLP 分析と同じ材料を用い、全 DNA の抽出は RFLP 分析と同様に行い、DNA の濃度をフルオメーター (Hofer scientific

Table 2. Cloned probes used in RFLP analyses

Clone	Chromosome	M. W. (kb)	Clone	Chromosome	M. W. (kb)
RG350	1	1.5	RG351*	7	0.8
RG236*	1	1.4	RZ634	7	1.1
RG220*	1	0.9	RZ395	7	1.4
RG780	1	2.3	RG650*	7	2.3
RG345*	1	1.2	RG711	7	1.8
RG462*	1	1.6	CDO533	7	1.5
CDO920	1	1.2	RG477	7	1.0
RG146*	1	1.0	RZ488	7	0.8
CDO962	1	1.2	RG165*	7	2.9
RG173	1	0.9	RG29*	8	0.8
RG140*	1	1.5	RG20*	8	1.5
RG520*	2	0.8	RZ562	8	1.2
CDO1091	2	1.1	RZ617	8	1.0
RG256*	2	1.7	RG28	8	0.9
RZ906	2	1.5	CDO464	8	1.5
RZ260	2	0.9	RG136*	8	1.2
RZ318	2	0.7	CDO99	8	2.1
RG139*	2	1.2	RG757	9	1.1
RG157*	2	1.0	RZ698	9	0.4
RZ386	2	1.3	RZ206	9	0.6
RZ643	2	0.5	RG358*	9	1.0
RG144*	2	0.8	RZ12	9	2.0
RG83	2	0.9	RG570*	9	1.1
RG365*	2	1.5	RG386*	9	1.3
RG555	2	0.8	RZ404	9	0.6
RG120	2		RG432	9	3.5
RG348*	3	1.4	RG553*	9	0.7
RG224*	3	1.1	RZ892	10	1.4
RG100*	3	0.9	RZ561	10	0.7
RG227	3	0.8	RZ337	10	1.4
RG393*	3	1.9	RZ811	10	0.6
RG179*	3	1.3	RG134*	10	0.6
RZ403	3	1.4	RG561	10	2.4
RZ393	3	0.9	RZ421	10	0.9
RZ745	3	1.3	RG241	10	2.5
RG147	3	1.5	RZ257*	10	1.6
RZ819	4	2.0	RG353	11	1.0
RG143*	4	1.2	RG303*	11	1.9
RG214*	4	1.4	RG103*	11	0.9
RG329*	4	1.3	RZ797	11	1.3
RG449*	4	1.8	RG2	11	1.5
RZ69	4	0.9	RG16*	11	0.8
CDO456	4	1.5	RG167*	11	1.6
RG207*	5	1.7	RG1094	11	1.5
RZ244	5	1.6	RG131	11	0.7
RG403*	5	1.4	RG118*	11	2.0
RG182	5	3.4	RZ141	11	0.8
RG573*	5	1.8	RZ722	11	0.8
RG13*	5	2.2	RG1022	11	1.1
RG470	5	0.9	RG304	11	0.9
RZ70	5	0.7	RG211*	11	0.8
RG119*	5	0.8	RG181*	12	1.2
RZ516	6	0.6	RG463	12	1.3
RZ588	6	1.0	RG190	12	1.4
RG213*	6	1.3	RG361	12	1.8, 8
RG138*	6	1.2	RZ76	12	0.7
RG64*	6	1.5	RG341*	12	1.6
RG264	6	0.6	RG235	12	0.8
RG123*	6	0.6	RZ816	12	0.6
RG172*	6	1.8	RG574*	12	1.1
RG653	6	1.9			

RG : Rice genomic DNA, RZ : Rice cDNA, CDO : Oat cDNA.

* 53 probes were used for RFLP analyses of the 12 lines to detect the parental relationships other than F₂ PFLP analyses.

instruments社製)により測定した。その値をもとにして10 ng/ μ lの濃度に希釈し、さらに酵素(プロテアーゼ)の失活や残留しているタンパク質の分解のために10分間煮沸し、その後すぐに氷水で冷却した。これを鋳型DNAとして4°Cで保存した。

PCR反応液の組成は25 ngの鋳型DNA, 2.5 μ lの10 \times buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 0.01% gelatin), 各100 μ MのdNTP, 1.0 unitのTaqポリメラーゼ, 15 pmolのプライマーで、プログラムサーマルサイクラー(DNA thermal cycler, Perkin Elmer Cetus社製)を用いて、94°C1分, 36°C1分, 72°C2分のサイクルを42回繰り返した後、72°Cで10分間に保った。増幅されたDNAを2%のアガロースゲルを用いたサブマリン電気泳動により分画し、エチジウムブロマイドで染色後、UVライトによる発光を写真に撮りバンドを検出した。なお本実験に用いた10塩基対のランダムプライマー(Operon社製kit C, P, V)60種類をTable 3に示した。ID-47 \times 83N1168のF₂集団については両親においてRAPDマーカーの多型を検出できたプライマーを用いてPCR法を行った。F₂集

団における各マーカー間の組換え価をAllardの最尤法²⁾によって求めた。なお組換え価の計算にはコンピュータプログラムMAPLを用いた。

結 果

1. RFLPに基づく親系統間の類縁関係

1) 全系統を対象とした場合の多型性

53種のプローブと2種の制限酵素を組合わせて、供試12系統についてRFLPマーカーの多型を調査した(Fig. 1)。制限酵素としては、6塩基認識の酵素のEcoRIとHindIIIを用い、染色体2, 4, 5, 7, 9, 10よりのRFLPプローブに対しては、いずれの酵素においてもほぼ同等に多型性を検出できた。しかし、それら以外のプローブでは制限酵素によって多型頻度にかかなりの差を生じていた(Table 4)。EcoRIでは染色体1, 6, 11からのプローブの多型頻度がHindIIIの場合よりも高かったが染色体3, 8, 12の場合には逆の傾向となった。特に染色体3と8のプローブに対してはEcoRIでは多型性を全く検出できなかった。しかし、この場合にも制限酵素をHindIIIへ変えると多型性を見出すことができた。平

Table 3. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primer code	Sequence 5' to 3'	Primer code	Sequence 5' to 3'	Primer code	Sequence 5' to 3'
OPC-01	TTCGAGCCAG	OPP-01	GTAGCACTCC	OPV-01	TGACGCATGG
OPC-01	GTGAGGCGTC	OPP-02	TCGGCACGCA	OPV-02	AGTCACTCCC
OPC-03	GGGGGTCTTT	OPP-03	CTGATACGCC	OPV-03	CTCCCTGCAA
OPC-04	CCGCATCTAC	OPP-04	GTGTCTCAGG	OPV-04	CCCCTCACGA
OPC-05	GATGACCGCC	OPP-05	CCCCGGTAAC	OPV-05	TCCGAGAGGG
OPC-06	GAACGGACTC	OPP-06	GTGGGCTGAC	OPV-06	ACGCCCAGGT
OPC-07	GTCCCGACGA	OPP-07	GTCCATGCCA	OPV-07	GAAGCCAGCC
OPC-08	TGGACCGGTG	OPP-08	ACATCGCCCA	OPV-08	GGACGGCGTT
OPC-09	CTCACCGTCC	OPP-09	GTGGTCCGCA	OPV-09	TGTACCCGTC
OPC-10	TGTCTGGGTG	OPP-10	TCCCGCCTAC	OPV-10	GGACCTGCTG
OPC-11	AAAGCTGCGG	OPP-11	AACGCGTCGG	OPV-11	CTCGACAGAG
OPC-12	TGTCATCCCC	OPP-12	AAGGGCGAGT	OPV-12	ACCCCCACT
OPC-13	AAGCCTCGTC	OPP-13	GGAGTGCCTC	OPV-13	ACCCCTGAA
OPC-14	TGCGTGCTTG	OPP-14	CCAGCCGAAC	OPV-14	AGATCCCGCC
OPC-15	GACGGATCAG	OPP-15	GGAAGCCAAC	OPV-15	CAGTGCCGGT
OPC-16	CACACTCCAG	OPP-16	CCAAGCTGCC	OPV-16	ACACCCACA
OPC-17	TTCCCCCAG	OPP-17	TGACCCGCCT	OPV-17	ACCGGCTTGT
OPC-18	TGAGTGGGTG	OPP-18	GGCTTGGCCT	OPV-18	TGGTGGCGTT
OPC-19	GTTGCCAGCC	OPP-19	GGGAAGGACA	OPV-19	GGGTGTGCAG
OPC-20	ACTTCGCCAC	OPP-20	GACCCTAGTC	OPV-20	CAGCATGGTC

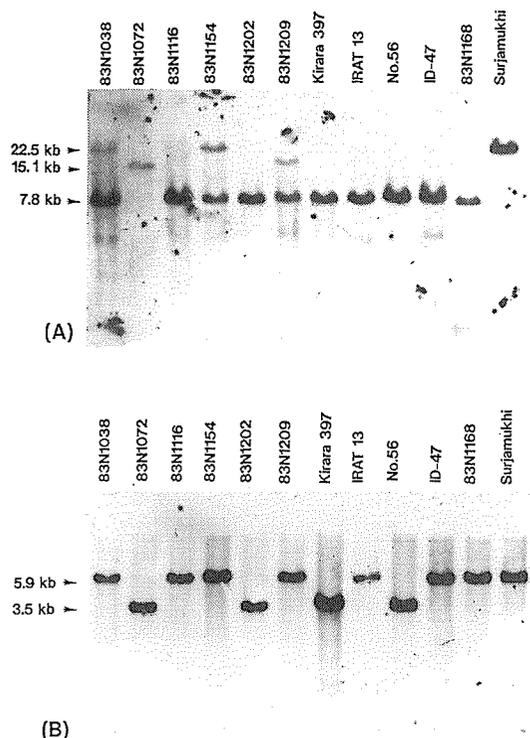


Fig. 1. RFLP patterns of the 12 strains.

- (A) DNA was digested with *EcoRI* and probed with RG256.
- (B) DNA was digested with *HindIII* and probed with RG64.

均多型頻度は *HindIII* では 43.4% であり *EcoRI* の場合の 39.5% と同程度であった。なお、53 種のプローブと 2 種の制限酵素との 106 種の組合せ中の多型割合を調べたところ、44 種で多型を生じ、平均多型率は 41.5% であった (Table 4)。

2) 米国系統群内の多型性

7 種の米国標識系統を用いて、それぞれの系統間で多型頻度を比較すると、系統間によって大きな変異がみられた (Table 5)。*EcoRI* では 83N1072 と 83N1209 との間に 32.1% の多型がみられたが、これを最高として、83N1038 と 83N1072 間、83N1072 と 83N1168 間ではいずれも 28.3% であった。米国系統間の組合せ 21 種のうちの 5 組合せでは 26% を越える高い多型が示された。一方、83N1038 と 83N1168 間、83N1168 と 83N1202 間では 9.4% しか多型を検出できなかった。その他の系統間では 15.1% から 20.8% までの変異幅となった。*HindIII* の場合にお

Table 4. Polymorphism(%) detected by *EcoRI* and *HindIII* enzymes

Chromosome	Probes tested	Percent polymorphism		
		<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	Mean
1	6	66.7	50.0	58.4
2	6	16.7	33.3	25.0
3	6	0.0	33.3	16.7
4	4	50.0	50.0	50.0
5	5	80.0	80.0	80.0
6	5	60.0	40.0	50.0
7	3	66.7	66.7	66.7
8	3	0.0	33.3	16.7
9	4	50.0	50.0	50.0
10	2	0.0	0.0	0.0
11	6	50.0	16.7	33.4
12	3	33.3	66.7	50.0
Total	53	39.5	43.4	41.5

ける最高は 83N1154 と 83N1202 間、83N1202 と 83N1209 間における 22.6% であった。83N1038 と 83N1168 間では 11.3% しか多型を検出できなかった。その他の系統間でも 13.2% から 20.8% の多型頻度となった。

3) 日本型系統群内の多型性

「きらら 397」ならびに ID-47, IRAT13, No. 56 の 4 系統間でみられた多型性は米国系統群の場合よりもかなり低かった (Table 5)。*EcoRI* では ID-47, 「きらら 397」と No. 56 との 3 系統間では最高 3.8% の多型しか検出できなかった。IRAT13 と他の日本型系統間でも 11.3% であった。*HindIII* の場合には IRAT13 と「きらら 397」間の 15.1% が最高で、最低は「きらら 397」と ID-47 間の 3.8% であった。その他の系統間では 9.4% から 13.2% となった。

4) 米国系統、日本型、インド型系統間の多型性

米国系統間では様々なバンドパターンが検出された。すなわちインド型 Surjamukhi と同じバンドを有する場合、日本型と同一の場合、インド型と日本型の両方のバンドを共有する場合、インド型にも日本型にもみられない特有のバンドを有する場合 (Fig. 1) の 4 種があった。その結果、米国系統と日本型系統間の組合せでは 5.7 から 34% に至る変異がみられた。また、83N1072 と日本型系統との間ではいずれも 30% 以上の高い多型を見出した。なお、米国系統とインド型の Surjamukhi 間ではいずれも

Table 5. Polymorphisms(%) of RFLP markers detected between different lines with *Eco*RI and *Hind*III enzymes

Line	A 83N 1038	B 83N 1072	C 83N 1116	D 83N 1154	E 83N 1202	F 83N 1209	G 83N 1168	H ID- 47	I Kirara 397	J No. 56	K IRAT 13	L Surja- mkhi
A. 83N1038	A	18.9	13.2	18.9	15.1	18.9	11.3	20.8	22.6	17.0	15.1	20.8
B. 83N1072	28.3	B	20.8	18.9	15.1	18.9	20.8	22.6	18.9	20.8	24.5	26.4
C. 83N1116	20.8	20.8	C	15.1	20.8	18.9	17.0	22.6	24.5	20.8	18.9	30.2
D. 83N1154	15.1	26.4	20.8	D	22.6	13.2	17.0	11.3	13.2	11.3	13.2	24.5
E. 83N1202	17.0	26.4	17.0	17.0	E	22.6	13.2	28.3	24.5	17.0	20.8	26.4
F. 83N1209	15.1	32.1	20.8	15.1	17.0	F	13.2	7.5	7.5	13.2	13.2	26.4
G. 83N1168	9.4	28.3	17.0	15.1	9.4	15.1	G	15.1	17.0	7.5	7.5	28.3
H. ID-47	13.2	34.0	22.6	15.1	17.0	15.1	11.3	H	3.8	11.3	13.2	26.4
I. Kirara 397	11.3	32.1	24.5	13.2	18.9	15.1	11.3	3.8	I	9.4	15.1	26.4
J. No. 56	13.2	32.1	24.5	17.0	18.9	18.9	11.3	3.8	3.8	J	9.4	30.2
K. IRAT 13	13.2	30.2	22.6	15.1	13.2	17.0	5.7	11.3	11.3	11.3	K	30.2
L. Surjamkhi	26.4	22.6	28.3	26.4	24.5	26.4	24.5	28.3	30.2	32.1	30.2	L

Polymorphisms(%) detected with *Eco*RI and *Hind*III are shown on left and right side diagonal, respectively.

20%以上の多型を検出し、日本型系統と Surjamkhi の間でも 26.4%以上の高い多型を検出できた。

2. 親系統における粒大およびアミロース含量の変異

供試 12 系統について粒大とアミロース含量に関する変異を調べた (Table 6)。一般にインド型は細長い粳が特徴であり、Surjamkhi の粒形指数(粳長/粳幅)は 2.45 を示した。一方、日本型系統では大粒

の IRAT13 を除いて短粒であり粒形指数は 1.75 以下となった。米国系統群には短粒、大粒および長粒が混在していた。アミロース含量については、インド型の Surjamkhi では 28.3%という高い値を示し、日本型系統は糯性の 0%から 16.7%の低い値を示した。米国系統群は 19.1%以下の 83N1116、83N1154、83N1168 と 22.5%の 83N1072、さらに 25%以上の 83N1038、83N1202、83N1209 の 3 群へ

Table 6. Comparison of grain size and amylose content between the lines used for RFLP analyses

Line	Spikelet length (mm)	Spikelet width (mm)	Spikelet shape index	Amylose content (%)
83N1038	8.60	3.38	2.54	25.0
83N1072	6.98	4.16	1.68	22.5
83N1116	7.94	3.16	2.51	17.5
83N1154	7.02	3.50	2.01	10.4
83N1202	7.70	3.28	2.35	25.9
83N1209	7.52	3.46	2.17	25.4
83N1168	10.40	3.50	2.97	19.1
ID-47	6.04	3.94	1.53	16.7
Kirara 397	6.52	3.72	1.75	15.1
IRAT 13	9.36	4.20	2.23	13.7
No. 56	5.74	3.80	1.51	0.0
Surjamkhi	7.16	2.92	2.45	28.3

Table 7. Number and polymorphism(%) of probes used to characterize ID-47 and 83N1168 (Polymorphism detected with at least 1 out of 6 enzymes surveyed)

Chromosome	# probes used	# probes with polymorphism	% polymorphism
1	11	2	18.2
2	15	2	13.3
3	10	2	20.0
4	7	1	14.3
5	9	2	22.2
6	9	3	33.3
7	9	1	11.1
8	8	1	12.5
9	10	2	20.0
10	9	1	11.1
11	15	2	13.3
12	9	2	22.2
Total	121	21	17.6

分類された。

3. F₂ 集団の遺伝分析

1) 分子マーカーの分離

粒形指数の顕著に異なる ID-47 と 83N1168 を交雑親に用い、まず両親間での RFLP マーカーの多型性を調査した。各染色体から選んだ 121 種のプローブについて多型頻度を Table 7 に示した。各染色体のマーカーについての平均多型頻度にはかなりの変動がみられ、染色体 6 のマーカーにおける多型頻度が最高で 33.3% を示し、染色体 7 や 10 のマーカー

の多型頻度はいずれも 11.1% で最低となり、平均は 17.4% であった。

F₁ および F₂ 個体からそれぞれ DNA を抽出して両親間に多型を生じた各プローブと 6 種の制限酵素の組合せにより RFLP 分析を行った (Fig. 2)。すなわち、RG140, RG147, RG214, RG207, RG213, RZ892 をプローブとした時には DNA を *EcoRI* で切断し、RG384, RG13, RG650, RG303, RG304, RG190, RG341 をプローブとした時には *HindIII* による切断、RG264, RG28 をプローブとした時には *EcoRV* により、RG64 をプローブとした時には *BamHI* によりそれぞれ DNA を切断した。また、RG570 をプローブとした時には *XhoI* で DNA を切断し、RG139, RG157, RG553 および RG780 をプローブとした時には DNA を *SlyI* で切断して RFLP 分析を行った。その結果、F₁ および F₂ 集団では完全優性を示して ID-47 型 : 83N1168 型を 3 : 1 あるいは 1 : 3 に分離する場合 (RG303, RG341, RG553, RG570) と共優性を示して ID-47 のホモ型 : ヘテロ型 : 83N1168 のホモ型を 1 : 2 : 1 に分離する場合とがあった (Table 8)。そのほか RFLP マーカーによっては分離に歪みを生じ、3 : 1 や 1 : 2 : 1 の比に適合しない場合もあった。

一方、RAPD については 60 種のプライマーのうち 9 種を用いた時に ID-47 と 83N1168 間で 25 種の多型を検出できた (Table 9)。それらの RAPD のうち、8 種では ID-47 が 83N1168 の有していないバンドを一本過剰に持ち、逆に他の 17 種では 83N1168 の方が ID-47 の持たないバンドを一本過剰に有していた。

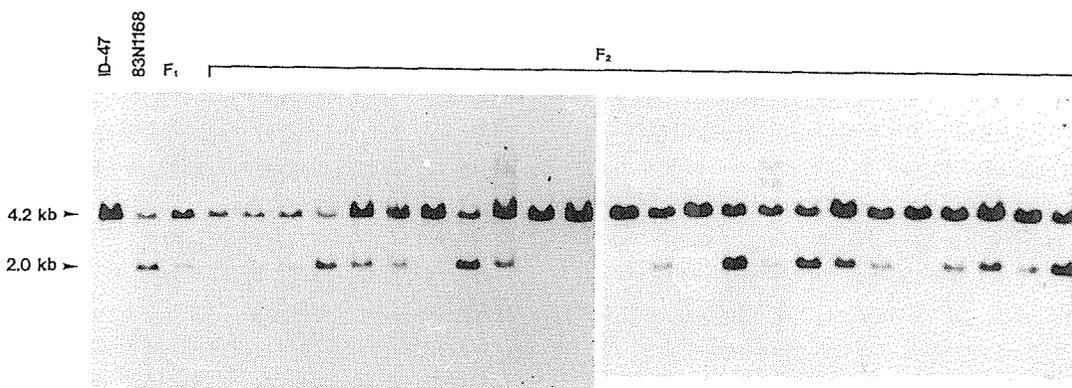


Fig. 2. F₂ segregation of RFLPs in the cross, ID-47 × 83N1168. DNA was digested with *EcoRI* and hybridized with the probe, RG214.

Table 8. F₂ segregation and goodness of fit for RFLP markers in the cross, ID-47×83N1168

Marker (chromo- some)	No. of F ₂ individuals				Goodness of fit (1:2:1 or 3:1)	
	ID-47 type	F ₁ type	83N1168 type	Total	χ^2	p
<i>EcoRI</i>						
RG140 (1)	27	53	22	102	0.65	0.7-0.8
RG147 (3)	22	37	15	74	1.32	0.5-0.6
RG214 (4)	21	46	22	89	0.12	0.9-0.95
RG207 (5)	18	35	14	67	0.61	0.7-0.8
RG213 (6)	20	43	17	80	0.68	0.7-0.8
RZ892 (10)	16	23	9	48	2.13	0.3-0.4
<i>HindIII</i>						
RG348 (3)	25	49	18	92	1.46	0.3-0.4
RG13 (5)	28	49	16	93	3.37	0.1-0.2
RG650 (7)	16	53	22	91	3.26	0.1-0.2
RG303 (11)	51		15	66	0.18	0.6-0.7
RG304 (11)	20	40	19	79	0.04	0.95-0.99
RG190 (12)	4	13	3	20	1.90	0.3-0.4
RG341 (12)	16		58	74	0.45	0.5-0.6
<i>EcoRV</i>						
RG264 (6)	27	39	14	80	4.28	0.1-0.2
RG28 (8)	17	49	17	83	2.71	0.2-0.3
<i>BamHI</i>						
RG64 (6)	22	45	18	85	0.67	0.7-0.8
<i>XhoI</i>						
RG570 (9)	68		31	99	2.10	0.1-0.2
<i>SlyI</i>						
RG139 (2)	75		10	85	7.94	<0.01
RG157 (2)	79		12	91	6.77	<0.01
RG553 (9)	24		67	91	0.09	0.7-0.8
RG780 (1)	79		12	91	6.77	<0.01

両親間で RAPD マーカーの多型を検出できた 9 種のプライマーを用いて、F₂ 集団について PCR を行い RAPD マーカーについての遺伝分析を行った (Table 10)。25 種の RAPD マーカーのうち 18 種においてはバンドを有する型が優性を示し、F₂ では 3:1 の分離比に適合した。しかし、7 種のマーカー (OPP1-860, OPV6-490, OPV6-510, OPV6-770, OPV7-710, OPV7-1080, OPV8-1300) については、F₂ で 3:1 の分離比に適合しなかった。

片親に用いた ID-47 は形態的マーカーとして *sd-1* (半矮性) を有するため正常型の 83N1168 との交雑においては、F₁ 個体の草型が正常型を示し、F₂ 集団

の稈長分布は *sd-1* の分離により、およそ 60 cm と 90 cm に 2 つのピークを有する 2 頂分布を示した (Fig. 3)。そこで、草型については 2 種の表現型に分けることができ、正常型:半矮性型の分離は 3:1 の比に適合した (Table 11)。

2) 分子マーカー間における連鎖分析

ID-47×83N1168 の F₂ 集団を用いて、18 種の RFLP マーカー、18 種の RAPD マーカーおよび 1 種の形態的マーカーを合わせた 37 種のマーカーについての連鎖分析を行った (Table 12)。*sd-1* と 36 種のマーカー間にはいずれも独立関係がみられた。一方、RFLP マーカー間では、RG140 と RG147 では

Table 9. RAPD markers used to distinguish between ID-47 and 83N1168

RAPD marker	ID-47	83N1168	RAPD marker	ID-47	83N1168
OPC11-630	-	+	OPV 7-710	-	+
OPC15-630	-	+	OPV 7-770	-	+
OPC15-680	+	-	OPV 7-950	+	-
OPP 1-710	+	-	OPV 7-1080	-	+
OPP 1-860	-	+	OPV 7-1240	-	+
OPP 1-960	-	+	OPV 8-400	+	-
OPP 5-680	+	-	OPV 8-500	+	-
OPP14-550	-	+	OPV 8-1000	-	+
OPP14-1140	-	+	OPV 8-1300	-	+
OPV 6-490	-	+	OPV10-420	+	-
OPV 6-510	-	+	OPV10-460	-	+
OPV 6-770	+	-	OPV10-770	-	+
OPV 6-920	-	+			

Each amplified band was named by the primer used and its size in bp. For example, OPC11-630 refers to the 630 bp band amplified by the primer OPC11. "+" means presence, "-" means absence.

4.3%, RG140 と RG213 間では 31.9%, RG213 と RG147 間では 23.5%, RG570 と RZ892 間では 28.1%, RG264 と RG64 間では 27.1% の組換え価がそれぞれ算出された。RAPD マーカー間においては OPC15-630 と OPC15-680 間では 0%, OPV8-400 と OPV8-500 間では 33.0%, OPV10-460 と OPV10-770 間では 25.4%, OPV6-920 と OPV1-960 間では 32.6%, OPV6-920 と OPP14-1140 間では 23.5%, OPV6-920 と OPV8-1000 間で 22.5%, OPV6-920 と OPV7-770 間では 23.2%, OPV6-920 と OPV10-770 間では 26.1%, OPV8-1000 と OPP1-960 間では 24.4%, OPV8-1000 と OPV7-770 間では 29.3%, OPV8-1000 と OPV10-770 間では 30.9%, OPP10-460 と OPP10-770 間では 25.4% の組換え価でそれぞれ連鎖関係を認めた。また、RFLP マーカーと RAPD マーカー間でも、RG553 と OPP14-1140 間、RG64 と OPV10-420 間にそれぞれ 32.5% と 24.8% の組換え価が算出された。すでに染色体上の座位が判明している RFLP マーカーを基にして新たに供試した RAPD マーカーを連鎖群に分け、独立関係にあるものをも含めて下記に示した。

染色体 6: RG264—RG64—OPV10-420, RG213—RG147 (染色体 3)—RG140 (染色体 1)

染色体 9: OPP1-960—OPV8-1000—OPV6-920

Table 10. F₂ segregations and goodness of fit for 25 RAPD markers in the cross, ID-47×83N1168

RAPD marker	No. of F ₂ individuals			Goodness of fit (3:1)	
	Presence	Absence	Total	χ^2	p
OPC11-630	71	19	90	0.73	0.3-4.0
OPC15-630	53	22	75	0.75	0.3-0.4
OPC15-680	63	12	75	3.24	0.05-0.1
OPP 1-710	88	33	121	0.33	0.5-0.6
OPP 1-860	79	39	118	4.08	<0.05
OPP 1-960	81	38	119	3.05	0.05-0.1
OPP 5-680	78	30	108	0.44	0.5-0.6
OPP14-550	78	37	115	3.16	0.05-0.1
OPP14-1140	94	25	119	1.01	0.3-0.4
OPV 6-490	34	39	73	31.46	<0.01
OPV 6-510	45	27	72	6.0	<0.05
OPV 6-770	56	33	89	6.93	<0.01
OPV 6-920	70	22	92	0.06	0.8-0.9
OPV 7-710	61	46	107	18.47	<0.01
OPV 7-770	81	26	107	0.03	0.8-0.9
OPV 7-950	83	27	110	0.01	0.9-0.95
OPV 7-1080	94	17	111	5.55	<0.05
OPV 7-1240	79	32	111	0.87	0.3-0.4
OPV 8-400	41	15	56	0.10	0.7-0.8
OPV 8-500	41	15	56	0.10	0.7-0.8
OPV 8-1000	39	17	56	0.86	0.3-0.4
OPV 8-1300	34	22	56	6.10	<0.05
OPV10-420	43	16	59	0.14	0.7-0.8
OPV10-460	42	17	59	0.46	0.4-0.5
OPV10-770	44	17	61	0.27	0.6-0.7

Table 11. F₂ segregation and goodness of fit for *sd-1* in the cross, ID-47×83N1168

	F ₂ segregation		Total	Goodness of fit (1:3)	
	<i>sd-1</i>	+		χ^2	p
Obs.	22	103	125	3.65	0.05-0.1

—OPP14-1140—RG553, RG570—RZ892 (染色体 10)

染色体不明: OPC15-630—OPC15-680

染色体不明: OPV10-460—OPV10-770

染色体 6 と 9 ではそれぞれ所属染色体の異なる RFLP マーカー間にも連鎖関係がみられた。なお、OPC11-630, OPP1-770, OPP5-680, OPP14-550, OPV7-950, OPV7-1240 の各マーカー間ではすべて

Table 12. Linkage analyses between marker genes in F₂ population of the cross, ID-47×83N1168

Gene Pair A : B	Linkage phase	R. C. V. (%)	F ₂ segregation									Total	χ^2	LOD
			AA			Aa			aa					
			BB	Bb	bb	BB	Bb	bb	BB	Bb	bb			
RB264 : RG64	Coup.	27.1±4.6	Obs. 13	9	1	6	20	7	1	6	5	68	20.29	3.62
RG140 : RG147	Coup.	4.3±1.7	Obs. 19	3	0	2	33	1	0	0	14	72	111.10	22.61
RG140 : RG213	Coup.	31.9±4.9	Obs. 11	12	2	6	25	8	3	6	7	80	13.10	2.26
RG213 : RG147	Coup.	23.5±4.5	Obs. 9	5	1	10	21	4	0	5	8	63	21.10	4.44
				A ₋				aa				Total	χ^2	LOD
				BB	Bb	bb		BB	Bb	bb		Total	χ^2	LOD
RG570 : RZ892	Coup.	28.1±7.3	Obs.	14	16	3		2	5	6	46	8.13	1.54	
OPV10-420 : RG64	Coup.	24.8±8.3	Obs.	10	14	4		1	2	5	36	7.33	1.43	
				A ₋			aa			Total	χ^2	LOD		
				B ₋	bb		B ₋	bb		Total	χ^2	LOD		
OPC15-630 : OPC15-680	Rep.	0.0±17.3	Obs.	41	12		22	0	75	5.51	Infinite			
OPV 6-920 : OPP 1-960	Coup.	32.6±6.1	Obs.	53	15		10	11	89	7.40	1.40			
OPV 6-920 : OPP14-1140	Coup.	23.5±5.6	Obs.	62	5		12	10	89	12.74	3.06			
OPV 6-920 : OPV 8-1000	Coup.	22.5±7.7	Obs.	26	7		1	6	40	8.71	1.73			
OPV 6-920 : OPV 7-770	Coup.	23.2±5.6	Obs.	53	8		8	11	80	15.02	3.14			
OPV 6-920 : OPV10-770	Coup.	26.1±8.6	Obs.	32	6		3	4	45	4.15	1.11			
OPV 8-400 : OPV 8-500	Coup.	33.0±7.7	Obs.	33	8		8	7	56	4.57	0.85			
OPV 8-1000 : OPP 1-960	Coup.	24.4±6.1	Obs.	30	9		5	12	56	19.29	2.65			
OPV 8-1000 : OPV 7-770	Coup.	29.3±7.8	Obs.	35	3		10	6	54	5.14	1.12			
OPV 8-1000 : OPV10-770	Coup.	30.9±7.1	Obs.	29	8		8	9	54	7.91	1.23			
OPV10-460 : OPV10-770	Coup.	25.4±6.4	Obs.	35	7		7	10	59	12.97	2.22			
OPP14-1140 : RG553	Coup.	32.5±6.5	Obs.	55	13		10	9	87	5.73	1.23			

互いに独立関係を示し、これらの6種のRAPDマーカーの所属染色体を特定できなかった。

3) 染色体マーカーと量的遺伝子座 (QTL) との関係

F₂ 集団の交雑親系統である ID-47 と 83N1168 間では稈長 (Fig. 3) の外に籾長, 籾幅, アミロース含量, 到穂日数, 穂数, 千粒重, 一穂頭花数, 穂長, 種子稔性について平均値間に有意差を認めた。また

F₂ 集団における各形質の頻度分布はかなり大きな変異幅による連続変異を示した (Fig. 4)。

本交雑組合せでは両親間にみられた RFLP や RAPD マーカーの多型頻度が低かったために, QTL 分析において染色体上の区間マッピングは困難となった。しかし各量的形質に関与する遺伝子の所属する染色体をほぼ推定できた。前述の 37 種のマーカーを用いて, それぞれのマーカーごとに 2 種ない

しは 3 種の遺伝子型または表現型に分けて各形質の平均値を算出し、その平均値の差についての有意性を調べる F 検定を行った (Table 13)。

稈長については *sd-1* (染色体 1) について正常型と半矮性の 2 つの表現型に分けると両型の平均値間には明らかな差が認められた。

籾長については染色体 1 のマーカーである *sd-1* と RG-140, 染色体 7 のマーカーである RG650, 染色体 11 のマーカーである RG304, 染色体 9 のマーカーである OPV6-920 ならびに座位不明のマーカーの OPV7-1240 について、3 種の遺伝子型間または 2 種の表現型間において平均値の差の有意性を検出できた。RG304, OPV6-920 を除く、他の 4 種のマーカーについては米国系統と同じバンドパターンを有する方で籾長が長くなった。

籾幅については染色体 1 のマーカーである RG140, 染色体 3 のマーカーの RG147, 染色体 5 のマーカーの RG13 について各遺伝子型・表現型間で平均値に有意差が認められた。RG140, RG147 の場合には、米国系統と同じバンドパターンを有する方で籾幅がより広く、逆に RG13 の場合には日本型系統 ID-47 と同じバンドパターンを有する時に籾幅が広がった。

アミロース含量については染色体 8 のマーカーである RG28 や座位不明の RFPD マーカーの OPC15-630 において各遺伝子型・表現型間で平均値に有意差を生じ、RG28 の場合には米国系統と同じバンドパターンを示す方でアミロース含量が高く、OPC15-630 の場合には逆になった。

到穂日数については染色体 7 のマーカーである

RG650 および染色体 8 のマーカーである RG28 において 3 種の遺伝子型間に平均値の有意差が認められ、2 種のマーカーとも米国系統と同じバンドパターンを示す方が晩生になった。

千粒重については染色体 1 のマーカーの *sd-1* と、RG140, 染色体 3 のマーカーの RG147, 染色体 6 のマーカーの RG213, 染色体 11 のマーカーの RG304 において、いずれも 3 種の遺伝子型間において平均値の有意差がみられた。RG304 を除く他のマーカーではいずれも米国系統と同じバンドパターンの方で千粒重が大きかった。

一穂穎花数については染色体 1 のマーカーである RG140, 染色体 12 のマーカーである RG341 においては 3 種の遺伝子型間に平均値の有意差が認められた。いずれのマーカーでも米国系統と同じバンドパターンを有する方で一穂穎花数が多くなった。

穂長については染色体 5 のマーカーである RG13, 染色体 7 のマーカーである RG650 について各遺伝子型の平均値間に有意差が認められた。2 種のマーカーとも米国系統と同じバンドパターンを有する場合に穂長が長かった。

種子稔性については、染色体 9 のマーカーである OPP1-960, 染色体 12 のマーカーである RG341, 座位不明の OPC15-630 において、各遺伝子型の平均値間に有意差を認めた。RG341, OPC15-360 については ID-47 と同じバンドパターンの方で種子稔性が高かったが、OPP1-960 の場合には逆になった。

なお、穂数については 3 種の遺伝子型の平均値間の差の有意となるマーカーが見い出されなかった。

各量的形質と各分子マーカー間における遺伝的相関関係 (連鎖) を括めると以下の如くである。

稈長: *sd-1* (染色体 1)

籾長: *sd-1* と RG140 (染色体 1), RG650 (染色体 7), OPV6-920 (染色体 9), RG304 (染色体 11), OPV7-1240 (染色体不明)

籾幅: RG140 (染色体 1), RG147 (染色体 3), RG13 (染色体 5)

アミロース含量: RG28 (染色体 8), OPC15-630 (染色体不明)

到穂日数: RG650 (染色体 7), RG28 (染色体 8)

千粒重: *sd-1* と RG140 (染色体 1), RG147 (染色体 3), RG213 (染色体 6), RG304 (染色体 11)

一穂穎花数: RG140 (染色体 1), RG341 (染色体 12)

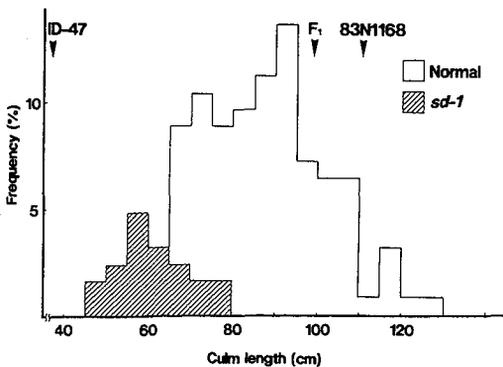


Fig. 3. Frequency distribution of culm length in F₂ population of the cross, ID-47×83N1168.

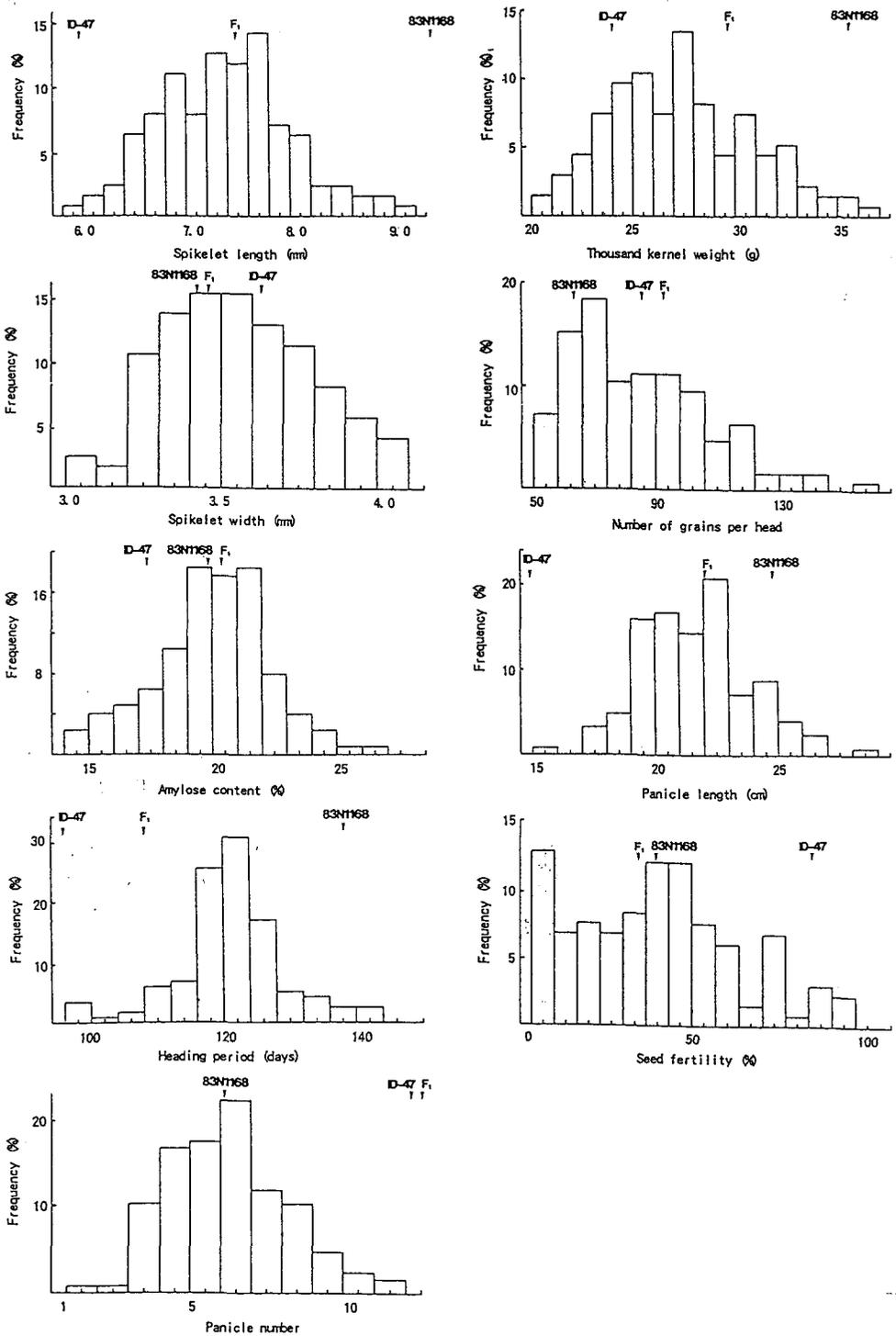


Fig. 4. Frequency distributions of nine characters in F₂ population of the cross, ID-47×83N1168.

Table 13. F-tests among the three genotypes (two kinds of homozygote and heterozygote) in nine characters

Trait	Marker gene	Chromosome	F value	A*
Culm length	<i>sd-1</i>	1	84.3**	83N1168
Spikelet length	<i>sd-1</i>	1	16.20**	83N1168
	RG140	1	4.16**	83N1168
	RG650	7	10.14**	83N1168
	OPV6-920	9	8.13**	ID-47
	RG304	11	4.66*	ID-47
	OPV7-1240	Unknown	7.16**	83N1168
Spikelet width	RG140	1	5.19**	83N1168
	RG147	3	14.98**	83N1168
	RG13	5	6.35**	ID-47
Amylose content	RG28	8	3.68*	83N1168
	OPC15-630	Unknown	8.27**	ID-47
Days to heading	RG650	7	5.81**	83N1168
	RG28	8	3.10*	83N1168
1000-kernel weight	<i>sd-1</i>	1	13.08**	83N1168
	RG140	1	5.19*	83N1168
	RG147	3	7.00**	83N1168
	RG213	6	4.27*	83N1168
	RG304	11	3.34*	ID-47
Number of spikelets per head	RG140	1	3.52*	83N1168
	RG341	12	3.97*	83N1168
Panicle length	RG13	5	4.20*	83N1168
	RG650	7	3.30*	83N1168
Seed fertility	OPP1-960	9	5.99*	83N1168
	RG341	12	8.31**	ID-47
	OPC15-630	Unknown	8.04**	ID-47

*, **: Significant levels at 5%, and 1% in F-test, respectively.

A: Parental genotype exhibiting greater mean in the F₂ population.

穂長: RG13 (染色体 5), RG650 (染色体 7)
種子稔性: OPP1-960 (染色体 9), RG341 (染色体 12), OPC15-630 (染色体不明)

考 察

分子マーカーによる最初のイネ連鎖地図は McCOUCH *et al.*¹²⁾ によって作成された。それ以来、少なくとも 3 種の高密度連鎖地図^{14,15,21)} が出来上が

り、ゲノムの全染色体領域をほとんど万遍なくカバーしている。したがって、QTL を区間マッピング (interval mapping)^{7,8)} により推定できるようになった。すでに米粒の長粒指数 (elongation rate) の QTL が第 8 染色体の RZ323 の近くにあること¹⁾ を初めとして、いもち病の部分抵抗性 (partial resistance)²²⁾、褐紋病抵抗性¹⁰⁾、耐冷性¹⁶⁾ 等の遺伝子座の推定や、日本型×インド型あるいはジャワ型×インド型の交雑 F₂ 集団における各種の QTL 解析^{9,25,26)} などが報告されている。

本研究では最近の重要な育種目標の一つである穀粒形質についての QTL 分析を行うために、まず米国系統を 7 系統、日本型を 4 系統、インド型を 1 系統の合計 12 系統を用いて RFLP マーカーにより系統間の類縁関係を調べた。53 種の RFLP プローブと 2 種の制限酵素の組合せ中で、44 組合せ (41.5%) ではいずれかの系統間に多型を検出できた。本実験に用いた 2 種類の制限酵素は共に 6 塩基認識の制限酵素であったが、RFLP の検出頻度は *Hind*III (43.4%) と *Eco*RI (39.5%) は同程度であった。McCOUCH *et al.*¹²⁾ は制限酵素によって切断された断片の長さ と RFLP の検出頻度との間に相関関係のみられること、また、インド型とジャワ型の間では *Eco*RI と *Hind*III を用いて 30% を越える高い多型を示したことを報告している。本実験でも両制限酵素を用いて、いずれも約 40% の多型を検出できたことから、イネでは *Eco*RI, *Hind*III が多型を検出しやすい制限酵素と言える。

米国系統間の全 21 組合せについて RFLP の検出頻度を比較すると、系統組合せにより大きな変異が認められ、9.4% から 32.1% までの変異がみられた。すなわち、米国系統中には互いに近縁な系統が存在する以外にかなり遠縁となる系統も含まれており、米国系統群内には大きな遺伝的変異がみられた。これに対して日本型の 4 系統間では多型性が極めて低かった。特に「きらら 397」と ID-47 間ならびに「きらら 397」と No. 56 の間では 4% 以下の多型しかみられなかった。一方、IRAT13 と「きらら 397」の間には 15.1% の多型がみられた。IRAT13 は IRRI 保有の大粒系統であり、日本型よりむしろ日本型とインド型の中間型に近いと考えられる。

Wang²³⁾ はインド型と日本型の間で 30% 以上の頻度で RFLP を検出している。本研究においてもインド型の Surjamkhi と日本型系統との間では

26.4%以上の高い頻度で多型を検出できた。米国系統と Surjamkhi との間でも 20.8%~30.2%の比較的高い多型が検出されたが、米国系統と日本型系統との間では 5.7%~34%で、組合せにより大きな差を生じていた。米国系統の 83N1168, 83N1209, 83N1154 については日本型系統との間では 19%以下であり、Surjamkhi とは 24%以上の多型を示したことから、日本型に比較的近い系統と考えられる。一方、83N1072 については *EcoR1* により日本型系統との間では 32%以上、Surjamkhi との間では 22.6%となり、むしろインド型に近い系統と考えられる。

松尾¹¹⁾は世界の栽培品種を粒の大きさと形から A 型(短粒)、B 型(大粒)、C 型(長粒)の 3 種に分類している。これらは日本型、ジャワ型、インド型にほぼ相当し、今回供試した 12 系統を松尾の分類により識別すると、IRAT13(大粒 B 型)を除き日本型の 3 系統はいずれも短粒 A 型であった。米国系統は 83N1072, 83N1154 と 83N1209 が短粒 A 型を示し、83N1038 と 83N1168 は大粒 B 型、残りの 2 系統とインド型の Surjamkhi は長粒 C 型と判定された。

胚乳のアミロース含量については、83N1038, 83N1202, 83N1209 と Surjamkhi が高く、83N1154 と日本型系統は低く、糯遺伝子(*ux*)を有する No. 56 は 0%を示した。アミロース含量は *Wx* 座の複対立遺伝子によって支配され、インド型は *Wx^a* を有して高含量となり、日本型は *Wx^b* を有して低含量となる¹²⁾、本実験の結果も *Wx* 座の遺伝子の違いを反映しているとみてよい。

以上の結果に基づいて米国系統と日本型系統との交雑後代を用いて RFLP マーカーとアミロース含量やその他の粒形質との連鎖関係を調べることを計画した。しかし、実際には交雑親間で RFLP マーカーの多型性が高い場合に、 F_1 の種子稔性が低かったり、さらに粒形およびアミロース含量の遺伝変異を考慮に入れると適当な交雑組合せを見出すことがかなり困難であった。そこで本研究ではまず ID-47×83N1168 の交雑組合せを用いて QTL 分析を試行した。

両親の ID-47 と 83N1168 について 6 種の制限酵素と 121 種のプローブによるサザンハイブリダイゼーションを行い、121 種のプローブ中 21 種のプローブについて多型を見出した。 F_2 集団では、そ

の内の 18 種のプローブについて 3:1 あるいは 1:2:1 の分離比に適合することを明らかにした。

RAPD マーカーは塩基配列のわずかな変化にも敏感に反応してバンドパターンに変化がみられることから、RFLP よりも近縁系統間で多型を検出し易いとされている。イネの品種同定にも RAPD の利用の有効であることが報告されている⁹⁾。本研究では 60 種のプライマーを用いて両親間に 25 種の多型パターンを検出した。 F_2 集団では、その内の 18 種のバンドパターンが 3:1 の分離比に適合した。

本研究においては、82N1168 と ID-47 との間での RAPD の検出率(42%)は RFLP の検出率(17%)よりもかなり高かった。ただし、その内 F_2 集団でメンデル比に適合した割合を比較すると、RAPD では 72%となり、RFLP の 86%よりもやや低かった。また、RAPD は RFLP より分析に要する労力と時間が少なくて済む。したがって、今後は RAPD マーカーを連鎖地図上へマッピングして近縁系統間の交雑における QTL 分析に利用することが望まれる。

本実験では、ID-47×83N1168 の F_2 集団において *sd-1* および 18 種の RFLP マーカーと 18 種の RAPD マーカーとを互いに組み合わせた 37 種のマーカー間で連鎖分析を行った。*sd-1* および 6 種の RAPD マーカー(OPC11-630, OPP1-710, OPP5-680, OPP14-550, OPV7-950, OPV7-1240)ではそれぞれの RAPD 間並びに 18 種の RFLP マーカーとの間ですべて独立関係がみられ、これらの RAPD マーカーの所属染色体は不明であった。新たに RAPD マーカー OPV10-420 が染色体 6 にあることと OPP1-960, OPV8-1000, OPV6-920 および OPP14-1140 が染色体 9 上に位置することがわかった。なお、染色体 1 の RG140, 染色体 3 の RG147 および染色体 6 の RG213 の 3 者の間に新たな連鎖関係が認められた。また、染色体 9 の RG570 と染色体 10 の RZ892 の間にも連鎖がみられた。これまでの連鎖分析の結果と相反するこのような事例が、単なる見かけ上の連鎖なのか、または染色体の構造差などによるものかについては今後検討せねばならない。

本実験に用いた ID-47×83N1168 の F_2 集団における稈長の頻度分布は *sd-1* の作用により 2 頂分布を示した。また粒長、粒幅、アミロース含量、到穂日数、千粒重、穂数、穂長はいずれも正規分布となり、一穂頭花数と種子稔性はややひずみを持つ変異

を示した。これらの連続変異を示す形質に関与する QTL の所属染色体は、少なくとも稈長の QTL は染色体 1 に、粒長は染色体 1, 7, 9, 11 に、粒幅は染色体 1 と 3 と 5 に、アミロース含量は染色体 8 に、到穂日数は染色体 7 と 8 に、千粒重は染色体 1, 3, 6 および 11 に、一穂穎花数は染色体 1 と 12 に、穂長は染色体 5 と 7 に、種子稔性は染色体 9 と 12 に座を有すると推定された。これらの QTL 分析を通じて、一つの形質が複数の遺伝子によって支配されていることや、一つの QTL が複数の形質に関与している場合が明らかとなった。これらの結果は従来のポリジーン概念に実証的な基礎を与えたことになる。

今回の交雑実験に用いた両親間では RFLP と RAPD を合わせても精度の高い QTL 分析を行うために十分な分子マーカーの多型性が得られなかった。そのために single point analysis¹⁹⁾ により、QTL と関係を持つ染色体の推定にとどめた。今回の実験を参考にして、今後より精度の高い分析を行うためには、特に interval analysis¹⁹⁾ を可能とする交雑組合せを選定する必要がある。また、比較的近縁な系統間でも多型を生じやすい RAPD や microsatellite, AFLP などの新しく開発された分子マーカーを用いてマッピングを行うことも望まれる。

元来ポリジーンは環境要因の影響を受け易く、遺伝子間の上位性や遺伝子座内の相互作用などを考慮に入れる必要があった。そこで異なる地域間での反覆実験などを行うためには組換え自殖系統 (Recombinant inbred line), 戻し交雑自殖系統 (Backcross inbred line) や倍加半数体系統 (Doubled haploid line) 等の材料を育成しておくことが望ましい。

QTL 分析により有用遺伝子へ分子マーカーをタギングさせると marker-aided selection によって育種の選抜効率を著しく高めることができる。また、有用遺伝子を挟む分子マーカーよりの染色体歩行に YAC クローン contigs による物理地図を用いて marker-based 遺伝子クローニングへ進めば組換え DNA 育種に役立てることができよう。

摘 要

1. イネの穀粒形質を中心にして、分子マーカーを利用する QTL 分析を計画した。まず、多型頻度の高い交雑組合せを選定するために、日本型、米国系

統群、インド型の計 12 系統を用いて RFLP マーカーの多型性を調べて、各系統の類縁関係を明らかにした。さらに粒大やアミロース含量の変異をも考慮して、米国系統×日本型系統の一つである ID-47×83N1168 の F₂ 集団を選び、試行的に QTL 分析を行った。

2. 米国系統を 7 系統、日本型を 4 系統、インド型を 1 系統用いて、RFLP マーカーの系統間変異を調べたところ、53 種のプローブと 2 種の制限酵素 (*EccRI* と *HindIII*) の組合せ 106 種のうち、44 組合せ (41.5%) で系統間に多型性が検出された。*EcoRI* と *HindIII* によるといずれも約 40% の多型性を示し、両酵素共に多型を検出しやすい制限酵素であった。

3. 米国系統間の RFLP 頻度を調べたところ、9.4~32.1% の多型が存在し、系統間に大きな遺伝変異が認められた。日本型の 4 系統内では多型が低く、遺伝的にかなり近縁であった。インド型の Surjamkhi と日本型系統および米国系統との間では 20% 以上の多型を検出できた。米国系統と日本型系統との間では 5.7~34% の変異がみられた。

4. 供試 12 系統を松尾 (1952) 方式により分類すると、IRAT13 (大粒型) を除く日本型 3 系統はすべて短粒型で、米国系統では 83N1072, 83N1154 と 83N1209 が短粒型を示し、83N1038 と 83N1168 は大粒型、残りの米国 2 系統とインド型の Surjamkhi は長粒型であった。胚乳のアミロース含量は米国 3 系統 (83N1038, 83N1202, 83N1209) とインド型系統で高く、83N1154 と日本型系統は低く、No. 56 は 0% を示した。

5. F₂ 集団の交雑親である ID-47 と 83N1168 の間では、用いた 121 種の RFLP プローブのうち 21 種で多型を検出した。その内 18 種のプローブでは F₂ 集団で 3:1 あるいは 1:2:1 の分離比に適合した。また、PCR に用いた 60 種のプライマーのうち 25 種で両親間に多型を検出でき、その中の 18 種については F₂ 集団で 3:1 の分離比に適合した。なお、両親間の RAPD の検出率 (42%) は RFLP の検出率 (17%) をかなり上回った。

6. ID-47×83N1168 の F₂ 集団において 18 種の RFLP, 18 種の RAPD および *sd-1* を合わせた 37 種のマーカー間で連鎖分析を行った。*sd-1* は 36 種の分子マーカーといずれも独立関係にあった。

7. 分子マーカー間の連鎖関係は次の 6 グループ

に分けられた。

染色体6: RG264—RG64—OPV10-420

染色体9: OPP1-960—OPV8-1000—OPV6-920
—OPP14-1140—RG553

染色体6?: RG213(染色体6)—RG147(染色体3)
—RG140(染色体1)

染色体9?: RG570(染色体9)—RZ892(染色体10)

不明: OPC15-630—OPC15-680

不明: OPV10-460—OPV10-770

RG264 および RG64 はいずれも染色体6に所属しているため、RAPD マーカーの OPV10-420 は染色体6にある。また、RG553 は染色体9に所属しているため、OPP1-960, OPV8-1000, OPV6-920, OPP14-1140 はいずれも染色体9に座乗する。

2つのグループにおいて、異なる染色体に位置する RFLP マーカー間にも連鎖関係が認められた。見かけ上の連鎖が否かを再検討する必要がある。

8. 各量的形質とマーカー間に見いだされた有意な遺伝的相関関係は以下の如くである。

稈長: *sd-1* (染色体1)

籾長: *sd-1*, RG140(染色体1), RG650(染色体7), OPV6-920(染色体9), RG304(染色体11), OPV7-1240(染色体不明)

籾幅: RG140(染色体1), RG147(染色体3), RG13(染色体5)

アミロース含量: RG28(染色体8), OPC15-630(染色体不明)

到穂日数: RG650(染色体7), RG28(染色体8)

千粒重: *sd-1*, RG140(染色体1), RG147(染色体3), RG213(染色体6), RG304(染色体11)

一穂穎花数: RG140(染色体1), RG341(染色体12)

穂長: RG13(染色体5), RG650(染色体7)

種子粘性: OPP1-960(染色体9), RG341(染色体12), OPC15-630(染色体不明)

引用文献

1. AHN, S. N., BOLLICH, C. N., McCLUNG, A. M., and TANKSLEY, S. D.: RFLP analysis of genomic regions associated with cooked kernel elongation in rice. *Theor. Appl. Genet.* **87**: 27-32, 1993
2. ALLARD, R. W.: Formulas and tables to facilitate the calculation of recombinant values in heredity. *Hilgardia* **24**: 235-278, 1956
3. CHIEN, A., EDGAR, D. B. and TRELA, J. M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriology* **127**: 1550-1557, 1976
4. DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L.: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15, 1990
5. FUKUOKA, S., HOSAKA, K. and KAMIJIMA, O.: Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* **67**: 243-252, 1992
6. KINOSHITA, T. and SHINBASHI, N.: Identification of dwarf genes and their character expression in the isogenic background. *Japan. J. Breed.* **32**: 219-231, 1982
7. LANDER, E. S. and BOTSTEIN, D.: Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7353-7357, 1986
8. LANDER, E. S. and BOTSTEIN, D.: Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**: 185-199, 1989
9. LI, Z., PINSON, S. R. M., STANSEL, J. W. and PARK, W. D.: Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **91**: 374-381, 1995
10. LI, Z., PINSON, S. R. M., MARCHETTI, M. A., STANSEL, J. W. and PARK, W. D.: Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theor. Appl. Genet.* **91**: 382-388, 1995
11. 松尾孝嶺: 栽培稲に関する種生態学研究, 農技研報告, **D3**: 1-111, 1952
12. MCCOUCH, S. R., KOCHERT, G., YU, Z. H., WANG, Z. Y., KHUSH, G. S., COFFMAN, W. R. and TANKSLEY, S. D.: Molecular mapping of rice chromosome. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 815-829, 1988
13. MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**: 4321-4325, 1980
14. RICE GENOME RESEARCH PROGRAM (RGP): The Rice RFLP linkage map as of Feb. 25, 1993. *Rice Genome* **2**(1): 11-13, 1993

15. SAITO, A., YANO, M., KISHIMOTO, N., NAKAGAHARA, M., YOSHIMURA, A., SAITO, K., KUHARA, S., UKAI, Y., KAWASE, M., NAGAMINE, T., YOSHIMURA, S., IDETA, O., OHSAWA, R., HAYANO, Y., IWATA, N. and SUGIURA, M.: Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Japan. J. Breed.* **41**: 665-670, 1991
16. SAITO, K., MIURA, K., HAYANO-SAITO, Y., SAITO, A., ARAKI, H. and KATO, A.: Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breeding Science* **45**: 337-340, 1995
17. SANO, Y., MAEKAWA, M. and KIKUCHI, H.: Temperature effects on the *Wx* protein level and amylose content in the endosperm of rice. *J. Heredity* **76**: 221-222, 1985
18. SCHARF, S. J., HORN, G. T. and ERLICH, H. A.: Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**: 1076-1078, 1986
19. TANKSLEY, S. D., Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 205-233, 1993
20. TANKSLEY, S. D., YOUNG, N. D., PATERSON, A. H. and BONIERBALE, M. W.: RFLP mapping in plant breeding - new tools for an old science. *Bio/Technology* **7**: 257-264, 1989
21. TANKSLEY, S. D., FULTON, T. M. and MCCOUCH, S. R.: Linkage map of rice (*Oryza sativa*) (2N=24). In: Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes, Book 6. Plants (S. J. O'Brien ed.) Cold Spring Harbour Lab. Press. pp. 6.61-6.79, 1993
22. WANG, G. L. MACKILL, D. J., BONMAN, J. M., MCCOUCH, S. R., CHAMPOUX, M. C. and NELSON, R. J.: RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* **136**: 1421-1434, 1994
23. WANG, Z. Y. and TANKSLEY, S. D.: Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome* **32**: 1113-1118, 1989
24. WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535, 1990
25. XU, Y. B., SHEN, Z. T., XU, J. C. CHEN, Y. and ZHU, L. H.: Mapping quantitative trait loci via restriction fragment length polymorphism markers in rice. *Rice Genet. Newsletter* **10**: 135-138, 1993
26. 矢野昌裕・春島嘉彰：分子マーカーを利用したイネ量的形質の遺伝解析，育種学最近の進歩，第36集：29-32，1994

Summary

As a basis of rice breeding for grain characters including morphology and composition, the authors dealt with an estimation of quantitative trait loci (QTL) by using molecular markers such as RFLP and RAPD.

1. In order to measure the amount of polymorphism of RFLP markers detected among the parental lines, twelve rice lines belonging to *indica*, *japonica* and American testers were assayed with the combinations between 53 RFLP markers and two restriction enzymes. Genetic variation was detected for 44 (41.5%) out of 106 probe-enzyme combinations. A high degree of polymorphism (40% and 43%) was indicated with *Hind*III or *Eco*RI, confirming the previous results that these enzymes are suitable for RFLP analysis in rice.

2. Frequencies of polymorphism detected between American testers ranged from 9.4% to 32.1% suggesting the existence of fairly large genetic variabilities. On the other hand, *japonica* lines were closely related showing an extremely low frequency of polymorphism. RFLP diversity between Surjamkhi (*indica*) and *japonica* or American lines was over 20%, while those between *japonica* and American lines indicated a variation ranging from 5.7% to 34% in the combination with different *japonica* lines.

3. Genetic variations of grain characters are also important for choosing parental combinations for the crossing experiments. Rice lines tested were classified into three categories based on grain size: Kirara 397, ID-47, No. 56, 83N1072, 83N1154 and 83N1209 belonging to "short grain" type; 83N1038, 83N1168 and IRAT13 belonging to "large grain" type; and the remainders belonging to "long and slender grain" type. Three American testers (83N1038, 83N1202 and 83N1209), and an *indica* line (Surjamkhi) showed high amylose content, whereas all *japonica* lines (Kirara 397, ID-47, IRAT13 and No. 56) and an American tester

(83N1154) fell into a group showing low or none amylose content.

4. F_2 population derived from a cross between ID-47 and 83N1168 was used for the preliminary QTL analysis. Polymorphisms between both parents were detected from 21 RFLP and 25 RAPD markers. A higher frequency of polymorphism (42%) was obtained in RAPD markers when compared with that of RFLP markers (17%). In the F_2 segregation, 18 of 21 RFLP markers and 18 of 25 RAPD markers fitted the expected segregation ratios, 1:2:1 or 3:1. Therefore, these 36 markers were employed in QTL mapping for grain and plant characters.

5. According to linkage analyses, the following alignments of molecular markers were newly established.

Chromosome 6 : RG264-RG64-(OPV10-420),
RG213-RG147(chromosome 3)-RG140(chromosome 1)

Chromosome 9 : (OPP1-960)-(OPV8-1000)
-(OPV6-920)-(OPV14-1140)-RG553, RG570-RZ892
(chromosome 10)

Unknown : (OPC15-630)-(OPC15-680)

Unknown : (OPV10-460)-(OPC10-770)

There were two cases in which two or three different chromosomal markers were linked with each other. Further confirmation is needed to examine the possibilities of pseudolinkage and structural difference.

6. QTLs attaching to markers were detected from a significant difference between mean values of three genotypic classes or two phenotypic classes of markers, as described below.

Culm : *sd-1* (chromosome 1)

Spikelet length : *sd-1*, RG140 (chromosome 1),
RG650 (chromosome 7), OPV6-920 (chromosome 9),
RG304 (chromosome 11), OPV7-1240 (unknown)

Spikelet width : RG140 (chromosome 1), RG147
(chromosome 3), RG13 (chromosome 5)

Heading period : RG28 (chromosome 8), RG650
(chromosome 7)

Amylose content : RG28 (chromosome 8), OPC15-
630 (unknown)

Days to heading : RG650 (chromosome 7), RG28
(chromosome 8)

1000 kernel weight : *sd-1*, RG140, RG147 (chromosome 1),
RG213 (chromosome 6), RG304 (chromosome 11)

Spikelet number per head : RG140 (chromosome 1),
RG341 (chromosome 12)

Panicle length : RG13 (chromosome 5), RG650
(chromosome 7)

Seed fertility : OPP1-960 (chromosome 9), RG341
(chromosome 12), OPC15-630 (unknown)

Although further experiments by using new molecular markers such as microsatellite and AFLP are needed for determination of QTLs by interval analysis, the authors are also preparing to produce a series of recombinant inbreds and backcross inbreds for detailed analysis. It is expected that new breeding techniques will be developed through marker-aided selection and marker-based gene cloning depending on the information of QTL mapping.