

野菜育種における DNA マーカーの利用

大澤 良

筑波大学農林学系 305-8572 つくば市天王台

Use of Molecular Markers in Vegetable Breeding

Ryo Ohsawa

Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572

はじめに

現在、植物育種において DNA マーカーが用いられている場面を大きく分けると、①集団の遺伝的多様性の評価、②品種系統の同定を含む系統関係の解析、③遺伝資源の維持・増殖・評価、④集団の生殖様式の推定あるいは集団にかかる淘汰圧の推定など遺伝構造の解析、⑤品種の均一性の評価や同一性・純度検定、⑥遺伝子連鎖地図の作成および地図情報を利用した選抜となる。DNA マーカーにより、同時に多数の遺伝子座における遺伝子(型)頻度の情報が得られることから、従来のアイソザイムあるいは一定領域の DNA 情報に比べて全ゲノム的に必要な情報を豊富に得ることができるようになった。上記の①から⑤では分子マーカーとして得られたマーカー遺伝子座の情報が単独で用いられるか、同一集団において得られる多数の情報が、それぞれの遺伝子座間の関連を抜きにして用いられていることが多い。一方、⑥の連鎖地図作成は、全染色体上に得られる分子マーカーと耐病性や草丈など多様な質的あるいは量的形質の連鎖関係を示し、分子マーカーによる選抜 (Marker Assisted Selection, MAS) を可能とすることが目的であり、育種事業において期待されている手段である (Tanksley, 1993; Young, 1999; Kumar, 1999)。野菜育種では対象作物が広いこと、企業育種が主体であり公的育種の勢力が少ないことなどの理由からイネのように集中的に研究が進むことは期待できない。しかし、今後主要作物に関しては連鎖地図作成と農業形質の遺伝解析、共有 DNA マーカーの確立など産官学が協力し合う全国的なプロジェクトが進展していくものと思われる。本稿では、野菜育種における DNA マーカー利用を念頭に、DNA マーカーによる遺伝的多様性評価、系統判別や純度検定への利用、連鎖地図作成、育種への応用について述べていきたい。

DNA マーカーの種類と利用方法

約 20 年前に開発された RFLP の利用以降、現在は PCR ベースの DNA マーカー利用の第 2 世代に入っている (Staub ら, 1996)。これまでに開発されている分子マーカーを解析対象によって使い分けることになる。育種において重要な点は近縁な系統間での多型性の有無とシーケンサーなどの設備投資の必要性を含めた開発コストである。各種マーカーはいつでも応用される段階に達しているが、現実にはマーカー開発過程の煩雑さやコスト高が障害となっているようである。また、企業育種が主体の野菜育種などでは、系統間変異などの情報は簡単には企業委託で開発できるものではないため、マーカー開発ネットワークの構築 (平井, 2001) などが必要であろう。個々のマーカーの特徴とその利用方法の詳細は総説 (津村, 2001; 矢野, 2004) を参照されたい。

遺伝的多様性評価における DNA マーカー

遺伝的多様性評価における DNA マーカー利用については数多くの総説 (Karp ら, 1996; Karp, 1997; Ford-Lloyd, 2001; 津村, 2001 など) がある。DNA マーカー利用では、RFLP や SSR のような共優性マーカーは遺伝構造を示すパラメータの不偏推定値が得られるが、RAPD は優性マーカーであり推定量の偏りが危惧される。DNA マーカーとしての RAPD の不安定性や再現性が問題にされることが多いが、同一条件下で明瞭なマーカーを用いることで多くの場合解消される。Huff (2001) は他殖性で集団中の異質性が高い牧草における遺伝的多様性評価に際して、RAPD をマーカーとして、AMOVA (Analysis of Molecular Variance) 解析 (Schneider ら, 2000) を手法とする場合について論じている。AMOVA は F 統計量に類似した手法で、観察された分子マーカーに基づく遺伝的分散を地域や集団ごとに分割できる。AMOVA は共優性マーカーについて開発されたものであるが、RAPD 利用による解析にも用いられている。Isabel ら (1995) は様々な優性マーカー利用による遺伝構造推

定を行い、集団間分化に関してはユークリッド距離に基づく AMOVA が最も偏りが少ない手法であることを明らかにしている。また、Stewart・Excoffier (1996) は RAPD データに基づく AMOVA による集団間分化は集団間の分化程度を過小評価する傾向があること、RAPD 表現型データは、分離から推定した RAPD 遺伝子型データと比べた場合に集団間分化の推定精度が劣ることを報告している。Huff (2001) は RAPD と AMOVA を他殖性植物集団の分化推定の第 1 段階として利用することを推奨している。また、多様性評価については、自殖性や栄養繁殖性作物はともかく他殖性作物において個体間変異を軽視した手法がとられていることが多い。例えば、他殖性植物において各品種 30 個体について AFLP 解析を行い、多数遺伝子座ごとの遺伝子頻度を推定し、系統関係を示したものと、任意に 10 個体を選び各遺伝子座について頻度を無視して、バンドの有無を情報にした場合とを比較すると、得られる系統関係はまったく異なってくる。他殖性集団の多様性評価においては、各集団の個体別遺伝子型評価が重要である。

品種判別、純度検定における DNA マーカー利用

育成者権保護の技術として DNA 多型検出法を利用することが、現実化している (原田ら, 2004)。イネなど主要作物やイチゴやイグサなど育成者権の侵害が問題になっている作物を中心に解析・実用化が進んでいるが、野菜品種特有の問題を中心に紹介する。

品種判別

作物育種における分子マーカーの利用のひとつに、個々の品種の遺伝的特異性 (類似性) を示し、品種・系統の個別性を判定することがあげられる。それにより育種家の権利の保護をしようとするものである (Soller・Beckmann, 1983; Wrigley, 1995; Smith・Register, 1998; Staubら, 1999; 野澤, 2004)。育種家の権利保護のためには、ある系統が無作為に選ばれたときに、それが市販品種と同一の遺伝子型組成である確率が重要になる。自殖性作物のように、対象とする品種が全遺伝子座で完全ホモ接合とした場合に、ある植物について、品種同定のために持ち込まれたある品種が、比較される品種のどれかと同じであるか否かを DNA マーカーで検査する場面を想定した理論的解析が公表されている (鶴飼, 2004)。具体的には、持ち込まれた品種に対し、既存品種からの標本である比較品種中に 1 品種以上の同一マーカー型が存在する確率 P_i は、比較品種 (n 品種) がもつ対立遺伝子の比較品種中での頻度が遺伝子座 (k 座) ごとに異なり、遺伝子座 i では、 P_i ($0 < P_i < 1$) であるとき、 $P_i = 1 - (1 - \prod_{j=1}^k p_{ij})^n$ で表される。今、全遺伝子型がホモ接合で固定している自殖性作物を考え、5 座について対象品種のもつ対立遺伝子の比較 20 品種中の頻度が 0.1, 0.1, 0.2, 0.2, 0.1 だとすると、 $P_i = 1 - (1 - 0.1 \times 0.1 \times \dots \times 0.1)^{20} =$

0.0008 となり、このような低い確率で対象品種と同じマーカー型を示す品種が 20 品種中に見出せたら、偶然以外の原因と考えるべき。しかし、頻度が 0.3, 0.3, 0.4, 0.4, 0.4 だとすると、 $P_i = 1 - (1 - 0.3 \times 0.3 \times \dots \times 0.4)^{20} = 0.109$ となり、対象品種が既存の比較品種と同一品種であることを疑いたくなる。しかし、偶然そのようなことが起きる確率が無視できないため、その判断は適切ではない。このような場合にはマーカー数を増やすべきであり、遺伝子頻度が 0.3 と 0.4 の 2 座が増えるだけで該当品種が比較品種と同一である確率は 0.01 まで下がることになる。

純度検定品

品種種子の純度を高いレベルで保つことは、品種登録による知的財産権の保護をはじめとして、生産者、実需者、消費者への生産物の均一性の保障の意味、あるいは多様な環境への適応予測、育成母本としての能力の保証の意味で必須のことである。純系品種の純度検定については、総説 (中村, 1985; Wrigley, 1995; Smith・Register, 1998 など) を参照していただきたい。野菜品種のほとんどを占める F_1 品種の純度も求められていることは純系品種の場合と同様である。これまで F_1 品種における種子純度検定には外観形質による幼苗検定やアイソザイムマーカーが利用されてきた。Arus (1983) はアイソザイムマーカーで、両親が多型を持ち、それぞれ固定している場合と片親が分離している場合に分けて F_1 純度検定の理論を明らかにしている。純度検定に用いる場合の DNA マーカーの特性については、矢野 (2004) に詳しい。現実には、 F_1 品種育成に際して用いられる両親が遺伝的に類似しているためアイソザイムマーカーでは多型が見つからない場合も多い。しかし、DNA マーカー利用では、近縁な両親系統においても多型を見出すことが期待できる。その場合には、全ゲノム的に多型解析が探索できる AFLP による多型遺伝子座の探索や超多型マーカーである SSR 利用が有効であろう。すでに、他殖性作物での分子マーカーによる F_1 純度検定はアブラナ科野菜 (Hahizumeら, 1993; Mengら, 1998; Crocketteら, 2000; 2002; 伴ら, 2002; Kaminskiら, 2003) で報告されている。

他殖性野菜における新育種法の提案

他殖性の場合には対象品種がもつ対立遺伝子型が判ったとしても、比較品種ごと、ひいては比較品種全体での遺伝子頻度が変動するためその品種の判定は困難である。野菜品種においては、自殖性として育種されるナスにおいても、在来品種の中には異なる対立遺伝子型やヘテロ接合の個体が見られる (福岡, 2004)。他殖性野菜では、 F_1 品種の両親系統でも近交弱勢を防ぐ意味から、通常、数回の自殖により農業形質の固定を図りその他の部分はヘテロ性を残していることが多い。そのため、上記の品種判別はもとより、 F_1 純度検定を行う際のマーカー利用にも制限がある。塚崎ら (2003) は他殖性植物育種における

問題点として集団内での遺伝的分離をとりあげ、それを克服する新たな品種育成手法を提案している。これは、任意に選んだ SSR マーカー座について両親系統内の全個体がある対立遺伝子について、系統ごとに異なるホモ接合になるように選抜し、それ以外の座では多型性を容認しておくものである。近交弱勢を避けて純度検定および品種識別が可能な F₁ 品種の育成を試みるものである。農業形質との連鎖に注意すれば、SSR マーカーは同一遺伝子座における多型が期待できるマーカーとして有望であろう。

マーカー利用選抜と QTL 解析

DNA マーカーを利用した育種においては、対象形質が質的遺伝子支配の形質か量的支配の形質かによりその手法は異なる。質的遺伝子支配の形質は、モチとウルチのように表現型が不連続で、その差異を定性的に表せる。通常、1個あるいは数個の遺伝子が関与しており、表現型が環境の影響を受けない特徴を持つ。したがって、その選抜には、対象形質遺伝子の利用、連鎖する遺伝子の利用、マーカー利用戻し交雑、Bulked Segregant Method が適している。一方、量的遺伝子支配の形質は、表現型が種子数のような計数値または草丈のような長さ、収量のような重さ、開花期のような時間など計量値で表され、複数の遺伝子が関与し、環境の影響を受けやすい特徴を持つ。関与する遺伝子座が k 個あるとすると F₂ での分離遺伝子型は 3^k にもなる。したがって、その選抜には、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析、MAS、選択的遺伝子型決定法、DNA まとめ法が適している。

他殖性作物集団において見られる遺伝的多様性は育種操作を複雑にしている。他殖性植物集団は基本的に遺伝的異質性を持ち、異型接合体からなるため、分子マーカーを使うに際しても多数個体を対象にした解析が必要である。分子マーカーを利用した遺伝構造の解析より得られる情報は育種家にとって価値の高いものであるが、経済的にも労力的にも大変な作業となるためあまり進展していない。そこで、分子マーカーを他殖性植物集団での選抜に有効利用するための簡便な方法が求められていた。Michelmore ら (1991) は耐病性などに連鎖している分子マーカーを迅速に見出す方法として、レタスべと病を例にして Bulked Segregant Method を提唱した。目標形質に関する分離世代を利用し、両親間での多型と照らし合わせて目的形質に連鎖していると考えられる分子マーカーを得る方法である。この手法により、ピスタチオの雌雄性 (Hormaza ら, 1994)、パパイアの雌雄性 (Flachowsky ら, 2001)、アルファルファにおける品種判別と品種の類縁関係 (Yu・Paul, 1993)、ダイコンの稔性回復遺伝子 (Murayama ら, 1999) などが明らかになっている。この手法の注意点としては、連鎖していないマーカーでも、群内の個体数がごく少ないと両群とも群内で

ンドを示す個体が分離しないことがありうること、形質の遺伝子座とマーカー座との連鎖が検出できるだけで、組換え価は推定できないこと、量的形質に対しては効果が期待できないことが挙げられる。

松浦ら (1994) は、キュウリの性表現型およびダイコン自家不和合性遺伝子の識別に分子マーカーを利用し、主要形質の一次選抜効率を著しく向上できたことから、分子マーカー利用の有用性を示している。また、通常、同質遺伝子系統を利用して、対象遺伝子座と連鎖関係にある DNA 多型を見つけるが、松浦 (1995) は逆に DNA 多型からの連鎖同定を行った。この研究は育種家が所有する系統を利用しながら、農業形質の選抜に有効な分子マーカーを得るという観点から大変に興味深い手法である。

一方、量的形質に関与する遺伝子座について、連鎖地図上の位置と遺伝効果を個別に推定する方法が多くの主要作物種、園芸種で進められており、園芸種における QTL 解析、およびその情報に基づくマーカー利用選抜 (MAS) が展開されることになろう。QTL マッピング手法は実用段階にあるが、人的資源と資金に依存する。分子マーカーに依拠した選抜が育種の効率化につながるのかという疑問に対しては、多くの理論および応用方法に関する総説が出ている (Kumar, 1999; Young, 1999; Dreher ら, 2003)。そのほとんどは MAS の可能性を支持するものであるが、Young (1999) は、DNA 解析技術の進展が MAS の実用化に結びつかない理由として、分子育種家が実用を念頭に置いた技術開発をしていないことと育種家が厳密な要求をしていないことの齟齬にあると述べている。しかし、Edwards・Page (1994) はトウモロコシの量的形質をモデルにして従来の表現型循環選抜と MAS の効率をシミュレーションによって比較している。それによると QTL とマーカーの距離が MAS の効果を左右する大きな要因であり、総じて検定交配による後代検定付きの 2 年 1 サイクルの循環選抜に比べ 1 年 2 サイクルの MAS はより早く、想定した全遺伝子型値の集積が可能となり、目標の系統が得られることが示されている。

他殖性作物育種は遺伝子型組成の構築そのものである。すなわち、一代雑種のように均一なヘテロ接合体による集団の育成あるいは特定領域の遺伝子型のみをホモ化しその他の領域は多様性を維持することなどが他殖性育種の目標である。特定の遺伝子座でのヘテロ性と量的形質の関係などが明らかになれば、概念の域をでなかった遺伝子型構造に基づく品種育成を具体化でき、計画的で効率のよい品種育成が可能となる。野菜育種においても重要であるヘテロシスに関して、Charcosett ら (1991) は両親系統の分子マーカーに基づく遺伝的距離と幾つかの遺伝子座によって支配されている量的形質におけるヘテロシスの相関から、マーカーを選択するならば、ヘテロシス程度の予想はかなり効果的であることを報告している。ヘテロシスの発現機構についても作物ごとに超優性説と

優性説のそれぞれを支持する結果が得られている(鶴飼, 2001).

QTL解析の理論ならびにマッピング手法の詳細については鶴飼(1999a; 1999b; 2001)や津村(2001)を参照されたい。既に作成されている各植物種の遺伝子地図はイネやトウモロコシなど主要作物, トマトなど主要園芸種については国際的プロジェクトの進行に応じて公開されているが(USDA, <http://www.nal.usda.gov/pgdic/tutorial/Default.htm>), 他の園芸種についてはまとめられておらず, 文献的データベース(<http://www.asahi-net.or.jp/~fh6y-uki/mapqtl.html>)などがあるにすぎない。マーカー情報の共有性, 利便性などからも公的機関による公開が待たれる。野菜茶業研究所では, ナス(Nunomeら, 2001; 2003), ハクサイ(Kikuchiら, 1999; Suwabeら, 2002; 諏訪部ら 2003), メロン(Chibaら, 2003), ネギ(若生ら, 2002; 小原ら, 2003a; 2003b)においてSSRマーカーをはじめとするDNAマーカーの開発, 連鎖地図作成がなされ, 様々な形質の遺伝解析が試みられている。これらの地図情報を伴うマーカーは量的形質解析のみならず, 品種判別と純度検定にも多大な貢献が期待できる。開発者の権利保護を踏まえながら, 誰もがアクセスできるこれらの情報データベースの構築が求められている。

QTL解析における留意点

実際にQTL解析を行うに際して抱える問題としては, マーカー選定を含む遺伝子地図作製法など分子生物学レベルの問題の他に, (1)交配組み合わせ, (2)対象形質に適した世代の選択, (3)量的形質の測定方法などに注意を払う必要がある, 統計遺伝学の基礎的な知識が必要である(鶴飼, 2001, 2002).

交配組合せと世代の選択

実際に解析しようとするときには, どのような交配をして, どの世代を選択すべきかを悩むことが多い。交配組み合わせに関しては, 目的形質に関与する遺伝子座を多数検出したい場合には, 表現型ができるだけ異なる品種を両親に選ぶことと, いくつかの異なる交配組合せについて解析を行うことが望ましい。解析集団としては F_2 世代またはDH(Dihaploid)集団, 組換え近交系(Recombinant Inbred Lines; RIL)が望ましい。DHやRILでは優性効果の推定はできないが, 同じ個体数と遺伝率の条件下では, DHやRILのほうが F_2 よりもQTL検出力が増す。また全個体がホモ接合であるDHやRILでは, 同一遺伝子型の個体を増殖できるため, 実験の反復区の設定や個体数増加による誤差の縮小, 異なる環境下での実験の比較検討, 多数の形質の計測などが可能となり, 形質の環境との作用を考慮する場合に必要な情報が得られることとなる。ただし, RILでは十分に世代が進んで, DHとほぼ同様に扱えることが前提である。その前の世代のRILによるQTL解析は遺伝子型頻度が世代ごとに異なる

ため容易ではない。戻し交雑世代(BC)は, 一般にLOD値が低いことと, 相加効果と優性効果とを区別して推定できないことからQTL解析の材料としては望ましくないといえる(鶴飼, 2001).

統計遺伝学的解析の必要性

QTL解析と並行して, 対象形質について P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , F_3 や BC_1 と BC_2 の各世代の平均と分散を求め, 分離している全QTLによる遺伝分散, 相加分散, 優性分散を求め, それとQTL解析から得られたQTL別の遺伝効果から期待される遺伝分散, 相加分散, 優性分散とを比較することにより, 検出し残したQTLの有無やQTL間エピスタシスの有無について推察することができる。このような解析ができない場合でも, 環境分散として両親における分散を求め, F_2 世代における遺伝分散と広義の遺伝率を求めることが必要である。環境変異が大きく広義の遺伝率の低い形質や個体を単位とする悉無形質については F_2 個別系統を養成して, 系統単位で量的形質を調査するべきである。QTL解析の目的は関連する遺伝子座数を知ることだけではなく, それらの効果を知ることである。

形質測定精度

環境条件による変動を確実に調べることがQTL解析には不可欠である。野菜の特異性として, 多くの形質が作型や栽培方法の違いで大きく異なることが挙げられる。作型や場所などの環境による変動の大きい形質では, 様々な作型や場所で同じ実験を行い, その総合的解析から, QTL解析結果の作型または場所による差異を調べ, QTLごとに遺伝子型 \times 環境交互作用を調べることにより対象とするQTLがどのような性質を持つのかを解析することができる。QTL解析に先立ち, 作型などの違いが生み出す形質の違いを質的にではなく計量的に把握することが前提になる。

QTL解析では, 低い遺伝率の形質でも解析が可能であり, 形質の計測法もそれにみあう精度を要求される。目視による観察や, スコアによる観察値の表現はできるだけ避け, 量的に計測したほうが良い。さらに, 実験の精度を高める, 形質発現の環境条件を均一にして環境変動を抑える, 実験区の反復を増やす, 個体単位ではなく系統または集団単位で値を求めることで, 形質の広義の遺伝率を高めることにより, QTLの検出力が増す(Hayashi・Ukai, 1999)。広義の遺伝率を高めることは, QTL解析においてマーカーの数や個体数を増加することよりもはるかに重要である。

収量や早晚性などの形質の測定においては, できるだけその構成要素への分解が重要である。果実形態であれば, 画像解析による構成要素への分解(Iwata・Ukai, 2002), 早晚性であれば感光性や感温性などへの分解が, 個々のQTLの役割を理解するのに役立つ。また, 発芽率や罹病個体率など悉無形質では逆正弦変換を, 平均と標

準誤差が比例する場合には対数変換を行うなど形質の測定値の性質に注意を払う必要がある。

おわりに

これまで述べてきた分子マーカーは育種の強力な武器となるが、育種においては本質的には質的あるいは量的形質の精度の高い評価が重要である。分子マーカーの利用が前提であれば、果実形態や色形質など量的形質を可能な限り計量形質として解析する必要性が高くなる。主動遺伝子支配の形質だけでも分子マーカーを利用した選抜がなされることは育種効率を著しく向上させることになる。分子マーカーの利用は決して特別な手法ではなくっており、どれだけ積極的に育種現場で利用するかが問題である。

謝辞 野菜茶業研究所小島昭夫室長、福岡浩之室長、(株)トーホク松浦誠司氏には、本稿に対する貴重なご助言をいただきました。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

- Arus, P. 1983. Genetic purity of commercial seed lots. p415-423 In S. D. Tanksley・T. J. Orton (eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, Elsevier, New York.
- 伴 義之・小曾納雅則・木村鉄也. 2002. DNA多型検出技術のハクサイ純度検査への応用. *農業および園芸*. 77: 1011-1017.
- Charcosset, A., M. Lefort-Buson and A. Gallais. 1991. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation. *Theor. Appl. Genet.* 81: 571-575.
- Chiba, N., K. Suwabe, T. Nunome, and M. Hirai. 2003. Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. *Breed. Sci.* 53: 21-27.
- Crockette, P. A., Bhalla, P. L., Lee, C. K. and Singh, M. B. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome*. 43: 317-325.
- Crockette, P. A., Bhalla, P. L., Lee, C. K. and Singh, M. B. 2002. Genetic purity analysis of hybrid broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) seeds using RAPD PCR. *Aust. J. Agric. Res.* 53: 51-54.
- Dreher, K., M. Khairallah, J. M. Ribaut and M. Morris. 2003. Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. *Mol. Breeding* 11: 221-234.
- Edwards, M. D. and N. J. Page. 1994. Evaluation of marker-assisted selection through computer simulation. *Theor. Appl. Genet.* 88: 376-382.
- Flachowsky, H., E. Schumann, W. E. Weber and A. Peil. 2001. Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp. *Plant Breeding*. 120: 305-309.
- Ford-Lloyd, B.V. 2001. Genotyping in plant genetic resources. p59-81. In Henry R. J. (ed.) *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting*, CABI.
- 福岡浩之. 2004. 野菜のDNA品種識別法確立に向けての技術的問題点とその方策. *農業および園芸* 79(1): 175-179.
- 原田久也ら. 2004. 植物新品種保護制度の現状と課題. *農業および園芸*. 79: 103-228.
- Hashizume, T., T. Sato and M. Hirai. 1993. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) *Jpn. J. Breed.* 43: 367-375.
- Hayashi, T and Y. Ukai. 1999. Method of QTL mapping in an F2 population using phenotypic means of F3. *Breed. Sci.* 49: 105-114.
- 平井正志. 2001. 園芸作物とくに野菜育種における成果と展望. *育種学最近の進歩*. 43: 9-12.
- Hormaza, J. I., L. Dollo and V. S. Polito. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.* 89: 9-13.
- Huff, D. R. 2001. Genetic Characterization of heterogeneous plant populations in Forage, Turf and Native Grasses. p149-160. In G. Spangenberg (ed.) *Molecular Breeding of Forage Crops*. Kluwer Academic Pub. Netherland.
- Isabel, N., Beaulieu J. and Bousquet J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 6369-6373.
- Iwata, H. and Y. Ukai. 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93: 384-385.
- Kaminski, P., M. Staniaszek and E. U. Kozik. 2003. Evaluation of genetic diversity and uniformity of head cabbage DH lines by the use of RAPD markers. *J. Appl. Genet.* 44: 157-163.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Ann. Bot.* 78: 143-149.
- Karp, A. O. 1997. Molecular technologies for biodiversity evaluation: opportunities and challenges. *Nature Biotech.* 15: 625-628.
- Kikuchi, M., H. Ajisaka, Y. Kuginuki and M. Hirai. 1999.

- Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of *Brassica rapa* into sequence-tagged sites (STSs). *Breed. Sci.* 49: 83-88.
- Kumar, L. S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.
- 松浦誠司・新倉 聡・藤田幸雄. 1994. 分子マーカーを用いた主要形質の一次選抜-キュウリとダイコンでの経験から- 育種学最近の進歩. 35: 41-44.
- 松浦誠司. 1995. キュウリにおけるDNA多型とその育種的利用に関する研究. 九州大学学位論文.
- Meng, X., Ma, H., Zhang, W. and Wang, D. 1998. A fast procedure for genetic purity determination of head Chinese cabbage hybrid seed based on RAPD markers *Seed Sci. & Technol.* 26: 829-833.
- Michelmore, R. W., I. Paran and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9828-9832.
- Murayama, S., H. Yamagishi and T. Terach. 1999. Identification of RAPD and SCAR markers linked to a restorer gene for Ogura cytoplasmic male sterility in radish by bulked segregant analysis. *Breed. Sci.* 49: 115-121.
- 中村俊一郎. 1985. p233-237. 農林種子学総論, 養賢堂. 東京.
- 野澤 真. 2004. 植物品種保護制度の概要. 農業および園芸. 79: 105-110.
- Nunome, T., K. Ishiguro, T. Yoshida and M. Hirai. 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers *Breed. Sci.* 51: 19-26.
- Nunome, T., K. Suwabe, H. Iketani, and M. Hirai. 2003. Identification and characterization of microsatellites in egg plant. *Plant Breed.* 122: 256-262.
- 小原隆由・若生忠幸・塚崎 光・布目 司・小島昭夫. 2003a. ネギの AFLP マーカー連鎖地図の作成. 育種学研究. 5(別1): 74.
- 小原隆由・塚崎 光・若生忠幸・Song, Y. S.・山下謙一郎・小島昭夫. 2003b. 秋まきネギの初期成育に関する QTL 解析. 育種学研究. 5(別2): 203.
- Schneider, S., D. Roessli and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: <http://lgb.unige.ch/arlequin/software/>
- Soller, M. and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* 67: 25-33.
- Smith, J. S. C. and J. C. Register III. 1998. Genetic purity and testing technology for seed quality: a company perspective. *Seed Sci. Res.* 8: 285-293.
- Stewart, N. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (american cherry). *J. Evol. Biol.* 9: 153-171.
- Staub, J. E., F. C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience.* 31: 729-741.
- Staub, J. E. 1999. Intellectual property rights, genetic markers, and hybrid seed production. *J. New seeds.* 1: 39-64.
- Suwabe, K., H. Iketani, T. Nunome, T. Kaga and M. Hirai. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L., *Theor. Appl. Genet.* 104: 1092-1098.
- 諏訪部圭太・塚崎 光・池谷裕幸・畠山勝徳・藤村みゆき・近藤正敏・布目 司・福岡浩之・平井正志・松元 哲. 2003. *Brassica rapa* における連鎖地図の作成と根こぶ病抵抗性に関する QTL 解析. 育種学研究. 5(別2): 80.
- Tanksley S. D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- 塚崎 光・福岡浩之・Song, Y. S.・山下謙一郎・小島昭夫. 2003. 他殖性植物における品種識別ならびに F₁ 純度検定に適した品種育成法の提案. 育種学研究. 5(別2): 196.
- 津村義彦. 2001. 遺伝的多様性ガイド. 森の分子生態学. 種生物学会編. pp319. 文一総合出版. 東京.
- 鶴飼保雄. 1999a. 量的形質と QTL 解析. 日作記. 68: 179-186.
- 鶴飼保雄. 1999b. QTL 解析の理論. 育種学研究. 1: 25-31.
- 鶴飼保雄. 2001. ゲノムレベルの遺伝解析-MAP と QTL-. pp368. 東大出版会. 東京.
- 鶴飼保雄. 2002. 量的形質の遺伝解析. pp354. 医学出版会. 東京.
- 鶴飼保雄. 2004. 植物品種における品種同定理論. 農業および園芸. 79: 194-198.
- Wrigley, C. W. 1995. Identification of Food-Grain Varieties. pp283. American Association of Cereal Chemists, Inc.
- 若生忠幸・小原隆由・Song, Y. S.・小島昭夫. 2002. ネギにおける SSR マーカーの開発. 育種学研究. 4(別1): 83.
- 矢野 博. 2004. DNA 多型分析による品種識別の可能性-植物における DNA 多型検出技術とその応用. 農業および園芸. 79: 131-136.
- Young, N. D. 1999. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding *Molecular Breeding.* 5: 505-510.
- Yu, K. and K. P. Pauls. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86: 788-794.