

(千葉大学学位申請論文)

イタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* Lam.)における
耐倒伏性関連形質に連鎖する DNA マーカーに関する研究

2006年 1月

井上 真以子

目次

摘要	1
Abstract	4
謝辞	7
緒論	8
第1部 RFLP 及びその他のマーカーによる高密度連鎖地図の作成及び RFLP マーカーの STS 化	11
緒言	
第1章 RFLP 及びその他のマーカーによる高密度連鎖地図の作成	
1.1 材料及び方法	18
1.1.1 植物材料	
1.1.2 イタリアンライグラスゲノミックライブラリーの構築	
1.1.3 RFLP 解析	
1.1.4 AFLP 解析	
1.1.5 TAS マーカー解析	
1.1.6 結果の記録及び連鎖解析	
1.2 結果	22
1.2.1 イタリアンライグラスゲノミックライブラリーの特徴	

1.2.2	RFLP マーカーの多型	
1.2.3	AFLP 解析	
1.2.4	TAS マーカー解析	
1.2.5	分離の歪みについて	
1.2.6	高密度連鎖地図の作成	
1.2.7	イタリアンライグラスの連鎖群とコムギの同祖群の保存された シンテニー	
1.3	考察	35
1.3.1	ゲノミックプローブの作出効率	
1.3.2	TAS マーカーの位置	
1.3.3	マップサイズ	
1.3.4	他のイタリアンライグラスやペレニアルライグラスの地図との 比較	
1.3.5	イタリアンライグラスとコムギとのシンテニー	

第2章 RFLP マーカーの STS 化

2.1	材料及び方法	39
2.1.1	植物材料	
2.1.2	RFLP プローブのシーケンシング	
2.1.3	データベース検索	
2.1.4	プライマー組合せの設計	
2.1.5	PCR 及びゲル電気泳動の条件	
2.2	結果	42
2.2.1	RFLP シークエンスの特徴	

2.2.2	BLAST 検索	
2.2.3	STS マーカー及び SSR マーカーの開発	
2.2.4	イタリアンライグラス STS プライマーの他の近縁種への応用 及びイタリアンライグラス品種内での多型調査	
2.3	考察	54
2.3.1	遺伝子の同定	
2.3.2	イタリアンライグラスとイネ間のシンテニー	
2.3.3	イタリアンライグラス STS マーカーの近縁種への応用	
2.3.4	RFLP マーカーからの SSR マーカーの作出	
2.3.5	品種内での多型検出	

第2部	耐倒伏性関連形質の QTL 解析及び作成したマーカーによる幼苗選抜の 試み	58
-----	--	----

緒言

第1章 耐倒伏性関連形質の QTL 解析

1.1	材料及び方法	62
1.1.1	植物材料	
1.1.2	形質データの収集	
1.1.3	データ解析	
1.2	結果及び考察	66
1.2.1	形質の分布と相関	
1.2.2	QTL 解析	
1.2.3	耐倒伏性と草丈の相関関係	

1.2.4 本研究結果と他の作物における耐倒伏性関連 QTL との比較

第 2 章 作成したマーカーによる幼苗選抜の試み

2.1 材料及び方法 77

2.1.1 植物材料

2.1.2 TAS、AFLP 解析

2.1.3 使用したマーカー及びマーカーの有意性の判定

2.1.4 圃場における選抜法

2.2 結果及び考察 81

2.2.1 マーカーの再現性試験

2.2.2 マーカーの有用性試験

2.2.3 形質の遺伝率と MAS の効果について

総合考察 87

引用文献 89

摘要

イタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* Lam.) ($2n = 2x = 14$)は日本で最も重要な短年性の寒地型牧草の 1 つである。また耐倒伏性は機械による収穫や良質安定性の面でも重要な形質である。耐倒伏性は量的形質であるため環境及び年次によって形質の発現が変わる可能性がある。耐倒伏性を持つイタリアンライグラスを作出するためには交配及び選抜時に分子マーカ―を利用することで耐倒伏性形質を正確かつ短期間で選抜することが重要である。しかしながらイタリアンライグラスは他殖性でゲノムサイズも大きいことから分子レベルでの研究はあまりなされていない。そこで本研究でははじめに 3 種類の分子マーカ―を用いて高密度連鎖地図を作成し、得られた RFLP マーカ―を PCR ベースにするために STS 化を行った。その後特性調査の結果から耐倒伏性に関する形質についての QTL 解析を行い、特定された DNA マーカ―を用いて幼苗選抜を試みた。以下にその結果を要約する。

1. two-way pseudo-testcross F_1 集団 82 個体を用いてイタリアンライグラスのゲノミックライブラリーから作製された RFLP マーカ―(IRG#)及びエンバクのアンカ―マーカ―(CDO#)のほかに AFLP、TAS (Telomeric Repeat Associated Sequence)マーカ―による計 385 マーカ―から成る高密度連鎖地図を作成した。連鎖地図は LOD 値 9.0 のレベルで主な 7 つの連鎖群から成り、全長 1244.4 cM、マーカ―間の平均距離は 3.7 cM である。この連鎖地図を用いて他のイタリアンライグラス連鎖地図と比較した上でペレニアルライグラス、コムギとのシンテニーを確認した。

2. RFLP マーカー93 個について STS 化を試みるためシーケンスを行った。これら得られたシーケンスに対して BLAST 検索を行ったところ 16 クローンで何らかの遺伝子と相同性が見られた。次に 95 クローン(2 つの SSR を含む)についてプライマーを設計し、PCR を行ったところ 1 つの SSR を含む合計 67 クローンで増幅が確認された。イタリアンライグラスの少なくとも 1 品種内で増幅の見られた 62 クローンのうち 25 クローンで品種内の多型が検出された。

3. 上記の解析集団を用いて形質調査及び QTL 解析を行った。調査した形質は草丈、稈の重さ、稈径、折損抵抗性、分けつ数、押し倒し抵抗性、出穂日、評点による倒伏評価である。その結果、評点による倒伏評価を除くすべての形質は正規分布を示し、それらの形質間においても相関が見られた。QTL 解析は CP (cross-pollination) アルゴリズム(LOD 値 3.0)及び BC₁ アルゴリズム(LOD 値 1.9)にてインターバルマッピング及びシングルポイントでの解析を行った。その結果、CP アルゴリズムのインターバルマッピングにおいて合計 17 の領域について QTL が検出された。また評点による倒伏評価の QTL は全連鎖群で検出された。

4. QTL 解析で得られた 2 つのマーカーを用いて幼苗選抜を試みた。使用したマーカーは LG5 に座乗している tp3d21 (寄与率 37%) 及び LG6 に座乗している AAC-CGT14 (寄与率 25.8%) である。再現性を確認するために地図作成に利用した集団の残り 123 個体について試験したところ、tp3d21 のみ 1%の有意水準で有意差が確認された。また実際の耐倒伏性育種材料を用いた選抜において表現型のみで選ばれた 49 個体について tp3d21 によるマーカー解析を試みたところ、23 個体は tp3d21 によって耐倒伏性であると判定された。その後 49

個体からさらに表現型による選抜を重ね、選ばれた 30 個体のうち 15 個体はマーカーにより耐倒伏性であると判定された。最初に判定した 23 個体のうち 15 個体(65%)は最終的に表現型でも選抜されたという結果が得られた。

キーワード： イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.)、高密度連鎖地図、RFLP、シンテニー、STS 化、耐倒伏性、QTL 解析、マーカー利用選抜

Abstract

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) ($2n = 2x = 14$) is one of the most important cool-season forage grasses. Lodging damage reduces both harvested yield and forage quality. Therefore, lodging resistance is one of the most important targets in Italian ryegrass breeding. Lodging resistance is a complex, quantitatively inherited character and it was also easily influenced by environmental factors, and the expression of lodging resistance probably varies when cultivated at different locations and years. To breed lodging resistant Italian ryegrass, it will be possible to select rapidly and correctly lodging resistant individuals at parent-screening and individual selection using molecular markers closely linked to lodging resistance. However, there are only a few studies at the molecular level in Italian ryegrass, due to its specific characteristics of out-crossing and big genome size. In the present study, at first, a high-density linkage map was constructed using three kinds of molecular markers, and the RFLP markers derived from Italian ryegrass genomic library were converted to STS markers. Secondly, putative QTLs for lodging resistance and related traits were detected using a pseudo-testcross F_1 population and marker assisted selection (MAS) was performed. The main results are as follows.

1. A high-density linkage map was constructed using a total of 385 markers including Italian ryegrass genomic RFLP markers (IRG#), oat anchor markers (CDO#), AFLP and TAS (Telomeric Repeat Associated

Sequence) markers in a two-way pseudo-testcross F_1 population consisting of 82 individuals. The map consisted of seven major linkage groups at LOD 9.0 and covered 1244.4 cM of total map length, with the average of 3.7 cM between the markers. The synteny was identified between Italian ryegrass and perennial ryegrass and wheat, and our linkage map was compared with another Italian ryegrass linkage map.

2. To convert RFLP markers of Italian ryegrass to STS markers, 93 previously mapped single or low-copy RFLP probes were end-sequenced. The results of BLAST search showed that 16 clones matched to the sequences reported in rice and other plants. STS primers were designed for 95 clones including two SSR clones, and 67 primer pairs including one SSR primer amplified single bands with the expected sizes. Twenty-five out of 62 clones were detected to have polymorphisms within the cultivars.

3. QTL analysis was performed using the F_1 population mentioned above. The traits measured were plant height, culm weight, culm diameter, culm strength, tiller number, culm pushing resistance, heading date and lodging score. As a result, all traits except for lodging score showed nearly normal distribution and were correlated with each other. Putative QTLs were detected in both of CP at $LOD > 3.0$ and BC_1 at $LOD > 1.9$ algorithm, using interval mapping method and single point analysis method of MapQTL, respectively. A total of 17 QTLs were detected using interval mapping of CP algorithm. QTLs for lodging score were detected in all linkage groups.

4. Two markers, tp3d21 on LG5 and AAC-CGT14 on LG6 were found to be tightly linked to the major QTLs for culm pushing resistance, and these two QTLs accounted for 37% and 25.8% of total variation, respectively. To confirm the reproducibility of the correlation between the QTLs and the selected markers, other 123 individuals, which were not used in QTL analysis, of the F₁ population were evaluated. However, a significant correlation was found only between tp3d21 and lodging resistance at the 0.01 probability level. In addition, the tp3d21 genotypes of 49 individuals selected from actual breeding material for lodging resistance were analyzed. The results showed that 23 out of 49 individuals had lodging resistance genotype of tp3d21. After three times of phenotypic selections, 30 individuals were finally selected, and 15 individuals of them were found to have the lodging resistance genotype of tp3d21. The selection-rate of MAS by tp3d21 was 15/23 (65%).

Key words: Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), linkage map, RFLP, synteny, STS, lodging resistance, QTL analysis, marker assisted selection

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始適切な御指導を賜り、本論文の校閲の労をお執り下さいました千葉大学園芸学部木庭卓人教授に慎んで感謝の意を表します。また千葉大学園芸学部三位正洋教授、長田嘉穂教授、中村郁郎助教授には本論文の校閲の労をお執り頂き、多くの御助言、御指導を頂きました。心より感謝いたします。また学位申請にあたり本論文の校閲の労をお執り頂き、暖かい御指導、御助言、激励を頂きました千葉大学園芸学部原田久也教授に心から感謝致します。また本研究の遂行及び学位申請にあたりご支援下さった社団法人日本草地畜産種子協会に深く感謝いたします。また、本研究全般にわたり懇切なご助言、御指導、および終始激励を頂きました同協会飼料作物研究所杉信賢一所长、同佐藤信之助前所长に深甚の謝意を表します。そして研究計画から実験、考察全般の細部にわたり格別の便宜と御指導を頂きました同才宏偉博士に満腔の謝意を表します。また、本研究を行うにあたり有益なご助言と御援助を頂いた同研究所の諸氏に心から感謝いたします。

独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所飼料作物開発部杉田紳一部長、山梨県酪農試験場藤森雅博研究管理幹、コーネル大学 S. R. McCouch 博士、社団法人日本草地畜産種子協会飼料作物研究所佐々木亨博士には供試材料の一部を快く御分譲頂きました。ここに記して感謝の意を表します。また、論文投稿にあたり多くの貴重なご助言、御指導を頂きました国立遺伝学研究所森島啓子名誉教授に心から感謝の意を表します。

最後に、本研究は日本中央競馬会の助成金により遂行されたことをここに記して深く感謝の意を表します。

緒論

現在 BSE（牛海綿状脳症）の発生に伴い食の安全性はもとより家畜飼料の安全性への意識も高まりつつある。近い将来家畜飼料に対してもトレーサビリティ（履歴管理）が求められるかもしれない。しかしながら我が国の飼料の自給率は低く、約 75 %を外国からの輸入に頼っている。昨今の安全性意識の高まりを考えるならば家畜並びにその飼料までも国内生産に変えていくことが望まれる。このため牧草類や長大型飼料作物（主にトウモロコシやソルガム）の栽培面積の拡大、そのためのより進んだ育種は今後の重要な課題であると考えられる。

イタリアンライグラス（*Lolium multiflorum* Lam.）（ $2n = 2x = 14$ ）は、我が国で最も多く栽培されているイネ科寒地型牧草の 1 つである。イタリアンライグラスは Festuceae 族 *Lolium* 属に分類され、同じ属内には他にペレニアルライグラス（*Lolium perenne* L.）などがある。国内における栽培範囲は東北から沖縄までと広く分布しており、飼料用としてだけでなく多年生芝草との混播にも利用されている。国内でイタリアンライグラスの育種が始まったのは 1955 年からである。以来、それぞれの栽培地域、栽培目的に合った育種が行われてきた。育種目標としては多収性、採種性、耐病虫性、耐倒伏性、不良環境に対するストレス耐性など多岐にわたっており、現在までに数多くの品種が育成されている。中でも耐倒伏性は機械での収穫ロスの低減、多雨条件下での株枯れ防止、また採種性の向上に関連する最も重要な形質として認識されている。しかしながら倒伏は風雨などの環境の影響を受けやすく、また病虫害の発生等により圃場での表現型のみで選抜するのは困難である。また倒伏は茎の強さ、稈の太さ、草丈、一穂粒数等の複数の要因から影響を受けるため環境要因に左

右されない安定した選抜法が望まれている。

最近では遺伝子地図の充実及び DNA マーカー技術の向上に伴い、育種における選抜には DNA マーカーが利用されるようになった。このマーカー利用選抜 (Marker assisted selection; MAS) は圃場での表現型による選抜に比べ、栽培年次の環境影響を受けることなく目的の形質についてのみ選抜することが可能である。またマーカーの解析は少量の DNA があれば可能であるため、植物体の成長を待つことなく幼苗の時点でサンプリングし、結果を得ることが出来る。このことから MAS は育種期間を短縮し、環境など他の影響を受けることなく選抜することが出来る有用な手段であるといえる。MAS での選抜には寄与率の高いマーカーを使用することが望ましい。そのため開発したマーカーが目的形質に緊密に連鎖していることが重要である。しかしながら形質によっては遺伝子型と表現型とを明確に対応づけることは出来ないものもある。

形質には表現型が不連続でその差異を定性的に表すことが出来る「質的形質」と表現型が連続的で計数值または計量値で表される「量的形質」がある。現在、ゲノム分野での研究の発展に伴い、今まで統計的にしか解析出来なかった量的形質も遺伝子座の単位で解析できるようになった。耐倒伏性を含め量的形質は質的形質と違って環境に左右される。量的形質には複数の遺伝子が関与しているといわれているが、QTL (quantitative trait loci) 解析により量的形質に関与する個々の遺伝子座の位置や遺伝効果を推定することが可能となり、品種改良事業にとって大きな技術革新となった。

QTL 解析には連鎖地図と表現型の調査結果が必要である。しかしながら現在イタリアンライグラスの高密度連鎖地図は発表されていない。その原因の 1 つはイタリアンライグラスが他殖性であることが挙げられる。他殖性植物ではイネ、ムギなどの自殖性植物と違って基本的に遺伝子座はヘテロで、また遺伝子

の分離パターンが多く、解析が困難であること、また遺伝的に複雑なため他殖性専用の解析ソフトが無いこと、また他殖性では近交度が高まると生存力や生活力が弱まる近交弱勢(inbreeding depression)の現象が見られることが挙げられる。他の原因としてはゲノムサイズが大きい(1 C = 2000 Mb) (Hutchinson ら 1979) こと、また作物の重要性の問題が挙げられる。自殖性作物は重要性が高く、研究が進んでいるが、比較的利用価値の低い飼料作物などの他殖性作物に関してはあまり研究がなされていないのは事実である。しかしながら文頭で述べたように飼料作物の自給率向上を目指すには、他殖性作物のゲノムレベルでの研究は今後重要な課題となってくるであろう。

このため本研究でははじめに QTL 解析を行うための連鎖地図の作成を行った。また本研究で得た連鎖地図の情報を、イギリス諸島やヨーロッパ、アメリカ合衆国、オーストラリア、ニュージーランドで栽培されているイタリアンライグラスの近縁種であるペレニアルライグラス、同じイネ科牧草のメドウフェスク (*Festuca pratensis* Huds.)、トールフェスク (*Festuca arundinacea* Schreb.)、イネ科作物のコムギへの応用についても述べた。

第 1 部ではイタリアンライグラスの連鎖地図の作成及びペレニアルライグラスの地図との比較と、それらとコムギとのシンテニー、またゲノミッククローンの STS 化、及び作成したイタリアンライグラスの STS マーカーのペレニアルライグラス、メドウフェスク、トールフェスクへの応用について述べた。第 2 部ではイタリアンライグラスにおける耐倒伏性関連形質の QTL 解析及びコムギの耐倒伏性関連形質の QTL 領域との比較について、また特定された耐倒伏性関連 DNA マーカーを利用した幼苗選抜の試みについて述べた。

本研究は今後耐倒伏性品種の育成を進める際により早くて正確な選抜を可能にするための DNA マーカーを開発することを目的として行った。

第1部 RFLP 及びその他のマーカーによる高密度連鎖地図の作成及び RFLP マーカーの STS 化

緒言

近年、いくつかの主要作物について連鎖地図が作成されている。連鎖地図とは遺伝子座同士の連鎖の強さからそれらの位置を線状に表したものである。連鎖地図の利用法は様々であるが、例えばある主要作物について品種改良しようとするとき、目的の形質に関連する遺伝子そのものを単離しなくてもその遺伝子に強く連鎖しているマーカーを使用して選抜することで育種に応用することが出来る。またその連鎖地図は育種のみならず他の植物との比較によるシンテニー(synteny)研究や進化の解明にも利用することが出来る。シンテニーとは異種間で複数の遺伝子が同順序で連鎖した染色体構造が認められることである。このような比較マッピングは種の進化を解明するために重要な情報である。

連鎖地図を作成する際、それぞれの目的に合った解析材料を作成することが重要である。種類としては F_2 (交配後の自殖 2 代目)、DH (doubled haploid 倍加半数体)、BC (戻し交配) 等いくつかある。しかしながら他殖性の場合、自殖性と違って近交度が高まると生存力や生活力が弱まる近交弱勢が起こるために F_2 、DH、BC 等の集団は利用できない場合が多い。このため樹木や多くの飼料用牧草のような他殖性植物の連鎖地図の作成には pseudo-testcross (Ritterら 1990 ; Grattapaglia と Sederoff 1994) が利用される。この方法では血縁関係がない 2 つのヘテロ個体を掛け合わせた F_1 集団を使用する。また自殖の場合と違って最初にデータ中の母親ホモ×父親ヘテロのマーカー、母親ヘテロ×父親ホモのマーカーについて解析し、それぞれの親毎の地図が作成される。これ

ら両親由来の 2 つの地図は RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) や SSR (Simple Sequence Repeat) のような共優性のマーカーを用いることで母親ヘテロ×父親ヘテロのマーカー座を位置づけることで統合することが出来る。近年、ペレニアルライグラス ($2n = 2x = 14$) において AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)、RFLP、SSR を含む多くの分子マーカーが開発され、連鎖地図が発表されている (Hayward ら 1998 ; Bert ら 1999 ; Forster ら 2001 ; Jones ら 2001, 2002a, b ; Armstead ら 2002)。

AFLP は 4 塩基認識と 6 塩基認識の制限酵素の組合せにより得た断片の切断部位に、20 塩基程度のアダプターを結合させ、PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応の鋳型とし、このアダプターの 3'末端に任意の塩基を 1~3 個付加した配列をプライマーとして PCR で得られる多型である。得られた多型の大多数は有る無しの優性遺伝を示す。AFLP 技術は実験の難易度としては中程度のレベルであり、しかも早急に数多くの多型の見られる遺伝子座を検出できる。その結果として、連鎖地図の作成やマーカーの開発に幅広く使われるようになった (Simons ら 1997)。例えばペレニアルライグラスでは 463 マーカーを含む高密度 AFLP 連鎖地図が作成された (Bert ら 1999)。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) は無作為配列プライマーにより PCR 増幅される DNA 断片中に偶然検出される多型であり、得られた多型はほとんどが優性である。また操作は簡単迅速で、コストも低い。DNA サンプルは極少量で足りる。ランダムプライマーを用いるため、解析対象の生物の塩基配列情報を必要としない。しかしながら RAPD 法では多型は検出しやすいが再現性が低いため、得られたマーカーはアンカー(anchor)として利用できない。また通常 RAPD 多型は片方の親のみでバンドが見られ、もう片方の親では見られないことからその F_2 に関しては優性ホモ型とヘテロ型の区別がつかず、分離

比は 3:1 になってしまう。このため組換え価推定における情報量は少ない。

RFLP（制限酵素断片長多型）は制限酵素の特異的切断個所の相違により断片長に生じる差異（多型）を、断片に共通して結合するプローブによるサザンハイブリダイゼーションで検出する。RFLP マーカーはほとんどが共優性であり、RAPD や AFLP マーカーと違ってその地図の情報はマッピング集団が変わっても応用し易いという利点がある (Beckmann と Soller 1986; Helentjaris 1987)。RFLP 解析には大量のゲノム DNA を必要とし、労力、時間、コストの面でも決して効率が良いとは言えないが、有用な RFLP 連鎖地図はゲノムの構造解析 (Berhan ら 1993) や DNA マーカーを使ったインサイチュールハイブリダイゼーションによるある特定の染色体の物理地図の作成 (Werner ら 1992; Wanous と Gustafson 1995) やマーカー選抜による作物の農業特性の向上などに役立つ。また近縁種との RFLP 比較マッピングは植物ゲノムの進化の過程における重要な知見の供給源にも成り得る (Ahn と Tanksley 1993; Huang と Kochert 1994)。Van Deynze ら (1998) はイネ科植物における RFLP マーカーセットをスクリーニングし、それらはその後のゲノムマッピング比較においてとても有用なツールとなっている。いくつかの主要作物では、これら RFLP マーカーセットを利用した詳細な連鎖地図が作成されている。飼料用の牧草種の中ではペレニアルライグラスやメドウフェスク、トールフェスクの RFLP 地図が作成された (Xu ら 1995; Chen ら 1998; Hayward ら 1998; Armstead ら 2002; Jones ら 2002a; Alm ら 2003)。

SSR は 2-6 塩基(モチーフ)の繰り返し配列回数の違いによる多型で、得られたマーカーは共優性である。多型は得られやすく、1 遺伝子座あたりの対立遺伝子数が多い。また、SSRs は染色体上に広く散在しているためゲノム全体にわたる解析ができ、実験技術としては PCR 法を用いるため容易に分析が出来る等、利

点が多い。

テロメアリピート(TR)は動物や高等植物において高く保存されている繰り返し配列である (Biessmann と Manson 総説 1994)。モデル双子葉植物である *Arabidopsis thaliana* L. の TR “TTTAGGG” はイネ (*Oryza sativa* L.) やトマト (*Lycopersicon esculentum* L.) 等の高等植物で保存されている。また TR を含む近傍のシークエンスは TASs (telomeric repeat associated sequences) と呼ばれ、TAS マーカーは染色体の末端に座乗することが報告されている (Shen と Zhu 1998)。Mao ら (1997) はコムギの TAS に相補的なプライマーとテロメアリピート特異的なプライマーとの組合せによってコムギの TAS の PCR ベースでのマッピングを行った。また Shen と Zhu (1998) は RM-PCR (RAPD promoter mediated asymmetric PCR) 法によってイネの 7 本の染色体の末端部位に 11 個の TAS マーカーをマッピングした。このような染色体の末端に座乗した TAS マーカーによって作成した地図のゲノムカバー率を推測することが出来る。RFLP ベースの地図のゲノムカバー率を把握しておくことは QTL 解析をする上で重要なことである (Paterson ら 1988)。イタリアンライグラスやペレニアルライグラスに関しては細胞遺伝学としての遺伝資源である異数体や B-A translocation や染色体の置換系統などが存在しないため連鎖群と染色体の対応や染色体の短腕と長腕の識別等が出来ず、ゲノムカバー率を推定するための情報が少ない。このためイタリアンライグラスにおいて TAS マーカーのマッピングをすることは連鎖地図の完成度や染色体上の位置についての何らかの情報を得られる可能性がある。

連鎖地図の長さは M(モルガン)単位で表される。これは遺伝的距離を表す単位で、「2つの座位間で起きる交差の回数の期待値」と定義される。1 M は 1 回の減数分裂において 1 回の交差が期待できる距離を表し、1 cM は 1/ 100 M であ

る。しかしながらマーカーによる連鎖解析では最初にマーカー間の「組換え割合」をもとにグルーピングされる。これらを地図にするときに「組換え割合」から「遺伝的距離」に変換する必要がある。そこで地図関数を利用する。地図関数にはいくつか(Haldane や Kosambi)ある。本研究では交差の事象が互いに独立であると仮定したときに使用する Haldane (Haldane 1919)の地図関数を使用した。

主要作物においては様々な種類のマーカーが開発されゲノム研究が進んでいる。それに比べてイタリアンライグラスにおいては分子レベルでの研究はほとんどされていない。これはおそらくイタリアンライグラスのゲノムサイズが比較的大きいことや経済的利用価値の低さも関係していると思われる。現在までに Hayward ら (1998) によりペレニアルライグラス×イタリアンライグラスのハイブリットを利用した連鎖地図が作成され、著者らは結果的に得られた連鎖群のほとんどがイタリアンライグラス由来の多型によるものであると推定している。またイタリアンライグラスやペレニアルライグラス及びその近縁種であるメドウフェスクの連鎖地図は AFLP、RAPD、SSR マーカー及びイネ科のアンカープローブが主になっており (Hayward ら 1998 ; Bert ら 1999 ; Hirata ら 2000 ; Forster ら 2001 ; Jones ら 2001, 2002a, b ; Armstead ら 2002 ; Alm ら 2003)、一方トールフェスクの連鎖地図ではゲノミックプローブの RFLP マーカーが主になっている (Xu ら 1995 ; Chen ら 1998)。

そこで本研究の第 1 章では (i) RFLP、AFLP、TAS マーカーによるイタリアンライグラスの連鎖地図の作成 (ii) イタリアンライグラス、ペレニアルライグラス(PRG)、コムギとの比較マッピングについて報告する。また本研究ではイネ科のアンカープローブを使用することで草種を越えた利用可能な情報、また作成した地図と別のイタリアンライグラス解析集団の地図との比較について

も考察した。

遺伝子の発見や STS (Sequence Tagged Site)、SSR マーカーの開発には cDNA の EST (Expressed Sequence Tag) のシークエンスを利用することが多い。EST とは cDNA ライブラリーから無作為に選んだ多数のクローンの 5'あるいは 3'末端から、一度の配列分析で決定できる数百塩基の情報を収集したもので、任意の組織や時期に発現している遺伝子の部分構造についての情報が得られる。しかしながらゲノミックの RFLP マーカーをシークエンスしても同様な結果が得られる。Van Deynae ら (1998) はイネ、エンバク、オオムギの 152 個のアンカープローブのシークエンスを調査し、そのうち 119 個 (78%) は他の生物体において以前に特徴付けされた遺伝子もしくは推定遺伝子と有意に相似であることを明らかにし、Murray ら (2002) は以前マップされたインゲンマメのゲノミッククローン 79 個を調査し、そのうち 59 個 (75%) は他の植物特に *Arabidopsis thaliana* の遺伝子と相同であり、Schlose ら (2002) もソルガムのゲノミックプローブシークエンスの約 56%が GenBank 内のシークエンスにヒットしたと報告している。

STS とはゲノミックもしくは EST シークエンスから設計されたアレル特異的プライマーを使って増幅された短いユニークゲノミックシークエンスであり、通常はその PCR プライマーセットを指す。このプライマーを用いれば、必ずゲノム中の特定の個所の DNA が再現性よく増幅される。RFLP マーカーを STS マーカーに変換することで PCR ベース化され、より経済的で大量のサンプルを低労力で処理できるという点で有利であり、また遺伝地図を物理地図に変換するのにとても重要なツールとなる (Olson ら 1989)。現在、イネ (Inoue ら 1994)、オオムギ (Blake et al. 1996)、Cryptomeria (Tsumura ら 1997) においてスタンダード STS ランドマーカーが作成されている。

そこで第 2 章では 1)連鎖地図に座乗したゲノミック由来のイタリアンライグラス RFLP マーカーのシークエンスから遺伝子を明らかにする、2) 93 個のイタリアンライグラス RFLP マーカーを STS マーカーもしくは SSR マーカーに変換する、3) イタリアンライグラスの STS プライマーが他の近縁種であるペレニアルライグラス、メドウフェスク、トールフェスクへの応用が可能かどうか試験することを目的として行った。

第1章 RFLP 及びその他のマーカーによる高密度連鎖地図の作成

1.1 材料及び方法

1.1.1 植物材料

ゲノミックライブラリーの構築にはイタリアンライグラスの市販品種“ニオウダチ”からランダムに選んだ1個体からDNAを抽出し、供試した。

連鎖地図の作成には“ニオウダチ”と同じくイタリアンライグラス品種“新潟早生”からそれぞれ1個体ずつを単交配し、得られたF₁集団（以下、NN集団と略す）、82個体を供試した。これら“ニオウダチ”と“新潟早生”の種子は佐々木亨博士（日本草地畜産種子協会飼料作物研究所）より提供していただいた。

また、連鎖地図の比較をするために杉田紳一氏（独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構畜産草地研究所）により作成された細胞質雄性不稔解析集団128個体を供試した。

1.1.2 イタリアンライグラスゲノミックライブラリーの構築

ゲノミックライブラリーはタカラバイオ株式会社により構築された。DNA3 μ gをメチレーションに感受性である制限酵素 *Pst*I で消化し、ChromaSpin-400（クロンテック）により0.5~3.5kbサイズの断片を分画し、pUC118プラスミドベクターに連結した後、大腸菌JM109へ形質転換した。イタリアンライグラスのインサートを含んだプラスミドの入っているコロニーの選別はX-GalとIPTGを含む培地を用いて行った。それぞれのコロニーを拾い、Sambrookら（1989）の方法に従ってプラスミドDNAを抽出した。それらをRFLP解析の

プローブとして使用するために M13M4 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') 及び M13RV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') プライマーを使用し、PCR を行った。その後増幅産物をマイクロコン-50 (ミリポア) により精製し、プローブとした。なお、得られたゲノミッククローンには通し番号 (IRG#) をつけた。これらの番号は連鎖地図上にある RFLP マーカーの番号としても使用している。

1.1.3 RFLP 解析

McCouch ら (1988) の方法に従い、2000 年に飼料作物研究所 (栃木県西那須野町) にて育成された NN 集団の葉片から DNA を抽出し、制限酵素で消化後、泳動、ブロッティングを行った。

はじめに NN 集団の親とその F₁ 個体 4 つを用いてプローブの 1 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングのための制限酵素は 4 種類 (*Hind*III、*Eco*R V、*Dra*I、*Bgl*II) 使用した。1 次スクリーニングで両親の間に多型が見られた制限酵素について F₁ 集団の連鎖解析を行った。ハイブリダイゼーションは ECL system (アマシャム) を用いて行った。多型解析にはイタリアンライグラスゲノミックプローブのほかに McCouch SR 博士 (Cornell University) より提供していただいたイネ (RZ#)、オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) (BCD#)、エンバク (*Avena sativa* L.) (CDO#) のイネ科 cDNA アンカープローブを使用した。

1.1.4 AFLP 解析

AFLP 解析は *Pst*I/*Mse*I (+3、+3) の酵素組合せを使用し、Vos ら (1995) と Myburg ら (2001) の方法に従って行った。また *Pst*I プライマーは IRD700 及び IRD800 (ライカ) で蛍光標識されたものを使用した。AFLP 産物は 6%ア

クリルアミドゲルを使用し Long Readir 4200 ライカシーケンサー（ライカ）によって解析された。

1.1.5 TAS マーカー解析

TAS マーカー解析は Shen と Zhu (1998) の方法に従って行った。使用したプライマー組合せは TP1/D2、TP1/D30、TP1/K12、TP3/D2、TP3/D30、TP4/D2、TP4/D30 である。その TP プライマーの塩基配列は TP1, 5'-(CCCTAAA)₂(A/G/T)(A/G)T-3'、TP3, 5'-(CCCTAAA)₂CCCT(A/T)AAAG-3'、TP4, 5'-(CCCTAAA)₂CCCT(A/T)AAT-3' である。これらは IRD800 でエンドラベルされている。また使用したランダムプライマーのシーケンスは D2, 5'-GGACCCAACC-3' と K12, 5'-TGGCCCTCAC-3' (Operon Technologies) 及び D30, 5'-GAGACTACCGAA-3' (ニッポンジーン) である。

1.1.6 結果の記録及び連鎖解析

マーカーデータは JoinMap 3.0 (Stam 1993) の定義に従って記録した。AFLP 及び TAS マーカーについては遺伝子座の分離タイプに応じて <lm×ll>、<nn×np>、<hk×hk> の 3 タイプで記録した。分離タイプの <lm×ll> は母親のみでヘテロ、<nn×np> は父親のみでヘテロ、<hk×hk> は両親共にヘテロの遺伝子座を示している。RFLP マーカーに関しては上記 3 タイプの他に <ab×cd> (両親共にヘテロの遺伝子座で且つ 4 つの対立遺伝子)、<ef×eg> (両親共にヘテロの遺伝子座で且つ 3 つの対立遺伝子) の 2 つのタイプについても記録した。1 つのプロープについて複数のバンド (band) が検出され、遺伝子座の判別が困難であるときは複数のバンドをそれぞれの親からの 1 つ 1 つの優性遺伝子座とした分離タイプ <lm×ll>、<nn×np>、<hk×hk> で記録した。

遺伝的距離と組換え割合の関係を表す数種の地図関数のうち本研究では Haldane の地図関数を用い、CP (cross-pollination) アルゴリズムにて JoinMap 3.0 を用いて連鎖地図を作成した。また連鎖地図は MapChart 2.0 (Voorrips 2002) によって作成した。

1.2 結果

1.2.1 イタリアンライグラスゲノミックライブラリーの特徴

イタリアンライグラスのゲノミックライブラリーから 472 個のコロニーを拾った。その後抽出したプラスミドについてユニバーサルプライマーを用いた PCR を行った。その結果、323 個で PCR 産物がシングルバンドであることを確認した。これらすべてを多型解析に使用した。その結果、シングル及び低コピーのハイブリダイゼーションパターンが見られたクローンは 239 個 (74%) であった (Fig. 1)。また、繰り返し配列を含んでいると思われるスミアのパターンが 37 クローン (11%)、かなり強いシグナルが見られるが 4 つすべての制限酵素で消化しても多型が見られないオルガネラと思われるクローンが 47 個 (15%) であった。

1.2.2 RFLP マーカーの多型

シングル及び低コピーのハイブリダイゼーションパターンが得られた 239 個のイタリアンライグラスプローブを用いて NN F₁ 集団の連鎖解析を行った。そのうち 102 個のプローブで多型が見られ、合計 209 個の遺伝子座が検出された。分離比 1:1:1:1 (分離タイプ ab×cd または ef×eg) もしくは 1:2:1 (分離タイプ hk×hk) の共優性マーカーは 40 個であった (Table 1)。解析の結果、合計 161 マーカーが全 7 連鎖群上にマップされた (Fig.2)。

また、67 個のイネ科アンカープローブ (主にエンバクの cDNA) についても NN F₁ 集団で連鎖解析を行った。エンバク cDNA のプローブ 61 個のうち 29 個で多型が見られた。またイネ及びオオムギの cDNA アンカープローブについてはハイブリダイゼーションのシグナルが著しく弱かったため解析には使用しな

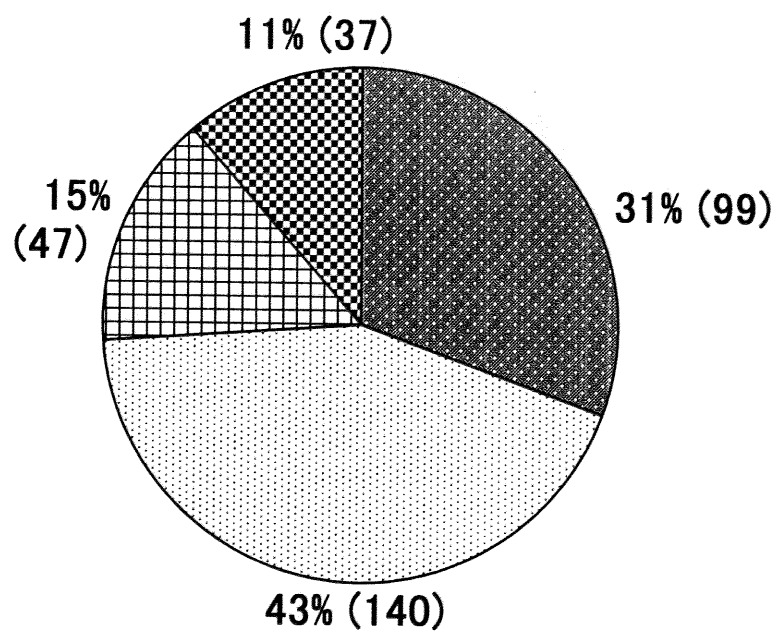


Fig. 1. Characteristic of Italian ryegrass *Pst*I genomic library. The number of the clones were showing in the parenthesis.

■ : single copy ▨ : low-copies ▩ : repeat sequence
 ▤ : source from organelles

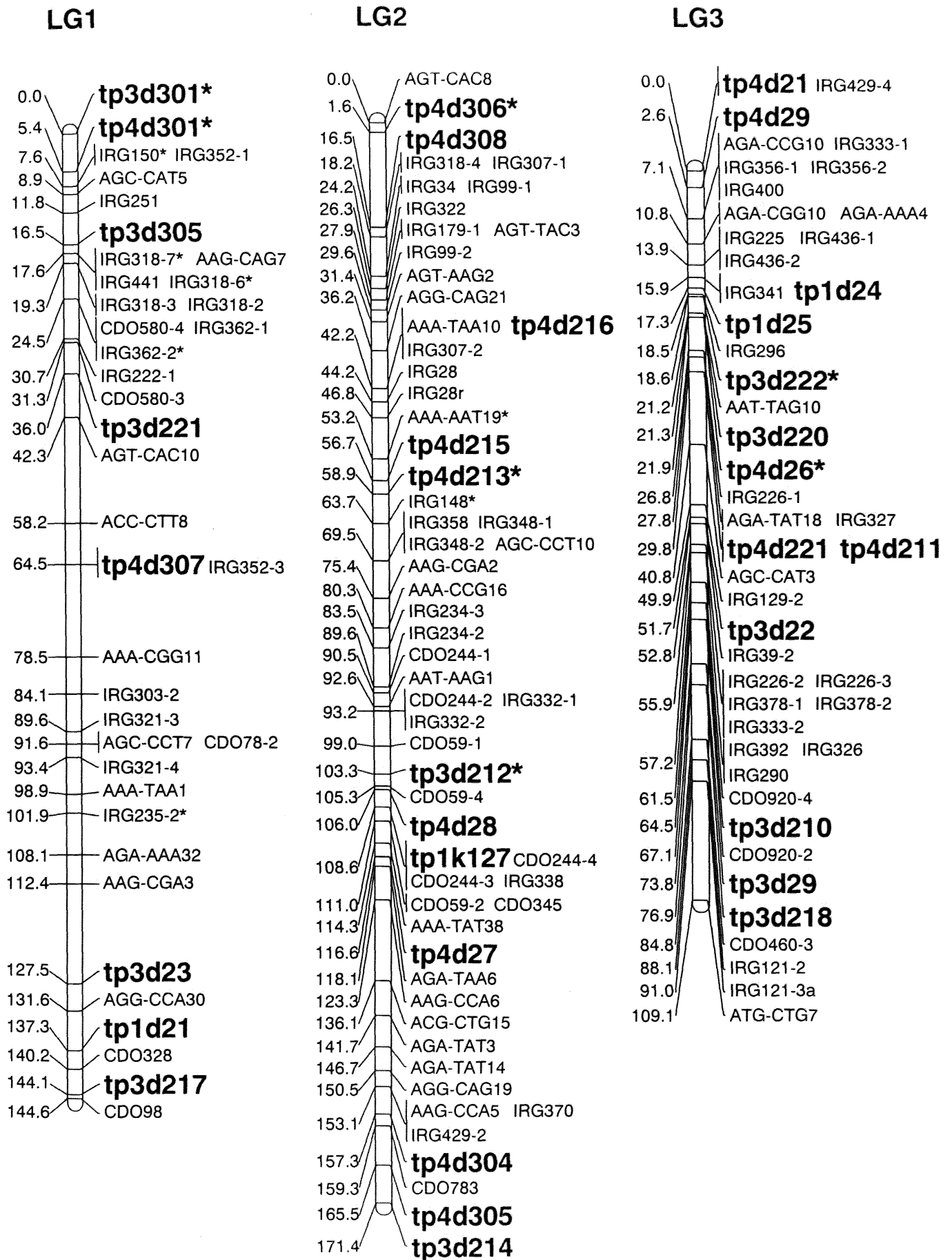
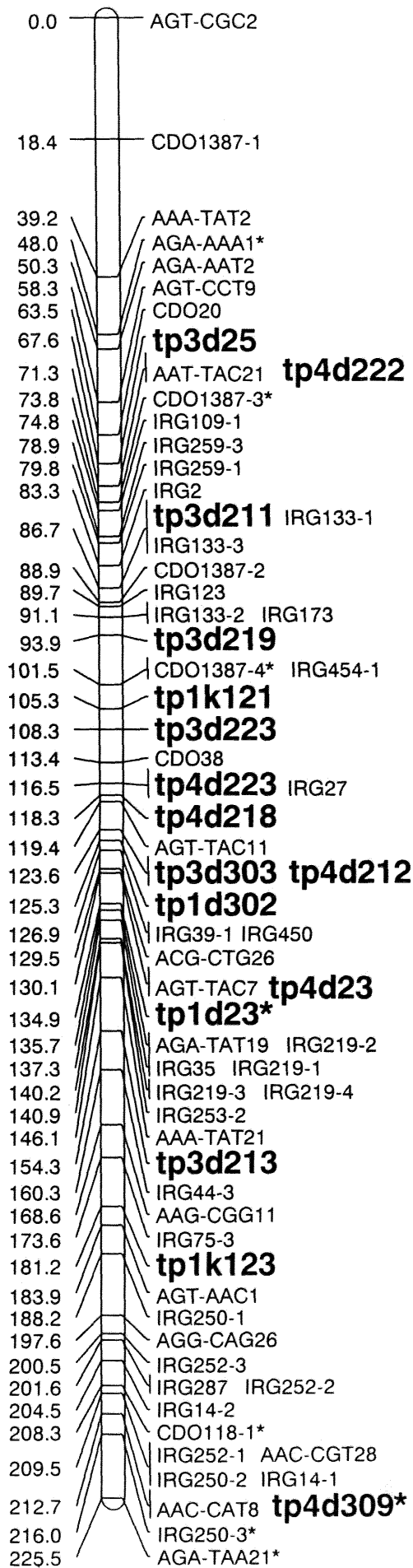
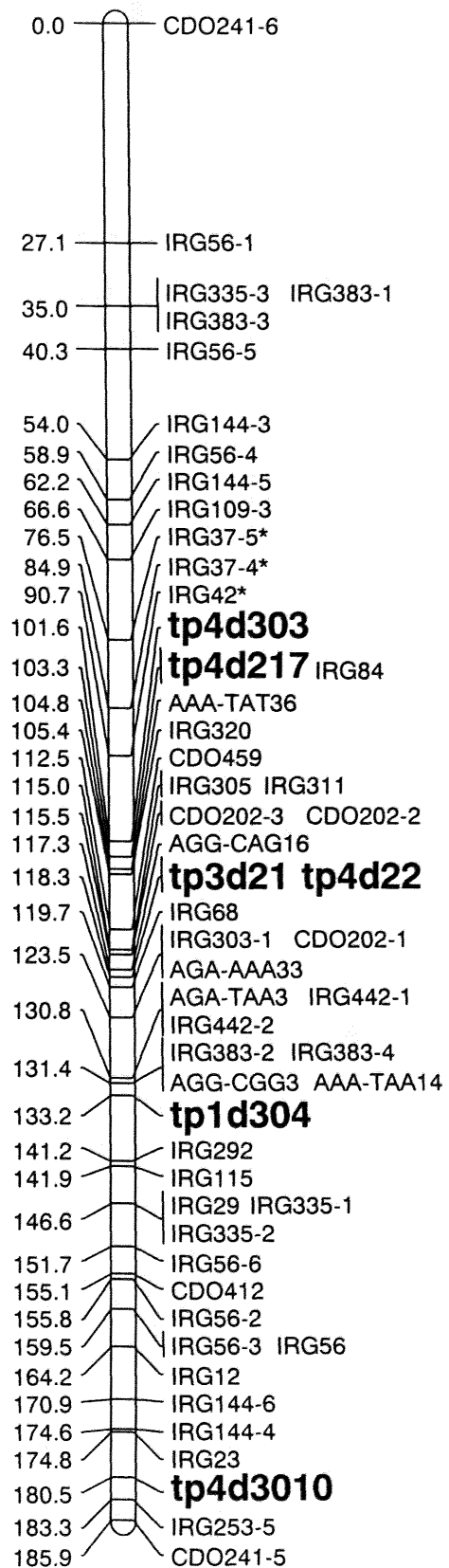


Fig. 2. Linkage map of the Italian ryegrass (IRG) 'Nioudachi' × 'Nigatawase' (NN) population. Linkage groups are represented as vertical lines, with their numbers indicated at the top and the names of the markers on the right. Distances (cM) between markers are shown on the left. IRG genomic RFLP loci, oat anchor marker loci, and telomeric repeat associated sequence (TAS) markers are indicated as IRGx, CDOx, and tpx (shown in bold), respectively; the others correspond to AFLP markers. The markers with an asterisk were those showing significant segregation distortion ($p < 0.01$).

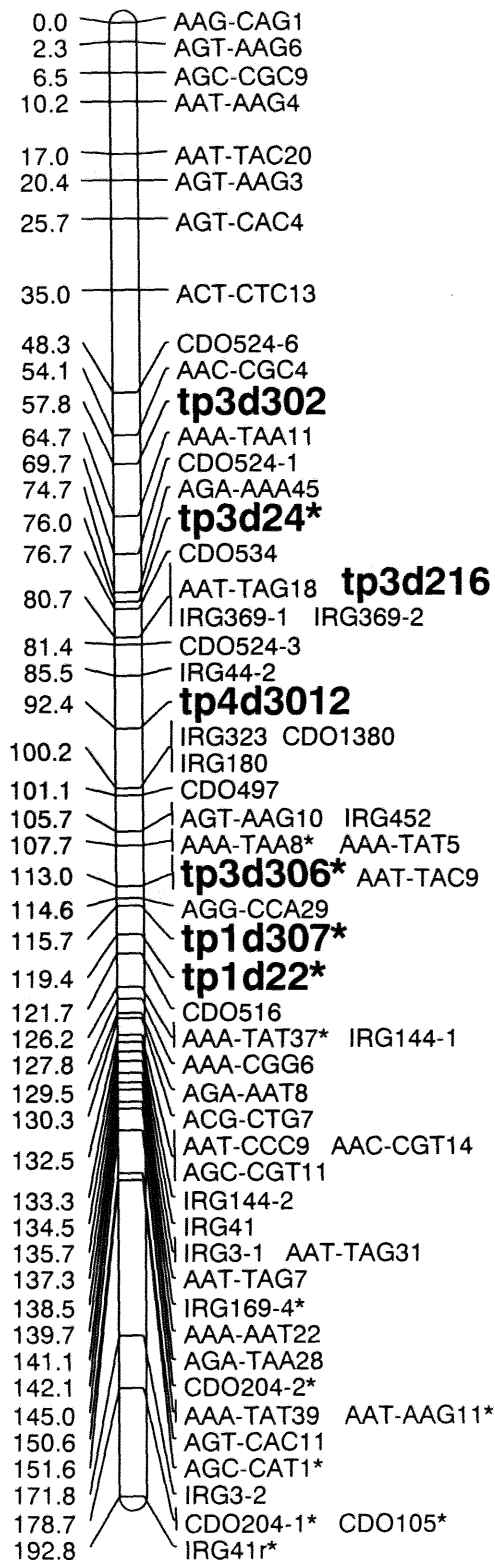
LG4



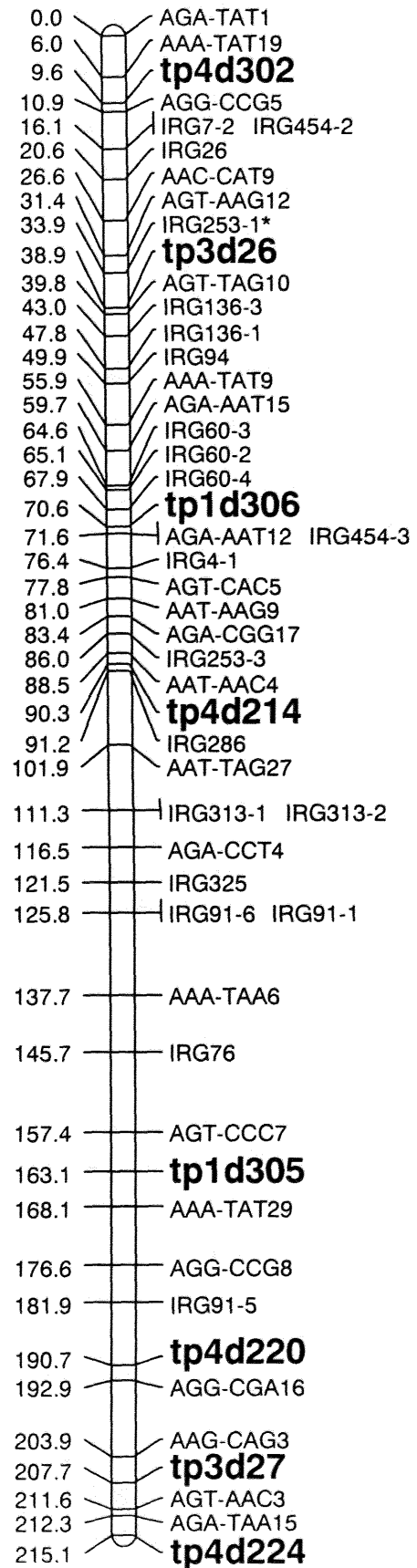
LG5



LG6



LG7



かった。多型の見られた 29 プローブから 65 遺伝子座が検出され、そのうち 9 個は共優性のマーカーであり、合計 41 マーカーが連鎖群 (LG) 7 を除く 6 つの連鎖群上にマップされた (Table 1, Fig.2)。

Table 1. The number of RFLP marker loci showing various segregation ratios in the Italian ryegrass Nioudachi × Nigatawase F₁ population.

Source of probe (No. of probes)	Segregation ratios and types ^a						Total		
	1:1:1:1		1:2:1		1:1			3:1	
	ab x cd	ef x eg	hk x hk	lm x ll	nn x np	hk x hk			
IRG probe (102)	16	22	2	52	99	18	209		
Anchor probe (29)	3	6	0	23	30	3	65		
Total	19	28	2	75	129	21	274		

^aThe segregation types were according to the manual of JionMap 3.0 (Plant Research International B. V., The Netherlands)

1.2.3 AFLP 解析

AFLP 解析では *Pst*I/*Mse*I プライマー54 組合せについて解析した結果、合計 867 個の多型が検出された (Table 2)。そのうち 712 個は分離比 1:1 を示す優性マーカーであり、そのうち母型特異的バンドの見られたものが 380 個、父型特異的バンドの見られたものが 332 個であった。それに対して分離比 3:1 を示した多型は 155 個であった (Table 3)。これらは母型、父型共にバンドが見られた。1 プライマー組合せ当たり平均 16 個の多型が検出された。

Table 2. The number of total markers and selected markers for framework map generated by each primer pair using 54 PstI+3/MseI+3 primer combinations.

Primer pairs		No. of total markers	No. of markers selected
P01M11	AAA/CGG	20	2
P01M13	AAA/CCA	2	0
P01M15	AAA/CCG	21	1
P01M17	AAA/AAA	16	0
P01M18	AAA/AAT	24	2
P01M33	AAA/TAA	17	6
P01M34	AAA/TAT	33	10
P02M02	AAT/CAC	1	0
P02M12	AAT/CGC	3	0
P02M14	AAT/CCT	5	0
P02M16	AAT/CCC	16	1
P02M19	AAT/AAG	14	4
P02M20	AAT/AAC	8	1
P02M35	AAT/TAG	29	6
P02M36	AAT/TAC	22	3
P03M03	AAG/CAG	14	3
P03M09	AAG/CGA	4	2
P03M11	AAG/CGG	13	2
P03M13	AAG/CCA	7	2
P03M15	AAG/CCG	11	0
P04M04	AAC/CAT	12	2
P04M10	AAC/CGT	28	2
P04M12	AAC/CGC	8	1
P04M14	AAC/CCT	16	0
P04M16	AAC/CCC	2	0
P07M07	ATG/CTG	8	1
P09M10	AGA/CGT	8	0
P09M11	AGA/CGG	17	2
P09M14	AGA/CCT	6	1
P09M15	AGA/CCG	23	1
P09M17	AGA/AAA	36	5
P09M18	AGA/AAT	16	4
P09M33	AGA/TAA	27	5
P09M34	AGA/TAT	22	5
P10M02	AGT/CAC	14	5
P10M12	AGT/CGC	11	1
P10M14	AGT/CCT	13	1
P10M16	AGT/CCC	7	1
P10M19	AGT/AAG	17	5
P10M20	AGT/AAC	4	2
P10M35	AGT/TAG	24	1
P10M36	AGT/TAC	12	3
P11M03	AGG/CAG	28	5
P11M09	AGG/CGA	22	1
P11M11	AGG/CGG	12	1
P11M13	AGG/CCA	34	2
P11M15	AGG/CCG	15	2
P12M04	AGC/CAT	27	3
P12M10	AGC/CGT	27	1
P12M12	AGC/CGC	10	1
P12M14	AGC/CCT	18	2
P14M06	ACT/CTC	13	1
P15M07	ACG/CTG	30	3
P16M08	ACC/CTT	20	1
Total		867	116

Table 3. The number of loci showing distorted segregations in the Italian ryegrass Nioudachi × Nigatawase F₁ population.

Type of markers	Segregation ratios and types ^a						Total (%)
	1:1:1:1		1:2:1	1:1		3:1	
	ab x cd (19) ^b	ef x eg (28)	hk x hk (2)	lm x ll (496)	nn x np (483)	hk x hk (198)	
AFLP (867)				3 (380) ^b	3 (332)	12 (155)	18 (2.1%)
RFLP (274)	0 (19)	5 (28)	0 (2)	8 (75)	20 (129)	3 (21)	36 (13.1%)
TAS (85)				4 (41)	3 (22)	11 (22)	18 (21.2%)
Total (1226)		5 (17.9%)		15 (3.0%)	26 (5.4%)	26 (13.1%)	72 (5.9%)

^aThe segregation types were according to the manual of JionMap 3.0 (Plant Research International B. V., The Netherlands)

^bTotal number of markers belong to this segregation type

1.2.4 TAS マーカー解析

TAS 解析では 7 つのプライマー組合せについて解析を行った (Table 4)。その結果、合計 85 個の多型が検出された。そのうち 70 個は全連鎖群上にマップされた (Fig.2)。バンドパターンは AFLP と同様、分離比 1:1 もしくは 3:1 で、すべて優性マーカーである (Fig.3)。1 プライマー組合せ当たり平均 12 個の多型が検出され、1 つの組合せで多いもので 24 個、少ないもので 5 個の多型が検出された。

Table 4. The number of total markers mapped by each primer pair using TAS primer combinations.

Primer pairs	No. of total markers	No. of markers mapped
TP1D2	5	5
TP1D30	7	5
TP1K12	7	3
TP3D2	23	21
TP3D30	6	5
TP4D2	24	20
TP4D30	13	11
Total	85	70

1.2.5 分離の歪みについて

RFLP、AFLP、TAS マーカーを含む合計 1226 マーカーのデータのうち 72 個 (5.9%) で分離の歪みが見られた (Table 3)。特に RFLP、TAS マーカーの分離比の歪み (13.1%、21.2%) は AFLP マーカーの歪み (2.1%) より高い頻度を示した。4 種類の分離パターンの中で歪みの割合が最も高かったのは分離比

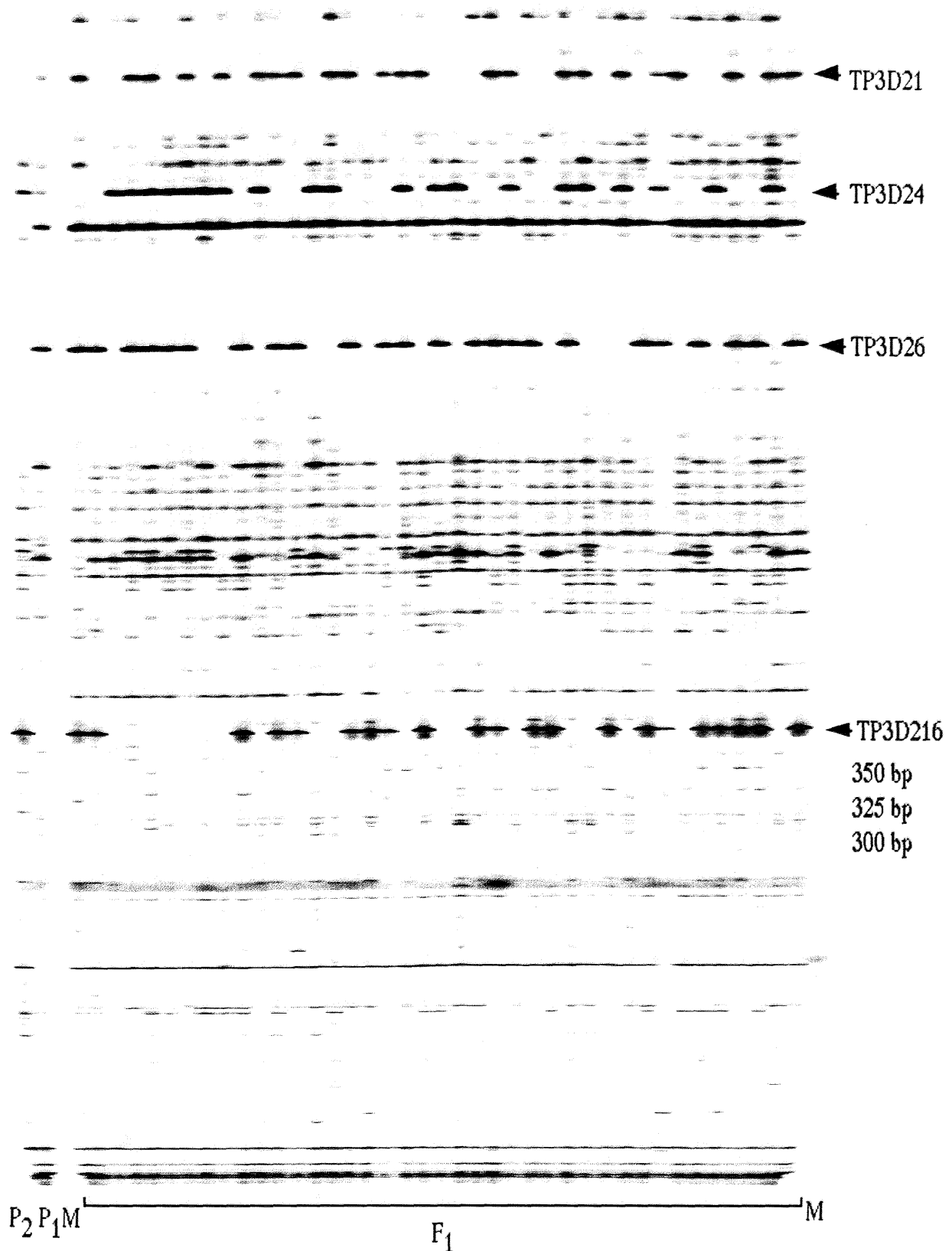


Fig. 3. Profile of telomeric repeat associated (TAS) markers detected by primer combination TP3/D2 segregating in the 'Nioudachi' × 'Nigatawase' (NN) Italian ryegrass F₁ population. Lane M contains the molecular size markers and lanes P₁ and P₂ are the maternal and paternal parents of the NN F₁ population, respectively. The other lanes correspond to 40 F₁ individuals. The arrows indicate four TAS markers.

3:1 の hk×hk のパターン (13.1%) であった。歪みの見られたマーカーのほとんどが LG1 の上部と LG6 の下部に集中していた (Fig.2)。

1.2.6 高密度連鎖地図の作成

はじめに 867 個の AFLP、164 個の RFLP マーカーのデータから LOD (logarithm of the odds) 値 9.0 で 7 つのグループを含む連鎖地図を作成した。その後、連鎖地図上の RFLP マーカー 119 個と 5 センチモルガン (cM) 間隔になるように選び出した AFLP マーカー 116 個 (Table 2)、合計 235 マーカーからマップフレームを作成した。その後、また新たに RFLP マーカー 110 個、TAS マーカー 85 個を加えた。最終的な地図は 385 マーカーを含む 7 つの主な連鎖群から成っている。連鎖群 (LG1~LG7) の順番は International *Lolium* Genome Initiative (ILGI) の表記に従った (Jones ら 2002a)。なお、連鎖地図の全長は 1244.4 cM でマーカー間の平均距離は 3.7 cM である (Fig.2)。

LG1 は 39 マーカーから成り、マーカー間の平均距離はほぼ 3.7 cM で 144.6 cM をカバーしている。LG1 には合計 8 個の TAS マーカーがマップされ、そのうち 4 つ (tp3d301、tp4d301、tp1d21、tp3d217) は連鎖群の末端に位置し、1 つ (tp4d307) は中央にマップされた。LG2 は 60 マーカーから成り、マーカー間の平均距離は 2.9 cM で 171.4 cM をカバーしている。LG2 には合計 12 個の TAS マーカーがマップされ、そのうち 3 つ (tp4d306、tp4d305、tp3d214) は連鎖群の最も末端にマップされた。LG3 は 47 マーカーから成り、マーカー間の平均距離は 2.3 cM で 109.1 cM をカバーしている。LG3 には合計 13 個の TAS マーカーがマップされ、そのうち 2 つ (tp4d21、tp4d29) は連鎖群の最も末端にマップされた。LG4 は 70 マーカーから成り、マーカー間の平均距離は 3.2 cM で 225.5 cM をカバーしている。LG4 には合計 16 個の TAS マーカーがマップされ、

そのうち7つは連鎖群の中央付近にマップされた。LG5は55マーカーから成り、マーカー間の平均距離はほぼ3.4 cMで185.9 cMをカバーしている。LG5には合計6個のTASマーカーがマップされ、1つ(tp4d3010)は連鎖群の末端に位置し、2つ(tp4d303、tp4d217)は中央付近に位置した。LG6は62マーカーから成り、マーカー間の平均距離はほぼ3.1 cMで192.8 cMをカバーしている。LG6にマップされたTASマーカー7つのうち、1つ(tp4d3012)は連鎖群の中央付近にマップされた。LG7は52マーカーから成り、マーカー間の平均距離は4.1 cMで215.1 cMをカバーしている。LG7にマップされたTASマーカー8つのうち、3つ(tp4d302、tp3d27、tp4d224)は連鎖群の末端にマップされた。

1.2.7 イタリアンライグラスの連鎖群とコムギの同祖群の保存されたシンテニ

本研究の結果においてイタリアンライグラスの連鎖地図とコムギの同祖群との間に数個のアンカープローブにおいて共通に位置するものを検出した。そのうちの2つのマーカー(CDO20、CDO1387)はコムギの第4染色体(w4)で確認されているが、イタリアンライグラスのLG4でも確認された。また、3つのマーカー(CDO534、CDO1380、CDO497)はw6で確認され、LG6でも確認されている。w3の2つのマーカー(CDO920、CDO460)はイタリアンライグラスのLG3でも確認された。またコムギのw7と共通なアンカーマーカー3つを持つイタリアンライグラス細胞質雄性不稔解析集団のLG7はNN集団のLG7と対応している(Table 5)。コムギのw1とイタリアンライグラスのLG1、コムギのw2とイタリアンライグラスのLG2との間には1つもしくは2つの共通なマーカーが見られた。

Table 5. Relationships between IRG, PRG and wheat linkage groups.

Species	Linkage group						
IRG, NN population ^a	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7
IRG, CMS population ^b	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7
PRG ^c	LG1	LG2	LG3	LG4		LG6	
Wheat ^d	(w1) ^e	(w2) ^e	w3	w4		w6	w7

a: This study

b: Hirata et al. in preparation

c: Jones et al. 2002b

d: Data derived from Graingenes (<http://wheat.pw.usda.gov>)

e: Only few markers common detected between IRG and wheat, see text in details.

1.3 考察

1.3.1 ゲノミックプローブの作出効率

本研究ではゲノミックライブラリー構築の際に、メチレーション感受性の制限酵素である *Pst*I を使用した。今までに多くの研究者達 (Burr ら 1988, McCouch ら 1988, Tanksley ら 1988, Xu ら 1991) によって *Pst*I でのゲノミックライブラリーではシングルもしくは低コピーの断片が効率よく得られるということが報告されている。イタリアンライグラスにおいて連鎖解析に使用可能なプローブの検出効率は 74%で、これはイタリアンライグラスとゲノムサイズの近いトウモロコシ (1 C = 2400 Mb) の 50.6% (Burr ら 1988) 及びゲノムサイズの小さいイネ (1 C = 430 Mb) の 58% (McCouch ら 1988) に比べて比較的高い (Fig. 1)。

本研究では合計 274 個の RFLP 遺伝子座が検出されたがそのうち 49 個 (17.9%) が共優性であった (Table 1)。このように共優性マーカーの割合が低い主な理由としては、いくつかのプローブにおいて複雑な多型を示したために共優性マーカーとして判断することが出来ず数個の独立した優性マーカーとして検出したためであると思われる。このため同じプローブでありながら数個のクラスターに分かれてしまい、結果的に共優性マーカーの数が減少したと思われる。この 1 つの例としては LG1 の IRG318-2 と IRG318-3 や IRG318-6 と IRG318-7 のクラスターである (Fig. 2)。もしこのように全く同じ位置に検出された遺伝子座を 1 つの共優性の遺伝子座として数えると連鎖地図上の共優性マーカーの数は合計で 70 個 (25.5%) になる。今後、本実験の解析集団の多型解析に使用した 4 つの制限酵素以外のより多くの制限酵素が使用できれば判別可能な共優性遺伝子座が増え、共優性マーカーの割合が高くなり、逆に優性マ-

カーの割合が低くなると思われる。

1.3.2 TAS マーカーの位置

テロメリピート配列が染色体の末端以外にも存在するという事は動物や植物において一般的な現象であり、そのほとんどが染色体の中央部に位置していることがわかっている (Mayne ら 1990、Richards ら 1991、Cheung ら 1994、Presting ら 1996)。本研究の結果、13 個の TAS マーカーが LG6 を除く 6 つの連鎖群の末端に位置していたのに対して、他の 10 個の TAS マーカーは連鎖群の中央付近に位置していた。この結果は Shen と Zhu (1998) の結果と一致している。しかしながら連鎖群の末端に位置する TAS マーカーが正確に検出されているかどうかは末端の TAS マーカーをクローニングし、シーケンスをするか、もしくはインサイチュハイブリダイゼーションをする必要があると思われる。

1.3.3 マップサイズ

本研究における地図の全長は 1244.4 cM で、これはすでに発表されているペレニアルライグラスの遺伝子地図 (692~930 cM) よりも大きい (Hayward ら 1998、Bert ら 1999、Jones ら 2002a、2002b)。このような地図の長さの違いについて考えられる主な原因として、本研究において作成された連鎖地図は主として AFLP マーカーから成る 1000 以上のマーカーを使用していること (ペレニアルライグラスの地図に於いても AFLP による地図が最も全長が長い (Bert ら 1999)) が考えられる。その他の理由として地図関数の違い (Haldane か Kosambi か) や、交配様式 (two-way pseudo-testcross か one-way pseudo-testcross か) や、解析時の遺伝子型の記録エラーによるものとも考えら

れる。

1.3.4 他のイタリアンライグラスやペレニアルライグラスの地図との比較

今回作成したイタリアンライグラスの地図と別のイタリアンライグラス (CMS) 集団の地図 (藤森ら、未発表) との比較を試みた。両集団について共通のプロープを用いて RFLP 解析を行うことで2つの地図の比較が可能となる。使用した CMS 集団の地図はもともと LOD4.0、約 300 の AFLP (*EcoRI/MseI*; +3、+4) 及び SSR マーカーから成り、マーカー間の平均距離はほぼ 10 cM で7つの連鎖群から成っている。また母、父型由来のそれぞれの地図を持っている。解析に用いた共通のプロープとして NN 集団解析に使用した 48 プロープ (エンバクのアンカープロープとイタリアンライグラスのゲノミックプロープ) を使用した。その結果、アンカープロープ 29 個により検出された 47 遺伝子座及びイタリアンライグラスプロープ 19 個により検出された 35 遺伝子座が CMS 集団の母、父型由来の両地図にマップされた (ここには示していない)。結果、NN 集団の地図と CMS 集団の地図においてすべての連鎖群はそれぞれ比較可能であった (Table 5)。また今回作成した NN 集団の地図と Jones ら (2002b) によって報告されたペレニアルライグラスの地図とを比較してみたところ、これら 2 つの地図の間でいくつかの連鎖群に共通のマーカーがわずかしかなかったにも関わらず、両地図の LG1、LG2、LG3、LG4、LG6 が互いに対応することがわかった (Table 5)。

1.3.5 イタリアンライグラスとコムギとのシンテニー

イタリアンライグラスにおけるゲノム研究は他の主要作物に遅れをとっているのが現状である。特にゲノムシーケンスや EST (expressed sequence tags)

の作出、RFLP や SSR マーカーの開発に関しては遅れていると思われる。今現在イタリアンライグラスの完全な遺伝子連鎖地図でさえ発表されていない。イタリアンライグラスとその他イネ、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、オオムギ、コムギのように深く研究されているイネ科作物とのシンテニー研究は今後のイタリアンライグラスのゲノム研究の発展に役立つと思われる。Jones ら (2002b) により、ペレニアルライグラスの 3 つの連鎖群とそれに対応するコムギの染色体との間に完全なシンテニーが見られ (Table 5)、これら両地図上の共通マーカーの 80%以上はシンテニーの関係にあると発表している。本研究の結果においても作成したイタリアンライグラスの連鎖地図と相同性が見られたコムギの染色体 (Table 5) との間でアンカープローブによるいくつかの共通領域が見られた (ここには示していない)。しかしながら現在イタリアンライグラスと、コムギもしくはイネのような研究の盛んな作物との間の詳細なシンテニー研究を行うための関連性のあるマーカー数はあまりにも少なく、今後より多くのアンカープローブによる解析が必要であると思われる。さらに、イタリアンライグラスやペレニアルライグラスからの EST マーカーをイネやコムギの連鎖地図にマッピング出来れば今後イタリアンライグラスのシンテニー研究に役立つだろう。

第2章 RFLP マーカーの STS 化

2.1 材料及び方法

2.1.1 植物材料

設計した STS プライマーのスクリーニングには 8 つの植物個体で構成された 1 つのパネルを使用した。そのうちの 5 つはイタリアンライグラス(IRG) CL1、TW59、11S、11F と”ワセアオバ”で、最初の 4 つは CMS 集団の親個体で、ワセアオバに関しては市販品種から無作為に選び出した。その他 3 つの植物体はイタリアンライグラスの近縁種であるペレニアルライグラス(PRG) (品種名:”キヨサト”; KS)、メドウフェスク(MF) (品種名:”トモサカエ”; TS)、トールフェスク(TF) (品種名:”ナンリョウ”; NR) である。

また、設計したプライマーについてイタリアンライグラスの品種内での多型を確認するために、16 個体で構成されたパネルを使用した。このパネルは 2 つの市販品種”ニオウダチ” (ND) と”ワセアオバ” (WA) それぞれ 8 個体ずつが含まれている。

2.1.2 RFLP プローブのシーケンシング

第 1 章で地図に座乗した 93 個の RFLP プローブのエンドシークエンスは MegaBACE1000 にてフォワードとリバース、両方向から DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) を使用して得られた(Dragon Genomics)。シーケンシング後、SEQUENCHER™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) を使用してコンティグを確認した。これらのシークエンスは DDBJ の受理番号 AB124671 から AB124779 に登録された

(2004年11月1日より公開)。

2.1.3 データベース検索

上記シーケンスを BLAST アルゴリズム (Altschul ら 1997) による塩基配列データベースにて検索した。DDBJ によって提供される BLAST ネットワークサービスはイタリアンライグラスプローブと既知の遺伝子の蛋白質シーケンスとの関係を明らかにするために利用した。BLASTX 検索は 2003 年 10 月 15 日に行い、E-value $\leq 1 \times 10^{-5}$ の水準を有意差と設定した。

2.1.4 プライマー組合せの設計

STS プライマーは Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Inc. Cascade, CO, USA) を使用して設計した。その際、アニール温度は 55°C、GC 含量は 40~60% に設定した。プライマー組合せは多型を得られ易くするために出来るだけ長い断片が増幅されるものを選んだ。断片があまりにも長くてシーケンスが完全に出来なかったクローンの STS プライマーについては間の長さは不明だが、それぞれの両端からフォワード及びリバースプライマーを設計した。

(AT)_n もしくは (TTA)_n の繰り返し配列を含む 2 つのクローンに関しては Primer 0.5 (<http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/pub/software/primer0.5>) を使用し SSR プライマーを設計した。すべてのプライマーを ESPEC Oligo Service (茨城県つくば市) に依頼し合成した。

2.1.5 PCR 及びゲル電気泳動の条件

ゲノム DNA は CTAB 法 (Murray と Thompson 1980) により幼葉から抽出した。

PCR 反応は GeneAmp PCR System 9700 (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用し、20 ng のゲノミック DNA テンプレート (1 μ l)、2 μ l の 10 \times reaction buffer、1.6 μ l の dNTP mix (それぞれ 25mM)、0.4 μ l (8pmol) のフォワード及びリバースプライマー、0.2 μ l (1 ユニット) の GeneTaq NT (ニッポンジーン) を含む計 20 μ l 容量にて行った。なお PCR は 94 $^{\circ}$ C 5 分 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 7 分 1 サイクル、4 $^{\circ}$ C ホールディングの条件で行った。PCR 産物は 3%アガロースゲル(TAE バッファー)もしくは 1.5%アガロースゲル(TBE バッファー)にて電気泳動を行った。泳動後のゲルは ethidium bromide で染色後、UV ライトで撮影もしくは Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive Hercules, CA, USA) を使用し、スキャンした。

2.2 結果

2.2.1 RFLP プローブシークエンスの特徴

第1章で地図にのった合計93個のシングルもしくは低コピーのRFLPプローブ (Fig. 4) についてエンドシークエンスを行った。そのうち87個はフォワードとリバース両方向からのシークエンスに成功したが、残りの6個はフォワードもしくはリバースのどちらか1方向しかシークエンス出来なかった (Fig. 5)。得られたシークエンスについて Sequencher ソフトウェアにて解析したところ、71個のコンティグが検出された (Fig. 5)。そのうち26個はフォワードエンドシークエンスとリバースエンドシークエンスが一部重なっており、残り45個はフォワードとリバース両方向から完全にシークエンスされた。また87個のうちコンティグの得られなかった16個についてはプローブ断片の長さがあまりにも長いために完全にシークエンスが出来なかった。シークエンスした93クローンのうち2クローンについては (AT)_n もしくは (TTA)_n の繰り返し配列が含まれていることが明らかとなった。

2.2.2 BLAST 検索

本研究でのイタリアンライグラスゲノミッククローンのシークエンス内に含まれる既知の機能遺伝子を見つけるために BLAST 検索を行った。その結果、E-スコアがそれほど高くない4つのクローンを含め、合計16クローンでDNAデータベース内の何らかの機能遺伝子と相同性が見られた (Table 6)。そのうち12クローンについてはイネとオオムギのゲノミックシークエンスでそれぞれ11クローン、1クローンで相同性が見られた。他の4クローン、IRG91、IRG129、IRG179、IRG292 についてはそれぞれソルガムの推定レセプタープロテインキ

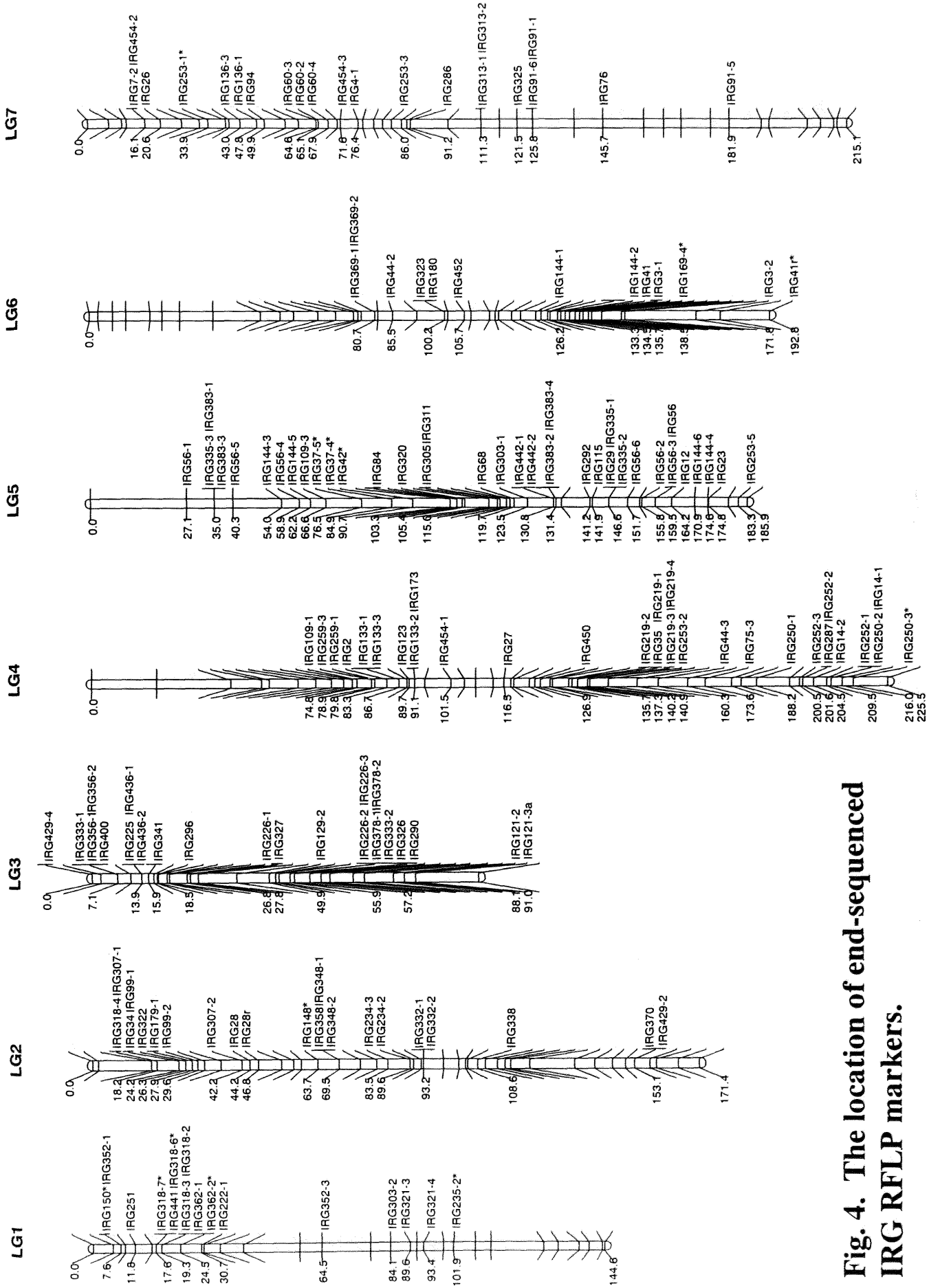


Fig. 4. The location of end-sequenced IRG RFLP markers.

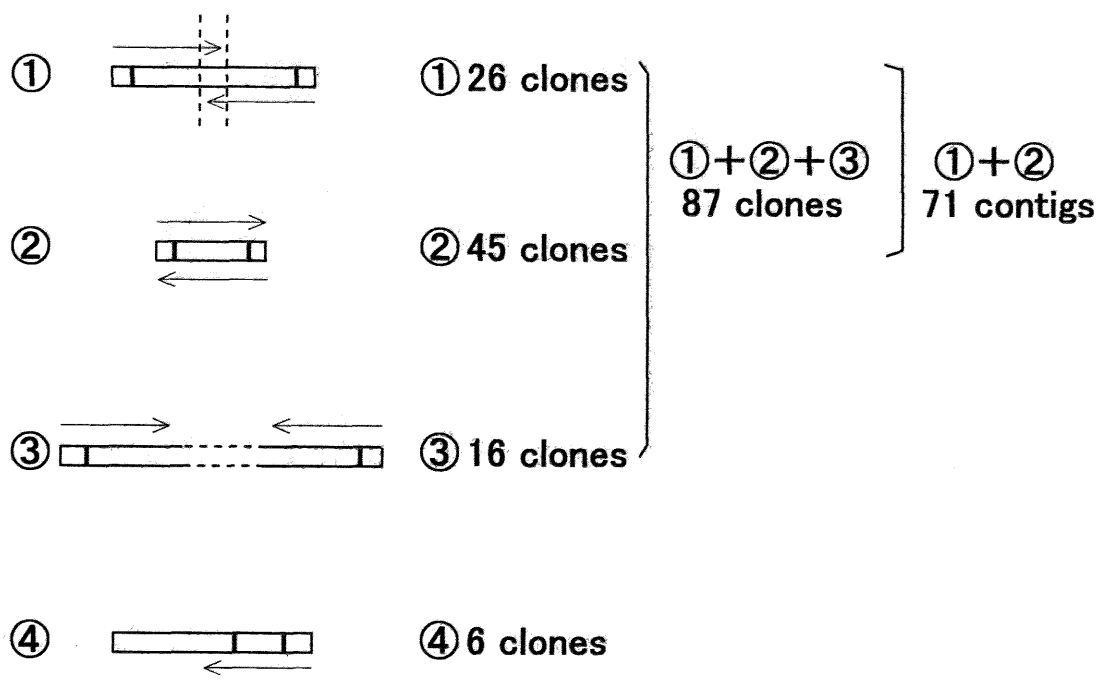


Fig. 5. Characteristics of RFLP probe's end-sequence and No. of RFLP probes sequenced. RFLP probe fragments are indicated as boxes. The locations of STS forward and reverse primers designed are indicated by blue and red vertical line, respectively. Arrowed symbols are indicated end-sequence directions, and the length of arrows indicate the region end-sequenced. ① Forward- and reverse-end sequences overlapped; ② RFLP probes were completely sequenced in forward and reverse directions; ③ RFLP probes could not be sequenced completely because their fragments were too long; ④ RFLP probes could be sequenced in 1 direction.

Table 6. High scoring matches against the DDBJ databases using BLAST searches.

Clone	Matched clone	Putative identification	E value
IRG27	AC131175	Genomic sequence for <i>Oryza sativa</i> (Nipponbare), clone OSJNBa0030D15 from chromosome 3	2e-38
IRG76	AP000559	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 6, clone: P0493C11.	4e-30
IRG91	AF466199	<i>Sorghum bicolor</i> putative receptor protein kinase	2e-39
IRG129	D21289	Rice mRNA for MCM3 (gene name SS300)	1e-27
IRG179	U89496	<i>Zea mays</i> liguleless1 protein (liguleless1) mRNA	1e-05
IRG235	AL731589	<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0039G19	5e-19
IRG252	AC096687	<i>Oryza sativa</i> chromosome 3 BAC OSJNBa0010E04 genomic sequence	1e-41
IRG286	AP003217	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: OSJNBa0094H06.	2e-07
IRG290	AP003332	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: B1097D05	3e-09
IRG292	AJ007705	<i>Triticum aestivum</i> PEPC gene.	2e-09
IRG333	AP003269	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0504E02	e-143
IRG338	AP004380	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 7, PAC clone: P0594D10	3e-13
IGR341	AP003368	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: B1100D10.	8e-15
IRG348	AL731582	<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0022H21	1e-27
IRG352	AC079888	<i>Oryza sativa</i> chromosome 10 BAC OSJNBa0078O01 genomic sequence	6e-32
IRG452	AJ234742	<i>Hordeum vulgare</i> genomic DNA fragment; clone MWG2061.rev.	1e-70

ナーゼ (AF466199)、イネ SS300 遺伝子 (D21289)、トウモロコシ *liguleless1* プロテイン (*Liguleless1*) mRNA (U89496)、コムギの PEPC 遺伝子 (AJ007705) であった。

2.2.3 STS マーカー及び SSR マーカーの開発

本研究では 93 プローブより STS 及び 2 クローンの SSR を含む合計 95 クローンについてプライマー設計を行った (Table 7)。そのうち 67 個の STS 及び SSR プライマーで予想断片長にシングルバンドが増幅された (Fig. 6)。また、バンドの増幅の見られなかった 28 個の STS 及び SSR プライマーについては増幅時の条件を変えて PCR を行ったが、増幅が見られなかったためプライマーの再設計の必要があると判断した。シングルバンドの見られた 67 個の STS 及び SSR プライマーは選抜用パネル内のイタリアンライグラス 5 個体のうちいずれかの個体で増幅が見られた。そのうち 5 個体すべてにおいて増幅が見られた STS 及び SSR プライマーは 40 個であった。残りの 27 個の STS プライマーについては 5 個体中 1~3 個体でのみ増幅が確認された。これはイタリアンライグラスのヘテロ接合性によるものだと思われる。また 67 個の STS 及び SSR プライマーのうち 9 個の STS プライマーでは 5 個体間での増幅断片長及びバンドの有無による多型が見られた。また SSR プライマー (IRG252SSR) で SSR の増幅に成功し、5 個体の間でも多型が確認され、もう 1 つの SSR プライマー (IRG68SSR) では SSR の増幅は確認できなかった。(Fig. 7)。

2.2.4 イタリアンライグラス STS プライマーの他の近縁種への応用及びイタリアンライグラス品種内での多型調査

本研究では 5 個体の IRG、1 個体の PRG、1 個体の MF、1 個体の TF を含む

Table 7. List of STS and SSR primers developed from Italian ryegrass RFLP probes

Probe name ^a	Linkage Group ^b	DDBJ Accession no. ^c	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length (bp) ^d	Amplification ^e			Polymorphism		
						IRG	PRG	MF	TF	ND/WA	on length presence / absence
IRG2	4	AB124671, AB124672	AGAGCCAGGCCATACA	ATGGCTTTCAGGACAACTTA	>960	+	+	+	+	-	-
IRG3	6	AB124673	GGGAAGTGTGTTGTCAAAC	TCTATGATGATGACGCAACT	976	+	+	+	+	+	+
IRG4	7	AB124674	GGTAAACATAATGAAAGCGTGT	AGTGTCTGCTAAATGACGTGC	268	+	-	-	-	+	+
IRG7	7	AB124675	TAAACCTCAACAATAFACCCAG	AAAGCTTGAATCTGTGGACC	261	+	+	+	+	+	+
IRG12	5	AB124676	AATCAGCCAAACCATTGTCGAT	GTGGCTCTTTCGGACACA	199	-	-	-	-	+	+
IRG14	4	AB124677	TTCACCTAAGAAATGGA	ACTAAACAAATAGTTGCATGA	168	-	-	-	-	-	-
IRG23	5	AB124678	AGAGACCAAGGACGACGAAG	TTCGATGATGCCATACACGAT	460	+	+	+	+	+	-
IRG26	7	AB124679	ATCTTCTCCGAAGCAT	ATATATGGCAATAGAGTAAAG	752	-	-	-	-	-	-
IRG27	4	AB124680	CACATAAAGAGGCCCTAGAGA	CCCGAAAAGTCTGTCAAATGC	401	+	+	+	+	+	+
IRG28	2	AB124681	TTCGGTGTCAACATTTAGAGC	CGCGAAATATTTGGTAAAGAA	322	+	+	+	+	+	-
IRG29	5	AB124682	TAGAAAGAAGGCCAAACTTACA	GCCACCACCCTGATGACTAA	874	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG34	2	AB124683	TCTCAGTGTGAGCCGGTGICA	TGAGGTGCTGGACTACAAGC	239	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG35	4	AB124684, AB124685	CACCCGCAATCTTTAGTCTTT	GCGTGTGCTGCTCGCTGGTCTGG	>1089	+	+	+	+	+	-
IRG37	5	AB124686	CGGAACCTTGGAAACCGGAGTG	CTGTCACTATCGCCCTTTA	1038	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG41	6	AB124687	TGGGATCTAGTGAAGATATG	CGGAAAAGTTTCCAGATACTAT	319	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG42	5	AB124688	TGATGAGATAAGATATAACCG	TTAGTTATCTTGTATACAGC	399	-	-	-	-	-	-
IRG44	4, 6	AB124689	CIATAATGTAGTGACAAAATC	TTCCTTCTTCTGCTTAA	142	-	-	-	-	-	-
IRG56	5	AB124690	AAACATAICTTATCGCCTCA	AGGCTAGACAGAACCGGGAAG	295	-	-	-	-	-	-
IRG60	7	AB124691	CACACACTACACGCAGCA	GGTTCTTTGATTCGGTACAT	516	+	+	+	+	+	-
IRG68	5	AB124692	ATCAAATGGCATCTCCGGACT	GGCCCTGCTTGGTGTAG	242	+	+	+	+	+	+
IRG68SSR ^{a1}	5		GCTGAGTGGGTATTC AACAT	AGGTTACATAACGAAAACITTTT	273	-	-	-	-	-	-
IRG75	4	AB124693	TCTCAAAGGGATAAGCGGACA	GAGCAACCAACTTCCCGTGTGA	533	+	+	+	+	+	-
IRG76	7	AB124694	TTATTTGCTTGGGTTAG	GCATGATATGACCGCATTTGCAT	371	-	-	-	-	-	-
IRG84	5	AB124695	ATGGGTCTACATGAAGCGACA	TGGAICTTTGCGAAACGTTG	288	+	+	+	+	+	-
IRG91	7	AB124696	TGCTAGTGAITTTGCGGTCGAG	AGCTTAAGGGCCGAAGG	608	+	+	+	+	+	-
IRG94	7	AB124697, AB124698	ACCCAAACTTGGCCGACCCCAT	GCCGAGCCGGTGAATATGAG ⁷	>958	-	-	-	-	-	-
IRG99	2	AB124699, AB124700	GGCTGCGTCTAGATTCGACTC	AGACCTACTGGGCTCGAC	>2036	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG109	4, 5	AB124701	TACTGATGCAGCTACGGGACA	ATGGTTGGCCCTGCTTATGT	159	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG115	5	AB124702	TGGTGTCTGCGTTCAATGG	TTTCTGAAATACGACGACAAG	887	+	+	+	+	+	-
IRG121	3	AB124703	GTTGCATGGCAGCTAATGGAA	ATCCGCATACCTGTATAACTG	326	+ ^{e1}	-	-	-	-	+
IRG123	4	AB124704	GAGACCCCTGCATAAAGATAACA	TTCCTTGGGGATAATA	199	-	-	-	-	-	-
IRG129	3	AB124705	TCTGTAACTCGGGATA	TTTGGCAATAGATAFATCTGT	339	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG133	4	AB124706	CCACAGGAGCAATCGCAATAA	ACCAATGGCAGCAGTACCGTT	100	+	+	+	+	+	-
IRG136	7	AB124707	GAGGCGACACAGTAGAC	TTGATGTGTTTGGGAGTAAATG	300	+	+	+	+	+	-
IRG144	5, 6	AB124708	AAGGAGCTACTCGTGGCAITTA	CCGGGTACTCAGACATAGATA	223	+ ^{e1}	-	-	-	+	+
IRG148	2	AB124709	TGAACATAITTAAGGGCTTACC	TCCCAACAACCCCGAAAAG	514	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG150	1	AB124710, AB124711	TTGTCCGCTCTCCCGATCCA	AGGATGCACGCGAACAAGG	>1147	+	+	+	+	+	-
IRG168	unknown	AB124712	AGGTGCCAACCCAGTGTAGAIT	TTTCTAGTGTCCGGGAGA	137	-	-	-	-	-	-
IRG169	6	AB124713	AGAITCTCCACTTGTCTCCGG	GGAAAACCCAGCCGATGAT	95	+ ^{e1}	-	-	-	+	-
IRG173	4	AB124714	GCCGCTCGGACCCGTGATCTT	GCAGTACAACCCGGGGATTCTI	420	+	+	+	+	+	-

IRG179	2	AB124715	GAAGGAAGTCAAAAGCCGTCT	ACTTGTATGTCCATCCCGTCT	258	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG180	6	AB124716	GAGTAGGCCATGTAGATTGC	GCTCCAAGCCCGTACAC	340	+ ^{el}	+	-	-	-	-	+
IRG219	4	AB124717, AB124718	GCCATTAACACCGAACAT	TCTGTATGATAAATGCGTAG	>1204	-	-	-	-	-	-	-
IRG222	1	AB124719	TGGAACGCTAGAGCACC	GGCTCITGGGAGTTGTACAT	322	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG225	3	AB124720	GGGTGTGTGGCGTGT	TTTCAGITGGAGAITAGGTGG	89	+	+	+	+	-	-	-
IRG226	3	AB124721	TCATGCAGAGTACCAGGCTA	GACTTGGTTTGAAGGCCAATC	447	+	+	+	+	-	-	-
IRG234	2	AB124722	GCTCCGCTTCCTCCGTA	AGATTCCTCCAITCCCGTGCA	383	-	-	-	-	-	-	-
IRG235	1	AB124723, AB124724	ATCCTGTCTCAGTGGGTTAT	CGTGTAGTGGCCCTAAT	>1157	+ ^{el}	-	-	-	-	-	-
IRG250	4	AB124725	GAATCTGGGGCTGTAAGAC	AGATCTTTACACCGGACC	243	-	-	-	-	-	-	-
IRG251	1	AB124726	CGATAAGCTGCGGGATA	TCGGGAATGTGGTTGGCAACT	482	+	+	+	+	-	-	-
IRG252	4	AB124727, AB124728	CTTGCTTCGCCCTATC	CCTGCCAGTTCACAACCCATA	>1077	+ ^{el}	+	+	+	+	+	+
IRG252SSR ^{a1}	4		GTGCACCTTATGCTCAACAAA	CAGCATAGAGCATCATCAGA	200	+	+	+	+	-	-	-
IRG253	4, 5, 7	AB124729	AACGAATAAATCATGGTAA	CTTCTTTTATCCTTCGAG	884	+ ^{el}	-	-	-	-	-	+
IRG259	4	AB124730	CTATCCAITGGCGTGTCAAC	CTATAAGCGGATCGGACTTCA	695	+	+	+	+	-	-	-
IRG286	7	AB124731	AGACCAGCTTGAGTCTTATC	GGCCATTCATATGAT	319	+	+	+	+	-	-	-
IRG287	4	AB124732, AB124733	CTCGATGAGCGGACGGAC	TCCTTTAGCTGGGCACGTCCT	>788	-	-	-	-	-	-	-
IRG290	3	AB124734	GTCTGCTGATGGCCGTAG	GGCTGCACGAACCCGAAGGAI	494	+	+	+	+	+	+	+
IRG292	5	AB124735	ACAAATGCCAATGGGAACGAT	CCAGTCCAATCTCGGCTCT	941	+	+	+	+	+	+	+
IRG296	3	AB124736	AAATCAACGCCCGATCAG	GCCCAACCTGTGCCATGACGA	227	+	+	+	+	+	+	-
IRG303	1, 5	AB124737, AB124738	CGTTACTCGCTTGTCACAAC	TATGTCAAAGGGGATA	>771	-	-	-	-	-	-	-
IRG305	5	AB124739	TTACAGTGGCCCTTTC	CGGCTGTGTGGAGTATTAC	445	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG307	2	AB124740	CACATAACACTGCACCGTCT	CTAGCAITTACCCTGTGCAA	273	-	-	-	-	-	-	-
IRG311	5	AB124741	AGTTGTCTAAGTATCGG	AITGCCAGCACTTCTCACTAC	242	-	-	-	-	-	-	-
IRG313	7	AB124742	GAGAAGACCAACTGCGGAGAT	CGCGCAGGAACAATA	170	+	+	+	+	-	-	-
IRG318	1, 2	AB124743	CGCCACACACCTAAA	GGCAAAATCAAGTGGTTAAGA	397	+ ^{el}	+	+	+	-	-	+
IRG320	5	AB124744	TCCCTATCAATCGGCATTCA	CTACAGGAGGGCACGGTTTCT	571	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG321	1	AB124745, AB124746	CCTCTGGATCGCGTTAC	ATGCCGTATGAGGAGTATAGGC	>1145	+ ^{el}	-	-	-	-	-	-
IRG322	2	AB124747, AB124748	AGTGTCCGATCGGCTTGATA	AACATGTGGCGCAACAG	>1103	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG323	6	AB124749	GGTCGATCTTACCAGTAGTT	ACTTCAGAAATCACCAGTATGC	433	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG325 ^{a2}	7	AB124750	CAGGAGAACATGTTATGCCAT	CCCCTGGGCATTTGTT	618	-	-	-	-	-	-	-
IRG326	3	AB124751	CATGACTAAGAAGTAGCCCTG	TTCACTCTGGCACTAAACC	140	+	+	+	+	-	-	-
IRG327	3	AB124752	TCTGGTAAATACATTTGCCAAA	TGTGAGAAAACCAAACGC	197	+	+	+	+	-	-	-
IRG332	2	AB124753	AGATGCTGACCAGTCTAAGT	CTGGGGTCTTCTTTAAGT	340	+	+	+	+	-	-	-
IRG333	3	AB124754	CCCAAAATTCCTGACATAAG	CCCTGTTAACCATGTACTTC	555	+	+	+	+	-	-	-
IRG335	5	AB124755	AAACTAGTATGCCATATCAGT	CGCATCTGAAGAGTATTC	670	+ ^{el}	-	-	-	-	-	+
IRG338	2	AB124756	CATGGGCTTGTGAACTACGA	CAGCCGACAGACATCTAAC	731	+	+	+	+	-	-	+
IRG341	3	AB124757, AB124758	CGGAAGGAGTCAACTTATCTG	TCTCCGCTCGTTGTTTC	>1033	+ ^{el}	+	+	+	-	-	-
IRG348	2	AB124759	GGTAGTCTATCTGGCGTGTAT	GGTCGGGAATCGGGCTTIG	615	+	+	+	+	-	-	-
IRG352	1	AB124760	CGCACCGTGTGAGTACTCT	CATGTCCTCAACAAGATACCGA	313	+	+	+	+	-	-	-
IRG356	3	AB124761, AB124762	GATTAATGGGAACGCTGAA	GCGACTCAAITGCCAGTAGAG	>1706	-	-	-	-	-	-	-
IRG358	2	AB124763, AB124764	AAATCTGAAAAGAAAGCGAAGGT	TACAGCCCACACGCAATC	>1213	-	-	-	-	-	-	-
IRG362	1	AB124765	AACAGGCAGTTTCTAGATTTA	GGGAAGAAAAAATAACATACA	281	+	+	+	+	-	-	-
IRG369 ^{a2}	6	AB124766	GGTAGTGTCTGTTGGTGCTA	AAATGCCAACCGTTCTTATT	594	-	-	-	-	-	-	-
IRG370 ^{a2}	2	AB124767	TTTTTATTATTCCAGTACGG	CTCCACACGTCGATCTCTAA	451	-	-	-	-	-	-	-

IRG378 ^{a,2}	3	AB124768	GATCAGGTAATGTTCAAC	ATGGGACTGTTTTTCTATGTC	-	-	-	-	497
IRG383	5	AB124769	TTTTAAATCCATTTGTTTITA	CAAGCTTCACITGATAAGTCA	-	-	-	-	187
IRG391	unknown	AB124770	GCGTGGCCTGGTTCGGTAC	TTGTCIGTCGCGGAACATAAC	-	-	-	-	559
IRG400	3	AB124771	GGTGCTAAATCCATCAGTAT	AGAGCAACCAGGTACACTGT	+	+	+	+	251
IRG429	2,3	AB124772	TTGCCTCTCTCTTGGGTACA	TCAGTTTCGGACGAGCAAC	+	+	+	+	158
IRG436	3	AB124773, AB124774	GCAACTGCACGTCGAGA	TTCTTGTGGCAGATAGTAAAT	+	+	-	+	>1001
IRG441	1	AB124775	ITCAGTGTITTCCTGCGTA	AACGTTAGATTAATGTAACCCA	+	+	-	+	404
IRG442 ^{a,2}	5	AB124776	CTGACGTAGTAACCCATAAT	GTACTCAITGGACCAGATCTGA	-	-	-	-	437
IRG450	4	AB124777	GGGATTCGACTTGGTTATC	GTTTTGTGCTAATTTAGGTG	+	+	+	+	591
IRG452	6	AB124778	AGTTCTACTTCTCCGTTGCT	TAACTCAATGACAAGCGGTGA	+	+	+	+	515
IRG454 ^{a,2}	4,7	AB124779	TGTTGATATCCCTCTATG	TGCGTATGACCATGATACACC	-	-	-	-	437

^aa1-primers designed from the same number's clone, a2-primers designed from forward or reverse sequence only.

^bsome clones were multicopies and mapped to more than one linkage groups.

^cTwo DDBJ ID numbers correspond to the forward and reverse sequences.

^dThe values with > means minimum product size in expect, because the clone did not sequenced completely.

^eIRG-in Italian ryegrass, PRG-in perennial ryegrass, MF-in meadow fescue, TF-in tall fescue, ND/WA-in two cultivar of IRG, +: succeeded to amplify, -:failed to amplify, e1-the primer pairs only amplify product in 1-3 of 5 individuals.

^fPolymorphism intra-cultivar of ND or WA, +:polymorphism, -:monomorphism.

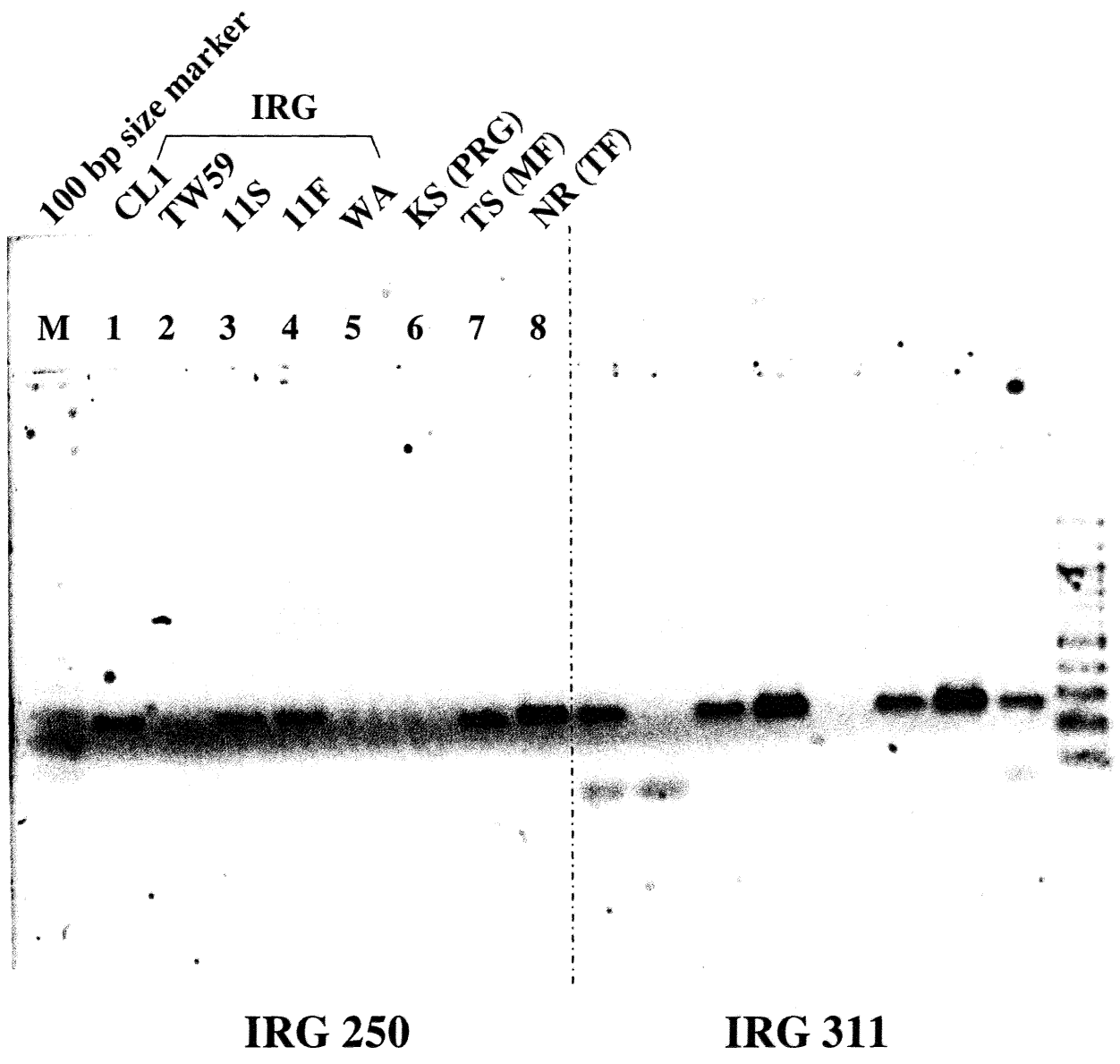


Fig. 6. Polymorphisms of STS marker IRG 250 (left) and IRG 311 (right). The PCR products were electrophoresed using 1.2 % agarose gel in TBE buffer.

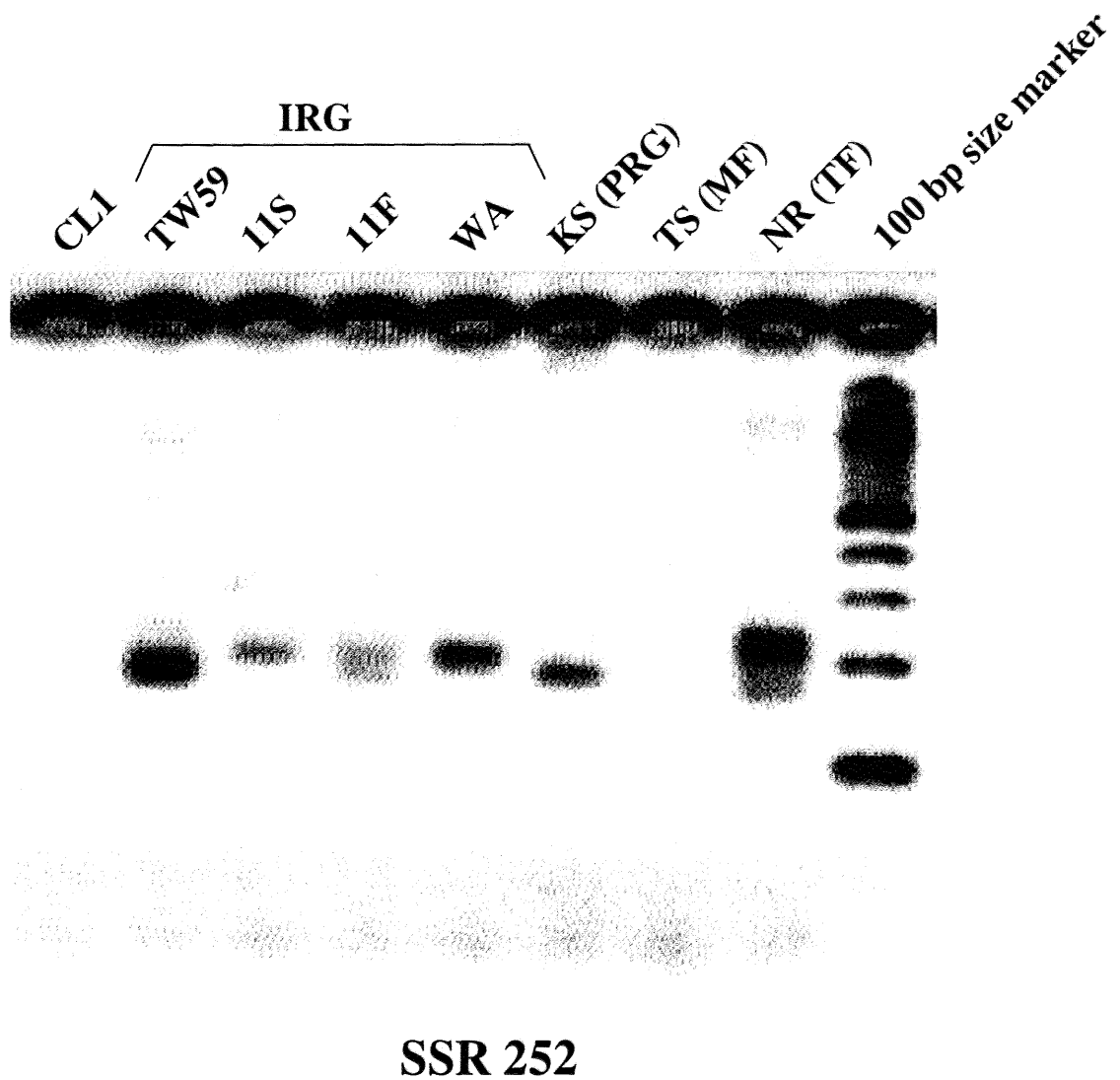


Fig. 7. Polymorphism of SSR marker SSR 252.
The PCR products were electrophoresed using 3 % agarose gel in TAE buffer.

パネルを用いて STS 及び SSR プライマーの選抜を行った。その結果、シングルバンドの見られた合計 67 個の STS 及び SSR プライマーのうち PRG、MF、TF においてそれぞれ 57 個 (85%)、47 個 (70%)、55 個 (82%) の STS 及び SSR プライマーで増幅が見られた (Table 7)。その後 IRG の 5 個体いずれかにおいて増幅の見られた 67 個の STS 及び SSR プライマーについては 2 品種 16 個体を含むもう 1 つのパネルを用いて多型調査を行った。また、IRG の 5 個体では増幅が見られなかったが PRG と TF のどちらか 1 つで多型の見られた 3 個の STS プライマー (IRG12、IRG356、IRG358) についても同様に 2 品種 16 個体を含むパネルを用いて多型調査を行った。その結果、61 個の STS プライマーと 1 個の SSR プライマーについては少なくとも 1 品種内で増幅が見られたが残り 8 個の STS プライマーでは増幅産物は検出されなかった (Table 7)。62 個の STS 及び SSR プライマーのうち 25 個 (40%) で少なくとも 1 つの品種において品種内多型が検出された (Fig. 8)。そのうち 9 個の STS プライマーではバンドの有無による多型が、残り 16 個の STS プライマーでは長さの違いによる多型が検出された。上記 62 個の STS 及び SSR プライマーではこれら 2 品種を区別できるような品種特異的な差は確認することが出来なかった。

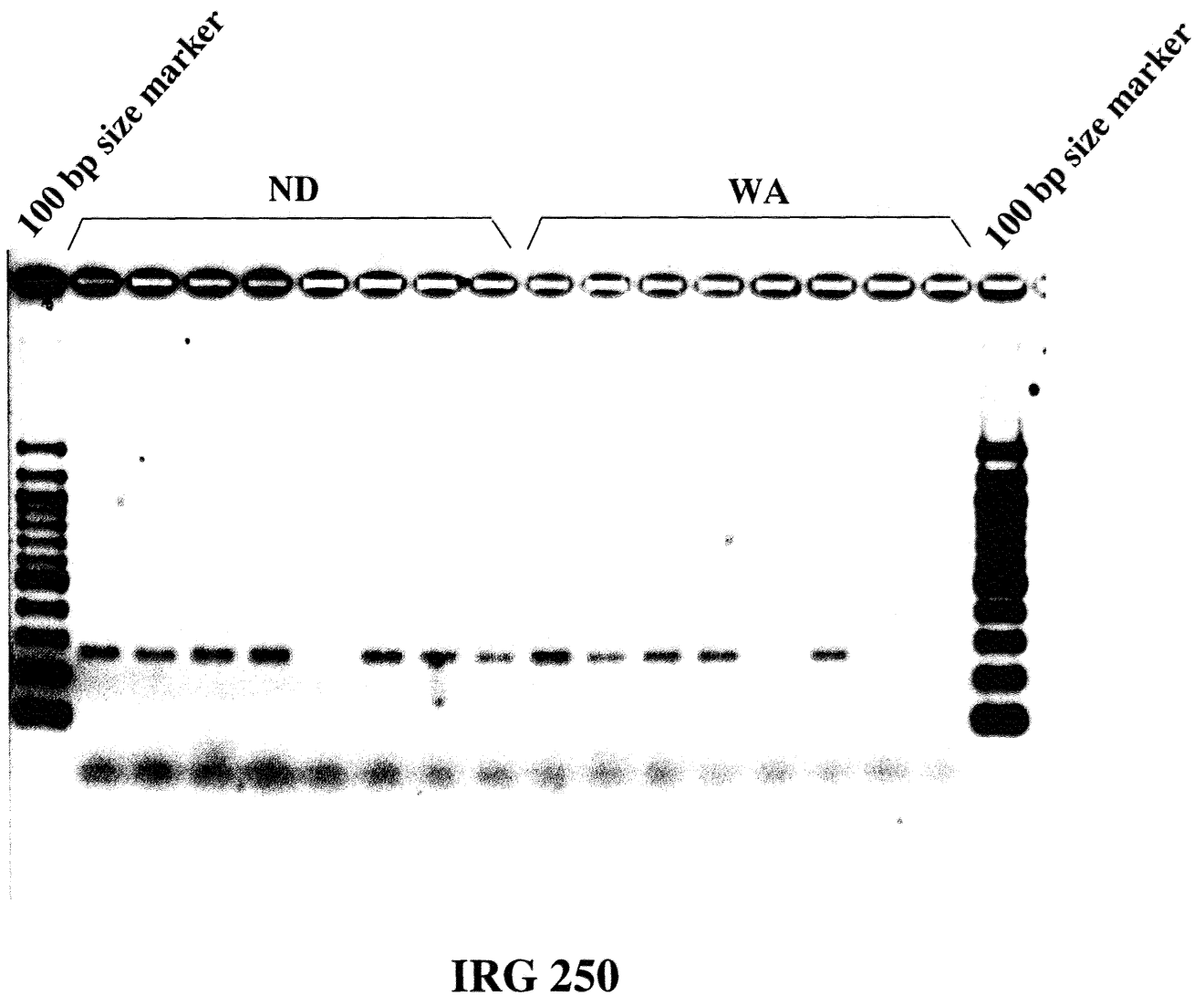


Fig. 8. Polymorphism of STS marker IRG 250 detected in intra- cultivars. The PCR products were electrophoresed using 1.2 % agarose gel in TBE buffer.

2.3 考察

2.3.1 遺伝子の同定

本研究の結果では 16 シークエンス (14.7%) のみが既知の遺伝子のシークエンスと相同性が見られた (Table 6)。この数字はとても低く、Michalek ら (1999) のオオムギにおいて既知の遺伝子のシークエンスと有意な相似が見られたのはゲノミッククローンの 9%のみであったという結果と似ている。一方、Schloss ら (2002) や Murray ら (2002) のようにソルガム及びインゲンマメのゲノミッククローンの 56%及び 75%で既知の遺伝子のシークエンスと相同性が見られたという報告もある。この差は草種間によるゲノムサイズの違いによるものであると思われる。一般的にゲノムサイズの大きい草種は遺伝子以外の領域の割合が多い (Barakat ら 1997)。事実、オオムギとイタリアンライグラスのゲノムサイズ (4800Mb 及び 2000Mb /C) はソルガムとインゲンマメ (690Mb 及び 637Mb /C) のゲノムサイズよりはるかに大きい (Hutchinson ら 1979、Arumuganathan と Earle 1991)。

2.3.2 イタリアンライグラスとイネ間のシンテニー

BLAST 検索の結果から 12 個のイタリアンライグラスのゲノミッククローンがイネのシークエンスと相同性が見られたが、そのうちイタリアンライグラスの LG3 にある IRG290、IRG333、IRG341 はイネの第 1 染色体に位置するクローンと相同性が見られた。また LG4 にある IRG27 と IRG252 はイネの第 3 染色体に位置するクローンと、LG2 の IRG338 と IRG348 はそれぞれイネの第 7 及び第 4 染色体に位置するクローンと相同性が見られた。この結果はイタリアンライグラスの LG3 はイネの第 1、LG4 はイネの第 3、LG2 はイネの第 4 及び

第7染色体とシンテニーグループの関係にあると推測され、Jones ら (2002b) によって示されたことと同じである。その他のクローン、LG1 上の IRG235 と IRG352、LG7 上の IRG286 はイネの第4、10 及び第1 染色体に位置するクローンと相同性が見られたが、この3 つのクローンの結果は Jones ら (2002b) の結果とは異なっていた。

2.3.3 イタリアンライグラス STS マーカーの近縁種への応用

いくつかの研究において STS プライマーを他の種へ応用するとき相同シーケンスの増幅に失敗したという報告があった (Talbert ら 1994、1996、Erpelding ら 1996、Mano ら 1999)。本研究ではイタリアンライグラスのゲノミックプローブから 67 個の STS 及び SSR プライマーを開発し、近縁種に対して応用できるかどうか実験した。その結果、PRG、MF、TF でそれぞれ 59 (88%)、47 (70%)、56 (84%) プライマーの増幅が見られた。またこの頻度は Erpelding ら (1996) のオオムギからコムギへの STS マーカーの応用効率ほぼ 70% であったという結果とほぼ同じである。また TF から MF への SSR マーカーの応用効率 (Saha ら 2003) においても同様の結果が得られている。

2.3.4 RFLP マーカーからの SSR マーカーの作出

SSR マーカーの開発は従来のライブラリーからのスクリーニングや濃縮ライブラリーの使用によるものが多い。しかしながらこれらの方法は 2 もしくは 3 塩基の繰り返し配列を持った SSR マーカーが多く得られ、また費用を要し、労力的にも骨の折れる仕事である。Schloss ら (2002) は以前にマップした 789 個のソルガムの RFLP プローブをシーケンスすることによって 69 個の RFLP プローブから 74 個の SSR マーカーを見つけ、最終的に 60 個の新規 SSR マー

カーを開発した。本実験においても 93 個の RFLP プローブシーケンスから 2 つの SSR シーケンスを明らかにし、1 個で SSR マーカーの変換に成功した。SSR マーカーは数に限界があるが、STS、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーに比べ多型調査においてより効率的である。またゲノミッククローンから検出される SSR シーケンスには従来のライブラリースクリーニング、濃縮ライブラリーでは得られない 3 塩基以上の繰り返しモチーフが含まれている割合が多いかもしれない (Schloss ら 2002)。以上のことから RFLP エンドシーケンスは SSR マーカー開発におけるもう 1 つの方法と成り得ることが示唆された。

2.3.5 品種内での多型検出

2 品種 16 個体を使った品種内での多型調査の結果、増幅の見られた 62 個の STS 及び SSR プライマーのうち 25 個の STS 及び SSR プライマー (40%) で片方もしくは両方の品種で品種内多型が検出された。Mano ら (1999) はオオムギにおいて 41 個の STS プライマーのうち 4 個の STS プライマー (9.8%) で増幅断片長もしくはバンドの有無による解析集団親間での多型が見られたと報告している。この結果から他殖性作物の方が自殖性作物に比べ増幅断片長の違いによる多型の検出頻度が高いと思われる。

また Mano ら (1999) は 12 種類の制限酵素を用いてオオムギの 37 個の STS マーカーから 14 個の CAPS による解析集団親間の多型を検出し、Taylor ら (2001) は 3 種類の制限酵素を用いてペレニアルライグラスの 13 個の STS マーカーから 11 個の CAPS の多型を検出した。STS マーカーの CAPS マーカーへの変換はより多くの多型を検出するのに有効な手段である。このため本研究においてもイタリアンライグラスの STS マーカーからより多くの多型を効率的

に見つけ出すためには今後いくつかの制限酵素を使用し、STS マーカーを CAPS マーカーへ変換することが必要であると思われる。

現在までに IRG 及び PRG でそれぞれ 50,000 以上の ESTs が作られているが、それらは未だ公開されていない (Spangenberg ら 2003, Ikeda ら 2004)。Taylor ら (2001) は PRG の 13 個の STS プライマーはオオムギ、エンバク、PRG から設計されたと報告している。Lem と Lallemand (2003) はロリウムやイネ科の近縁種から 42 個の STS マーカーを作出したと報告している。本研究にて作成された 67 個の STS 及び SSR マーカーは BLAST 検索の結果から、上述した Taylor ら (2001) や Lem と Lallemand (2003) の STS マーカーとは重複していないことを確認している。これら 67 個の STS 及び SSR マーカーは IRG の 7 つの連鎖群すべてに分布しているため、新規の遺伝子や農業上重要な形質などをマッピングする際に別の集団でのランドマークとして役立つと思われる。

第2部 耐倒伏性関連形質のQTL解析及び作成したマーカーによる幼苗選抜の試み

緒言

倒伏のダメージは収量及び機械による収穫作業の能率の面で悪影響を及ぼす。そのため耐倒伏性はイタリアンライグラスの育種において最も重要な目標の1つである。しかしながら「倒伏」という形質は量的形質でいくつかのファクターが関連している複雑な形質である。また環境の影響を受けやすく、風雨によっても引き起こされる。また茎や根に影響を及ぼす病原体や病害虫によっても倒伏の度合いは増し、窒素多加や密植、干ばつのような他の要因でも影響を受けるため圃場での倒伏の評価は大変難しい(Brady 1934; Pinthus 1973; Easson ら 1993; Crook と Ennos 1995; Milczarski 2002; Sanchez 2002)。

圃場での耐倒伏性のスコアリングは必ずしも安定するものではない。なぜなら倒伏は植物のどの成長段階でも起こり得るし、また少しも起こらないかもしれないからである(Atkins 1938)。このため天候に左右されずに耐倒伏性を評価する方法を確立することも育種家達は常に念頭においてきた(Heyland 1960)。これまでに行われた実験のほとんどは倒伏性と相関関係を示す形態学的形質を見つけようとするものであり、二次的な評価要素としては使用できる。しかしながら耐倒伏性に関しては一般的に信頼性が高いと立証された単一形質や形質グループは無い。このためマーカー利用選抜は耐倒伏性の向上において重要な手段となるだろう。耐倒伏性に関するQTLの研究はダイズ(Mansur ら 1993; Lee ら 1996)、オオムギ(Backes ら 1995; Hayes ら 1995; Tinker ら 1996)、イネ(Champoux ら 1995)、コムギ(Keller ら 1999; Börner ら 2002)、トウ

モロコシ (Flint-Garcia ら 2003b ; Sherry ら 2003a, b) やエンドウ (Tar'an ら 2003) のような主要作物において報告されており、そのほとんどの研究からは倒伏性に関する QTL と草丈に関する QTL はリンクしているもしくは同じ領域に位置するということが示されている。

実際に QTL 解析を行う際に使用する分離世代には F_1 、 F_2 、 BC_1 、DH など数種の集団タイプが存在し、それぞれの植物の性質(自殖性及び他殖性)や解析目的などによって分離世代を養成する。イタリアンライグラスの場合、他殖性なので pseudo-testcross 法による F_1 タイプの分離世代を使用する。

QTL 解析により得られた結果について遺伝育種学的な考察を行うために遺伝効果(相加効果、優性効果、エピスタシス)を推定することが重要となる。相加効果(additive effect)は例えばある対立遺伝子について両親の遺伝子型がそれぞれ A_1A_1 、 A_2A_2 のようなホモ接合型るとき、 A_2A_2 の 1 つだけを A_1 に置き換えたときの量的形質に生じる変化量のことをいう。また $A_1A_1 \times A_2A_2$ の F_1 、 A_1A_2 から両親の遺伝子型値の平均を引いた値(普通は交互作用があるため等しくはならない)を優性効果(dominance effect)という。エピスタシス(epistasis)とは異なる遺伝子座において交互作用がある場合のその遺伝子間の効果をいう。本研究の場合、イタリアンライグラスは他殖性のため両親の遺伝子型はヘテロであり、また短年性であることから植物体を長期間維持することが困難なため、ホモ型とヘテロ型、及び後代との比較が出来ず相加効果及び優性効果は推定出来ない。しかしながら BC_1 アルゴリズムでの QTL 解析では相加効果は得ることができる。

古くから行われてきた育種は表現型によるもので、実際に植物を選抜に適した時期(例えば早晚性や耐倒伏性の選抜には出穂期または開花期)まで栽培しなければならず、また選抜のための条件(例えば病害抵抗性の検定には病菌、害虫の接種、検定、評価のための特別検定圃場)を整えることに労力及びコストを費

やしてきた。また選抜された個体については表現型値の評価は可能だが目的形質に関する遺伝子座のうちどれが実際に選抜されたのか、その遺伝子座はホモなのかヘテロなのかについては不明である。また選抜してからも結果の評価に何年もの検定が必要である。それに比べて DNA マーカー利用選抜(MAS)は植物材料を幼苗の段階で DNA を抽出、解析することで目的とする形質に緊密に連鎖する DNA マーカーについてゲノムレベルでの選抜を行うもので、特定の DNA マーカーについてのみ実験室で選抜すれば良く、選抜の場を設けることも時期を選ぶことも必要ない。また条件の設定が困難で再現が難しい形質(耐干性や耐病性など)の選抜にとっては有利であり、得られたデータは環境の影響を受けることなく確実な評価へつながる。このことから MAS は選抜過程の短縮やコスト低下などの育種条件の向上に大変有用な手段である。

近年、作物における量的形質の選抜に MAS を利用しようと様々な研究がなされており、その中のいくつかで MAS と従来の表現型値による選抜との比較について対象となる形質の遺伝率に関係があるという報告がなされている (van Berloo と Stam 1999、Fazio ら 2003、Flint-Garcia ら 2003)。遺伝率 (heritability) とは子供が親に似る度合いを示す統計量で、育種における選抜の難易を示す指標として用いられる。遺伝率が 1 に近いほどその形質の選抜は確実であり、0 に近いほど不確実になる。そこで第 2 章では耐倒伏性関連マーカーの特定、及びそれらの検証を行い、また MAS の結果と形質の遺伝率との関係についても考察した。

第 1 章では他殖性牧草であるイタリアンライグラスの耐倒伏性に関する染色体上の領域を明らかにするために 8 つの形質—出穂日、草丈、稈の重さ、稈径、折損抵抗性、分けつ数、押し倒し抵抗性、及び圃場での倒伏性の評価を two-way pseudo-testcross F_1 集団を用いて行った。また耐倒伏性に関連する形質の推定

QTL の位置と寄与率について述べ、その結果と他の作物での耐倒伏性の QTL の結果とを比較した。

第 2 章ではこの一連の研究から得られた結果を研究の最終目的であるイタリアンライグラス育種へ利用するために有望マーカーの選出、及びその効果を検証するための再現性及び有用性の試験を行った。

第1章 耐倒伏性関連形質の QTL 解析

1.1 材料及び方法

1.1.1 植物材料

イタリアンライグラス品種“ニオウダチ”(ND; 倒伏に耐性がある品種)と“新潟早生”(NW; 倒伏しやすい品種)との単交配から作出した two-way pseudo-testcross F_1 集団 (NN 集団) 220 個体を特性調査に使用した。QTL 解析にはそのうちの 82 個体を使用した。単交配に用いた NN 集団の親には ND から耐倒伏性の最も強い個体を NW から耐倒伏性の最も弱い個体を選んだ。

1.1.2 形質データの収集

NN 集団と親品種各 32 個体(他殖性のため F_1 集団の作成に使用した個体ではない)は飼料作物研究所(栃木県西那須野町)にて栽培され、2000 年の 4 月から 5 月にかけて評価された。イタリアンライグラスは他殖性の自家不和合性でまた短年性あることから表現型評価は反復無しの 1 回限りとした。すべての材料は 1999 年 9 月 15 日に温室内のペーパーポットに播種し、1999 年 10 月 15 日に圃場へ畦間 80 cm、株間 60 cm で移植した。施肥は 100 m² あたり窒素、リン、カリウムをそれぞれ 1 kg ずつ行った。

過去に発表された論文(大山と石黒 1986、杉信ら 1989a、b)と本研究の予備実験の結果(Gao ら未発表)をもとに品種レベルで耐倒伏性について有意な相関が見られた形質を耐倒伏性評価のための形質として選んだ。具体的には草丈(PH; plant height)、稈の重さ(CW; culm weight)、稈径(CD; culm diameter)、折損抵抗性(CS; culm strength)、分けつ数(TN; tiller number)、押し倒し抵

抗性 (CPR; culm pushing resistance)、出穂日 (HD; heading date) について調査し、押し倒し抵抗性を除く 6 形質はいずれも出穂後に調査した。また倒伏程度 (LS、1=直立、9=倒伏) は 9 段階の評点法を用い、降雨及び強風後に評価した。評価実施日は 4 月 22 日、5 月 2、3、13、14、15、21、25 日、6 月 25 日の計 9 回 (Table 8)。

また評価法は簡単に Table. 8 で述べた。折損抵抗性値の計測はデジタルフォースゲージ FGX-0.5 (日本電産シンプ株式会社) を用い、根元から切り取った茎について根元側を固定し、固定点から 20 cm の位置で茎を引っ張って茎が折れたときの力 (gf) を計測した。折損抵抗性値は 1 植物個体中の 10 茎について計測し、その平均値とした。押し倒し抵抗性値はバネ秤式倒伏試験器 DIK-7401 (大起理化工業株式会社) を用い、出穂前に計測した。計測は植物体の地際から 20 cm の位置に試験器を当て、植物体を 45° に倒したときの重さ (g) を計測した。また、押し倒し抵抗性値は 100 茎当たりの重さに換算した。

Table 8. The traits related to lodging resistance evaluated in the F₁ mapping population.

Trait	Observation criteria	Evaluation method
Culm diameter (CD)	Measured in mm	The average of five basal culms per plant, measured two time at cross direction per plant
Culm pushing resistance (CPR)	Measured in gram	Degree of the culm's strength for whole plant, see methods
Culm strength (CS)	Measured in gf	Degree of the individual culm strength, the average of 10 culms per plant, see methods
Culm weight (CW)	Measured in gram	The average of five culms weight per plant
Heading date (HD)	Days	The days to panicle emergence from April 1
Lodging scores (LS)	1: erection – 9: lodging	Scored 9 times
Plant height (PH)	Measured in cm	Measured the distance from the ground to the top of the panicle
Tiller number (TN)		The number of all tillers

1.1.3 データ解析

それぞれの形質のヒストグラム及び形質相関は StatView ソフトウエア（SAS Institute Inc. Cary, NC, USA）によって算出した。

また本研究では他殖性の QTL 解析が可能なソフトウェア (MAPL や MapQTL) のうち耐倒伏性のようなノンパラメトリック解析を必要とする QTL 解析に使用される MapQTL (van Ooijen と Maliepaard 1996) を用いた。また形質の分布において倒伏程度以外に正規分布の得られたすべての形質については区間マッピング (interval mapping) 法によりフランキングマーカ (flanking marker) を検出した。正規分布の得られなかった倒伏程度についてはシングルポイント (single point) 解析によりマーカー単位で QTL の検出を行った。どちらも CP アルゴリズムによる QTL 解析を行った。有意な QTL の閾値として LOD 値 3.0 以上を採用し、その際、LOD 値の -1 の範囲を信頼区間とした。

次に検出された QTL の偽陽性を避けるために解析したデータの優性遺伝子座 (分離比 1:1) について、作成した統合地図を母型及び父型に分け、BC₁ アルゴリズムの区間マッピング法にて再度 QTL 解析を行い、CP アルゴリズムにより得られた QTL と同じ領域に QTL が得られるか確認した。このときの LOD 値の閾値を 1.9 以上 (van Ooijen 1999) とした。

QTLs の表記は McCouch ら (1997) によって書かれた規定に準じた。

1.2 結果及び考察

1.2.1 形質の分布と相関

倒伏程度を除く 7 つの形質について F₁ 集団及びその親の 2 品種 (ND 及び NW) の特性調査を行った (Fig. 9)。F₁ 集団においては 7 つのすべての形質について正規分布を示した。また親集団においては出穂日を除くすべての形質で正規分布を示した。Fig. 9 のように親集団において分布の幅が広いのは他殖性の高いヘテロ性によるものであると考えられる。また稈重、稈径、折損抵抗性、押し倒し抵抗性ではニオウダチと新潟早生の分布に明らかな差が見られた。F₁ 集団の分布では稈重、稈径、折損抵抗性は新潟早生分布に偏り、押し倒し抵抗性はニオウダチ、新潟早生分布の間に分布した。

Fig. 10 では F₁ 集団の倒伏程度の評点の分布を日付順に示した。ほとんどの個体において 4 月 22 日及び 5 月 2 日では倒伏が見られていない。しかしながら次の日の 5 月 3 日には約半数が倒伏し、5 月 13 日以降には大部分の個体で倒伏が見られた。Fig. 10 から推測すると圃場での倒伏による分離が見られたのは 5 月 3 日あたりだと思われる。

次に形質間での相関について見たところ、倒伏程度を除く 7 つの形質について出穂日／稈径、出穂日／押し倒し抵抗性、出穂日／稈重、分げつ数／稈重、分げつ数／草丈を除くすべての組合せにおいて有意な相関が見られた (Table 9)。中でも高い相関を示したのは折損抵抗性／稈径、稈重／稈径、稈重／折損抵抗性であった。

倒伏評価を実施した 7 日間すべてにおいて倒伏程度間で有意な相関が見られた。また倒伏程度内において倒伏程度の評価された日付が遅くなるにつれ他の組合せに比べ高い相関が示された。

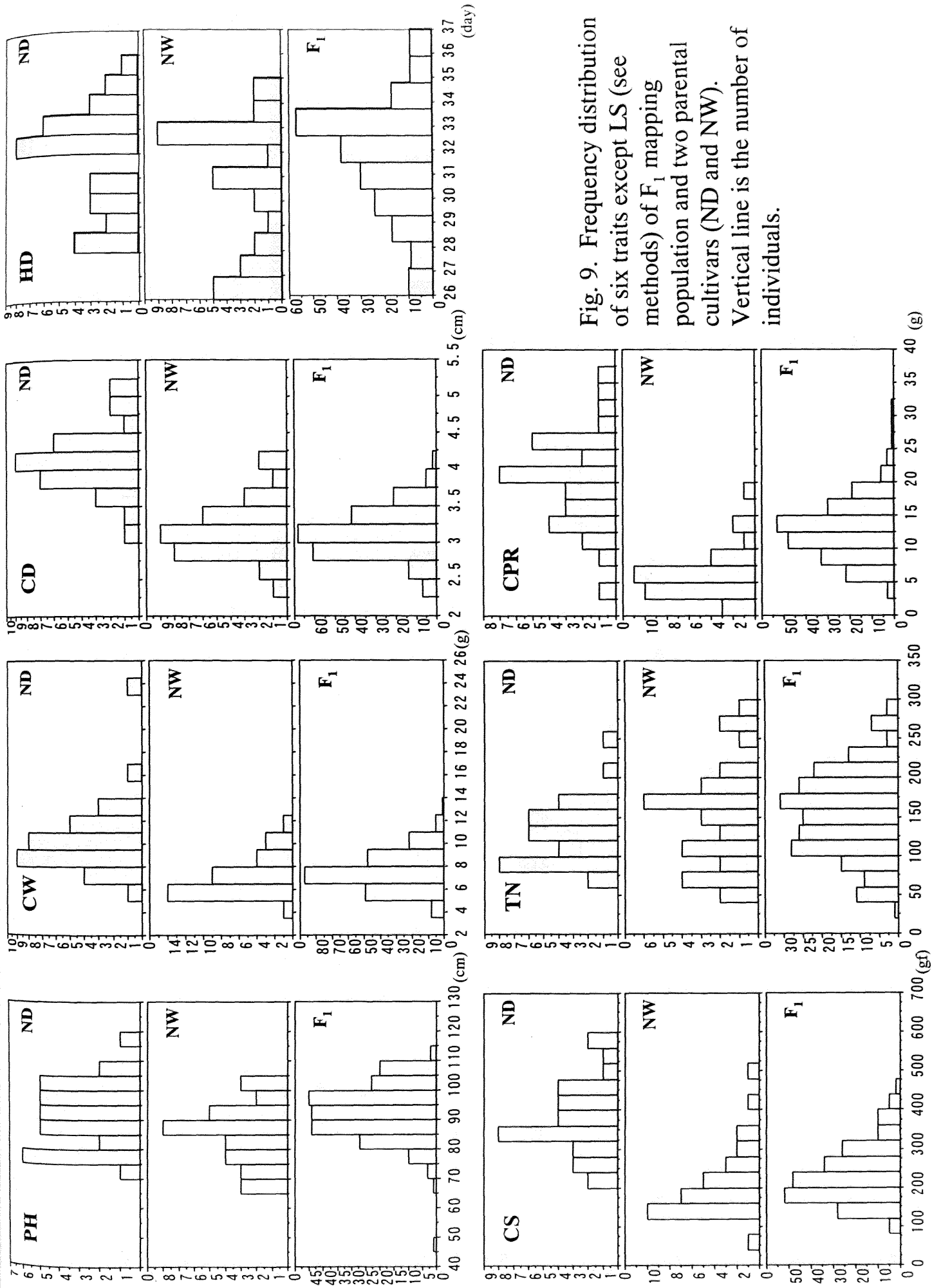


Fig. 9. Frequency distribution of six traits except LS (see methods) of F₁ mapping population and two parental cultivars (ND and NW). Vertical line is the number of individuals.

Number of individuals

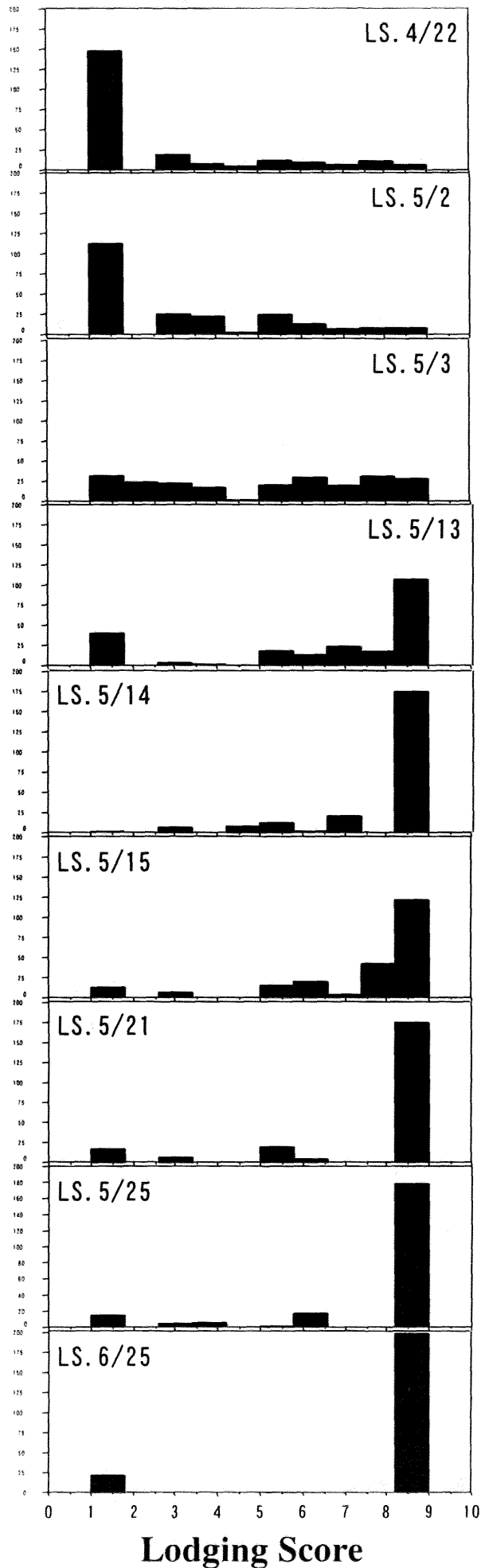


Fig. 10. Frequency distribution of lodging score (LS, see Methods) of F_1 mapping at nine evaluated times. Vertical line is the number of individuals, and horizontal line is the values of lodging score, 1- resistant, 9- susceptible.

Table 9. Correlation coefficients between all traits evaluated in the F₁ mapping population.

	CD	CPR	CS	CW	HD	PH	TN	LS										
								4/22	5/2	5/3	5/13	5/14	5/15	5/21	5/25			
Culm diameter (CD)																		
Culm pushing resistance (CPR)	0.436**																	
Culm strength (CS)	0.751**	0.420**																
Culm weight (CW)	0.686**	0.214**	0.753**															
Heading date (HD)	0.092ns	-0.015ns	0.136*	0.107ns														
Plant height (PH)	0.357**	0.352**	0.269**	0.383**	-0.250**													
Tiller number (TN)	-0.302**	-0.186**	-0.261**	-0.115ns	-0.240**	0.132ns												
LS (Lodging score), 4/22	-0.250**	-0.388**	-0.122ns	0.135*	0.076ns	-0.129ns	0.256**											
LS (Lodging score), 5/2	-0.344**	-0.466**	-0.265**	-0.014ns	-0.045ns	-0.135*	0.487**	0.607**										
LS (Lodging score), 5/3	-0.294**	-0.393**	-0.265**	0.022ns	-0.194*	-0.054ns	0.590**	0.443**	0.612**									
LS (Lodging score), 5/13	-0.293**	-0.257**	-0.287**	-0.121ns	-0.089ns	0.204**	0.359**	0.226**	0.317**	0.467**								
LS (Lodging score), 5/14	-0.170*	-0.168*	-0.131ns	-0.018ns	-0.112ns	0.280**	0.326**	0.142**	0.229**	0.342**	0.591**							
LS (Lodging score), 5/15	-0.211**	-0.197**	-0.230**	-0.060ns	-0.109ns	0.333**	0.310**	0.204**	0.254**	0.332**	0.668**	0.811**						
LS (Lodging score), 5/21	-0.197**	-0.151*	-0.247**	-0.092ns	-0.096ns	0.242**	0.340**	0.163*	0.200**	0.332**	0.617**	0.710**	0.784**					
LS (Lodging score), 5/25	-0.245**	-0.226**	-0.324**	-0.141*	-0.132ns	0.203**	0.338**	0.162*	0.245**	0.391**	0.670**	0.724**	0.795**	0.844**				
LS (Lodging score), 6/25	-0.093ns	-0.044ns	-0.023ns	0.029ns	-0.100ns	0.177**	0.201**	0.161*	0.174*	0.327**	0.506**	0.416**	0.423**	0.387**	0.358**			

*, ** and ns: Significant at the 0.05, 0.01 probability level and not significant, respectively.

7つの形質のうち稈重と出穂日及び6月25日の倒伏程度を除くすべての形質間での相関のほとんどで有意性が認められた。これはコムギについて Keller ら (1999) が、イタリアンライグラスについては杉信ら (1989a) が発表した出穂日と倒伏評価との間には有意な相関があるという結果と異なる。

1.2.2 QTL 解析

稈重を除くすべての形質に関して LOD 値 3.0 以上で合計 17 個の QTL を MapQTL のインターバルマッピングにて検出した (Table 10, Fig.11)。そのうち押し倒し抵抗性の 6 つの QTL が LG1、LG4、LG5、LG6 の 4 連鎖群で検出され、それらの寄与率の範囲は 23.8%から 49.9%であった。また草丈の 5 つの QTL が LG1、LG4、LG5、LG7 の 4 連鎖群で検出され、それらの寄与率の範囲は 15.8%から 39.1%であった。分けつ数の 2 つの QTL は LG2 と LG7 で検出され、寄与率はそれぞれ 44.3%と 17.9%であった。出穂日の 2 つの QTL は LG6 と LG7 で検出され、寄与率はそれぞれ 28.9%と 24.3%であった。稈径と折損抵抗性の QTL は LG4 でそれぞれ 1 つずつ検出され、寄与率はそれぞれ 17.0%と 18.8%であった。また稈重については有意な QTL は検出されなかった。

検出された 17 個の QTL の中で qPH5、qPH7、qCPR4 の 3 つの QTL のフラッキングマーカーは MapQTL の CP アルゴリズムによるシングルポイント解析 (Kruskal-Wallis test) では有意性が確認されなかった(データは載せていない)。CP アルゴリズムによって検出されたすべての QTL が本当に存在するかどうか確認するために統合した連鎖地図を両親ごとの連鎖地図に分け、BC1 アルゴリズムによって再度解析を行った。これにより合計 13 個の QTL が検出された (Table 10)。そのうちの 11 個は CP アルゴリズムで検出されたものと同じ領域で検出された。qCPR5-2 と qCPR5-3 は母、父両連鎖地図において検出され、

Table 10. Putative QTLs related to lodging detected by interval mapping under CP algorithm and single point analysis under BC algorithm in the F₁ mapping population.

Traits	QTL	Origin ^a	Flanking markers	Linkage group	LOD score	Explanation %	Value of marker class		Additive effect
							Aa	aa	
CD	qCD4	CP	tp1k123- IRG252-2	4	3.2	17.0			
CPR	qCPR1	CP	tp4d307- IRG303-2	1	3.1	33.9			
		BC, female			2.7	13.7	10.9 ^b	14.9 ^b	3.7
	qCPR4	CP	tp3d303- tp1d302	4	3.4	27.3			
	qCPR5-1	CP	tp4d303- IRG320	5	4.8	23.8			
	qCPR5-2	CP	CDO459- CDO202-2	5	5.6	31.8			
		BC, female			4.0	33.6	11.0 ^b	15.0 ^b	3.6
		BC, male			2.4	14.7	10.9 ^b	14.9 ^b	3.6
	qCPR5-3	CP	tp3d21- AGG-CGG3	5	6.7	49.9			
		BC, female			2.5	13.1	11.1 ^b	14.8 ^b	3.6
		BC, male			2.7	13.9	10.9 ^b	15.1 ^b	3.8
	qCPR6	CP	AGA-AAT8- AAT-TAG7	6	3.1	25.8			
CS	qCS4	CP	IRG252-1- IRG250-2	4	3.6	18.8			
HD	qHD6	CP	CDO516-IRG144-1	6	4.2	28.9			
		BC, male			2.7	14.1	31.5 ^c	33.0 ^c	1.52
	qHD7	CP	tp3d27-tp4d224	7	3.2	24.3			
		BC, female			3.0	15.4	33.0 ^c	31.4 ^c	-1.6
PH	qPH1-1	CP	IRG303-2- IRG321-3	1	5.8	39.1			
		BC, female			2.0	10.4	90.7 ^c	84.7 ^c	-4.3
	qPH1-2	CP	tp3d23- AGG-CCA30	1	3.0	17.3			
		BC, female			2.1	12.4	84.0 ^c	89.8 ^c	5.8
	qPH4	CP	IRG123- IRG173	4	3.0	15.8			
	qPH5	CP	IRG37-5- IRG37-4	5	5.5	36.4			
	qPH7	CP	IRG4-1- AAT-AAG9	7	3.9	28.0			
TN	qTN2	CP	CDO345- AAG-CCA6	2	3.7	44.3			
		BC, female			2.3	11.9	125.7	157.1	35.5
	qTN7-1	CP	IRG136-3- IRG94	7	3.4	17.9			
		BC, male			3.0	17.2	118.1	162.4	40.8
	qTN7-2	BC, male	IRG60-4- tp1d306	7	2.0	39.2	156.9	122.6	-33.5
	qTN7-3	BC, male	AGA-CCT4- IRG91-6	7	1.9	12.1	156.6	124.2	-32.4

^aCP-cross pollination algorithm of MapQTL, BC-backcross algorithm of MapQTL

^bMeasured in gram

^cMeasured in cm

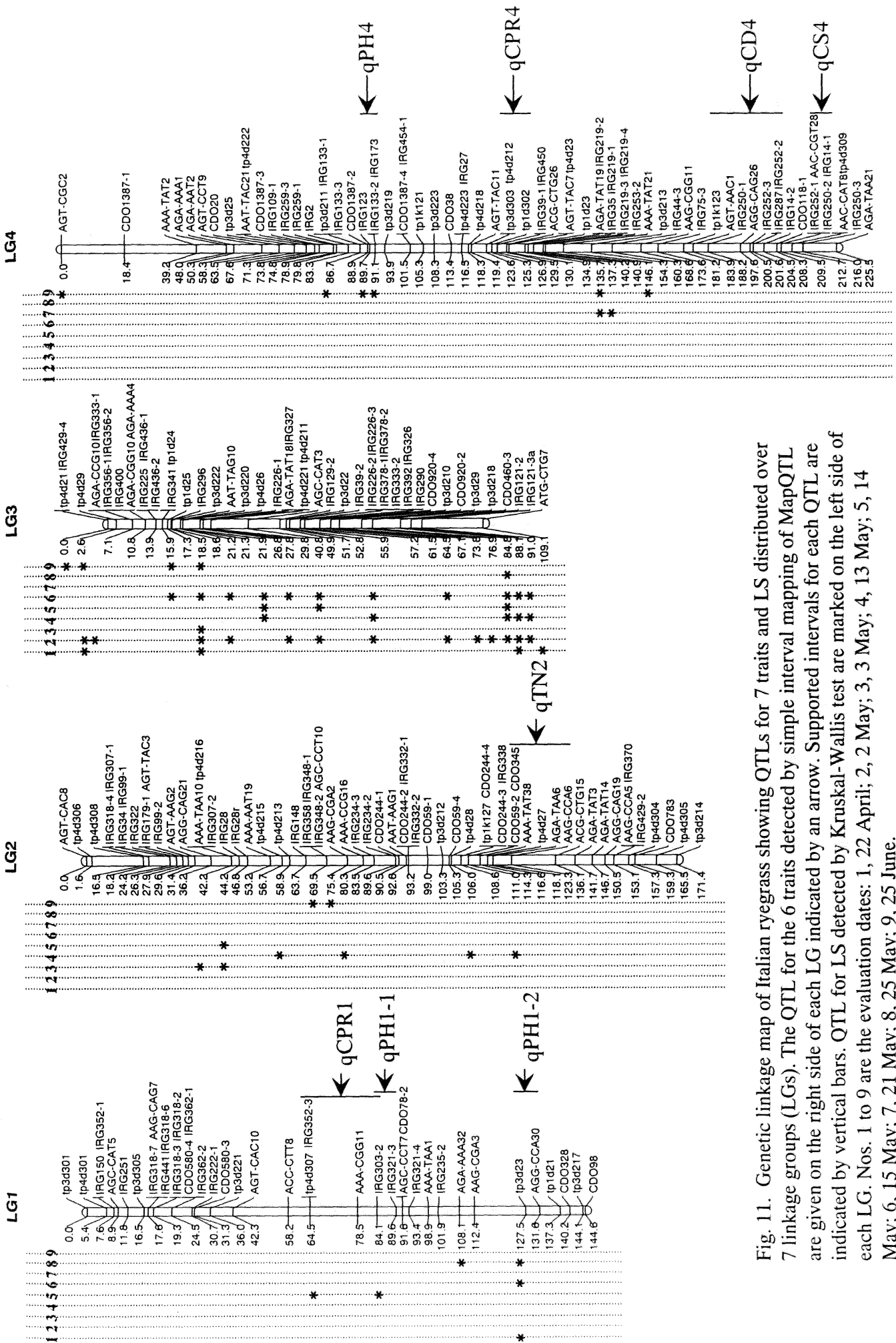
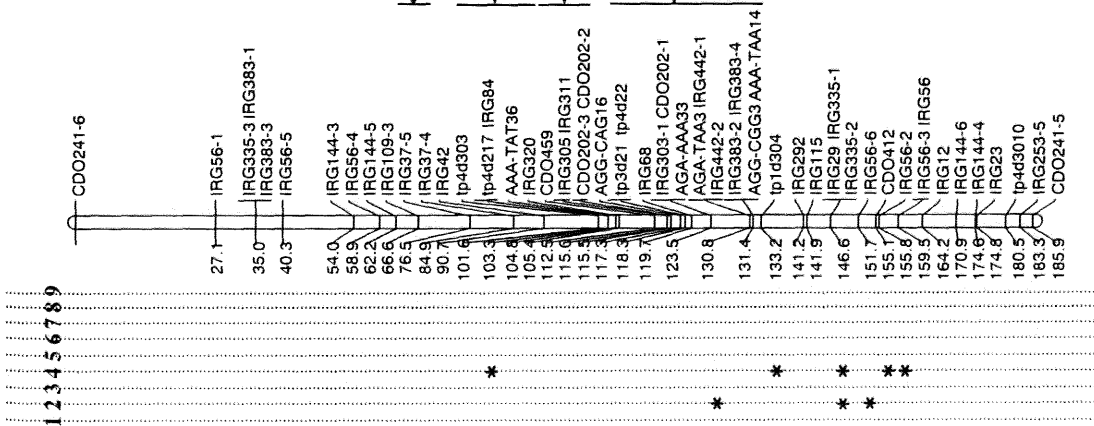
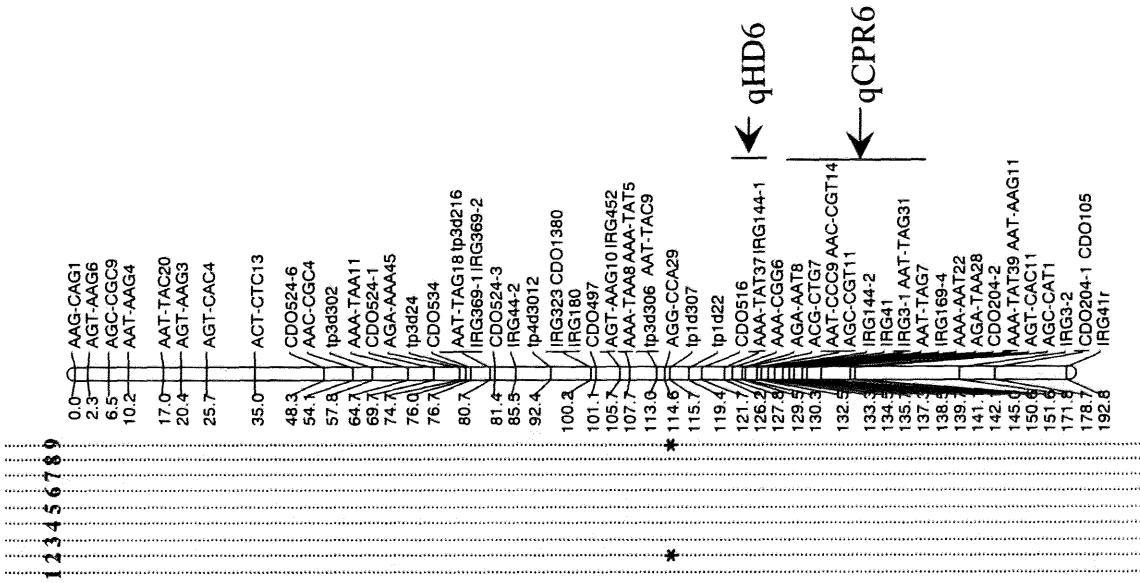


Fig. 11. Genetic linkage map of Italian ryegrass showing QTLs for 7 traits and LS distributed over 7 linkage groups (LGs). The QTL for the 6 traits detected by simple interval mapping of MapQTL are given on the right side of each LG indicated by an arrow. Supported intervals for each QTL are indicated by vertical bars. QTL for LS detected by Kruskal-Wallis test are marked on the left side of each LG. Nos. 1 to 9 are the evaluation dates: 1, 22 April; 2, 2 May; 3, 3 May; 4, 13 May; 5, 14 May; 6, 15 May; 7, 21 May; 8, 25 May; 9, 25 June.

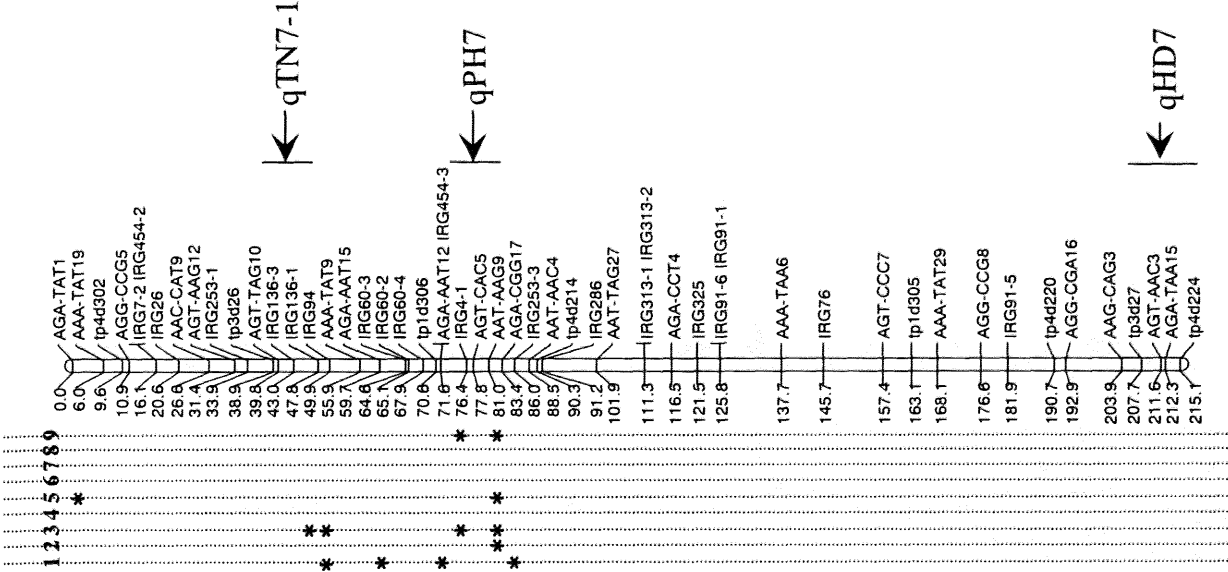
LG5



LG6



LG7



他7つのQTLはどちらか片方の親の連鎖地図でのみ検出され、分けつ数の2つのQTL、qTN7-2及びqTN7-3はBC1アルゴリズムによってのみ検出され、CPアルゴリズムでは検出されなかった。CPアルゴリズムでは有意差が見られなかったqPH5、qPH7、qCPR4のQTLのフランキングマーカ―はBC1アルゴリズムによっても有意差は確認されなかった。

倒伏程度に関してはヒストグラムが正規分布を示さなかったために倒伏程度のQTL検出にはノンパラメトリックKruskal-Wallis testのみを行った。有意水準1%にて確認された領域をFig.11に示した。日付順に見ていくと4月22日に9個、5月2日に18個、5月3日に7個、5月13日に14個、5月14日に8個、5月15日に12個、5月21日に2個、5月25日に3個、6月25日に15個のQTLが検出された。倒伏程度のQTLのいくつか（例えばqPH1-2 (LG1) やqPH7 (LG7) 付近のQTL)は他の形質のQTL領域と同じところに位置していることが確認された。倒伏程度のQTLのほとんどがLG3で検出された。LG3においてインターバルマッピングでは他の形質のQTLは検出されなかったが、シングルポイント解析ではいくつか有意なマーカ―が確認された（データは載せていない）。

1.2.3 耐倒伏性と草丈の相関関係

多くの研究において倒伏性と草丈のQTLはリンクもしくは同じ領域に位置しているという報告がなされている（Mansurら1993、Backesら1995、Hayesら1995、Leeら1996、Tinkerら1996、Kellerら1999、Börnerら2002、Tar'anら2003）。本研究の結果でもLG1、LG4、LG5、LG7で倒伏程度のQTLが草丈のQTL付近で確認されている（Fig.11）。また押し倒し抵抗性のQTLもLG1、LG4、LG5で草丈のQTLと部分的に重なっているもしくはその付近に有るとい

うことが確認された。

1.2.4 本研究結果と他の作物における耐倒伏性関連 QTL との比較

イタリアンライグラスにおけるゲノム研究はマーカーの開発だけでなく QTL 解析において他の主要作物よりも大きく遅れをとっている。しかしながら最近の研究においてイタリアンライグラスとコムギ、イネ間のシンテニーについての報告がなされた(Jones et al. 2002)。このような研究によりコムギ、トウモロコシ、イネのような主要作物で発表されている QTL 情報を将来イタリアンライグラスの QTL 解析の促進に役立てていけるだろう。

Börner ら (2002) はコムギにおいて倒伏性に関する 3 つの QTL を第 2 染色体で 2 つ、第 6 染色体で 1 つ検出している。本研究の結果からも押し倒し抵抗性の QTL、*qCPR6* がコムギの第 6 染色体とシンテニーの見られる LG6 にマップされている。

植物の細胞壁の重要な構成要素としてリグニンが挙げられる (Moore と Hatfield 1994) が、リグニン合成は茎の堅さと関係があるのではないかということが長い間提唱されてきた。トウモロコシの *brown-midrib mutants* においてリグニンレベルの減少が観察され、それらはまた茎の強さの減少にも結びついていた (Kuc と Nelson 1964、Kuc ら 1968、Gentinetta ら 1990)。Cardinal ら (2003) はトウモロコシのリグニン含量と繊維に関係する 65 個の QTL を検出した。そのうち第 5 染色体に位置する *acid detergent lignin* の QTL の 1 つは本研究結果で得られた LG6 の押し倒し抵抗性の QTL の近傍であった。本研究において検出された QTL 及び他の作物で検出された QTL とを比較するにはそれぞれの QTL 領域内のより詳細なシンテニー情報が必要となる。そのためには今後より多くの共通な RFLP や EST 等のマーカーのマッピングが必要である

と思われる。

本章において検出された合計 17 個の QTL のうち 9 つの QTL(qCPR1、qCPR5-2、qCPR5-3、qHD6、qHD7、qPH1-1、qPH1-2、qTN2、qTN7-1)に関しては BC1 アルゴリズムによるシングルポイント解析でも同じ領域に QTL が検出されている。これらの QTL のフランキングマーカーはイタリアンライグラスの耐倒伏性についてのマーカー利用選抜において今後有力なマーカーとなることが期待される。

第2章 作成したマーカーによる幼苗選抜の試み

2.1 材料及び方法

2.1.1 植物材料

本研究において連鎖地図作成に使用した NN 集団 220 個体のうち地図作成に使用していない残り 123 個体をマーカーの再現性試験に使用した。また、マーカーの有用性についての試験を行うために佐々木亨博士ら(日本草地畜産種子協会飼料作物研究所)により改良された耐倒伏性改良 27 母系より作成された耐倒伏性選抜集団より第 1 次選抜された 49 個体を供試した。またこの集団は日本草地畜産種子協会飼料作物研究所(栃木県西那須野町)にて 2002 年の 10 月から 2003 年の 5 月にかけて圃場で栽培され、耐倒伏性について評価された。栽培様式は畦間 75 cm、株間 40 cm、施肥は 100 m²あたり窒素、リン、カリウムをそれぞれ 0.8 kg ずつ行った。

2.1.2 TAS、AFLP 解析

McCouch ら(1988)の方法に従い、育成された 1 次選抜個体の葉片から DNA を抽出し、TAS 及び AFLP 解析を行った(第 1 部第 1 章、材料及び方法を参照)。また AFLP 解析に使用したプライマー組合せは P04M10 である(Table 2)。TAS マーカー解析に使用したプライマー組合せは TP3D2 である(Table 4)。

2.1.3 使用したマーカー及びマーカーの有意性の判定

マーカーの再現性試験に用いた 2 種類のマーカーのうち 1 つはテロメリックマーカー tp3d21 で LG5 に座乗し、押し倒し抵抗性 QTLqCPR5-3 のフランキング

マーカーで寄与率は 37%である (Fig. 12)。tp3d21 マーカー付近には別の 2 つの押し倒し抵抗性 QTLqCPR5-1 及び qCPR5-2 が存在し、(Fig. 12)それぞれの LOD 値は 4.84、5.59、寄与率はそれぞれ 23.8%及び 31.8%である。qCPR5-3 内のマーカーには LOD 値 6.66 寄与率 49.9%の IRG68 マーカーが含まれていた。このマーカーは RFLP マーカーであり、本研究の STS 化の結果で示した 2 つの SSR マーカーのうちの 1 つであるが設計したプライマーでは PCR 増幅が見られず(Fig. 7)使用することが出来なかったため、IRG68 マーカーから 1.4 cM 離れている tp3d21 マーカーを使用した。なお、qCPR5-3 領域の長さは 13.1 cM である。

もう 1 つは AFLP マーカー AAC-CGT14 で LG6 に座乗し、押し倒し抵抗性 QTLqCPR6 の領域内のマーカーで寄与率は 25.8%である。AAC-CGT14 以外にも 2 つのマーカー AAT-CCC9 と AGC-CGT11 が同じ場所、同じ LOD 値(3.11)の同じ寄与率(25.8%)で座乗している。これら 3 マーカーは領域内で最も寄与率の高いマーカーである。

マーカーデータは tp3d21、AAC-CGT14 とともに<lm×ll>で記録した。両マーカーとも優性マーカーであること、集団解析の結果分離比はほぼ 1:1 になること、QTL 解析の結果、バンドが無い個体は押し倒し抵抗性の値が増加する＝耐倒伏性であることから、両マーカーはおそらく劣性ホモのときのみ耐倒伏性を示すと考えられる。

マーカーデータ及び形質データの統計解析は Excel 統計によって処理された。

2.1.4 圃場における選抜法

再現性試験における押し倒し抵抗性の調査は出穂前にバネ秤式倒伏試験器 DIK-7401(大起理化工業株式会社)を用いて行った(第 2 部第 1 章、材料及び方法

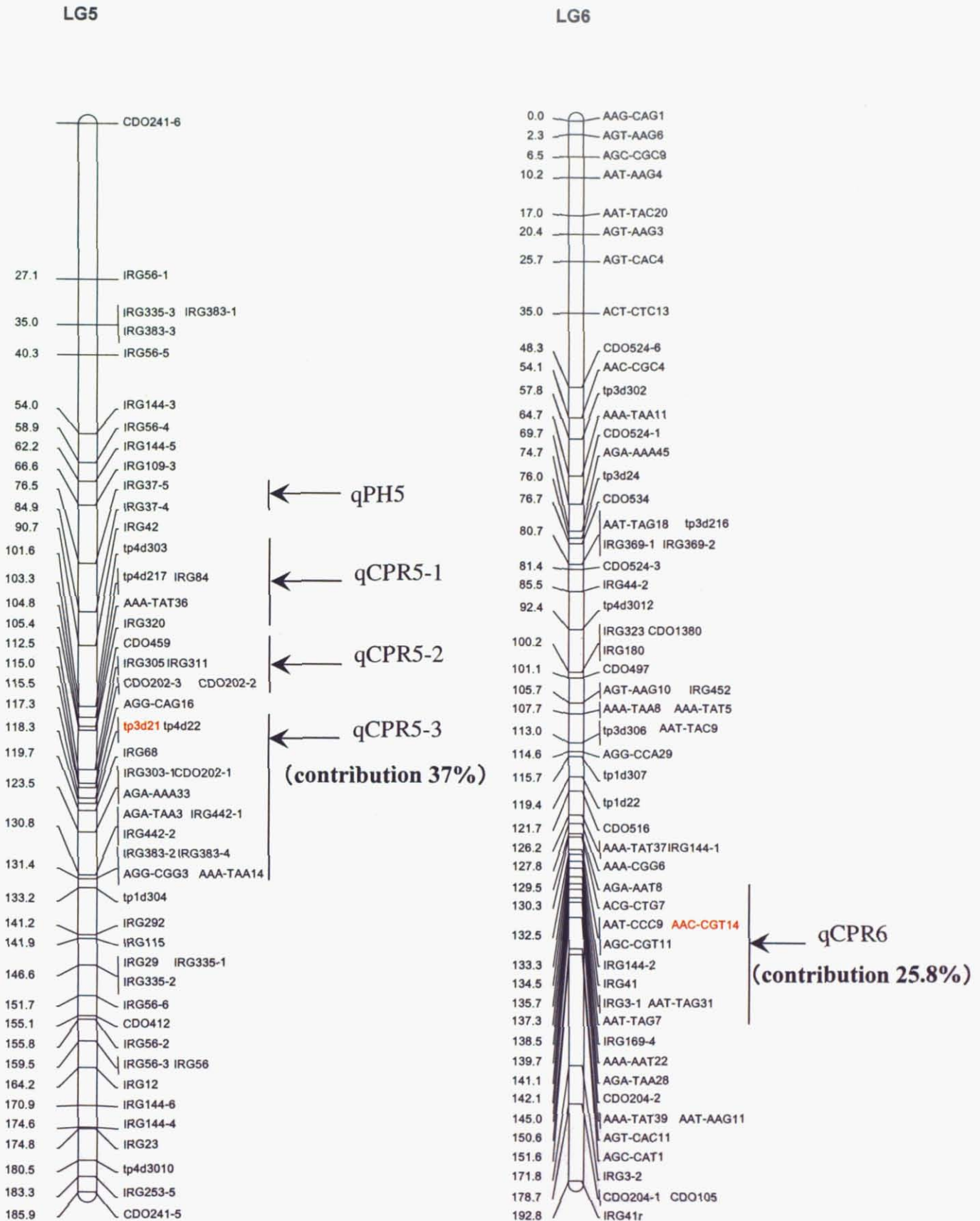


Fig. 12. The position and the contribution of the markers used for MAS. Red ones were actually used for MAS. tp3d21 and AAC-CGT14 were TAS and AFLP markers, respectively.

を参照)。

耐倒伏性選抜集団における圃場での第 1～3 次選抜は佐々木亨博士により表現型についてのみ行われた。具体的な調査形質は評点による倒伏調査、草勢、耐病性、出穂始めである。

2.2 結果及び考察

2.2.1 マーカーの再現性試験

NN 集団の 123 個体について再現性試験を行った。Table 11 ではそれぞれのマーカーの効果とマーカー毎のバンドの有無による CPR 値の違いを表している。TAS 解析の結果、123 個体のうち tp3d21 マーカーのバンドの見られなかった 60 個体について押し倒し抵抗性値の平均は 13.49g であった(Table 11)。またバンドの見られた 63 個体の押し倒し抵抗性値の平均は 11.52g であった。また AFLP の結果、AAC-CGT14 マーカーのバンドの見られなかった個体は 123 個体中 63 個体で、そのときの押し倒し抵抗性の平均値は 12.49g、またバンドが見られたときの押し倒し抵抗性の平均値は 12.47g であった。QTL 解析の結果から、tp3d21 および AAC-CGT14 は相反のマーカーであることからバンドが無いものは倒伏に強い、つまり押し倒し抵抗性値が高くなる。今回の結果では tp3d21 についてはバンドがあるものと無いものの平均値に 1%の有意水準で有意差が見られたが、AAC-CGT14 では有意差は見られなかった。よって tp3d21 マーカーについては再現性があることが確認された。

Table 11. Reproducibility of the flanking markers (tp3d21 and AAC-CGT14) of QTL for CPR.

Band pattern	Marker	
	tp3d21**	AAC-CGT14
-	13.49 ^a	12.49 ^a
+	11.52 ^a	12.47 ^a
Linkage	Repulsion	Repulsion

** : Significant at 0.01 probability level.

^a : Measured in gram

2.2.2 マーカーの有用性試験

耐倒伏性選抜集団より第1次評価された49個体についてtp3d21マーカーで解析を行った。その結果、49個体中23個体(47%)でバンドは見られなかった(Table 12)。その後佐々木氏によって49個体から表現型により30個体を選抜した。その結果、選抜された30個体のうちバンドが見られない個体が15個体(50%)含まれていた(Table 13)。最終的に1次評価でバンドの見られなかった23個体のうち15個体(65%)は3次評価まで選抜されたことになる。しかしながらこれらの数字は再現性が有意に見られたにもかかわらず思った以上に低く、マーカー自身の効果あまり見られなかった。Flint-Garciaら(2003)はトウモロコシの耐倒伏性に関する形質のMASにおいて集団由来のマーカーを使用したときのみMASの方が表現型による選抜より優れていたと報告している。本研究においても有用性という面から判断するとtp3d21は集団が変わると高い効果が得られない可能性があることが示唆された。

Table 12. Result of phenotypic selection vs MAS in lodging resistance breeding population.

Sample name	Lodging resistance in field	tp3d21 (LOD 5.59)
1	R	+
2	R	+
3	R	+
4		-
5		-
6	R	+
7		-
8	R*	-
9	R*	-
10		-
11		+
12	R*	-
13	R*	-
14	R	+
15	R	+
16		+
17	R*	-
18		+
19		-
20		+
21		-
22	R*	-
23	R	+
24	R	+
25		+
26		+
27	R	+
28	R	+
29	R*	-
30		+
31		+
32		+
33	R	+
34	R*	-
35	R	+
36	R	+
37	R	+
38		+
39		+
40	R	+
41	R*	-
42	R*	-
43		-
44	R*	-
45		-
46	R*	-
47	R*	-
48	R*	-
49	R*	-

* results of phenotype in field agree with that of MAS

R: lodging resistance

その原因としていくつか考えられることは、今回使用した選抜集団は耐倒伏性の選抜が 1998 年から行われており、ある程度耐倒伏性の選抜圧がかかっている。このため耐倒伏性遺伝子のより近傍マーカーでないと選抜できない可能性がある。tp3d21 は押し倒し抵抗性 QTL のフランキングマーカーであるが、今後押し倒し抵抗性遺伝子により緊密に連鎖するマーカーを作出する必要がある。

また耐倒伏性は量的形質であり、数多くの形質や要因が複雑に絡み合っているため、押し倒し抵抗性に関するただ 1 つのマーカーで選抜をしても不十分であるということが考えられる。耐倒伏性に関わるすべての形質の QTL が検出されることが理想であるが、それには様々な環境下(例えば複数の場所)で集団の特性調査及び QTL 解析を行うなど研究規模の拡大が必要となってくる。

また tp3d21 マーカーは優性マーカーであるため、集団が変わると分離しない場合があることが考えられる。その集団内に tp3d21 のアレルが無い場合は解析不可能である。もし共優性のマーカーがあればいくつかのアレルのうちどれかで解析が可能である。そのため今回検出された QTL 領域内をより詳細に解析し、使用可能な共優性のマーカーを作出することが必要であると思われる。

もう 1 つ考えられることは形質の遺伝子とマーカーとの間で組換えが起こっている場合である。組換えが起こると相反だったマーカーが相引のマーカーになる。このため逆の効果のものを選抜してしまう可能性が出てくる。

Table 13. No. of lodging resistant individuals selected based on phenotype and marker tp3d21.

1st selection in phenotype (in marker type)	3rd selection in phenotype (in marker type)	Final No. & % of selected for MAS
49 (23)	30 (15)	(15)/(23) 65%

2.2.3 形質の遺伝率と MAS の効果について

一般的に量的形質は質的形質に比べて遺伝率が低い(武田 1993)。また量的形質の中でも形(葉形や粒形など)に関する形質は遺伝率が高く、数(1株穂数や1穂粒数など)に関する形質は遺伝率が低い。一般的に MAS は遺伝率の低い量的形質を選抜するには効果的であると言われており、その結果を示す報告がいくつもある(Lande と Thompson 1990、Schneider ら 1997、Moreau ら 1998、Flint-Garcia ら 2003)。トウモロコシの茎の強さの指標となる Rind penetrometer resistance (RPR) は遺伝率が高く、供試した 3 集団のうち 2 集団においては表現型による選抜の方が MAS よりも優っていたと報告している(Flint-Garcia ら 2003)。また van Berloo と Stam (1999) はアラビドプシスの開花期について MAS を行ったが、MAS と表現型による選抜ではほぼ同じ結果が得られたと報告している。このときの開花期の遺伝率は高いことがわかっている。

耐倒伏性の遺伝率について杉信ら(1989)はイタリアンライグラスにおける耐

倒伏性の遺伝率は”ワセアオバ”が 0.263、”ワセヒカリ”は 0.220 と比較的低い値を示したと報告している。このことから今後の研究の進展によりイタリアンライグラスの耐倒伏性に関する MAS は効果が上がるのではないかと推測される。

総合考察

本研究はイタリアンライグラスにおける耐倒伏性関連形質の DNA マーカーの開発を目的として行った。現在までにイネ科植物において遺伝子連鎖地図の作成、目的形質の QTL 解析、それによりあがってきた DNA マーカーの検証という一連の研究についての報告がいくつかあるが、(Willcox ら 2002、Prasad ら 2003)本研究との大きな違いはイタリアンライグラスが他殖性であるために品種内でも常に遺伝的な多様性があり、ゲノムはヘテロ接合性であるということである。すなわちすべての遺伝子座でホモになるような遺伝的な純系(pure line)や組換え近交系(recombinant inbred line)が存在しない。このような遺伝様式を持つ他殖性植物について遺伝解析を行う場合、非常に重要なのは解析集団の作出であると思われる。最大限に変異の幅の大きい集団を作出し、そこからきれいな分離の見られる集団を選ぶことが大切である。材料が得られれば自殖性植物の遺伝解析と同様の実験を行うことが出来る。

本研究で作成した連鎖地図はイタリアンライグラスでは初めての RFLP マーカーベース連鎖地図である。RFLPは使用する DNA 量も多く、検出までの時間、費用の面でも他のマーカー作成手段に比べ不利な点があることから、マップベースとして RFLP マーカーを使用することはあまり多くない。しかしながら得られた RFLP マーカーはシンテニー研究や、ゲノム上のランドマークとしても使用できることから作成した地図は価値のあるものだと思っている。本研究では主にエンバクのアンカーマーカーが座乗し、イネのアンカープローブが座乗しなかったことは残念である。近縁種であるペレニアルライグラスにおいて多数のイネアンカーマーカーを連鎖解析に使用した結果、多くのマーカーが座乗したという報告がある(Sim ら 2003)。本研究では使用したイネアンカープローブ

ブの数が少なかったことも原因の1つであると考えられる。

形質に関しては耐倒伏性は極めて環境の影響を受けやすい複合形質であるが、現在いくつかの植物で研究されており、それらはそれぞれ植物の耐倒伏性を代表する形質を選び、その植物に合った特性調査方法を用いてデータを収集し解析している。QTL解析の結果、マーカーの寄与率が高ければそのQTLの信頼性は高くなる(Lee et al. 1996、Flint-Garcia et al. 2003a、b、c、Tar'an et al. 2003、Kashiwagi と Ishimaru 2004)。いくつかの形質のみで耐倒伏性のすべてを説明することは難しいが、少なくとも耐倒伏性を代表する形質のQTLとして価値のある結果を得ることが出来る。

本研究は限られた労力、時間等の制限の中で行われたものであるが、今後いくつかの組合せによる集団を用いて耐倒伏性のQTL解析をし、本研究で得られた以外のQTLをマッピングすることが出来れば、得られたすべてのDNAマーカーは今後のイタリアンライグラス及びその近縁種での育種に大きく役立つであろう。

現在までにイタリアンライグラスの耐倒伏性に関する形質のQTL解析の報告は無いが、本研究を通して他殖性植物の遺伝解析は自殖性植物のそれと何ら変わることなく行えるということが明らかとなった。今後は自殖性、他殖性問わずもっと幅広く研究が行われることを願っている。また今後このように遺伝様式を問わず解析材料として研究が進められれば、例えばQTLマッピングは遺伝子ターゲティングに、またMASによる選抜は全ゲノム選抜や近年需要が高まりつつある品種識別技術にと様々な研究への応用が期待される。またこれらすべての情報は今後の作物育種を大いに躍進させることは間違いないと確信している。

引用文献

- Aguilar EDB, Huyghe C, Ecalle C, Hacquet J, Julier B (2002) Effect of Cultivar and Environment on Seed Yield in Alfalfa. *Crop Sci.* 42: 45-50
- Ahn S, and Tanksley SD (1993) Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 7980-7984.
- Alm V, Fang C, Busso CS, Devos KM, Vollan K, Grieg Z, Rognli OA (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor. Appl. Genet.* DOI: 10.1007/s00122-003-1399-5.
- Altuschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Armstead IP, Turner LB, King IP, Cairns AJ, Humphreys MO (2002) Comparison and integration of genetic maps generated from F₂ and BC₁-type mapping populations in perennial ryegrass. *Plant Breed.* 121 (6): 501-507.
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Atkins IM (1938) Relation of certain plant characters to strength of straw and lodging in winter wheat. *J Agric Res* 56: 99-120
- Backes G, Graner A, Foroughi-Wwhe B, Fischbeck G, Wenzel G, Jahoor A (1995) Localization of quantitative trait loci (QTLs) for agronomic

- important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor. Appl. Genet. 90:294-302
- Barakat A, Carels N, Bernardi G (1997) The distribution of genes in the genomes of Gramineae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6857-6861.
- Beckmann JS, and Soller M (1986) Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. Euphytica, 35:111-124.
- Berhan AM, Hulbert SH, Butler LG, Bennetzen JL (1993) Structure and evolution of the genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. Theor. Appl. Genet. 86: 598-604.
- Bert PF, Charmet G, Sourdille P, Hayward MD, Balfourier F (1999) A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 99:445-452.
- Biessmann H and Manson JM (1994) Telomeric repeat sequence. Chromosoma 103: 154-161.
- Blake TK, Kadyrzhanova D, Shepherd KW, Islam AKMR, Langridge PL, McDonald CL, Erpelding J, Larson S, Blake NK, Talbert LE (1996) STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. Theor. Appl. Genet. 93: 826-832.
- Brady J (1934) Some factors influencing lodging in cereals. J. Agric. Sci. 24:209-231
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertson MC, Stuber CW (1988) Gene mapping with recombinant inbreds in maize. Genetics 118: 519-526.
- Börner A, Schumann E, Fürste A, Cöster H, Leithold B, Röder MS, Weber

- WE (2002) Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:921-936
- Cardinal AJ, Lee M, Moore KJ (2003) Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci affecting fiber and lignin content in maize. *Theor. Appl. Genet.* 106:866-874
- Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, Otoole JC, Huang N, McCouch SR (1995) Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 969-981
- Chen C, Sleeper DA, Johal GS (1998) Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. *Theor. Appl. Genet.* 97: 255-260.
- Cheung WY, Money TA, Abbo S, Devos KM, Gale MD, Moore G (1994) A family of related sequences associated with (TTTAGGG)_n repeats are located in the interstitial regions of wheat chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 245: 349-354.
- Crook MJ, Ennos AR (1995) The effect of nitrogen and growth regulations on stem and root characteristics associated with lodging in two cultivars of winter wheat. *J. Exp. Bot.* 46:931-938
- Easson DL, White EM, Pickles SJ (1993) The effects of weather, seed rate and cultivar on lodging and yield in winter wheat. *J. Agric. Sci.* 121:145-156
- Erpelding JE, Blake NK, Blake TK, Talbert LE (1996) Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley. *Genome* 39: 802-810.

- Fazio G, Chung SM, Staub JE (2003) Comparative analysis of response to phenotypic and marker-assisted selection for multiple lateral branching in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 875-883.
- Flint-Garcia SA, Darrah LL, McMullen MD and Hibbard BE (2003a) Phenotypic versus marker-assisted selection for stalk strength and second-generation European corn borer resistance in Maize. *Theor. Appl. Genet.* 107:1331-1336
- Flint-Garcia SA, Jampatong C, Darrah LL and McMullen MD (2003b) Quantitative Trait Locus Analysis of Stalk Strength in Four Maize Populations. *Crop sci.* 43:13-22
- Flint-Garcia SA, McMullen MD and Darrah LL (2003c) Genetic Relationship of Stalk Strength and Ear Height in Maize. *Crop sci.* 43:23-31
- Forster JW, Jones ES, Kolliker R, Drayton MC, Dumsday J, Dupal MP, Guthridge KM, Mahoney NL, van Zijll de Jong E, Smith K.F (2001) Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. *In: Molecular breeding of forage crops. Edited by Spangenberg G. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.* pp. 101-133.
- Gentinetta E, Bertolini M, Rossi T, Lorenzoni C, and Motto M (1990) Effect of brown midrib-3 mutant on forage quality and yield in maize. *J. Genet. Breed.* 44: 21-26
- Grattapaglia D, and Sederoff R (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus uraphylla* using a pseudo-testcross: mapping

- strategy and RAPD markers. *Genetics*, 137: 1121-1137.
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* 8: 299-309.
- Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowjak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ullrich SE, Wesenberg D, Kleinhofs A (1995) Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North America barley germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 87:392-401
- Hayward MD, Forster JW, Jones JG, Dolstra O, Evans C, McAdam NJ, Hossain KG, Stammers M, Will JAK, Humphreys MO, Evans GM (1998) Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breed.* 117:451-455.
- Helentjaris, T. 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends Genet.* 3:217-221.
- Heyland KU (1960) Ein Beitrag zur Methodik der Standfestigkeit-suntersuchung bei Winterweizen mit Hilfe der Knickfestigkeit des Halmes. *Z Acker-und Pflanzenbau* 111:321-333
- Hirata M, Fujimori M, Komatsu T (2000) Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Italian ryegrass. In: *Molecular breeding of forage crops 2000*, Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, pp. 19-24.
- Huang H, and Kochert G (1994) Comparative RFLP mapping of an allotetraploid wild rice species (*Oryza latifolia*) and cultivated rice (*O. sativa*). *Plant Mol. Biol.* 25: 633-648.
- Hutchinson J, Rees H, Seal AG (1979) An assay of the activity of supplementary DNA in *Lolium*. *Heredity* 43:411-421.

- Ikeda S, Takahashi W, Oishi H (2004) Generation of Expressed Sequence Tags from cDNA Libraries of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Grassland Science 49 (6):593-598
- Inoue T, Zhong HS, Miyao A, Ashikawa I, Monna L, Fukuoka S, Miyadera N, Nagamura Y, Kurata N, Sasaki T, Minobe Y (1994) Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. Theor. Appl. Genet. 89: 728-734.
- Jones ES, Dupal MP, Dumsday JL, Hughes LJ, Forster JW (2002b) An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor. Appl. Genet. 105:577-584.
- Jones ES, Dupal MP, Kolliker R, Drayton MC, Forster JW (2001) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Theor. Appl. Genet. 102:405-415.
- Jones ES, Mahoney NL, Hayward MD, Armstead IP, Jones JG, Humphreys MO, Kishida T, Yamada T, Balfourier F, Charmet G, Forster JW (2002a) An enhanced molecular marker-based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. Genome 45:282-295.
- Kashiwagi T, and Ishimaru K (2004) Identification and Functional Analysis of a Locus for Improvement of Lodging Resistance in Rice. Plant Physiology 134: 676-683
- Keller M, Karutz Ch, Schmid J E, Stamp P, Winzeler M, Keller B, Messmer MM (1999) Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating

- wheat × spelt population. *Theor. Appl. Genet.* 98:1171-1182
- Kuc J, Nelson OE, and Flanagan P (1968) Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry* 7: 1435-1436
- Kuc J, and Nelson OE (1964) The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize, I: The brown-midrib 1 mutant. *Arch. Biochem. Biophys.* 105: 103-113
- Lande R, and Thompson R (1990) Efficiency of Marker-Assisted Selection in the Improvement of Quantitative Traits. *Genetics* 124: 743-756
- Lee SH, Bailey MA, Mian MAR, Shipe ER, Ashley DA, Parrot WA, Hussey RS, Boerma HR (1996) Identification of quantitative loci for plant height, lodging, and maturity in a soybean population segregating for growth habit. *Theor. Appl. Genet.* 92: 516-523
- Lem P, and Lallemand J (2003) Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1113 – 1122.
- Mano Y, Sayed-Tabatabaei BE, Graner A, Blake T, Takaiwa F, Oka S, Komatsuda T (1999) Map construction of sequence-tagged sites (STS) in barley (*Hordeum vulgare* L). *Theor. Appl. Genet.* 98: 937-946.
- Mansur LM, Lark KG, Kross H, Oliveira A (1993) Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). *Theor. Appl. Genet.* 86:907-913
- Mao L, Devos KM, Zhu LH, Gale MD (1997) Cloning and genetic mapping of wheat telomere-associated sequences. *Mol. Gen. Genet.* 254: 584-591.

- McCouch SR, Cho YG, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T (1997) Report on QTL nomenclature. Rice Genet. Newslett. 14:11-13
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76: 815-829.
- Meyne J, Baker R, Highboad H, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wily JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK (1990) Distribution of non-telomeric sites of the (TTTAGGG)_n telomeric sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 7049-7053.
- Michalek W, Kunzel G, Graner A (1999) Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 42: 849-853.
- Milczarski P, Masojc P (2002) The mapping of QTLs for chlorophyll content and responsiveness to gibberellic (GA3) and abscisic (ABA) acids in rye. Cell Mol. Biol. Lett. 7(2A): 449-55
- Moore KJ and Hatfield RD (1994) Carbohydrates and forage quality. In: Fahey GC Jr (ed) Forage quality, evaluation, and utilization. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 229-280
- Moreau L, Charcosset A, Hospital F, Gallais A (1998) Marker-Assisted selection Efficiency in Populations of Finite Size. Genetics 148: 1353-1365
- Murray J, Larsen J, Michaels TE, Schaafsma A, Vallejos CE, Pauls KP (2002) Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. Genome 45:

1013-1024.

- Murray MG, and Thompson WF (1980) The isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Myburg AA, Remington DL, O'Malley M, Sederoff RR, Whetten RW (2001) High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *BioTechniques* 30: 348-357.
- 大山一夫、石黒潔 (1986) イタリアンライグラスの耐倒伏性の品種・系統間差異と関連形質 草地学会講演要旨集 32 : 108-109
- Olson M, Hood L, Cantor C, Doststein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335: 721-726.
- Pinthus MJ (1973) Lodging in wheat, barley and oats: the phenomenon, its causes and preventative measures. *Adv. Agron.* 25: 209-263
- Prasad M, Kumar N, Kulwal PL, Röder MS, Balyan HS, Dhaliwal HS, Gupta PK (2003) QTL analysis for grain protein content using SSR markers and validation studies using NILs in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106: 659-667
- Presting GG, Frary A, Pillen K, Tanksley SD (1996) Telomere-homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* 251: 526-531.
- Richards E, Goodmam HM, Ausubel FM (1991) The centromere region of

- Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. Nucleic Acids Res. 19: 3351-3357.
- Ritter E, Gebhardt C, Salamini F (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. Genetics, 125: 645-654.
- Saha MC, Chekhovski K, Zwonitzer JC, Eujayl I, Mian MAR (2003) Development of microsatellite markers for forage grass and cereal species. Plant and Animal Genome XI Conference. San Diego, CA, Jan. 11–15.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sanchez AC, Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT (2002) Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Plant Molecular Biology 48:713-726
- Schloss SJ, Mitchell SE, White GM, Kukatla R, Bowers JE, Paterson AH, Kresovich S (2002) Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Theor. Appl. Genet. 105: 912-920.
- Schneider KA, Brothers ME, Kelly JD (1997) Marker-Assisted Selection to Improve Drought Resistance in Common Bean. Crop Sci. 37: 51-60
- Shen LS, and Zhu LH (1998) Direct PCR-based genetic mapping of rice telomeric repeat associated sequences. Genome 41:193-198.
- Sim S, Chang T, Curley J, Warnke S, Barker R, Jung G (2003) Comparative genomics of the *Lolium* and *Poaceae* species. Molecular Breeding of

Forage and Turf Conference. Dallas, TX, May 18-22

Simons G, van der Lee T, Diergarde P, van Daelen R, Groendijk J, Frijters A, Buschges R, Hollicher K, Topsch S, Schulze-Lefert P, Salamini F, Zabeau M, Vos P (1997) AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics* 44: 61-70.

Spangenberg G, Sawbridge T, Ong E, Emmerling M, Webster T, Lidgett A, Edwards D, Kalla R, Aldao-Humble G, Baera K, Bartkowski A, Chalmers J, Cummings N, Felitti S, Jennings K, Johnson S, Lewis B, Ludlow E, Lynch D, McInnes R, Meath K, Nguyen N, Nunan K, O'Neill M, O'Toole F, Petrovska N, Rhodes C, Ramsperger M, Shields K, Simmonds J, Tian P, Wearne K, Winkworth A (2003) Integrated resources for pastoral functional genomics: EST collections, BAC libraries, VIGS systems and microarray-based expression profiling in perennial ryegrass (*Lolium perenne*), white clover (*Trifolium repens*) and Neotyphodium grass endophytes. Plant and Animal Genome XI Conference. San Diego, CA, Jan. 11-15.

Stam P (1993) Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3: 739-744.

杉信賢一、鈴木信治、小松敏憲 (1989a) イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) の耐倒伏性及び種子収量に対する選抜効果 1. 耐倒伏性及び関連形質の変異と相互関係 *日本草地学会誌* 34: 300-308

杉信賢一、鈴木信治、小松敏憲 (1989b) イタリアンライグラス (*Lolium multiflorum* Lam.) の耐倒伏性及び種子収量に対する選抜効果 2. 耐倒伏性及び関連形質の遺伝率と選抜効果 *日本草地学会誌* 34: 309-317

武田和義(1993) 植物遺伝育種学 裳華房 pp43

Talbert LE, Blake NK, Chee PW, Blake TK, Magyer GM (1994) Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87:789-794.

Talbert LE, Bruckner PL, Smith LY, Sears R, Martin TJ (1996) Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 93:463-467.

Tanksley SD, Miller J, Paterson A, Bernatzky R, (1988) Molecular mapping of plant chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.

Tar'an B, Warkentin T, Somers DJ, Miranda D, Vandenberg A, Blade S, Woods S, Bing D, Xue A, DeKoeper D and Penner G (2003) Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.) *Theor. Appl. Genet.* (in press)

Taylor C, Madsen K, Borg S, Moller MG, Boelt B, Holm PB (2001) The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L.: the application of primer sets derived from other genera. *Theor. Appl. Genet.* 103: 648-658.

Tinker NA, Mather DE, Rossnagel BG, Kasha KJ, Kleinhofs A, Hayer PM, Falk DE, Ferguson T, Shugar LP, Legge WG, Irvine RB, Choo TM, Briggs KG, Ullrich SE, Franckowial JD, Blake TK, Grad RJ, Dofing SM, Saghai MMA, Scoles GJ, Hoffman D, Dahleen LS, Kilian A, Chen F, Biyashev RM, Kudrna DA, Steffenson BJ (1996) Regions of the genome that affect agronomic performance in two-row barley. *Crop Sci.* 36:1053-1062

- Tsumura Y, Suyama Y, Yoshimura K, Shirato N, Nukai Y (1997) Sequence-tagged sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 764-772.
- van Berloo R, and Stam P (1999) Comparison between marker-assisted selection and phenotypical selection in a set of *Arabidopsis thaliana* recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* 98: 113-118.
- van Deynze AE, Sorrells ME, Park WD, Ayres NM, Fu H, Cartinhour SW, Paul E, McCouch SR (1998) Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor. Appl. Genet.* 97: 356-369.
- van Ooijen JW (1999) LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity* 83 613-624
- van Ooijen JW, and Maliepaard C (1996) MapQTL version 3.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. *Plant Genome IV*
- Voorrips RE (2002) MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Heredity* 93 (1): 77-78.
- Vos P, Hogers R, Bleekers M, Reijans M, van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wanous MK, and Gustafson JP (1995) A genetic map of rye chromosome 1R integrating RFLP and cytogenetic loci. *Theor. Appl. Genet.* 91: 720-726.
- Werner JE, Endo TR, Gill BS (1992) Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 11307-11311.
- Willcox MC, Khairallah MM, Bergvinson D, Crossa J, Deutsch JA,

- Edmeades GO, León DG, Jiang C, Jewell DC, Mihm JA, Williams WP, Hoisington D (2002) Selection for Resistance to Southwestern Corn Borer Using Marker-Assisted and Conventional Backcrossing. *Crop Sci.* 42: 1516-1528
- Xu WW, Sleper DA, Chao S (1995) Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 947-955.
- Xu WW, Sleper DA, Hoisington DA (1991) A survey of restriction fragment length polymorphism in tall fescue and its relative. *Genome* 34: 686-692.

Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers

Maiko Inoue, Zhensheng Gao, Mariko Hirata, Masahiro Fujimori, and Hongwei Cai

Abstract: To construct a high-density molecular linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), we used a two-way pseudo-testcross F_1 population consisting of 82 individuals to analyze three types of markers: restriction fragment length polymorphism markers, which we detected by using genomic probes from Italian ryegrass as well as heterologous anchor probes from other species belonging to the Poaceae family, amplified fragment length polymorphism markers, which we detected by using *PstI/MseI* primer combinations, and telomeric repeat associated sequence markers. Of the restriction fragment length polymorphism probes that we generated from a *PstI* genomic library, 74% (239 of 323) of randomly selected probes detected hybridization patterns consistent with single-copy or low-copy genetic locus status in the screening. The 385 (mostly restriction fragment length polymorphism) markers that we selected from the 1226 original markers were grouped into seven linkage groups. The maps cover 1244.4 cM, with an average of 3.7 cM between markers. This information will prove useful for gene targeting, quantitative trait loci mapping, and marker-assisted selection in Italian ryegrass.

Key words: linkage map, molecular markers, synteny, Italian ryegrass, *Lolium multiflorum* Lam.

Résumé : Afin de construire une carte génétique à haute densité chez l'ivraie multiflore (IRG, *Lolium multiflorum* Lam.), les auteurs ont employé en double pseudo-testcross une population F_1 de 82 individus. Trois types de marqueurs ont été employés sur cette population : des marqueurs RFLP (polymorphismes de longueur de fragments de restriction) détectés à l'aide de sondes génomiques de l'ivraie multiflore de même que des sondes d'ancrage hétérologues provenant d'autres espèces de la famille des graminées ; des marqueurs AFLP (polymorphismes de longueur de fragments amplifiés) obtenus à l'aide des combinaisons d'amorces *PstI/MseI* ; et, finalement, des séquences répétitives associées aux télomères (TAS). Parmi les sondes développées à partir d'une banque de fragments génomiques *PstI*, 74 % (239 de 323) des sondes choisies au hasard ont révélé des motifs d'hybridation suggérant des locus à copie unique ou à faible nombre de copies. Les 385 marqueurs (principalement des RFLP), choisis parmi la collection initiale de 1226 marqueurs, ont formé sept groupes de liaison. Les cartes s'étendent sur 1244,4 cM avec une distance moyenne de 3,7 cM entre les marqueurs. Cette information sera utile pour le ciblage génique, la cartographie de caractères quantitatifs (QTL) et la sélection assistée chez l'ivraie multiflore.

Mots clés : carte génétique, marqueurs moléculaires, synténie, ivraie multiflore, *Lolium multiflorum* Lam.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Italian ryegrass (IRG) (*Lolium multiflorum* Lam.) ($2n = 2x = 14$) is one of the most important cool-season forage grasses

and is the most widely cultivated annual forage grass in Japan. A closely related species, perennial ryegrass (PRG) (*Lolium perenne* L.) ($2n = 2x = 14$), is cultivated mainly in the British Isles, Europe, the United States, Australia, and

Received 4 June 2003. Accepted 8 September 2003. Published on the NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca> on 27 January 2004.

Corresponding Editor: G. Jenkins.

M. Inoue, Z. Gao,¹ M. Hirata, and H. Cai.² Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, 388-5, Higashiakata, Nishinasuno, Tochigi 329-2742, Japan.

M. Fujimori. National Institute of Livestock and Grassland Science, 768, Senbonmatsu, Nishinasuno, Tochigi 329-2747, Japan.

¹Present address: Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan, KS 66506-5501, U.S.A.

²Corresponding author (e-mail: hcai@jfsass.or.jp).

New Zealand. IRG is an out-crossing species and has a relatively large genome ($1C = 2000$ Mb) (Hutchinson et al. 1979). In recent years, many molecular markers, including amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), and simple sequence repeat (SSR) markers, have been developed for PRG (Hayward et al. 1998; Bert et al. 1999; Forster et al. 2001; Jones et al. 2001, 2002a, 2002b; Armstead et al. 2002). However, there are only few studies at the molecular level in IRG, and no molecular linkage map of IRG has been reported, probably because of its lesser economic performance. Hayward et al. (1998) constructed a linkage map using a PRG \times IRG hybrid and assumed that most of the linkage groups obtained were derived from polymorphism in the IRG parent.

To construct linkage maps of out-crossing species that include most forage grasses and forest trees, F_1 progeny generated from the cross between unrelated multiple heterozygous individuals could be used (two-way pseudo-testcross; Ritter et al. 1990; Grattapaglia and Sederoff 1994). In this approach, two linkage maps from parents are generated and the two parental linkage maps can be joined into a consensus map based on the use of the CP algorithm in JoinMap 3.0 (Stam 1993) using codominant bridging markers such as RFLP and SSR.

The detection of RFLPs in plants has permitted genetic mapping at the molecular level. The advantages of RFLP markers over other types, such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) and AFLP markers, include their codominant nature and the ease with which map information can be transferred to a different mapping population (Beckmann and Soller 1986; Helentjaris 1987). Although RFLP analysis requires a large amount of genomic DNA and is time consuming and costly, an informative RFLP linkage map is useful in analyzing the structural organization of genomes (Berhan et al. 1993), generating physical maps of specific chromosomes through in situ hybridization using DNA markers (Werner et al. 1992; Wanous and Gustafson 1995), and improving the agronomic attributes of crop plants by marker-assisted selection. In addition, comparative RFLP mapping of related species has the potential of providing important insights into the evolution of plant genomes (Ahn and Tanksley 1993; Huang and Kochert 1994). The RFLP marker set for the Poaceae family that Van Deynze et al. (1998) screened provided a very useful tool for comparative genome mapping. As a result, detailed linkage maps have been constructed for several important crops. Among forage grass species, RFLP maps of PRG, meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.), and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) have been constructed (Xu et al. 1995; Chen et al. 1998; Hayward et al. 1998; Armstead et al. 2002; Jones et al. 2002a; Alm et al. 2003).

The AFLP technique provides a marker system that allows the rapid detection of a large number of polymorphic loci through relatively modest levels of experimental activity. Consequently, it has been used widely in linkage map construction and marker development (Simons et al. 1997). For example, a high-density AFLP linkage map consisting of 463 markers has been constructed for PRG (Bert et al. 1999).

Telomeric repeat sequences are highly conserved among animals and higher plants (reviewed by Biessmann and Manson 1994). The consensus sequence of the telomeric repeat of the model dicot species *Arabidopsis thaliana* (TTTAGGG) is conserved in higher plants, including rice (*Oryza sativa* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Mao et al. (1997) performed polymerase chain reaction (PCR) amplification-based mapping of wheat (*Triticum aestivum* L.) telomeric repeat associated sequences (TASs) by using primers complementary to wheat TASs in combination with telomeric repeat specific primers. Shen and Zhu (1998) mapped 11 rice TASs on the distal position of seven chromosome arms by using the RAPD primer mediated asymmetric PCR method. Knowing the degree of genome coverage of an RFLP map is important for the analysis of quantitative trait loci (Paterson et al. 1988). Well characterized genetic stocks, including aneuploid, B-A translocation, and chromosome substitution lines, are unavailable for IRG and PRG. For this reason, the mapping of TAS markers in IRG may give some information about the completeness of the linkage maps.

The objectives of our study were to (i) construct a linkage map of IRG by using RFLP, AFLP, and TAS markers and (ii) use anchor probes for comparative mapping of IRG, PRG, and wheat. The comparison of the resulting map with another IRG map is discussed also.

Materials and methods

Plant materials

The DNA from one individual of the commercial IRG cultivar Nioudachi was used as the source for genomic library construction.

A two-way pseudo-testcross F_1 population derived from a pair cross between single individuals selected from IRG cultivars Nioudachi \times Nigatawase consisting of 82 individuals (NN population) was used for linkage map construction. The seeds of 'Nioudachi' and 'Nigatawase' were provided by Dr. T. Sasaki (Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, Tochigi, Japan).

Another pseudo-testcross full-sib F_1 population consisting of 128 individuals that was generated for the genetic analysis of cytoplasmic male sterility analysis (CMS population) made by Mr. S. Sugita (National Institute of Livestock and Grassland Science, Tochigi, Japan) was also used.

Construction of the IRG genomic library

The IRG genomic library was constructed by TaKaRa Inc. (Kusatsu, Shiga, Japan). Briefly, 3 μ g of total DNA from one individual selected from cultivar Nioudachi was digested with the methylation-sensitive restriction enzyme *Pst*I. The digested DNA was size fractionated using ChromaSpin-400 (Clontech, Palo Alto, Calif.), and the 0.5- to 3.5-kb fraction was bulk ligated into the pUC118 plasmid; *Escherichia coli* JM109 cells were transformed with the resulting plasmids. Colonies of cells containing plasmids with IRG inserts were selected by using X-Gal and IPTG screening procedures. Individual colonies were isolated and plasmid DNA was prepared according to Sambrook et al. (1989). Inserts for RFLP

analysis were prepared by PCR amplification using the M13M4 (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') and M13RV (5'-AGGAAACAGCTATGAC-3') primers. Random genomic clones were given consecutive numbers (IRGx) as they were prepared. The same numbers were then used to designate loci in the genome as detected by genetic mapping.

AFLP analysis

The NN population was grown at the Forage Crop Research Institute, and young leaf tissues were sampled for DNA extraction. DNA extraction, digestion, electrophoresis, Southern blotting were performed according to the methods described by McCouch et al. (1988). For polymorphism survey, the DNA from two parents of the NN population (or the CMS population) and their four F₁ individuals were digested with four enzymes (*Hind*III, *Eco*RV, *Dra*I, and *Bam*HI) was used. After the polymorphism survey, the DNA from each parental line and 82 F₁ progeny was digested with an enzyme showing polymorphism between the two parents. DNA hybridization was carried out using the radiolabeled ECL system (Amersham Int., Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.). The IRG probes described in the above section and the Poaceae anchor probes (IRG cDNAs of rice (RZx), barley (*Hordeum vulgare* L.) (CDx), and oat (*Avena sativa* L.) (CDOx), kindly provided by Dr. S. R. McCouch (Cornell University, Ithaca, N.Y.), were used in the polymorphism survey.

AFLP analysis

AFLP analysis was carried out as described by Vos et al. (1995) and Myburg et al. (2001) by using the enzyme combination *Pst*I/*Mse*I (+3, +3). The *Pst*I primer was labeled with IRD700 or IRD800 fluorescent dye (LI-COR, Lincoln, Neb.). The AFLP products were analyzed on a 6% denaturing IRG acrylamide gel and a Long Readir 4200 LI-COR sequencer.

TAS marker analysis

TAS marker analysis was carried out as described by Shen et al. (1998). Primer combinations used were TP1/D2, TP1/D30, TP1/K12, TP3/D2, TP3/D30, TP4/D2, and TP4/D30. The sequences of the TP primers used are as follows: TP1, 5'-(CCCTAAA)₂(A/G/T)(A/G)T-3'; TP3, 5'-(CCCCTAAA)₂CCCT(A/T)AAG-3'; TP4, 5'-(CCCTAAA)₂CCCT(A/T)AAT-3'. The TP primers were end-labeled with IRD800 dye (LI-COR). The sequences of the random primers used are as follows: D2, 5'-GGACCCAAC C-3'; K12, 5'-GGCCCTCAC-3' (both D2 and K12 are from Operon Technologies, Inc., Alameda, Calif.); D30, 5'-GAGACTCCGAA-3' (Nippon Gene, Tonya, Toyama, Japan).

Data scoring and linkage analysis

The marker data were scored according to the definition of Stam (1993). For AFLP and TAS markers, the segregation types $ab \times cd$, $np \times np$, and $hk \times hk$ were used to score the segregation types of locus heterozygous in female parent, locus heterozygous in male parent, and locus heterozygous in both parents. For RFLP markers, in addition to the above three types, another two types, $ab \times cd$ (locus heterozygous in both parents, four alleles) and $ef \times eg$ (locus heterozygous in

both parents, three alleles), were also scored. In the case of the allelism of multiple loci detected by one probe that is difficult to recognize, we scored it as a separate dominant locus segregating from one parent or another.

The linkage map construction was performed using JoinMap 3.0 under the cross-pollination model, and a Haldane (1919) map function was used. The linkage map was drawn using MapChart 2.0 (Voorrips 2002).

Results

Characterization of the IRG genomic library

Of the 472 clones that we picked from the IRG genomic library, 323 supported PCR amplification of a single product. All of these 323 single-insert clones were used for the polymorphism survey. Of them, 239 clones (74%) showed single- or low-copy hybridization patterns, 37 clones (11%) probably contained repetitive DNA sequences, as they generated smear patterns following Southern hybridization to the total genomic DNA, and 47 clones (15%) may be organelle clones because they showed very strong hybridization signals but no polymorphism after digestion with any of the four tested restriction enzymes.

Polymorphism of RFLP markers

We randomly selected 102 of the single- and low-copy IRG probes for the analysis of the NN F₁ population. Of the 209 loci detected, 40 were codominant and segregated as 1:1:1:1 (segregation types are $ab \times cd$ or $ef \times eg$) and 1:2:1 (segregation type is $hk \times hk$) (Table 1). Finally, 161 were mapped on all seven linkage groups.

We also used 67 Poaceae anchor probes (mostly oat cDNA) to screen the polymorphism of the NN F₁ population. Of the 61 probes from oat cDNA, 29 showed polymorphism; the rice and barley cDNA probes were difficult to use because they showed very weak hybridization (data not shown). Of 65 loci detected by these 29 oat anchor probes, nine were codominant (Table 1) and 40 were mapped on six linkage groups except LG7.

AFLP analysis

We analyzed a total of 54 *Pst*I/*Mse*I AFLP primer combinations (Table 2), which identified a total of 867 polymorphisms. Of these, 380 and 332 are dominant markers segregated as 1:1 and were present only in the maternal or paternal line, respectively; 155 polymorphisms were 3:1-segregating bands present in both parents. The average number of polymorphisms per primer combination was 13.

TAS marker analysis

We analyzed seven primer combinations (see Materials and methods) (Fig. 1). A total of 85 polymorphisms were detected, and 70 were mapped on the IRG linkage map. In a fashion similar to that described for AFLP analysis, the number of polymorphisms per primer combination ranged from 5 to 24, with an average of 12.

Segregation distortion

Among all of the 1226 markers including RFLP, AFLP, and TAS markers that we scored, 72 (5.9%) showed segrega-

Table 1. Number of RFLP marker loci showing various segregation ratios in the Italian ryegrass (IRG) 'Nioudachi' × 'Nigatawase' F₁ population.

Source of probe (no. of probes)	Segregation ratio and type ^a						Total
	1:1:1:1			1:1			
	ab × cd	ef × eg	1:2:1, hk × hk	lm × ll	nn × np	3:1, hk × hk	
IRG probe (102)	16	22	2	52	99	18	209
Anchor probe (29)	3	6	0	23	30	3	65
Total	19	28	2	75	129	21	274

^aThe segregation types were according to the JoinMap 3.0 manual (Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands).

Fig. 1. Profile of telomeric repeat associated sequence (TAS) markers detected by primer combination TP3/D2 segregating in the 'Nioudachi' × 'Nigatawase' (NN) Italian ryegrass F₁ population. Lane M contains the molecular size markers and lanes P₁ and P₂ are the maternal and paternal parents of the NN F₁ population, respectively. The other lanes correspond to 40 F₁ individuals. The arrows indicate four TAS markers.

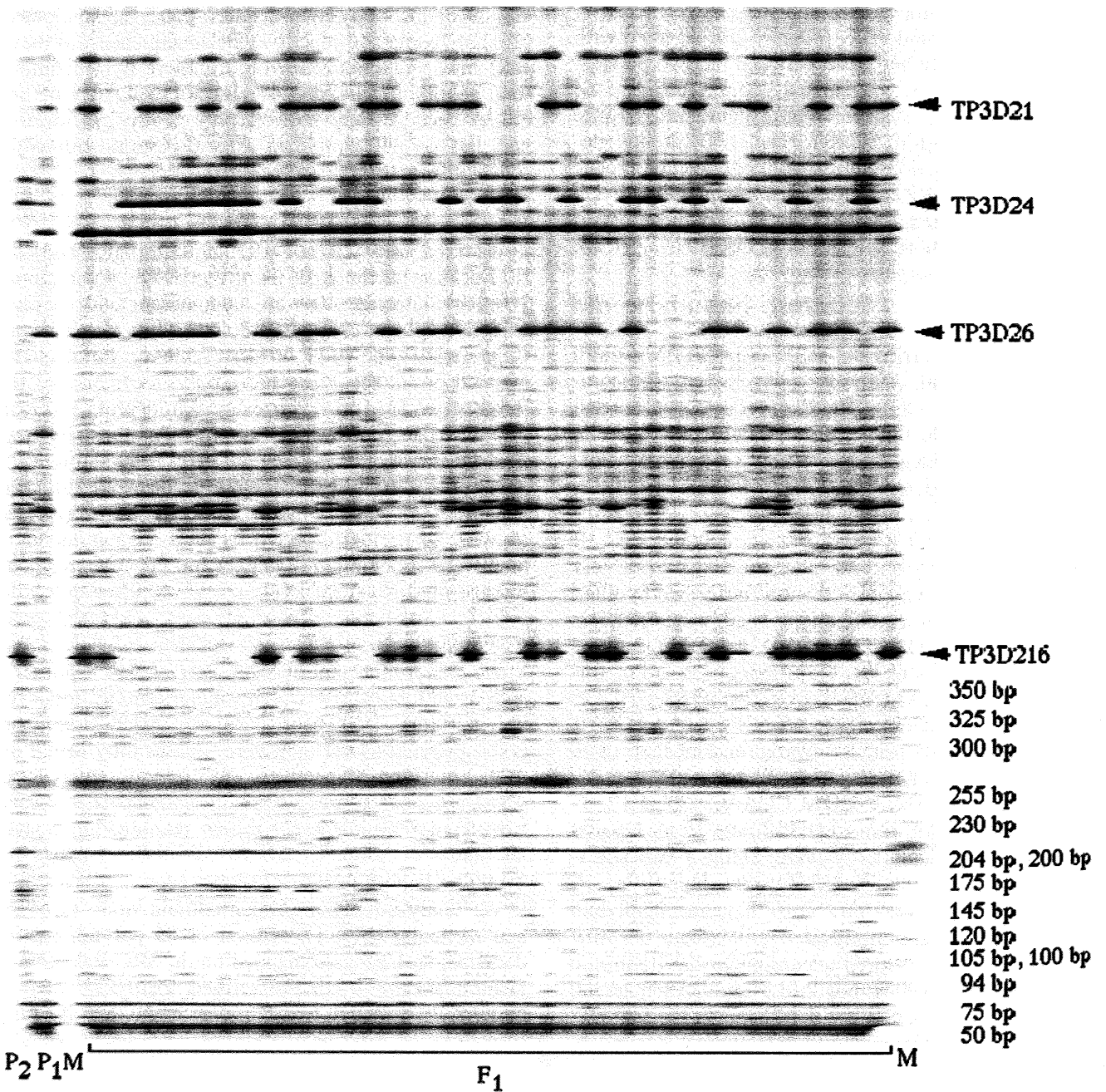


Table 2. Total number of markers and selected markers for the framework map generated by each primer pair using 54 *Pst*I/*Mse*I (+3, +3) primer combinations.

Primer pair		Total no. of markers	No. of markers selected
P01M11	AAA/CGG	20	2
P01M13	AAA/CCA	2	0
P01M15	AAA/CCG	21	1
P01M17	AAA/AAA	16	0
P01M18	AAA/AAT	24	2
P01M33	AAA/TAA	17	6
P01M34	AAA/TAT	33	10
P02M02	AAT/CAC	1	0
P02M12	AAT/CGC	3	0
P02M14	AAT/CCT	5	0
P02M16	AAT/CCC	16	1
P02M19	AAT/AAG	14	4
P02M20	AAT/AAC	8	1
P02M35	AAT/TAG	29	6
P02M36	AAT/TAC	22	3
P03M03	AAG/CAG	14	3
P03M09	AAG/CGA	4	2
P03M11	AAG/CGG	13	2
P03M13	AAG/CCA	7	2
P03M15	AAG/CCG	11	0
P04M04	AAC/CAT	12	2
P04M10	AAC/CGT	28	2
P04M12	AAC/CGC	8	1
P04M14	AAC/CCT	16	0
P04M16	AAC/CCC	2	0
P07M07	ATG/CTG	8	1
P09M10	AGA/CGT	8	0
P09M11	AGA/CGG	17	2
P09M14	AGA/CCT	6	1
P09M15	AGA/CCG	23	1
P09M17	AGA/AAA	36	5
P09M18	AGA/AAT	16	4
P09M33	AGA/TAA	27	5
P09M34	AGA/TAT	22	5
P10M02	AGT/CAC	14	5
P10M12	AGT/CGC	11	1
P10M14	AGT/CCT	13	1
P10M16	AGT/CCC	7	1
P10M19	AGT/AAG	17	5
P10M20	AGT/AAC	4	2
P10M35	AGT/TAG	24	1
P10M36	AGT/TAC	12	3
P11M03	AGG/CAG	28	5
P11M09	AGG/CGA	22	1
P11M11	AGG/CGG	12	1
P11M13	AGG/CCA	34	2
P11M15	AGG/CCG	15	2
P12M04	AGC/CAT	27	3
P12M10	AGC/CGT	27	1
P12M12	AGC/CGC	10	1
P12M14	AGC/CCT	18	2
P14M06	ACT/CTC	13	1
P15M07	ACG/CTG	30	3
P16M08	ACC/CTT	20	1
Total		867	116

Table 3. Number of loci showing distorted segregations in the Italian ryegrass 'Nioudachi' × 'Nigatawase' F₁ population.

Type of marker	Segregation ratio and type ^a						Total (%)
	1:1:1:1			1:1			
	ab × cd (19)	ef × eg (28)	1:2:1, hk × hk (2)	lm × ll (496)	nn × np (483)	3:1, hk × hk (198)	
RFLP (867)				3 (380)	3 (332)	12 (155)	18 (2.1%)
AFLP (274)	0 (19)	5 (28)	0 (2)	8 (75)	20 (129)	3 (21)	36 (13.1%)
TAS (85)				4 (41)	3 (22)	11 (22)	18 (21.2%)
Total (1226)		5 (17.9%)		15 (3.0%)	26 (5.4%)	26 (13.1%)	72 (5.9%)

^aThe segregation types were according to the manual of JoinMap 3.0 (Plant Research International B.V., Wageningen, The Netherlands). The total number of markers belonging to a segregation type is given in parentheses.

in distortion (Table 3). Especially RFLP and TAS markers showed high frequencies of loci showing segregation distortion (13.1% and 21.2%) compared with AFLP markers (1.1%). Among the four types of segregation ratios, the distortion percentage of the hk × hk type segregating as 3:1 was mostly higher (Table 3). Most distorted markers were located on the top of LG1 and the bottom of LG6.

Construction of high-density linkage map

Using the data from 867 AFLP and 164 RFLP markers, we constructed a linkage map containing seven groups at an logarithm of the odds (LOD) threshold value of 9.0. To generate a simple framework map, 235 markers (including 119 mapped RFLP markers and 116 AFLP markers) were selected to cover intervals of approximately 5 cM. We then added 110 newly analyzed RFLP markers and 85 TAS markers to this analysis. The final map included 385 markers, which were separated into seven major linkage groups. The numbers for the linkage groups (LG1 to LG7) were assigned according to the International *Lolium* Genome Initiative designation (Jones et al. 2002a). The total map length was 144.4 cM, and the average interval between markers was 1.7 cM (Fig. 2).

LG1 comprised 39 markers covering 144.6 cM at approximately 4.3-cM intervals. Of the eight TAS markers mapped to LG1, four (tp3d301, tp4d301, tp1d21, and tp3d217) were located at distal positions, and one (tp4d307) was mapped to central position. LG2 had 60 markers covering 171.4 cM at an average interval of 3.4 cM. Of the 12 TAS markers mapped to LG2, three (tp4d306, tp4d305, and tp3d214) were mapped to its most distal regions. LG3 was composed of 47 markers covering 109.1 cM with an average interval of 3.3 cM. Of the 13 TAS markers mapped to LG3, two (tp4d21 and tp4d29) were mapped to its most distal regions. LG4 comprised 70 markers covering 225.5 cM at an average interval of 3.3 cM. Of the 16 TAS markers mapped to LG4, seven were mapped toward the central region of LG4. LG5 included 55 markers that covered 185.9 cM at approximately 3.4-cM intervals. Of the six TAS markers mapped to LG5, one (tp4d3010) was mapped to a distal position, and two (tp4d303 and tp4d217) were located near the center. LG6 comprised 62 markers covering 192.8 cM at an interval of approximately 3.3 cM. Of the seven TAS markers mapped to LG6, one (tp4d3012) was located near its center. LG7 had 22 markers covering 215.1 cM at an interval of 4.4 cM on average. Of the eight TAS markers mapped to LG7, three (tp4d302, tp3d27, and tp4d224) were mapped to distal positions of LG7.

Conserved synteny between the linkage groups of IRG and the homeologous groups of wheat

In our results, the common location of some anchor probes between IRG linkage map and the homeologous groups of wheat were detected. Of them, two markers (CDO20 and CDO1387) identified on chromosome 4 of wheat (w4) occurred in IRG LG4, three (CDO534, CDO1380, and CDO497) of those on w6 were found in IRG LG6, and two (CDO920 and CDO460) on w3 occurred in IRG LG3. In addition, IRG LG7 of the CMS population, which is the comparable linkage group of LG7 of the NN population, had three anchor markers in common with those in wheat. We detected only one or two markers in common between w2 and w1 of wheat and IRG LG2 and LG1.

Discussion

Efficiency of genomic probe generation

In this study, we used the methylation-sensitive enzyme *Pst*I during the construction of the IRG genomic library. As noted by many authors (Burr et al. 1988; McCouch et al. 1988; Tanksley et al. 1988; Xu et al. 1991), the *Pst*I genomic library efficiently yielded single- or low-copy fragments. The efficiency of single locus detected for IRG was 74%, which was relatively high compared with those of maize (50.6%, genome size 1 C = 2400 Mb; Burr et al. 1988), which is similar in genome size to IRG and rice (58%, genome size 1 C = 430 Mb; McCouch et al. 1988).

In Table 1, a total of 274 RFLP loci were detected; however, only 49 (17.9%) were codominant. The major reason for the low ratio of codominant markers was that there were clusters of closely linked loci generated from the same probe that were detected as multiple dominant loci opposed to codominant loci, and allelism could not be recognized. One example is a cluster of IRG318-6, IRG318-7, and IRG318-3 on the LG1; if those loci are included, the number of codominant markers would be 86 (31.4%). In this study, we used only four restriction enzymes to survey the polymorphism of mapping population; the use of more restriction enzymes will be useful to recognize more codominant loci and reduce the percentage of multiple dominant loci.

Position of TAS markers

The interstitial localization of telomeric repeats is a common phenomenon in animals and plants, and interstitial-localized telomeric repeats are found mainly near centromeric regions (Meyne et al. 1990; Richards et al. 1991; Cheung et al. 1994; Presting et al. 1996). In our results, 13 TAS markers were located at distal positions in six

of the seven IRG linkage groups (except LG3), whereas another 10 TAS markers were located near central regions. Our results agree with those described by Shen and Zhu (1998). Whether the TAS markers located at distal positions of linkage groups truly detected telomeric sequences still needs to be confirmed by cloning and sequencing of the TAS markers and their use in in situ hybridizations.

Map size

Our total map size is 1244.4 cM, which is larger than other published PRG genetic maps (692–930 cM; Hayward et al. 1998; Bert et al. 1999; Jones et al. 2002a, 2002b). This difference may be because we used more than 1000 markers (mostly AFLP markers) to generate a linkage map; in other PRG maps, AFLP maps have the longest length also (Bert et al. 1999). Other factors such as map function (Haldane, our paper vs. Kosambi, other paper), the nature of the cross (two-way pseudo-testcross in our paper versus one-way pseudo-testcross in other papers), and genotyping errors should be considered.

Comparison with other IRG and PRG maps

To compare our IRG linkage maps with another map generated in the same species, we used the CMS population, from which seven major groups carrying about 300 *EcoRI/MseI* (+3, +4) AFLP markers and SSR markers at approximately 10-cM intervals were constructed at an LOD of 4.0 (M. Fujimori et al., in preparation). We analyzed 48 RFLP probes used in the NN population and ultimately mapped 47 loci detected by 29 anchor probes and 35 loci detected by 19 IRG probes across the parental genetic maps of the CMS population (data not shown). All linkage groups were comparable between the NN and CMS maps. In the comparison of our NN maps with the PRG maps reported by Jones et al. (2002b), our groups LG1, LG2, LG3, LG4, and LG6 were comparable, although the markers common between the PRG and IRG maps were few in some linkage groups.

Syntenicity between IRG and wheat

The genomic study of IRG has lagged behind that of other major crops, particularly with regard to the genomic sequence, compilation of expressed sequence tags, and development of markers such as RFLP and SSR markers. Currently, there is no complete genetic linkage map for IRG. Syntenicity studies of IRG with other well-defined species of the Poaceae such as rice, maize (*Zea mays* L.), barley, and wheat will facilitate the progress of IRG genome analysis in the future. Jones et al. (2002b) noted that three linkage groups of PRG showed complete syntenicity with corresponding chromosomes of wheat and that, overall, 80% of markers common to the PRG and wheat maps were syntenic. Our results also showed some common locations of the anchor probes between the IRG linkage map presented here and the homeologous groups of wheat. However, the number of relevant markers was very low for the study of the detailed syntenicity between IRG and wheat or other well-studied species such as rice; therefore, analysis of a much larger number of anchor probes is needed. In addition, mapping expressed sequence tag markers from IRG or PRG on the

rice or wheat linkage maps will be useful for the syntenicity studies of IRG.

We identified seven linkage groups at LOD = 9.0, but the relationships between our linkage groups and the IRG chromosomes are not yet clear. Because cytological genetic stocks are not yet available, in situ hybridization using IRG-specific genomic probes will be useful for determining the relationships between linkage groups and chromosomes. The information provided by the high-density RFLP-based linkage map of IRG that we report here, unlike AFLP-based maps, may be applicable to other IRG populations. Our high-density linkage map likely will be useful for gene targeting, quantitative trait loci mapping, and marker-assisted selection in IRG.

Acknowledgements

We thank Dr. S.R. McCouch (Cornell University, Ithaca, N.Y.) for kindly providing the Poaceae anchor probes. We also thank Dr. H. Morishima (Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan) and two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript. This study was financially supported by a grant from the Japan Racing Association.

References

- Ahn, S., and Tanksley, S.D. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7980–7984.
- Alm, V., Fang, C., Busso, C.S., Devos, K.M., Vollan, K., Grieg, Z., and Rognli, O.A. 2003. A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 25–40.
- Armstead, I.P., Turner, L.B., King, I.P., Cairns, A.J., and Humphreys, M.O. 2002. Comparison and integration of genetic maps generated from F₂ and BC₁-type mapping populations in perennial ryegrass. *Plant Breed.* **121**: 501–507.
- Beckmann, J.S., and Soller, M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica*, **35**: 111–124.
- Berhan, A.M., Hulbert, S.H., Butler, L.G., and Bennetzen, J.L. 1993. Structure and evolution of the genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 598–604.
- Bert, P.F., Charmet, G., Sourdille, P., Hayward, M.D., and Balfourier, F. 1999. A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **99**: 445–452.
- Biessmann, H., and Manson, J.M. 1994. Telomeric repeat sequence. *Chromosoma*, **103**: 154–161.
- Burr, B., Burr, F.A., Thompson, K.H., Albertson, M.C., and Stuber, C.W. 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics*, **118**: 519–526.
- Chen, C., Sleeper, D.A., and Johal, G.S. 1998. Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 255–260.
- Cheung, W.Y., Money, T.A., Abbo, S., Devos, K.M., Gale, M.D., and Moore, G. 1994. A family of related sequences associated with (TTTAGGG)_n repeats are located in the interstitial regions of wheat chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 349–354.
- Forster, J.W., Jones, E.S., Kolliker, R., Drayton, M.C., Dumsday, J., Dupal, M.P., Guthridge, K.M., Mahoney, N.L., van Zijl de Jong, E., and Smith K.F. 2001. Development and implementa-

- tion of molecular markers for forage crop improvement. In Molecular breeding of forage crops. Edited by G. Spangenberg. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 101–133.
- Rappapaglia, D., and Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus uraphylla* using a pseudotestcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, **137**: 1121–1137.
- Stoddard, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J. Genet.* **8**: 299–309.
- Hayward, M.D., Forster, J.W., Jones, J.G., Dolstra, O., Evans, C., McAdam, N.J., Hossain, K.G., Stammers, M., Will, J.A.K., Humphreys, M.O., and Evans, G.M. 1998. Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breed.* **117**: 451–455.
- Wentjarij, T. 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends Genet.* **3**: 217–221.
- Wang, H., and Kochert, G. 1994. Comparative RFLP mapping of an allotetraploid wild rice species (*Oryza latifolia*) and cultivated rice (*O. sativa*). *Plant Mol. Biol.* **25**: 633–648.
- Hutchinson, J., Rees, H., and Seal, A.G. 1979. An assay of the activity of supplementary DNA in *Lolium*. *Heredity*, **43**: 411–421.
- Wentjarij, T., Dupal, M.P., Kolliker, R., Drayton, M.C., and Forster, J.W. 2001. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* **102**: 405–415.
- Wentjarij, T., Mahoney, N.L., Hayward, M.D., Armstead, I.P., Jones, J.G., Humphreys, M.O., Kishida, T., Yamada, T., Balfourier, F., Charmet, G., and Forster, J.W. 2002a. An enhanced molecular marker-based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome*, **45**: 282–295.
- Wentjarij, T., Dupal, M.P., Dumsday, J.L., Hughes, L.J., and Forster, J.W. 2002b. An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* **105**: 577–584.
- Wang, L., Devos, K.M., Zhu, L.H., and Gale, M.D. 1997. Cloning and genetic mapping of wheat telomere-associated sequences. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 584–591.
- McCouch, S.R., Kochert, G., Yu, Z.H., Wang, Z.Y., Khush, G.S., Coffman, W.R., and Tanksley, S.D. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 815–829.
- Wentjarij, T., Baker, R., Highboad, H., Hsu, T.C., Ryder, O.A., Ward, O.G., Wily, J.E., Wurster-Hill, D.H., Yates, T.L., and Moyzis, R.K. 1990. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 7049–7053.
- Wentjarij, T., Remington, D.L., O'Malley, M., Sederoff, R.R., and Whetten, R.W. 2001. High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. *BioTechniques*, **30**: 348–357.
- Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., and Tanksley, S.D. 1988. Resolution of quantitative traits. *Nature (Lond.)*, **335**: 721–726.
- Presting, G.G., Frary, A., Pillen, K., and Tanksley, S.D. 1996. Telomere-homologous sequences occur near the centromeres of many tomato chromosomes. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 526–531.
- Richards, E., Goodmam, H.M., and Ausubel, F.M. 1991. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3351–3357.
- Ritter, E., Gebhardt, C., and Salamini, F. 1990. Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics*, **125**: 645–654.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
- Shen, L.S., and Zhu, L.H. 1998. Direct PCR-based genetic mapping of rice telomeric repeat associated sequences. *Genome*, **41**: 193–198.
- Simons, G., van der Lee, T., Diergarde, P., van Daelen, R., Groendijk, J., Frijters, A., Buschges, R., Hollicher, K., Topsch, S., Schulze-Lefert, P., Salamini, F., Zabeau, M., and Vos, P. 1997. AFLP-based fine mapping of the *Mlo* gene to a 30-kb DNA segment of the barley genome. *Genomics*, **44**: 61–70.
- Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* **3**: 739–744.
- Tanksley, S.D., Miller, J., Paterson, A., and Bernatzky, R. 1988. Molecular mapping of plant chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **76**: 815–829.
- Van Deynze, A.E., Sorrells, M.E., Park, W.D., Ayres, N.M., Fu, H., Cartinhour, S.W., Paul, E., and McCouch, S.R. 1998. Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor. Appl. Genet.* **97**: 356–369.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* **93**: 77–78.
- Vos, P., Hogers, R., Bleekers, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407–4414.
- Wanous, M.K., and Gustafson, J.P. 1995. A genetic map of rye chromosome 1R integrating RFLP and cytogenetic loci. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 720–726.
- Werner, J.E., Endo, T.R., and Gill, B.S. 1992. Toward a cytogenetically based physical map of the wheat genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 11 307 – 11 311.
- Xu, W.W., Sleper, D.A., and Hoisington, D.A. 1991. A survey of restriction fragment length polymorphism in tall fescue and its relative. *Genome*, **34**: 686–692.
- Xu, W.W., Sleper, D.A., and Chao, S. 1995. Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 947–955.

Maiko Inoue · Zhensheng Gao · Hongwei Cai

QTL analysis of lodging resistance and related traits in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Received: 12 November 2003 / Accepted: 6 August 2004 / Published online: 22 September 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is the most widely cultivated annual forage grass in Japan. Lodging damage reduces both harvested yield and forage quality. To identify the chromosomal regions controlling lodging resistance in Italian ryegrass, we analyzed seven quantitative characters—heading date, plant height, culm weight, culm diameter, culm strength, tiller number, and culm pushing resistance—and evaluated lodging scores in the field in a two-way pseudo-testcross F₁ population. Significant correlations between most combinations of the traits examined were found. Seventeen QTLs for all traits except culm weight were detected on six of seven linkage groups by simple interval mapping using cross-pollination (CP) algorithm, and 33 independent QTLs were also detected by composite interval mapping from both male and female parental linkage maps. In addition, up to 18 QTLs for lodging scores evaluated at nine different times were detected on all linkage groups. The flanking markers of those QTLs will serve as a useful tool for marker-assisted selection of lodging resistance in Italian ryegrass.

Therefore, lodging resistance is one of the most important goals in Italian ryegrass breeding. However, lodging is difficult to evaluate in the field, because not only is it a complex trait related to several factors, it is also caused by a combination of wind and rain and can be enhanced by pathogens and pests, affecting culms or roots. Other factors such as high nitrogen fertilization, high sowing density, and drought can also affect lodging (Brady 1934; Pinthus 1973; Easson et al. 1993; Crook and Ennos 1995; Milczarski and Masojc 2002; Sanchez et al. 2002).

Scoring for lodging resistance in the field can be inconsistent, as incidents causing lodging can occur at any stage of plant development or not at all (Atkins 1938). Therefore, it has always been a major aim of research to establish methods to assess lodging resistance independent of weather conditions (Heyland 1960). Most of the studies conducted so far have tried to find morphological traits that are correlated with lodging and could be used as indirect selection parameters. However, no single trait, or group of traits, has proven to be generally reliable as an index of lodging resistance. Therefore, marker-assisted selection could be an important tool to improve lodging resistance in cereals. Studies of QTLs for lodging resistance have been conducted on soybean (Mansur et al. 1993; Lee et al. 1996), barley (Backes et al. 1995; Hayes et al. 1995; Tinker et al. 1996), rice (Champoux et al. 1995), wheat (Keller et al. 1999; Börner et al. 2002), maize (Flint-Garcia et al. 2003), and field pea (Tar'an et al. 2003). Most studies have found that QTLs for lodging and plant height are linked or located in the same chromosomal region or regions.

In this paper, we describe the chromosomal positions and the contribution of putative QTLs affecting lodging resistance and related traits in Italian ryegrass, an out-breeding forage grass, and compare our results with the results obtained from QTL analysis of lodging resistance in other crop plant species.

Introduction

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is the most widely cultivated annual forage grass in Japan. Lodging damage reduces both yield by machine harvest and forage quality due to the pre-harvest sprouting of lodging culms.

Communicated by P. Langridge

M. Inoue · Z. Gao · H. Cai (✉)
Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage
Crop Research Institute,
388-5, Higashiakada,
Nishinasuno, Tochigi, 329-2742, Japan
e-mail: hcai@jfsass.or.jp
Tel.: +81-287-37-6755
Fax: +81-287-37-6757

Present address:

Z. Gao
Department of Agronomy, Kansas State University,
Manhattan, KS, 66506-5501, USA

Materials and methods

Plant materials

A two-way pseudo-testcross F_1 population derived from a pair cross between single individuals selected from the Italian ryegrass cultivars Nioudachi (ND, resistant, as female parent) and Nigatawase (NW, susceptible, as male parent), consisting of 220 individuals, was used for linkage map construction and QTL analysis. The seeds of ND and NW were provided by Dr. T. Sasaki (Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, Tochigi, Japan).

Phenotypic data collection

The F_1 mapping population and 32 individuals (not the individuals used for making F_1 population) of each parental cultivar were cultivated and evaluated at the Forage Crop Research Institute in April and May 2000. In the F_1 mapping population, however, only one individual

Table 1 The traits related to lodging resistance evaluated in the F_1 mapping population. *CD* Culm diameter, *CPR* culm pushing resistance, *CS* culm strength, *CW* culm weight, *HD* heading date, *LS* lodging scores, *PH* plant height, *TN* tiller number

Trait	Evaluation method
CD (mm)	Basal diameter of a culm measured two times at cross direction, the average of five culms per plant
CPR (g)	Degree of the culm strength for a whole plant, the value was the average of 100 culms (see text)
CS (gf)	Degree of the individual culm strength, the average of ten culms per plant (see text)
CW (g)	The average weight of five culms per plant
HD (days)	No of days to panicle emergence from April 1
LS (score)	1 (erect) – 9 (lodging), observed at nine different growing stages
PH (cm)	Distance from the ground to the top of the flag leaf
TN	Number of tillers per plant

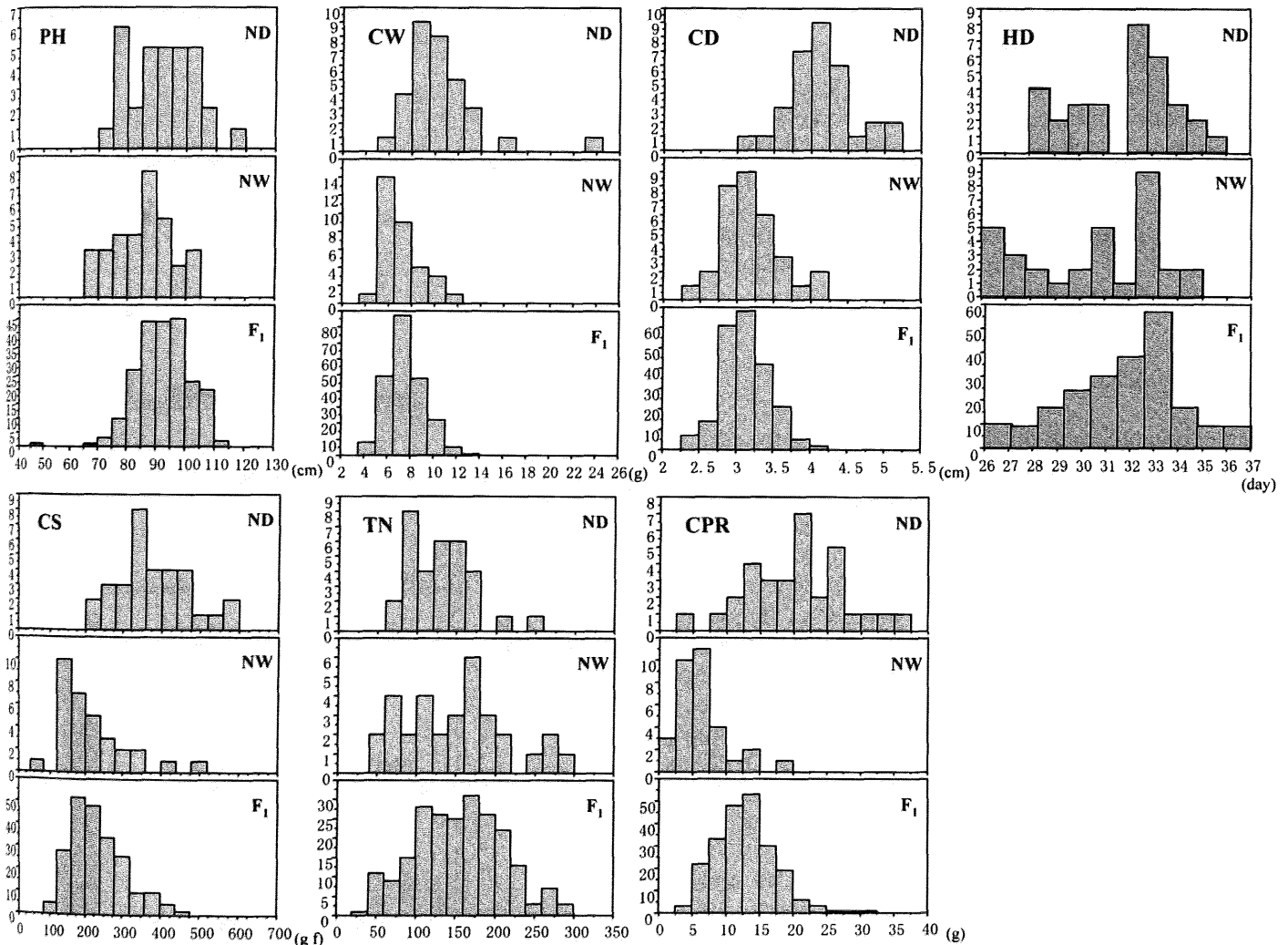


Fig. 1 Frequency distribution of six traits: plant height (*PH*); culm weight (*CW*); culm diameter (*CD*); culm strength (*CS*); tiller number (*TN*); and culm pushing resistance (*CPR*) and heading date of F_1

mapping population and two parent cultivars Nioudachi (ND) and Nigatawase (NW). Bars show number of individuals

Fig. 2 Frequency distribution of lodging score of F_1 mapping population on nine dates. Lodging score (LS): 1 = resistant to 9 = susceptible

was evaluated for each genotype, because Italian ryegrass is a self-incompatible annual species, and no genotypic replications were available. All materials were sown on 15 September 1999 in paper pots in a greenhouse and transplanted into the field on 15 October 1999 at a density of 80×60 cm. A total of 1 kg each of nitrogen, phosphorus, and potassium per 100 m² was supplied.

On the basis of the results of previous published studies (Ohyama and Ishiguro 1986; Sugino et al. 1989a, b) and our preliminary study (Z. Gao et al., in preparation), we selected the following traits that showed significant correlation with lodging resistance at the cultivar level for evaluation of lodging resistance: plant height (PH); culm weight (CW); culm diameter (CD); culm strength (CS); tiller number (TN); and culm pushing resistance (CPR). All these traits except for CPR were evaluated after heading. In addition, heading date (HD) was recorded. Lodging scores [(LS) 1 = erect to 9 = lodged] were evaluated nine times, immediately after rainy or windy days after the stage of internode elongation on 22 April, 2, 3, 13–15, 21, and 25 May, and 25 June.

Evaluation methods are briefly given in Table 1. The CS value was shown by the force required to break the basal part of a culm measured using a digital force gauge (FGX-0.5, Shimpo, Kuzetonosiro, Kyoto, Japan). CPR value was measured before heading with a Prostrate Tester (DIK-7401, Daiki Soil and Moisture, Nishiogu, Tokyo, Japan) set 20 cm from the ground against an unlodged plant. Reading of the tester when the plant was pushed to an angle of 45° was recorded.

Data analysis

Trait correlations and distribution histograms for each trait were calculated by StatView, version 5.0 (SAS Institute, Cary, N.C., USA).

We previously constructed a consensus linkage map including 385 (mostly RFLPs) markers on seven linkage groups at an LOD threshold value of 9.0 by using 82 individuals of the same mapping population (Inoue et al. 2004). From the map information and trait data in the present study, we determined putative QTL locations by using the simple interval mapping (SIM) method of MapQTL (van Ooijen and Maliepaard 1996) with the cross-pollination (CP) algorithm. We used $\text{LOD} \geq 3.0$ as a probability threshold for a significant QTL, and the one-LOD support region as a confidence interval for the location of a QTL on the genetic map.

To confirm the presence of putative QTLs, we separated the consensus map into two maps of the parents using only the markers with a segregation ratio of 1:1 and reanalyzed the QTL with the BC_1 algorithm of Windows QTL Cartographer, version 2.0 (Wang et al. 2004), using composite interval mapping (CIM). Both minimal LOD

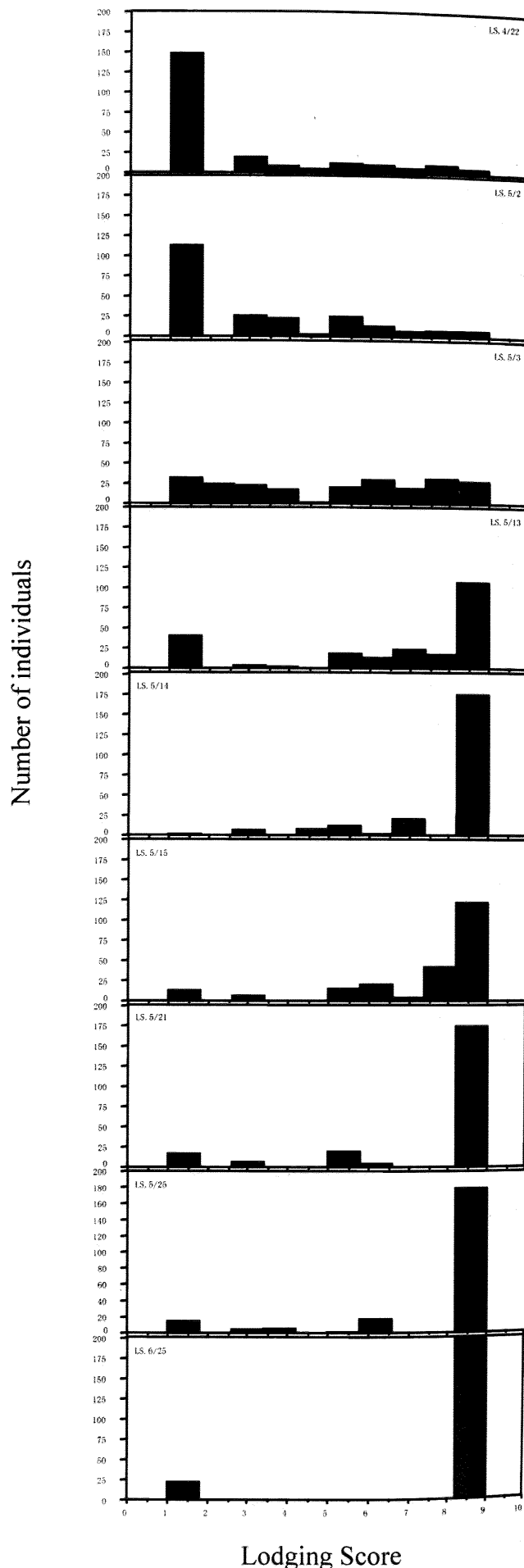


Table 2 Correlation coefficients between all traits evaluated in the F_1 mapping population

Table 2 Correlation coefficients between all traits evaluated in the F₁ mapping population

CD	CPR	CS	CW	HD	PH	TN	LS														
							4/22	5/2	5/3	5/13	5/14	5/15	5/21	5/25							
CPR	0.436**																				
CS	0.751**	0.420**																			
CW	0.686**	0.214**	0.753**																		
HD	0.092NS ^a	-0.015NS	0.136*	0.107NS																	
PH	0.357**	0.352**	0.269**	0.383**	-0.250**																
TN	-0.302**	-0.186**	-0.261**	-0.115NS	-0.240**	0.132NS															
LS																					
4/22	-0.250**	-0.388**	-0.122NS	0.135*	0.076NS	-0.129NS	0.256**														
5/2	-0.344**	-0.466**	-0.265**	-0.014NS	-0.045NS	-0.135*	0.487**	0.607**													
5/3	-0.294**	-0.393**	-0.265**	0.022NS	-0.194*	-0.054NS	0.590**	0.443**	0.612**												
5/13	-0.293**	-0.257**	-0.287**	-0.121NS	-0.089NS	0.204**	0.359**	0.226**	0.317**	0.467**											
5/14	-0.170*	-0.168*	-0.131NS	-0.018NS	-0.112NS	0.280**	0.326**	0.142**	0.229**	0.342**	0.591**										
5/15	-0.211**	-0.197**	-0.230**	-0.060NS	-0.109NS	0.333**	0.310**	0.204**	0.254**	0.332**	0.668**	0.811**									
5/21	-0.197**	-0.151*	-0.247**	-0.092NS	-0.096NS	0.242**	0.340**	0.163*	0.200**	0.332**	0.617**	0.710**	0.784**								
5/25	-0.245**	-0.226**	-0.324**	-0.141*	-0.132NS	0.203**	0.338**	0.162*	0.245**	0.391**	0.670**	0.724**	0.795**	0.844**							
6/25	-0.093NS	-0.044NS	-0.023NS	0.029NS	-0.100NS	0.177**	0.201**	0.161*	0.174*	0.327**	0.506**	0.416**	0.423**	0.387**	0.358**						

Significance levels: * $P=0.05$, ** $P=0.01$ ^aNS Not significant

Table 3 Putative QTLs related to lodging resistance detected by simple interval mapping under cross-pollination (CP) algorithm of MapQTL and composite interval mapping under backcross algorithm of Windows QTL Cartographer in the F₁ mapping population

Traits	QTL	Origin	Flanking markers	Linkage group	LOD score	Explanation (%)	Additive effect	
CD	<i>qCD4</i>	CP	tp1 k123-IRG252-2	4	3.2	17.0		
	<i>qCD-fl.1</i>	BC, female	tp3d301-IRG318-6	1	3.1	12.7	0.23	
	<i>qCD-fl.2</i>	BC, female	AAA-CGG11-CDO78-2	1	2.4	9.0	0.19	
	<i>qCD-f5.1</i>	BC, female	IRG5-4-IRG56-5	5	3.1	11.7	0.22	
	<i>qCD-f5.2</i>	BC, female	IRG37-5-tp4d303	5	2.5	15.0	-0.30	
	<i>qCD-m1</i>	BC, male	tp3d301-tp4d301	1	2.3	6.9	0.17	
	<i>qCD-m3</i>	BC, male	tp3d29-CDO460-3	3	2.6	10.7	-0.21	
	<i>qCD-m4</i>	BC, male	AGA-TAA211-AAC-CAT8	4	2.4	8.8	-0.19	
	<i>qCD-m7</i>	BC, male	IRG26-AGT-AAG12	7	3.0	10.8	0.21	
	CPR	<i>qCPR1</i>	CP	tp4d307-IRG303-2	1	3.1	33.9	
<i>qCPR4</i>		CP	tp3d303-tp1d302	4	3.4	27.3		
<i>qCPR5-1</i>		CP	tp4d303-IRG320	5	4.8	23.8		
<i>qCPR5-2</i>		CP	CDO459-CDO202-2	5	5.6	31.8		
<i>qCPR5-3</i>		CP	tp3d21-AGG-CGG3	5	6.7	49.9		
<i>qCPR6</i>		CP	AGA-AAT8-AAT-TAG7	6	3.1	25.8		
<i>qCPR-fl</i>		BC, female	AAA-CGG11-AGC-CCT7	1	4.4	13.9	3.88	
<i>qCPR-f4</i>		BC, female	tp3d303-tp1d302	4	2.0	6.1	-2.60	
<i>qCPR-f6</i>		BC, female	AAT-CCC9-AAT-TAG31	6	3.6	11.0	-3.63	
<i>qCPR-m4</i>		BC, male	CDO20-tp3d211	4	2.1	8.5	-2.99	
<i>qCPR-m5</i>		BC, male	tp4d217-IRG305	5	6.5	29.4	6.05	
<i>qCPR-m7</i>		BC, male	tp3d27-tp4d224	7	3.9	19.3	-4.95	
CS		<i>qCS4</i>	CP	IRG252-1-IRG250-2	4	3.6	18.8	
	<i>qCS-fl.1</i>	BC, female	tp3d301-IRG318-6	1	3.7	16.3	67.14	
	<i>qCS-fl.2</i>	BC, female	tp3d221-AGT-CAC10	1	2.4	9.6	65.87	
	<i>qCS-fl.3</i>	BC, female	tp3d23-tp3d217	1	2.1	8.1	46.98	
	<i>qCS-m1</i>	BC, male	IRG150-IRG318-3	1	2.7	11.5	57.76	
	<i>qCS-m5</i>	BC, male	AGG-CGG3-IRG115	5	2.3	11.3	-57.12	
	CW	<i>qCW-fl</i>	BC, female	tp3d221-AGT-CAC10	1	2.2	7.8	1.26
<i>qCW-f3</i>		BC, female	tp4d29-IRG296	3	2.3	8.3	1.03	
<i>qCW-f7.1</i>		BC, female	IRG60-2-AGA-AAT12	7	3.0	15.0	-2.09	
<i>qCW-f7.2</i>		BC, female	AGA-CGG17-IRG286	7	3.1	12.1	-1.61	
<i>qCW-m1</i>		BC, male	tp3d221-AGT-CAC10	1	3.2	14.1	1.67	
HD		<i>qHD6</i>	CP	CDO516-IRG144-1	6	4.2	28.9	
		<i>qHD7</i>	CP	tp3d27-tp4d224	7	3.2	24.3	
	<i>qHD-f4</i>	BC, female	IRG27-IRG39-1	4	3.0	17.8	1.78	
	<i>qHD-f6</i>	BC, female	tp1d307-tp1d22	6	2.2	7.3	1.17	
	<i>qHD-f7</i>	BC, female	tp4d220-tp4d224	7	4.1	12.6	1.49	
	<i>qHD-m3</i>	BC, male	IRG39-2-IRG226-2	3	2.1	6.7	-1.08	
	<i>qHD-m4</i>	BC, male	CDO38-AGT-TAC11	4	3.3	11.1	1.37	
	<i>qHD-m6</i>	BC, male	AGT-AAG10-tp1d307	6	5.7	17.7	1.74	
	<i>qHD-m7.1</i>	BC, male	IRG91-6-tp1d305	7	3.9	14.3	-1.57	
	<i>qHD-m7.2</i>	BC, male	tp3d27-tp4d224	7	3.6	17.2	1.84	
PH	<i>qPH1-1</i>	CP	IRG303-2-IRG321-3	1	5.8	39.1		
	<i>qPH1-2</i>	CP	tp3d23-AGG-CCA30	1	3.0	17.3		
	<i>qPH4</i>	CP	IRG123-IRG173	4	3.0	15.8		
	<i>qPH5</i>	CP	IRG37-5-IRG37-4	5	5.5	36.4		
	<i>qPH7</i>	CP	IRG4-1-AAT-AAG9	7	3.9	28.0		
	<i>qPH-m1</i>	BC, male	IRG321-4-IRG235-2	1	2.6	16.6	-8.67	
	<i>qPH-m4</i>	BC, male	tp3d211-tp1 k121	4	3.7	13.1	21.68	
<i>qPH-m6</i>	BC, male	CDO1380-tp3d306	6	2.6	9.0	5.81		

Table 3 (continued)

Traits	QTL	Origin	Flanking markers	Linkage group	LOD score	Explanation (%)	Additive effect
TN	<i>qTN2</i>	CP	CDO345–AAG–CCA6	2	3.7	44.3	
	<i>qTN7-1</i>	CP	IRG136-3–IRG94	7	3.4	17.9	
	<i>qTN-f2</i>	BC, female	CDO244-4–tp4d27	2	2.4	8.6	-30.55
	<i>qTN-f3</i>	BC, female	CDO920-4–CDO920-2	3	2.3	12.9	38.61
	<i>qTN-f6</i>	BC, female	tp1d307–tp1d22	6	2.1	9.1	-32.34
	<i>qTN-m7.1</i>	BC, male	AGT–AAG12–IRG94	7	3.1	12.6	-39.18
	<i>qTN-m7.2</i>	BC, male	IRG313-1–IRG91-1	7	3.6	15.4	72.30

threshold of 2.0 and the LOD threshold generated by 300 times permutation tests at a 0.05 significant level (from 3.1 to 4.1 depends on the trait) were used to detect putative QTLs.

The QTL nomenclature followed the rules described by McCouch et al. (1997).

Results and discussion

Distribution and correlation of traits

Figure 1 shows the frequency distribution of the parent cultivars and the F₁ population in the seven traits other than LS. Two parent cultivars, ND and NW, that differ in

mean values particularly in CW, CD, CS, and CPR, showed a nearly normal distribution within each cultivar except for HD. This might be due to the high heterozygosity of Italian ryegrass, which is an open-pollinated species. F₁ populations showed also nearly normal distributions in all traits. The mean value of the F₁ population tended to approach to that of one parent, NW, in CD, CS, and CW, but intermediate between the two parents in CPR.

Figure 2 shows the lodging scores in evaluation date order in F₁ population. Most individuals were erect on 22 April and 2 May. About half were lodging on 3 May, and most were lodging on and after 13 May.

As shown in Table 2, the seven traits supposedly related to lodging were mostly correlated with each other, except

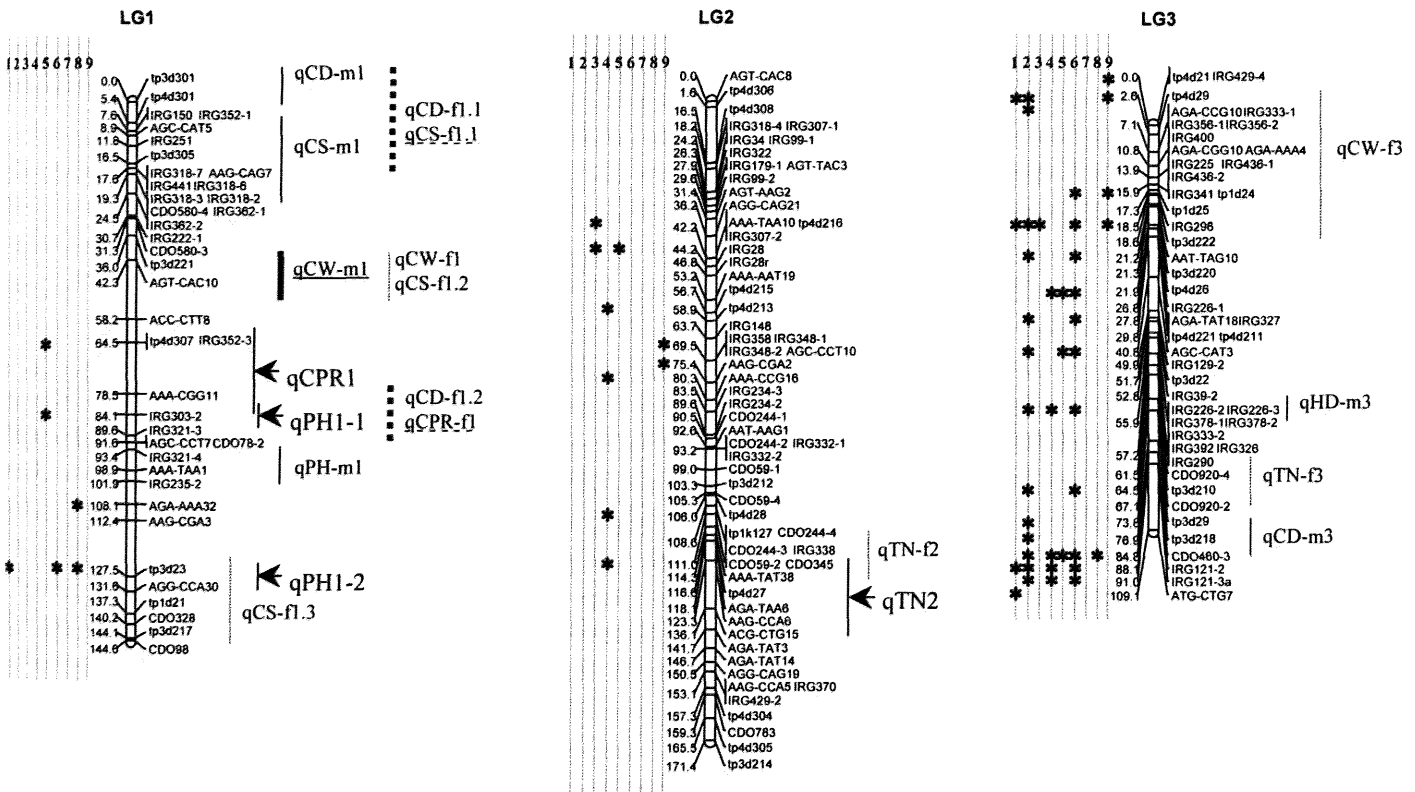


Fig. 3 Genetic linkage map of Italian ryegrass showing QTLs for seven traits and LS distributed over seven linkage groups (LGs). The QTLs for the six traits detected by simple interval mapping of MapQTL are given on the right side of each LG, indicated by an arrow. The composite interval mapping (CIM) QTLs detected from the male parent are indicated by solid line with the name *qXX-mx* and the CIM QTLs detected from the female parent are indicated by

dotted line with a name *qXX-fx*. The QTLs underlined were detected also by a permutation test of CIM at a 0.05 significant level. Supported intervals for each QTL are indicated by vertical bars. QTLs for LS detected by the Kruskal–Wallis test are marked on the left side of each LG. Numbers 1–9 are the evaluation dates: 1 22 April, 2 2 May, 3 3 May, 4 13 May, 5 14 May, 6 15 May, 7 21 May, 8 25 May, 9 25 June

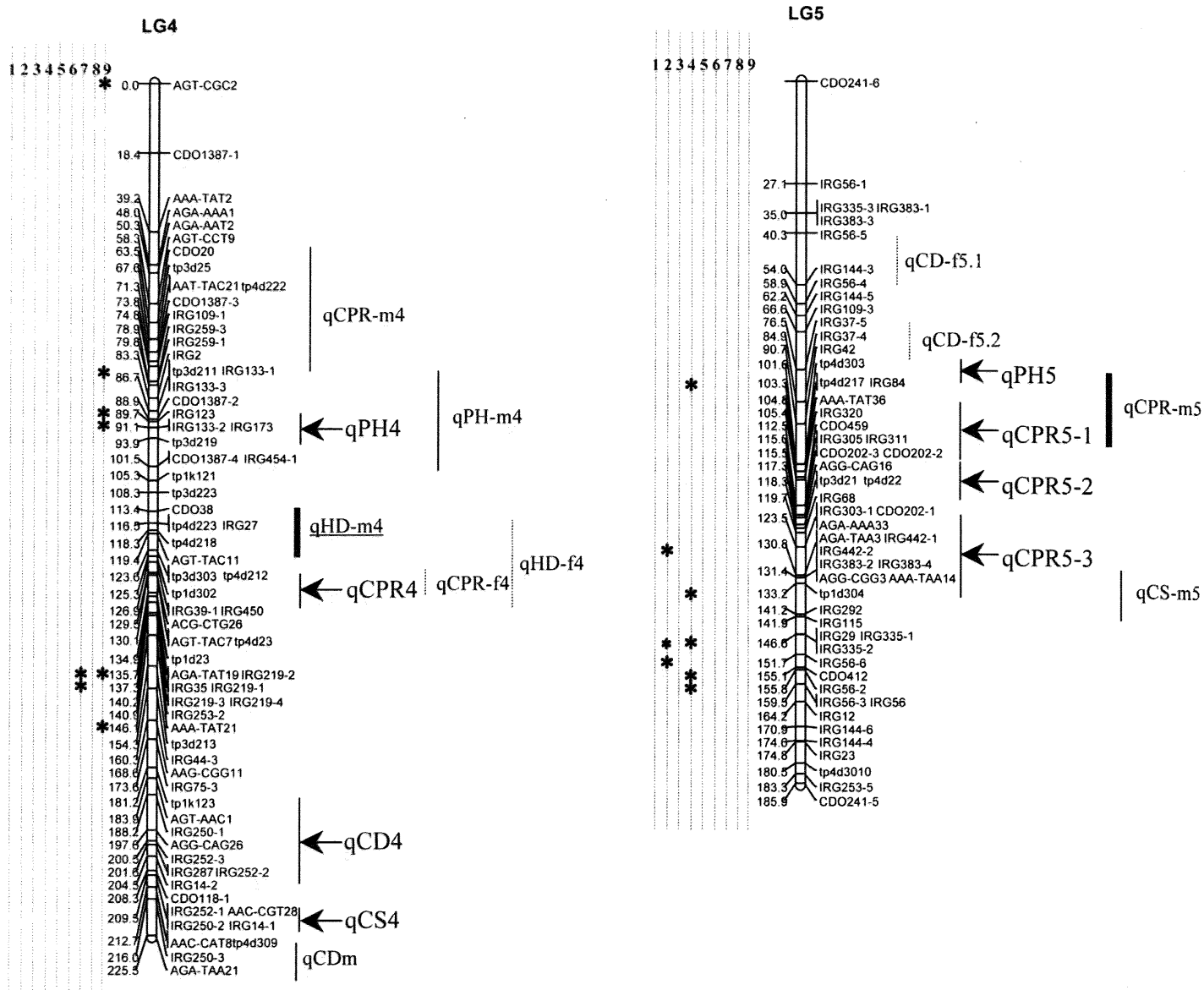


Fig. 3 (continued)

that HD was not always related with others. The correlations of CS/CD, CW/CD, and CW/CS were highest. Correlations between LS recorded at seven different dates were all significant. The correlation coefficients between LS evaluated at later dates were higher than the others. Most correlations between all LS (except 25 June) and the examined traits except CW and HD were significant. This result agrees with the results of Sugino et al. (1989a). General absence of correlations between HD and lodging resistance observed in the present study differs from the results reported by Keller et al. (1999) in wheat and Sugino et al. (1989a) in Italian ryegrass, who reported significant correlations between HD and LS.

QTL analysis

Seventeen QTLs for all traits except CW were detected at LOD>3.0, using the SIM method of MapQTL (Table 3; Fig. 3). Of them, six QTLs for CPR were detected on four

linkage groups (LGs), LG1, LG4, LG5, and LG6, and explained 23.8–49.9% of total variance, five QTLs for PH were detected on four linkage groups (LG1, LG4, LG5, and LG7) and explained 15.8–39.1% of total variance; two QTLs for TN detected on LG2 and LG7 explained 44.3% and 17.9% of total variance, respectively; two QTLs for HD detected on LG6 and LG7 explained 28.9% and 24.3% of total variance; and one QTL for CD and one for CS detected on LG4 explained 17.0% and 18.8% of total variance. No significant QTLs for CW were detected. The results of SIM by QTL Cartographer were almost same with that detected by MapQTL.

Among the 17 QTLs detected above, flanking markers of three QTLs (*qPH5*, *qPH7*, and *qCPR4*) were not significant by single-point analysis of variance by the CP algorithm of MapQTL (the Kruskal–Wallis test), though data were not shown. To confirm whether those QTLs detected by the CP algorithm were truly present, we separated the consensus linkage map into two parental linkage maps and re-analyzed those QTLs by the BC₁

Fig.

also
Carri
dete
each
6.7-
wer
met
cou
qCL
hand
dete
espe
link
of q
alge
in a
dete
gene
sign
sam

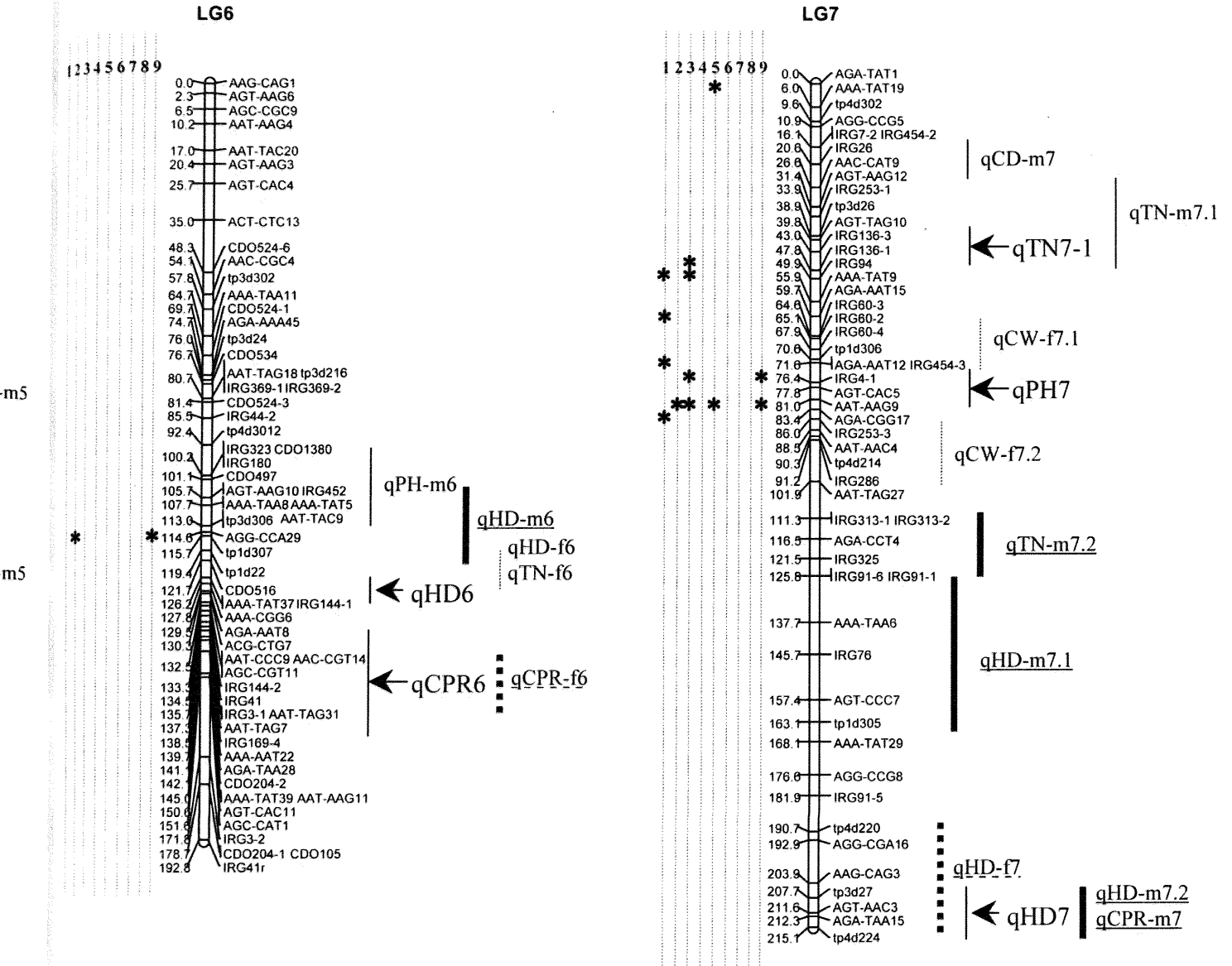


Fig. 3 (continued)

algorithm, using the CIM methods of Windows QTL Cartographer. A total of 33 independent QTLs were detected from both male and female parental maps (20 each) at an LOD=2.0 level for all seven traits explaining 6.7–29.4% of total variance (Table 3; Fig. 3). Nine of them were detected in the same region as detected by the SIM method of MapQTL; some QTLs detected by SIM method could not be detected by CIM, for example, *qPH1-2*, *qCD4*, *qCS4*, *qCPR5-2*, *qCPR5-3*, and *qPH7*. On the other hand, QTLs such as *qCD-f1.1* and some others were detected only by CIM, probably because some QTLs—especially groups with similar magnitude in tight repulsion linkage—are only resolved by CIM. The flanking markers of *qPH5* and *qPH7*, which were not significant by the CP algorithm, were also not significant by QTL Cartographer. In addition, 12 QTLs from two parental maps were detected when the LOD value was set to the values generated by a 300 times permutation test at a 0.05 significance level. Of them, five QTLs were located on the same or very close region of the QTLs for the same trait

detected by MapQTL. The interactions between QTLs detected were not found at this analysis.

Because the LS distributions were not normal, we conducted only the nonparametric Kruskal–Wallis test to find the QTLs affecting LS. Regions showing significance at the 1% level are shown in Fig. 3. Eight QTLs were detected in samples collected on 22 April (1), 18 on 2 May (2), 7 on 3 May (3), 14 on 13 May (4), 11 on 14 May (5), 17 on 15 May (6), 2 on 21 May (7), 3 on 25 May (8), and 15 on 25 June (9). Some QTLs for LS were located in the same regions as QTLs for other traits, for example, at *qPH1-2* (LG1) and *qPH7* (LG7). It should be noted that most QTLs for LS were detected on LG3. On LG3, SIM detected no QTLs for other traits, but CIM and single-point analysis (data not shown) identified some significant markers for other traits.

Correlation between lodging resistance and plant height

A number of studies have found that QTLs for lodging resistance and QTLs for plant height are linked or located in the same regions (Mansur et al. 1993; Backes et al. 1995; Hayes et al. 1995; Lee et al. 1996; Tinker et al. 1996; Keller et al. 1999; Börner et al. 2002; Tar'an et al. 2003). Our results also showed QTLs for LS are nearly located to QTLs for plant height on LG1, LG4, LG5, and LG7. In addition, QTLs for CPR and QTLs for plant height were near or overlapped on LG1, LG5, and LG6.

Comparison between our results and QTLs related to lodging resistance in other crops

The genomic studies of Italian rye grass, not only marker development but also QTL analysis, have lagged behind that of other major crops. The synteny among Italian rye grass, wheat, and rice was pointed out by several studies (Jones et al. 2002; Inoue et al. 2004). QTL information published in other major crops such as wheat, maize, and rice will facilitate the progress of Italian rye grass QTL analysis in the future. Börner et al. (2002) detected three QTLs related to lodging in wheat, two on chromosome 2 and one on chromosome 6. In our results, although the heterologous anchor probes used were limited, the QTL region for CPR, *qCPR6*, was mapped to LG6, which shows synteny with chromosome 6 of wheat (Inoue et al. 2004).

Lignin is an important constituent of plant cell walls (Moore and Hatfield 1994). It has long been proposed that lignin synthesis might be related to stem strength. Reduced lignin levels have been observed in *brown-midrib* mutants of maize (Kuc and Nelson 1964; Kuc et al. 1968; Gentinetta et al. 1990) and are associated with reduced stem strength. Cardinal et al. (2003) detected 65 QTLs related to fiber and lignin content in maize. A QTL of acid detergent lignin reported by Cardinal et al. (2003), found near *umc54* on chromosome 5, was near the QTL region of CPR on LG6 in our result. To collect more detailed information of synteny between the QTLs we detected with those in other crops, mapping of more common markers such as RFLP or expressed sequenced-tag markers will be needed.

In this study, we detected a total of 17 QTL for six traits related to lodging resistance and HD by the SIM and 33 independent QTLs from male and female parents by CIM. Among them, the QTLs, *qCPR1*, *qCPR5-1*, *qHD6*, *qCPR6*, and *qHD7* were detected in both SIM and CIM and had higher LOD values. The flanking markers of those QTLs will serve as a useful tool for marker-assisted selection of lodging resistance in Italian ryegrass.

Acknowledgements We thank Dr. H. Morishima of Tokyo University of Agriculture, Japan; Dr. K. Sugino and Dr. S. Satoh of the Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, Nishinasuno, Japan; and two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript. This study was financially supported by a grant from the Japan Racing Association.

References

- Atkins IM (1938) Relation of certain plant characters to strength of straw and lodging in winter wheat. *J Agric Res* 56:99–120
- Backes G, Graner A, Foroughi-Wehr B, Fischbeck G, Wenzel G, Jahoor A (1995) Localization of quantitative trait loci (QTLs) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 90:294–302
- Börner A, Schumann E, Fürste A, Cöster H, Leithold B, Röder MS, Weber WE (2002) Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 105:921–936
- Brady J (1934) Some factors influencing lodging in cereals. *J Agric Sci* 24:209–231
- Cardinal AJ, Lee M, Moore KJ (2003) Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci affecting fiber and lignin content in maize. *Theor Appl Genet* 106:866–874
- Champoux MC, Wang G, Sarkarung S, Mackill DJ, O'Toole JC, Huang N, McCouch SR (1995) Locating genes associated with root morphology and drought avoidance in rice via linkage to molecular markers. *Theor Appl Genet* 90:969–981
- Crook MJ, Ennos AR (1995) The effect of nitrogen and growth regulations on stem and root characteristics associated with lodging in two cultivars of winter wheat. *J Exp Bot* 46:931–938
- Easson DL, White EM, Pickles SJ (1993) The effects of weather, seed rate and cultivar on lodging and yield in winter wheat. *J Agric Sci* 121:145–156
- Flint-Garcia SA, Jampatong C, Darrah LL, McMullen MD (2003) Quantitative trait locus analysis of stalk strength in four maize populations. *Crop Sci* 43:13–22
- Gentinetta E, Bertolini M, Rossi T, Lorenzoni C, Motto M (1990) Effect of *brown midrib-3* mutant on forage quality and yield in maize. *J Genet Breed* 44:21–26
- Hayes PM, Liu BH, Knapp SJ, Chen F, Jones B, Blake T, Franckowjak J, Rasmusson D, Sorrells M, Ullrich SE et al (1995) Quantitative trait locus effects and environmental interaction in a sample of North American barley germplasm. *Theor Appl Genet* 87:392–401
- Heyland KU (1960) Ein Beitrag zur Methodik der Standfestigkeit-suntersuchung bei Winterweizen mit Hilfe der Knickfestigkeit des Halmes. *Z Acker Pflanzenbau* 111:321–333
- Inoue M, Gao ZS, Hirata M, Fujimori M, Cai HW (2004) Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using RFLP, AFLP, and TAS markers. *Genome* 47:57–65
- Jones ES, Mahoney NL, Hayward MD, Armstead IP, Jones JG, Humphreys MO, Kishida T, Yamada T, Balfourier F, Charmet G, Forster JW (2002) An enhanced molecular marker-based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome* 45:282–295
- Keller M, Karutz Ch, Schmid JE, Stamp P, Winzeler M, Keller B, Messmer MM (1999) Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat × spelt population. *Theor Appl Genet* 98:1171–1182
- Kuc J, Nelson OE (1964) The abnormal lignins produced by the brown-midrib mutants of maize, I: the *brown-midrib 1* mutant. *Arch Biochem Biophys* 105:103–113
- Kuc J, Nelson OE, Flanagan P (1968) Degradation of abnormal lignins in the brown-midrib mutants and double mutants of maize. *Phytochemistry* 7:1435–1436

- Lee SH, Bailey MA, Mian MAR, Shipe ER, Ashley DA, Parrot WA, Hussey RS, Boerma HR (1996) Identification of quantitative loci for plant height, lodging, and maturity in a soybean population segregating for growth habit. *Theor Appl Genet* 92:516-523
- Mansur LM, Lark KG, Kross H, Oliveira A (1993) Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). *Theor Appl Genet* 86:907-913
- McCouch SR, Cho YG, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T (1997) Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl* 14:11-13
- Milczarski P, Masojc P (2002) The mapping of QTLs for chlorophyll content and responsiveness to gibberellic (GA3) and abscisic (ABA) acids in rye. *Cell Mol Biol Lett* 7(2A):449-55
- Moore KJ, Hatfield RD (1994) Carbohydrates and forage quality. In: Fahey GC Jr (ed) *Forage quality, evaluation, and utilization*. ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp 229-280
- Ohyama K, Ishiguro K (1986) The variation of lodging resistance and characters related to lodging resistance in Italian ryegrass (in Japanese). *J Jpn Grassland Sci* 32 [Suppl]:108-109
- Ooijen JW van, Maliepaard C (1996) MapQTL version 3.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Genome IV Conference, 14-18 January 1996, San Diego
- Pinthus MJ (1973) Lodging in wheat, barley and oats: the phenomenon, its causes and preventative measures. *Adv Agron* 25:209-263
- Sanchez AC, Subudhi PK, Rosenow DT, Nguyen HT (2002) Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Mol Biol* 48:713-726
- Suginobu K, Suzuki S, Komatsu T (1989a) Effects of the selection for lodging resistance and seed yield in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). 1. Variabilities and relationships of lodging resistance and related characteristics (in Japanese). *J Jpn Grassland Sci* 34:300-308
- Suginobu K, Suzuki S, Komatsu T (1989b) Effects of the selection for lodging resistance and seed yield in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). 2. Heritabilities and selection effects of lodging resistance and related characteristics (in Japanese). *J Jpn Grassland Sci* 34:309-317
- Tar'an B, Warkentin T, Somers DJ, Miranda D, Vandenberg A, Blade S, Woods S, Bing D, Xue A, DeKoeber D, Penner G (2003) Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to *Mycosphaerella* blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 107:1482-1491
- Tinker NA, Mather DE, Rosnagel BG, Kasha KJ, Kleinhofs A, Hayer PM, Falk DE, Ferguson T, Shugar LP, Legge WG et al (1996) Regions of the genome that affect agronomic performance in two-row barley. *Crop Sci* 36:1053-1062
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2004) Windows QTL Cartographer 2.0. Department of Statistics, North Carolina State University, (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)

Sequence Analysis and Conversion of Genomic RFLP Markers to STS and SSR Markers in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Maiko Inoue and Hongwei Cai

Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, 388-5 Higashiakata, Nishinasuno, Tochigi 329-2742, Japan

Reprinted from

Breeding Science Vol. 54, No. 3 (2004)

Sequence Analysis and Conversion of Genomic RFLP Markers to STS and SSR Markers in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Maiko Inoue and Hongwei Cai*

Japan Grassland Farming and Forage Seed Association, Forage Crop Research Institute, 388-5 Higashiakata, Nishinasuno, Tochigi 329-2742, Japan

To convert RFLP markers of Italian ryegrass to sequence-tagged site (STS) markers, we end-sequenced 93 previously mapped single or low-copy RFLP probes. Eighty-seven clones gave acceptable results from both forward and reverse directions, and 71 contigs were detected, while other clones could not be sequenced completely because their fragments were too long. BLAST search results showed that 16 clones matched sequences reported in rice and other plants. STS primers were designed for all the 93 clones by using Oligo software, and 66 primers amplified a single band with the expected size. Of the 2 SSR primers designed from the 2 clones containing (AT)_n or (TTA)_n repeats, 1 amplified an SSR. Fifty-seven (85%) of the 67 STS (and SSR) primer pairs could amplify products in perennial ryegrass, 47 (70%) in meadow fescue, and 55 (82%) in tall fescue—species closely related to Italian ryegrass. Forty percent of the STS primers detected within-cultivar length or presence/absence of polymorphisms.

Key Words: *Lolium*, *Festuca*, molecular markers, sequence-tagged site (STS), SSR markers, BLAST search.

Introduction

Italian ryegrass (IRG, *Lolium multiflorum* Lam.) is one of the most important cool-season forage grasses, and is the most widely cultivated annual forage grass in Japan. A closely related species, perennial ryegrass (PRG, *L. perenne* L.), is cultivated mainly in the British Isles, Europe, USA, Australia and New Zealand. In recent years, many molecular markers, such as amplified-fragment-length polymorphism (AFLP), restriction-fragment-length polymorphism (RFLP) and simple sequence repeat (SSR) markers, have been developed for PRG and IRG (Hayward *et al.* 1998, Bert *et al.* 1999, Hirata *et al.* 2000, Forster *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001, 2002a, 2002b, Armstead *et al.* 2002, Inoue *et al.* 2004).

RFLP markers are highly reproducible and transferable

among different laboratories. The advantages of RFLP markers over other types, such as random amplified polymorphic DNA (RAPD) and AFLP markers, include their co-dominant nature and the ease with which map information can be transferred to a different mapping population (Beckmann and Soller 1986, Helentjaris 1987). RFLP analysis, however, requires a large amount of genomic DNA and is time-consuming and costly. In PRG and its relative meadow fescue (MF, *Festuca pratensis* Huds.), genetic linkage maps are based on anchor probes and other markers such as AFLP, RAPD and SSR markers (Hayward *et al.* 1998, Bert *et al.* 1999, Forster *et al.* 2001, Jones *et al.* 2001, 2002a, 2002b, Armstead *et al.* 2002, Alm *et al.* 2003). Linkage maps of IRG (Inoue *et al.* 2004) and tall fescue (TF, *Festuca arundinacea* Schreb.) (Xu *et al.* 1991, 1995, Chen *et al.* 1998) are based on RFLP of genomic probes.

Sequencing genomic RFLP markers is an alternative method for the identification of genes and development of sequence-tagged site (STS) markers and SSR markers to expressed sequence tags (ESTs) (van Deynze *et al.* 1998, Michalek *et al.* 1999, Murray *et al.* 2002, Schloss *et al.* 2002). Van Deynze *et al.* (1998) searched the sequences of 152 anchor probes and detected 119 clones (78%) that showed a significant similarity to previously characterized genes or putative genes in other organisms. Murray *et al.* (2002) searched 79 previously mapped bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genomic clones and found that 59 (75%) were homologous with genes from other plants, especially *Arabidopsis thaliana*. Schloss *et al.* (2002) reported that 56% of the sorghum genomic RFLP probe sequences fitted to sequences in GenBank.

An STS is a short, unique genomic sequence that is amplified by using allele-specific primers designed from genomic or EST sequences. STS markers have an advantage over RFLP markers in that a large number of samples can be handled economically and easily, and they are very important tools for converting a genetic linkage map to a physical map (Olson *et al.* 1989). Standard STS landmarks have been generated for rice (Inoue *et al.* 1994), barley (Blake *et al.* 1996) and *Cryptomeria* (Tsumura *et al.* 1997).

The objectives of our study were 1) to identify genes from the sequences of mapped genomic IRG clones, 2) to convert 93 IRG RFLP markers to STS markers or SSR markers, and 3) to examine the possibility of transferring STS primers from IRG to other closely related species, PRG, MF and TF.

Communicated by K. Okuno

Received November 20, 2003. Accepted February 26, 2004.

*Corresponding author (e-mail: hcai@jfsass.or.jp)

Materials and Methods

Plant materials

We screened working STS primers in 8 plants. Five of the plants consisted of IRG, with 4 (CL1, TW59, 11S and 11F) being used as parents in the mapping of cytoplasmic male sterility by Mr. S. Sugita (National Institute of Livestock and Grassland Science, Tochigi, Japan) and 1 being randomly selected from the commercial cultivar 'Waseaoba'. The remaining 3 plants represented the closely related species PRG (cv. 'Kiyosato', KS), MF (cv. 'Tomosakae', TS) and TF (cv. 'Nanryou', NR).

To detect within-cultivar polymorphism in IRG using the working primers, we selected 16 plants, 8 each from 2 commercial cultivars, 'Nioudachi' and 'Waseaoba'.

Sequencing of RFLP probes

Ninety-three IRG RFLP probes previously mapped in a 2-way pseudo-testcross F_1 population (NN population, Inoue *et al.* 2004) were end-sequenced. The probes were generated from a *Pst*I genomic library, and the insert sizes ranged from approximately 500 to 3,500 bp. The sequences were obtained on a MegaBACE 1, 000 DNA sequence analyzer using a DYEnamic ET dye terminator kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) in both forward and reverse directions at the Dragon Genomics (Yokkaichi, Mie, Japan). Then the DNA sequences were edited and aligned with Sequencher software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). These sequences were deposited in the DDBJ under the accession numbers AB124671–AB124779.

Database searches

The above sequences were searched against the nucleotide databases using BLAST algorithms (Altschul *et al.* 1997). The BLAST network service provided at the DDBJ was used to identify the relationships between the IRG probes and protein sequences for known genes. BLASTX searches were run on 15 October 2003, and an E-value = 1×10^{-5} was considered to be significant.

Design of primer pairs

STS primers were designed with Oligo 6.0 (Molecular Biology Insights, Inc. Cascade, CO, USA). The annealing temperature was set at 55°C and the GC content at 40%–60%. The primer pairs were selected so as to generate fragments that were as long as possible. For the clones that could not be sequenced completely because their fragments were too long, the STS primers were designed from forward and reverse end-sequences. For 2 clones containing (AT)_n or (TTA)_n repeats, SSR primers were designed with Primer 0.5 (<http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/pub/software/primer0.5>). All the primer pairs were synthesized by ESPEC Oligo Service (Tsukuba, Japan).

Conditions for PCR and gel electrophoresis

Genomic DNA was extracted from young leaves by the

CTAB method (Murray and Thompson 1980).

PCR reaction was carried out in a GeneAmp PCR System 9700 (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 20- μ L volume containing 20 ng genomic DNA template (1 μ L), 2 μ L 10 reaction buffer, 1.6 μ L of dNTP mix (each 25 mM), 0.4 μ L (8 pmol) of each primer and 0.2 μ L (1 unit) of GeneTaq NT (Nippon Gene, Tonya, Toyama, Japan). The STS and SSR markers were amplified under the following PCR conditions: 1 cycle of 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min; 1 cycle of 72°C for 7 min; and a 4°C holding step.

The PCR products were electrophoresed in 3% agarose gel in TAE buffer or in 1.2% agarose in TBE buffer. The gel was stained with ethidium bromide and visualized by illumination with UV light or scanned with a Molecular Imager FX (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Results

Characterization of RFLP probe sequences

Ninety-three single- or low-copy RFLP probes previously mapped (Inoue *et al.* 2004) were end-sequenced. Eighty-seven of them gave acceptable results in both forward and reverse directions, and 6 could be sequenced in 1 direction. Sequencher software detected 71 contigs. In 26 of them, the forward- and reverse-end sequences overlapped; the other 45 were completely sequenced in forward and reverse directions. Sixteen clones could not be sequenced completely because their fragments were too long. Two of the 93 clones contained (AT)_n or (TTA)_n repeats.

BLAST searches

To determine which genes with known functions were included in our sequenced IRG clones, we conducted BLAST searches. Sixteen clones matched sequences in the DNA database, although 4 showed only moderate E-values. Twelve clones matched 11 rice genomic DNA sequences and 1 barley genomic DNA sequence. The other 4 clones, IRG91, IRG129, IRG179 and IRG292, matched sorghum putative receptor protein kinase (AF466199), rice *SS300* gene (D21289), maize *liguleless1* protein (*Liguleless1*) mRNA (U89496) and wheat *PEPC* gene (AJ007705), respectively (Table 1).

Development of STS and SSR markers

We designed 95 primer pairs, including 93 STS primers and 2 SSR primers (Table 2). Sixty-six STS primers amplified a single band with expected size (an example is shown in Fig. 1, left) in IRG. Although we changed the PCR conditions, the other 27 STS primers did not amplify any products, indicating the need for redesigning the primers. Among the 66 STS primers that were amplified in 5 IRG plants, 39 could amplify products in all 5 plants, but (probably owing to the heterozygosity of IRG) the other 27 primer pairs could amplify products in only 1 to 3 plants. In addition, 9 primer pairs amplified product length polymorphism in 5 IRG

Table 1. High scoring matches against the DDBJ databases by BLAST search

Clone	Matched clone	Putative identification	E value
IRG27	AC131175	Genomic sequence for <i>Oryza sativa</i> (Nipponbare), clone OSJNBa0030D15 from chromosome 3	2e-38
IRG76	AP000559	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 6, clone: P0493C11	4e-30
IRG91	AF466199	<i>Sorghum bicolor</i> putative receptor protein kinase	2e-39
IRG129	D21289	Rice mRNA for MCM3 (gene name SS300)	1e-27
IRG179	U89496	<i>Zea mays</i> liguleless1 protein (liguleless1) mRNA	1e-05
IRG235	AL731589	<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0039G19	5e-19
IRG252	AC096687	<i>Oryza sativa</i> chromosome 3 BAC OSJNBa0010E04 genomic sequence	1e-41
IRG286	AP003217	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: OSJNBa0094H06	2e-07
IRG290	AP003332	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: B1097D05	3e-09
IRG292	AJ007705	<i>Triticum aestivum</i> PEPC gene	2e-09
IRG333	AP003269	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, PAC clone: P0504E02	e-143
IRG338	AP004380	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 7, PAC clone: P0594D10	3e-13
IRG341	AP003368	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone: B1100D10	8e-15
IRG348	AL731582	<i>Oryza sativa</i> genomic DNA, chromosome 4, BAC clone: OSJNBa0022H21	1e-27
IRG352	AC079888	<i>Oryza sativa</i> chromosome 10 BAC OSJNBa0078O01 genomic sequence	6e-32
IRG452	AJ234742	<i>Hordeum vulgare</i> genomic DNA fragment; clone MWG2061.rev	1e-70

plants. Of the 2 SSR primers, IRG252SSR amplified an SSR and showed polymorphism between 5 IRG plants (Fig. 1, right).

Transfer of the IRG STS primers to other related species and polymorphism survey within IRG cultivars

We screened all the 67 STS (and SSR) primer pairs in 5 IRG plants, 1 PRG, 1 MF and 1 TF. Fifty-seven primer pairs (85%) amplified products in PRG, 47 (70%) in MF and 55 (82%) in TF. In addition, we examined the 16 plants of the 2 cultivars of IRG to search for polymorphism by using the above 66 STS and 1 SSR primers, and 3 STS primers (IRG12, IRG356 and IRG358) that could not amplify products in the 5 IRG plants but could amplify them in PRG or TF. Sixty-one STS and 1 SSR primers amplified products, while the other 8 primers did not amplify products. Twenty-five out of 62 STS (and SSR) primer pairs (40%) detected intra-cultivar polymorphism in either one or both cultivars. Nine of them detected the presence/absence of polymorphism, and the other 16 detected length polymorphisms

(Table 2). Differences between these 2 cultivars could not be detected when the above 61 STS and 1 SSR primer pairs were used.

Discussion

Gene identification

Only 16 sequences (14.7%) matched known sequences. This frequency which is very low, is similar to the results reported by Michalek *et al.* (1999) in barley (9%). On the other hand, Schloss *et al.* (2002) and Murray *et al.* (2002) reported that about 56% and 75% of genomic clones matched known sequences in sorghum and bean, respectively. This difference may be ascribed to the difference in the genome size between these species, because generally species with a larger genome size exhibit a larger proportion of non-gene regions (Barakat *et al.* 1997). Barley and IRG have a larger genome (4, 800 Mb and 2, 000 Mb/C) than sorghum and bean (690 Mb and 637 Mb/C) (Hutchinson *et al.* 1979, Arumuganathan and Earle 1991).

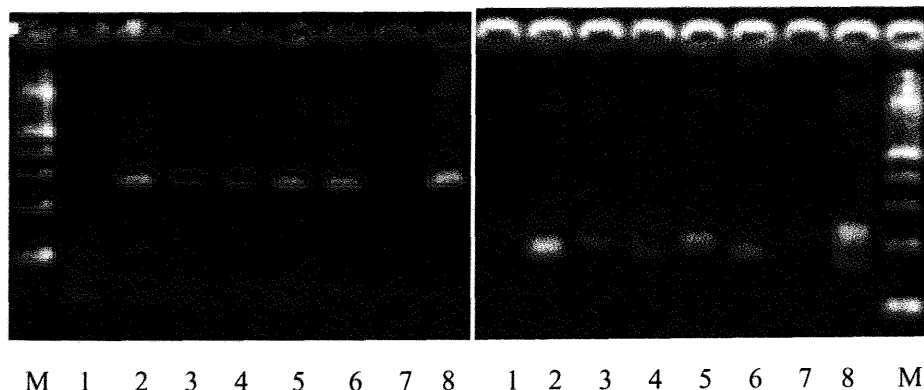


Fig. 1. Polymorphism of STS marker IRG400 (left) and SSR marker IRG252 (right). The PCR products were electrophoresed in 3% agarose gel in TAE buffer. M: 100-bp size marker; 1: CL1 (IRG); 2: TW59 (IRG); 3: 11S (IRG); 4: 11F (IRG); 5: WA (IRG); 6: KS (PRG); 7: TS (MF); 8: NR (TF)

Table 2. STS and SSR primers developed from Italian ryegrass RFLP probes

Probe name ⁽¹⁾	Linkage Group ⁽²⁾	DDBJ Accession no. ⁽³⁾	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length (bp) ⁽⁴⁾	Amplification ⁽⁵⁾				Polymorphism ⁽⁶⁾	
						IRG	PRG	MF	TF	ND/WA	on length/absence
IRG2	4	AB124671, AB124672	AGGCCAGCCATACA	ATGGCTTCAGGACAACCTTA	>960	+	+	+	+	+	-
IRG3	6	AB124673	GGGAAGTGTGTGTTCAAAC	TCTATGATGTATGACGCAACT	976	+	+	+	+	+	+
IRG4	7	AB124674	GGTAAACATATTGAAGCGTGT	AGTGTCTGTAATGTAGCTGC	268	+	-	-	-	-	-
IRG7	7	AB124675	TAAACCTCAAACAATACCCAG	AAAGCTTGAATCGTTGGACC	261	+	+	+	+	+	+
IRG12	5	AB124676	AATCAGCCAACCATGTTCCGAT	GTGGCTTTTCTGGCACACA	199	+	-	-	-	-	-
IRG14	4	AB124677	TTGCACCTAAGAATGGA	ACTAACAAAAATAGTTGCATGA	168	-	-	-	-	-	+
IRG23	5	AB124678	AGAGACCAAGGACGACGAAG	TTTCGATGATGCCATACACGAT	460	+	+	+	+	+	-
IRG26	7	AB124679	ATCTTTCGGAAGCAT	ATATATGGCAATAGAGTAAAG	752	-	-	-	-	-	-
IRG27	4	AB124680	CACTACAAGAGCCCTAGAGA	CCCGAAAAGTCTCTGCAATGC	401	+	+	+	+	+	+
IRG28	2	AB124681	TTCCGTGTCAACATTTAGAGC	CGCGAAATATTGGTAAGAA	322	+	+	+	+	+	-
IRG29	5	AB124682	TAGAAAAGAAAGCAAACTTACA	GCCACCACCCTGATGACTAA	874	+	+	+	+	+	-
IRG34	2	AB124683	TCTCAGTGTAGCCGTGTCA	TGAGGTCCGTGGACTACAAGG	239	+	+	+	+	+	-
IRG35	4	AB124684, AB124685	CACC CGCAATCTTTAGTCTTT	GCGTGTCTGCTCGCTCTGG	>1089	+	+	+	+	+	-
IRG37	5	AB124686	CGGAAACTTGGAAACCGGAGTG	CTGTCAATCATCGCCCTTA	1038	+	+	+	+	+	-
IRG41	6	AB124687	TGAGTACTAGGTGAAGATATG	CGGAAAAGTTTCAGATACTAT	319	+	+	+	+	+	+
IRG42	5	AB124688	TGATGAGATAAGATATACCG	TTAGTTATCTTGTTTATCAGC	399	-	-	-	-	-	-
IRG44	4, 6	AB124689	CTATATTGATGACCAATC	TTCCCTTCTTCGCTTAA	142	-	-	-	-	-	-
IRG56	5	AB124690	AAACATATCTTATCGCCTCA	AGGCTAGACAGAACGGGAAG	295	-	-	-	-	-	-
IRG60	7	AB124691	CACACACTTACACGCAGCA	GGTTCTTTGATTCGGTACAT	516	+	+	+	+	+	-
IRG68	5	AB124692	ATCAAATGGCATCTCGGACT	GGCCCTGCTTGGGTTAG	242	+	+	+	+	+	+
IRG68SSR ⁽¹⁾	5		GCTGAGTGGTATTTCAAACAT	AGGTTACATACGAAAACCTTTG	273	-	-	-	-	-	+
IRG75	4	AB124693	TCTCAAAGGCATAAGCGACA	GAGCAACCAACTCCGTGTGA	533	+	+	+	+	+	-
IRG76	7	AB124694	ITATTTGCTTGGGTTAG	GCATGATATGACGCATTTGCAT	371	-	-	-	-	-	-
IRG84	5	AB124695	ATGGGTACATGAAGCGACA	TGGATCTTTGCGAAGCGTG	288	+	+	+	+	+	-
IRG91	7	AB124696	TGCTAGTGAATTGCGGTCGAG	AGCTTAAAGGCGGAAGG	608	+	+	+	+	+	-
IRG94	7	AB124697, AB124698	ACCCAAACTTGCACCCCAT	GCCGAGCGGTGAGTATGAGT	>958	-	-	-	-	-	-
IRG99	2	AB124699, AB124700	GGCTGCGCTAGATTCGACTC	AGACCTACTGGGCTCGAC	>2036	+	+	+	+	+	-
IRG109	4, 5	AB124701	TACTGATGCACTACCGGACA	ATGGTTGGCCTGCTTATGT	159	+	+	+	+	+	-
IRG115	5	AB124702	TGGTGTCTGGTTCATGG	TTTCCGTAACACGACGACAAG	887	+	+	+	+	+	-
IRG121	3	AB124703	GTTCGATGGCAGCTATTGGAA	ATCCGCAATCTGTATAACTG	326	+	+	+	+	+	-
IRG123	4	AB124704	GAGACCCTGCATAAAGATACA	TTCTTTTGGGATAATA	199	+	+	+	+	+	-
IRG129	3	AB124705	TCTGTAACCTCGGGATA	TTTGGCAATAGATATAGTCTG	339	-	-	-	-	-	-
IRG133	4	AB124706	CCACAGGAGCAATCGCAATAA	ATCCGCAATCTGTATAACTG	100	+	+	+	+	+	-
IRG136	7	AB124707	GAGGCAGCACAGTAGAC	ACCAATGGCAGCAGCTACGTT	300	+	+	+	+	+	-
IRG144	5, 6	AB124708	AAGGAGCTACTCTGTGGCATTA	TTGATGTTTTGGGAGTAAATG	223	+	+	+	+	+	-
IRG148	2	AB124709	TGAACATATTAAGGGCTTACC	CCGGTACTCAGACATAGATA	514	+	+	+	+	+	-
IRG150	1	AB124710, AB124711	TTGTCCGTCTCTCCGATCCA	TCCCAACAACCCGAAAG	>1147	+	+	+	+	+	-
IRG168	unknown	AB124712	AGTGGCCAACCAAGTGTAGATT	AGGATGCACCGCAACAAGG	137	-	-	-	-	-	-
IRG169	6	AB124713	AGATCTCCACTTGTCTCGG	TTTCTAGTGTCCGGAGA	95	+	+	+	+	+	-
IRG173	4	AB124714	GCCGTCTCCGACCGTGATCTT	GGAACCCAGGGGATGAT	420	+	+	+	+	+	-
IRG179	2	AB124715	GAAGAAAGTCAAAGCCGTCT	ACTTGTATGTCCATCCCGTCT	258	+	+	+	+	+	-
IRG180	6	AB124716	GAGTAGGCCATGTAGATTGC	GCTCCAAGCCCCGTACAC	340	+	+	+	+	+	-
IRG219	4	AB124717, AB124718	GCCATTAACACCCGAACAT	TCTGTATGATAAATGCGTATG	>1204	-	-	-	-	-	-
IRG222	1	AB124719	TGGAACGCTAGAGCACCC	GGCTTCTTGGGAGTTGTACAT	322	+	+	+	+	+	-
IRG225	3	AB124720	GGGTGTGTGCGTGT	TTTCAAGTTGGAGATTAGTGG	89	+	+	+	+	+	-
IRG226	3	AB124721	TCATGCAGAGTGACCGAGCTA	GACTTGGTTTTGAAGGCATTC	447	+	+	+	+	+	-
IRG234	2	AB124722	ATCCCGTCTCCCTCGTA	AGATTCCTCCATTCCTGTCAT	383	-	-	-	-	-	-
IRG235	1	AB124723, AB124724	GTCTGTCTCAGTTGCGTTAT	CGTGTATGTGGCCTAAT	>1157	+	+	+	+	+	-
IRG250	4	AB124725	GAACTGTGGGCTGTAAAGAC	AGATCTTTACACCGGACC	243	-	-	-	-	-	-
IRG251	1	AB124726	CGATAAGGCTGCGGGATA	TCGCGAATGTGGTTGGCAACT	482	+	+	+	+	+	-
IRG252	4	AB124727, AB124728	CTTCTTCTTGCCTATC	CCTGCCAGTTTCAACAACCATTA	>1077	+	+	+	+	+	+

Table 2. (continued)

Probe	Linkage	Product	Amplification ⁽⁵⁾	Polymorphism ⁽⁶⁾
-------	---------	---------	------------------------------	-----------------------------

Table 2. (continued)

Probe name ¹⁾	Linkage Group ²⁾	DDBJ Accession no. ³⁾	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length (bp) ⁴⁾	Amplification ⁵⁾				Polymorphism ⁶⁾ presence/absence	
						IRG	PRG	MF	TF		ND/WA
IRG252SSR ^{e1}	4		GTGCACATTATGCTCAACAAA	CAGCATAGAGCATCATCAGA	200	+	+	-	+	-	-
IRG253	4, 5, 7	ABI24729	AAAGAAATAAATAATCATGTGTA	CITTTCTTTTATCCTTCGAG	884	+ ^{e1}	-	-	-	+	+
IRG259	4	ABI24730	CTATCCATTTGGCGTTCAC	TATAAGCGGATCGGACTTCA	695	+	+	+	-	-	-
IRG286	7	ABI24731	AGAGCCAGCTTGAGTCTTATC	GGCCATTCATATTGAT	319	+	+	+	-	-	-
IRG287	4	ABI24732, ABI24733	CCTGATGAGCGGACGGAC	TCTTTAGCTGGCCACGCTTT	>788	-	-	-	-	-	-
IRG290	3	ABI24734	GTCGTGTAGTGGCGTAG	GGGTGACGAACCGAAGGAC	494	-	+	+	-	+	+
IRG296	5	ABI24735	ACAATGCCATTTGGGAACGAT	CCAGTCCAATCTCGGCTCT	941	+	+	+	+	+	+
IRG296	3	ABI24736	AAATCAACGCCCGATCAG	CCCAACCTGTGCGCATGACGA	227	+	+	+	+	+	+
IRG303	1, 5	ABI24737, ABI24738	CGTTACTGCTTGTGCACAAC	TATTTGCAAGGCGATA	>771	-	-	-	-	-	-
IRG305	5	ABI24739	TTACAGTGGCCCTTTC	CGGCTCTGGTGTGGAGTTATC	445	+ ^{e1}	-	-	+	-	-
IRG307	2	ABI24740	CACTACAACACTGCACCGTCT	CTAGCAATTTACCTGTGCAA	273	-	-	-	-	-	-
IRG311	5	ABI24741	AGTTTGTAAAGTTATCGG	ATTGCCAGCACTTCTCACTAC	242	-	-	-	-	-	-
IRG313	7	ABI24742	GAGAAGACCAACTTGGCAGAT	CGCGAAGAACTAACA	170	-	+	+	-	+	+
IRG318	1, 2	ABI24743	CGCCACACACTAAA	GGGCAAAATCAAGTGGTTAAGA	397	+ ^{e1}	+	+	-	-	-
IRG320	5	ABI24744	TCCCTATCAATCGCAATTCA	CTACAGGAGGGCACGGTTTCT	571	+ ^{e1}	-	-	+	+	+
IRG321	1	ABI24745, ABI24746	CCTCTGGATCGGTTAC	ATGCGTATGAGGATATAGGC	>1145	+ ^{e1}	-	-	+	+	-
IRG322	2	ABI24747, ABI24748	AGTGTCCGATCGGTTGATAA	AACATGTGGCGCAACAG	>1103	+ ^{e1}	+	+	-	-	-
IRG323	6	ABI24749	GGTCGATCTCACCGATGTT	ACTTCAGAATCACCAATATGC	433	+ ^{e1}	+	+	+	+	+
IRG325 ^{a2}	2	ABI24750	CAGGAGAACATGTTATGCCAT	CCCGTGGCATTTGTT	618	-	-	-	-	-	-
IRG326	7	ABI24751	CATGACTAAGAGTAGCCTG	TTCATCTGTGGCACTAAACC	140	-	-	-	+	+	-
IRG327	3	ABI24752	TCTGGTAAATACATTTGCAA	TGTCAGAAAACCAAAACGC	197	+	+	+	+	+	-
IRG332	2	ABI24753	AGATGCGCACCGACTAAGT	CTGGGTCTTCTTAAAGT	340	+	+	+	+	+	-
IRG333	3	ABI24754	CCCAAAATCTCTGACATAAG	CCCTGTTAACCAATGACTTC	555	+	+	+	+	+	-
IRG335	5	ABI24755	AAACTAGTATGCCATATCAGT	CGCATCTGAAAGATATTC	670	+ ^{e1}	-	-	+	+	+
IRG338	2	ABI24756	CATGGCTTTGGAACACTCGA	CAGCCGAGACATCTAAC	731	+	+	+	+	+	+
IRG341	3	ABI24757, ABI24758	CGGAAGGATCAACTTATCTG	TCTCCGCTCGTTGTTTC	>1033	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG348	2	ABI24759	GGTAGCTATCCTGGCGTGAT	GGTCGGAAATCGGCTTG	615	-	+	+	+	+	-
IRG352	1	ABI24760	CGCACCGTGTGAGCTACCT	CATGTCCCAACAAGATACCA	313	+	+	+	+	+	-
IRG356	3	ABI24761, ABI24762	GATTAATGGGAACCGCTGAA	GCGACTCAATGGCAGTAGAG	>1706	-	-	-	+	+	-
IRG358	2	ABI24763, ABI24764	AAATCTGAAAAGAGCGAAGGT	TACAGCCACACGCCATTC	>1213	-	+	+	-	-	-
IRG362	1	ABI24765	AACAGGAGTTCTTAGATTTA	GGGAAGAGAAAATAACATACA	281	+	+	+	+	+	-
IRG369 ^{a2}	6	ABI24766	GGTAGTCTCTGTGGTGCTA	AAATGCAACCGTCTTATT	594	-	-	-	-	-	-
IRG370 ^{a2}	2	ABI24767	TTTTTATTTATCCAGTACGG	CTCCACACGTCGATCCCTAA	451	-	-	-	-	-	-
IRG378 ^{a2}	3	ABI24768	GATCCAGTGAATGTTCAAC	ATGGACTGTTTTCTTATGTC	497	-	-	-	-	-	-
IRG383	5	ABI24769	TTTTAAATCCATTTGTGTTTA	CAAGCTTCACTTGATAAGTCA	187	-	-	-	+	+	-
IRG391	unknown	ABI24770	GCTGGCCCTGGTGTCCGGTCA	TTGCTGTGCGGGAACATAC	559	-	-	-	-	-	-
IRG400	3	ABI24771	GGTGTAAATCCATCAGTAT	AGAGCAACCGAGTACACTGT	251	+	+	+	+	+	-
IRG429	2, 3	ABI24772	TTGCCCTTCTCTGGGTACA	TCAGTTTCGGACCGGCAAC	158	+	+	+	+	+	-
IRG436	3	ABI24773, ABI24774	GCAACTGCACGTCGAGA	TTCTTGTGGCAGATAGTAAAT	>1001	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG441	1	ABI24775	ITCAGTGTTCCTCGCTGA	AACGTTAGATTAAATGTACCCA	404	+	+	+	+	+	-
IRG442 ^{a2}	5	ABI24776	CTGACCTTGAACCCATAAT	GTACTCATGGACAGACTCTGA	437	-	-	-	+	+	-
IRG450	4	ABI24777	GGGATTCGACTTTGGTTATC	GTTTTTGTCTAATTTAGGTG	591	-	-	-	+	+	-
IRG452	6	ABI24778	AGTTTACTTCTCCGTTGCT	TAACTCAATGACAAGCCGTGA	515	+ ^{e1}	+	+	+	+	-
IRG454 ^{a2}	4, 7	ABI24779	TGTTGATATCCCTCTATG	TGCGTATGACCATGATACACC	437	-	-	-	+	+	-

¹⁾ a1: Primers designed from the clone with the same number; a2: primers designed from forward or reverse sequence only.

²⁾ Some clones were multiple copies and mapped to more than 1 linkage group.

³⁾ The 2 DDBJ ID numbers correspond to the forward and reverse sequences.

⁴⁾ Values indicated a minimum product size greater than expected, because the clones were not sequenced completely.

⁵⁾ IRG: Italian ryegrass; PRG: perennial ryegrass; MF: meadow fescue; TF: tall fescue; ND/WA: 2cultivars of IRG Nioudachi & Waseooba; +: amplified; -: not amplified; e1: amplified in only 1-3 of 5 plants.

⁶⁾ Polymorphism in within-cultivar of ND or WA. +: polymorphism; -: monomorphism.

Syntenicity between IRG and rice

Based on the results of BLAST searches, 12 IRG genomic clones matched the rice sequences. Clones IRG290, IRG333 and IRG341 in the IRG linkage group (LG) 3 matched the clones located on chromosome 1 of rice; IRG27 and IRG252 in IRG LG4 matched the clones on chromosome 3 of rice; and IRG338 and IRG348 in IRG LG2 matched the clones on chromosomes 7 and 4, respectively. These facts suggest that IRG LG3, LG4 and LG2 may be syntenous with rice chromosomes 1, 3, 4 and 7, as indicated by Jones *et al.* (2002b). Three other clones—IRG 235 and IRG 352 in IRG LG1, and IRG 286 in IRG LG7—matched clones on rice chromosomes 4, 10 and 1, respectively, but these results did not agree with those of Jones *et al.* (2002b).

Transfer of STS markers of IRG to closely related species

In several studies it was reported that some of the STS primers failed to amplify homologous sequences when transferred to other species (Erpelding *et al.* 1996, Talbert *et al.* 1994, 1996, Mano *et al.* 1999). We screened 67 STS (and SSR) primer pairs developed from IRG genomic probes to examine the possibility of transfer to closely related species. Fifty-seven (85%) could amplify products in PRG, 47 (70%) in MF and 55 (82%) in TF. Yet the frequencies were almost similar to those reported by Erpelding *et al.* (1996), who showed that approximately 70% of the STS markers could be transferred between barley and wheat. The frequency which we obtained was also similar to the transfer ratio of SSR markers from TF to MF, tetraploid fescue and ryegrass (Saha *et al.* 2003).

Identification of SSR markers from RFLP probes

Development of SSR markers, either by traditional library screening methods or library enrichment, is laborious and expensive. Schloss *et al.* (2002) found 74 SSR markers from 69 RFLP probes by sequencing 789 previously mapped sorghum RFLP probes, and developed 60 new SSR markers. We also identified 2 SSR sequences from 93 RFLP probe sequences and succeeded in converting 1 SSR marker. Although the number of SSR markers is very limited, SSR markers are more efficient tools in polymorphism surveys than STS or cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers. In addition, the SSR sequences detected in genomic clones may have a larger proportion of multiple nucleotide repeat motifs which are not generally used in traditional library screening or library enrichment (Schloss *et al.* 2002). Therefore, we expect that RFLP end-sequencing will become an alternative method for identifying SSR markers.

Within-cultivar polymorphism

In the polymorphism survey of 16 plants from 2 cultivars of IRG, we found that 25 out of 62 primers (40%) detected within-cultivar polymorphism in 1 or both cultivars. Compared with the frequency found in self-pollinating crops, the frequency of length polymorphism detected was high. Mano *et al.* (1999) reported that only 4 out of 41 prim-

ers showed length or presence/absence of polymorphism in barley. Conversion of the STS markers to CAPS markers may enable to detect polymorphism more efficiently, since Mano *et al.* (1999) detected 14 CAPS polymorphisms from 37 STS primers of barley by using 12 endonucleases, and Taylor *et al.* (2001) detected 11 CAPS polymorphisms from 13 STS primers of *Lolium perenne* by using 3 endonucleases. To detect more polymorphisms efficiently by using STS markers in IRG, it may be necessary to convert STS markers to CAPS markers.

Until now, more than 50,000 ESTs had been generated from PRG and IRG, but they are not available for public use (Spangenberg *et al.* 2003). Taylor *et al.* (2001) reported 13 STS primers in PRG designed from barley, oat and PRG. Lem and Lallemand (2003) reported 42 STS markers from *Lolium* and related species. The 67 STS (and SSR) markers generated in our study did not duplicate the STS markers developed in the above 2 studies, based on the results of the BLAST searches. Because these 67 STS (and SSR) markers are distributed across all the 7 IRG linkage groups, they could become useful landmarks for different populations in mapping new genes and agriculturally important traits.

Acknowledgments

We thank Dr. H. Morishima (Tokyo University of Agriculture, Japan) and two anonymous reviewers for their valuable comments on the manuscript. This study was financially supported by a grant from the Japan Racing Association.

Literature Cited

- Alm, V., C. Fang, C.S. Busso, K.M. Devos, K. Vollan, Z. Grieg and O.A. Rognli (2003) A linkage map of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) and comparative mapping with other Poaceae species. *Theor. Appl. Genet.* 108: 25-40.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Armstead, I.P., L.B. Turner, I.P. King, A.J. Cairns and M.O. Humphreys (2002) Comparison and integration of genetic maps generated from F₂ and BC₁-type mapping populations in perennial ryegrass. *Plant Breed.* 121: 501-507.
- Arumuganathan, K. and E.D. Earle (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 208-218.
- Barakat, A., N. Carels and G. Bernardi (1997) The distribution of genes in the genomes of Gramineae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6857-6861.
- Beckmann, J.S. and M. Soller (1986) Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
- Bert, P.F., G. Charmet, P. Sourdille, M.D. Hayward and F. Balfourier (1999) A high-density molecular map for ryegrass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 99: 445-452.
- Blake, T.K., D. Kadyrzhanova, K.W. Shepherd, A.K.M.R. Islam,

- P.L. Langridge, C.L. McDonald, J. Erpelding, S. Larson, N.K. Blake and L.E. Talbert (1996) STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. *Theor. Appl. Genet.* 93: 826-832.
- Chen, C., D.A. Sleeper and G.S. Johal (1998) Comparative RFLP mapping of meadow and tall fescue. *Theor. Appl. Genet.* 97: 255-260.
- Erpelding, J.E., N.K. Blake, T.K. Blake and L.E. Talbert (1996) Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley. *Genome* 39: 802-810.
- Forster, J.W., E.S. Jones, R. Kölliker, M.C. Drayton, J. Dumsday, M.P. Dupal, K.M. Guthridge, N.L. Mahoney, E. van Zijll de Jong and K.F. Smith (2001) Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In "Molecular Breeding of Forage Crops" Spangenberg, G. (ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 101-133.
- Hayward, M.D., J.W. Forster, J.G. Jones, O. Dolstra, C. Evans, N.J. McAdam, K.G. Hossain, M. Stammers, J.A.K. Will, M.O. Humphreys and G.M. Evans (1998) Genetic analysis of *Lolium*. I. Identification of linkage groups and the establishment of a genetic map. *Plant Breed.* 117: 451-455.
- Helentjaris, T. (1987) A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends Genet.* 3: 217-221.
- Hirata, M., M. Fujimori and T. Komatsu (2000) Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Italian ryegrass. In "Molecular Breeding of Forage Crops 2000" Lorne and Hamilton, Victoria, Australia, Nov. 19-24.
- Hutchinson, J., H. Rees and A.G. Seal (1979) An assay of the activity of supplementary DNA in *Lolium*. *Heredity* 43: 411-421.
- Inoue, M., Z.S. Gao, M. Hirata, M. Fujimori and H.W. Cai (2004) Construction of a high-density linkage map of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) using restriction fragment length polymorphism, amplified fragment length polymorphism, and telomeric repeat associated sequence markers. *Genome* 47: 57-65.
- Inoue, T., H.S. Zhong, A. Miyao, I. Ashikawa, L. Monna, S. Fukuoka, N. Miyadera, Y. Nagamura, N. Kurata, T. Sasaki and Y. Minobe (1994) Sequence-tagged sites (STSs) as standard landmarks in the rice genome. *Theor. Appl. Genet.* 89: 728-734.
- Jones, E.S., M.P. Dupal, R. Kölliker, M.C. Drayton and J.W. Forster (2001) Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 405-415.
- Jones, E.S., M.P. Dupal, J.L. Dumsday, L.J. Hughes and J.W. Forster (2002a) An SSR-based genetic linkage map for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105: 577-584.
- Jones, E.S., N.L. Mahoney, M.D. Hayward, I.P. Armstead, J.G. Jones, M.O. Humphreys, T. Kishida, T. Yamada, F. Balfourier, G. Charmet and J.W. Forster (2002b) An enhanced molecular marker-based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome* 45: 282-295.
- Lem, P. and J. Lallemand (2003) Grass consensus STS markers: an efficient approach for detecting polymorphism in *Lolium*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1113-1122.
- Mano, Y., B.E. Seyed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda (1999) Map construction of sequence-tagged sites (STS) in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 937-946.
- Michalek, W., G. Kunzel and A. Graner (1999) Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 42: 849-853.
- Murray, J., J. Larsen, T.E. Michaels, A. Schaafsma, C.E. Vallejos and K.P. Pauls (2002) Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. *Genome* 45: 1013-1024.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson (1980) The isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Doststein (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Saha, M.C., K. Chekhovski, J.C. Zwonitzer, I. Eujayl and M.A.R. Mian (2003) Development of microsatellite markers for forage grass and cereal species. *Plant and Animal Genome XI Conference*, San Diego, CA, USA, Jan. 11-15.
- Schloss, S.J., S.E. Mitchell, G.M. White, R. Kukatla, J.E. Bowers, A.H. Paterson and S. Kresovich (2002) Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 105: 912-920.
- Spangenberg, G., T. Sawbridge, E. Ong, M. Emmerling, T. Webster *et al.* (2003) Integrated resources for pastoral functional genomics: EST collections, BAC libraries, VIGS systems and microarray-based expression profiling in perennial ryegrass (*Lolium perenne*), white clover (*Trifolium repens*) and *Neotyphodium* grass endophytes. *Plant and Animal Genome XI Conference*. San Diego, CA, Jan. 11-15.
- Talbert, L.E., N.K. Blake, P.W. Chee, T.K. Blake and G.M. Magyer (1994) Evaluation of "sequence-tagged-site" PCR products as molecular markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 789-794.
- Talbert, L.E., P.L. Bruckner, L.Y. Smith, R. Sears and T.J. Martin (1996) Development of PCR markers linked to resistance to wheat streak mosaic virus in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 93: 463-467.
- Taylor, C., K. Madsen, S. Borg, M.G. Moller, B. Boelt and P.B. Holm (2001) The development of sequence-tagged sites (STSs) in *Lolium perenne* L.: the application of primer sets derived from other genera. *Theor. Appl. Genet.* 103: 648-658.
- Tsumura, Y., Y. Suyama, K. Yoshimura, N. Shirato and Y. Nukai (1997) Sequence-tagged sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 764-772.
- van Deynze, A.E., M.E. Sorrells, W.D. Park, N.M. Ayres, H. Fu, S.W. Cartinhour, E. Paul and S.R. McCouch (1998) Anchor probes for comparative mapping of grass genera. *Theor. Appl. Genet.* 97: 356-369.
- Xu, W.W., D.A. Sleper and D.A. Hoisington (1991) A survey of restriction fragment length polymorphism in tall fescue and its relative. *Genome* 34: 686-692.
- Xu, W.W., D.A. Sleper and S. Chao (1995) Genome mapping of polyploid tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) with RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 947-955.