

ナスの分子遺伝マーカー開発と有用形質との連鎖解析に関する研究[†]

布 目 司

(平成 16 年 12 月 7 日受理)

Studies on the Development of DNA Markers and the Genetics of Several Traits in Eggplant

Tsukasa NUNOME

Synopsis

RAPD and AFLP markers in eggplant were developed and analyzed for polymorphisms between two eggplant lines, 'EPL1' and 'WCGR112-8'. A total of 1,224 random primers were screened by RAPD analysis for polymorphisms. Of them, 104 primers revealed polymorphisms, with 115 polymorphic fragments in total. In AFLP analysis, 43 of the 64 AFLP primer combinations used detected 104 polymorphic fragments. The frequencies of detected polymorphisms in RAPD and AFLP analyses were lower than those reported in other plant species.

To develop microsatellite markers, a genomic library of eggplant was screened with dinucleotide and trinucleotide repeat probes. A total of 81 microsatellite markers were developed and analyzed for polymorphisms among 11 eggplant accessions and 11 accessions of 10 related species. Frequencies of microsatellites in eggplant were lower than those reported in other plant species.

Using the RAPD, AFLP and microsatellite markers developed in the present study, a genetic linkage map was constructed on a F₂ population derived from a cross between 'EPL1' and 'WCGR112-8'. The linkage map consisted of 19 linkage groups (LGs) with 189 markers, spanning 807.3 cM in total. The observed number of LGs did not correspond to the expected number of 12 LGs for a comprehensive linkage map of eggplant.

A major QTL that governs fruit shape was detected, and some QTLs that govern color development in fruits, stem, and calyx were also detected. These DNA markers would be useful for marker-assisted selection in eggplant breeding.

Key Words: eggplant, *Solanum melongena*, molecular marker, RAPD, AFLP, microsatellite, linkage map

		3	マイクロサテライトの単離および多型解析	46
		a	2塩基繰り返し配列の単離および多型解析	46
		b	3塩基繰り返し配列の単離および多型解析	52
	目 次	III	連鎖地図の作成と連鎖解析	56
I	緒 言	1	連鎖地図の作成	56
II	分子遺伝マーカーの開発	2	量的形質の連鎖解析	59
1	RAPD 解析	IV	総合考察	62
2	AFLP 解析			

〒514-2392 三重県安芸郡安濃町大字草生 360
機能解析部

[†] 本論文は千葉大学学位審査論文(平成 15 年 9 月)を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は, Plant Breeding, **122**, 256-264(2003); Breed. Sci., **53**, 77-83 (2003); Breed. Sci., **51**, 19-26 (2001) において発表した。

V 摘要	64
引用文献	64
Summary	68

I 緒 言

ナス (*Solanum melongena* L.) はナス科に属し、eggplant, aubergine, あるいは brinjal と呼ばれる野菜であり、インドまたはアフリカが起源とされている (KALLOO, 1988; KALLOO, 1993). ナス科植物は約 2,300 種で構成されており、その半数近くが *Solanum* 属に属する。 *Solanum* 属の多くの種はアメリカ大陸を起源とするが、旧世界を起源とするものも 20% 弱ある。ナスの果実は、若干苦みのあるものやわずかに甘みのあるもの、刺激のあるものがあり、ほとんどのものは調理して食べられるが、生や乾燥品としても食べられている。アフリカなどでは、葉も調理して食べられている。また、日本では漬物としての需要も大きい。ナスにはアルカロイドを含む系統があり、医薬的な目的にも用いられる。

生産量統計によると、ナスはナス科作物のうちジャガイモ・トマトに次いで生産量が多く、世界中で約 2,300 万トンが生産され、特に中国 (約 1,220 万トン) とインド (約 640 万トン) の生産量は世界生産の 85% 以上を占めている (FAO 2000). 2000 年の日本のナス生産量は約 48 万トンで、世界第 5 位である。ヨーロッパでは 27 万トン、アメリカでは 8 万トンが生産されているが、それぞれ世界生産量の 1.1% および 0.34% を占めるに過ぎない。ナスの栽培面積は全世界で約 140 万ヘクタールであり、ジャガイモの約 14 分の 1 である。日本のナス栽培面積は 1.3 万ヘクタールであり、トマトの作付面積とほぼ同じである。ナス果実の栄養価やカロリーは他の野菜に比べて特に多いほうではなく、ビタミン類についてもトマトやキュウリとほぼ変わらない。ナスの機能性成分についてはまだ十分には研究されていないものの、抗酸化特性 (CAO ら, 1996) やコレステロール値抑制 (KAYAMORI ら, 1994) など多くの薬効があると報告されている (KHAN, 1979).

ナスの品種改良は、アジア (主に日本・中国・インド) とヨーロッパ (特にフランス・スペイン) の国立研究機関や種苗会社で精力的に行われている。育種目標は、病害虫抵抗性・収量・品質・栽培適応性と多岐にわたっている。育種を行う国が異なると選抜の基準も大きく異なる。果実形質 (果形・大きさ・果色・硬さ) や味 (苦み・甘み) の好みが異なり、気候や問題となる病気なども異

なるためである。ナス近縁野生種を育種素材とした育種は、限られた組み合わせでしか行われていない。多くのナス近縁種が存在するが、*Solanum* 属の種間交雑親和性が限定されるなどの理由からである。ナス種間交雑では、交雑後代が獲得されてもその後代の稔性が低下するなどの問題が生じることが多い。

ナスはトマト・トウガラシと同様に染色体数 $2n=24$ の自殖性 2 倍体であり、核ゲノムサイズはトマト (1,000Mb) より若干大きく 1,100Mb である (ARUMUGANATHAN ら, 1991). 主要なナス科植物であるトマト・ジャガイモ・トウガラシにおいては、分子遺伝的解析が精力的に行われ、DNA マーカーの開発および連鎖地図の作成が行われている (LIVINGSTONE ら, 1999; PRINCE ら, 1993; TANKSLEY ら, 1992). しかし、ナスにおいてはこれらのナス科作物と比較して分子遺伝学的情報に乏しく、DNA マーカーの開発および連鎖地図の作成の報告はわずかである。これまでに、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析, AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析, アイソザイム解析, 葉緑体 DNA の RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析, 種子貯蔵蛋白質解析によるナスおよびナス近縁種の系統解析が行われている (COLLONNIER ら, 2001; ISSHIKI ら, 1998; SAKATA ら, 1997). しかし、ナス品種系統間においては II で述べるように極めて DNA 多型性が乏しいために、DNA マーカーを用いた遺伝的解析はほとんど報告されていない。最近、トマトの RFLP プローブを用いた連鎖解析により、ナス連鎖地図が作成された (DOGANLAR ら, 2002a). 作成された連鎖地図は、12 連鎖群・全長 1,480cM・233 マーカーで構成され、トマトの連鎖地図との比較解析が可能であり、ナス科植物のゲノムシンテニーが示されている。しかし、これはナス近縁種 *S. linnaeanum* との交配集団を用いて行われたものである。近縁野生種との交配集団を用いた解析は、多型頻度が高く高密度連鎖地図の作成などの目的には適している。しかし、農業形質を解析するためには、品種系統間の交配集団を用いて研究を進めることが必要である。育種現場においては品種間の交配や栽培品種への戻し交雑などが行われるので、品種系統間で多型検出可能な DNA マーカーが望まれている。連鎖地図の作成は、質的および量的形質の同定、座乗位置の特定、マーカー支援選抜 (marker-assisted selection, MAS), 染色体歩行による遺伝子の単離に必須である。さらに、ソマクローナル変異、体細胞雑種形成、半数体作成、形質転換などのナス

の改良のためのバイオテクノロジー技術と連鎖地図情報を組み合わせることにより、ナスの育種および遺伝研究の促進が期待される (COLLONNIERら, 2001)。

本論文では、RAPD 解析・AFLP 解析・マイクロサテライトの単離および多型解析を行い、ナスの DNA マーカーの開発を行った。また、開発された DNA マーカーのナス品種系統間およびナス近縁種間での多型性を調査し、その有用性を調査した。さらに、品種間交配に由来する分離集団の多型解析を行い、ナス連鎖地図を作成するとともに重要形質と DNA マーカーの連鎖解析を行った。

本論文の取りまとめに際し、懇切なる御指導を賜った千葉大学園芸学部生物生産科学科園芸植物工学講座教授原田久也博士に、心から感謝の意を表します。助言を頂いた千葉大学園芸学部三位正洋教授、長田嘉穂教授、中村郁郎助教授に心から感謝いたします。

本研究開始時より御指導頂いた独立行政法人農業技術研究機構野菜茶業研究所育種工学研究室長平井正志博士 (現京都府立大学農学部)、本論文の取りまとめに際し終始懇切なる御指導を賜った同研究室長福岡浩之博士、同研究室主任研究官大山暁男博士 (現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所企画調整部)、研究遂行に当たり有益な御助言を頂いた同研究室主任研究官池谷祐幸博士 (現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所) に心から感謝いたします。本研究を始めるに当たり御助言頂いた野菜・茶業試験場ナス科育種研究室長門馬信二博士 (現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構九州沖縄農業研究センター)、解析に用いたナス種子およびサンプルを提供して下さった独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所果菜研究部ナス科育種研究室長吉田建実氏 (現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構総合企画調整部)、同研究室主任研究官齊藤猛雄博士 (現同研究室長)、ナス栽培管理の御助言を頂いた同研究室主任研究官松永啓氏 (現長野県農業試験場) に心から御礼申し上げます。

研究の遂行に当たり御協力頂いた独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構野菜茶業研究所業務科職員各位、同研究所育種工学研究室重点支援研究員諏訪部圭太博士、同研究室非常勤職員前田花子氏、田中記三子氏に厚く御礼申し上げます。

II 分子遺伝マーカーの開発

従来は表現形質の分離データをもとに遺伝距離を計算し、遺伝地図が構築されてきた。これに比べて、DNA 多型を検出しその分離データをもとに構築される分子連鎖地図には数多くの利点がある。DNA マーカーを利用することにより検出できる多型の数は著しく多くなり、従来用いられてきた表現形質の遺伝分析では区別できなかったヘテロ個体とホモ個体の区別ができることが多く、組換え価の推定精度が高くなる。また、DNA マーカーは栽培や検定条件などの環境要因による影響を受けず、遺伝子型判定の精度が向上するとともに形質の発現を待たずに早期に遺伝子型を判定することが可能となる。

多くの種類の DNA マーカーが開発されており、それぞれに長所短所がある。RFLP, CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) などのように分離型が共優性を示すマーカーと RAPD, AFLP などの優性を示すマーカーがあり、一般的に共優性を示すマーカーは開発に時間と労力を必要とする。優性を示すマーカーは、開発は比較的容易であるが、組換え価推定の情報量が少ない。また、遺伝子型の判定に必要なサンプル DNA 量はマーカーの種類により異なり、PCR 増幅の過程を含むマーカーは少量の DNA で解析が可能である。多くの植物個体の遺伝子型を多数のマーカーで判定するためには、遺伝子型判定の自動化が可能かということも開発するマーカーを選択する際に考慮すべき大きな要素となる。

本編では、ナスの DNA マーカー開発を試みた。分子遺伝情報の乏しいナスの連鎖地図を作成するために、RAPD 解析・AFLP 解析・マイクロサテライトマーカーの開発を行った。

1 RAPD 解析

RAPD (random amplified polymorphic DNA) 解析は、任意のオリゴヌクレオチドプライマーによる PCR を用いた多型検出法である (WILLIAMSら, 1990)。RAPD 法における多型のほとんどは、プライマー結合部位の変異 (点突然変異) によって生じ、特定の PCR 増幅断片の有無により多型を判定し、優性マーカーとなる。まれに対象 DNA の構造変異 (挿入、欠失、逆位など) による増幅産物の大きさや増幅効率の変化により多型が検出され、この場合は共優性となる。RAPD 法は、操作が簡便で迅速に多型を検出でき、経費も少なく済み、少量の粗精製 DNA を用いて解析が可能である。ま

表-1 両親系統の形質

形質	両親系統の形質		形質スコア
	なす中間母本農1号	WCGR112-8	
花色	紫	白	1(白) - 3(紫)
果実色	濃紫	緑	1(白) - 6(濃紫)
茎色 ¹⁾	とても高い	なし	1(なし) - 7(とても高い)
へた色 ¹⁾	とても高い	なし	1(なし) - 7(とても高い)
果形	中長形	球形	1(球形) - 4(中長形)
ナス青枯れ病抵抗性	感受性	抵抗性	

¹⁾ 着色程度を表す

た、ランダムプライマーを用いるので、解析対象生物の塩基配列情報を必要としない。RAPD解析による多型頻度は、RFLP解析等よりも高い。このようにRAPD解析には多くの利点があげられる。RAPD解析はその簡便性から遺伝解析情報の少ない植物種で多く用いられており、ナスの遺伝解析に適していると考えられる。

本章ではRAPD解析条件の検討を行い、ナス品種系統間の多型を検索し、連鎖地図作成のためのデータを収集した。

1) 材料および方法

(1) 植物材料

‘なす中間母本農1号’(ES123)と‘WCGR112-8’(LS3835)と、これらの系統の交配F₂集団168個体の幼葉を材料として供試した。‘なす中間母本農1号’は野菜・茶業試験場で育成された日本型ナスであり、ナス半枯れ病抵抗性を有し、果実は中長形で濃紫色である。一方、‘WCGR112-8’はインドより遺伝資源として導入され、ナス青枯れ病抵抗性を有し、果実は球形で緑色である(表-1, 図-1)。これらの植物体の栽培は野菜茶業研究所圃場において慣行に従って行った。

(2) DNA抽出

一部改変したCTAB法(MURRAYら, 1980)によりゲノムDNAを抽出した。野菜茶業研究所圃場で栽培した植物体よりナス幼葉を採取し、DNA抽出に供試した。葉柄および主脈を取り除いたナス幼葉3g(新鮮重)を液体窒素中で磨砕し、9ml(ナス幼葉の3倍量)の抽出緩衝液(0.1M Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1%ポリビニルピロリドン, 0.1%2-メルカプトエタノール)を加え懸濁した。55°Cで20分抽出後、室温に戻し、等量のクロロホルムを加え振とうした。遠心分離後、上層に等量の2-プロパノールを添加し核酸を沈殿させた。核酸を少量のTE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解し、RNase Aを添加しRNAを分解した。2倍量のエタノールを添加し、DNAを再

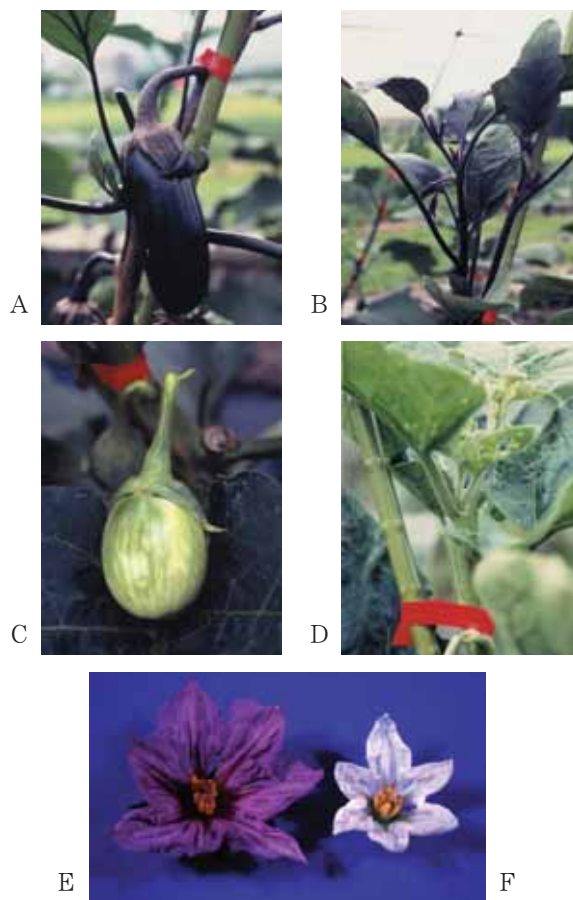


図-1 供試ナス系統

A, B, E: なす中間母本農1号
C, D, F: WCGR112-8

度沈殿させた。遠心分離し沈殿させたDNAを少量のTEまたは脱イオン水に溶解し解析に用いた。

(3) RAPD解析

10merおよび12merのランダムプライマーをPCR増幅に供試した。PCR反応液(10μl)は、10ngゲノムDNA, 1x反応緩衝液(10mM Tris-HCl pH8.9, 80mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.1%コール酸ナトリウム, 0.5mg/ml BSA: 東洋紡),

0.4 μM プライマー, 200 μM dNTPs, 0.5U *Tth* DNA polymerase (東洋紡) を加え, 調製した. PCR は 94°C 30 秒を 1 サイクル, 次いで 94°C 30 秒・40°C 1.5 分・72°C 2.5 分を 1 サイクルとして計 45 サイクル行い, 最終伸長を 72°C 7 分行った. 反応後, 増幅産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動により分離し, エチジウムブロマイド染色後, UV 照射下で写真撮影を行い, 多型を検出した.

2) 結 果

両親間での多型を 1,224 種類の 10mer または 12mer のプライマーを用いて検索した. 10mer のプライマー 766 種のうち 79 種, 12mer のプライマー 458 種のうち 25 種でそれぞれ多型が検出され, 検索した全プライマーの 8.5% にあたる合計 104 種類のプライマーで計 115 の多型断片が検出された (表-2, 図-2). プライマー長による増幅バンド数および多型頻度に差異は見られなかった. 多型を示した増幅断片は, プライマー 1 種類当たり最高で 2 本, 平均 1.1 本だった.

RAPD 解析の欠点として再現性が低いことが挙げられており, ナスの解析でも再現性の低い PCR 増幅断片が見られた. 再現性の高い DNA マーカーを選抜するた

めに, 交配両親間での多型性の確認を繰り返すとともに, 精製度の異なる DNA を用いて実験を繰り返し, 再現性の確認を行い, 上記の 115 の多型断片を再現性の高い RAPD マーカーとして見出した.

‘なす中間母本農 1 号’ および ‘WCGR112-8’ の交配 F₂ 集団 168 個体を用いて RAPD マーカー 115 種すべての分離を調査した. すべての RAPD マーカーは優性に分離し, 107 マーカーが期待される分離比 (3:1) に適合した. 8 マーカーは分離に歪みが見られた. マーカーの分離の歪みは, 稔性低下遺伝子や致死遺伝子との連鎖に起因する可能性が考えられるほか, RAPD 解析の場合は複数の増幅断片の断片長が類似しているために生じる可能性が高い.

3) 考 察

RAPD 解析は, PCR を用いて簡易に DNA マーカーを開発でき, 必要なサンプル量が少なくハイスループトであるなど育種選抜に DNA マーカーを用いるための利点が多い (STAUBら, 1996). そのため, ナスの DNA マーカー開発のために RAPD 解析は有効であると推測された. しかし, ‘なす中間母本農 1 号’ と ‘WCGR112-8’ の間では, 検索した 10mer および 12mer の全プライマー 1,224 種のうちの 8.5% にあたる合計 104 種類のプライマーで検出された多型断片は 115 であり, 多型頻度は低かった. 他のナス品種系統間でも多型性を調査したが, RAPD 解析では多型頻度はほぼ同程度であった. 本論文と同様に, *S. melongena* 52 系統を用いた RAPD 解析において, 増幅産物の 94.7% で多型が検出されず, 多型頻度が低いことが報告されている

表-2 RAPD 解析における多型検出頻度

プライマー長	プライマー数		多型検出割合 (%)
	供試数	多型検出数	
10mer	766	79	10.3
12mer	458	25	5.5
合計	1224	104	8.5

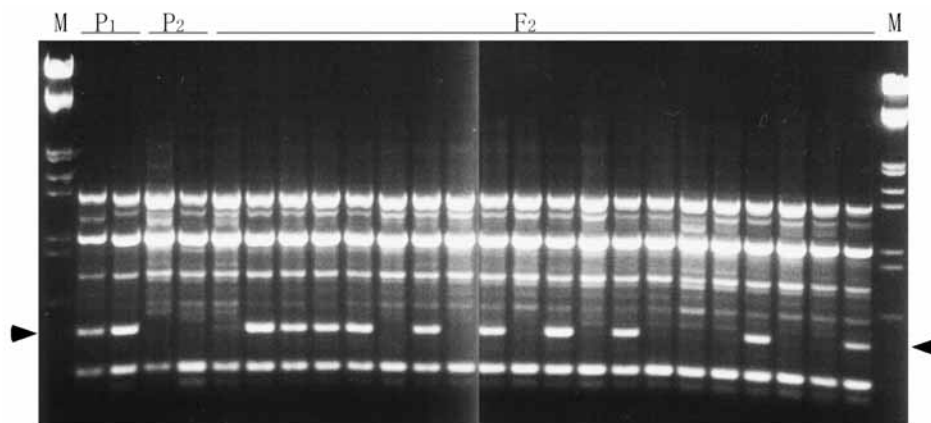


図-2 RAPD マーカー OPAB11 電気泳動図

1.5%アガロースゲル電気泳動
 矢印は多型の見られた断片を示している.
 P1: なす中間母本農 1 号
 P2: WCGR112-8

(KARIHALOOら, 1995). ナスと同様にいくつかの植物で RAPD 解析において多型頻度が低いことが報告されている. トマトでは, 313 種のプライマーを用いて RAPD 解析を行ったところ, 16 から 63% のプライマーにおいて品種間で多型が検出されたことが報告されている (FOOLADら, 1993). ピーナツでも同様に多型頻度が低いことが報告されている (HALWARDら, 1991). しかし, ナス品種間の多型頻度は, 多型頻度が低いと報告されている植物よりもさらに低いものであった. これはナス系統が遺伝的に近縁であり, 他の植物の品種系統に比べて遺伝的バックグラウンドが狭いことを反映していると推定される.

RAPD 解析は, 比較的低いアニーリング温度で PCR を行うことにより, 多くの DNA 断片を増幅しその多型性を調査する方法である. そのため, 実験の再現性が低いことが指摘されている. ナスの RAPD 解析においても, いくつかのマーカ―では再現性が低かった. 実験者間や用いた DNA の精製度・耐熱性 DNA 合成酵素の種類やロットにより再現性が変化するマーカ―も見られた. 実験精度を確保するために, 再現性を確認できた 113 種のマーカ―を用いて F₂ 集団の分離を調査した. これらの RAPD マーカ―の欠点を克服するためには, 多型の検出された断片を SCAR (sequence characterized amplified region) マーカ― (PARANら, 1993), CAPS マーカ― (KONIECZYNら, 1993), RFLP マーカ―へ変換する必要がある. RAPD マーカ―は優性を示し, 他の集団へ直接用いることができないなどの欠点もあるが, CAPS 等の DNA マーカ―へ変換することにより共優性で再現性の高い結果が得られると考えられる.

RAPD マーカ―は, 容易に, 迅速かつ安価にマーカ―を開発できるので, 質的な有用形質と連鎖するマーカ―を開発する目的に適している. また, RAPD マーカ―はほとんどのマーカ―が優性分離し, 異なる解析系統や集団には適用は難しいが, ランドマークとなるマイクロサテライトマーカ―や RFLP マーカ―とともに連鎖地図の高密度化を行う目的には適していると考えられる.

2 AFLP 解析

AFLP (amplified fragment length polymorphism) 解析は, 制限酵素認識部位の変異を PCR を用いて検出する解析法である (Vosら, 1995). AFLP は RFLP と同様に, 制限酵素切断部位の違いによって生じ, RAPD と同様にプライマー結合部位の塩基配列の違いによって生じる. 解析に必要な DNA サンプル量は少量であり,

1 回の解析で数多くの DNA 断片 (数十~百数十) を解析できる (JONESら, 1997; POWELLら, 1996). 対象とする生物の塩基配列情報が不要である点は RAPD 解析と同様であるが, 安定性と再現性が比較的高い. このため, DNA マーカ―の作出に要する時間が大幅に短縮され, 連鎖地図作成やフィンガープリンティングによる品種識別だけでなく, 遺伝子単離などを目的とした特定の染色体領域の高密度マーカ―作成においても有効な技術である (THOMASら, 1995). 分子遺伝情報が少なく多型頻度の低いナスなどの植物においては, AFLP 解析は DNA マーカ―開発法として有効な手法であると考えられる.

本章では, AFLP 解析を用いてナス品種系統間の多型を検出し, 連鎖地図作成のためのデータを収集した.

1) 材料および方法

(1) 植物材料および DNA 抽出

II-1 RAPD 解析と同様に 'なす中間母本農 1 号', 'WCGR112-8' およびこの両系統を両親とする F₂ 集団 84 系統を供試した. DNA 抽出についても II-1 RAPD 解析と同様に改変 CTAB 法により行った.

(2) AFLP 解析

AFLP 解析は Vosら (1995) の方法に従って行い, 図-3 に示したアダプターおよびプライマーを用いた. 制限酵素反応液 (15ul) は, 150ng ゲノム DNA, 1.5U *Eco* RI, 1.5U *Mse* I, 1x 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM 酢酸マグネシウム, 50mM 酢酸カリウム) を加えて調製し, 37°C 3 時間反応後 70°C 15 分処理し酵素を失活させた. ライゲーション反応液 (15ul) として 40nM *Eco* RI アダプター, 400nM *Mse* I アダプター,

アダプター

*Eco*RI アダプター

5'- CTCGTAGACTGCGTACC -3'
3'- CATCTGACGCATGGTTAA -5'

*Mse*I アダプター

5'- GACGATGAGTCCTGAG -3'
3'- TACTCAGGACTCAT -5'

プレセレクトティブプライマー

*Eco*RI 5'- GACTGCGTACCAATTCA -3'
*Mse*I 5'- GATGAGTCCTGAGTAAC -3'

セレクトティブプライマー

*Eco*RI 5'- GACTGCGTACCAATTCNNN -3'
*Mse*I 5'- GATGAGTCCTGAGTAANNN -3'

図-3 AFLP 用アダプターおよびプライマー

0.4mM ATP, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM 酢酸マグネシウム, 50mM 酢酸カリウム, 0.6U T4 DNA ライゲース (Life Technology) を加えて調製し, 制限酵素反応液へ添加後 20°C 2 時間反応させた. ライゲーション反応液を TE で 10 倍に希釈し, プレアンプリフィケーションに用いた. プレアンプリフィケーション反応液 (20ul) は, 希釈したライゲーション反応液 2 μl, 1x 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), 0.25 μM *Eco* RI プレセレクトティブプライマー, 1.5 μM *Mse* I プレセレクトティブプライマー, 200 μM dNTPs, 0.4U TakaraTaq (タカラバイオ) を加えて調製した. PCR は 94°C 20 秒・56°C 30 秒・72°C 2 分を 1 サイクルとして 20 サイクル行い, その後 60°C 30 分反応を行った. プレアンプリフィケーションにはアダプター配列に 1 塩基付加したプライマーを用いた. プレアンプリフィケーション産物を TE で 50 倍に希釈し, セレクトティブアンプリフィケーションに用いた. セレクトティブアンプリフィケーション反応液 (10 μl) は, 希釈したプレアンプリフィケーション反応液 2.5 μl, 1x 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), 0.05 μM *Eco* RI セレクトティブプライマー, 0.25 μM *Mse* I セレクトティブプライマー, 200 μM dNTPs, 0.25U TakaraTaq (タカラバイオ) を加えて調製した. PCR は 94°C 1 分・65°C 1 分・72°C 1.5 分を 1 サイクルとし, 1 サイクルごとにアニーリング温度を 1°C ずつ下げて 10 サイクル行い, 次いで 94°C 30 秒・56°C 30 秒・72°C 1 分を 1 サイクルとして 23 サイクル行った. セレクトティブアンプリフィケーションには, *Eco* RI および *Mse* I アダプター配列に 3 塩基付加したセレクトティブプライマーを用い, *Eco* RI セレクトティブプライマーには 5' 末端を蛍光ラベルしたものをを用いた. PCR 増幅産物にローディングバッファを等量添加し, 熱変性後急冷し電気泳動用サンプルとした. 電気泳動および増幅断片の検出には ABI373 および ABI PRISM 377XL DNA シークエンサーを用いた.

2) 結 果

64 のプライマー組み合わせについて多型を検索し, そのうち 43 のプライマー組み合わせにおいて計 104 の多型断片を検出した (表-3, 図-4). 残りの 21 のプライマー組み合わせでは, 多型は検出されなかった. 多型の検出された断片の長さは 63~704bp であり, 平均は 275bp であった. 1 組のプライマー組み合わせに対し 1~5 本, 平均 1.6 本の多型断片が検出された. 多型の検出された断片数は, *Eco* RI プライマーの違いにより

1~28 本と大きな差が見られたが, *Mse* I プライマーの違いでは 8~18 本とそれほど大きな差は見られなかった (表-3). F₂ 集団を用いて分離を調査したところ, 96 のマーカーにおいて期待される分離比 (3:1) に適合した.

表-3 AFLP プライマー組み合わせにおける多型断片数

	E-ACA	E-AAC	E-ACC	E-AGC	E-AAG	E-AGG	E-ACG	E-ACT
M-CAA	4	2	0	1	0	3	0	2
M-CAC	3	0	0	0	1	1	1	2
M-CAG	5	0	2	1	1	1	0	2
M-CAT	4	4	0	0	0	2	0	2
M-CTA	4	4	5	0	0	4	0	1
M-CTG	2	4	3	2	1	1	0	2
M-CTG	1	0	4	1	4	2	0	3
M-CTT	5	3	0	2	0	1	0	1

E-XXX : *Eco* RI アダプター由来のセレクトティブプライマー
M-XXX : *Mse* I アダプター由来のセレクトティブプライマー

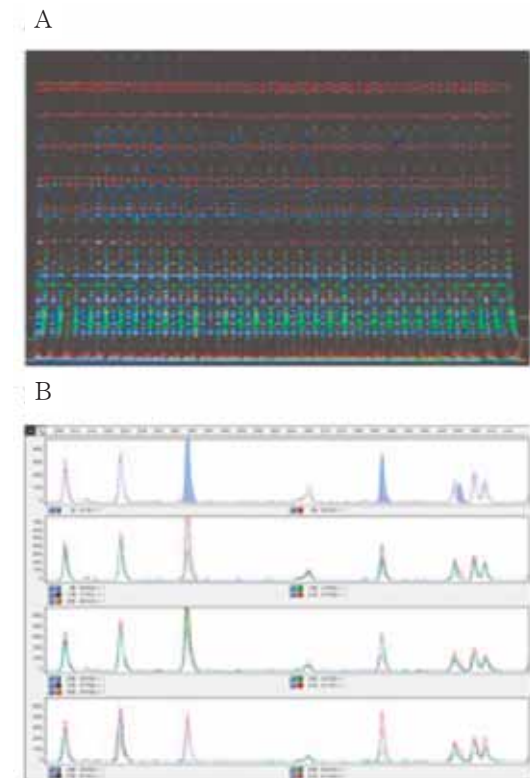


図-4 AFLP 電気泳動図

A : DNA シークエンサーでの電気泳動図
B : エレクトロフェログラム
1 番上のカラムは解析に用いた両親間での多型を表している.
青く塗られているピークは, 両親間で多型の見られた断片を示している.
2 番目以降のカラムは, F₂ 個体での多型性を示している.

AFLP 解析は、RAPD 解析に比べて再現性は高かったが、マーカーによっては再現性の低い多型も散見された。実験者間やサンプルの精製度等の違いによる再現性の不安定さは見られなかった。再現性の低かった AFLP マーカーは、1回の解析で増幅する断片数が多いプライマー組み合わせである傾向が見られた。RAPD 解析と同様に AFLP 解析は、複数の増幅断片の断片長が類似しており、重なって検出されるために分離に歪みが見られるマーカーが検出されると推定された。また、多数の断片を一度に増幅するために、PCR 増幅の不安定な断片は遺伝子型の判定が難しく、分離が歪んでいるように判断されたとも考えられる。

3) 考 察

AFLP 解析は、1回の解析で数多くの DNA 断片（数十～百数十）を解析できるため、高密度連鎖地図の作成や多型頻度の低い植物での連鎖地図作成に有効な手法であると考えられる。シロイヌナズナの 'Landsberg erecta' と 'Columbia' のエコタイプ間では、AFLP 解析により得られた断片の 30.4% が多型を示した (ALONSO-BLANCOら, 1998)。イネでは、10のプライマー組み合わせにおいて約 300 のマーカーが得られ (ZHUら, 1999)、ジャガイモでは、39のプライマー組み合わせにおいて 573 マーカーが得られた (BRADSHAWら, 1998) と報告されている。しかしナスでは、64 プライマー組み合わせにおいて 104 マーカーのみが得られ、他の植物に比べると多型頻度が低かった。'なす中間母本農 1号' と 'Talina' についても解析を行ったところ、64 のプライマー組み合わせにおいて 159 マーカーのみが得られた。ナスにおいては品種系統間の多型頻度が低く、得られた多型断片数が少なかった。RAPD 解析と同様に AFLP 解析においても、ナス品種系統は遺伝的に近縁であることが示された。

AFLP 解析では、一度に多数の断片の多型性を検索することが可能であり、迅速にマーカーを開発することができる。しかし、AFLP マーカーは主に優性分離する。また、他の解析集団へ直接利用できないこともあるので、STS マーカーまたは SCAR マーカー化することが望ましい。マーカーを変換する事により、遺伝子型判定の正確性が向上し、ある程度の優性マーカーも共優性マーカーになると考えられる。しかし、AFLP 解析では制限酵素認識部位の変異を検出しているため、多型の検出された断片をクローニングしその塩基配列を決定しただけでは多型を検出できないことが多く、STS (sequence-tagged site) マーカー化または SCAR マー

カー化することは容易ではないと考えられる。Inverse PCR などにより多型の検出された断片の周辺塩基配列情報を獲得しなければならない。

3 マイクロサテライトの単離および多型解析

マイクロサテライトまたは SSR (simple sequence repeat) は、数塩基を繰り返し単位とする反復配列であり、遺伝解析ツールとして用いられている。マイクロサテライトはゲノム中に多数存在し、比較的偏りなく散在し、それらの繰り返し数が多型に富んでいる。ゲノム中のマイクロサテライトの反復数は種内および種間で高い変異を示すことから、多型頻度の高い DNA マーカーとして利用できる。このようなマイクロサテライトの性質により、フィンガープリンティング、ゲノムマッピング、系統解析、遺伝解析、マーカー支援育種、集団遺伝学のための DNA マーカーとして広く用いられている。またマイクロサテライトマーカーは共優性分離し、遺伝子型の判定が容易で再現性が高いなどの DNA マーカーとしての利点を備えている。このため、多くの植物でマイクロサテライトマーカーの開発が精力的に行われている。本章では、ナスのマイクロサテライトを単離し、その構造的特徴を明らかにするとともに、ナス品種系統間およびナス近縁種間での多型性を調査した。

a 2 塩基繰り返し配列の単離および多型解析

2 塩基繰り返し配列は、他の繰り返し配列に比べ存在頻度が高い (McCouchら, 1997)。ヒトゲノム中には $(GT)_n$ がもっとも多く存在するが、多くの植物ゲノム中には $(AT)_n$ の存在頻度が高い。しかし、 $(AT)_n$ や $(GC)_n$ はパリンδροーム構造であることから、ライブラリーのスクリーニングによる存在頻度の推定やクローンの単離は技術的に他のモチーフより難しい。マイクロサテライトのモチーフごとの存在頻度や繰り返し数は植物種により異なっているため、それぞれに調査する必要がある。また、多数の DNA マーカーを開発するために、これらの情報を明らかにする必要がある。

本項ではナスにおける 2 塩基繰り返し配列 $(GA)_n$ および $(GT)_n$ の存在頻度とその構造的特徴を明らかにするとともに、繰り返し配列近傍の塩基配列情報を用いて DNA マーカーを開発しその多型頻度を調査した。

1) 材料および方法

(1) 植物材料

ナスゲノムライブラリーの作成には 'なす中間母本農 1号' を供試した。また、単離したマイクロサテライトマ

カーの多型頻度の調査には表-4に挙げた11系統のナス品種系統およびナス近縁種11系統を供試した。DNAの抽出には、改変CTAB法(II-1参照)を用いた。

(2) マイクロサテライトの単離

‘なす中間母本農1号’のゲノムDNAを制限酵素Sau 3AIで完全消化し、1%アガロースゲルで分離後、200~800bpの断片をQIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)を用いてアガロースゲルより抽出した。抽出したDNA断片をZAP Expressベクター(Stratagene)へクローニングし、ゲノムDNAライブラリーを作成した。約72,000 pfuのファージをプレートに展開し、ナイロンメンブレン(Roche Diagnostics)に転写後、UVクロスリンクして固定した(SAMBROOKら, 2001)。5'末端をdigoxigenin (DIG)ラベルしたオリゴDNA (GA)₁₅および(GT)₁₅をプローブとして用いて陽性プラークを選抜した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は定法(SAMBROOKら, 2001)に従って行った。ハイブリダイゼーションは55°Cで一晩行い、メンブレンを2×SSC (0.3M塩化ナトリウム, 0.03Mクエン酸ナトリウム)、

0.1% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)で5分間2回室温で洗浄後、0.5×SSC, 0.1%SDSで15分間2回55°Cで洗浄した。プローブの検出はDIG発光検出システム(Roche Diagnostics)に従って行った。メンブレンをX線フィルムに30分間感光し、陽性プラークを同定した。陽性プラークの精製を2回繰り返す。ExAssistヘルパーファージ(Stratagene)によりファージミドに変換した。陽性クローンの塩基配列の決定は、BigDye terminator cycle sequencing kitおよびABI PRISM 377XLシーケンサー(Applied Biosystems)により行った。

(3) マイクロサテライトマーカーの多型解析

マイクロサテライトマーカー開発のために、コンピュータソフトウェアPrimer3(ROZENら, 1998)を用いて、繰り返し配列の近接領域にPCRプライマーを設計した。PCR反応液(10μl)は、10ngゲノムDNA, 1x反応緩衝液(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl₂:タカラバイオ), 0.2μM各プライマー, 200μM dNTPs, 0.1% formamide, 0.25U Takara Taq(タカラバイオ)を加え、調製した。PCRはTakara TP-

表-4 マイクロサテライトマーカーの多型解析に供試したナス系統およびナス近縁種系統

Accession ^{a)}	種名	系統名
LS216	<i>S. melongena</i>	Dingaras Multiple Purple (DMP)
LS969	<i>S. melongena</i>	津田長
LS980	<i>S. melongena</i>	橘田
LS1378	<i>S. melongena</i>	仙台長
LS1821	<i>S. melongena</i>	泉州水ナス
LS3809	<i>S. melongena</i>	中生真黒
LS1934	<i>S. melongena</i>	
ES123	<i>S. melongena</i>	なす中間母本農1号 (EPL 1)
LS3835	<i>S. melongena</i>	WCGR112-8
ES119	<i>S. melongena</i>	Talina 2/1
N	<i>S. melongena</i>	千両2号
LS174	<i>S. incanum</i>	
LS1117	<i>S. aethiopicum</i>	
LS1119	<i>S. anguivi</i>	
LS1149	<i>S. gilo</i>	
LS1151	<i>S. linnaeanum</i>	
LS1155	<i>S. indicum</i>	
LS1163	<i>S. macrocarpon</i>	
LS1170	<i>S. olivare</i>	
LS1172	<i>S. panduriforme</i>	
LS1081	<i>S. panduriforme</i>	
LS3801	<i>S. integrifolium</i>	

a) 野菜茶業研究所保存系統

N: ‘千両2号’は販売品種のため登録されていない。

3000 を用いて、94°C 3分を1サイクル、次いで94°C 0.5分・60°Cまたは65°C 1分・72°C 1分を1サイクルとして計35サイクル、最終伸長を72°C 5分行った。PCR増幅産物の電気泳動には30%のホルムアミドを含む変性5%ポリアクリルアミドゲル (Super Reading DNA Sequence Solution: 東洋紡) を用いた。電気泳動後 SYBR Green (Molecular Probes) を用いて染色し、蛍光イメージアナライザーにより PCR 増幅産物を検出した。

目的とする遺伝子断片の増幅を確認するために、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、ナイロンメンブレンに転写し、DIG 標識した繰り返し配列をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は定法 (SAMBROOKら, 2001) に従い、検出は DIG 発光検出システム (Roche Diagnostics) に従って行った。

(4) 遺伝子多様度解析

遺伝子多様度は、マイクロサテライトマーカーの多型頻度を表す指標であり、 $1 - \sum [p_i^2]$ を用いて計算した (NEI, 1987)。 p_i は i 番目の遺伝子型の頻度を表す。

2) 結 果

(1) ナスマイクロサテライトの特徴

約 72,000pfu のゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、56 の陽性クローンを獲得し、塩基配列を決定した。最終的に 52 のマイクロサテライト配列を有するクローンを獲得した。これらのクローンに重複は見られず、11 クローンが (GA)_n の繰り返しモチーフを、44 クローンが (GT)_n の繰り返しモチーフを有し、3 クローンが (GA)_n および (GT)_n の両繰り返しモチーフを有していた (表-5)。(GA)_n モチーフを有するクローンの繰り返し数は 9 から 41、平均 24 であり、(GT)_n モチーフを有するクローンの繰り返し数は 5 から 38、平均 18 だった。(GT)_n モチーフを有するクローンのうち 27 クローン (61%) には (AT)_n モチーフが隣接していた。得られたクローンには 4 塩基繰り返しモチーフ (TACA)_n を有するものが 1 つ、5 塩基繰り返しモチーフ (GGAGG)_n を有するものも 1 つ見られた。

表-5 ナス 2 塩基繰り返しマイクロサテライトの存在頻度

反復モチーフ	クローン数	繰り返し回数	存在頻度 (repeat/kb)
GA/CT	11	9-41	3200
GT/CA	44	4-38	820

マーカー化するため、単離したマイクロサテライト配列のうち 37 の隣接領域に特異的プライマーを設計した。マイクロサテライト領域の多型性をナス品種系統間およびナス近縁種間で調査した。残りの 15 クローンはマイクロサテライト領域がクローニングサイトに近接していたため、マイクロサテライト近接領域が AT リッチであったためにプライマーの設計ができなかった。37 プライマー組み合わせのうち 23 組み合わせで、単一または少数の明瞭な PCR 産物を確認した (表-6)。残りの 14 プライマー組み合わせでは、再度プライマー設計を行い PCR 増幅を試みたが、明瞭な増幅産物は確認できなかった。目的とする遺伝子断片の増幅を確認するために、繰り返し配列をプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、増幅の確認されたすべてのプライマー組み合わせで陽性シグナルが観察され、マイクロサテライト領域の増幅が確認された (図-5)。

増幅を確認したマーカーについて変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、予想される断片長よりも短い複数の増幅断片を検出した (図-6A)。アガロースゲル電気泳動では単一断片を検出したマーカーについても複数断片を検出したことから、電気泳動条件の検討が必要であると考えられた。30%ホルムアミドをアクリルアミドゲルに添加したところ、明瞭な断片が検出された (図-6B)。通常量 (7M) の尿素を加えた変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、変性が不十分であるために未変性の断片が生じ、複数の断片が検出されると考えられる。そこで、これ以降、マイクロサテライトマーカーの解析には、30%ホルムアミドを添加した変性ポリアクリルアミドゲルを用いた。

(2) マイクロサテライトマーカー座の多型性

ナス品種系統間では、16 のマイクロサテライトマーカー座において多型が検出された (図-7)。対立遺伝子数は 1 から 6 (平均 3.1)、遺伝子多様度は 0.17 から 0.77 (平均 0.38) だった (表-7)。ナス近縁種間では、18 のマイクロサテライトマーカー座において多型が検出された。対立遺伝子数は 2 から 13 (平均 6.7)、遺伝子多様度は 0.28 から 0.89 (平均 0.60) だった。マーカー遺伝子座の対立遺伝子数とマイクロサテライトの繰り返し数には、他の植物と同様に相関は認められなかった (BROUNら, 1996; NAGYら, 1998; SUWABEら, 2001)。

(3) マイクロサテライトマーカー座の遺伝性とマッピング

‘なす中間母本農 1 号’ と ‘WCGR112-8’ との交配 F₂ 集団を用いて、開発されたマーカーの分離を調査した。

表-6 ナス 2 塩基繰り返しマイクロサテライトの特性

EM	リピートモチーフ	プライマー配列 (5'-3')	増幅断片長 (bp)	アニーリング温度 (°C)
104	(TC) ₉ (AC) ₃₈ (AT) ₁₉	TGGATCTGCAAAGAAAAGGAGAAAAG CGCAAATCGGGTAGACTTTTCGAT	246	60
107	(AC) ₁₃ (AT) ₇	GGCCCTAGACTGAGCTGAAATGTT TGCTACAACCAACACAACCCTCAA	214	65
114	(AC) ₁₃	AGCCTAAACTTGTTGGTTTTTGC GAAGCTTTAAGAGCCTTCTATGCAG	221	65
116	(AC) ₁₂ (AT) ₈	TTAGAAATTTTCGGAACAAAGAGA CCACATGAAACTTGGACCAATGAG	246	60
117	(AC) ₁₉ (AT) ₁₁	GATCATCACTGGTTTGGGCTACAA AGGGGAGAGGAAACTTGATTGGAC	123	65
119	(GGAGG) ₅ ... (AT) ₈ (GT) ₃ AT(GT) ₁₄	CCCCACCCATTTGTGTTATGTT ACCCGAGAGCTATGGAGTGTCTG	201	65
120	(AC) ₁₆	GGATCAACTGAAGAGCTGGTGGTT CAGAGCTTCAATGTTCCATTTTACA	160	65
126	(AT) ₇ (GT) ₁₈	GCATAGCTTATGAGTCAGGTGGCTTT GCTCATCAAACCATCACATTTCAAG	209	65
127	(AC) ₁₃ (AT) ₁₃	CAGACACAACCTGCTGAGCCAAAAT CGGTTTAAATCATAGCGGTGACCTT	213	65
128	(CA) ₂₆ (TA) ₁₉	TAGCGGTGCTAGGTCATCATCTCA TTCTCAAGAAGTTGCTCCAAAGGA	295	60
131	(AT) ₅ (AC) ₃ A(AC) ₁₄ (AT) ₇ GTA(TG) ₅ (TA) ₃	TCTGGGACACCAAGTGAAAAATCA TGCGTTTTTGGCTCCTCTATGAAT	213	65
133	(AC) ₁₃ (AT) ₄	GCGGATCACCTGCAGTTACATTAC TCCTTTGACCTATAGTGGCACGTAGT	177	65
134	(GT) ₂ GC(GT) ₆	AGTAAGGGAAAGTGCTGACGAAGG CAGAGTCATCGTTATGGGGAGGTT	168	65
135	(CA) ₁₁ (GA) ₂₀	ATCCTGTTGCTGCTCATTTTCCTC AGGAGGATCCAAGAGGTTTGTGTA	260	65
139	(AC) ₆ AT(AC) ₁₁ (AT) ₁₀	TGCTAAGTCGTCATCCACAAGAA GATTTTGGCTCCTTGACCATTTTG	258	65
140	(AC) ₄ GC(AC) ₅ T(AC) ₃ ATGC(AC) ₄ AT(AC) ₆ (AT) ₅ G(TA) ₁₃	CCAAAACAATTTCCAGTGACTGTGC GACCAGAATGCCCTCAAATTTAAA	268	65
141	(AT) ₁₆ (GT) ₁₉	TCTGCATCGAATGTCTACACCAAA AAAAGCGCTTGCCTACTACTGAAT	228	65
145	(TACA) ₄ TA(TACA) ₄ (CA) ₃₇ (TA) ₅ TG(TA) ₃ (TTAA) ₃	CAGTGCTACATAAAATTGAGACAAGAGG GGAGGTACAACGGATTTTCATATGGT	369	65
146	(AC) ₁₉ (AT) ₁₁ AC(AT) ₂	GGACCAAAGCGAAAATTTTCACAAC TTGCACCAATTGGGAAGTAACACA	288	65
151	(TG) ₃ TA(TG) ₈ (TA) ₆	TGATTTGGCCCTTAAGCCTAAGTATG GACTCCTCAAGCCTTACCTCCAA	165	65

8 マーカーにおいて両親間で多型が検出され、そのうち 7 マーカーでは 1 : 2 : 1 の分離に適合した (表-8)。

3) 考 察

2 塩基繰り返し配列をプローブに用いたゲノムライブラリーのスクリーニングにより、ナスゲノム中の 2 塩基繰り返し配列の存在頻度を明らかにした。ナスゲノムには (GT)_n マイクロサテライトは、(GA)_n マイクロサテ

ライトの約 4 倍存在する。コムギやハクサイなどの植物ではナスと異なり、(GA)_n マイクロサテライトが (GT)_n マイクロサテライトよりも多く存在することが報告されている (GUPTAら, 2000; SUWABEら, 2001)。ナス科植物であるトマト・タバコ・ジャガイモでは、(GA)_n・(GT)_nそれぞれのマイクロサテライトはほぼ同程度存在すると推定されている (ASHKENAZIら, 2001)；

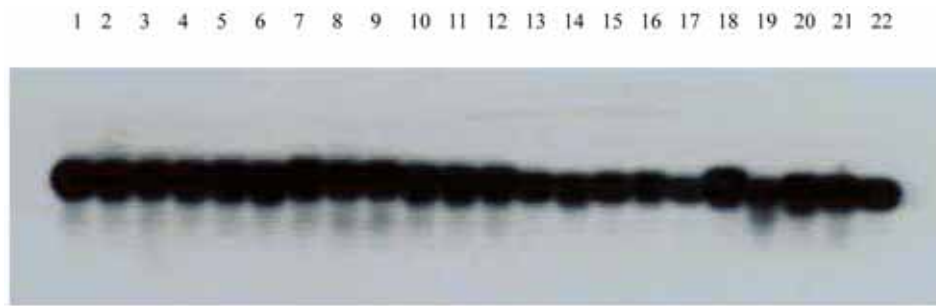


図-5 PCR 増幅断片の確認 (2 塩基繰り返しマイクロサテライト EM114)
 1: DMP, 2: 津田長, 3: 橘田, 4: 仙台長, 5: 泉州水ナス, 6: 中生真黒,
 7: LS1934, 8: なす中間母本農 1 号, 9: WCGR112-8, 10: Talina 2/1,
 11: 千両 2 号, 12: *S. incanum*, 13: *S. aethiopicum*, 14: *S. anguivi*,
 15: *S. gilo*, 16: *S. lineanum*, 17: *S. indicum*, 18: *S. macrocarpom*,
 19: *S. olivare*, 20: *S. panduriforme*, 21: *S. panduriforme*,
 22: *S. integrifolium*

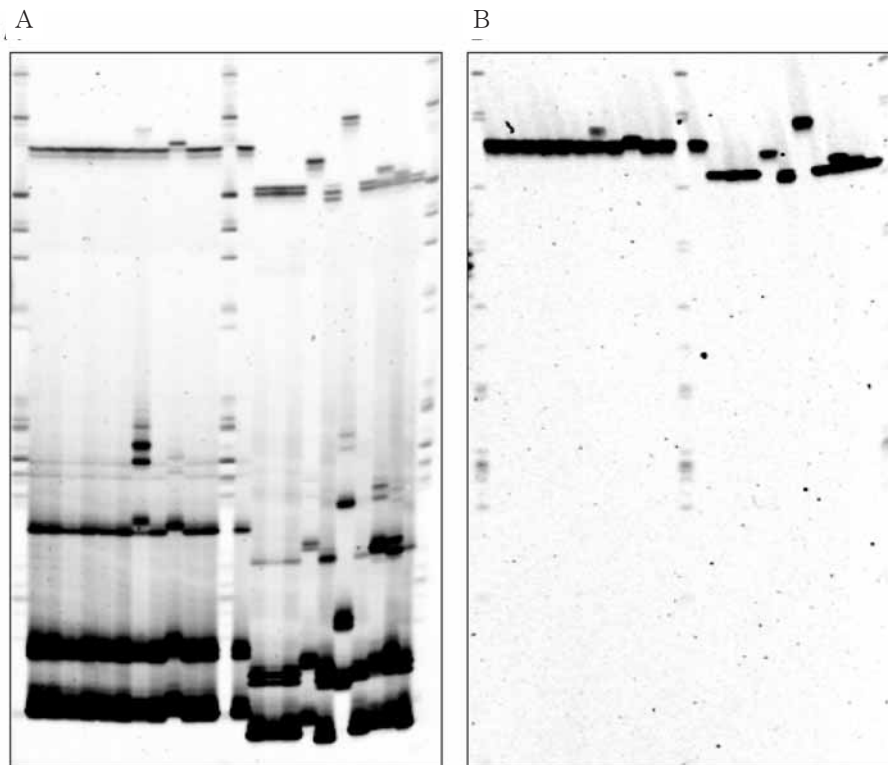


図-6 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の比較 (EM114)
 A: ホルムアミド無添加
 B: 30%ホルムアミド添加

BROUNら, 1996; LAGERCRANTZら, 1993). また, (AT)_nマイクロサテライトが高頻度で存在することが他の植物で報告されているが (WANGら, 1994), (AT)_nマイクロサテライトはその構造により, スクリーニングが技術的に困難であり, ナスでの存在頻度は不明である. しかし, (GT)_nマイクロサテライトの約 60%に (AT)_nマイクロサテライトが近接していることから, ナスにお

いても (AT)_nマイクロサテライトが多数存在することが推測される. このような (GT)_nマイクロサテライトに (AT)_nマイクロサテライトが近接している構造は, ジャガイモでも観察されている (MILBOUNEら, 1998). 少数のマイクロサテライトの解析ではあるが, トマトとトウガラシでも同様な構造を持つマイクロサテライトが観察されている (ARESHCHENKOVAら, 1999; NAGYら,

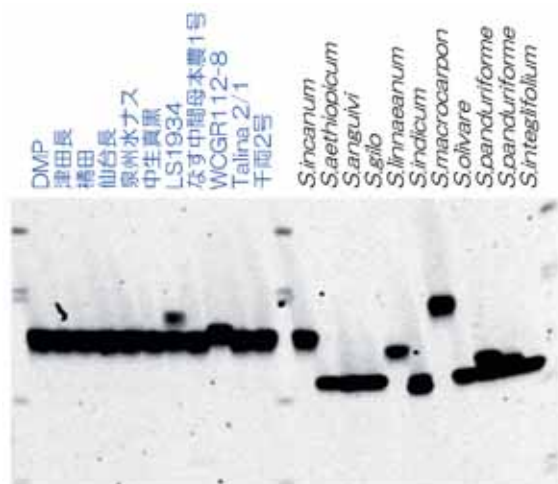


図-7 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動図
(2塩基繰り返しマイクロサテライトマーカー EM114)

1998). このような異なるコア配列のマイクロサテライトが隣接して存在する構造が高頻度に存在することは、他の植物種では報告されておらず (RÖDERら, 1998 ; SUWABEら, 2001 ; TARAMINOら, 1996), ナス科植物に特徴的である.

ゲノムライブラリーの平均インサートサイズ (537bp) とナスのゲノムサイズ (1,100Mb, (ARESHCHENKOVAら, 1999) より計算すると, ナスのマイクロサテライト頻度は (GA)_nが約 3,200kb あたり 1 個, (GT)_nが約 820kb に 1 個と計算され, ナス科植物を含む他の植物に比べその存在頻度は低い (ASHKENAZIら, 2001). これは, ライブラリーの構成によるものか, ライブラリーのスクリーニング条件によるものか, それともナスの持つマイクロサテライトの存在頻度を反映しているのかは現時点では判断できない.

遺伝子多様度は, ナス品種系統間では 0.17 から 0.77・

表-7 ナス 2 塩基繰り返し配列の対立遺伝子座数と遺伝子多様度

EM	対立遺伝子数		遺伝子多様度	
	<i>S. melongena</i>	<i>Solanum</i> relatives	<i>S. melongena</i>	<i>Solanum</i> relatives
104	1	1*	0.00	0.00
107	2	2*	0.17	0.15
114	3	8	0.24	0.68
116	1	1*	0.00	0.00
117	3	9	0.43	0.74
119	3	3	0.31	0.44
120	2	6	0.17	0.48
126	2	6	0.30	0.60
127	2	2*	0.17	0.28
128	1	3	0.00	0.46
131	3	7	0.38	0.72
133	4	9	0.50	0.77
134	2	8	0.17	0.67
135	4	8	0.45	0.75
139	1	1	0.00	0.00
140	4	11	0.55	0.81
141	4	8	0.69	0.83
145	4	13	0.71	0.89
146	2	6	0.40	0.75
151	1	3	0.00	0.58
155	6	9	0.77	0.82
157	1	1*	0.00	0.00
162	1	1	0.00	0.00
av.	3.1	6.7	0.38	0.60

* いくつかのナス近縁種では PCR 増幅産物が検出されない

表-8 ナス 2 塩基繰り返しマイクロサテライトマーカーの分離比

遺伝子座	分離比			χ^2 (1:2:1)	p value
	AA	Aa	aa		
EM114	29	60	24	0.876	0.645
EM117	33	60	20	3.425	0.180
EM119	22	52	22	0.667	0.717
EM120	30	60	25	0.652	0.722
EM134	31	55	31	0.419	0.811
EM135	21	53	18	2.326	0.313
EM140	32	68	17	6.932	0.031
EM155	27	51	18	2.063	0.357

平均 0.38, ナス近縁種間では 0.15 から 0.89・平均 0.60 だった (表-7). 他の植物の遺伝子多様度は, イネのジャポニカ系統間では 0.33 から 0.88・平均 0.57 (WUら, 1993), ジャガイモでは平均 0.66 (ASHKENAZIら, 2001), ダイズでは 0.52 から 0.88・平均 0.74 (HOSSAINら, 2000) であり, ナス品種系統間の多型頻度は他の植物に比べ低かった. RAPD および AFLP 解析においても, ナス品種系統間では多型頻度は低かった (II-1 および II-2 参照). トマトでも同様に RFLP およびマイクロサテライト解析において, 品種間では多型頻度が低く, 近縁種間では若干高いことが報告されている (MILLERら, 1990; SMULDERSら, 1997). しかし, ナスと同じ *Solanum* 属に属するジャガイモ品種間では, 120 のマイクロサテライトマーカーのうち 98 のマーカーで多型が検出され, 高い多型性が見られている (MILBOUNEら, 1998). これはジャガイモ品種が 4 倍体であるためと推測される. ナスおよびトマトにおいて品種間の遺伝的多型性が低いのは, 限られた遺伝資源のみを利用して育種が行われてきたためと推測される.

7つのマイクロサテライトマーカーにおいて, 解析に用いた *S. melongena* 11 系統すべてが *S. incanum* と同じ対立遺伝子を示した. また, 15 マーカーでは, *S. melongena* 11 系統のうち 8 系統以上が *S. incanum* と同じ対立遺伝子を示した. この結果は, *S. incanum* は *S. melongena* と極めて近縁であることを示しており, 近年提唱されている *Solanum* 属の分類体系と合致している (PEARCEら, 1979). 本研究と同様に, RAPD 解析によって *S. melongena* と *S. incanum* が近縁であることが示されている (KARIHALOOら, 1995). 本研究では解析している系統数が少ないので, 種内および種間の多型性の比較および系統解析を行うためには, さらに多

くの種について多くの系統を用いた解析を行う必要がある.

b 3 塩基繰り返し配列の単離および多型解析

3 塩基繰り返し配列はヒトゲノムで高い多型性を示し, 安定して遺伝することが報告されている (EDWARDSら, 1991; SHEFFIELDら, 1995). また, 2 塩基繰り返し配列は電気泳動時の変性が不十分であると, 正しい長さ以外のバンド (シャドーバンド) が出現しやすいが, 3 塩基繰り返し配列は明瞭なバンドが得られ易く, 遺伝子型の判定がしやすい (CREGANら, 1994; HEARNEら, 1992). 植物種によってはマイクロサテライトが染色体の特定領域に集中して存在することも報告されており, 複数の繰り返しモチーフを用いて DNA マーカーを開発することはその有効性を高める上で重要であると考えられる.

大量のマイクロサテライトマーカーを開発するためには, 繰り返し配列の存在頻度, 繰り返し数やマーカーの多型頻度などの情報が必要である. そこで, 本項ではナスの 3 塩基繰り返し配列を単離し, 塩基配列等の構造的特徴を明らかにするとともに, マイクロサテライトマーカーのナス品種系統間およびナス近縁種間の多型頻度を調査した.

1) 材料および方法

(1) 植物材料

II-3-a と同様の材料を用いた.

(2) マイクロサテライトの単離

II-3-a と同様の手法を用いた. ハイブリダイゼーションのプロープには 5' 末端を DIG ラベルしたオリゴ DNA (AAC)₁₀, (AAG)₁₀, (ACC)₁₀, (ACG)₁₀, (ACT)₁₀, (AGC)₁₀, (AGG)₁₀, (ATC)₁₀ を用いて, 約 108,000pfu のナスゲノムライブラリーをスクリーニングした.

(3) マイクロサテライトマーカーの多型性および遺伝子多様度解析

II-3-a と同様の解析法を用いた.

2) 結果

(1) ナス 3 塩基繰り返し配列の特徴

ナスゲノムにおける 3 塩基繰り返し配列の存在頻度を推定するために, 約 108,000pfu のゲノムライブラリーをスクリーニングし, 174 の陽性クローンを単離した. すなわち, 0.16% のクローンが 3 塩基繰り返し配列を含むと推定される. これらのクローンの塩基配列を決定し, 繰り返し配列モチーフの存在頻度を明らかにした (表-9). (AAC/TTG)_n と (ACC/TGG)_n をコア配列とする

繰り返し配列の存在頻度が高く、3塩基繰り返し配列の84.5%を占めていた。

陽性クローンの平均インサート長(537bp)と推定されるナスのゲノムサイズ(1,100Mbp/C, ARUMUGANATHANら, 1991)より、3塩基繰り返し配列の存在頻度を推定した(表-10)。3塩基繰り返し配列のうち、(AAC/TTG)_nの存在頻度が最も高く、ゲノムあたり1.9×10³個、(ATC/TAG)_nの存在頻度が最も低く、ゲノムあたり3.8×10個存在すると推定される。それぞれ、569kbpから29.0Mbpごとに存在すると推定される。最も存在頻度の高い(AAC/TTG)_nをコア配列とするマイクロサテライト配列は、繰り返し数が3から22、平均6だった。繰り返し数が8以上のマイクロサテライト配列は単離されたクローンの16.5%であり、比較的繰り返し数の少ないマイクロサテライトが多く単離された。これは、用いたスクリーニング条件が緩やかなために、反復数の少ないマイクロサテライトが多数単離

されたためであり、ナスのマイクロサテライトの存在頻度を反映していない可能性がある。

(2) マイクロサテライト遺伝子座の多型性と遺伝性

単離した繰り返し配列を有する97クローンのうち85クローンについて、繰り返し配列に隣接する領域にプライマーを設計した。残りの12クローンは、マイクロサテライト配列がクローニングサイトに近いためにプライマーを設計できなかった。85プライマー組み合わせのうち58組み合わせにおいて、明瞭なPCR増幅産物を確認した(図-8)。

PCR増幅の確認された58プライマー組み合わせにおいて、8マーカーがナス品種系統間で多型を示した(表-11)。また、対立遺伝子数は2から3(平均2.1)、遺伝子多様度は0.17から0.57(平均0.31)であった(表-12)。

表-9 単離されたナス3塩基繰り返し配列数と割合

反復モチーフ	クローン数	割合 (%)
AAC/TTG	61	62.9
AAG/TTC	7	7.2
ACC/TGG	21	21.6
ACG/TGC	4	4.1
ACT/TGA	6	6.2
AGC/TCG	3	3.1
AGG/TCC	7	7.2
ATC/TAG	2	2.1
TAT/ATA	6	
CGC/GCG	2	

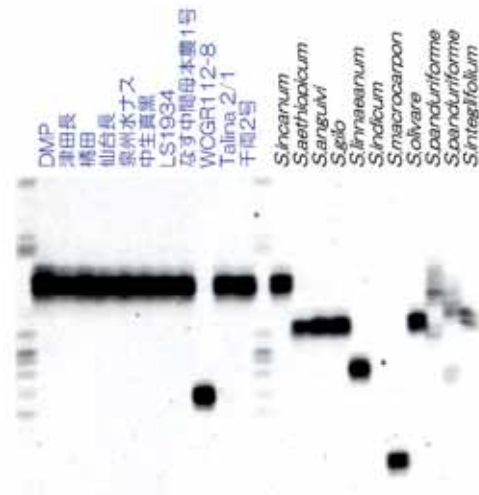


図-8 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動図 (3塩基繰り返しマイクロサテライトマーカーEM206)

表-10 ナス3塩基反復配列の繰り返し数と存在頻度

反復モチーフ	反 復 数							Total	ナスゲノム中の推定存在頻度 ^{a)}
	3-5	6-8	9-12	13-15	16-18	19-21	>21		
AAC/TTG	50	38	13	0	0	1	0	102	1.9×10 ³
AAG/TTC	7	2	0	0	0	0	1	10	1.9×10 ²
ACC/TGG	31	2	0	0	0	0	0	33	6.3×10 ²
ACG/TGC	1	2	1	0	0	0	0	4	7.6×10
ACT/TGA	3	1	2	0	0	0	0	6	1.1×10 ²
AGC/TCG	1	1	1	0	0	0	0	3	5.7×10
AGG/TCC	6	1	1	1	0	0	0	9	1.7×10 ²
ATC/TAG	1	1	0	0	0	0	0	2	3.8×10
TAT/ATA	11	0	0	0	0	0	0	11	
CGC/GCG	2	0	0	0	0	0	0	2	

a) ナスゲノムサイズと塩基配列情報を元に計算した

表-11 明瞭な増幅断片が確認されたプライマーセット数と多型マーカー数

反復モチーフ	プライマー セット数	PCR 増幅	多型マーカー数	
			<i>S. melongena</i>	<i>Solanum</i> relatives
AAC/TTG	46	35	5	21
AAG/TTC	5	4	1	1
ACC/TGG	17	14	1	8
ACG/TGC	4	3	0	1
ACT/TGA	5	4	1	2
AGC/TCG	3	3	0	1
AGG/TCC	7	5	1	3
ATC/TAG	2	2	0	1
TAT/ATA	6	5	0	3
CGC/GCC	1	1	0	1
	n=84		n=8	n=33

ナス品種系統間で多型の得られた8マーカーのうち5マーカーが(AAC/TTG)_nをコア配列とするマイクロサテライト配列を有していた。(AAC/TTG)_nをコア配列とするマイクロサテライトはナスゲノム中の存在頻度が高く、単離されたマイクロサテライトを含む配列の中でもPCRプライマーを設計できたクローン数が最も多かったので、単純に(AAC/TTG)_nをコア配列とするマイクロサテライトが他のマイクロサテライトに比べて多型性が高いとは判断できない。近縁種間では、33マーカーにおいて多型が検出され、対立遺伝子数は2から11(平均2.9)、遺伝子多様度は0.09から0.71(平均0.32)であった。いくつかの近縁種においては増幅産物を確認できないマーカーも認められた。対立遺伝子数とマイクロサテライトの繰り返し数には相関は見られなかったが、繰り返し数が5以下の遺伝子座ではほとんど多型が検出されなかった。

‘なす中間母本農1号’と‘WCGR112-8’の間で多型の検出された3つのマイクロサテライトマーカーについて、F₂集団での分離を検定したところ、すべて分離比が1:2:1に適合し、共優性分離を示した。

3) 考 察

3塩基繰り返し配列はスクリーニングに用いたライブラリーの0.16%に存在することが明らかになった。存在頻度の高い(AAC/TTG)_nと(ACC/TGG)_nの2種類の繰り返しモチーフは約430kbに1つ存在し、ゲノムあたり2.6×10⁴個存在すると推定され、解析した3塩基繰り返しのマイクロサテライト全体の84.5%を占めていた。コムギでは(TAA/ATT)_n、(CTT/GAA)_n、(CAA/GTT)_nの3種類の繰り返し配列が96%を占め

(SONGら, 2002)、シロイヌナズナでは(TAA/ATT)_n、(CAA/GTT)_n、(CTT/GAA)_n、(CAT/GTA)_n、(GGA/CCT)_nの5種類の繰り返し配列が96%を占めている(LORIDONら, 1998)。また、トマトでは存在頻度の高い(TAA/ATT)_nと(CTT/GAA)_nの2種類のマイクロサテライト配列が、(AG/TC)_nと(AC/TG)_nの2種類の2塩基繰り返し配列と同程度の頻度で存在する(BROUNら, 1996)。同様に、ナスでも存在頻度の高かった(AAC/TTG)_nと(ACC/TGG)_nの2種類の繰り返し配列は、(AG/TC)_nと(AC/TG)_nの2種類の2塩基繰り返し配列と同程度存在することが明らかとなった。しかし、ナスでは(CTT/GAA)_nマイクロサテライト配列の頻度は高くなかった。このようにマイクロサテライトの存在頻度は植物種により大きく異なり、植物種特異的と考えられる。多くの植物では(TAA/ATT)_nのマイクロサテライト配列が最も高頻度に存在すると推定されているが(AKKAYAら, 1995; ECHTら, 1996; GASTIERら, 1995; HÜTTELら, 1999; SMULDERSら, 1997)、ナスではスクリーニングを行っておらず、その存在頻度は不明である。

繰り返し数が8以上のマイクロサテライト配列は高い多型頻度を示すことが報告されている(GASTIERら, 1995; SMULDERSら, 1997)。しかし、理論的にはマイクロサテライト配列の繰り返し数と変異率とは相関があるが、多型頻度とは相関はない(BRINKMANNら, 1998; SUWABEら, 2001; XUら, 2000)。ナスでは対立遺伝子数とマイクロサテライト配列の繰り返し数の間に相関は見出せなかったが、繰り返し数が7以下の3塩基繰り返し配列は多型頻度が低く、ナス品種系統間で多型の検出

表-12 ナス3塩基繰り返しマイクロサテライトマーカーの対立遺伝子座数と遺伝子多様度

EM	反復モチーフ	対立遺伝子数		遺伝子多様度	
		<i>S. melongena</i>	<i>Solanum relatives</i>	<i>S. melongena</i>	<i>Solanum relatives</i>
201	(TGT) ₃	1	2	0.00	0.30 ^{a)}
206	(ATG) ₁₀	2	7	0.17	0.66
209	(AAC) ₇	1	2	0.00	0.09
213	(AAC) ₅ (ACT) ₄	1	3	0.00	0.19 ^{a)}
222	(CGC) ₃ (ACC) ₄	1	2	0.00	0.09
228	(AAC) ₉	2	7	0.50	0.66
229	(ACC) ₄	1	2	0.00	0.09
232	(AAC) ₅	2	3	0.20	0.55 ^{a)}
234	(ACG) ₆	1	2	0.00	0.13 ^{a)}
236	(AAC) ₉	1	2	0.00	0.48
239	(ACT) ₃	1	2	0.00	0.17 ^{a)}
241	(AAC) ₆	1	2	0.00	0.09
245	(AAC) ₁₀	2	11	0.17	m
248	(AAC) ₈	2	5	0.18	0.47 ^{a)}
252	(AGG) ₄ (ACC) ₇	1	5	0.00	m
259	(ACC) ₄ (AAC) ₁₀	1	3	0.00	0.43 ^{a)}
261	(AGC) ₇	1	3	0.00	0.50
274	(ACC) ₄	1	2	0.00	0.12
294	(ACG) ₉	1	4	0.00	0.56
297	(AGG) ₁₂ (AAG) ₈	3	5	0.57	0.72 ^{a)}
304	(TAT) ₃	1	2	0.00	0.48
308	(AAC) ₇	1	2	0.00	0.13 ^{a)}
313	(ACC) ₆	2	4	0.50	0.72 ^{a)}
319	(ACC) ₅	1	2	0.00	0.09
333	(ACC) ₄	1	3	0.00	0.09
342	(AAC) ₁₁	1	2	0.00	0.38
346	(CTTT) ₃ (AAC) ₅	2	3	0.17	0.49
349	(TAT) ₃ (AAC) ₅	1	2	0.00	0.15 ^{a)}
359	(AGG) ₆	1	3	0.00	0.53
360	(AAC) ₆	1	2	0.00	0.11
362	(AAC) ₅	1	2	0.00	0.09
370	(AAC) ₇	1	2	0.00	0.09
374	(AAC) ₇	1	2	0.00	0.14 ^{a)}

m：いくつかのナス近縁種では PCR 産物が複数検出された。

a)：いくつかのナス近縁種では PCR 増幅産物が確認できなかった。

されたマーカーのほとんどが、繰り返し数が8以上のマイクロサテライト配列を有していた。また、レタスでは、複数のコア配列が隣接する複合型マイクロサテライト配列が高い多型性を示すことが報告されている (VAN DE WIELら, 1999)。単離されたナスの3塩基繰り返し配列には、複合型マイクロサテライト配列は少数であり、明確な相関は見出せなかった。しかし、ナスの2塩基繰り返し配列では、(AC/TG)_nをコア配列とするマイクロサテライトには高頻度で(AT)_nが隣接し、複雑な構造を

していることが明らかとなり、その多型頻度は高かった。以上より、繰り返し数が8以上のマイクロサテライトまたは複数の繰り返しコア配列で構成されるマイクロサテライト配列をDNAマーカー開発に用いることにより、効率良くマイクロサテライトマーカーを開発することができると思われる。これらの配列がなぜ高い多型性を示すのかは不明であるが、進化的な意味においても興味深い。

III 連鎖地図の作成と連鎖解析

連鎖地図の作成にはいくつかの基礎的・応用的な目的がある。第1に、染色体歩行による遺伝子の単離である。染色体歩行により遺伝子を単離するためには、形質と連鎖した、染色体歩行のスタートポイントとなるDNAマーカーが必要である。染色体歩行を行うにはより密接に形質と連鎖したDNAマーカーが必要であり、より多数のDNAマーカーが存在することが望ましい。第2に、植物育種における効率的選抜への利用である。有用形質に密接に連鎖したマーカーを見出せば、マーカー支援選抜(marker-assisted selection: MAS)により育種効率を向上させることができる。究極的には、形質に連鎖したDNAマーカーではなく、形質の遺伝子そのものをDNAマーカーとして用いることが求められるが、それを開発してゆく上で連鎖地図の利用価値は高い。第3に、農業上の重要形質は、量的形質であることが多く、量的形質を詳細に遺伝解析するためには、全ゲノムをカバーする連鎖地図が必要である。連鎖地図により、量的形質に関連する遺伝子座を同定し、その遺伝子座間の相互作用を解析することが可能となる。量的形質遺伝子座(quantitative trait loci, QTL)の詳細な遺伝解析は、連鎖地図がなければ行うことはできない。多数のDNAマーカーを開発し、連鎖地図を作成する最も重要な目的は、量的形質遺伝子座の解析である。

RFLP解析による連鎖地図作成が1980年代から始まり、様々な動植物で連鎖地図の作成が行われてきた。ヒトやいくつかの実験動植物では、高密度連鎖地図が作成され、全塩基配列の決定にまで至っている。また、有用形質の染色体歩行による遺伝子の単離も多数報告されている。しかし、野菜においては作目が多く、それぞれの植物でDNAマーカーの開発を行い、連鎖地図を作成しなければならず、研究の進展が遅れている。

本章では、IIで開発されたRAPD・AFLP・マイクロサテライトマーカーを用いて連鎖地図を作成し、ナス重要形質の遺伝解析を行った。

1 連鎖地図の作成

ナス科植物では、トマト・ジャガイモ・トウガラシで詳細な連鎖地図が作成され、染色体歩行による有用形質遺伝子の単離も報告されている。ナス科植物の連鎖地図は、主にトマトのRFLPプローブを用いて作成され、ナス科植物のゲノム構造の比較が行われている。ナスで

は、2002年10月、トマトのRFLPプローブを用いた連鎖地図が作成された(DOGANLARら, 2002a)。ナスの連鎖地図はこれ以外には報告されておらず、DNAマーカーの情報もほとんどないのが現状である。

1) 材料および方法

開発されたRAPD・AFLP・マイクロサテライトマーカーの分離を‘なす中間母本農1号’と‘WCGR112-8’とのF₂集団を用いて調査した。連鎖地図の作成にはMAPMAKER/EXP 3.0を用い、地図関数にKosambi関数を用いて連鎖地図作成を行った(KOSAMBI, 1944; LANDERら, 1987; LINCOLNら, 1992)。LODスコアを3、地図距離を35cM以下として、“group”コマンドで各マーカーを連鎖群に割り当てた。それぞれの連鎖群ごとに“suggest subset”コマンドにより地図距離が十分あり情報量の多いマーカーを選抜し、“order”コマンドによりマーカーの並びを決定した。“suggest subset”コマンドでマーカーを選抜できなかった連鎖群は、“compare”コマンドによりマーカーの並びを決定した。残ったマーカーは“try”コマンドにより連鎖群上の位置を決定した。最終的に決定したマーカーの並びは、“ripple”コマンド(windowサイズ:5)により確認した。

RAPDおよびAFLPマーカーには、どちらの親系統由来の多型バンドを示すかによって“e”(なす中間母本農1号由来)および“w”(WCGR112-8由来)の文字を配置した。RAPDマーカーはプライマーの供給元により以下のように表記した: W(和光純薬), C(ベックス), OP(オペロン), UBC(University of British Columbia), RA(野菜茶業研究所)。たとえば、eWA18aというマーカーは、‘なす中間母本農1号’由来(e)の多型バンドを有する和光純薬製(W)のA18というランダムプライマーにより複数検出される多型バンドのうちの一つである。AFLPマーカーはAEMの文字で識別され、この後に続く数値がプライマー組み合わせを示す。マイクロサテライトマーカーはEMという文字で識別される。この後に続く数値がプライマーペアを示す。200番未満が2塩基繰り返し配列、200番以上が3塩基繰り返し配列を有するマイクロサテライトマーカーである。

2) 結果

作成した連鎖地図は、19連鎖群・全長807.3cM・189マーカーで構成された(図-9)。作成した連鎖地図は19連鎖群で構成され、ナスの基本染色体数12には収束しなかった。連鎖地図上には、92個のRAPDマーカー、

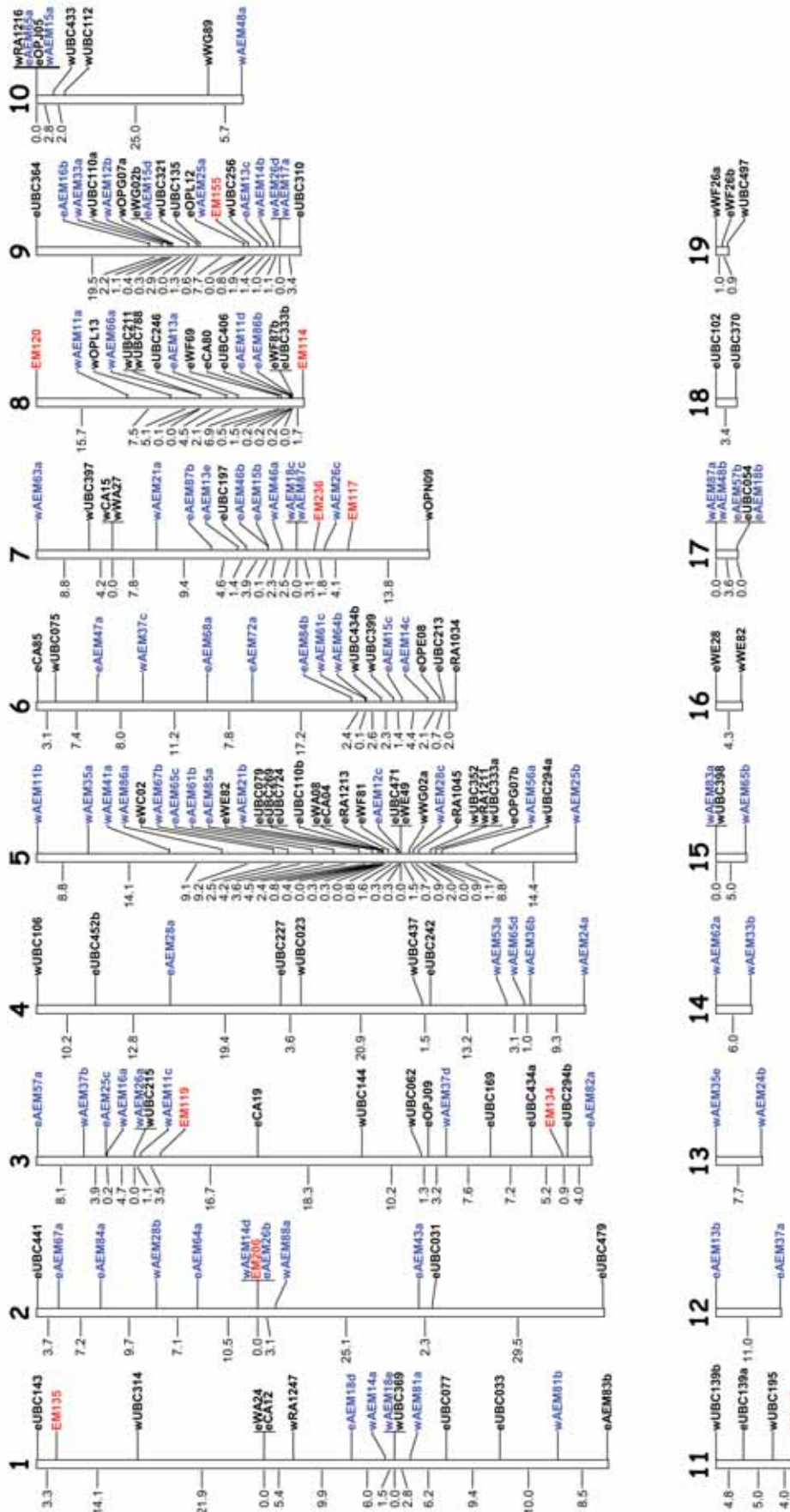


図-9 ナス連鎖地図
黒：RAPD マーカー，青：AFLP マーカー，赤：マイクロサテライトマーカー

88個の AFLP マーカー、9個のマイクロサテライトマーカーが座乗した。残りの26マーカーは連鎖が認められなかった。10個の連鎖群が8個以上のマーカーで構成され、残りの連鎖群は5個以下のマーカーで構成されていた。マーカー間の平均距離は4.7cMであり、87%のマーカー間距離が10cM以下だった。

マイクロサテライトマーカーは連鎖地図上全体に散在していた。しかし、RAPD マーカーは第5連鎖群上に集中する領域が見られ、3.6cMに10個のRAPD マーカーが座乗した。

3) 考 察

AFLP およびマイクロサテライトマーカーは連鎖地図上全体に分布したが、RAPD マーカーはマーカー同士が密接に連鎖する領域が見られた。他の植物でもRAPD や AFLP マーカーがクラスターを組みやすいことが報告されている (ALONSO-BLANCOら, 1998; NILSSONら, 1997)。連鎖群の特定領域にマーカーが密接に連鎖することは良く見られ (DEBENERら, 1999)、セントロメア領域周辺の組換え頻度が低いことが原因のひとつであると考えられる (ALONSO-BLANCOら, 1998; TANKSLEYら, 1992)。一方マイクロサテライトマーカーは、多くの植物では連鎖地図上全体に分布する (BELLら, 1994; WUら, 1993)。しかし、トマトではマイクロサテライトがセントロメア付近にクラスターを組んでいることが報告されている (BROUNら, 1996)。本研究では、マイクロサテライトマーカーは連鎖地図全体に散在していたが、用いたマイクロサテライトマーカーの数が少なく、連鎖地図上での分布を議論するためにはさらに解析が必要である。

作成された連鎖地図は、比較的小さな連鎖群が多く、ナスの基本染色体数に収束しておらず、ナス染色体全体を十分にはカバーしていない。連鎖地図作成に用いた親系統は形態的には大きく異なるが、共通の祖先を持ち遺伝的に同一の染色体領域を有しているために、分離するDNA マーカーが得られないとも考えられる。そのため同一染色体上に位置する連鎖群が連鎖しているように見えない可能性もある。DOGANLARら (2002a) により、トマトプローブを用いたナス連鎖地図が報告されている。連鎖地図は12連鎖群・全長1,480cM・233マーカーで構成される。DOGANLARらの連鎖地図は、栽培ナス *S. melongena* とナス近縁種 *S. linnaeanum* との交配 F_2 集団を用いて作成されており、多型頻度は高いが、マーカーの分離の歪む領域が存在する。また、近縁種との交配集団を用いて作成したDNA マーカーは、品種系統間にお

いては多型が検出されにくく農業形質の遺伝解析に用いることは難しいと考えられる。本研究によるナス連鎖地図はまだナス染色体全体をカバーしていないが、ナス系統間の交配集団を用いて作成しているため、DNA マーカーを育種の場合で利用する際には利点が多い。DNA マーカーの育種への利用を考えるとマイクロサテライトマーカーやCAPS マーカーのような共優性でPCRを用いて解析の行うことのできるマーカーを多数開発することが望まれる。今後さらにDNA マーカーを開発しナス染色体全体をカバーする連鎖地図を作成すれば、ナス育種の効率化・詳細化を促進できると考えられる。

ナス科植物のゲノム構造の比較は、トマトのRFLPプローブを用いて作成された連鎖地図により、トマト・ジャガイモ・トウガラシ・ナスで示されている (DOGANLARら, 2002a; LIVINGSTONEら, 1999; TANKSLEYら, 1992)。この4種の植物の連鎖地図を比較すると、染色体再配列の程度に差が見られる。トマトとナスの連鎖地図を比較すると22の偏動原体的逆位と7つの転座が見られた (DOGANLARら, 2002a)。トマトとジャガイモでは5つの偏動原体的逆位が見られ (TANKSLEYら, 1992)、トマトとトウガラシでは7つの転座を含む22の再配列が見られた (LIVINGSTONEら, 1999)。トマトとナスの比較と、トマトとジャガイモの比較から、ナスとジャガイモでは24の再配列があると考えられる (DOGANLARら, 2002a)。この連鎖地図の比較から、この4種の中ではトマトとジャガイモが最も近縁であり、トマトとジャガイモと同じクレードにナスが属し、トマトとジャガイモから最も遠いクレードにトウガラシが属することが示唆されている (DOGANLARら, 2002a)。これは、葉緑体DNAのRFLP解析を用いたナス科植物の系統分類と類似した結果である (OLMSTEADら, 1997)。トマト (SMULDERSら, 1997) およびジャガイモ (MILBOUNEら, 1998) で開発されたマイクロサテライトマーカーのナスへの適用を行ったところ、ナス科植物の類縁関係を示唆する結果が得られた。ジャガイモのマイクロサテライトマーカーは、解析を行ったマーカーの約2割で明瞭な増幅断片が検出されたが、トマトでは約1割のマイクロサテライトマーカーで増幅断片が検出された (未発表データ)。この結果は、ナスはナス科植物の中でトマトよりもジャガイモに近縁であることを示しており、葉緑体DNAのRFLP解析による類縁関係の推測と同様な傾向を示している。

ナス科植物のゲノム情報は、Solanaceae Genomics Network (<http://www.sgn.cornell.edu/index.html>)

上で公開されている。トマト・ジャガイモ・ナスの連鎖地図情報も公開されている。600以上のトマトのマイクロサテライトマーカーなども公開されている。これらの情報を用いてさらにDNAマーカーを開発し、詳細なナス連鎖地図の開発を進めていく必要がある。

2 量的形質の連鎖解析

遺伝研究や育種事業において連鎖地図を作成する目的は、有用な質的および量的形質に関連する遺伝子座の染色体上の位置を確定することにある。多数のDNAマーカーが連鎖地図上に座乗したとしても、多くの場合通常の地図における所番地に過ぎない。DNAマーカーによる連鎖地図は、形質の連鎖地図や細胞学的な染色体地図と統合されて初めて遺伝育種への利用価値がある。DNAマーカーの作成は、農業上有用な形質を連鎖地図上に位置付け、詳細な遺伝解析を可能にし、育種の効率化を図ることが大きな目的である。

量的形質は、連鎖地図により詳細な遺伝解析が可能となる。トマトの果実重やイネの感光性を支配する遺伝子座の詳細な遺伝解析が行われ、遺伝子座間の相互作用が解析され、それぞれの遺伝子が単離されている (FRAYら, 2000; YANOら, 2000)。これらの解析はDNAマーカーが開発され、詳細な連鎖地図が作成されて始めて可

能となった。検出された個々の量的遺伝子座を組み合わせる事により、量的な形質を操作することが可能となっている。

ナスの果実色は紫・緑・白とバラエティーに富んでおり、重要な育種目標の一つである。日本の市場では濃紫色の果実が好まれており、白や緑、淡紫色果実の育種材料を用いた場合、戻し交雑による果実色の改良が必要である。また、果形もナスの育種目標の一つであり、日本市場では長卵形から中長形の品種が最も多いが、地域品種には球形や極長形の品種もある (TACHIBANA, 1994)。

本節では、作成した連鎖地図を用いて、ナスの重要形質である果形・果実色・ヘタ色・茎色の連鎖解析を行った。

1) 材料および方法

‘なす中間母本農1号’と‘WCGR112-8’とのF₂集団を解析に用いて、各形質の評価を行った。植物体の栽培は、野菜茶業研究所の慣行に従い野菜茶業研究所内の圃場で行った。各植物ごとに果形、果実色、茎色、ヘタ色を調査し、評点として記録した。(表-13, 図-10)。

QTL解析には、MAPMAKER/QTL 1.1を用いた。LODスコア3.0以上の領域をQTLとした。LOD値の最も高いピークに隣接するマーカーと形質との連鎖について、Wilcoxonの符号化順位検定により検定した。



図-10 果形スコア

表-13 ナスの特性スコア

スコア	1	2	3	4	5	6	7
果形	球形	卵形	長卵形	中長形	長形		
果色	白	緑	緑がかった紫	赤紫	紫	濃紫	
茎色 ¹⁾	なし (緑)	とても低い	低い	やや低い	中間	高い	とても高い (濃紫)
ヘタ色 ¹⁾	なし (緑)	とても低い	低い	やや低い	中間	高い	とても高い (濃紫)

¹⁾ 着色程度を表す

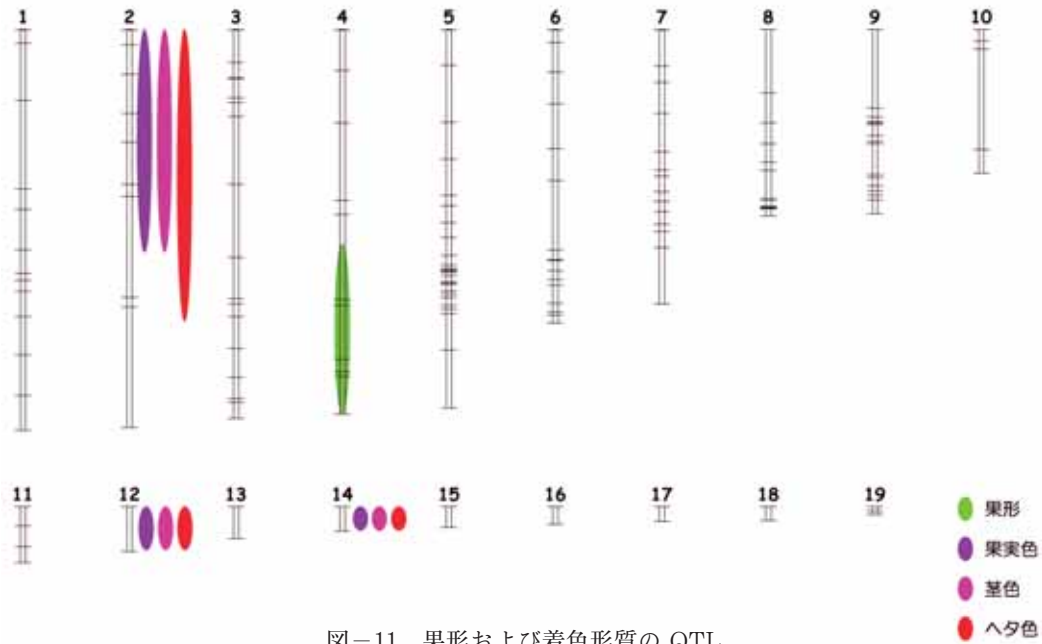


図-11 果形および着色形質の QTL

表-14 QTL の連鎖地図上の座乗位置

形質	座乗位置		Wilcoxon test		
	連鎖群	マーカー ¹⁾	LOD	寄与率	P
果形	4	eUBC242	7.8	21.4	<0.0001
	4	wAEM53a	8.6	31.1	<0.0001
果実色	2	eAEM64a	5.9	24.5	<0.001
	2	eAEM26b	6.0	30.2	<0.0001
茎色	2	eAEM64a	11.3	52.4	<0.0001
	2	eAEM26b	11.7	47.0	<0.0001
ヘタ色	2	eAEM64a	18.4	70.1	<0.0001
	2	eAEM26b	19.5	68.8	<0.0001

1) QTL 座にもっとも近接するマーカー

2) 結果

果形の表現型は、‘なす中間母本農1号’は中長形、‘WCGR112-8’は球形を示した。F₂集団の果実は、球形から中長形まで連続的に分布し、量的遺伝を示した。果形の QTL は第4連鎖群上に検出された。果形の QTL ピークにもっとも近接する eUBC242 および wAEM53a ではそれぞれ LOD 値が 7.8 および 8.6、寄与率が 21.4% および 31.1% であった (表-14, 図-10, 図-11, 図-12)。

‘なす中間母本農1号’は果実色、茎色、ヘタ色ともに濃紫色を示した。一方、‘WCGR112-8’は果実色、茎色、ヘタ色ともに緑色を示した。F₁個体は果実色および

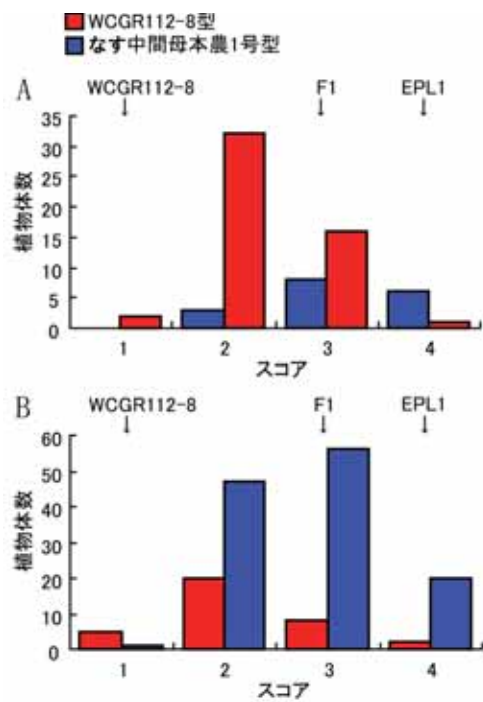


図-12 遺伝子型による果形の頻度分布

A : wAEM53a, B : eUBC242

1 : 球形, 2 : 卵形, 3 : 長卵形, 4 : 中長形

EPL1 : なす中間母本農1号

茎色は両親の中間を示し、不完全優性を示した。しかし、F₁植物のヘタ色は濃紫色を示し、優性を示した。F₂集団は果実色・茎色・ヘタ色ともに連続的に分布した。果実色・茎色・ヘタ色の着色形質はともに第2連鎖群、

第12連鎖群および第14連鎖群上にQTLが検出された(表-14, 図-11, 図-13). 着色形質におけるQTLの寄与率は, 果実色では30.2% (eAEM26b), 茎色では52.4% (eAEM64a), ヘタ色では70.1% (eAEM64a)だった. ヘタ色は遺伝様式が果実色や茎色と異なるにも関わらず, 上記以外のQTLは検出されなかった.

3) 考 察

ナスの果形に関連するQTLは第4連鎖群のみで検出された. ナスの果形におけるQTLの寄与率は, QTLピークに近接する2つのマーカーeUBC242とwAEM53aではそれぞれ21.4%, 31.1%であり, このQTLだけでは十分に説明できない可能性もある.

DOGANLARら(2002b)の解析では, ナスの果形は主要な2つのQTLにより支配されている. これはトマト果形の遺伝解析と矛盾していない. 本研究で検出された果形に関連するQTLはひとつであり, DOGANLARら(2002b)の解析結果と異なる. これは, 寄与率の低い多数の遺伝子座により果形が決定されているか, 解析に用いた系統が遺伝的に近縁であるために果形に関連するひとつの主要QTLのみが検出されているか, または本研究で作成した連鎖地図が十分に飽和していないために果形に関連する遺伝子座を検出できないためと考えられる. また, ここで用いた解析系統は両親ともに *S. melongena* であり, DOGANLARら(2002b)の用いた

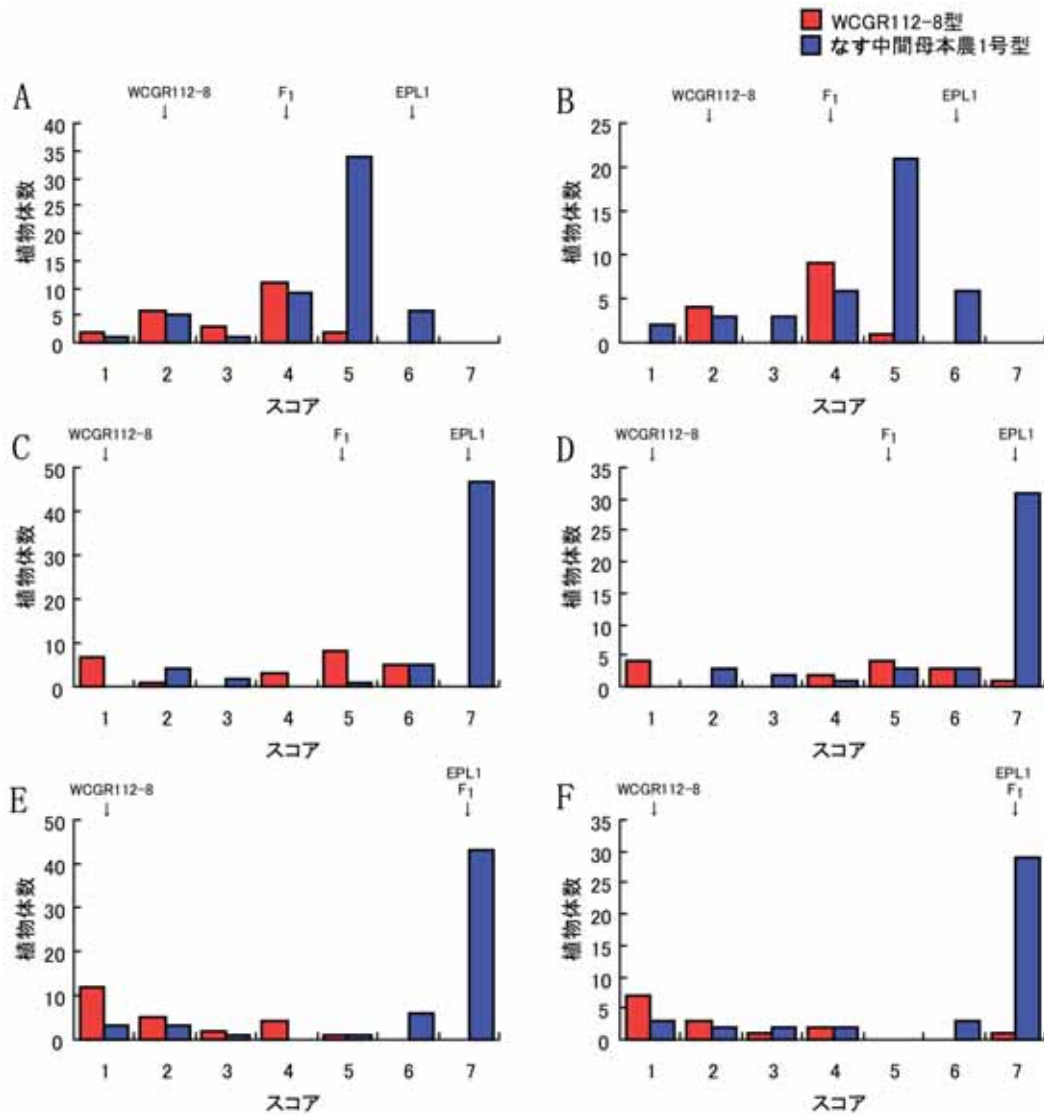


図-13 遺伝子型による着色形質の頻度分布
 A, B: 果実色, C, D: 茎色, E, F: ヘタ色
 A, C, E: eAEM26b
 B, D, F: eAEM64a
 EPL1: なす中間母本農1号

S. linnaeanum との種間交雑集団に比べて果形形質の差はそれほど大きくない。そのため、検出された QTL が少なかったとも考えられる。

着色形質の QTL は果実、莖、ヘタともに第2連鎖群、第12連鎖群、第14連鎖群上に座乗した(表-14, 図-11)。着色に関連する QTL は同じ領域に重なって存在しており、それぞれの QTL が密接に連鎖しているか、あるいは単一遺伝子座の多面発現と考えられる。QTL が近接して存在する場合、これを区別するためには大規模な集団を用いて解析し、密接に連鎖する遺伝子の組換えを検出する必要がある、解析は容易ではない。しかし、果実・莖・ヘタの着色形質はともに紫色のアントシアニン色素の蓄積により生じるので、同一遺伝子座の多面発現の可能性も考えられる。DOGANLARら(2002b)の解析においても、複数の組織のアントシアニン蓄積について QTL がクラスターを組んでおり、同一遺伝子座の多面発現と推定している。着色形質における QTL の寄与率は、果実色では 30.2% (eAEM26b)、莖色では 52.4% (eAEM64a)、ヘタ色では 70.1% (eAEM64a) だった。この QTL でヘタ色の形質の大部分を説明できると考えられるが、果実色の形質はこの QTL だけでは十分説明できない可能性がある。また、ヘタの着色形質は、果実および莖の着色形質と異なり F₁ 植物で優性に発現し、他の着色形質と遺伝様式が異なる。しかし、ヘタと果実および莖では異なる QTL は検出されなかった。これは連鎖地図が十分飽和しておらず、ヘタ色と連鎖する他の QTL が検出できなかったためか、または同一 QTL の多面発現によるためと考えられる。

栽培化に関連する果実重・果形・着色などの形質は、主要 QTL の多くがトマト・ジャガイモ・トウガラシ・ナスの間で保存されていることが示されている(DOGANLARら, 2002b)。これは比較的少数の遺伝子座によって栽培化に関連する形質が支配されていることを示している。トマトの果実形質と連鎖する遺伝子座の情報をナスに利用できれば、効率よく DNA マーカーを開発でき、育種へ利用することが可能となる。

着色形質および果形と連鎖する DNA マーカーの開発は、ナス育種においてマーカー支援選抜に有効である。開発されたマーカーによりナス育種の効率化が期待される。

IV 総合考察

DNA マーカーを用いて作成された分子連鎖地図は、遺伝研究や育種の状況を大きく変化させた。質的な遺伝

をする形質は連鎖地図を用いて遺伝子のクローニングを行うことが可能となり、量的形質などの複雑な遺伝をする形質は、連鎖地図が作成されてはじめて詳細な遺伝解析が可能となった。また、DNA マーカーを利用することにより育種効率は向上し、育種年限の短縮が可能となった。有用形質を導入する際に、連鎖する不良形質が問題となる。これまでは大規模な栽培を行い複数年にわたって選抜を行うことによりこの問題を克服してきた。しかし、DNA マーカーを用いれば形質評価を行うことなく不良形質を除去することが可能となる。さらに、幼苗期に選抜が可能となり、栽培規模を縮小できるだけでなく育種年限の短縮が可能となる。また、量的形質などの複雑な遺伝様式を示す形質については、関与する複数の遺伝子座を同定し、遺伝子座間の相互作用などについても詳細な解析が可能となる。

ナス科植物であるトマトやジャガイモ、トウガラシでは、伝統的な遺伝解析と詳細な連鎖地図の作成や質的および量的形質のマッピングなどの分子遺伝学的解析が精力的に行われている。しかし、ナスの遺伝解析情報は乏しく、DNA マーカー開発および連鎖地図の作成はこれまでほとんど行われていない。そこで本研究ではナスの DNA マーカーを開発し、連鎖地図を作成するとともに、主要形質の遺伝解析を行った。

DNA マーカーには多くの種類があり、それぞれに長所・短所がある。本研究では RAPD・AFLP・マイクロサテライト解析を行った。RAPD・AFLP 法では、迅速にそして容易に DNA マーカーを開発できるが、開発されたマーカーは主に優性に分離し、その再現性に若干の問題があった。そのため、実験を繰り返し再現性の高いマーカーを選抜する必要があった。また、RAPD・AFLP 解析では対象とする生物の塩基配列情報が得られないので、異なる解析集団への直接の適用はできない。しかし特定の染色体領域の高密度連鎖地図作成や DNA マーカーの整備されていない植物種において有用形質に連鎖する DNA マーカーを開発するためには有効な手法である。マイクロサテライトマーカーは、マーカー開発が容易ではないが、開発されたマーカーは共優性に分離し、再現性が高かった。また、対立遺伝子数が多く、変異に富んでいるので、多型を同定しやすい。さらに、ゲノム全体に均一に位置付けられ、公表されたプライマー配列は他の研究室でも利用しやすいなどの利点がある。

マイクロサテライトマーカーの開発は、3つの方法により行われている。1) 近縁種で開発されたマーカーの利用(PROVANら, 1996)、2) 塩基配列情報を利用して

の開発 (BELLら, 1994), 3) ライブラリーまたは繰り返し配列の濃縮されたライブラリーのスクリーニングである (POWELLら, 1996). 属間でのマイクロサテライトマーカーの利用は, 繰り返し配列周辺の変異が大きく困難である (SMULDERSら, 1997). ナス科植物であるトマトとジャガイモの間でのマイクロサテライトマーカーの相互利用は難しく (MILBOUNEら, 1998), また, トマトのマイクロサテライトマーカーをナスに利用することも困難だった (未発表データ). 塩基配列情報を用いたマイクロサテライト配列の検索は有効な手段であるが, 塩基配列情報の乏しい植物種ではこの方法を用いることはできない. ナスの塩基配列情報は, Genbank に 38 の塩基配列が登録されているが, これらの配列にはマイクロサテライト配列は見られなかった. マイクロサテライト配列の濃縮は, マイクロサテライトマーカーを開発するためには有効な手段であるが, 重複したクローンを高い確率で単離してしまうことがある (FISHERら, 1998; MBAら, 2001; RALLOら, 2000). 反対に, ライブラリーのスクリーニングによるマイクロサテライト配列の単離では, 重複したクローンは単離されにくい, 大量のマイクロサテライトを単離することは容易ではない.

ナス品種間の多型頻度は, RAPD 解析, AFLP 解析, マイクロサテライト解析ともに他の植物に比べて低かった. トマト品種間の RFLP 解析およびマイクロサテライト解析でも同様に多型頻度が低く (SMULDERSら, 1997), ピーマン品種間のマイクロサテライト解析においても多型頻度は低かった (未発表データ). よって, ナス科植物であるナス・トマト・ピーマンは他の植物種に比べて多型頻度が低い傾向があることが明らかとなった. しかし, ナス科植物であるジャガイモ品種間のマイクロサテライト解析では多型頻度は高く, これはジャガイモ品種が 4 倍体であるためと推測される (ASHKENAZIら, 2001). 同様にササゲ近交系間およびスイカ一代雑種交配親間でも多型頻度が低いことが報告されているが (HASHIZUMEら, 1993; MENÉNDEZら, 1997), 他殖性 *Brassica* 植物では多型頻度は高い (LANDRYら, 1992; TANHUANPÄÄら, 1995). なぜ植物種により多型頻度に大きな差が認められるのかは不明である.

マイクロサテライトマーカーの重要な特性は, 高い変異性を持ち, 共優性を示し対立遺伝子数が多いことから, RFLP などの他のマーカーと比べて情報量が多いことである. マイクロサテライトマーカー座の遺伝子多様度は一般的に哺乳類では 0.5 から 0.8, 植物では 0.5 から

0.9 と報告されている (ECHTら, 1996; RONGWENら, 1995; SONGら, 2002; TARAMINOら, 1996; WUら, 1993). ナスマイクロサテライトマーカーの遺伝子多様度は, 2 塩基繰り返し配列では, ナス品種間で 0.38, 近縁種間で 0.60, 3 塩基繰り返し配列では, ナス品種系統間で 0.31, 近縁種間で 0.32 であり, 遺伝子多様度が低かった. トマトでは, マイクロサテライトマーカー, RFLP および RAPD を用いた解析により, 品種間の多型頻度が低いことが報告されている (BROUNら, 1996; MILLERら, 1990; RUS-KORTEKAASら, 1993). ピーマンにおいても品種間でのマイクロサテライトマーカーの多型頻度は低かった (未発表データ). ナス科植物であるナス, トマト, ピーマンでは, ともに品種間の多型頻度が低い傾向が見られた. ナスおよびトマト品種間の多型頻度が低い原因は, 遺伝的バックグラウンドが狭いためと推測されるが, なぜナス科植物は他の植物に比べて多型性が低いのかは不明であり, 遺伝的・進化的に興味あるところである.

ナスのマイクロサテライトマーカーは高い再現性を示した. しかし, RAPD および AFLP マーカーのいくつかは再現性に乏しかった. RAPD および AFLP 解析による DNA マーカー開発は迅速かつ容易であるが, その利用が制限される. また, マイクロサテライトマーカーは主に共優性を示すのに対し, RAPD および AFLP マーカーは主に優性を示し, 情報量が少ない. これらの点からマイクロサテライトマーカーは有効であるが, マーカーの開発が RAPD 法や AFLP 法に比べ困難であるので, 解析の状況にあわせてそれぞれのマーカーを組み合わせることで解析することが最も良い選択であると考えられる.

トマトの単一コピーマーカーを用いた RFLP 解析によりナスの連鎖地図が作成され, ナスとトマトのゲノムシンテニーが示された (DOGANLARら, 2002a). ナス科植物であるジャガイモおよびトウガラシとトマトのシンテニーについてもすでに示されており, ナス科植物のゲノム進化も明らかになりつつある (LIVINGSTONEら, 1999; TANKSLEYら, 1992). また, 果実重や果形, 着色などの栽培化に関与する形質は, 極少数の遺伝子座に支配されており, ナス科植物間で保存されている (DOGANLARら, 2002b). 本研究では, ナスの果形形質ではひとつの QTL が, 果実・茎・ヘタの着色形質では 3 つの QTL が検出された. この結果は DOGANLARら (2002b) の結果と同様に栽培化に関与する形質は少数の遺伝子座に支配されていることを示している.

本研究で作成された連鎖地図は十分に飽和しておらず,

さらに詳細な解析が必要である。他の研究グループで得られた情報や他のナス科植物の情報を利用し、さらに詳細な連鎖地図を作成するとともに、重要形質の詳細な遺伝解析を行う必要がある。本研究で得られた情報によりナスの詳細な連鎖解析が行われることが期待される。

V 摘 要

分子連鎖地図は、あらゆる生命現象の遺伝的な研究に欠くことのできない基本情報である。しかし、ナスは主要ナス科植物であるトマト・ジャガイモ・トウガラシとの類似性が高いにもかかわらず、分子遺伝的情報が乏しく、DNA マーカーの開発および連鎖地図の作成の報告はわずかである。そこで本研究では、ナスのDNA マーカーの開発を行い、連鎖地図を作成するとともに主要形質との連鎖解析を行った。

RAPD 解析は、簡便な操作で迅速に多型を検出できる手法であり、分子遺伝的知見の蓄積に乏しいナスには適した解析法である。1,224 種類の 10mer および 12mer のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてナス系統間の多型を検索した。その結果、104 種類のプライマーによって 115 の多型が検出され、多型頻度は他の植物に比べて低かった。AFLP 解析は、一度に数多くの DNA 断片を解析でき、多型頻度の低いナスには適した解析法である。64 プライマー組み合わせについて多型を検索し、43 プライマー組み合わせで 104 の多型を検出した。RAPD 解析と同様、多型頻度は他の植物に比べて低く、ナス品種系統は遺伝的バックグラウンドが狭いと推測された。

マイクロサテライトは塩基を繰り返し単位とする反復配列であり、その繰り返し数が多型に富んでいるので、多型頻度の高いマーカーとなる。本研究では、ナスゲノムライブラリーを作成し、繰り返し配列をプローブとしてスクリーニングを行い、マイクロサテライト配列を単離した。マイクロサテライトの存在頻度は、2 塩基繰り返し配列はゲノムあたり 1.6×10^3 、3 塩基繰り返し配列は 3.2×10^4 と推定され、他の植物に比べ若干低かった。繰り返し数は、2 塩基繰り返し配列は 5 から 38 (平均 19.1)、3 塩基繰り返し配列は 3 から 22 (平均 5.2) だった。単離された 3 塩基繰り返し配列の 83.5% は、繰り返し数が 7 以下のマイクロサテライトだった。対立遺伝子数は、2 塩基繰り返し配列の方が多く、多型頻度が高かった。繰り返し数と多型頻度に相関は見られなかったが、繰り返し数が 7 以下のマイクロサテライトでは多型頻度が低く、3 塩基繰り返し配列の多型頻度が低かった

原因のひとつと推測される。単離された (GT)_n マイクロサテライトの 61% には (AT)_n マイクロサテライトが隣接しており、同様な構造のマイクロサテライトはトマト・ジャガイモ・トウガラシで報告されていることから、ナス科植物に特徴的であるものと推察された。

開発されたマーカーを用いて作成した連鎖地図は、19 連鎖群・全長 807.3cM・189 マーカーで構成された。RAPD マーカーはマーカー同士が密接に連鎖する領域が見られたが、AFLP およびマイクロサテライトマーカーは連鎖地図上全体に分布した。また、マイクロサテライトマーカーは高い再現性を示したが、RAPD および AFLP マーカーのいくつかは再現性が低かった。ナスの基本染色体数は 12 であり、作成した連鎖地図の連鎖群数と対応しておらず、連鎖地図はナス染色体全体をカバーしていない。解析に用いた系統が近縁であるために、連鎖地図がナス染色体全体をカバーできない可能性はあるが、マーカーをさらに開発し連鎖地図の高密度化を図る必要がある。

果実を支配する QTL は第 4 連鎖群に検出され、果実・茎・ヘタの着色を支配する QTL は第 2 連鎖群・第 12 連鎖群・第 14 連鎖群で検出された。着色形質はともに紫色のアントシアニン色素を蓄積するので、単一遺伝子の多面発現によりこれらの形質が制御されていると推測される。また、ヘタ色は果実色・茎色と異なる遺伝性を示すが、異なる QTL は検出できなかった。詳細な連鎖地図を作成し、さらに解析を行う必要がある。

以上要するに、本研究では本邦の主要野菜であるナスの分子遺伝マーカーを複数の手法を用いて開発し、その性状と多型頻度を解析するとともに、これを用いた連鎖地図を構築し、有用形質の量的遺伝子座の座乗位置を決定し、遺伝解析を行ったものである。

引用文献

- 1) AKKAYA, M. S., R. C. SHOEMAKER, J. E. SPECHT, A. A. BHAGWAT and P. B. CREGAN (1995): Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map. *Crop Sci.*, **35**, 1439-1445.
- 2) ALONSO-BLANCO, C., A. J. M. PEETERS, M. KORNEEF, C. LISTER, C. DEAN, N. VAN DEN BOSCH, J. POT and M. KUIPER (1998): Development of an AFLP based linkage map of *Ler*, *Col*, and *Cvi* *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a *Ler/Cvi* recombinant inbred line population. *Plant J.*, **14**, 259-271.
- 3) ARESHCHENKOVA, T. and M. W. GANAL (1999): Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. *Genome*, **42**, 536-544.
- 4) ARUMUGANATHAN, K. and E. D. EARLE (1991): Nuclear

- DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **9**, 211–215.
- 5) ASHKENAZI, V., E. CHANI, U. LAVI, D. LEVY, J. HILLEL and R. E. VEILLEUX (2001): Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. *Genome*, **44**, 50–62.
 - 6) BELL, C. J. and J. R. ECKER (1994): Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. *Genomics*, **19**, 137–144.
 - 7) BRADSHAW, J. E., C. A. HACKETT, R. C. MEYER, D. MILBOURNE, J. W. MCNICOL, M. S. PHILLIPS and R. WAUGH (1998): Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.*, **97**, 202–210.
 - 8) BRINKMANN, B., M. KLINTSCHAR, F. NEUHUBER, J. HUHNE and B. ROLF (1998): Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 1408–1415.
 - 9) BROUN, P. and S. D. TANKSLEY (1996): Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Mol. Gen. Genet.*, **250**, 39–49.
 - 10) CAO, G., E. SOFIC and R. L. PRIOR (1996): Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3426–3431.
 - 11) COLLONNIER, C., I. FOCK, V. KASHYAP, R. L. ROTINO, M. C. DAUNAY, Y. LIAN, I. K. MARISKA, M. V. RAJAM, A. SERVAES, G. DUCREUX and D. SIHACHAKR (2001): Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **65**, 91–107.
 - 12) CREGAN, P. B., A. A. BHAGWAT, M. S. AKKAYA and J. RONGWEN (1994): Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**, 49–61.
 - 13) DEBENER, T. and L. MATTIESCH (1999): Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, **99**, 891–899.
 - 14) DOGANLAR, S., A. FRARY, M.-C. DAUNAY, R. N. LESTER and S. D. TANKSLEY (2002a): A Comparative Genetic Linkage Map of Eggplant (*Solanum melongena*) and Its Implications for Genome Evolution in the Solanaceae. *Genetics*, **161**, 1697–1711.
 - 15) DOGANLAR, S., A. FRARY, M.-C. DAUNAY, R. N. LESTER and S. D. TANKSLEY (2002b): Conservation of Gene Function in the Solanaceae as Revealed by Comparative Mapping of Domestication Traits in Eggplant. *Genetics*, **161**, 1713–1726.
 - 16) ECHT, C. S., P. MAY-MARQUARDT, M. HSEIH and R. ZAHORCHAK (1996): Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome*, **39**, 1102–1108.
 - 17) EDWARDS, A., A. CIVITELLO, H. A. HAMMOND and C. T. CASKEY (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, **49**, 746–756.
 - 18) FAO (2000): Agricultural production data collection. (available from <http://apps.fao.org>.)
 - 19) FISHER, P. J., T. E. RICHARDSON and R. C. GARDNER (1998): Characteristics of single- and multi-copy microsatellites from *Pinus radiata*. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 969–979.
 - 20) FOOLAD, M. R., R. A. JONES and R. L. RODRIGUEZ (1993): RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Reports*, **12**, 293–297.
 - 21) FRARY A., NESBITT T. C., GRANDILLO S., KNAAP E., CONG B., LIU J., MELLER J., ELBER R., ALPERT K. B., TANKSLEY S.D. (2000): fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**, 85–88.
 - 22) GASTIER, J. M., J. C. PULIDO, S. SUNDEN, T. BRODY, K. H. BUETOW, J. C. MURRAY, J. L. WEBER, T. J. HUDSON, V. C. SHEFFIELD and G. M. DUYK (1995): Survey of trinucleotide repeats in the human genome: assessment of their utility as genetic markers. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1829–1836.
 - 23) GUPTA, P. K. and R. K. VARSHNEY (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, **113**, 163–185.
 - 24) HALWARD, T. M., H. T. STALKER, E. A. LARUE and G. KOCHERT (1991): Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. *Genome*, **34**, 1013–1020.
 - 25) 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). *Japan J. Breed.*, **43**, 367–375.
 - 26) HEARNE, C. M., S. GHOSH and J. A. TODD (1992): Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Theor. Appl. Genet.*, **8**, 288–294.
 - 27) HOSSAIN, K. G., H. KAWAI, M. HAYASHI, M. HOSHI, N. YAMANAKA and K. HARADA (2000): Characterization and identification of (CT)_n microsatellites in soybean using sheared genomic libraries. *DNA Res.*, **7**, 103–110.
 - 28) HÜTTEL, B., P. WINTER, K. WEISING, W. CHOUMANE, F. WEIGAND and G. KAHL (1999): Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Genome*, **42**, 210–217.
 - 29) ISSHIKI, S., T. UCHIYAMA, Y. TASHIRO and S. MIYAZAKI (1998): RFLP analysis of a PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum species*. *Euphytica*, **102**, 295–299.
 - 30) JONES, C., K. EDWARDS, M. CASTAGLIONE, M. WINFIELD, F. SALA, C. VAN DE WIEL, G. BREDEMELJER, B. VOSMAN, M. MATTES, A. DALY, R. BRETTSCHEIDER, P. BETTINI, M. BETTINI, E. MAESTRI, A. MALCEVSKI, N. MARMIROLI, R. AERT, G. VOLCKAERT, J. RUEDA, R. LINACERO, A. VAZQUEZ and A. KARP (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, **3**, 381–390.
 - 31) KALLOO, G. (1988): Vegetable breeding. Vol III. CRC press, Florida.
 - 32) KALLOO, G. (1993): Eggplant. In: Kallo G, Bergh B (eds), Genetic improvement of vegetable crop. Pergamon press, Oxford.
 - 33) KARIHALOO, J. L., S. BRAUNER and L. D. GOTTLIEB (1995): Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 767–770.

- 34) KAYAMORI, F. and K. IGARASHI (1994): Effects of dietary nasunin on the serum cholesterol level in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 570–571.
- 35) KHAN, R. (1979): *Solanum melongena* and its ancestral forms. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds), *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, pp. 629–636. Academic Press, London.
- 36) KONIECZYN, A. and F. AUSUBEL (1993): A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* **4**: 403–410.
- 37) KOSAMBI, D. (1944): The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.*, **12**, 172–175.
- 38) LAGERCRANTZ, U., H. ELLEGREN and L. ANDERSSON (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.*, **21**, 1111–1115.
- 39) LANDER, E., P. GREEN, J. ABRAHAMSON, A. BARLOW, M. DALY, S. LINCOLN and L. NEWBURG (1987): MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, **1**, 174–181.
- 40) LANDRY, B. S., N. HUBERT, R. CRETE, M. S. CHANG, S. E. LINCOLN and T. ETOH (1992): A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome*, **35**, 409–420.
- 41) LINCOLN, S. and E. LANDER (1992): Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics*, **14**, 604–610.
- 42) LIVINGSTONE, K. D., V. K. LACKNEY, J. R. BLAETH, R. V. WIJK and M. K. JAHN (1999): Genome Mapping in *Capsicum* and the Evolution of Genome Structure in the Solanaceae. *Genetics*, **152**, 1183–1202.
- 43) LORIDON, K., B. COURNOYER, C. GOUBELY, A. DEPEIGES and G. PICARD (1998): Length polymorphism and allele structure of trinucleotide microsatellites in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.*, **97**, 591–604.
- 44) MBA, R. E. C., P. STEPHENSON, K. EDWARDS, S. MELZER, J. NKUMBIRA, U. GULLBERG, K. APEL, M. GALE, J. TOHME and M. FREGENE (2001): Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor. Appl. Genet.*, **102**, 21–31.
- 45) MCCOUCH, S. R., X. CHEN, O. PANAUD, S. TEMNYKH, Y. XU, Y. G. CHO, N. HUANG, T. ISHII and M. BLAIR (1997): Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 89–99.
- 46) MENÉNDEZ, C. M., A. E. HALL and P. GEPTS (1997): A genetic linkage map of cowpea (*Vigna unguiculata*) developed from a cross between two inbred, domesticated lines. *Theor. Appl. Genet.*, **95**, 1210–1217.
- 47) MILBOUNE, D., R. C. MEYER, A. J. COLLINS, L. D. RAMSAY, C. GEBHARDT and R. WAUGH (1998): Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Mol. Gen. Genet.*, **259**, 233–245.
- 48) MILLER, J. C. and S. D. TANKSLEY (1990): RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.*, **80**, 437–448.
- 49) MURRAY, M. G. and W. F. THOMPSON (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4321–4325.
- 50) NAGY, I., A. POLLEY and M. GANAL (1998): Development and characterization of microsatellite markers in pepper. Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding on *Capsicum* and eggplant, pp. 235–237.
- 51) NEI, M. (1987): Genetic variation within species. In: Nei M (ed), *Molecular Evolutionary Genetics*, pp. 176–207. Columbia University Press, New York.
- 52) NILSSON, N. - O., C. HALLDEN, M. HANSEN, A. HJERDIN and T. SALL (1997): Comparing the distribution of RAPD and RFLP markers in a high density linkage map of sugar beet. *Genome*, **40**, 644–651.
- 53) OLMSTEAD, R. G. and J. D. PALMER (1997): Implications for the phylogeny, classification, and biogeography of *Solanum* from cpDNA restriction site variation. *Systematic Botany*, **22**, 19–29.
- 54) PARAN, I. and R. MITCHELMORE (1993): Development of reliable PCR-based markers linked downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, **85**, 985–993.
- 55) PEARCE, K. and R. N. LESTER (1979): Chemotaxonomy of the cultivated eggplant - a new look at the taxonomic relationships of *Solanum melongena* L. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds), *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, pp. 605–614. Academic Press, London.
- 56) POWELL, W., G. C. MACHRAY and J. PROVAN (1996): Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, **1**, 215–222.
- 57) POWELL, W., M. MORGANTE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY and A. RAFALSKI (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.*, **2**, 225–238.
- 58) PRINCE, J. P., E. POCHARD and S. D. TANKSLEY (1993): Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*, **36**, 404–417.
- 59) PROVAN, J., W. POWELL and R. WAUGH (1996): Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 1078–1084.
- 60) RALLO, P., G. DORADO and A. MARTIN (2000): Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.*, **101**, 984–989.
- 61) RÖDER, M. S., V. KORZUN, K. WENDEHAKE, J. PLASCHKE, M. -H. TIXIER, P. LEROY and M. W. GANAL (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics*, **149**, 2007–2023.
- 62) RONGWEN, J., M. S. AKKAYA, A. A. BHAGWAT, U. LAVI and P. B. CREGAN (1995): The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.*, **90**, 43–48.
- 63) ROZEN, S. and H. J. SKALETSKY (1998): Primer3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.
- 64) RUS-KORTEKAAS, W., M. J. M. SMULDERS, P. ARENS and B. VOSMAN (1993): Direct comparison of levels of genetic

- variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, **37**, 375–381.
- 65) SAKATA, Y. and R. LESTER (1997): Chloroplast DNA diversity in brinjal eggplant (*Solanum melongena* L.) and related species. *Euphytica*, **97**, 295–301.
- 66) SAMBROOK J. and D. W. RUSSELL (2001): Molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 67) SHEFFIELD, V. C., J. L. WEBER, K. H. BUETOW, J. C. MURRAY, D. A. EVEN, K. WILES, J. M. GASTIER, J. C. PULIDO, C. YANDAVA, S. SUNDEN, G. MATTES, T. BUSINGA, A. MCCLAIN, J. BECK, T. SCHERPIER, J. GILLIAM, J. ZHONG and G. M. DUYK (1995): A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 1837–1844.
- 68) SMULDERS, M. J. M., G. BREDEMEIJER, W. RUSKORTEKAAS, P. ARENS and B. VOSMAN (1997): Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.*, **94**, 264–272.
- 69) SONG, Q. J., E. W. FICKUS and P. B. CREGAN (2002): Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 286–293.
- 70) STAUB, J., F. SERQUEN and M. GUPTA (1996): Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience*, **31**, 729–740.
- 71) SUWABE, K., H. IKETANI, T. NUNOME, T. KAGE and M. HIRAI (2001): Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 1092–1098.
- 72) TACHIBANA, S. (1994): Eggplant. In: Konishi K, Iwahori S, Kitagawa H, Yakuwa T (eds), Horticulture in Japan., pp. 63–66. Asakura Publishing Co., Ltd., Tokyo.
- 73) TANHUANPÄÄ, P. K., J. P. VIKKI and H. J. VIKKI (1995): Identification of a RAPD marker for palmitic-acid concentration in the seed oil of spring turnip rape (*Brassica rapa* spp. *oleifera*). *Theor. Appl. Genet.*, **91**, 477–480.
- 74) TANKSLEY, S. D., M. W. GANAL, J. P. PRINCE, M. C. DE VICENTE, M. W. BONIERBALE, P. BROUN, T. M. FULTON, J. J. GIOVANNONI, S. GRANDILLO, G. B. MARTIN, R. MESSEGUER, J. C. MILLER, L. MILLER, A. H. PATERSON, O. PINEDA, M. S. RÖDER, R. A. WING, W. WU and N. D. YOUNG (1992): High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, **132**, 1141–1160.
- 75) TARAMINO, G. and S. TINGEY (1996): Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*, **39**, 277–287.
- 76) THOMAS, C., P. VOS, M. ZABEAU, D. JONES, K. NORCOTT, B. CHADWICK and J. JONES (1995): Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Plant J.*, **8**, 785–794.
- 77) VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER and M. ZABEAU (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4407–4414.
- 78) WANG, Z., J. L. WEBER, G. ZHONG and S. D. TANKSLEY (1994): Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 1–6.
- 79) VAN DE WIEL, C., P. ARENS and B. VOSMAN (1999): Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome*, **42**, 139–149.
- 80) WILLIAMS, J. G., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI and S. V. TINGEY (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6531–6535.
- 81) WU, K.-S. and S. D. TANKSLEY (1993): Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 225–235.
- 82) XU, X., M. PENG and Z. FANG (2000): The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics*, **24**, 396–399.
- 83) YANO, M., Y. KATAYOSE, M. ASHIKARI, U. YAMANOUCHI, I. MONNA, T. FUSE, T. BABA, K. YAMAMOTO, Y. UMEHARA, Y. NAGAMURA and T. SASAKI (2000): Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* **12**, 2473–2484.
- 84) ZHU, J. H., P. STEPHENSON, D. A. LAURIE, W. LI, D. TANG and M. D. GALE (1999): Towards rice genome scanning by map-based AFLP fingerprinting. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 184–195.

Studies on the Development of DNA Markers and the Genetics of Several Traits in Eggplant

Tsukasa NUNOME

Summary

Molecular markers are recognized as useful tools for breeding, genotype identification, and studies on genome organization and evolution. The advent of DNA-based markers has dramatically facilitated the mapping of several plant genomes in the last decade. Linkages between molecular markers and genes controlling valuable agronomic traits accelerate the introgression of these traits via marker-assisted selection (MAS). A detailed linkage analysis can be used as a first step towards saturation of the target region for positional cloning.

Eggplant (*Solanum melongena* L.), also known as aubergine or brinjal, is a member of the Solanaceae, and is an important vegetable in the world. Among the Solanaceous vegetables, development of molecular markers and construction of genetic linkage maps have already been reported in tomato, pepper and potato. In spite of the worldwide importance of eggplant, few studies have been made of these subjects for this crop.

Several DNA marker systems have been developed. RAPD (random amplified polymorphic DNA) technology became popular because of its simplicity and ease of use in contrast to RFLP (restriction fragment length polymorphism) technology that is time-consuming and labor-intensive. AFLP (amplified fragment length polymorphism) was recently developed as a new DNA marker system combining the advantages of RFLP and PCR. This technique has proven to be efficient in generating a large number of genetic markers in a single experiment.

In this study, 1,224 random primers were screened by RAPD analysis for polymorphisms between eggplant lines, 'EPL1' and 'WCGR112-8'. Of them, 104 primers revealed polymorphisms with 115 polymorphic fragments in total. In AFLP analysis, 43 of the 64 AFLP primer combinations used detected 104 fragments showing polymorphisms between 'EPL1' and 'WCGR112-8'. The frequencies of detected polymorphisms in RAPD and AFLP analyses were lower than those reported in other plant species.

Microsatellites (simple sequence repeats or SSR) consist of short stretches of DNA tandemly repeated several times. The repeat number of microsatellites has been found to be highly variable within and between species. Because of their high mutation rate, the microsatellites display the highest polymorphic information content (PIC) among the molecular markers. In the present study, a genomic library of eggplant was screened for dinucleotide and trinucleotide repeats to isolate microsatellite clones. It was estimated that microsatellites occurred every 3200 kb for GA repeats and every 820 kb for GT repeats in the eggplant genome. The number of microsatellites was

estimated at 1.6×10^3 for dinucleotide repeats and 3.2×10^4 for trinucleotide repeats. These frequencies of repeat in eggplant were lower than those reported in other plant species. The repeat number ranged from 5 to 38 (av. 19.1) for dinucleotide repeats, and from 3 to 22 (av. 5.2) for trinucleotide repeats. A total of 83.5% of identified trinucleotide microsatellites showed seven or less repeat units. For dinucleotide microsatellites, the number of alleles and the frequency of detected polymorphisms were higher than those for trinucleotide microsatellites. There was no correlation between the number of alleles per locus and the number of repeats in the microsatellites. Sixty-one percent of GT repeats were found to directly flank AT repeats. A similar complex structure of microsatellites have been reported in tomato, pepper and potato, being distinctive of Solanaceous species.

Using the RAPD, AFLP, and microsatellite markers developed in the present study, a genetic linkage map was constructed on a F_2 population derived from a cross between 'EPL1' and 'WCGR 112-8'. The linkage map consisted of 19 linkage groups (LGs) with 189 markers, spanning 807.3 cM in total. While some RAPD loci showed a tendency to link closely with each other, AFLP and microsatellite loci were distributed throughout the linkage map. The observed number of LGs did not correspond to the expected number of 12 LGs for a comprehensive linkage map of eggplant ($2n=24$). A common ancestry of the parental lines may exist and give a genetically identical chromosome section. It is necessary to develop more molecular markers and to saturate the linkage map.

A major QTL that governs fruit shape was located on the LG 4, and some QTLs that govern color development in fruits, stem, and calyx were located on LG 2, LG 12, and LG 14. The apparent clustering of QTLs for the color development observed might be the pleiotropic effect of a single QTL, because color development in fruit, stem and calyx is dependent on the accumulation of purple-colored anthocyanin pigments. No other QTLs were detected although the calyx color development showed a different mode of inheritance from fruit and stem color development. It was again indicated that development of more molecular markers is needed to saturate the linkage map.

In this study, RAPD, AFLP and microsatellite markers on eggplant were developed and analyzed for polymorphisms between two eggplant lines, 'EPL1' and 'WCGR112-8'. Polymorphisms of the microsatellite markers were also analyzed among nine additional accessions of eggplant and 11 accessions of 10 related species. The linkage map was constructed with the developed molecular markers. Some agronomic valuable traits were analyzed genetically with the molecular markers and some QTLs that governed the traits were detected and located on the linkage map.