

特集：RFLP 解析とその応用〔1〕

## 植物の RFLP

農林水産省農業生物資源研究所 <sup>かわ</sup>河 <sup>せ</sup>瀬 <sup>ま</sup>真 <sup>こと</sup>琴

## はじめに

植物の遺伝形質の研究は、まず個々の形質や遺伝現象に着目し、その形質を支配する遺伝子を解析するという方法で研究されてきた。メンデルのエンドウマメの実験で知られるように、まず形態的形質が研究の対象となり、その後、生化学的形質、生理的形質と広がった。多くの人為的突然変異遺伝子をマーカー（標識）として利用した遺伝研究の結果、トウモロコシ、オオムギ、イネなどの作物で、遺伝子の連鎖関係に基づく連鎖地図が構築された。連鎖地図は個々の遺伝子がどの染色体のどの部分に座乗しているかを表している。

近年の分子生物学の進展により、遺伝情報を担っている DNA の変異を直接分析することが可能になってきた。そのひとつが RFLP 解析である。RFLP 解析は DNA の多型、すなわち自然界に存在する遺伝的変異の検出に利用できる。したがって、多くの人為突然変異のように生存や生育に不都合な形質を導入することなく、一度に多くの遺伝子座について研究することが可能になった。

ここでは植物、とくに作物の核 DNA の RFLP に関して、遺伝的変異の指標としての集団遺伝学的利用や系統分類への応用も含めて述べることにする。

## I RFLP 解析の原理と方法

## 1 RFLP 解析の原理

RFLP は Restriction Fragment Length Polymorphism (制限酵素断片長多型) の略称であり、その検出にはサザーン・プロット法が用いられる (SOUTHERN, 1975)。まず組織から DNA 分子を抽出し、制限酵素によって切断 (消化) すると様々な長さの DNA 断片が得られる。制限酵素は特定の塩基配列の所で DNA を切断する酵素であり、非常に多くの種類が見いだされている。消化された DNA をアガロース電気泳動などによって断片の長さに基づいて分離し、二本鎖 DNA を一本鎖に解離した後ナイロン・フィルター・メンブレンに転写する。別に用意した特定の配列の DNA をプローブとして相補

的な DNA 同士をハイブリダイゼーションさせることによって泳動された断片がバンドとして検出される。一般にはプローブ DNA を予め放射性同位元素によって標識したり、あるいは非放射性的化学標識を行い発色反応や化学発光を利用して検出する。DNA を抽出した植物個体によってバンドの位置、すなわち制限酵素処理によって生成した DNA 断片の長さに違いがあれば、それは個体間の遺伝的な多型を検出したことになる。

RFLP として検出される DNA の塩基配列の変異の原因には、制限酵素認識部位の塩基配列のポイント・ミューテーション (点突然変異) である塩基置換、DNA 断片の挿入、欠失、塩基のメチル化などが考えられる (図-1)。

従来から遺伝的マーカーとして用いられている多くのアイソザイムなどと同様に、雑種が両親のバンドを併せ持つ共優性を示す (変異がバンドの有無の場合は優性・劣性となる) が、一度にアイソザイムでは及びもつかないほど多くの遺伝子座について解析を行うことができる。また、今後さらに検証が必要であるが、植物個体の細胞が同じ染色体のセットを保有しているとすれば、生長のステージによる差異や組織・器官特異性を基本的に無視できると考えられる。

## 2 RFLP 解析の方法

## (1) RFLP プローブ

RFLP の検出に用いるプローブとしては、さまざまな DNA の断片が考えられる。ジェノミッククローンでもよいし、cDNA クローンでもよい。連鎖分析のための遺

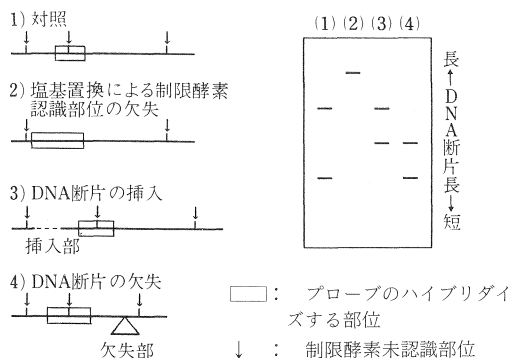


図-1 RFLP の生じる原理

伝子マーカーとして利用するのであれば、なるべくコピー数が少なく、単純なバンドを検出できるものが便利である。イネを例にとると、合衆国のコーネル大学のTANKSLEY博士らのグループが開発したRFLPプローブ(McCOUCH et al., 1988)は現在USDAに寄託されているし、農林水産省と九州大学の研究グループが開発したプローブは農業生物資源研究所で管理しており、申請すれば研究用として配布されている。これらは扱いの簡便さから数百から二千塩基対(bp)程度の長さのDNA断片が多い。また、品種や個体の識別にはDNA反復配列の利用が考えられ、一度に多くのバンドの検出できるプローブを用いた、いわゆるフィンガー・プリンティングが試みられている。

これらDNA断片は適当なプラズミドに組み込んで大腸菌で大量に増殖する、あるいはPCR法で増幅することができる。実際にプローブとして用いる際には検出のため放射性同位元素( $^{32}\text{P}$ など)を用いた放射能標識や非放射能標識(ピオチン、ジゴキシゲニン標識など)を用いて標識化する必要がある。放射能標識にはDNA修復反応を利用したニックトランスレーション法、Klenow fragmentのポリメラーゼ活性を利用したランダムプライマー伸長法などいくつかの方法があり、キットとして販売されている。

筆者らは、最近是非放射能標識法としてジゴキシゲニン(DIG)による方法を利用している。ペーリンガー・マンハイム社よりDIG DNA Labelling Kitとして市販されている。プローブとして用いるDNA断片を一本鎖に解離(変性と呼ぶ)した後、ジゴキシゲニンの結合したデオキシウリジン三リン酸(DIG-dUTP)を含む反応溶液中で、Klenow fragmentのポリメラーゼ活性を利用したランダムプライマー伸長法で標識化する。合成されたDNAの20-25ヌクレオチドごとにDIG-dUTPが取り込まれるといわれている。具体的な標識操作は次のとおりである。

プローブとなるDNA断片をクロニングして増殖後、プラズミドから制限酵素で切り出し、アガロースゲル電気泳動で分離し、抽出する。得られたDNA断片を含む水溶液をウォーターバスで95°C、10分間変性し、氷水に移し急冷する。この変性したDNA(10 ng~3 µgDNAを含む)の水溶液15 µlにヘキサヌクレオチド混合物(ランダムプライマー、キットに付属)2 µl、dNTP混合物(dATP, dCTP, dGTP, dTTP及びDIG-dUTPの混合物、キットに付属)2 µl、Klenow enzyme(キットに付属)1 µlを加え、37°Cで20時間程度置く。DIG標識したプローブの精製にはTakaraのSuprec-02を用いると

簡便である。

## (2) DNAの調製

RFLP分析には50 kbp程度のDNAを得ることが望ましく、そのため植物体からのDNAの抽出にはCTAB法が簡便で適している。筆者らはMURRY and THOMPSON(1980)の方法を改変して用いているので、そのプロトコルを図-2に示す。得られたDNAを少量とって電気泳動し、λDNAより大きいかあるいはほぼ同じくらいの分子量であれば、十分RFLP分析に用いることができる。

## (3) アガロース電気泳動とプロットイング

植物体から抽出したDNAを制限酵素で消化し、生じたDNA断片を分子量に応じて分離するためにアガロースゲル電気泳動を用いる。目的とするDNA断片長にもよるが、0.8%から1.5%のアガロースゲルが適している。サザン・プロットイングの場合には電気泳動したゲ

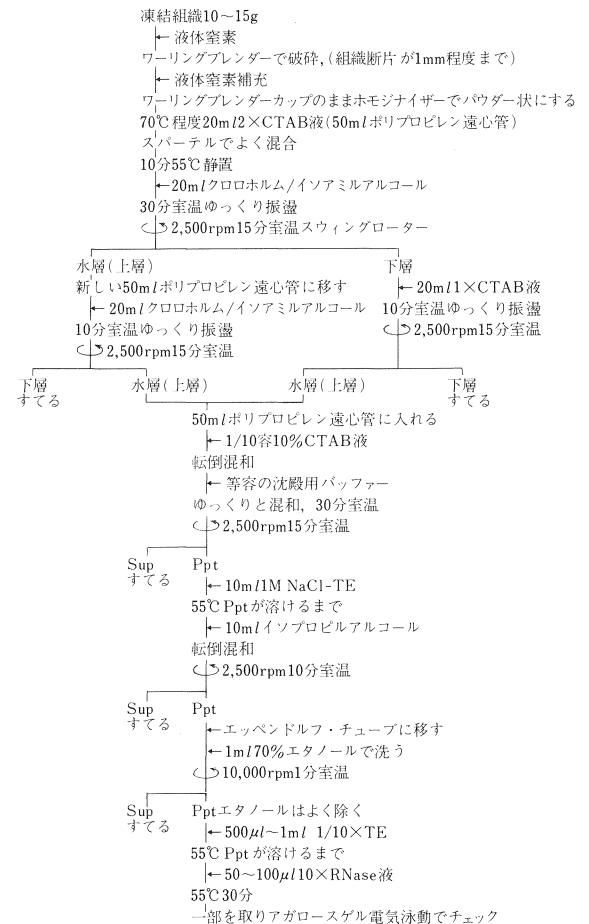


図-2 植物DNAの調整法(渡辺格監修, 植物バイオテクノロジー実験マニュアル「クロニングとシークエンス」(1989)より一部改変)

ルを酸処理, 続いてアルカリ変性処理し, ナイロン・フィルター・メンブレンに転写する。特に大きな DNA 断片を目的としない場合には, 酸処理を省略したアルカリ・プロットイングが簡便である。これは電気泳動後のゲルをアルカリ溶液 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) 中でゆっくり振とうした後, 同じアルカリ溶液を用いたキャピラリー・プロットイングによってナイロン・フィルター・メンブレンに転写する方法である。いずれの場合もゲルを割ったり, ゲルとナイロン・フィルター・メンブレンとの間に気泡が入ったりしないように注意する。また, アルカリ・プロットイングの場合にはナイロン・フィルター・メンブレンを素通りする DNA もあるので, プロットイングを5時間以内にとどめておいた方が無難である。

ハイブリダイゼーションの基本的な原理, 手順は多くの分子生物学に手引き書 (たとえば SAMBROOK et al., 1989) に解説されているし, とくにハイブリダイゼーションについては小林・小林 (1990) に詳述されているので参照されたい。

#### (4) RFLP の検出

前述のように, RFLP の検出は放射能標識あるいは非放射能標識したプローブによって行われる。標識法には多くの方法が試みられ, 現在ではキットの形で各社より供給されている (兼松ら, 1991)。

ジゴキシゲニンによる方法はベーリンガー・マンハイム社より DIG Luminescent Detection Kit として市販されており, 付属のプロトコールにしたがって X 線フィルムで検出できる。以下にプロトコールを簡単に示す。

1) プレハイブリダイゼーション: DNA をプロットイングしたナイロン・フィルター・メンブレンはメンブレン 100 cm<sup>2</sup> 当たり 20 ml のハイブリダイゼーション溶液 (5×SSC, 1%プロッキング剤 (キット付属), 0.1% (w/v) N-Lauroylsarcosine/0.02% (w/v) SDS) 中で 68°C で 1~3 時間。ホルムアミドを 50% 添加するときは 42°C。

2) ハイブリダイゼーション: 前述のハイブリダイゼーション溶液 1 ml 当たり 10~20 ng の熱変性した DIG 標識プローブを加えた溶液を調製し入れ換える。量はメンブレン 100 cm<sup>2</sup> あたり 2.5 ml。68°C で一晩置く。ホルムアミドを 50% 添加するときは 42°C。

3) メンブレンの洗浄: ハイブリダイゼーションの終わったメンブレンは 0.1% SDS を含む 2×SSC で室温, 5 分間 2 回, 次いで 0.1% SDS を含む 0.5×SSC で 68°C, 15 分間 2 回洗浄する。

4) 検出:

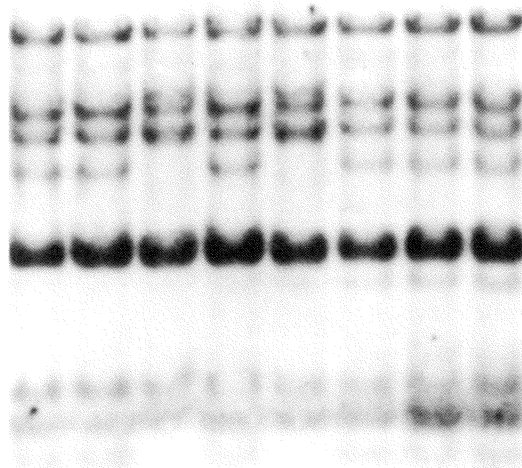


図-3 DIG 標識プローブを用いたイネの RFLP の検出例

① メンブレンをウォッシング・バッファー (0.1 M マレイン酸, 0.2 M NaOH, 0.15 M NaCl, 0.3% (w/v) Tween 20) に軽く浸す。

② メンブレンを 100 ml のバッファー 2 (0.1 M マレイン酸, 0.2 M NaOH, 0.15 M NaCl, 1%プロッキング剤) で室温で 30 分。

③ 抗ジゴキシゲニン抗体とアルカリ性フォスファターゼの結合体 (キットに付属) をバッファー 2 に 1:10000 で希釈した溶液 20 ml 中にメンブレンを移し, 室温で 30 分。この溶液は 4°C で 12 時間しか活性がない。

④ メンブレンをバッファー 3 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) で数分平衡化する。

⑤ メンブレンの水分を濾紙に吸わせた後, AMPPD (基質, 3-(2'-Spiroadamantane)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetane) をバッファー 3 に 1:100 に希釈して調製した基質溶液に浸す。

⑥ メンブレンを完全には乾かさないうちに水分を濾紙で吸い取り, 市販のハイブリ・バッグに入れるかあるいは台所用のラップで包み, X 線フィルム・カセットに入れ, 暗室で X 線フィルムを入れる。20 分~2 時間露光後, フィルムを現像する (図-3)。

(5) 結果の解析

RFLP の解析法には, 画像解析・自動読み取りによる

方法も開発されているが、まだ一般に普及するには至っていない。

肉眼で多型を判断する場合には、アイソザイムやタンパク質の電気泳動像の解析と同様である。分類単位の間にはどの程度の遺伝的な差異があるかをみるために遺伝距離 (genetic distance) という概念が用いられる。タンパク質のアミノ酸の置換の速度は個々の例では異なっているが、長い進化の時間で考えれば全体としてはほぼ一定とみなして解析を行うことによって、進化の道筋に時間の概念を持ち込むことが可能になるという考えに基づいている。NEI (1972) は、集団の標準遺伝距離 (standard genetic distance) を

$$D = -\log_e I$$

で推定できると考えた。

ここで  $I$  は集団間の類似度を示す遺伝的相同指数で

$$I = J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y}$$

で求められる。ここで  $J_{XY}$ ,  $J_X$ ,  $J_Y$  は  $j$  番目の遺伝子座における  $i$  番目の対立遺伝子頻度を、 $X$ ,  $Y$  という二つの集団についてそれぞれ  $x_{ij}$ ,  $y_{ij}$  としたとき

$$J_X = \sum_j \sum_i \frac{(x_{ij})^2}{r}$$

$$J_Y = \sum_j \sum_i \frac{(y_{ij})^2}{r}$$

$$J_{XY} = \sum_j \sum_i \frac{(x_{ij} \cdot y_{ij})}{r}$$

で与えられる。 $r$  は調査遺伝子座数を表す。

$X$ ,  $Y$  の二つの集団で遺伝子頻度が全く等しければ、 $I = 1$ ,  $D = 0$  となり、対立遺伝子に共通性がなくなれば  $I = 0$ ,  $D = \infty$  となる。

遺伝距離は、調査遺伝子座数、集団数によって、必ずしも同様な精度で比較できるものではないが、一般に分類単位のランク (属, 種, 亜種など) に比較的良好に対応するといわれ、アイソザイムを中心とする集団の遺伝的構造や遺伝的分化の目安として用いられている。

ミトコンドリア DNA やクロロプラスト DNA をいろいろな制限酵素で消化して得た DNA 断片の情報から、個体  $X$  と個体  $Y$  の遺伝的な類似度は

$$F = \frac{2 m_{xy}}{m_x + m_y}$$

で推定することができる (NEI, 1987)。ここで  $m_x$ ,  $m_y$  はそれぞれ  $X$  と  $Y$  で見られる DNA 断片数,  $m_{xy}$  は  $X$ ,  $Y$  に共通して見られる DNA 断片数である。詳細は省略するが、この値に基づいて 1 サイト当たりの塩基置換数を推定できる。

遺伝距離あるいは個体間の遺伝的類似度に基づいて、共通祖先からの分化のパターンを系統樹として再構成す

る試みには、さまざまな方法が考えられている。枝分かれ図を描く多変量解析はクラスター分析と呼び、いろいろな手法があるが、一般に広く用いられているのが UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) である。各分類単位 (OTU, operational taxonomic unit) 間の遺伝距離の最も小さいものをひとつのグループにまとめ、その新しい分類単位と他の分類単位間の遺伝距離は、もとの二つの遺伝距離の相加平均を用いる (Nei, 1987)。簡単に図で示すと

OTU	1	2	3
2	$d_{12}$		
3	$d_{13}$	$d_{23}$	
4	$d_{14}$	$d_{24}$	$d_{34}$

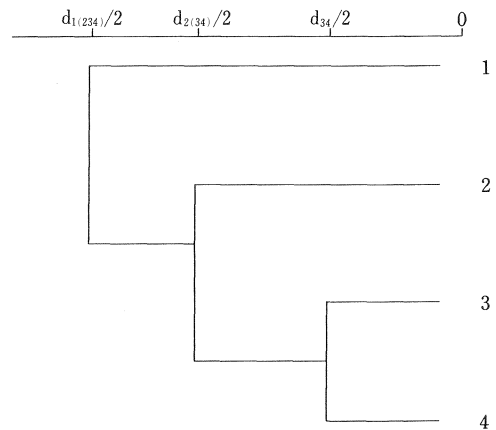
ここで  $d_{ij}$  は  $i$  番目と  $j$  番目の分類単位間の遺伝距離である。

もし、分類単位 3 と 4 の距離が最小であれば、

OTU	1	2
2	$d_{12}$	
(3,4)	$d_{1(3,4)}$	$d_{2(3,4)}$

となる。ここで  $d_{1(3,4)}$  と  $d_{2(3,4)}$  は  $(d_{13} + d_{14})/2$ ,  $(d_{23} + d_{24})/2$  でそれぞれ与えられる。

もし  $d_{2(3,4)}$  が最小なら、分類単位 2 と分類単位 (3,4) が遺伝距離  $d_{2(3,4)}/2$  の点で結びつく。この場合、分類単位 1 は最後に他の分類単位とつなぐことになる。その分岐点の遺伝距離は  $d_{1(234)}/2 = d_{12} + d_{13} + d_{14} / (3 \times 2)$  である。



系統樹の再構築のための枝分かれ図 (デンドログラム) の手法には UPGMA 以外にもいろいろ試されている。遺伝距離がタンパク質のアミノ酸の置換、あるいは DNA の塩基の置換などをもとの遺伝的分化に時間軸を導入使用とするものであるが、たとえば RFLP 分析で得られる結果を考えた場合、それには前述のように制限酵素認識部位の塩基の置換、DNA 断片の挿入、欠失、逆位、

塩基のメチル化などいろいろな原因が考えられ、解析している DNA も構造遺伝子の領域もあれば、それ以外の部分もあり、その解析方法も十分に確立されているとはいえない。多型の検出方法、解析方法とも今後のゲノム研究によって新たな展開が予想される。

### 3 RFLP 連鎖地図作成の原理と方法

メンデルの分離の法則、独立の法則、優性・劣性の法則の発見は現在の遺伝学の基礎となったが、独立の法則にはたくさんの例外がある。独立の法則は遺伝子が別の染色体に座乗しているか、あるいは同一の染色体上でも離れた位置にあるときに成り立つ。逆に同じ染色体の上で近くに位置しているときには、二つの遺伝子が一緒に行動しがちになる。この現象を連鎖と呼ぶ。配偶子が形成される減数分裂の際に、交叉と呼ばれる染色体部分の

交換が起こる。交叉が染色体上のいろいろな点でランダムに生じれば、2 個の遺伝子が互いに近ければまれに、離れていればより頻繁に交叉によって組換えられる。すなわち組換えの頻度から遺伝子の染色体上での距離を推察できる。実際には染色体のすべての部分で同じ頻度で組換えが起こるわけではないので、その距離は物理的距離と完全に比例するわけではないが、遺伝子の順序は変わらない。同一染色体上で離れて存在する遺伝子については、検出されない多重交叉があるため、その組換え率は地図距離より低くなり、お互いに独立なほど遠く離れた遺伝子間の組換え率は 50% となる。組換え価の計算法にはプロダクト法や最尤法があるが、詳しくは植物遺伝学実験法 (常脇 (責任編集), 1982) などを参考にされたい。

通常ホモ接合性の高い自殖性植物の場合、多くの RFLP を検出できる個体間の組み合わせの交配で得られた雑種第 2 代 (F<sub>2</sub>) (あるいは戻し交雑) の RFLP マーカーの分離を調査し、連鎖関係を分析することによって、RFLP 連鎖地図を作成できる (図-4)。RFLP だけでなく、特定の形質の遺伝子をその地図上に位置づけることも可能である。現在では専用のコンピュータ・ソフトが開発されている (LANDER et al., 1987; 鶴飼ら, 1990)。

また、三染色体植物 (トリソミックス) を利用し、座乗染色体を特定することも行われる。

## II 植物の RFLP とその応用

### 1 研究の現状

植物における RFLP の利用は 1980 年代後半から急速に増え、新しい遺伝マーカーとして広く利用されている。植物、とくに農業において利用されている作物の場合には遺伝子地図の作成あるいは特定の遺伝子の連鎖分析、品種間変異の解析、品種識別、さらには戻し交雑における特定の遺伝子の同質遺伝子系統作出の効率化、量的形質を支配する複数の遺伝子座の解析などが試みられている。そのいくつかを紹介したい。

RFLP 連鎖地図は、トウモロコシ、トマト、イネ、オオムギ、コムギ、ジャガイモ、レタス、ブラシカ類、等々主要作物のほとんどで次々と発表されているし、品種間、種間などの遺伝的変異の研究もきわめて盛んである。

図-5 にイネの RFLP 連鎖地図を示す (SAITO et al., 1991)。12 対の染色体に対応した連鎖群で構成され、RFLP マーカーといくつかの形態やアイソザイムの遺伝子が乗っている。

RFLP は遺伝的多様性の研究にも早くから利用されている。筆者らはイネで核 DNA の RFLP を利用して品種分類を試みた (KAWASE et al., 1991)。世界各地の品種

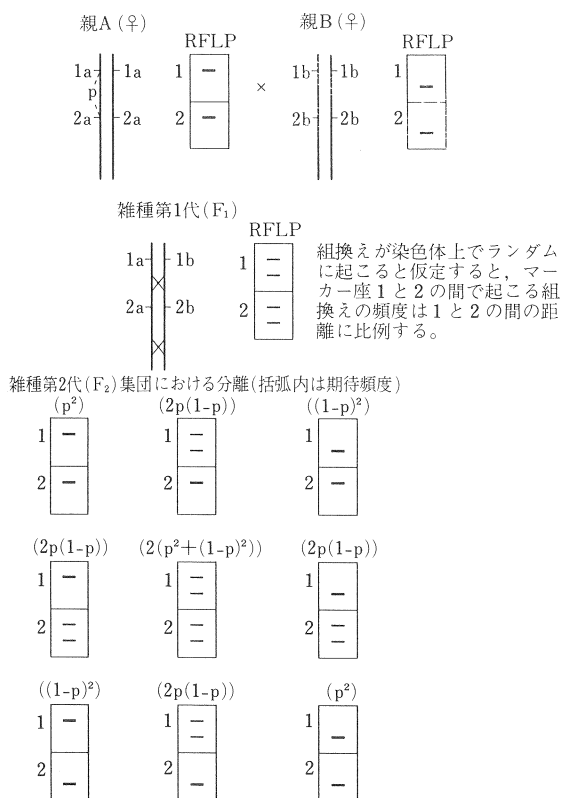


図-4 RFLP 連鎖分析の原理

二つの RFLP マーカー 1 及び 2 について、1a, 2a を示す個体 A と 1b, 2b を示す個体 B (ともに同質接合体とする) との交配から得られる雑種第一代及び第二代の分離を模式的に示す。組換え価を  $p$  と置き、F<sub>2</sub> 集団の実際の分離と期待頻度から最尤法により組換え価  $p$  を求める。染色体上における RFLP マーカーの配列順序を決めるためには、3 個のマーカーの連鎖を調べる 3 点試験を順次繰り返す。

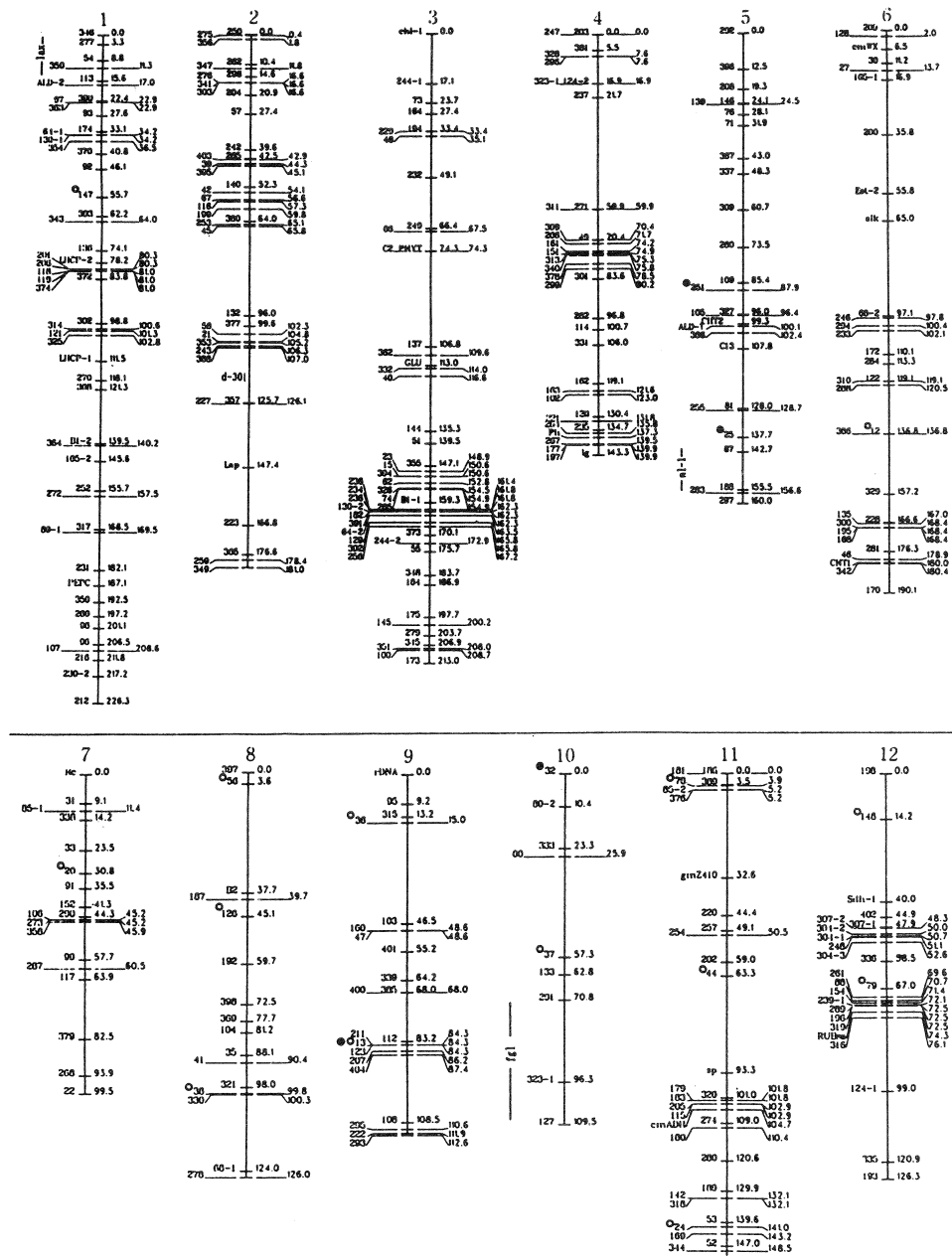


図-5 イネのRFLP連鎖地図 (SAITO et al., 1991)

135品種を用い、57のRFLPマーカーについて調査した。得られた結果を主成分分析、クラスター分析したのが図-6である。このRFLPによる分類の試みの結果、供試品種がまず二つのグループに分類できたが、それは従来唆されてきた2大品種群(インド型品種、日本型品種)とよく対応していた。さらに各品種群の中に特定の分布地域と結びついた小さな品種群の存在も明らかとな

った。  
 野生イネには2倍体、4倍体の多くの種が知られているが、WANG et al. (1992)は93アクセシオンをRFLP解析し、細胞遺伝学的研究によるゲノム分析の結果と突き合わせ、非常によく対応していることを報告している。さらに異質4倍体の種の祖先2倍体種の推定も試みてい

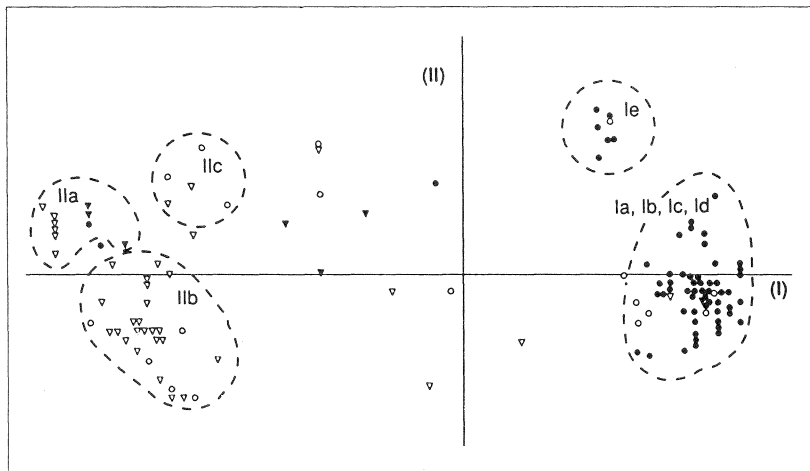
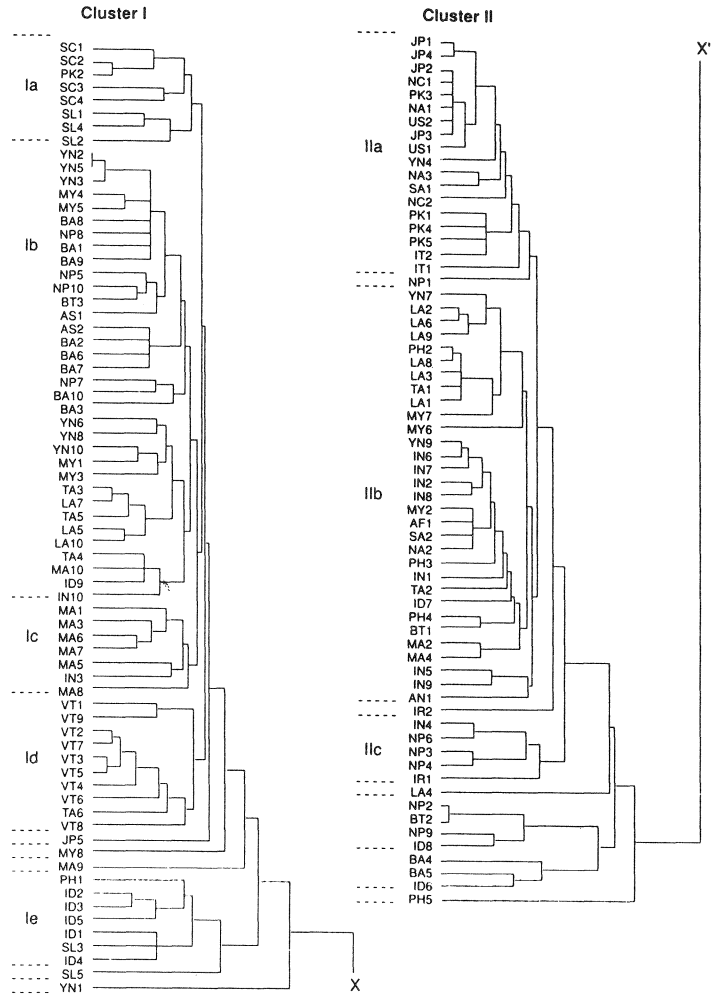


図-6 イネ品種のRFLPに基づくクラスター分析(上)及び主成分分析(下) (KAWASE et al., 1991)

他殖性の植物としては BRUMMER et al. (1991) が二倍体と四倍体のアルファルファの変異の解析に RFLP を用いている。McGRATH et al. (1992) は各地域の草型の異なるキャベツ類の遺伝的変異をアイソザイムと RFLP の両者を用いて比較検討し、キャベツ類の系統分化を議論している。このように RFLP の解析は、作物進化の研究においても強力な武器になると考えられる。

また、量的形質 (QTL) を支配する遺伝子座の解析への RFLP の応用もトウモロコシ、トマトなどで試みられている (PATERSON et al. (1988), EDWARDS et al. (1992))。

## 2 RFLP による病害虫抵抗性遺伝子のマッピング

RFLP の利用のひとつとして、育種において重要な遺伝子のより詳細な研究をあげることができる。そのひとつが病害虫抵抗性遺伝子である。

吉村ら (1989) はイネの白葉枯病抵抗性遺伝子 *Xa-1* および *Xa-12* の近傍に連鎖する RFLP マーカーを得ている。また Yu et al. (1990) はイネいもち病抵抗性遺伝子 (*Pi-2 (t)*) のごく近傍に位置する RFLP マーカーを報告した。MICHELMORE et al. (1989) はレタスの RFLP 地図を構築し、うどんこ病抵抗性、ターニップモザイクウイルス抵抗性、耐虫性 (root aphid resistance) の遺伝子を地図上に位置づけた。MESSEGUER et al. (1991) はトマトのネマトーダ (root knot nematode) 抵抗性遺伝子 (*Mi*) の周囲の詳細な RFLP 地図を作成した。

病害虫抵抗性遺伝子の RFLP 分析は現在緒についたばかりではあるが、従来の遺伝子座の分析や連鎖分析の蓄積があるので急速に進展している。緊密に連鎖したマーカーの発見は、単に遺伝的指標としての RFLP の利用ばかりでなく、将来は遺伝子のクローニングへと進むと思われる。そうなれば現在は機作のよく分かっていない抵抗性遺伝子についても、分子遺伝学的な知見が得られることになるだろう。

## おわりに

栽培される作物を中心に、植物の核 DNA の RFLP の研究は急速に進み、今まで述べてきたようにさまざまな応用が試みられている。RFLP 連鎖地図は遺伝子の詳細なマッピングを可能にしたし、RFLP を利用して育種の過程を詳しく検証することも試みられている。今後のゲ

ノム研究にも、染色体 DNA 各部のマーカーとして重要な役割を果たすであろう。アイソザイムなどに比べ非常に多くの遺伝的マーカーを一度に調査できるため、遺伝的多様性の新しい評価法として、種間や種内の精密な分類に利用できることが明らかとなった。これは遺伝的分化、さらには進化の問題を研究するための強力なツール (道具) が手に入ったと言えることができる。また、実用化には十分なデータの蓄積が必要であるが、将来はさまざまな植物で品種・系統の同定あるいは識別に応用されよう。

分子生物学の分野では、例えば PCR 法による DNA の多型検出など、次々と新しい手法が開発されている。ここで述べた RFLP 分析は決して最新の方法ではないが、その応用分野は今まで以上に広がると考えられる。

## 引用文献

- 1) BRUMMER, E. C. et al. (1991): Theor. Appl. Genet. 83: 89~86.
- 2) EDWARDS, M. D. et al. (1992): ibid. 83: 765~774.
- 3) 兼松誠司ら (1991): 植物防疫 44: 549~556.
- 4) KAWASE, M. et al. (1991) Rice Genetics II: 467~473.
- 5) 小林裕和・小林京子 (1990): 植物細胞工学 2: 543~555.
- 6) LANDER, E. S. et al. (1987): Genomics 1: 174~181.
- 7) MCCOUCH, S. R. et al. (1988): Theor. Appl. Genet. 76: 815~829.
- 8) McGRATH, J. M. et al. (1992): ibid. 83: 783~790.
- 9) MESSEGUER, R. et al. (1991): ibid. 82: 529~536.
- 10) MICHELMORE R. W. et al. (1989): Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics, Cold Spring Harbour Laboratory: 45~50.
- 11) MURRY, M. and W. F. THOMPSON (1980): Nucleic Acids Res. 8: 4321~4325.
- 12) NEI, M. (1972): Am. Naturalist 106: 283~292.
- 13) ——— (1987): Molecular Evolutionary Genetics, Columbia Univ. Press, New York, 512pp.
- 14) PATERSON A. H. et al. (1988): Nature 335: 721~726.
- 15) SAITO et al. (1991): Jpn. J. Breed. 41: 665~670.
- 16) SAMBROOK, J. et al. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Vol. 1~3
- 17) SOUTHERN, E. M. (1975): J. Mol. Biol. 98: 503~517.
- 18) 常脇恒一郎 (責任編集) (1982): 植物遺伝学実験法, 共立出版, 464 pp.
- 19) 鶴飼保雄ら (1990): 農林水産研究計算センター第9回電子計算機利用研究発表会論文集: 1~8.
- 20) 渡辺 格 (監修) (1989): 植物バイオテクノロジー実験マニュアル「クローニングとシークエンス」, 農村文化社, 314 pp.
- 21) WANG Z. Y. et al. (1992): Theor. Appl. Genet. 83: 565~581.
- 22) 吉村智美ら (1989): 育種 39 (別2): 300~301.
- 23) Yu, Z. et al. (1990): Rice Genetics II: 451~458.