

AFLP と RAPD マーカーを用いたクロマツの連鎖地図*

林 英司⁽¹⁾・近藤禎二⁽¹⁾・寺田貴美雄⁽²⁾・倉本哲嗣⁽¹⁾・後藤陽子⁽¹⁾・岡村政則⁽³⁾・河崎久男⁽²⁾

Eiji Hayashi⁽¹⁾, Teiji Kondo⁽¹⁾, Kimio Terada⁽²⁾, Noritsugu Kuramoto⁽¹⁾,
Yoko Goto⁽¹⁾, Masanori Okamura⁽³⁾ and Hisao Kawasaki⁽²⁾

Linkage Map Based on AFLP and RAPD Markers in Japanese Black Pine

要旨：AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーを、既存の RAPD マーカーによるクロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) の連鎖地図に加えることを目的として、マツバナタマバエ抵抗性個体の自然交雑種子大配偶体 71 個の分析を行った。その結果検出された 244 個のマーカーと、既知の RAPD マーカー 127 個の多型データを合せて解析を行い、20 連鎖群および 3 連鎖対からなる 2088.1 cM の地図を作成した。推定ゲノム長は 2665-2719 cM であり、この連鎖地図は全ゲノムの 77.1-78.4% をカバーした。地図上の 207 マーカーの平均距離は 11.3 cM であった。AFLP マーカーを加えることにより、RAPD マーカーによる連鎖地図の総距離、ゲノムのカバー率、およびマーカー間の平均距離を改善することができた。マツバナタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖した RAPD マーカー 3 個もこの地図上の第 1 連鎖群上に位置づけることができた。

1 緒 言

わが国におけるマツ類は、文化的側面のみならず国土保全上重要な機能を有するものとして重要である。ところが、松枯れ、マツバナタマバエ等の虫害が年次変動はあるものの、マツ林に対して被害を及ぼしつづけているため、マツ林は存続の危機に瀕している。したがって今後、虫害抵抗性を有するマツの導入が増加するものと予想される。一方、林木は永年生の植物であるため、育種に非常に長い年月がかかることが、品種を効率的に育成していく上で最大の問題となっている。したがって、マツの育種年限を短縮するとともに、各種抵抗性品種をニーズに応じて育成していくために必要な技術の開発が望まれている。

連鎖地図は、質的形質を支配する遺伝子の位置の解明、量的形質に関わる遺伝子座 (QTL; Quantitative Trait Loci) の数や位置、その遺伝効果の推定を可能にするなど、育種の研究において利用することができる。さらに、有用形

(1) 林木育種センター 〒319-1301 茨城県多賀郡十王町大字伊師 3809-1
Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Tago, Ibaraki 319-1301 Japan

(2) 林木育種センター東北育種場 〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字大崎 95
Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan

(3) 林木育種センター九州育種場 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町大字須屋 2320
Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
2320 Suya, Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan

* この報告は、2001 年 5 月 Theoretical and Applied Genetics Vol.102²⁾に掲載された。

質と連鎖した DNA マーカーを用いることにより、優良な個体の早期選抜 (MAS; Marker-Assisted Selection) が可能であり、育種を効率化する手段として期待されている。

そこでわれわれは、クロマツ (*Pinus thunbergii* Parl.) の育種に役立てるため、連鎖地図の作成に着手し、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカー¹⁷⁾ により、総地図距離が 1469.8 cM、平均マーカー間距離が 15.6 cM、ゲノムの 67.5% をカバーする連鎖地図を作成した⁴⁾。しかし、1160 種類の RAPD プライマーを検討したにもかかわらず、総距離とマーカー間の平均距離が他のマツで報告^{1) 7) 8) 10) 11) 13) 15)} されているものに比べてそれほど向上していなかったため、連鎖地図をより高密度なものにする必要がある。

これまで簡便な優性マーカーとして広く用いられてきた RAPD マーカーに代わり、再現性が高く、比較的多型を得やすい¹²⁾ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカー¹⁶⁾ が近年盛んに用いられるようになった。AFLP マーカーは当初ゲノムサイズの小さい植物のために開発されたが、使用するプライマー長などを最適化することにより非常に大きいゲノムを持つマツについても、ゲノムの 85% 以上をカバーする連鎖地図が作成された^{1) 13) 15)}。

本研究では、既報⁴⁾ で用いた大配偶体について AFLP 分析を行い、総地図距離を延ばし、平均マーカー間距離を短縮し、さらに連鎖群を統合することを目指した。また、マツバノタマバエ抵抗性に連鎖する RAPD マーカーの位置を再確認し、可能ならば連鎖する AFLP マーカーを探索することを目的とした。

2 材料と方法

2.1 供試材料と AFLP 分析

マツバノタマバエに対し抵抗性である耐虫東奥育 17 号から採取された自然交雑種子由来の大配偶体 71 個の DNA を用い、AFLP 分析を行った。この大配偶体 DNA は、RAPD マーカーによる連鎖地図を作成した際に使用したものと同一である⁴⁾。AFLP 分析の手順は、装置や試薬の製造元 (パーキン・エルマー) の推奨する方法に従って行った。ただし、一次増幅の際に使用するプライマーは、アダプター *Eco*RI および *Mse*I の相補的塩基配列の 3' 末端側に 2 選択塩基 (それぞれ AC および CC) を加えたものを用いた。さらに、二次増幅では、一次増幅で用いた塩基配列の 3' 末端側に 1 塩基 (*Eco* 側)、あるいは 2 塩基 (*Mse* 側) を加えた塩基配列のプライマー組合せを用いた。温度、時間、サイクル数は、Remington ら¹³⁾ の方法に従い、遺伝子増幅装置に 9600 型 (パーキン・エルマー) を使用し PCR (Polymerase Chain Reaction) を行った。二次増幅後、AFLP 断片は、自動 DNA シークエンサー 373 型 (パーキン・エルマー) で検出した。非常に多数の多型が観察されたため、以下の基準を満たすもののみ連鎖分析に用いた。第一に、母樹である耐虫東奥育 17 号が同じ分子量の断片を保有すること。第二に、多型のピークの強度が、大配偶体間で安定していること。第三に、多型から前後 1bp の範囲内に他のピークが存在しないこと。

2.2 連鎖分析

AFLP 分析で得られた多型が、1:1 の期待分離比に適合するか、カイ二乗検定した。適合した AFLP マーカーの分離データを 127 個の RAPD マーカーの分離データ⁴⁾ と合せ、コンピュータ・プログラム MAPMAKER/EXP 3.0^{5) 6)} を使用して連鎖分析を行った。まず、プログラムが相引と相反型の連鎖を計算することができるよう、マーカーの表現型を裏表 2 通りにコード化して入力した^{8) 10) 11)}。次に、連鎖群を確認するために、LOD スコア 5.0 以上の条件で「Group」コマンドを実行しマーカーのグループ化を行った。各連鎖群内でマーカーの順序を構築するために、

除外閾値として LOD スコア 2.0 の条件で、最良な順序および二番目に最良な順序を比較した。さらに、マーカーの順序を再確認するために「Ripple」または「Compare」コマンドを実行した。各マーカー間の地図距離の算出には、Haldane 地図関数を用いた。Hulbert ら³⁾の方法を用い 4.0, 5.0, 6.0 の LOD 値の場合についてゲノム長を算出し、その平均値をクロマツの推定ゲノム長とした。

3 結 果

耐虫東奥育 17 号の種子大配偶体 8 個の DNA を用いて、48 プライマー組合せによる AFLP 分析を行った。効率良く分析するため、増幅断片数が適当でしかも多型の多い 24 プライマー組合せを選抜し、これらのプライマー組合せにより 71 個の大配偶体 DNA について分析を行い、材料と方法に示した 3 つの基準を満たす 244 マーカーを選抜した (表 1)。これら 244 マーカー中、4 マーカーが 1:1 の期待分離比から有意に ($p < 0.05$) 逸脱したので、これらは連鎖分析から除外した。残りの 240 個の分離データと既知の RAPD マーカー 127 個の分離データとを合せて、MAPMAKER を使用して解析した。これらの 367 マーカー中、AFLP マーカー 228 個および RAPD マーカー 121 個が、23 の連鎖群にグループ化された。そして、AFLP マーカー 157 個と RAPD マーカー 50 個の位置が確定し、20 連鎖群および 3 連鎖対からなる連鎖地図が作成された (図 1)。その全長は 2088.1 cM, 平均マーカー間距離は 11.3 cM だった。グループ化はされたものの最終的に連鎖地図に座乗しなかった AFLP マーカー 71 個および RAPD マーカー 71 個

表 1. クロマツの AFLP 分析で得られた多型数および連鎖地図上に座乗した多型数

プライマー組合せ		多型数	連鎖地図に座乗した多型数
Eco +3	Mse +4		
ACA	CCAA	10	4
ACA	CCAC	6	3
ACA	CCAG	5	2
ACA	CCTT	5	5
ACA	CCTG	5	2
ACC	CCAA	5	5
ACC	CCAC	5	3
ACC	CCAG	15	9
ACC	CCTC	4	4
ACC	CCTT	9	5
ACC	CCGA	8	2
ACG	CCAA	20	17
ACG	CCAC	11	6
ACG	CCAG	2	2
ACG	CCCA	3	0
ACG	CCTA	11	12
ACG	CCTC	7	4
ACG	CCTT	17	13
ACG	CCTG	11	6
ACT	CCAC	19	15
ACT	CCAG	9	4
ACT	CCTA	24	16
ACT	CCTC	5	2
ACT	CCTG	24	16
平均		10	6.5

プライマー組合せは、選択塩基の配列で示す。

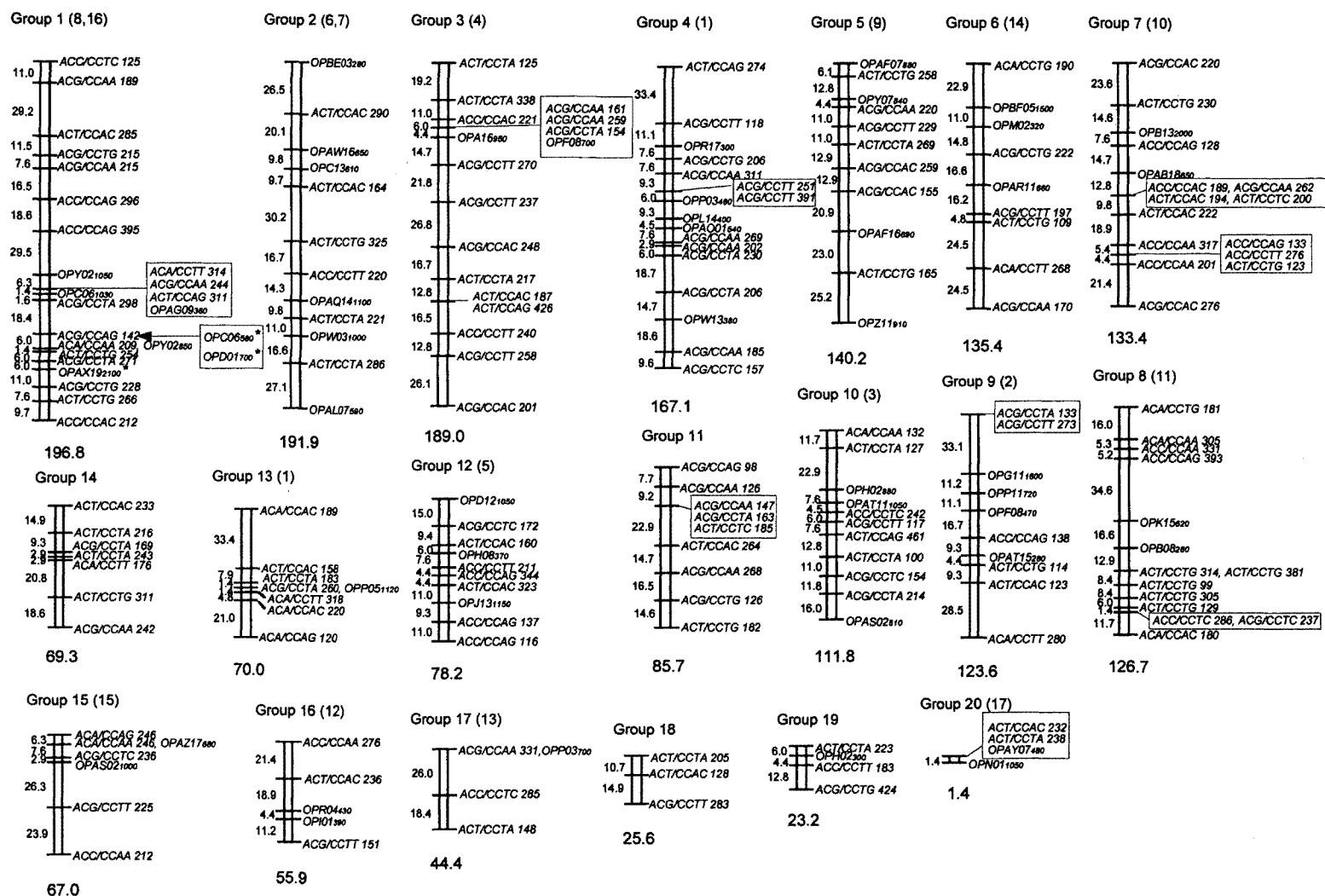


図1. クロマトの連鎖地図

AFLP マーカー 157 個および RAPD マーカー 50 個が 20 連鎖群, 3 連鎖対に帰属した。ただし連鎖対は図中に表記していない。() 内の数字は RAPD マーカーによる連鎖地図の連鎖群番号。マツパノタマバエ抵抗性と連鎖した RAPD マーカー 3 個のうち, OPA192100 のみ位置を定めることができた。OPC06580 および OPD01700 は, 計算上位置を決めることができなかった, 最も確からしい位置を矢印で示した。アスタリスク (*) はこれら 3 マーカーを示す。

は、それぞれ最も確からしい位置にアクセサリーマーカーとして配置された (*OPC06₅₈₀*, *OPD01₇₀₀*を除き図 1 には示していない)。全体の 4.9%にあたる 18 マーカーは、どの連鎖群にも帰属しなかった。LOD スコア (Z) でのゲノム長 (G) の評価を行ったところ、 $Z = 4.0$ で $G = 2718.5$ cM, $Z = 5.0$ で $G = 2665.0$ cM, $Z = 6.0$ で $G = 2709.1$ cM であった。既報の RAPD による連鎖地図中の第 8 連鎖群と第 16 連鎖群は結合して新しい地図中の第 1 連鎖群になった。同様に第 6 連鎖群と第 7 連鎖群は、第 2 連鎖群になった。これに対し、第 1 連鎖群は 2 つの連鎖群、第 4, 13 連鎖群に分離した。したがって、RAPD マーカーによる地図中の 17 個の連鎖群は、新しい地図では 16 個の連鎖群に再編成された。マツバノタマバエ抵抗性に連鎖した RAPD マーカー 3 個⁴⁾のうち、地図上には *OPAX19₂₁₀₀*のみを位置づけることができた。*OPC06₅₈₀*と *OPD01₇₀₀*は、アクセサリーマーカーとして配置した。

4 考 察

4.1 AFLP と RAPD 分析の比較

われわれはこれまでに、今回と同じ大配偶体を用いてマツバノタマバエに対する抵抗性と連鎖したマーカー 3 個を含む RAPD マーカー 98 個、17 連鎖群からなる連鎖地図を作成した⁴⁾。総地図距離は 1469.8cM、ゲノム長は 2138.3 cM であると推定されたので、ゲノムの 67.5%をカバーしていると考えられた。今回新たに AFLP マーカーを加えることにより、マーカー間の平均距離を 15.6cM から、11.3cM に短縮することができた。クロマツのゲノム長は、2697.5 cM と推定され、RAPD マーカーのみから推定した値よりも 26% 長かった。総地図距離は、42% 長い 2088.1cM となり、ゲノムの 77%をカバーした。このように、AFLP マーカーを加えることにより、マーカー間平均距離、総地図距離、ゲノムカバー率に関して RAPD による連鎖地図を大幅に改善することができた。また、RAPD による地図の 2 対の連鎖群を、新しい地図ではそれぞれ一つに統合することができた。RAPD マーカーによる連鎖分析 ($\text{LOD} > 3.0$) よりも、厳しい LOD スコア (> 5.0) で連鎖分析を行ったが、無連鎖の RAPD マーカーの数は 12 から 6 まで減少した。

連鎖地図作成は、植物体の栽培と形質の評価に労力と時間がかかる作業であったが、この 10 年余りの間に DNA マーカーが利用されるようになり、これまで遺伝的な情報が限られた林木においてさえも短時間で連鎖地図を作成することが可能になった。RAPD マーカーは非常に簡便であること、AFLP マーカーは再現性が高く、多数の多型を得やすいという特徴があり、この 2 つの手法は現在でも多方面に利用されている。また、マツのさまざまな形質に関する連鎖分析においても、今後広く利用されると予想されるため、これらのマーカーにより 1 回の分析でどのくらいの多型が得られるのか等の特徴を把握する必要がある。本研究の AFLP 分析には RAPD 分析と同一の大配偶体 DNA を使用したため、二種類のマーカーの特徴を直接比較することができる。まず、得られた多型数についてみると、AFLP 分析ではプライマー組合せあたり平均 10 個の多型が得られ、この値は RAPD 分析の 7.4 倍に相当し、AFLP が多型マーカーを得やすい方法であることが示された (表 1)。また、今回の連鎖地図には、アクセサリとしてさえも RAPD マーカーが見られない 50cM 以上の領域が、第 2, 5, 6, 7, 14, 15 連鎖群で 6 ヶ所検出された。このことは RAPD マーカーがゲノムの部分的な領域をサンプリングしているだけであることを示している。RAPD マーカーでは検出できなかった領域に、AFLP マーカーを検出した結果、連鎖群の統合、ゲノム長の増加につながったと考えられる。このように RAPD 分析よりも AFLP 分析のほうが、プライマー当たりの多型数が多く、ゲノムの広い範囲にわたる多くのマーカーを短時間で得ることができるので、連鎖地図作成に適していると考えられる。

4.2 AFLP マーカーのスクリーニング

Remington ら¹³⁾ はテーダマツ (*Pinus taeda*) において, Costa ら¹⁾ はフランスカイガンショウ (*Pinus pinaster*) において, AFLP マーカーによる連鎖地図を作成した。本研究でみられた, プライマー組合せあたりの多型マーカー数 (10 個) は, テーダマツ (24.8 個) やフランスカイガンショウ (21.4 個) よりも少なかった。彼らを使用したプライマー組合せの中には, われわれが使用したものと同じものが含まれているので, 直接多型数を比較したが, その傾向は同様であった。しかし, フランスカイガンショウの場合, 本報告より多い個体数 (200 個の大配偶体) と高い LOD スコア (>6.0) で分析したにもかかわらず, 連鎖地図上に位置づけられたマーカーは, 235 マーカー中 114 マーカー (49%) だけであった。同じように, テーダマツでは 521 マーカー中, 地図上の位置をはっきりと定められたのは 184 マーカー (35%) だけであった。これに対し, クロマツの連鎖地図に位置づけられた AFLP マーカーの割合は, 240 マーカーのうち 65% と非常に多かった。

今回得られた多型の中には, 大配偶体間でピーク強度が一定しないものが一部みられた。これは, 断片増幅の量に違いがあったこと, あるいは同じ分子量を持つ複数の断片の非特異的増幅⁹⁾ が原因と思われる。また, 大配偶体で見られる多型のいくつかは, 母樹では検出されない場合もあった。これは, 鋳型 DNA の準備または増幅反応中のアーティファクトによるかもしれない。これらのエラーによって分離データにミスが生じた場合, マーカーを地図上の特定の位置に位置づけることが難しくなると予想される。本研究では, 多数の多型の中から材料と方法で述べた基準にもとづいて, 質の高いマーカーを選抜した結果, テーダマツの場合に比較して高い割合でマーカーを地図上に位置づけることができたと考えられる。

4.3 マツバノタマバエ抵抗性遺伝子と連鎖したマーカー

マツバノタマバエ抵抗性は, 単一の優性遺伝子によって制御されていることが明らかにされており¹⁴⁾, MAS による抵抗性育種の効果が高いと予想される。抵抗性遺伝子と連鎖した RAPD マーカー 3 個⁴⁾ のうち, *OPAX192100* が第 1 連鎖群上に存在することがわかった (図 1)。この近傍には, *OPC06580* と *OPD01700* が最も確からしい位置にアクセサリマーカーとして位置づけられた。これらのマーカーの 15 cM 以内に AFLP マーカー 4 個が位置しており, 抵抗性遺伝子近傍の連鎖地図に新たに加えることができるのではないかと考えた。しかし, 抵抗性 17 号×感受性個体 6 号の F₁ 家系におけるマーカーの分離比をカイ二乗検定した結果, 全て期待分離比 1:1 に適合しなかった。これは, 両親がともにこれらのマーカーを保有しているためと考えられる。したがって, これらの AFLP マーカーは他の交配家系においては役立つ可能性があると考えている。

謝 辞

ノースカロライナ大学のレミントン博士には, AFLP プライマーの塩基配列について非常に貴重な情報をご提供いただいた。ここに心より感謝を申し上げる。

引用文献

- 1) Costa, P., Pot, D., Dubos, C., Frigerio, J. M., Pionneau, C., Bodenes, C., Bertocchi, E., Cervera, M.-T., Remington, D. L. and Plomion, C.: A genetic map of maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers, *Theor. Appl. Genet.* 100, 39-48 (2000)
- 2) Hayashi, E., Kondo, T., Terada, K., Kuramoto, N., Goto, Y., Okamura, M. and Kawasaki, H.: Linkage map of Japanese black pine based on AFLP and RAPD markers including markers linked to resistance against the pine needle gall midge, *Theor. Appl. Genet.* 102, 871-875 (2001)
- 3) Hulbert, S. H., Illott, T. W., Legg, E. J., Lincoln, S. E., Lander, E. S. and Michelmore, R. W.: Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction length polymorphism, *Genetics* 120, 947-958 (1988)
- 4) Kondo, T., Terada, K., Hayashi, E., Kuramoto, N., Okamura, M. and Kawasaki, H.: RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*), *Theor. Appl. Genet.* 100, 391-395 (2000)
- 5) Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S. and Newberg, L.: MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics* 1, 174-181 (1987)
- 6) Lincoln, S., Daly, M. and Lander, E.: Construction genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0, Whitehead Institute Technical Report, 3, Whitehead Institute, Cambridge, Mass. (1992)
- 7) Nelson, C. D., Kubisiak, T. L., Stine, M. and Nance, W. L.: A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs, *J. Hered.* 85, 433-439 (1994)
- 8) Nelson, C. D., Nance, W. L. and Doudrick, R. L.: A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliotii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs, *Theor. Appl. Genet.* 87, 145-151 (1993)
- 9) Nikaïdo, A., Yoshimaru, H., Tsumura, Y., Suyama, Y., Murai, M. and Nagasaka, K.: Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*, *Genes Genet. Syst.* 74, 55-59 (1999)
- 10) Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C.-E. and O'Malley, D. M.: Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers, *Heredity* 74, 661-668 (1995)
- 11) Plomion, C., O'Malley, D. M. and Durel, C.-E.: Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual, *Theor. Appl. Genet.* 90, 1028-1034 (1995)
- 12) Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A.: The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellites) markers for germplasm analysis, *Mol. breed.* 2, 225-238 (1996)
- 13) Remington, D. L., Whetten, R. W., Liu, B.-H. and O'Malley, D. M.: Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*, *Theor. Appl. Genet.* 98, 1279-1292 (1999)
- 14) 寺田貴美雄: クロマツのマツバノタマバエ抵抗性育種に関する研究, *林育研報* 10, 1-32 (1992).
- 15) Travis, S. E., Ritland, K., Whitham, T. G. and Keim, P.: A genetic linkage map of Pinyon pine (*Pinus edulis*) based on amplified fragment length polymorphisms, *Theor. Appl. Genet.* 97, 871-880 (1998)

- 16) Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.* 23, 4407-4414 (1995)
- 17) 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)

Linkage Map Based on AFLP and RAPD Markers in Japanese Black Pine

Eiji Hayashi ⁽¹⁾ , Teiji Kondo ⁽¹⁾ , Kimio Terada ⁽²⁾ , Noritsugu Kuramoto ⁽¹⁾ ,
Yoko Goto ⁽¹⁾ , Masanori Okamura ⁽³⁾ and Hisao Kawasaki ⁽²⁾

Summary : Macrogametophytes derived from the seeds of a tree resistant to pine needle gall midge (PGM) were analyzed using amplified fragment length polymorphism (AFLP) . A total of 244 segregating loci were detected among 71 macrogametophytes. Combining the AFLP results with previously reported segregation data for 127 RAPD markers, 157 AFLP and 50 RAPD markers with confirmed map positions were assigned to 20 linkage groups and three pairs covering 2088.1 cM with an average distance of 11.3 cM. The total map distance covers about 77.1-78.4% of the total genome, estimated to be approximately 2665-2719 cM. Thus, using AFLP markers, the previous RAPD map of this tree was improved in terms of average distance between markers, total map distance, and coverage of the genome. Three RAPD markers linked to a gene associated with resistance to PGM were also located on this map.

-
- (1) Forest Tree Breeding Center
3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan
 - (2) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan
 - (3) Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
2320 Suya, Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan