

日本のビール大麦系統間のRFLP検出頻度

山口 修・矢野昌裕¹⁾・佐々木卓治¹⁾

(農産研究所)

日本のビール大麦育種へのRFLP利用の可能性を明らかにする目的で、日本のビール大麦13品種・系統、及び外国の3品種、計16品種・系統間のRFLP検出頻度を調査した。North American Barley Genome Mapping Project (NABGMP) で作成された51種のプローブを用いて、ECL法によるサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、34プローブで特異的なバンドが検出できた。この34プローブ中のRFLP検出頻度は、外国品種間あるいは外国品種と日本の品種・系統間の組合せが、日本品種・系統間の組合せより高かった。しかしながら、日本品種・系統間でも外国品種間並にRFLPを示す組合せも存在した。日本品種・系統間でRFLPを示すプローブの連鎖地図上の座位は、特定の染色体上に偏らず、全染色体に散在していた。また近縁係数とRFLP検出頻度には有意な負の相関があった。以上の結果から、ビール大麦育種におけるRFLP利用の可能性が示唆された。

[キーワード：近縁係数、ECL法、ビール大麦、RFLP]

The Frequency of RFLP among Japanese Malting Barley Varieties. YAMAGUCHI Osamu, Masahiro YANO¹⁾ and Takuji SASAKI¹⁾ (*Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan, ¹⁾ Rice Genome Research Program, National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba 305, Japan*) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 17:48-52 (1998)

We investigated the frequency of RFLPs among 13 Japanese and 3 North American malting barley varieties to examine the validity of the RFLP technique for Japanese malting barley breeding. Fifty-one probes were tried, and 34 probes detected the Southern hybridization pattern by the ECL (Enhanced Chemiluminescence) method. For these probes, the frequency of RFLPs among North American varieties or that between North American and Japanese varieties was higher than that among Japanese varieties. However, in some cross combination between Japanese varieties, the frequency of RFLPs was the same degree as that among North American varieties or between North American and Japanese varieties. The probes that detected RFLPs among the Japanese varieties were distributed to all barley linkage groups. In addition, a significant negative correlation between the frequency of RFLPs among the Japanese varieties and its coefficient for parentage was observed. These results suggested that the selection based on RFLPs could be used for the breeding of Japanese malting barley.

[Key words: coefficient of parentage, ECL method, malting barley, RFLP]

緒 言

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: 制限酵素断片長多型) は、制限酵素で切断したDNA断片の長さによる品種あるいは個体間の多型のことであり、任意のプローブと相同性の高い領域をもつDNA断片の分子量の違いが、サザン解析パターンの多型として検出される。RFLPのようなDNA多型をマーカーにすることで、従来の形態マーカーやアイソザイムに比べて飛躍的に遺伝マーカー数を増やすことができる。このため、すでにオオムギでは300近くのRFLPマーカーが連鎖地図上にマッピングされている^{2,3)}。またRFLPは、①優性ホモ、ヘテロが区別できる、②DNAを直接分析するので栽培環境や生育段階、他座の遺伝子の影響を受けない、③詳細なRFLP連鎖地図を基に有用遺伝子の精密な連鎖解析¹²⁾やQTL (Quantitative Trait Loci: 量的形質遺伝子座) の解析¹⁾ができる、などの利点がある。こ

1) 農業生物資源研究所/STAFF・イネゲノム研究チーム

のにより、今まで環境、生育時期などに制約されていた育種選抜において、RFLPマーカーを用いることにより、飛躍的な選抜効率の向上が期待される。

しかし、オオムギのRFLP技術におけるサザンハイブリダイゼーションは、RI (Radio Isotope: 放射性同位元素) や、DIG (Digoxigenin) を利用した方法¹¹⁾が主であり、特にRI法は特別な施設を必要とする。また、DIG法はプローブの標識化にPCR (Polymerase Chain Reaction) を用いる点や、繰り返し使用する際に前回供試プローブの洗浄に手間がかかるなど問題がある。よって、多数の材料を扱う育種選抜において、より簡易なサザンハイブリダイゼーションの方法を検討することが必要である。また、RFLP連鎖地図の作成にあたっての交配組合せは、イネでは日本晴×Kasalath⁷⁾、あそみのり×IR24¹⁵⁾、オオムギではSteptoe×Morex, Harrington×TR306など^{3,4,5)}遠縁の組合せが主流であることや、日本型イネ同士の組合せではRFLP検出頻度が低いという報告¹⁴⁾もある。このことから、RFLP連鎖地図にマップさ

れているプローブが、実際のビール大麦の育種場面で行われている近縁種間で、どの程度RFLPを示すかを調査することは、RFLPを日本のビール大麦育種選抜のマーカーに利用する上で重要である。そこで本研究では、①サザンハイブリダイゼーション検出方法に関して、イネで行われているECL (Enhanced Chemiluminescence) 法¹³⁾のビール大麦に対する適用性、②育種現場で行われている交雑を想定して、日本のビール大麦品種・系統間のRFLP検出頻度の測定、③RFLP分析材料として適した組合せの選定のために、RFLP検出頻度と品種間の近縁度 (近縁係数) との関係について明らかにし、日本のビール大麦育種へのRFLP利用の可能性を検討したので報告する。

試験方法

1 サザンハイブリダイゼーション

試験には、第1表に示す日本のビール大麦13品種・系統及び外国のビール大麦3品種、計16品種・系統を用いた。DNAの抽出、精製は、播種後約2週間のオオムギ幼苗を1品種・系統当たり約8g採取し、界面活性剤CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) を用いたMurray and Tompsonの方法¹⁰⁾により行った。サザンハイブリダイゼーションはKurataらの方法⁷⁾に準じ、1品種・系統当たり6 µgの全DNAを8種類の制限酵素 (BamH I, Bgl II, EcoR V, Hind III, Apa I, Dra I, EcoR I, Kpn I) でそれぞれ消化し、アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブレンにアルカリ転写した。サザンハイブリダイゼーションは、RFLP連鎖地図⁶⁾ (第4図) 上の全染色体に分布する、NABGMPから提供された51種のプローブを用いた。

DNAバンドの検出は、ペルオキシダーゼ・ルミノール反応系を利用したAmersham製のECL遺伝子検出キットにて行い (ECL法)、プローブ濃度を20ng/µl ハイブリダイズを1晩、X線フィルムへの露光時間を8時間とした。サザンハイブリダイゼーションバンドパターン

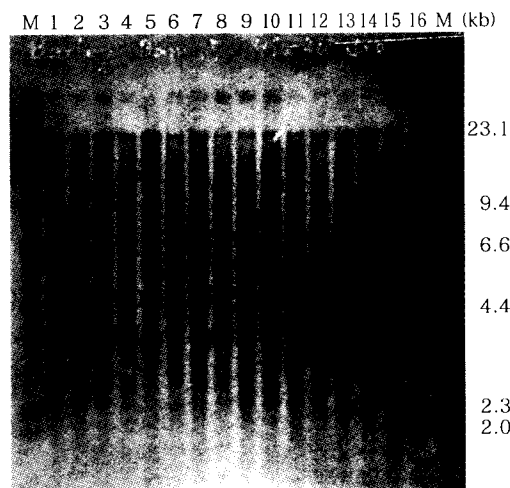
の能力は、ECL法によるX線フィルムへのバンドの感光の有無により検出可能、または検出不可と判定した。

2 RFLPの検出頻度

供試品種・系統間のRFLPの検出は、8種類の制限酵素のうち1つでもサザンハイブリダイゼーションのバンドパターンに違いがある時、その組合せの間には供試プローブによるRFLPが存在すると判定した。すなわち、第1図に示すように、RFLPが検出される組合せは、1~5の品種と6の品種間、6と7の品種間などであり、1~5の品種間や、6、15、16の品種間は同一のパターンであることからRFLPがないと判定した。そして、供試プローブ中RFLPを示したプローブ数を、その組合せ間のRFLP検出頻度とした。

3 近縁係数とRFLP検出頻度

近縁係数 (r_{XY}) は、水田ら⁹⁾の系譜データベースに基づき、共通祖先へさかのぼる世代数をそれぞれ n_1, n_2 とした、 $r_{XY} = \sum (1/2)^{n_1+n_2}$ で求め、各組合せから得られた近縁係数とその組合せ間のRFLP検出頻度との相関係数



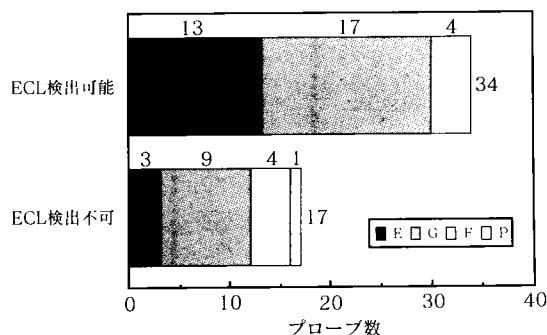
第1図 ビール大麦品種・系統のサザンハイブリダイゼーションパターン

- 1) 供試プローブはCat3, 制限酵素はBamH I
- 2) Mはマーカー (λ Hind III), 数字は第1表の供試品種・系統の番号を示す。

第1表 ビール大麦品種・系統間におけるRFLP検出頻度

品種・系統名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 吉系15	*	9	10	9	9	10	14	16	10	9	17	10	14	28	25	22
2 吉系16		*	15	15	12	16	18	17	13	11	22	13	17	25	22	23
3 きぬ 二条7号			*	8	11	10	13	13	14	10	12	10	16	26	22	21
4 ニシノゴールド				*	10	8	12	13	15	13	16	14	16	28	26	23
5 はるな 二条					*	10	9	15	7	13	17	9	8	26	24	23
6 アサカゴールド						*	8	12	13	15	15	11	13	26	25	21
7 九州 二条10号							*	16	10	19	15	14	9	26	24	22
8 九州 二条11号								*	20	17	19	17	18	23	22	24
9 九州 二条12号									*	11	15	10	6	28	20	22
10 あまぎ 二条										*	13	10	14	24	23	21
11 きぬゆたか											*	15	13	21	22	21
12 成城17号												*	11	24	23	21
13 あかぎ 二条													*	23	22	20
14 Harrington														*	23	21
15 UM570															*	15
16 Morex																*

1) 数値はサザンハイブリダイゼーションパターンが検出できた34個のプローブのうちRFLPが検出できたプローブ数。



第2図 ECL法におけるサザンハイブリダイゼーションパターンの検出能力

- 1) 凡例はNABGMPの指定したRI法による検出感度に基づく供試プローブの分類。
E > G > F > Pの順に感度が高い。

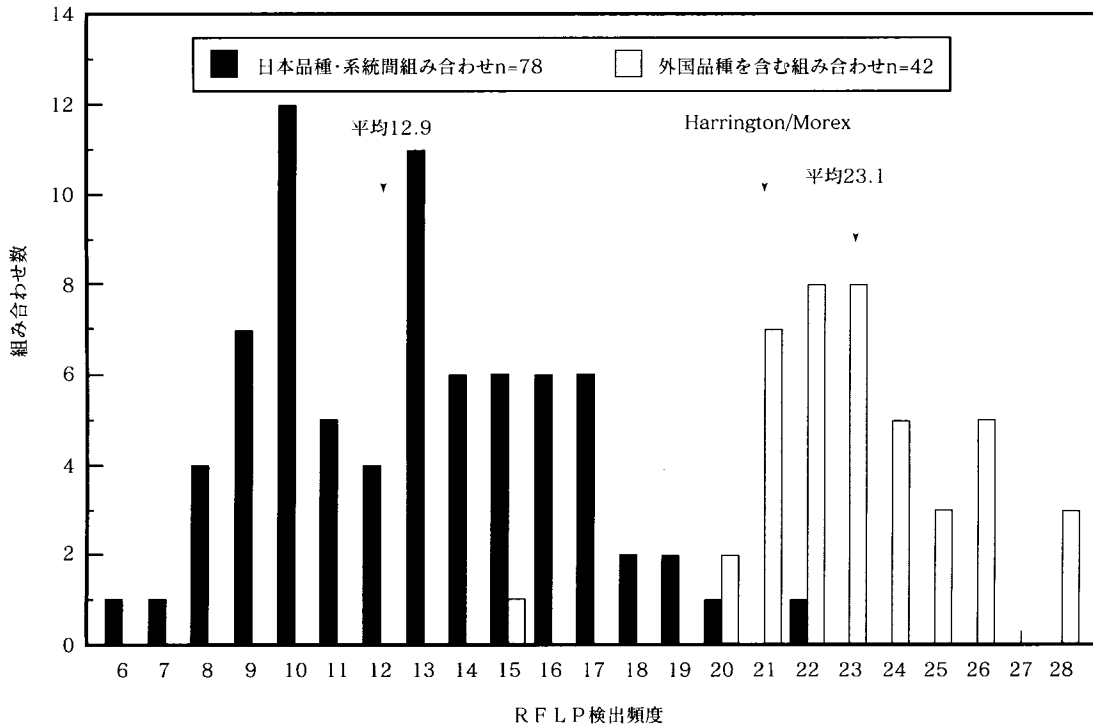
を算出した。

結果及び考察

1 ビール大麦に対する ECL 法の適用性

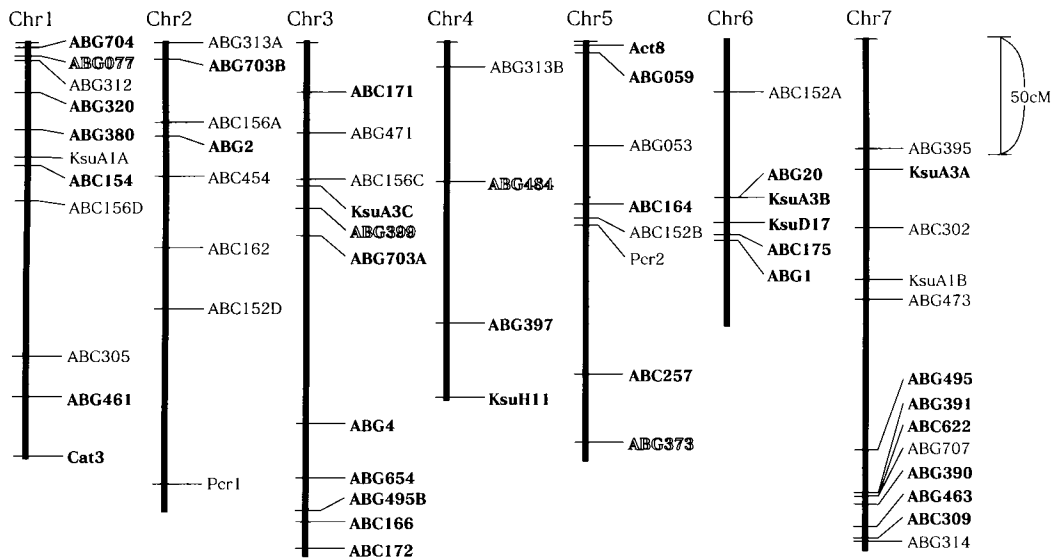
第1図に16品種・系統におけるサザンハイブリダイゼーションの一例を示した。ECL法はオオムギのサザンハ

イブリダイゼーションにおいても、明確なバンドパターンが検出された。また、第2図にはNABGMPがRIでの検出感度の高い順にE, G, F, Pと分類している⁴⁾ 供試プローブの、ECL法における検出能力を示した。全供試プローブ51個のうち、34個がECL法で検出可能であり、最も感度の高いEに分類された16個のプローブ中



第3図 ビール大麦品種・系統間における RFLP 検出頻度¹⁾ごとの組み合わせ数

1) RFLP 検出頻度はサザンハイブリダイゼーションパターンが検出できた34プローブのうち、RFLPを示したプローブを表した。



第4図 RFLPを示したプローブのオオムギ染色体連鎖地図⁴⁾上の座位

- 1) 図中の記号は供試した51種のプローブ名。
- 2) 白ヌキ文字及び肉太の文字はECL法でサザンハイブリダイゼーションパターンを検出できた34個のプローブ。
- 3) 肉太の文字は日本のビール大麦品種・系統間でRFLPを示した30個のプローブ。
- 4) Kleinhofsらの連鎖地図に基づき作成した。

13個が検出できた。また、検出感度の低いF、Pに分類された9個のプロープでは4個の検出にとどまった。ECL法はペルオキシダーゼによる発光反応を利用するので、RIに比べてフィルムに対する感光能力に劣っている。そのためにイネなどのゲノムサイズが小さい植物（イネは4億3千万塩基）には容易に適用できるが、コムギなどイネの10倍を超えるゲノムサイズの植物では十分なシグナルが得られにくいとされていた¹³⁾。しかし、約55億塩基のゲノムサイズをもつオオムギ⁵⁾においても、今回の結果でRIで検出できる51個のプロープのうち34個、67%を検出することができた。現在の連鎖地図上のプロープ数は約300であり^{2,3)}、今回の検出率から考えるとECL法で利用できるプロープ数は育種利用上問題ないと推察された。またECL法は、プロープのラベリングからバンドの検出まで特別な施設や機器を必要とせず、操作性も簡便である。したがってECL法は、ビール大麦育種のRFLP分析において、RI施設のような特別な施設を必要としない簡易な方法として十分利用できることが明らかとなった。

2 日本のビール大麦系統間のRFLP検出頻度

RFLPの各品種・系統間の検出頻度を第1表に、また検出頻度ごとの組合せ数を第3図に示した。ECL法でパターンを検出できた34プロープ中、31プロープがRFLPを示した。31プロープにおけるRFLP検出頻度は、日本のビール大麦品種・系統間が6~22個、平均で12.9個であったのに対し、外国品種間あるいは外国品種と日本品種・系統との組合せでは、15~28個、平均で23.1個と後者の検出頻度が高かった。なお、RFLP連鎖地図作成品種組合せの1つであるHarringtonとMorex間は21個であった。日本品種・系統間では、吉系16ときぬゆたかとの組合せが22個、九州二条11号と九州二条12号との組合せが20個など、外国品種間並に高い検出頻度を示す組合せも見られた。また、日本品種・系統間で1つでもRFLPを示したプロープは30個であり、これらのRFLP連鎖地図上の座位は、特定の染色体に偏ることなく、全染色体に散在していた（第4図）。本研究における日本品種・系統間のRFLP検出頻度は、外国品種間あるいは外国品種と日本品種・系統との組合せより低いが、組合せによっては検出頻度の高いものもあり、プロープの

座乗染色体も偏っていなかった。したがって、あらかじめ組合せを特定することにより、日本の品種・系統間でも多数のプロープが使用でき、効果的なRFLP分析が可能であると考えられた。

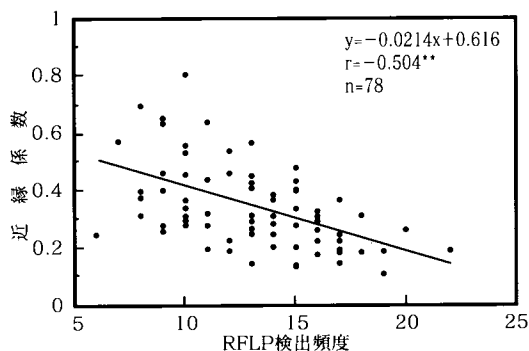
3 近縁係数とRFLP検出頻度

日本のビール大麦品種・系統間の近縁係数と、同じ組合せ間で得られたRFLP検出頻度との関係を第5図に示した。両者間には1%水準で有意な負の相関 ($r = -0.504^{**}$)が見られ、近縁の組合せよりも、遠縁の組合せでRFLP検出頻度が高いことが明らかとなった。したがって、日本のビール大麦をRFLP分析に供試する場合、あらかじめ品種・系統間の近縁係数を計算し、RFLP分析用交配組合せを絞り込むことにより、効率的な分析が行えると考えられた。

総合考察

従来のオオムギの育種におけるRFLPの利用は、その供試系統のほとんどが外国品種間の組合せである。一方本研究の供試材料は、日本のビール大麦において問題となっている大麦縮萎縮病、うどんこ病、湿害、側面裂皮粒および凸腹粒に対してそれぞれ耐性の異なる品種・系統であった。このうち特に、大麦縮萎縮病抵抗性遺伝子と密に連鎖する第3染色体長腕末端部のエステラーゼアイソザイム連鎖群 (*Est1-Est2-Est4*)⁶⁾ と約1.3cMの距離にあるプロープABC172³⁾ や、うどんこ病抵抗性遺伝子 *Mla* と密に連鎖する *Hor2*⁸⁾ と3.4cMの距離にあるプロープABG059⁴⁾ に、抵抗性と罹病性品種・系統間でRFLPが見られた。このことは日本品種を用いた病害抵抗性遺伝子のRFLP連鎖解析や、RFLPによる耐病性選抜の可能性を示唆している。また、耐湿性や被害粒発生程度の異なる品種・系統間におけるRFLP検出頻度は、ビール大麦品種の中で耐湿性のやや強い‘成城17号’と弱い‘ニシノゴールド’間で14プロープ、側面裂皮粒の多発する‘吉系16’と発生が少ない‘九州二条10号’間で18プロープ、凸腹粒の多発する‘きぬゆたか’と発生が少ない‘吉系16’間で22プロープであり、日本のビール大麦栽培で問題となっている湿害や被害粒に関して、RFLPによる連鎖分析やQTL解析も可能なことが示唆された。

以上の結果から、ビール大麦のRFLP解析におけるサザンハイブリダイゼーションのバンドパターンの検出に、ECL法が適用可能なこと、日本のビール大麦品種・系統間で高いRFLP検出頻度を持つ組合せが存在すること、さらに、近縁係数を用いたRFLP分析の交配組合せの絞り込みが有効であることが明らかとなった。今後日本品種・系統間のRFLP分析を行うにあたっては、連鎖地図作成品種^{3,4,5)}が示すバンドサイズとの比較や、他のプロープとの連鎖分析を行い、RFLP遺伝子座の連鎖地図上の位置を確認しておくことが重要である。



第5図 日本のビール大麦品種・系統間のRFLP検出頻度と近縁係数との相関関係

1) **は1%水準で有意。

謝 辞

本研究は、平成7年度農林水産省依頼研究員としてイネゲノム研究チームにおいて実施したものである。研究の遂行にあたり、協力していただいた農業生物資源研究所並びにSTAFF（農林水産先端技術研究所）の関係各位に深く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) BACKES, G., A. GRANER, B. FOROUGHI-WEHR, G. FISCHBECK, G. WENZEL and A. JAHOR (1995) Localization of quantitative trait loci (QTL) for agronomic important characters by the use of a RFLP map in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* **90**:294 - 302
- 2) GRANER, A., A. JAHOR, J. SCHONDELMAIER, H. SIEDLER, K. PILLEN, G. FISCHBECK, G. WENZEL and R. G. HERMANN (1991) Construction of an RFLP map of barley. *Theor. Appl. Genet.* **83**:250 - 256
- 3) KASHA, K. K., A. KLEINHOF and the North American Barley Genome Mapping Project (1993) Mapping of the Barley Cross Harrington × TR306. *Barley Genet. Newsl.* **23**:65 - 69
- 4) KLEINHOF, A., A. KILLIAN and D. KUDRNA (1992) The NABGMP mapping progress report, Spring 1993. *Barley Genet. Newsl.* **22**:27 - 41
- 5) KLEINHOF, A., A. KILLIAN, M. A. SAGHAI MAROOF, R. M. BIYASHEV, P. HAYES, F. Q. CHEN, N. LAPITAN, A. FENWICK, T. K. BLAKE, V. KANAZIN, E. ANANIEV, L. DAHLEEN, D. KUDRNA, J. BOLLINGER, S. J. KNAPP, B. LIU, M. SORRELLS, M. HEUN, J. D. FRANCKOWIAK, D. HOFFMAN, R. SKADSEN and B. J. STEFFENSON (1993) A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* **86**:705 - 712
- 6) KONISHI, T. and R. KAISER (1991) Genetic difference in barley yellow mosaic virus resistance between Mokusekko 3 and Misato Golden. *Japan. J. Breed.* **41**:499 - 505
- 7) KURATA, N., Y. NAGAMURA, K. YAMAMOTO, Y. HARUSHIMA, N. SUE, J. WU, B. A. ANTONIO, A. SHOMURA, T. SHIMIZU, S. Y. LIN, T. INOUE, A. FUKUDA, T. SHIMANO, Y. KUBOKI, T. TOYAMA, Y. MIYAMOTO, T. KIRIHARA, K. HAYASAKA, A. MIYAO, L. MONNA, Y. UMEHARA, M. YANO, T. SASAKI and Y. MINOBE (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* **8**:365 - 372
- 8) MAHADEVAPPA, M., R. A. DESCENZO and R. P. WISE (1994) Recombination of alleles conferring specific resistance to powdery mildew at the *Mla* locus in barley. *Genome* **37**:460 - 468
- 9) 水田一枝・佐々木昭博・吉田智彦(1996)近縁係数のためのPrologによるコンピュータプログラムとそのビール大麦品種の近縁関係への解析への応用. *農業情報研究* **5**:19 - 28
- 10) MURRY, M. G. and W. F. THOMPSON (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* **8**:4321 - 4325
- 11) 野村慎太郎・稲澤謙治(1994) 脱アイソトープ実験プロトコール①DIGハイブリダイゼーション. 東京:秀潤社, pp.1 - 138
- 12) SCHWEIZER, G. F., M. BAUMER, G. DANIEL, H. RUGEL and M. S. RÖDER (1995) RFLP markers linked to scald (*Rhynchosporium secalis*) resistance gene *Rh2* in barley. *Theor. Appl. Genet.* **90**:920 - 924
- 13) 島本功・佐々木卓治(1995) 植物のPCR実験プロトコール. 東京:秀潤社, pp.1 - 171
- 14) 島野公利・江花薫子・矢野昌裕・佐々木卓治(1995) 日本型水稻品種間のRFLP検出頻度. *育種* **45** (別1): 225
- 15) 常松浩史・吉村淳・春島嘉章・長村吉晃・倉田のり・矢野昌裕・佐々木卓治・岩田伸夫(1996) RI系統群を用いたイネのRFLP基本骨格地図. *育種* **46**: 279 - 284