

福岡県農業総合試験場特別報告

第22号

ビール大麦の品種育成におけるDNA マーカーの開発と利用に関する研究

平成18年3月

福岡県農業総合試験場

(筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

NO. 22

**Studies on the Development and Application of DNA
Markers for Breeding of Malting Barley**

by
Yosuke Uchimura

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

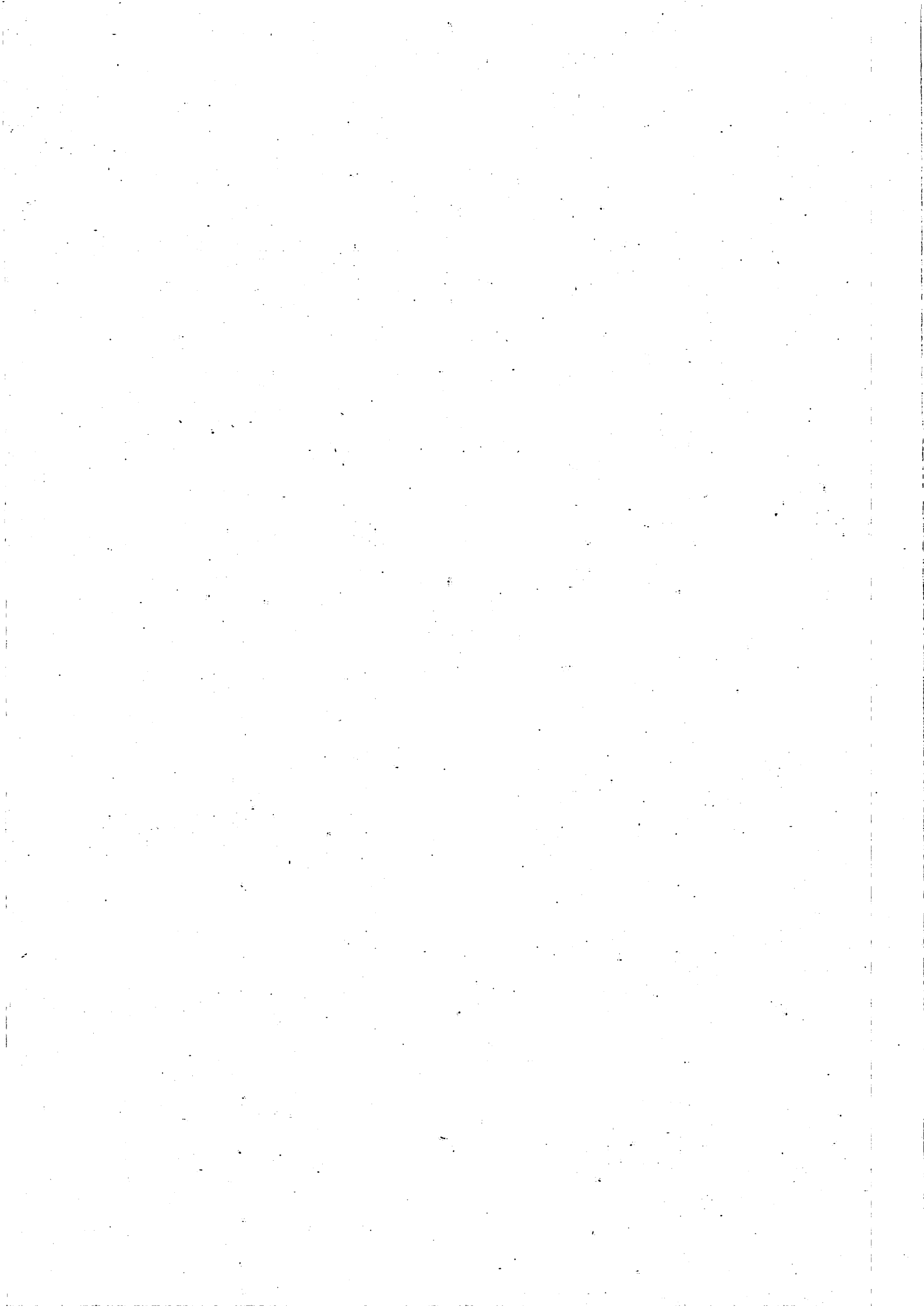
March 2006

ビール大麦の品種育成における DNA マーカーの開発と利用に関する研究

内 村 要 介

2 0 0 6

* 東京農工大学大学院審査学位論文



序

ビール大麦は、福岡県において水稻と農作業の競合が少ないことから、土地利用型の基幹作物に位置づけ生産振興を図っています。現在、ビール大麦の新品種育成においては、生産性、醸造品質の改善が最大の育種目標です。このため、生産者ならびに実需者のニーズにいち早く対応できる品種育成技術が必要不可欠であり、その育成期間を短縮できる効率的な選抜を行う技術の確立が急務となっています。

近年急速に発展した生物の DNA の違いを検出する DNA マーカーは、有用形質に関する遺伝子を備えた品種を高精度に識別することが可能であるとともに、育種選抜技術を飛躍的に進展させる新しい技術として、実用的な利用方法が提案されています。

本研究は、以上の背景をもとにビール大麦の育種事業、ならびに品種の純度維持に対して、DNA マーカーを利用する技術がどのような効果をもたらせるかという観点から、基礎的かつ実用的な技術開発を行ったものです。その結果、国内大麦品種を識別する技術、交配組合せを選定する情報となる遺伝資源の近縁程度、ビール大麦の重要病害であるオオムギ縞萎縮病に対する新たな抵抗性遺伝子の染色体上の位置と抵抗性を選抜できる DNA マーカーの開発といった成果を得たので、ここに特別報告として公表します。これらの DNA マーカーを利用した技術開発の成果が今後ビール大麦品種の育種技術に積極的に利用されて、高品質ビール大麦の生産振興に寄与することを期待するものです。

なお、本報告は、1998 年から 2005 年にかけて、「RAPD 分析による水稻・麦の品種識別」、県の新世紀スーパー農産物開発プロジェクト「DNA マーカー利用による水稻等の新品種の育成」および農林水産省プロジェクト研究「DNA マーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」の中で実施した試験成果を取りまとめたものです。

本研究の遂行及びとりまとめにあたっては、大学院設置基準第 4 条に基づく教育法の特例を受けました。ご指導とご助言をいただいた東京農工大大学院連合農学研究科宇都宮大学教授吉田智彦博士に厚くお礼を申し上げます。また、協力いただいた関係各位に深く感謝の意を表します。

平成 18 年 3 月

福岡県農業総合試験場

場 長 野村 泰夫

目 次

第1章 序論	1
第2章 二条大麦の DNA マーカーによる品種識別	6
1. CAPS, SSR, RAPD 分析からみた国内二条大麦の DNA 多型検出率	7
2. CAPS マーカー, SSR マーカー, RAPD マーカーによる品種識別	11
第3章 二条大麦品種間の近縁係数や遺伝的距離	18
1. 二条大麦主要品種間の近縁係数	18
2. 二条大麦主要品種間の遺伝的距離	21
3. 近縁係数と遺伝的距離との関係	26
第4章 有用遺伝子の遺伝解析のための半数体倍加系統の作出	29
1. 半数体倍加系統群の作製	29
2. 半数体倍加系統群の遺伝子型と分離比	33
第5章 育種選抜に利用できる DNA マーカーの開発	39
1. バルク分析	39
2. 連鎖地図の作製	42
3. DNA マーカーによる選抜の有効性	44
第6章 その他の有用農業形質に関する QTL の検出	46
第7章 総合考察	53
第8章 総合摘要	57
引用文献	60
Summary	67
謝辞	69

第1章 序 論

農作物の品種とは、育成者の多大な努力によって、形態、生理作用および栄養成分など農業上重要な形質が改良された、他の集団と区別できる集団である（吉田 1999）。品種は農業上重要な役割を担っており、世界的にみると短稈、多収および広域適応性の水稻品種 IR8 や、CIMMYT による半矮性小麦品種などの育成と普及は、発展途上地域の食糧事情の改善に大きく貢献し、緑の革命（ビッケル 1995）をもたらした。日本において品種は、水稻品種のコシヒカリ、苺品種のとよのかなど、品種改良により優れた食味を有することから、品種自体が市場でブランドとして評価され消費者の購入の際の指標となり、消費拡大に大きく貢献している。

大麦は、ビール、味噌、焼酎、麦茶、押し麦など様々な食品の原料として用いられている。品種はそれぞれの用途に合うように改良が行われているため、品種銘柄は原料の品質を判断する重要な指標である。ビール大麦は、福岡県において約 5000ha 栽培され、これは日本の都道府県で3番目の栽培面積である。水稻との二毛作による土地の高度利用型作物として、福岡県の基幹作物として重要な位置を占める。二毛作を成立させるためには早生品種が必須である。ビール大麦には、このほかの品種特性として高度の醸造適性が求められ、品種の純度を高く保つことが重要である。

近年、農産物の一連の偽装表示事件を受け、農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律である改正 JAS 法や、農作物の品種の育成者権の保護を目的とした種苗法の一部改正法が制定された（野澤 2004）。このような農産物を取り巻く現状からみて、品種の育成者の権利保護、農作物の品種の適正な取引による品質の高位安定化および消費者の食品の情報公開への関心の高まりに応える技術として、品種を識別する技術の確立が強く求められている（赤木 2000, 松本 2003, 齋藤 2004）。

水稻や麦類などの主要な作物においては、優良種子の生産や普及を促進するための主要農作物種子法により、都道府県の農業試験場が原々種や原種種子の生産を行っている。原々種や原種圃では、品種の純度維持のため、栽培によって品種特有の出穂期、成熟期および草型など形態的特徴を植物体ごとに検査して、異品種や変異体の除去を行う。しかし、生産年や栽培環境により個体間差が認められる農作物について、品種を簡易かつ迅速に判別できる決定的な判断材料はいまのところあまりない（木村 2004, 山本 2004, 松本 2004, 大坪 2004）。

近年、わずかな量の DNA からプライマーで挟まれた特定領域の DNA 断片を短時間に大量に増幅する PCR（Polymerase Chain Reaction）法（Mullis ら 1986）が開発され、品種間の微細な DNA 構造の違いを DNA マーカーとして容易に検出することが可能となった。DNA 構造の違いを検出して品種を識別する技術が優れる点は、極少量の試料、栽培環境の異なる試料、加工品に対して精度の高い識別が可能なことである。水稻では、これまで困難であった精米 1 粒ずつの分析からブレンド商品の品種の特定（赤木 2000）、異なる産地や生産年次の試料における品種の識別（大坪ら 1999a）、長期間貯蔵している種子（Matsue ら 2002）や加工食品である炊飯米（大坪ら 1999b）の品種識別などが可能になっている。実際に流通段階の検査において、米では秋田県総合食品研究所で開発した DNA 鑑定法（小笠原・高橋 2000）の実用化により、JA 秋田が品種鑑定シールを貼って出荷している（赤木 2000）。その他の作物品種においても、違法な輸入、生産、集荷および販売を防止する

ため、米（大坪ら 1999a,b, 赤木 2000, 小笠原・高橋 2000）、い草（伴 2004, 齋藤 2004）、茶（松元ら 2003）、苺（Kunihisa ら 2003）、桃（山本 2004）、梨（木村 2004）、椎茸（松本 2004）、隠元豆（紙谷ら 2004）、枝豆用大豆（小曾納・伴 2003）をはじめとする多種多様な作物で DNA マーカーを利用した品種識別技術の開発が行われている。

DNA マーカーを利用した品種識別技術の開発において、水稻では遺伝的背景が近縁な日本型品種間の DNA 多型検出頻度は著しく低く（久保ら 2000, 河野ら 2000）、選定には多大な時間、労力が必要であり（久保ら 2000）、大きな初期投資が求められる（赤木 2000）。河野ら（2000）は遺伝背景が近縁な日本型水稻品種間において効率的に DNA マーカーを検出する方法を AFLP, RFLP, SSR および RAPD 分析から比較検討し、多型検出率が比較的高い RFLP マーカーと SSR マーカーを組合せた利用が有効であると報告している。

しかし、二条大麦では、効率的に DNA 多型を検出する方法や検出頻度について、遺伝的背景が近縁な国内品種間で比較検討した報告はないようである。

そこで、本論文ではまず近年国内で栽培されている二条大麦品種間で DNA マーカーを効率的に検出できる方法について比較検討を行い、品種識別に利用できる DNA マーカーを明らかにしようとした。

一方、新品種の育種は、生産性向上、品質改善や新商品開発による消費拡大を図るために重要な事業である。しかしその育成は、育種家の経験と熟練度によるところが大きく、多大な時間と労力を要する。育種計画の策定では、地域に普及している品種間、そして交配親となる品種間の遺伝的背景の多様性を維持し、その地域の遺伝的脆弱性（Weber and May 1989）を回避して安定多収を戦略的に保つことが重要である。品種間の遺伝的背景の関係を把握するには、家系図の祖先品種の共通程度からみた近縁係数を統計的に算出する方法（酒井 1957）と、DNA マーカーにより品種間の DNA 多型を検出し、遺伝的相似度を調査する方法（根井 2002）がある。次に本論文では、それぞれの方法により品種間の遺伝的背景の関係を把握し、さらに家系図で祖先品種の共通程度からみた近縁係数が、DNA マーカーの検出率から算出した根井の遺伝的距離で説明できるか、できるとすればどの程度であるか推定しようとした。

新品種育成において遺伝資源から最適な交配組合せを決定すると、交配を多数行い雑種後代を多数育成する。この中から、食味や外観など消費者の嗜好性、形や保存期間など流通適性、早生、多収、耐倒伏性や耐病性など、農業上必要となる様々な有用形質や有用成分をできる限り多く集積した有望系統を、効率的かつ精度高く迅速に選抜しなければならない。選抜には、対象となる有用形質を評価するための試料、施設および専用の分析機器を要し、多大な時間と労力がかかる。育種事業で新品種を育成するためには、効率的かつ精度の高い選抜方法の開発が重要である。

近年、DNA マーカーを利用したオオムギの連鎖地図を作製し、育種目標となる重要な農業形質である種子感水性（岩佐ら 1999）、醸造適性（岡田ら 2002）、凸腹粒や側面裂皮粒（Kai ら 2003）および木石港 3 由来のオオムギ萎縮病抵抗性遺伝子（Miyazaki ら 2001）などに関与する有用遺伝子の位置の特定と、その有用遺伝子に連鎖する DNA マーカーを開発する研究が急速に進展している。開発した DNA マーカーを利用する育種選抜技術は、新品種育成における有用形質の効率的選抜を可能にする手段として期待されている（井辺・吉村 1999）。DNA マーカーによる育種選抜技術が優れる点は、分析に必要な試料が極少量の DNA であり、生育中の植物体や種子から採取できることである。早い育

成世代の幼植物において、従来多量の収穫物を要する醸造適性などの有用形質の選抜を、少量の DNA を採取して DNA マーカーにより効率的かつ高精度に判別し、確実に形質の改良を進めることができる。また、評価に多大な時間と労力、専用の分析機器を要するさまざまな形質の選抜を、遺伝子型の調査という 1 つの実験系で効率的に行えることが考えられる。水稻において重要病害であるイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* (早野ら 2000) および穂もち抵抗性遺伝子 *Pb1* (遠山ら 1998, Fujii ら 2000) に連鎖する DNA マーカーが開発されている。これらの DNA マーカーは、労力やコストの面からみた、育種選抜への利用価値が検証されている。その結果、イネ縞葉枯病抵抗性の選抜では、坂ら (2000) が開発した幼苗による大量検定システムが稼働しているものの、ヒメトビウンカの飼育とそのため施設にかかるコストや労力、ウイルス保毒虫率に応じた検定日数の調整などによる検定者の熟練度による検定精度の差などからみて、DNA マーカー選抜導入のメリットが大きいとしている。葉もち病抵抗性の選抜では、連続戻し交雑法によるコシヒカリ準同質遺伝子系統作出において、病気の発生程度に気象の影響が大きく 1 年に 1 回しか検定できないため連続戻し交雑が検定と同一年内にできなかった問題が、DNA マーカー選抜では出穂前に判定できるため、穂もち抵抗性選抜を実施しても、連続戻し交雑を温室内で最速 1 年に 3 回のペースで進めることが可能になり、有効な手法であることを明らかにしている (杉浦ら 2004)。その他にも、従来日本において生産が極めて難しいといわれたパン用の硬質小麦において、パン用として優れる 5+10 サブユニットを有する品種の選抜に利用できる DNA マーカーが開発され (石川ら 2004)、幼植物のうちに硬質小麦の選抜が可能になっている。

このような育種選抜に利用できる DNA マーカーの開発には、塩基配列の解読や DNA マーカーの作成技術、DNA 多型の検出技術、連鎖地図の作製および量的遺伝子の座乗位置を解析する QTL 解析 (鵜飼 1999) の技術が必要である。しかし近年、塩基配列や DNA マーカーの情報は、オオムギにおいて多くの情報が公開されてきた (Blake ら 1996, Mano ら 1999, Ramsay ら 2000)。また、イネをはじめとするコムギやダイズ、野菜や果樹などにおける DNA マーカーの開発も、独立行政法人農業技術研究機構作物研究所による「DNA マーカーによる効率的な新品種育成システムの開発」プロジェクトにより急速に進展している。連鎖解析や QTL 解析は、コンピュータソフト MAPMAKER version 3.0 (Lander ら 1987) や MAPL98 (鵜飼ら 1995) など多くのプログラムが開発され、必要なデータを入力することで迅速に結果が得られるようになった。QTL の検出は、遺伝解析の手始めとして対象とする遺伝子の座乗領域を明らかにする目的であれば、50cM の間隔で DNA マーカーがあれば可能であり、DNA マーカーの数はさほど重要ではない (Darvasi and Soller 1994)。遺伝解析研究で重要なのは、研究対象となる形質を高い精度で評価する方法の確立と、安定した評価が得られる質の高い材料の確保である (矢野・春島 1994)。形質の評価は、環境の影響による変異を小さくするために様々な条件下で評価を繰り返し行うか、評価に最適な環境条件を設定して高い精度で検定できる方法を開発する必要がある。一方、遺伝解析に適する材料は、遺伝解析をする形質が個体間 (または系統間) で明らかに遺伝子由来の変異をすること、形質発現が安定していて再現性のある結果が得られること、遺伝的に固定化されていて繰り返し栽培してもその後代で形質の分離が無いこと、同一遺伝子構成の材料として増殖が容易で分析用として多量に確保できることが望ましい。イネにおいては、QTL の高精度マッピングや遺伝子間および環境との相互作用の検出に有効に活用できる染色体の一部が置換されて固定された染色体部分置換系統シリーズが作出されている (吉

村・土井 2001, Kubo ら 2002).

そこで本論文では、育種選抜に有効利用できる DNA マーカーを開発する目的で、遺伝解析材料として、野生大麦 *Hordeum bulbosum* L. を利用する Furusho ら (1990b) の方法に準じて短期間で完全な純系と期待される半数体倍加系統群を作出しようとした。この半数体倍加系統は、オオムギ品種と野生オオムギを交雑すると受精後早い段階で野生オオムギの染色体のみが消失する現象を利用し、残っているオオムギ品種由来の染色体をコルヒチン処理により倍化することで、染色体がすべてホモ接合体の固定系統を短期間で得ることができる利点があり、遺伝解析に半数体倍加系統を用いた報告がいくつかある (岩佐ら 1999, Kai ら 2003)。しかし、遺伝解析における材料の重要性からみて、半数体倍加系統の適性を検討した報告はないようである。そこで本論文では、半数体倍加系統の作出から形態マーカーや DNA マーカーによる遺伝子型のメンデル分離比までの具体的なデータを示して、遺伝解析材料としての適性を明らかにしようとした。

本論文で開発しようとする DNA マーカーは、オオムギ縞萎縮病の I 型, II 型, III 型すべてのレースに対して抵抗性を示す新たな徳島モチ裸由来の劣性遺伝子 (以下仮に *rym7t* として表記 (福岡ら 1991, 古庄・福岡 1997)) を有する個体を判別できるものである。

オオムギ縞萎縮病は、大麦の病害の中で最も被害が大きいウイルス病で、感染すると株全体が黄化、萎縮して発病が激しいと枯死に至り、醸造品質が低下する (氏原ら 1984, 草場ら 1965)。オオムギ縞萎縮病は根に寄生する *Polymyxa graminis* によって媒介される土壌伝染性 (遠山・草場 1970) であるため、圃場が一度汚染されると薬剤や耕種的な方法では有効な防除は難しく、被害を防ぐためには、抵抗性品種を育成する以外に効果的な防除法がない。抵抗性品種の育成は、抵抗性遺伝子を有する品種を交配してその後代系統をウイルス汚染圃場で検定するしか方法が無く、抵抗性の検定においては、均一に汚染された圃場の確保や供試材料数が限られるなど制限要因がある (八田ら 2004, Kashiwazaki ら 1989, 柏崎 2000)。

そこで、オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* の染色体上の座位を明らかにし、抵抗性個体を選抜できる DNA マーカーを開発することは、オオムギ縞萎縮病抵抗性を有する品種の選抜および育成を行うために利用価値が高いと判断した。オオムギ縞萎縮病は、半数体倍加系統以前の半数体の世代において個体の早期選抜が可能であり (古庄ら 1990a), 均一に汚染された環境を維持して耐病性の検定を行うよりも、DNA マーカーを利用することで、より精度が高い効率的な選抜ができるようになると考えられる。

そこで本論文では、*rym7t* 遺伝子について、連鎖解析を行い連鎖地図を作成して染色体上の座乗位置を推定しようとした。さらに *rym7t* 遺伝子を有する系統を高精度に選抜できる *rym7t* 遺伝子近傍の DNA マーカーの開発を図った。

一方で、今後地域に普及するビール大麦の新品種に対して求められる特性は、早生、多収、オオムギ縞萎縮病やうどんこ病に対する抵抗性、赤かび病のデオキシニバレノール (DON) が無いこと、外観品質が良好で被害粒の発生が無いこと、整粒歩合が高いこと、醸造品質が優れることなど、極めて多岐にわたる。これらの重要形質は、計数値または、長さ、重さ、時間などの計量値で表される量的形質であるものが多く、それぞれ特性検定や分析を行うためには、多大な施設、費用、労力および時間が必要である。これらの量的形質に関与する遺伝子の数や位置を明らかにし、それらの有無を判別できる DNA マーカーが開発できれば、有用形質に関与する遺伝子を集積した品種が効率的に選抜でき、育種効率を向上させることができる。量的形質に関与する個々の遺伝子座の位置や遺伝効果の

解析は、一般には複数の遺伝子座が関与し、遺伝子型と表現型の対応が明確ではないため困難であったが、QTL 解析（鵜飼 2000）により可能になった。QTL 解析により得られる遺伝子座の位置や遺伝効果の情報は、効率的な育種選抜を行う DNA マーカーの効果的な開発に有効である。開発した DNA マーカーは、有用形質に関与する遺伝子が集積した個体の選抜に利用し、育種効率を向上できる。

そこで本論文では最後に、二条大麦品種において重要な有用農業形質であるうどんこ病抵抗性、斑葉病抵抗性、凸腹粒および麦芽品質（水感受性、粗タンパク含有率、麦芽可溶性窒素、麦芽エキス％、 β -グルカン、ジアスターゼ力）などについて、きぬゆたかと吉系 15 由来の半数体倍加系統群を用いて QTL 解析を行い、これらの形質の染色体上の座乗位置を推定するとともに、QTL の最も近傍に位置し、育種選抜に利用できる DNA マーカーを明らかにしようとした。

第2章 二条大麦の DNA マーカーによる品種識別

農作物の品種とは、育成者の多大な努力によって、形態、生理作用および栄養成分など農業上重要な形質が改良された、他の集団と区別できる集団である（吉田 1999）。そのため、意図されていない異品種の混入は、生産段階では栽培特性の違いから生産性が不安定となり、流通や加工段階では加工特性や栄養成分の品種間差などから品質が不安定になるため、生産者のみならず実需者や消費者にとって好ましくない。

一方で、品種は育成されて一度世に出回ると増殖が比較的容易である。品種の育成者の権利保護、農作物の品種の適正な取引による品質の高位安定化のため、また、消費者の食品の情報公開への関心の高まりからみて、品種を識別する技術の確立が様々な作物で強く求められている（大坪ら 1999a, 赤木 2000, 小笠原・高橋 2000, 伴ら 2002, 小曾納・伴 2003, 松元ら 2003, 紙谷ら 2004）。

二条大麦においては、用途がビールや焼酎などの醸造用と味噌などの食糧用があり、品種はそれぞれの用途に適しするように改良されている。これらの国内で育成された品種についての精度の高い識別技術の確立は、育成者の権利保護、品種の純度維持、品種特有の品質の高位安定化を図るため、また、用途に合う品種や需要の高い品種を実需者や消費者に対して確実に供給するために急務となっている（伴ら 2002, 丸山 2003）。

近年、PCR 法の開発（Mullis ら 1986）により、品種間の微細な DNA 構造の違いであっても DNA 多型として容易に検出することが可能となり、少量の試料で精度の高い品種識別できるようになった（赤木 2000）。

DNA マーカーを利用した品種識別技術の開発において、まず、DNA マーカーの開発または選定では、水稻では遺伝的背景が近縁な日本型品種間の DNA 多型検出頻度は著しく低く（久保ら 2000, 河野ら 2000）、選定には多大な時間、労力が必要である（久保ら 2000）。

河野ら（2000）は遺伝背景が近縁な日本型水稻品種間において効率的に DNA 多型を検出する方法を AFLP, RFLP, SSR および RAPD 分析から比較検討している。その結果、日本型水稻品種間の多型検出頻度は SSR や RFLP 分析が高いことを明らかにし、品種識別には、検出操作の容易さから SSR や RAPD 分析が有用であり、特に多数の DNA 増幅断片を一度に検出できる点からみると AFLP 分析が適していると報告している。一方、PCR による品種識別の最も重要なポイントとして、再現性（赤木 2000）が求められる。

二条大麦では、効率的に DNA 多型を検出する方法や検出頻度について、遺伝的背景が近縁な国内品種間で比較検討した報告はないようである。一方、再現性についてみると、筆者は RAPD 分析により国内二条大麦 8 品種を識別可能な RAPD マーカー 5 種類を得たが、PCR 反応を行う機種の違いによってはこれらの RAPD マーカーの再現性が失われることがあった（内村ら 2000）。

そこで、本章では近年国内で栽培されている二条大麦品種 22 品種と外国二条大麦 2 品種の計 24 品種を供試して、視認性、再現性が良好で効率的に品種識別できる DNA 多型を検出できる方法について、操作が容易な SSR, RAPD および CAPS 分析から比較検討を行った。また、供試した 24 品種すべてを識別できる、視認性と再現性が優れ、最も効率的かつ最小の DNA マーカーの組合せを明らかにしようとした。

1. CAPS, SSR, RAPD 解析からみた国内二条大麦の DNA 多型検出率

品種間の DNA 多型を検出する技術は、品種鑑定への利用、育種における有用農業形質の発現の多様性の解明や選抜に利用できる DNA マーカーの開発など、様々な分野で利用ができる。これからの研究を効率的に行う上で、DNA 多型を高頻度に検出し、操作が簡易で短時間に結果を得る分析方法を検討することは重要と考えられる。

近年、DNA 多型を検出する方法として、RAPD 分析 (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams ら 1990), RFLP 分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSR 分析 (Simple Sequence Repeat) (Weber and May 1989), CAPS 分析 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

(Konieczny and Ausubel 1993), AFLP 分析 (Amplified fragment length polymorphism) (Vos ら 1995) などさまざまな方法が開発されている。このなかで、プライマーで挟まれた特定領域の DNA 断片を短時間に大量に増幅する PCR (Polymerase Chain Reaction) 法 (Mullis ら 1986) を利用する RAPD, SSR, CAPS および AFLP 分析は、RFLP 分析に比べて極少量の DNA 量から結果を得ることができる利用しやすい分析方法である。さらに操作性からみて、比較的簡易かつ短時間で結果が得られる RAPD, SSR および CAPS 分析が優れると考えられた。一方、PCR 増幅産物の分画を行い DNA 多型を検出するには、一般的にシークエンサー、アクリルアミドゲルまたはアガロースゲルなどがある。アガロースゲルは、アクリルアミドゲルに比べて、PCR 増幅産物の分画能力が劣るものの、作製が最も簡易で比較的短時間で結果を得ることができるなど利用しやすい。

そこで、本節では国内二条大麦間において DNA 多型を効率的に検出する分析方法を検討するため、RAPD, SSR および CAPS 分析により得た PCR 増幅産物について、アガロースゲルによる DNA 多型の検出を行って、DNA 多型の検出率を比較した。

材料と方法

(1) 供試品種

供試品種は、近年、国内で栽培されている二条大麦 (日本麦類研究会 2002) 22 品種、あまぎ二条、アサカゴールド、ミハルゴールド、ほうしゅん、九州二条 16 号、ニシノゴールド、ダイセンゴールド、きぬゆたか、ミサトゴールデン、スカイゴールデン、なす二条、おうみゆたか、とね二条、みょうぎ二条、はるな二条、きぬか二条、ミカモゴールデン、さきたま二条、タカホゴールデン、ニューゴールデン、ニシノチカラおよびニシノホシと、DNA の多型検出率の比較のために加えた外国二条大麦 2 品種、Harrington, Pallas の合計 24 品種である。これらはすべて福岡県農業総合試験場で維持、保存していたものである。外国 2 品種は、国内品種との系譜的關係が少なくとも記録上はない。

(2) DNA の抽出

DNA の抽出は幼植物の生葉から CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) を一部改変して以下のように行った。大麦の生葉を 50mL プラスチックチューブに約 5g 入れ、液体窒素を十分量加えて葉さじで細かく砕いた。液体窒素を蒸発させ沸騰寸前の 1.5%CTAB 溶液を 20mL 加えて軽く攪拌後、56℃のウォーターバス中で 20 分間振とうした。クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 20mL 加え、さらに室温で 20 分間振とうした。その後、室温で 2800rpm, 20 分間遠心した。上層 (水槽) を新しい 50mL 遠心管に滅菌済みの使い捨てのスプイトで移し、70℃に加熱しておいた 10% CTAB を 2mL 加えて混合後、さらにクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 20mL 加えて室温で 20 分間振とうした。

その後、室温で 2800rpm, 20 分間遠心した。再び上層（水槽）を新しい 50mL 遠心管に滅菌済みの使い捨てのスポイトで移した。その遠心管に CTAB 沈殿溶液を 1.5 倍量（約 30mL）加え緩やかに攪拌し、一昼夜静置して DNA を析出させた。

DNA の精製は以下の通りとした。遠心管を室温で 3000rpm, 20 分間遠心し、液体を捨て底面にペレット状に張り付いた DNA のみを残した。直前に混合した $1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ の NaCl と $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ の RNase の混合液を 5mL 加え、56℃ウォーターバス内で数時間かけて DNA を完全に溶解させた。その液へ-20℃に冷やしておいた 99.5 %エタノール 10mL を加えて穏やかにかき混ぜて DNA を析出させた。析出した DNA をパスツールピペットに巻き付けて新しい 15mL の遠心管に移した。

DNA の洗浄は以下の通りとした。70 %エタノール約 5mL を加え 7 分間静置して洗浄して、さらに 99.5 %エタノール約 5mL で 5 分間静置して洗浄後、エタノールを捨てた。エタノールを蒸発させた DNA は、400 μL の 10 % TE 溶液を加えて完全に溶かし、DNA 溶液として-20℃で保存した。分析には必要量を 10 % TE 溶液で $20\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ に濃度調整して用いた。

（3）CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 分析

プライマーは Blake ら (1996) と Mano ら (1999) が作製したなかから、Kai ら (2003) が国内二条大麦品種間で DNA 多型の検出を行った結果、比較的明瞭な PCR 増幅産物を得ていたプライマーから優先的に使用した。

PCR 反応液は、濃度を $20\text{ng }\mu\text{L}^{-1}$ に調整した鋳型 DNA を $1\text{ }\mu\text{L}$ 、濃度が 10pM の Forward 側プライマーおよび Reverse 側プライマーをそれぞれ $1\text{ }\mu\text{L}$ 、(株)タカラバイオ社製の TaKaRa Ex Taq を $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 、付属されている 10 × Ex Taq Buffer を $10\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP Mixture を $10\text{ }\mu\text{L}$ 、 MgCl_2 を $0.8\text{ }\mu\text{L}$ に滅菌水を合わせて $100\text{ }\mu\text{L}$ とした。PCR 反応は、Program Temp Control System PC-808 (ASTECC 社製) で 95℃を 5 分後、熱変性を 94℃で 1 分間、アニーリングを 55℃で 1 分間、伸長反応を 72℃で 2 分間を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、反応停止を 72℃で 5 分間行った。

制限酵素は、単価が比較的安く、酵素の認識配列が短く高頻度で DNA 断片の切断が期待できるもので、反応温度は操作の簡易化を目的として 37℃で統一するという条件に合った 16 種類 *HinfI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *EcoT14I*, *PstI*, *DraI*, *EcoO65I*, *EcoT22I*, *BanII*, *HaeIII*, *MboI*, *BspT107I*, *FokI*, *Csp6I*, *Hin6I* および *cfr13I* を供試した。制限酵素処理は、PCR 反応後の溶液 $5\text{ }\mu\text{L}$ に滅菌水 $4\text{ }\mu\text{L}$ 、反応バッファー $1\text{ }\mu\text{L}$ および制限酵素 1unit を混合後、37℃で一昼夜静置した。制限酵素処理後の溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$ を 1.8 %アガロースゲルのコームの穴に注入し、0.5 % TBE 緩衝液中にて 200V の電圧により 55 分間の電気泳動を行った。

電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 1.5 時間染色後、紫外線照射下で、制限酵素断片長多型を観察した。

（4）SSR (Simple Sequence Repeats) 分析

プライマーの組合せは、Ramsay ら (2000) が公表している組合せのうち、Kai ら (2003) が国内二条大麦品種間で比較的明瞭な PCR 増幅産物を得たプライマーの組合せを優先して 50 種類とした。

PCR 反応液は、濃度を $20\text{ng }\mu\text{L}^{-1}$ に調整した鋳型 DNA を $1\text{ }\mu\text{L}$ 、濃度が 10pM の Forward 側プライマーおよび Reverse 側プライマーをそれぞれ $1\text{ }\mu\text{L}$ 、(株)タカラバイオ社製の TaKaRa Ex Taq を、 $0.05\text{ }\mu\text{L}$ 、付属されている 10 × Ex Taq Buffer を $1\text{ }\mu\text{L}$ 、dNTP Mixture を $1\text{ }\mu\text{L}$ 、 MgCl_2 を $0.8\text{ }\mu\text{L}$ に滅菌水を合わせて $10\text{ }\mu\text{L}$ とした。PCR 反応は、CAPS 分析

と同じ温度条件とした。PCR 反応液は 10 μ L を 3.0 % アガロースゲルのコームの穴に注入し、0.5 $\times$ TBE 緩衝液中にて 200V の電圧により 60 分間の電気泳動を行った。DNA 多型の調査は、電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 1.5 時間染色して、紫外線照射下で行った。

(5) RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 分析

プライマーは、いずれも 10 塩基で、筆者が選定した 5 種類と、STAFF 研究所から分譲して頂いた 48 種類合計 53 種類を用いた。PCR 反応液は、濃度を 20ng μ L⁻¹ に調整した鋳型 DNA を 1 μ L、濃度が 20pM のプライマーを 1 μ L、(株) タカラバイオ社製の TaKaRa Ex Taq を 0.05 μ L、付属されている 10 $\times$ Ex Taq Buffer を 1 μ L、dNTP Mixture を 1 μ L、MgCl₂ を 1 μ L に滅菌水を合わせて 10 μ L とした。PCR 反応は、Program Temp Control System PC-808 (ASTEC 社製) で 95 $^{\circ}$ C を 5 分後、熱変性を 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、アニーリングを 36 $^{\circ}$ C で 2 分間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 3 分間を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、反応停止を 72 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。PCR 反応後の溶液 10 μ L を 1.5 % アガロースゲルのコームの穴に注入し、0.5 $\times$ TBE 緩衝液中にて 200V の電圧により 55 分間の電気泳動で行った。DNA 多型の調査は、電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 1.5 時間染色後、紫外線照射下で行った。

RAPD 分析の PCR 増幅産物による DNA 多型は、増幅される断片の再現性が劣る場合がある(鵜飼 2000)。そこで、再現性の確認のため、同一品種の異なる植物体から DNA を抽出し、同一条件で再度 PCR 反応を行って DNA 多型の再現性を確認した。

結果

第 1 表に RAPD 分析、SSR 分析 および CAPS 分析における、国内品種間と国内品種と外国品種間それぞれの DNA 多型検出数および検出率を示した。

DNA 多型検出率は、2 品種の組合せの間で、調査したプライマー数またはプライマー組合せ数に対して DNA 多型を検出したプライマー数の頻度を示した。DNA 多型検出率の平均値は、国内品種では供試した 22 品種間の 231 組合せの DNA 多型検出率から算出した。一方、外国品種と国内品種との間では、供試した国内 22 品種と外国 2 品種間の 44 組合せから算出した。最高検出数および最高検出率は本実験のなかで得られた品種間についての結果を示した。

第 1 表 二条大麦品種間における分析方法の違いによる DNA 多型検出数と頻度。

分析方法	調査 ¹⁾	国内 22 品種間における DNA 多型検出数 (頻度)			外国 2 品種と国内 22 品種 間の多型検出数 (頻度)		
		最高	最低	平均	最高	最低	平均
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
RAPD	53	6(11.3)	0(0.0)	1.5 (2.8)	6(11.3)	1(1.9)	2.5(4.8)
SSR	50	1(2.0)	0(0.0)	0.3 (0.7)	1(2.0)	0(0.0)	0.8(1.7)
CAPS	19	9(47.4)	0(0.0)	4.0 (18.7)	10(52.6)	6(31.6)	8.2(43.3)

1) 調査したプライマーの種類。SSR と CAPS 分析は Forward 側と Reverse 側との組合せで 1 種類とした。CAPS 分析は、17 種類の制限酵素処理 (無処理を含む) を行った結果。平均は、品種すべての組合せについてのもので、国内 22 品種間では 231 組合せ、外国 2 品種と国内 22 品種間では 44 組合せの平均値を示す。

RAPD 分析, SSR 分析 および CAPS 分析において, DNA 多型検出頻度の平均値は, 国内品種間では 2.8 %, 0.7 %, 18.7 % (上記の分析方法の順) であり, 外国品種と国内品種間では 4.8 %, 1.7 %, 43.3 % (同上) であった. いずれの分析方法においても, 国内品種間の DNA 多型検出率の平均値は, 外国品種と国内品種間に比べて低かった. DNA 多型検出率の平均値からみて, CAPS 分析, RAPD 分析, SSR 分析の順に優れた. 最高検出率も同様であった. 最低検出率については, いずれの分析方法も DNA 多型を 1 つも検出できなかった品種の組合せが認められた. 多型を検出できなかった品種の組合せは, RAPD 分析, SSR 分析および CAPS 分析において, それぞれ 56 組, 174 組および 9 組認められた.

これらの結果, DNA 多型検出数および検出率からみて最も効率的に DNA 多型を検出した分析方法は CAPS 分析であった. また CAPS 分析は, PCR 反応による増幅の安定性, DNA 多型の再現性および視認性からみて, RAPD 分析や SSR 分析より優れた.

RAPD 分析では, 再現性が劣ったため DNA 多型検出率が低かった. 供試した RAPD プライマー 53 種類の内, 1 回目の分析結果では 19 種類のプライマーで PCR 増幅産物の有無による品種間差を観察できたが, 再現試験の結果, 再現性が良好な DNA 多型と判断したのは最終的に 6 種類のプライマーのみであった.

SSR 分析においては, 供試した 50 種類のプライマー組合せのうち, 3.0 %アガロースゲルによる電気泳動で PCR 増幅断片長の差が大きく視認性の優れる DNA 多型を検出したのは 1 種類であった. 他に 7 種類のプライマーの組合せで PCR 増幅産物長にわずかな差による品種間差らしきものが観察されたが, 判別が極めて困難であったため, これらは DNA 多型の検出数に入れていない. また 1 種類のプライマー組合せで PCR 増幅産物の有無による DNA 多型が観察されたが, これも PCR 反応における増幅の失敗と区別できないため DNA 多型検出数に入れなかった.

考察

本節の結果, 分析方法によって国内および外国大麦品種間の DNA 多型検出率に差が認められた. DNA 多型検出率からみて優れたのは CAPS 分析で, RAPD 分析や SSR 分析は劣った. RAPD 分析の DNA 多型検出率が劣った原因は, 再現性が劣ったことであった. 再現性が劣る原因は, PCR 反応の温度, 反応液の製品の違いなどわずかな違いで結果が異なることがある (鵜飼 2000) ためであろう. 一方, SSR 分析の DNA 多型検出率が比較的低かったのは, PCR 増幅産物の分画能力が低いアガロースゲルを用いたためと考えられた. SSR 分析は, 数塩基の単純な繰り返し数の品種間差を PCR 増幅産物長の違いによる DNA 多型として検出する. 著者の経験では, PCR 増幅産物長の品種間差が 4bp 以下の場合, シークエンサーと解析ソフト genescan による数量的な測定では明瞭に判別できるが, 3.0 %アガロースゲルでは判定が著しく困難であった. そのため, 本実験方法による SSR 分析で竹井検出率が低かった原因は, 4bp 以下の PCR 増幅産物長の品種間差による DNA 多型を見逃している可能性があったためと考えられた. また, SSR 分析において PCR 増幅産物の有無による DNA 多型検出数に入れなかった理由は, PCR 反応による増幅産物が 1 つであったため, PCR 増幅産物の無かった品種が PCR 反応の失敗により PCR 増幅産物が観察されないことと区別ができなかったためである. SSR 分析で DNA 多型検出率を上げるためには, わずかな PCR 増幅産物長の差異を検出できる方法を用いる必要性が示唆された.

2. CAPS マーカー, SSR マーカーおよび RAPD マーカーによる品種識別

国内二条大麦 22 品種と外国品種の 2 品種の計 24 品種について, 前節の結果最も効率的に DNA 多型を検出できた CAPS 分析により, 24 品種すべてを識別する CAPS マーカーのデータベースを作成した。

また, 前節の実験および新たに探索して得た RAPD マーカーと SSR マーカーによる品種間の DNA 多型の結果も, 一部識別できる品種があり, 利用価値があると判断して付け加えた。

材料と方法

供試品種, DNA の抽出, CAPS 分析, SSR 分析および RAPD 分析は前節に準じた。

結果

(1) CAPS 分析による品種識別

前節の CAPS 分析により DNA 多型を検出できなかった国内品種 9 組について, さらに新たなプライマー組合せ 30 種類について前節と同じ 16 種類の制限酵素処理を行って分析したところ, DNA 多型を検出できなかった国内品種 9 組においても DNA 多型を検出することができた。制限酵素断片長の品種間差が極めて小さく DNA 多型の判断が困難なものは無視した。これら 49 種類のプライマー組合せと 16 種類の制限酵素処理および無処理の 833 組合せから, 本実験で DNA 多型を検出できたのは 36 組合せであった。

24 品種間で検出した DNA 多型の一例を第 1 図に示した。品種間の DNA 多型検出数を第 2 表に示した。品種間の DNA 多型の検出数は, 品種の組合せによって 1 ~ 31 と大きな変異が認められた。最も多い 31 の DNA 多型を検出した品種の組合せは, Pallas とほうしゅん, Pallas とスカイゴールドで, いずれも外国品種と国内品種との組合せであった。これらは, それぞれでプライマー組合せと制限酵素との組合せは異なるが, いずれも 13 種のプライマー組合せと 14 種類の制限酵素処理との組合せで検出した。これらの多型検出率は, 調査したプライマー 49 種類に対しては 26.5 %, プライマーと制限酵素との 833 組合せに対して 3.7 % であった。一方で, DNA 多型の検出数が最少の 1 つのみであった品種の組合せと, その DNA 多型を検出したプライマー組合せと制限酵素の組合せは, なす二条とはるな二条間の aABG711 と *Ban*II, タカホゴールドとニューゴールド間の aMST102 と *Hae*III の 2 組であった。これらの DNA 多型検出率は調査したプライマー組合せ 49 種類に対して 2.0 %, プライマー組合せと制限酵素との 833 組合せに対して 0.1 % であった。

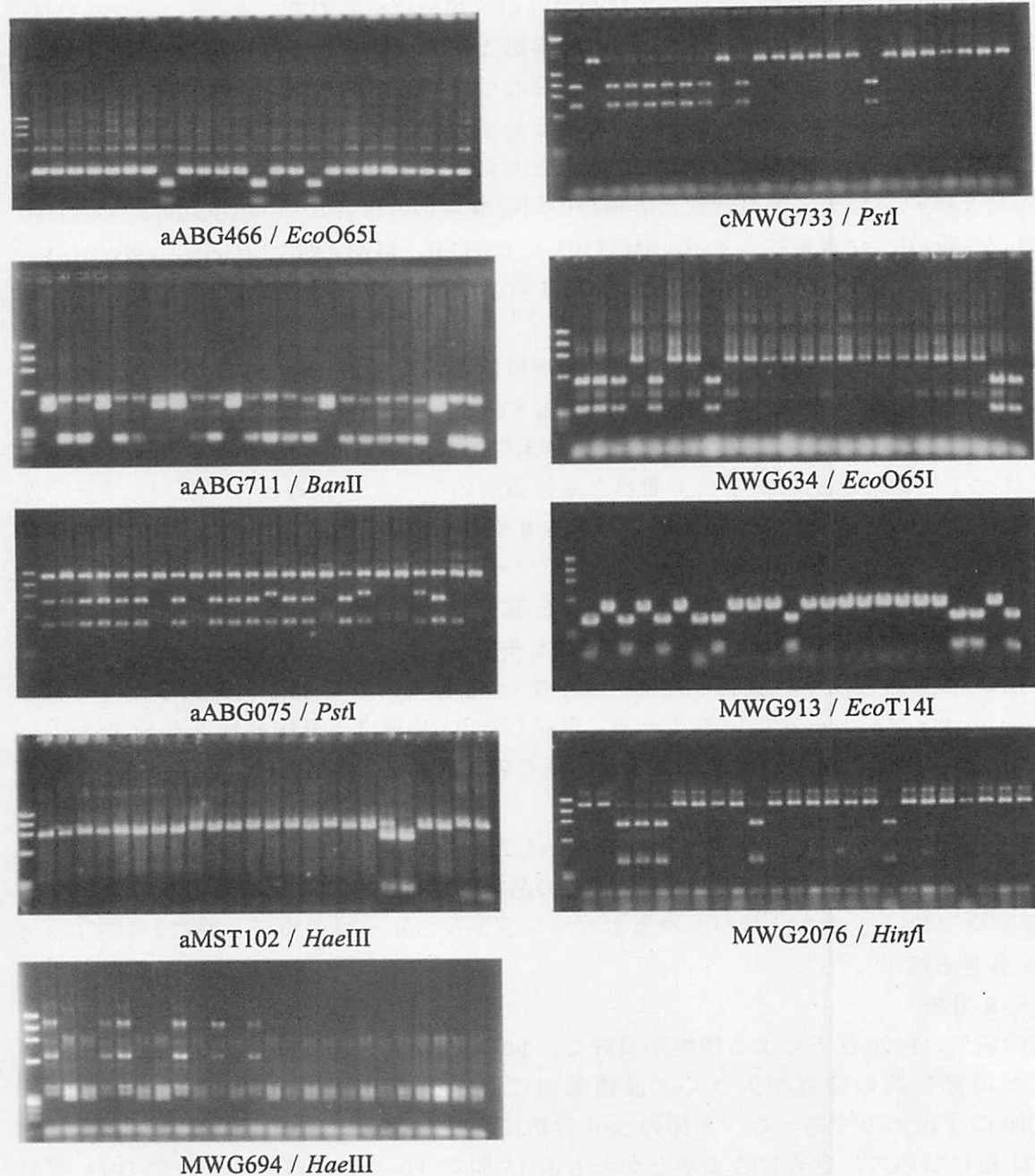
検出した DNA 多型を基に品種を識別するためのデータベースを第 3 表に作成した。品種間で得られた制限酵素断片長の違いで検出した DNA 多型を, 1, 2, 3 および 4 の数字で区別して示した。この数字による区別の例としては, 第 3 表と第 1 図の aABG075 のプライマーと制限酵素 *Pst* I の組合せによる DNA 多型の対応を参照されたい。同一のプライマー組合せと制限酵素との組合せにおいて, 数字が異なる品種間は制限酵素断片長の違いによる識別が可能であることを示す。ABG004, ABG462, aMST102 および cMWG728 の 4 種類は制限酵素処理をしなくても PCR 増幅産物による DNA 断片長の多型が検出でき, そのまま STS マーカーとして利用が可能であった。

また, PCR 増幅産物に対して, 1 ~ 10 種類の異なる制限酵素処理により, それぞれ制

第2表 CAPS分析におけるDNA多型検出数.

[illegible]

④はDNA多型の検出数の最少数であり、⑤は最大数であることを示す。



第 1 図 大麦 24 品種を識別する CAPS 分析のプライマーと制限酵素の組み合わせ例と制限酵素断片長多型の検出.

図の下に、プライマー / 制限酵素の組合せを示す. 図はいずれも左のレーン 1 列目から、1.サイズマーカー (ϕ X174 *HaeIII*, cMWG733 のみ *HindIII* を含む), 2.あまぎ二条, 3.アサカゴールド, 4.ミハルゴールド, 5.ほうしゅん, 6.しゅんれい, 7.ニシノゴールド, 8.ダイセンゴールド, 9.きぬゆたか, 10.ミサトゴールド, 11.スカイゴールド, 12.なす二条, 13.おうみゆたか, 14.とね二条, 15.みょうぎ二条, 16.はるな二条, 17.きぬか二条, 18.ミカモゴールド, 19.さきたま二条, 20.タカホゴールド, 21.ニューゴールド, 22.ニシノチカラ, 23.ニシノホシ, 24.Harrington, 25. Pallas.

制限酵素断片長による DNA 多型が検出できたプライマー組合せが cMWG733, aMST102, aABG075, MWG2076, MWG634 および MWG913 の 6 種類認められた。ただし, cMWG733, MWG2076 および MWG2076 は異なる制限酵素処理により得られた制限酵素断片長はそれぞれで異なるものの, 識別ができる品種の組合わせは同じであった。

これらの結果から 24 品種全てを識別できる最小のプライマー組合せと制限酵素との組合せを選定し, 第 3 表の左側に○印で示すとともに, 結果の写真を第 1 図に示した。その組合せは, 9 種のプライマー組合せと 6 種類の制限酵素との組合せで, aABG466 と *Eco*O65I, aABG711 と *Ban*II, aABG075 と *Pst*I, aMST102 と *Eco*T14I, MWG694 と *Hae*III, cMWG733 と *Pst*I, MWG634 と *Eco*O65I, MWG913 と *Eco*T14I および MWG2076 と *Hinf*I であった。

(2) RAPD 分析

RAPD 分析で再現性が良好で品種識別に利用可能と判断した DNA マーカーのデータベースを第 4 表に示す。これらは, Program Temp Control System PC-808 (ASTEC 社製) を用いた PCR 反応の結果である。RAPD 分析の結果は, 識別が可能な品種間について, CAPS 分析に比べて制限酵素処理が不要で簡易な品種識別のデータベースとして利用できる, 品種間で DNA 多型となる PCR 増幅産物の有無を 0 (PCR 増幅産物無し) と 1 (PCR 増幅産物有り) の数字で区別して示した。同一のプライマーにおいて, 数字が異なる品種間は, PCR 増幅産物の有無による識別が可能であることを示す。

6 種類のプライマーにより最高で 6 つの DNA 多型をニシノチカラと Harrington 間で検出した。DNA 多型の検出率は調査した全プライマー 53 種に対して 11.3 % であった。これらの 6 つの RAPD マーカーを用いることで, 供試した 24 品種は, 外国品種 2 品種を含む 11 品種 (第 4 表の*印) が識別可能となった。残りの国内品種 13 品種は, 2 品種と 11 品種の 2 群に分類できた。

6 種類のプライマーの塩基配列は第 5 表に示した。なお, CAPS 分析で DNA 多型の検出数が 1 つと少なかったなす二条とはるな二条の品種間では, 今回の RAPD 分析においても DNA 多型検出数は 0 であったが, タカホゴールドとニューゴールド間においては, 1 つ DNA 多型を検出した。

(3) SSR 分析

前節の結果, PCR 反応による増幅が良好で, 3.0 % アガロースゲルによる分画で PCR 増幅断片長の品種間の変異が大きく, 品種識別に適すると判断したプライマー組合せは Bmac0090 の 1 種のみであった。前節の SSR 分析により DNA 多型を検出できなかった国内品種 174 組について, さらにきぬゆたかと吉系 15 間で 3.0 % アガロースゲルで DNA 多型を検出したプライマー組合せ (Kai ら 2003) を新たに 18 種類用いて分析したところ, 視認性と再現性に優れ品種識別に利用できると判断した以下の 3 種類のプライマー組合せを選定した。SSR 分析の結果は, 識別が可能な品種間について, CAPS 分析に比べて制限酵素処理が不要で簡易な品種識別のデータベースとして利用できる。

新たに検出した 3 つ DNA 多型は, 1 つは 24 品種間で PCR 増幅断片長の品種間の変異が大きいプライマー組合せ HvM036, 残り 2 つは RAPD 分析のように複数の PCR 増幅産物が得られ, そのうち特定のバンドの有無による DNA 多型を検出するプライマー組合せ HvM062, HvPRP1B である (第 6 表)。これらの 4 種類の SSR マーカーを用いることで, 24 品種のうち 6 品種 (第 6 表の*印) の識別が可能であった。のこりの 18 品種は 5 群の 2 品種, 3 品種, 3 品種, 4 品種および 6 品種に分類ができた (第 6 表)。SSR 分析の PCR 反応液の組成と PCR 反応の温度条件は, CAPS 分析と同じであるため, CAPS 分析と同時に PCR

第3表 CAPS 分析による品種識別

[illegible]

1) 同一のプライマーと制限酵素の組合せにおいて、数字が異なる品種間には多型が検出され識別できることを示す。9つの○印は、24品種をすべてを識別できる最小のプライマーと制限酵素の組合せの1つの例である。

第4表 RAPD 分析による品種識別.

	* * a a a * * b a a a b a a a * a a * * * * *																							
	ド				ン				ン				ン				ン							
プライマー名	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	ル	
	条	ー	ー	ん	い	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	
	二	ゴ	ゴ	ゆ	れ	い	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	ー	
	ぎ	カ	ル	し	ん	ノ	セ	ゆ	ト	イ	二	み	二	う	な	か	モ	た	ホ	ー	ノ	ノ	ホ	
	ま	サ	ハ	う	ゆ	シ	イ	ぬ	サ	カ	す	う	ね	よ	る	ぬ	カ	き	カ	ユ	シ	シ	シ	
	あ	ア	ミ	ほ	シ	ダ	き	ミ	ス	な	お	と	み	は	き	ミ	さ	タ	ニ	ニ	ニ	ニ	ニ	
RA8	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
RA19	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
RA55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
RAPD7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	
RAPD15	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
RAPD17	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	

PCR 反応に Program Temp Control System PC-808 (ASTECC 社製) による結果.

*印の品種は、6種類のプライマーにより識別が可能である。

a, b の同一英小文字の品種間は、多型が無く識別できない。

第5表 RAPD 分析により DNA 多型を検出した
ランダムプライマーの塩基配列.

プライマー名	塩基配列 (5'→ 3')
RA8	CACCGTTCTG
RA19	TAGACAGTCG
RA55	GGGCTCTAGC
RAPD7	CAAACGTCGG
RAPD15	CTGCGCTGGA

第6表 SSR分析による品種識別.

	**b c b e * * d e e c c c e b e e d d * * a a																						
	ドド		ド		ド		ル		ル		ル		ル		ル		ル		ル				
プライマー名	条	ー	ん	い	ー	ゴ	か	ー	ー	か	た	二	条	条	ー	ー	ー	ー	ー	カ	シ		
	二	ゴ	ゴ	ゆ	れ	ゴ	ん	た	ゴ	ゴ	条	ゆ	条	ぎ	二	ゴ	ま	ゴ	ゴ	チ	ホ		
	ぎ	カ	ル	し	ん	ノ	セ	ゆ	ト	イ	二	み	二	う	な	カ	モ	た	ホ	ー	ノ		
	ま	サ	ハ	う	ゆ	シ	イ	ぬ	サ	カ	す	う	ね	よ	る	ぬ	カ	き	カ	ユ	シ		
	あ	ア	ミ	ほ	し	ニ	ダ	き	ミ	ス	な	お	と	み	は	き	ミ	さ	タ	ニ	ニ		
																					Harrington Pallas		
Bmac0090	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2		
HvM036	3	2	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3		
HvM062 ⁿ	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1		
HvPRP1B ⁿ	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0		

1) 複数の PCR 増幅産物があり、そのうちの 1 つの有無で判定している。

*印の品種は、4種類のプライマーにより、識別が可能である。

a～e の同じ英小文字の品種間は、多型が無く識別できない。

反応が可能である。

なお、CAPS 分析で DNA 多型の検出数が 1 つのみであった品種の組合せであるなす二条とはるな二条およびタカホゴールデンとニューゴールデン間では、SSR 分析において DNA 多型は検出できなかった。RAPD 分析で DNA 多型を検出できなかった 56 組の品種間では、そのうち 43 組の品種間で DNA 多型を検出した。

考察

本節では、CAPS 分析のみを用いて、国内二条大麦 22 品種と外国二条大麦 2 品種の計 24 品種を識別できる方法を開発した。今回供試した 24 品種は 9 種類のプライマー組合せと 6 種類の制限酵素との組合せで識別が可能である。品種間の DNA 多型の検出は 1.8 % アガロースゲルを用いた 200V, 55 分間の電気泳動により可能である。なお、CAPS 分析は操作性からみて、RAPD や SSR 分析に比べて制限酵素処理のためのコストと時間がかかる。本実験では比較的安価な制限酵素を選定した。

この品種識別技術は、結果の視認性と再現性からみた識別の確実性に重点を置いたこと、使用目的として原種圃場や採種圃場の品種の純度管理の研究、流通での偽装防止のための抑止力としての効果を想定していることから、コストと手間および PCR 特許（注：ポリメラーゼ連鎖反応プロセス関連および Taq 関連の米国特許第 4683195 号等）は現時点では問題ないと判断した。PCR 特許は現在 Roche 社（スイス）が保有し、その薬品以外に関する占有実施権を ABI（米国）が保有している。PCR 特許の使用が研究室段階の範囲であれば問題はないが、事業への使用は問題を生じる（伴 2004）ので契約などを行う必要がある。

今回用いた二条大麦 24 品種は、2002 年時点で福岡県で栽培されている奨励品種を全て含み、2001 年産の全国の国内産出回り数量の 93.1 % を占める（日本麦類研究会 2002）。今回供試していない未知の品種や今後育成される新品種については、本実験の 24 品種と同じ結果を示す場合、見逃す可能性がある。そのため、品種識別技術の精度や実用性を高めるには、今後、新品種など継続的に品種間の DNA の多型情報を最大限蓄積していくことが重要である。

まとめ

二条大麦品種の DNA 解析を効率的に行うため、品種間の DNA 多型検出率が優れる分析方法について、RAPD 分析、SSR 分析および CAPS 分析から、アガロースゲルで検出する条件により比較して検討した。DNA 多型検出率は CAPS 分析、RAPD 分析、SSR 分析の順に優れ、最も効率的に DNA 多型を検出した分析方法は CAPS 分析であった。また CAPS 分析は、PCR 反応による増幅の安定性、DNA 多型の再現性および視認性からみて、RAPD 分析や SSR 分析に比べて優れた。CAPS 分析を用いて、国内二条大麦 22 品種と外国二条大麦 2 品種の計 24 品種を識別できる方法を開発した。これらの 24 品種の識別は、9 種類のプライマー組合せと 6 種類の制限酵素との組合せで可能である。

第3章 二条大麦品種間の近縁係数や遺伝的距離

育種計画を策定する際に、地域に普及している品種間の近縁程度を把握することは、安定多収を戦略的に保つために重要な情報となる。それは、地域に普及する品種の遺伝的背景の多様性を保ち、遺伝的多様性の減少による脆弱化 (Walsh 1981) を避け、暖冬や出穂後の多雨などの気象災害や病害虫による減収や品質低下の被害を軽減する対策に役立つ。また、交配母本となる品種間における遺伝的背景の把握は、育種目標となる有用遺伝子の由来や多様性を明らかにし、効率的かつ効果的に有用遺伝子を集積した品種育成に有効な情報となる。

本章では、品種間の遺伝的背景を把握するため、家系図の祖先品種の共通程度からみた近縁係数と、DNA マーカーの検出率から算出した根井の遺伝的距離を求めた。

1. 二条大麦主要品種間の近縁係数

近縁係数は、品種の家系を基にして品種間の祖先品種の共通程度から統計的に算出する方法である。推論型コンピュータ言語の Prolog を用いることにより、近縁係数の算出は、家系図のデータベースから迅速かつ手軽にできるようになっている (水田ら 1996a)。このプログラムを利用した水稻 (大里・吉田 1996)、小麦 (水田・吉田 1996b) およびビール大麦 (水田・吉田 1996a) で良質品種育成のための合理的な交配組合せの予測が可能であることが明らかにされている (吉田 1998a)。

このプログラムによる近縁係数の算出方法は、両親の全遺伝物質を雑種が半分ずつ受け継ぐとして、理論的に計算を行うものである。両親から遺伝物質の半分ずつを雑種が受け継ぐという仮定については、Martin (1982) が、大豆において、交配で1つの染色体上につき1回の組換えが起こると仮定した場合、雑種の88%は片親の遺伝物質の40~60%を持ち、強度の選抜を行っても70%の遺伝物質を持つ系統を選抜する見込みはないことから、妥当であるとしている。染色体上の組換え回数については、矢野・清水 (1993) が日本型稲品種とインド型稲品種を交配し、その後集団養成と系統選抜による自殖を経た交雑後代 F12 と F14 世代ではあるが、遺伝子型を RFLP マーカーによる遺伝子地図を作成して図示し、各染色体における組換え頻度が平均 1.2 回であったことを明らかにしている。

本節では、近年国内で栽培されている主な二条大麦国内 22 品種間の近縁係数を算出した。

材料と方法

第7表に、供試した二条大麦国内 22 品種の各交配親、品種登録年および育成地を示す。品種登録の無いものは、農林水産省農林水産技術会議事務局地域研究課 (2003) による農林登録年を示した。

自殖作物の近縁係数の算出は、2 個体 X, Y 間の近縁係数を r_{xy} 、2 個体間の共通祖先を Z し、 n_1 , n_2 を X, Y からそれぞれ Z へさかのぼる世代数とすると、

$$r_{xy} = \sum (1/2)^{n_1+n_2}$$

で求められる (酒井 1957)。ここで $\sum$ は共通祖先へさかのぼる全経路の和を示す。

近縁係数の算出は、水田ら (1996a) が作製した推論型コンピュータ言語の Prolog を用いて行った。

第7表 近縁係数と遺伝的距離を計算した二条大麦品種名、交配親、品種登録年と育成地。

品種名	交配親		品種登録年	育成地
	♀	♂		
ニューゴールド	エビス	アサヒ19号	1965 ¹⁾	栃木県農業試験場南河内分場
ダイセンゴールド	エビス	アサヒ19号	1972 ¹⁾	鳥取県農業試験場東伯分場
あまぎ二条	ふじ二条	成城17号	1981	キリンビール株式会社
はるな二条	(G65/K-3)F10	成城15号	1981	サッポロビール株式会社
きぬゆたか	新田系1	あまぎ二条	1987	キリンビール株式会社
ミサトゴールド	南系B4641	新田二条1号 ³⁾	1987	栃木県農業試験場栃木分場
ニシノゴールド	(南系B4718/新田二条1号 ³⁾)F3	新田二条1号 ³⁾	1988	福岡県農業総合試験場
なす二条	(成系5/にら系31)F3	成系5	1988	キリンビール株式会社
ニシノチカラ	南系R1303	(新田二条1号 ³⁾ / KLAGES)F1	1989	九州農業試験場
とね二条	Art.Mut.M4-66 ³⁾	新田系1	1989	サッポロビール株式会社
ミカモゴールド	南系B4718	新田二条1号 ³⁾	1989	栃木県農業試験場栃木分場
アサカゴールド	(はるな二条/倉系2660)F1	関東二条19号	1992	福岡県農業総合試験場
きぬか二条	83SBC27	吉系8 ⁴⁾	1996	キリンビール株式会社
みょうぎ二条	栃系144 ⁵⁾	やす系50	1996	サッポロビール株式会社
タカホゴールド	大系R2068	栃系144 ⁵⁾	1997	栃木県農業試験場栃木分場
おうみゆたか	野洲二条2号	栃系144 ⁵⁾	2000	アサヒビール株式会社
ミハルゴールド	(大系H804/Spartan)F1	栃系157	2000	福岡県農業総合試験場
ニシノホシ	西海皮38号 ⁶⁾	栃系145	2001	九州農業試験場
ほうしゅん ²⁾	吉系19	関東二条25号	2002	福岡県農業総合試験場
さきたま二条	新田系25	やす系58	2003	サッポロビール株式会社
スカイゴールド	関東二条25号	栃系216	2003	栃木県農業試験場栃木分場
しゅんれい	(吉系15/きぬゆたか)F5	九州二条11号 ⁷⁾	2004	福岡県農業総合試験場

1) 農林登録年。これ以外は農林水産技術会議事務局地域研究課(2003)による。

2) ほうしゅんは、(吉系19/関東二条25号)F1に*H.bulbosum*を交配した半数体育種法による育成品種。3) 新田二条1号はのちのはるな二条、Art.Mut.M4-66ははるな二条の人為的突然変異、4) 吉系8はのちのニシノゴールド、5) 栃系144はのちのミサトゴールド、6) 西海皮38号はのちのニシノチカラ、新田系25はのちのとね二条、7) 九州二条11号はのちのミハルゴールド。

[illegible]

結果と考察

近縁係数は、供試した品種間で 0.100 ~ 0.809 の変異が認められた(第 8 表)。他の国内二条大麦 21 品種との近縁係数の平均値が高かったのは、はるな二条の 0.517, ミサトゴールドの 0.483, ニシノゴールドの 0.469 およびみょうぎ二条の 0.454 であった。

はるな二条は育成当時に麦芽エキスの品質からみて世界最高水準の醸造適性を有すると評価され(増田ら 1993), その育成途中である新田二条 1 号(はるな二条の旧名系統番号名), はるな二条の人為的突然変異系統の Art. Mut. M4-66, はるな二条と同じ交配親を持つ成系 5 などが交配親として多く用いられた(第 7 表)。そのため、はるな二条との近縁度が高くなったのであろう。

他の 21 品種との近縁係数の平均値が低かったのは、スカイゴールドの 0.173 であった。スカイゴールドは、六条大麦であるはがねむぎ由来の耐病性を導入した品種であり、近縁係数の計算上では、はがねむぎが他の二条大麦品種との類縁関係が交配記録による家系上からみて全く無いとと考えられた。

国内 22 品種間での近縁係数の平均値は 0.517 ~ 0.173 で、多くの品種がはるな二条など良質品種との近縁度が高く、わが国ビール大麦の遺伝的背景がかなり狭いことを示している(水田・吉田 1994)。水稻も同様な傾向が認められ、わが国で栽培されている品種は良食味品種であるコシヒカリとの近縁度が高い(吉田・今林 1998b)。そのため遺伝的背景が狭く、特定病虫害などが突発的に多発する可能性のある遺伝的脆弱性(Walsh 1981)が指摘されている。今後の新品種育成のためには、良質多収を維持しつつ、耐病虫性などの遺伝子を積極的に導入し、遺伝的背景を拡大し、遺伝的脆弱性の軽減を図る必要がある。

2. 二条大麦主要品種間の遺伝的距離

遺伝的距離は、品種間の塩基配列の相似度からみた近縁の程度であり、近縁な品種間ほど塩基配列の相似度が高いと考えられる。塩基配列の相似度は、塩基配列上に存在する品種間の DNA 多型を検出し、その検出率を基にして算出する。

本節では、品種間の遺伝的相似度からみた遺伝的距離を算出するため、前章の第 7 表に示した国内 22 品種に外国品種である Harrington と Pallas を加えた合計 24 品種間で検出した DNA 多型のデータを用いた。最初に、このデータが品種の遺伝的背景を適性に反映しているかの妥当性を検討するため、データを基にして品種間の多次元空間内での距離であるユークリッド距離を推定し、クラスター分析を行って品種間の遺伝的距離を系統樹化して示した。この系統樹について、妥当性を系譜から検討した。次に国内 22 品種について遺伝的距離の算出を、妥当性を検討した DNA 多型のデータを基に行った。

材料と方法

品種間の遺伝的距離の算出は、前章の第 7 表に示した国内 22 品種に外国品種である Harrington と Pallas を加えた合計 24 品種とした。遺伝的距離の算出に用いる品種間の DNA 多型のデータは、前章の第 3 表、第 4 表および第 6 表に示した 43 種類のものを用いた。データの数値は、以下のように DNA 多型に数値を当てはめたものである。すなわち、RAPD 分析では、PCR 増幅産物の有無による DNA 多型であり、PCR 増幅産物がある品種を '1'、無い品種を '0' とした。SSR 分析では、PCR 増幅産物の長さの違いによる DNA 多型であり、長い方の品種を '1'、短い方の品種を '2' とした。CAPS 分析では、制限酵素

による切断断片の長さの違いによる DNA 多型が最高 4 種類検出されたので、それぞれに '1' ~ '4' の数値を便宜的に割り当てた。これらの数字は、DNA 多型によって品種を区別するためのもので、クラスター分析の際、例えば数字の '1' と '2' の品種間差と '1' と '4' の品種間差はいずれも '2 つの品種は区別できる' ということを表し、数字の大きさの違いによる評価の差はない。

まず最初に、DNA 多型のデータが品種の遺伝的背景を反映しているか妥当性を検討するため、DNA 多型のデータの数値をそのまま青木によるプログラム（注：<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/Mokuji/index2.html>）に入力し、正規化してユークリッド距離を求め、ward 法によるクラスター分析を行って、系統樹化した。系統樹の妥当性を系譜から行った。

次に、遺伝的距離の算出は以下の手順で行った。DNA 多型のデータは、前章の第 3 表、第 4 表および第 6 表から対立遺伝子数が 2 とみなせる単純な DNA 多型を検出したプライマーと制限酵素の組合せによる 24 種類の DNA 多型データとした。24 種類の DNA 多型のデータにした理由は、染色体上のごく狭い DNA 領域にデータが偏らないようにするためである。CAPS マーカーについては 1 種類のプライマー組合せで増幅したごく狭い DNA 領域において、異なる制限酵素処理により最高で 10 の DNA 多型のデータを得ていたが、1 種類のプライマー組合せにつき 1 つの DNA 多型のデータを用いた。解析に用いた 24 種類の DNA マーカーの染色体上の分布状況については、既知の情報（Blake ら 1996, Mano ら 1999, Ramsay ら 2000, Kai ら 2003）を基に第 9 表に示す。

第 9 表 遺伝的距離の計算に用いた DNA マーカーの座乗染色体。

DNA マーカー		座乗	座乗する染色体
プライマー名	制限酵素	染色体	の情報
ABG004		1H	Blake ら 1996
aMST102	<i>Csp6I</i>	1H	Blake ら 1996
MWG913	<i>MboI</i>	1H	Mano ら 1999
cMWG733	<i>Csp6I</i>	1H	Mano ら 1999
MWG858	<i>HinfI</i>	2H	Mano ら 1999
MWG889	<i>MspI</i>	2H or 7H	UKCropNet
MWG2054	<i>DraI</i>	2H	Mano ら 1999
MWG2076	<i>cfr13I</i>	2H	Mano ら 1999
cMWG694	<i>HaeIII</i>	2H	Mano ら 1999
ABG462		3H	UKCropNet
aABG070	<i>EcoT14I</i>	3H	Blake ら 1996
aABG075	<i>Csp6I</i>	3H or 7H	Blake ら 1996
aABG466	<i>EcoO65I</i>	4H or 6H	Blake ら 1996
aABC455	<i>BspT107I</i>	4H or 7H	Blake ら 1996
aABG711	<i>BanII</i>	5H or 6H	Blake ら 1996
cMWG728		7H	UK CropNet
MWG634	<i>cfr13I</i>	4H	Mano ら 1999
Bmac0090		1H	Ramsay ら 2000
RA8		-	
RA19		-	
RA55		2H	Kai ら 2003
RAPD7		-	
RAPD15		2H	Kai ら 2003
RAPD17		-	

- ; 不明. UKCropNet ; <http://ukcrop.net>

同一の DNA マーカーで複数の染色体が記載されているものは、DNA マーカーの座乗染色体を推定する解析に用いた品種が違うため計算によって推定された連鎖群がまれに異なることがあること、また 1 種類のプライマーで複数の PCR 増幅産物が得られそれぞれが異なる染色体に由来することがあるためである。供試した DNA マーカーの染色体上の分布状況は、第 9 表で染色体の位置情報がある 17 種類からみて、少なくとも 7 本の染色体のうち 5 本にそれぞれ 1 つ以上が座乗していると推定された。なお、第 9 表で座乗染色体の情報が無い 5 種類のプライマーは“-”とした。これらの対立遺伝子数が 2 とみなせる全染色体上の広範囲に分布する 24 種類の DNA 多型のデータから、各 2 品種間の根井による遺伝的距離 D (根井 2002) の算出を以下の式で行った。

$$D = -\ln [(\sum p_{1i} \times p_{2i}) / \sqrt{(\sum p_{1i}^2 \times \sum p_{2i}^2)}]$$

p_{1i} : 集団 1 (品種 1) の i 遺伝子座の遺伝子型の頻度

p_{2i} : 集団 2 (品種 2) の i 遺伝子座の遺伝子型の頻度

なお、算出に用いた品種 (集団) の遺伝子頻度の値として、DNA 多型となる PCR 増幅産物が有る場合を 1、無い場合または対立遺伝子となる別の PCR 増幅産物の場合は 0 の値をいれた。

この計算には、Felsenstein によるプログラム (注: PHYLIP <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>) を用いて行った。遺伝的距離の計算は近縁係数との比較を行うため、前節で計算した国内 22 品種について行った。

結果と考察

第 2 図に、供試した DNA 多型のデータの妥当性を検討するため、43 種類の DNA マーカーの DNA 多型から算出したユークリッド距離に基づくクラスター分析の結果を示した。その結果、供試した 24 品種は距離 200 で、国内の 10, 7 および 5 品種群 (第 2 図の A, B, C の品種群) と外国 2 品種の 4 つのクラスターに分類された。

A クラスターの品種間では、第 7 表で示した交配親にあまぎ二条、きぬゆたか、九州二条 11 号 (ミハルゴールド) や関東二条 25 号など共通な品種が認められた。なお、六条大麦のはがねむぎのオオムギ縞萎縮病耐性を導入したスカイゴールデンも A クラスターに分類された。

B クラスターは、品種間の共通な交配親および祖先品種にはるな二条、新田二条 1 号 (はるな二条の試験番号)、はるな二条の人為的突然変異系統の Art. Mut. M4-66、はるな二条と同じ交配親である成系 5 などを交配親に持つグループで、はるな二条と遺伝的相似度が高い品種で構成されていると考えられた。

C クラスターは、ニューゴールデンやダイセンゴールドの交配親であるエビスとアサヒ 19 号の 2 品種と遺伝的相似度が高い品種で構成されていると考えられた。ミサトゴールデンの交配親の南系 B4641、タカホゴールデンの交配親の栃系 144、およびきぬか二条はいずれも祖先品種にエビスとアサヒ 19 号を持つ。なお、きぬか二条は、交配親がのちのニシノゴールドである吉系 8 とはるな二条を祖先品種に持つ 83SBC27 であるが、ニシノゴールドとはるな二条を含む B クラスターには分類されず、C クラスターに分類された。この原因として、きぬか二条は、交配親である 83SBC27 の祖先で交配記録による家系上では他の品種とは類縁がない外国品種 Claret を遺伝的背景に持っており、Claret の遺伝的

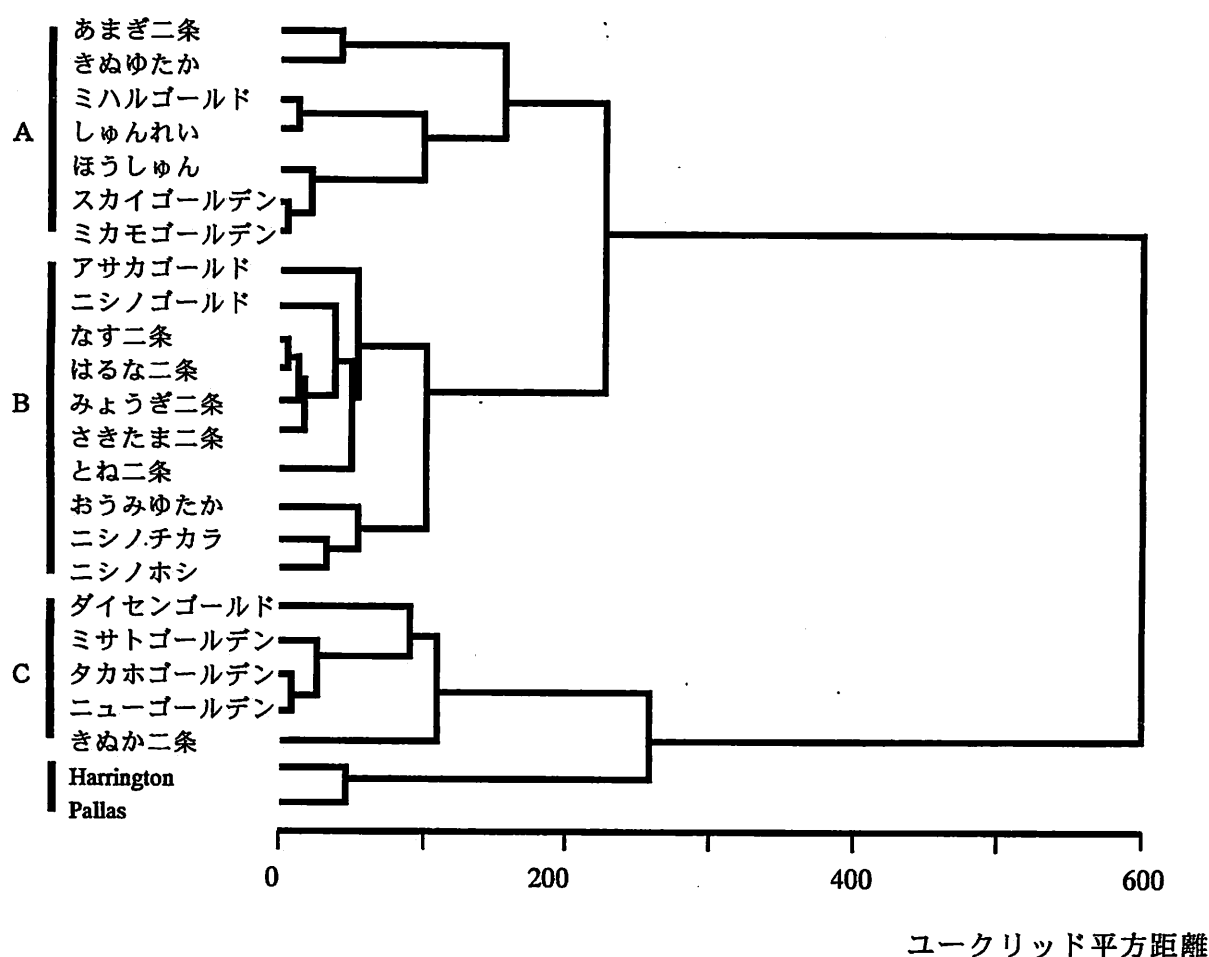
相似度が A クラスタや B のクラスタより C クラスタや外国 2 品種のクラスタの方で高かったためと推察される。

一般的には DNA マーカーで検出した DNA 多型を基にしたクラスタ分析による品種の分類結果は、品種の家系図からみた祖先の共通程度や二条大麦品種の育成の歴史（増田ら 1993）からみておおむね妥当な結果であった。DNA マーカーが、今後全染色体領域をカバーする十分な数が作製されれば、さらに信頼できる結果が得られると考えられる。

第 10 表に国内 22 品種間での根井による遺伝的距離 D の値を示した。遺伝的距離 D の値が小さいほど品種間の近縁の程度が高いことを示す。

他の国内 21 品種との遺伝的距離の平均値からみて、近縁度が高い品種は、はるな二条 (0.206)、さきたま二条 (0.206)、ニシノゴールド (0.251)、ミサトゴールド (0.271) などであった。これらの品種は近縁係数（値は近縁の場合に高くなり、距離とは逆の関係になる）でも他の国内二条大麦 21 品種との近縁度が高く、両者の結果が同様の関係を示した。

一方、他の国内 21 品種との遺伝的距離の平均値からみて、近縁度が低い品種は、きぬゆたか (0.639) であった。近縁係数で他品種との近縁度が最も低かったスカイゴールデンは、他の国内 21 品種との遺伝的距離では平均値が 0.298 と比較的高く近縁度が低い結果となり、近縁係数からみた近縁度とは異なる傾向を示した。



第 2 図 DNA 多型の検出率を基にした大麦品種間のクラスタ分析。

[illegible]

3. 近縁係数と遺伝的距離との関係

品種を区別できる形態や成分の変異は、それらに關与するタンパク質や酵素の働きの違いによる結果であり、それらをコードする遺伝子の塩基配列の差異による。遺伝的距離は、塩基配列の相似度を DNA 多型の検出率から算出し、品種間の近縁程度を示すものである。この品種間の遺伝的距離は、品種の家系図からみた祖先の共通程度との比較においてよく一致したという報告が、小麦 (Smale ら 2002) やライ麦 (vom Brocke ら 2003) である。

前節では、品種間の DNA 多型のデータを用いたクラスター分析の結果、家系上で祖先品種の共通程度が高い品種ほど近いクラスターに属した。本節では、家系図を基に統計的に計算した近縁係数の値と、DNA 多型の検出率から算出した遺伝的距離との関係をみた。

材料と方法

前節までで計算した国内 22 品種相互の近縁係数の値と、根井による遺伝的距離 D との間の相関関係を調査した。併せて両者の関係を図示することで特異的な分布をする品種の有無についても考察した。

結果と考察

国内 22 品種相互間の近縁係数と根井の遺伝的距離 D との関係を第 3 図に示した。これら品種の関係を近縁係数と遺伝的距離で比較すると、大部分の組合せが第 3 図の 2 本の点線、X 軸および Y 軸で囲んだ部分に分布し、全体では、 $r = -0.526$ の 1 % 水準の有意な相関が認められた。なお、第 3 図の中で、DNA 多型の検出率からみて遺伝的相似度が高く遺伝的距離が近いのに交配記録による家系上では類縁関係があまり無い場合は、全体の傾向の左下に位置するはずである。逆に、DNA 多型の検出率からみて遺伝的相似度が低く遺伝的距離が遠いのに家系上では互いに共通な品種が多く使われていた場合には、図の右上に位置する。第 3 図では全体的に左下に分布する傾向が認められた。この原因としては、交配記録上に共通祖先のない品種間は、家系上類縁関係がないと近縁係数のプログラムでは計算する (水田ら 1996a) が、遺伝的背景からみると同じ大麦属として共有する遺伝子領域があるためと考えられる。

第 3 図のグラフで左下に特に離れて位置した×印は、スカイゴールデンとの組合せである。このことは、スカイゴールデンが、六条大麦であるはがねむぎ由来の耐病性を導入した品種であり、クラスター分析の結果である第 2 図でみるかぎり他品種とそれほど遺伝的に離れていないが、はがねむぎが他の二条大麦品種との類縁関係が交配記録による家系上では全く無いためである。遺伝的距離の値から推察すると、はがねむぎもここでの二条大麦品種と類縁関係があるのであろう。このようにスカイゴールデンは家系上の不備が想定されるのでスカイゴールデンとの組合せを除くと、遺伝的距離と近縁係数との間には $r = -0.600$ の相関関係となった。

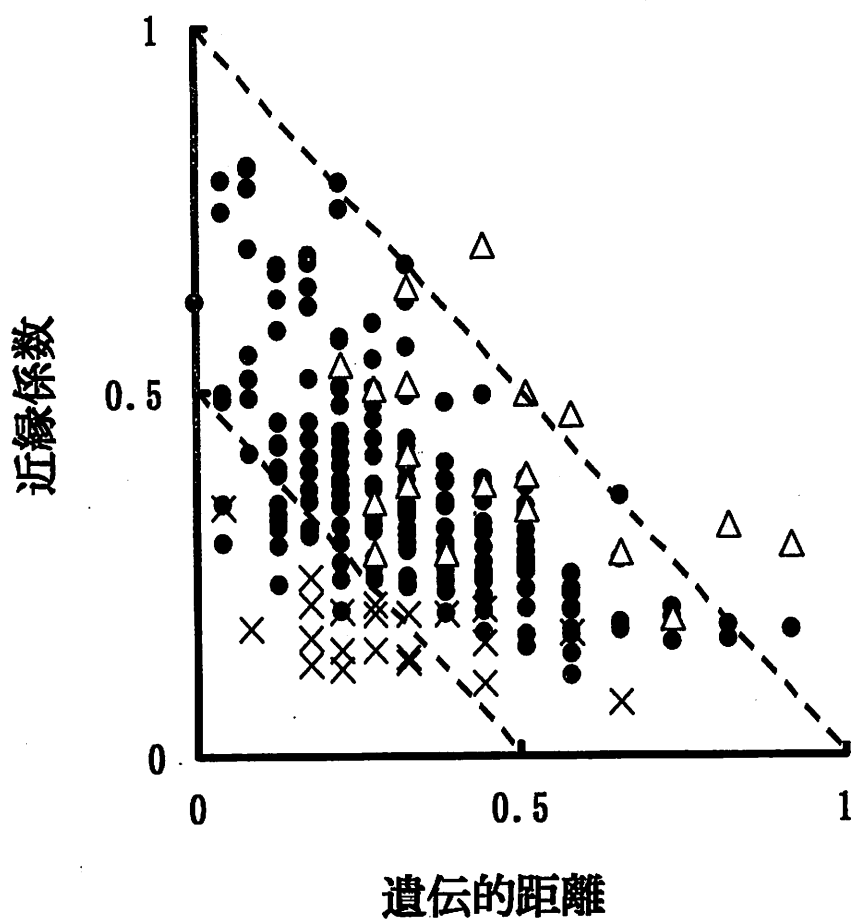
きぬか二条との組合せを図中で△印とした。この場合は、図の右上部に全体の傾向から離れて位置するものがいくつかみられ、きぬか二条の家系に何らかの不整合性のある可能性が示唆された。従って、スカイゴールデンときぬか二条を除いた国内 20 品種間の相関係数を計算すると、遺伝的距離と近縁係数との間には $r = -0.650$ の関係が認められた。

近縁係数は、両親から半分ずつの遺伝物質を確率的に受け継ぐとして算出するが、選抜と固定により世代が進んだ品種間においても、この値は DNA 多型検出率を基にした遺伝

的相似度からある程度裏付けされた。

大麦において、過去の不明、または不整合と考えられる品種の記録については、今後 DNA マーカーの開発と遺伝解析が進むことでさらに明快な結果が得られると考えられる。

今回二条大麦品種間の遺伝的関係を解析する 2 つの方法で、交配記録による家系図から統計的に算出した近縁係数と、DNA マーカーにより検出した DNA 多型を基に算出した遺伝的距離との間には、相関関係が認められた。今回 DNA マーカーで検出した DNA 多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していったのであろう。



● ; スカイゴールデンときぬか二条を除いた国内 20 品種間
 × ; スカイゴールデンと国内品種 △ ; きぬか二条と国内品種

第 3 図 大麦品種における家系から算出した近縁係数と DNA 多型率を基に算出した根井の遺伝的距離 D との相関関係。

まとめ

二条大麦国内 22 品種間の遺伝的関係を明らかにするため、品種の家系図から統計的に算出する品種間の近縁係数と、DNA 多型検出率を基にした品種間の遺伝的距離を算出し、両者の関係を調査した。近縁係数は、はるな二条など良質品種との間の値が高く、一方で特定病害抵抗性を導入した品種との間の値は小さかった。この近縁係数と、DNA 多型を基に算出した遺伝的距離との間には、 $r = -0.526 \sim -0.650$ の相関が認められた。

従って、品種間の近縁係数は、両親から半分ずつの遺伝物質を受け継ぐという理論的な計算に基づくが、品種間の DNA 多型検出率を基に算出した遺伝的距離からある程度裏付けされた。また一方で、今回用いた DNA マーカーが座乗する染色体領域は、品種育成の過程で選抜や淘汰による影響を受けずに、後代にほぼ均等に分離していったと考えられる。

第4章 有用遺伝子の遺伝解析のための半数体倍加系統の作出

近年、DNA マーカーを利用したオオムギの連鎖地図を作製し、育種目標となる重要な農業形質である種子感水性（岩佐ら 1999）、醸造適性（岡田ら 2002）、凸腹粒や側面裂皮粒（Kai ら 2003）および木石港 3 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子（Miyazaki ら 2001）など重要形質に関与する有用な遺伝子の位置を特定し、連鎖する DNA マーカーを開発する遺伝解析の研究が急速に進展している。開発した DNA マーカーは、新品種育成での育種選抜を効率化する一つの手段として期待されている（井辺・吉村 1999）。

遺伝解析で重要なのは、対象となる形質を高い精度で評価する方法と、安定した評価が得られる質の高い材料の確保である（矢野・春島 1994）。遺伝解析に適する材料は、遺伝解析の対象となる形質について個体間または系統間で明らかに遺伝子由来の変異が認められること、形質発現が安定していて再現性のある結果が得られること、分析試料が十分量確保できること、遺伝的に固定されていて同一遺伝子構成の材料として維持が容易で形質評価を繰り返し行えること（金谷ら 1998）が望ましい。

そこで本章では、徳島モチ裸に由来する新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子で、I 型、II 型、III 型すべてのレースに対して抵抗性を示す新たな劣性遺伝子 *rym7t*（福岡ら 1991、古庄・福岡 1997）の染色体上の位置を特定し、この抵抗性遺伝子を有する個体の育種選抜に利用できる DNA マーカーを開発する目的で、遺伝解析の材料として、野生大麦 *Hordeum bulbosum* L. を利用する Furusho ら（1990b）の方法に準じて、半数体倍加系統群を作出しようとした。またそれら半数体を経由した場合でのメンデル分離比を検証し、遺伝解析に用いる半数体倍加系統数を検討しようとした。

1. 半数体倍加系統群の作製

H. bulbosum を利用する半数体作出方法は、大麦と *H. bulbosum* を交雑すると受精後早い段階に特異的に *H. bulbosum* の染色体のみが消失する（Kasha and Kao 1970、古庄ら 1992a）という現象を利用し、残っている大麦品種由来の染色体をコルヒチン処理により倍化することで、染色体がすべてホモ接合体の固定系統を短期間で得る方法である（Furusho ら 1990b）。

本節では DNA マーカーを利用した効率的な育種方法の開発を目標として行った半数体倍加系統群の作出率を明らかにし、効率的な作出方法と遺伝子型の分離比からみた遺伝解析に用いる半数体倍加系統数について検討しようとした。

材料と方法

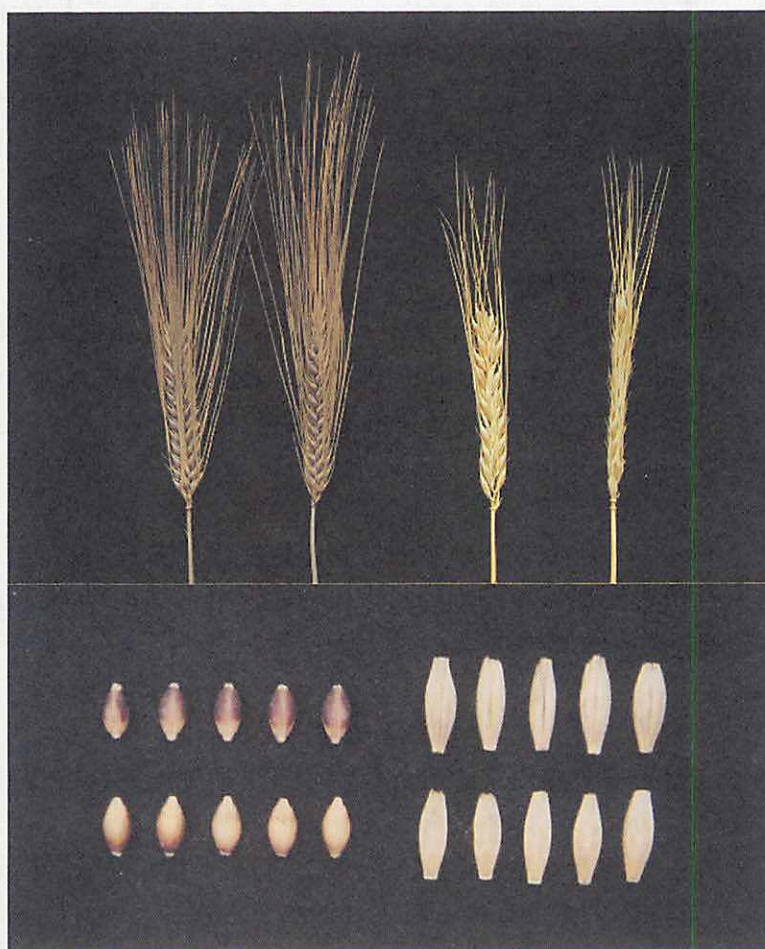
供試した交配親は、徳島モチ裸由来の新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t*（福岡ら 1991、古庄・福岡 1997）を有する六条大麦品種の縞系 6 と、*rym7t* が無くオオムギ縞萎縮病に感受性である二条大麦品種の Ik2 とした（第 4 図）。大麦半数体の作出は、野生大麦 *H. bulbosum* で花粉を多く得られる系統 cb2920（古庄ら 1987、Furusho ら 1992c）を利用する Furusho ら（1990b）の方法に準じた。

H. bulbosum は、cb2920 の株わけを 6 月下旬に行い、1/5000 ワグネルポット 40 ポットで増殖を行った。活着するまでは日陰で養成し、活着後は日なたで液肥を適宜与えながら養成した。12 月中旬から 2 月にかけて交配用の花粉を得ることを目的に、9 月上旬から 5 ポ

ットずつ1週間おきに人工気象室で5℃、8時間日長で8週間の春化处理を行った後、15℃以上で24時間照明の温室内で開花まで養成した。

半数体を作成するため材料養成は、縞系6とlk2とを交配して得たF1種子を9月20日にプランターに播種し、12月以降は15℃以上で24時間照明の温室で養成した。除雄を止め葉より穂が抽出する頃に行い、除雄した穂が自然交雑しないようにポリエチレン袋で被覆した。除雄から3～4日後に*H. bulbosum*との交配を行い、交配後直ちに第2節間で切断して穂を切花延命剤入りの水に挿し、25℃、18時間日長下で維持した。なお、交配翌日に胚の肥大を促進させるためにGA3(75ppm)を穂に噴霧した。交配11日後に胚をクリーンベンチ内で無菌的に摘出し、B5培地に置床して暗所25℃で培養した。発芽後は12時間日長、暗：20℃、明：25℃条件にして培養した。こうして得られた2～3葉期の植物体を、砂：土：バーミキュライト＝1：1：1の床土のポリポットに移植して約1ヶ月栽培し、半数体を得た。半数体の幼植物の根を0.05%のコルヒチン溶液に20℃、5時間浸漬させる倍加処理を行い半数体倍加系統を得た(第4～7図)。

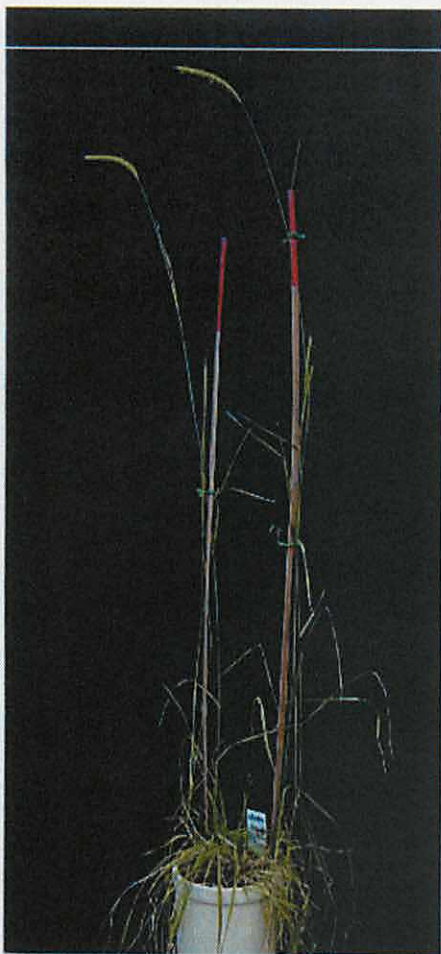
受粉穎花数、幼胚着生数、半数体作出数、半数体倍加処理数、半数体倍加系統数作出数を調査し、半数体倍加系統を効率的に作出する方法を検討した。



第4図 オオムギ縞萎縮病抵抗性品種「縞系6」と罹病性品種「lk2」。

上図左側2穂と下図左側10粒；裸性六条大麦の縞系6。

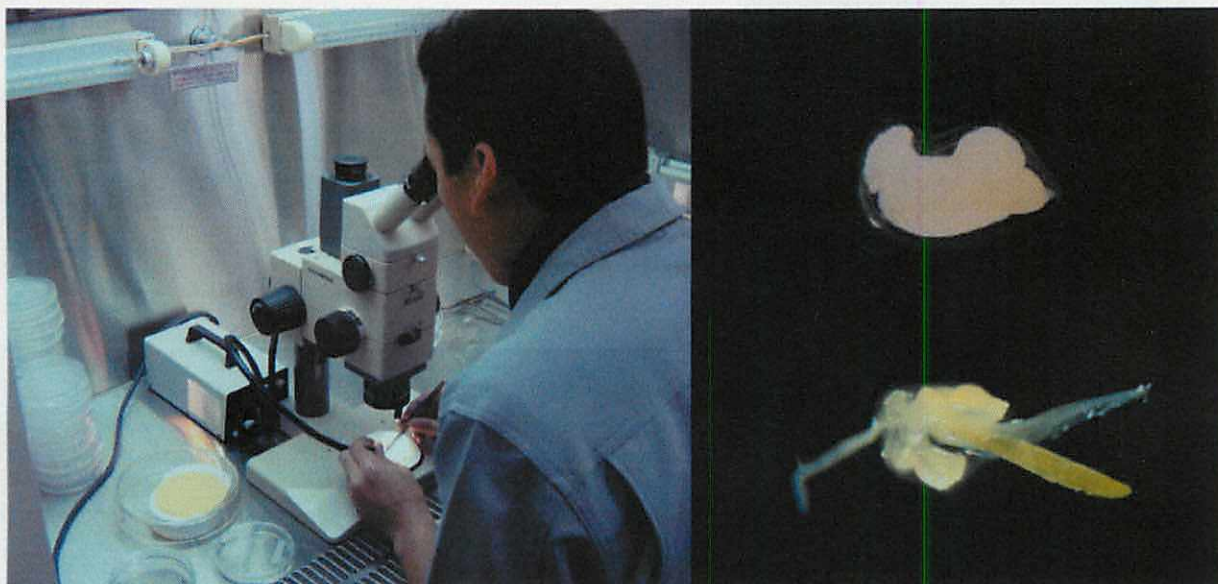
上図右側2穂と下図右側10粒；皮性二条大麦品種のlk2。



第5図 *H.bulbosum* の株と穂.



第6図 除雄した大麦の小穂へ *H.bulbosum* を受粉.



第7図 胚の置床と再分化.

左図；無菌条件下で胚を置床. 右上図；置床直後の胚.
右下図；培養7日後.

第11表 *bulbosum* 法による大麦幼胚着生率，半数体作出率，半数体倍加
処理率および半数体倍加系統作出.

年度	受粉額	幼胚着生		半数体作出		半数体倍加 処 理		半数体倍加 系統作出	
	花数 (a)	数 (b)	b/a%	数 (c)	c/a %	数 (d)	d/a%	数 (e)	e/a%
1996	929	502	54.0	134	14.3	100	10.8	34	3.7
1997	775	324	41.8	138	17.8	125	16.1	56	7.2
1999	605	142	23.5	43	7.1	43	7.1	13	2.1
合計	2309	968	41.9	315	13.6	268	11.6	103	4.5

結果と考察

第11表に、縞系6とlk2由来のF1と*H.bulbosum*との受粉額花数，幼胚着生数，半数体作出数，半数体倍加処理数，半数体作出数および受粉額花数に対するそれぞれの作出率を示した. 受粉額花数に対する幼胚着生率では，1996年，1997年および1999年でそれぞれ54.0%，41.8%および23.5%であり，平均41.9%であった. 1999年の受粉額花数に対する幼胚着生率が他の年次に比べてかなり低かった. この原因は，生育中のハウス内の低温が原因と考えられる出穂の遅延により，交配時期に野生オオムギの花粉が十分得られず，受粉の作業精度が低くなったためと考えられた. 半数体倍加系統の作出率を高位安定化するには，交配時期に十分量の花粉を得ることが重要である. そのため対策として，交配に最適

な時期に出穂するように最低気温が 15℃以上に維持と管理ができる環境を整える必要がある。受粉穎花数に対する半数体作出率では、1996 年、1997 年および 1999 年でそれぞれ 14.3 %、17.8 %および 7.1 %、平均 13.6 %であった。この結果は、Furusho ら (1990b) が行った二条オオムギ品種 3 組合せの F1 を用いた結果の 12.1 ~ 23.9 %に比較して同等かやや低い結果であった。半数体の作出率に差を生じる原因としては、交配時の温度および作業の熟練度 (古庄ら 1987) の他に、オオムギ品種と *H.bulbosum* との交配親和性の差 (Devaux ら 1990, Furusho ら 1990b)、胚培養におけるカルス生長量や不定芽再分化率を高める遺伝子の存在 (Komatsuda ら 1991, Mano ら 1996) などが報告されている。本実験では、1999 年度の半数体作出率が低下したが、これは受粉作業の精度低下が主な原因であり上記の生物学的な要因の影響は小さかったと考えられる。半数体倍加系統作出率は、受粉穎花数に対して 1996 年、1997 年および 1999 年でそれぞれ 3.7 %、7.2 %および 2.1 %で、平均 4.5 %であった。

半数体倍加系統の作出を 3 年間行った結果、2309 の受粉穎花数に対して 103 系統の半数体倍加系統が得られ、その作出率は 4.5 %であった。この値は稲の薬培養における、全置床薬数に対する得られた倍化半数体数の割合の 3 カ年平均値の 2.4 % (大里ら 1999) よりも高い値であり、*bulbosum* 法が優れた方法であることを示した。

2. 半数体倍加系統群の遺伝子型と分離比

本節では、前節で作製した半数体倍加系統群について、劣性の単一遺伝子 *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性検定を行い、抵抗性系統と感受性系統の分離比が、1:1 のメンデル分離比になるか検定した。検定結果の分離比に歪みがなければ、材料に分離比を乱す生物学的な要因はなく、形質評価の誤り (鵜飼 2000) はなかったと判断できる。*rym7t* は 7H 染色体上の皮裸性および長短芒性と連鎖関係が認められる (福岡ら 1991, 古庄・福岡 1997) ことから、7H 染色体上に座乗する形態マーカーは、*rym7t* の座乗位置を解明する連鎖解析に利用できる。そこで、半数体倍加系統の由来となる縞系 6 と lk2 で表現型が異なり、半数体倍加系統群で分離が認められる 7H 染色体上の形態マーカーであるモチウルチ性 (Klamer and Blander 1961)、皮裸性 (Kikuchi 2003) および長短芒性 (武田ら 2004) についても形質評価を行いメンデル分離比になるか調査した。7H 染色体以外の形態マーカーである条性についても、同様にメンデル分離比になるか調査した。

材料と方法

(1) オオムギ縞萎縮病

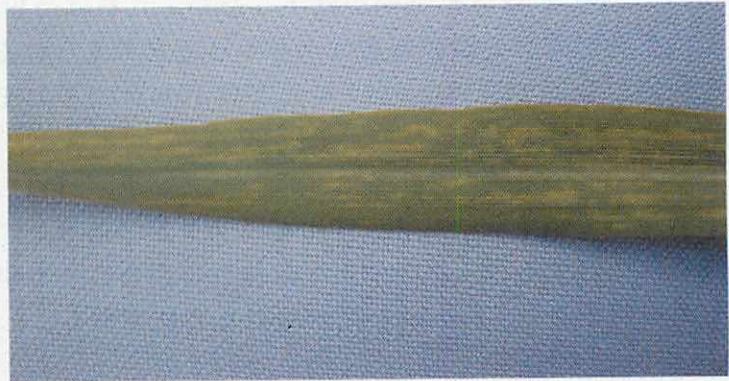
オオムギ縞萎縮病 (第 8 図) 抵抗性の判定は、発芽やその後の生育が不良であった系統を除いた 95 の半数体倍加系統について、I 型ウイルスに汚染された福岡県筑紫野市萩原の現地農家圃場で 1997 年、1998 年および 2001 年に行った。最終的に発病程度の判定が困難であった半数体倍加系統は、ELISA 検定 (高橋 1988) を行って判定した。

(2) モチ、ウルチ性とその他の形態的特性

7H 染色体上に座乗する *wax* の形質発現が、半数体倍加系統群の由来となる縞系 6 はモチ性、lk2 はウルチ性と異なるので、半数体倍加系統群についても調査した (第 9 図)。材料は、福岡県農業総合試験場場内のウイルスに汚染されていない圃場で 1999 年に栽培して得た種子 30 粒を、直径約 2mm になるまでパーレスト (株) ケット科学研究所製) で

とう精したものを用いた。

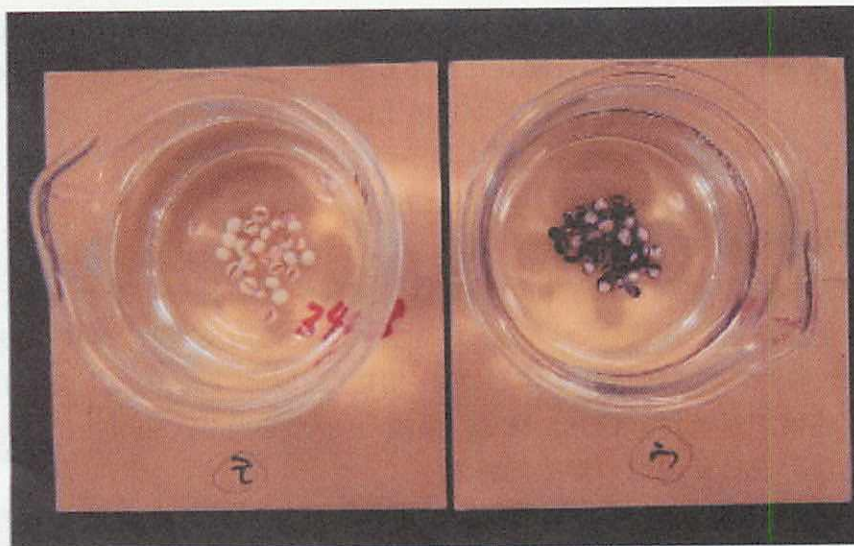
とう精後の種子を沃素：沃素カリ：水＝1：2：3000 の溶液 25mL に 30 分浸漬後、水で 3 回すすぎ、100mL の水に 3 時間浸漬後の種子の色をビーカーの真上から観察した（第 9 図）。種子が脱色して白くなった系統をモチ性、青色のままのものをウルチ性と判定した。栽培期間中に、半数体倍加系統の長短芒性および皮裸性の調査も行った（第 9 図）。



第 8 図 オオムギ縞萎縮病の症状と病斑。

左図；手前左列が健全な株，手前中列と右列が罹病して萎縮した株。

右図；罹病した葉身．緑黄色のかすり状の斑点が現れる．



第 9 図 ヨード・ヨードカリ反応による wax（モチ，ウルチ性）の検定。

左側：wax 遺伝子由来の表現型がモチ性（縞系 6 型）の系統。

右側：wax 遺伝子由来の表現型がウルチ性（lk2 型）の系統。

(3) DNA マーカーによる遺伝子型

オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* の染色体上の座乗位置を明らかにするため、連鎖地図の作製を以下のように行った。まず、縞系 6 と Ik2 間で DNA マーカーの検出を行った。DNA マーカーの検出には、*rym7t* が 7H 染色体上の形態マーカーの皮裸性および長短芒性と連鎖している（古庄・福岡 1997）ことから、位置情報がある SSR のプライマー組合せ（Ramsay ら 2000）と STS プライマーの組合せ（Blake ら 1996, Mano ら 1999）から、7H 染色体に位置するプライマーの組合せを用いた。SSR 分析および STS プライマーを用いた CAPS 分析は第 2 章の方法に準じた。ただし、SSR 分析では DNA 多型の検出精度を上げるため、アガロースゲルより PCR 増幅産物長のわずかな差を検出できる 11.3 % ポリアクリルアミドゲルを作成して 400V の電圧で 150 分間電気泳動を行った。

縞系 6 と Ik2 間の DNA マーカーは、これらの交配 F1 由来の半数体倍加系統 94 系統について、遺伝子型を調査し、遺伝子型の分離比が半数体倍加系統におけるメンデル分離比の 1:1 に適合するかカイ二乗検定を行った。

結果

オオムギ縞萎縮病やその他の形質に対する半数体倍加系統群の抵抗性と感受性の分離比を第 12 表に示す。作出した 103 系統のうち出芽やその後の生育が不良であった 8 系統を除いた 95 系統中、抵抗性が 48 系統、感受性が 47 系統で、半数体倍加系統におけるメンデル分離比の 1:1 に適合した。

形態マーカーの半数体倍加系統群における分離比についても、条性では六条：二条 = 49 系統：46 系統、皮裸性では裸性：皮性 = 46 系統：49 系統、モチウルチ性ではウルチ性：モチ性 = 47 系統：48 系統、長短芒性では長芒：短芒 = 50：45 で、いずれもメンデル分離比の 1:1 に適合した。

第 12 表 半数体倍加系統群におけるオオムギ縞萎縮病抵抗性およびその他の表現型分離。

形態の項目	調査 系統数	表現型	系統数	χ^2 値 (1:1)	P
		縞系 6 型 : Ik2 型	縞系 6 型 : Ik2 型		
オオムギ縞萎縮病 (I 型)	95	抵抗性 : 感受性	48 : 47	0.011 ^{ns}	0.90<
条性	95	六条 : 二条	49 : 46	0.095 ^{ns}	0.70-0.80
皮裸性	95	裸性 : 皮性	46 : 49	0.095 ^{ns}	0.70-0.80
モチウルチ性	94	モチ性 : ウルチ性	48 : 46	0.043 ^{ns}	0.80-0.90
長短芒性	95	長芒 : 短芒	50 : 45	0.263 ^{ns}	0.50-0.70

** ; 自由度 1 では $\chi^2(0.05) = 3.84$ であり、すべて $P < 3.84$ であることから帰無仮説が採択される。すなわち、調査した形質の分離比は期待分離比 1:1 に適合しないとはいえない。

DNA マーカーは、SSR 分析と CAPS 分析の結果、*rym7t* の連鎖解析に利用できる SSR マーカー 13 種類および CAPS マーカー 17 種類の合計 30 種類を選定できた（第 13 表）。調査

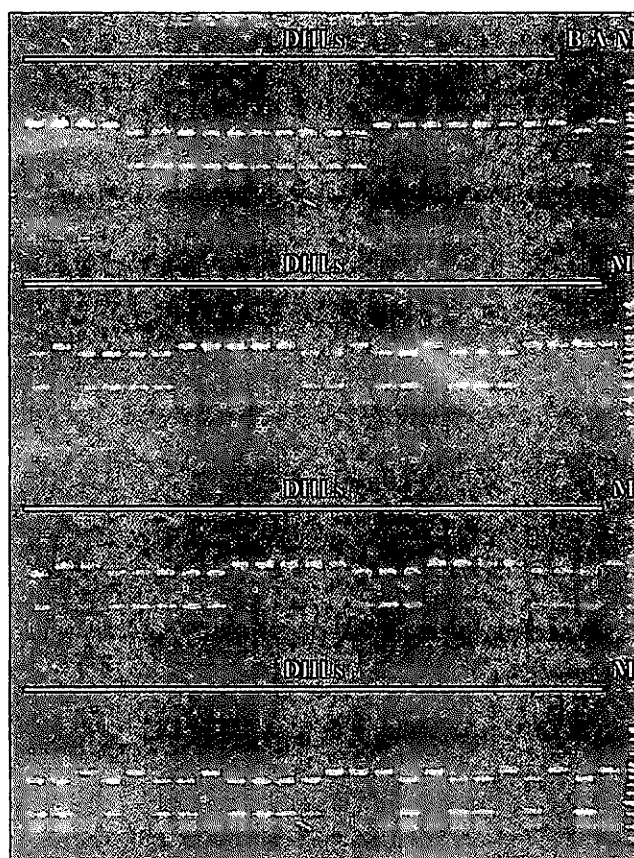
したプライマー数に対して DNA 多型を検出した頻度は、SSR 分析で 22.0 %，CAPS 分析で 36.2 %で、第 2 章で行った国内二条大麦品種間（内村 2004）に比べてかなり高かった。選定した 30 種類の DNA マーカーにおける半数体倍加系統の遺伝子型は、SSR マーカーと CAPS マーカーはヘテロ型を検出できる供優性マーカーであるが、すべてホモ型でヘテロ型は全く検出されなかった（第 10 図）。遺伝子型の分離比は、29 種類の DNA マーカーにおいてメンデルの期待分離比である 1 : 0 : 1（縞系 6 型 : ヘテロ型 : lk2 型）に適合した（第 13 表、第 10 図）。

第 13 表 分子マーカーの選定.

分析方法 ¹⁾	調査した プライマー の種類 (a)	DNA 多型		半数体倍加系統群 の遺伝子型分離比 が 1 : 1 に適合した 分子マーカー数 ²⁾
		検出数 (b)	検出率 (b/a%)	
SSR	59	13	22.0	12
CAPS	47	17	36.2	17

1) 分析方法是第 2 章に準じた。

2) 縞系 6 と lk2 交配 F1 由来の 94 の半数体倍加系統の遺伝子型を調査し、カイ二乗検定を有意水準 5 %で行った結果。



第 10 図 CAPS マーカーにおけるオオムギ半数体倍加系統の遺伝子型の調査.

M ; サイズマーカー (100bp Ladder), A ; 縞系 6, B ; lk2,
DHLs ; 半数体倍加系統.

考察

DNA マーカーの選定において、縞系 6 と 1k2 間の DNA 多型検出率は、第 2 節の国内二条大麦品種間より高かった。この原因として、これらの品種間の近縁係数が 0 であり、裸性の六条大麦と皮性の二条大麦という形態の違いからみて、両品種間の遺伝的多様性が比較的大きかったことが考えられる。また、SSR 分析においては、分画能力の高いポリアクリルアミドゲルを用いたことで、わずかな差の DNA 多型を検出できたためと考えられた。

供試した半数体倍加系統は、今回選定した DNA マーカーからみて、完全なホモ接合体で遺伝的に固定した系統であった。そのため、劣性遺伝子である *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性やモチウルチ性が表現型を観察することで判別可能であった。また、同一の遺伝子構成を持つ材料として維持と増殖が容易で、本節で実施したさまざまな形質評価や分析用の材料を十分量確保することができた。これは分析用材料を大量に要する麦芽品質や、環境の影響により変異しやすく反復調査の必要な被害粒の発生程度（馬場ら 1998）などの形質評価を行う材料として適すると考えられる。また、遺伝的に固定した材料は、異なる環境下で栽培して何度も形質評価を行って、環境による変異の影響を小さくした精度の高いデータを得ることができる点で優れる（金谷ら 1998）。精度の高いデータは QTL の検出力を高めることができる（Lander and Botstein 1989, 鵜飼 2000）。本節で半数体倍加系統のオオムギ縞萎縮病検定を 3 年間実施して得た耐病性のデータは、再現性が認められ、抵抗性と感受性の系統数が 1:1 のメンデル分離比に適合した。また本節で評価した形質や DNA マーカーにおける遺伝子型もメンデル分離比に適合した。分離比に歪みがある場合は、形質の誤分類などの実験上のミスや生物学的要因を検討する必要がある（鵜飼 2000）が、今回の形質と DNA マーカーによる遺伝子型の評価は正確であったと判断した。また、胚着生率からみた *H.bulbosum* との交配親和性の差（Furusho ら 1990b）、胚培養におけるカルス生長量や不定芽再分化率に差を生じる遺伝子（Thompson ら 1991, Komatsuda ら 1991, 小松田ら 1992, 小西ら 1994, Mano ら 1996）およびコルヒチン処理による倍数化における適性に関して、今回の調査した染色体領域は分離比を歪める特異的な生物学的要因との連鎖がなかったことが示された。

育種選抜に利用できる DNA マーカー開発のための遺伝解析に用いる半数体倍加系統数を検討した。遺伝解析材料の規模は、ふつう 100 ~ 200 であり（鵜飼 2000）、90 ~ 200 の個体や系統を供試した報告が多い（矢野・春島 1994, Mano ら 1996, 金谷ら 1998, 岩佐ら 1999, 小山内ら 1999, Mano ら 1999, 佐藤ら 1999, Miyazaki ら 2001, Kai ら 2003, 武田ら 2004, 和田ら 2004）。今回、94 の半数体倍加系統を調査した結果、オオムギ縞萎縮病などの形態マーカーや DNA マーカーにおける遺伝子型の分離比は、メンデル分離比に適合して歪みはなかった。遺伝解析に供試する半数体倍加系統数は、多い方が遺伝子の精密な座乗位置の解析を可能にするが、多大な労力と経費を要し、形質評価の精度が低下する恐れがある。遺伝解析の研究で重要なのは、対象となる形質を高い精度で評価することである（矢野・春島 1994）。これらのことから、DNA マーカー開発のための遺伝解析は、今回作出した 94 の半数体倍加系統が妥当であると判断した。

半数体倍加系統を約 100 作出するためには、本結果（第 11 表）から約 2200 程度の穎花への交配が必要と推定される。半数体倍加系統を作出した実績から、必要な期間と労力を検討した。福岡県農業総合試験場の麦類育種チームにおいて、4 名の研究員が 1 ~ 2 ヶ月間で約 8500 ~ 15000 の穎花に交配を行い、1 年間で半数体倍加系統を約 270 ~ 400 以上作出した（2000 年 ~ 2002 年の実績）。そのため約 100 の半数体倍加系統の作出は、若干名の

研究員で1年間交配と培養を行うことで十分可能であると考えられた。

なお、古庄ら（1988, 1990a）は、半数体倍加系統より早い世代の半数体において、オオムギ縞萎縮病抵抗性やうどんこ病抵抗性の評価を行い、通常の交雑育種と比べて早い世代での選抜が可能であるとしている。これらの耐病性に関する遺伝子の有無を判別できるDNA マーカーの開発は、半数体の幼植物の数 mg の葉から抽出した DNA により抵抗性個体の判別を可能にする。そのため、DNA マーカーによる選抜は、半数体の幼植物をウイルスで均一に汚染された環境条件下に維持管理して行う耐病性検定に比較して、抵抗性個体を効率的に高い精度の選抜を可能にすると考えられる。選抜した個体は速やかにコルヒチン処理を行うことで固定系統として生産力検定ができる（古庄ら 1990a）。このように、半数体倍加系統は、効率的に短期間で育種選抜できる点においても優れている。

まとめ

育種選抜に利用できる有用遺伝子に連鎖した DNA マーカーを開発する目的で、遺伝解析の材料として、徳島モチ裸由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性品種縞系 6 とオオムギ縞萎縮病罹病性品種 1k2 の F1 に野生大麦 *H. bulbosum* の cb2920 を交配して得た胚を培養しコルヒチン処理をして、半数体倍加系統を作出した。半数体倍加系統群の作出率は、*H. bulbosum* を受粉した F1 の穎花数に対して、2.1～7.2%であった。

半数体倍加系統群 95 系統のオオムギ縞萎縮病（I 型）に対する表現型は、抵抗性 48 系統と感受性 47 系統であり、メンデル分離比 1:1 に適合した。また、連鎖分析に利用するために選定した DNA マーカーで検出した遺伝子型は、すべてホモ型でヘテロ型は全く検出されず、29 種類の DNA マーカーがメンデル分離比 1:1 に適合した。

半数体倍加系統群は遺伝解析の材料として、以下の点で優れた。完全なホモ接合体であるため劣性遺伝子の形質の評価が可能であり、ヘテロ型が判定できない優性マーカーが有効に使えた。同一の遺伝子構成の材料として維持・増殖が容易にできるため、分析用の材料を十分量確保することが可能で、異なる環境下で何度も栽培して形質評価ができ、形質の評価の信頼性を高めることができた。

第5章 育種選抜に利用できる DNA マーカーの開発

古庄ら (1988, 1990a) は, DNA マーカーを利用して幼植物から葉を採取してオオムギ縞萎縮病やうどんこ病抵抗性遺伝子の有無を調査する方法が確立できれば, 半数体倍加系統以前の半数体の世代において効率的な選抜が可能としている. また, DNA マーカーを利用したオオムギ縞萎縮病抵抗性品種の選抜は, ウイルスで均一に汚染された環境条件を維持, 管理する労力が必要なく, 効率的かつ精度の高い選抜ができると考えられる.

前章で *rym7t* 遺伝子と同じ染色体上にある DNA マーカーと形態マーカーを選定した. 本節では, *rym7t* を有する個体の育種選抜に利用価値が高い DNA マーカーの開発を目的として, *rym7t* 遺伝子領域を狙って, バルク法 (Michelmore ら 1991) による DNA マーカーの作出を試みようとした. バルク分析で作出した DNA マーカーは, 前章で作製した半数体倍加系統群の遺伝子型を調査し, オオムギ縞萎縮病抵抗性, 形態マーカーおよび DNA マーカーのデータとともに, 連鎖解析を行って連鎖地図の作成しようとした. 作製した連鎖地図を基に *rym7t* の最も近傍に連鎖する DNA マーカーを選定しようとした.

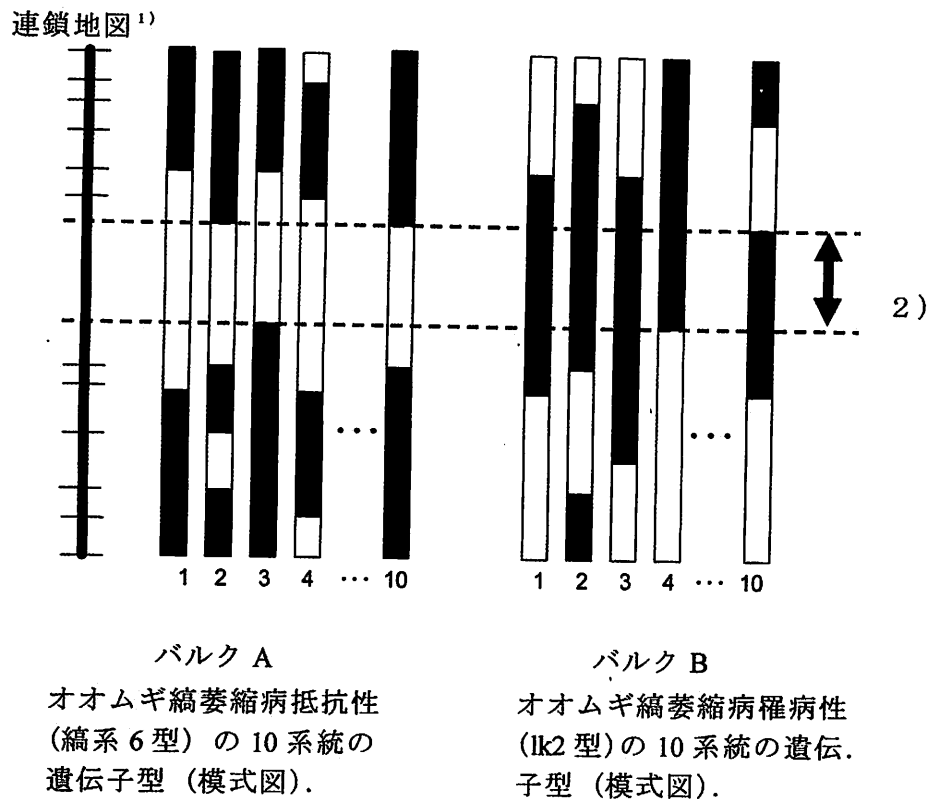
選定した *rym7t* 遺伝子の最も近傍の DNA マーカーは, 半数体倍加系統群の遺伝子型とオオムギ縞萎縮病抵抗性の表現型との一致程度を調査して選抜精度を明らかにし, 育種選抜への利用の有効性を明らかにしようとした.

1. バルク分析

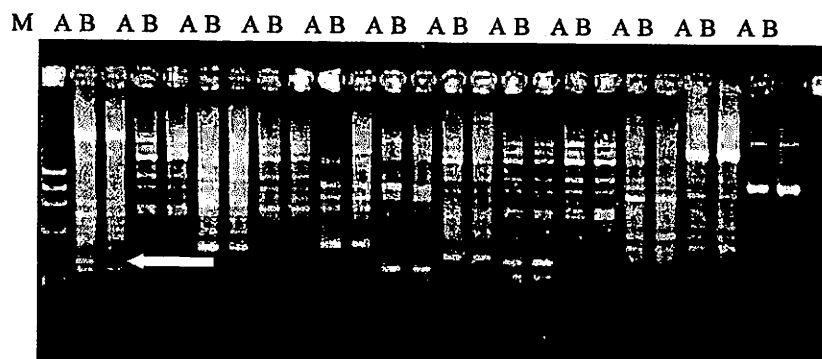
育種選抜への利用を目的とする DNA マーカーは, 選抜対象となる遺伝子の有無を高精度に判別するために, 目的の遺伝子上またはその遺伝子の両側の可能な限り近傍に作出する必要がある. オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* を有する個体の育種選抜に利用価値が高い DNA マーカーを開発する目的で, 前章では *rym7t* と同じ染色体上に座乗する DNA マーカーと形態マーカーを得た. 本章ではさらに *rym7t* 近傍の領域を狙って, バルク法 (Michelmore ら 1991) により DNA マーカーの作出を図ろうとした. バルク法とは, 目的の遺伝子の表現型または遺伝子型が分離している集団をその表現型またはその周辺の DNA マーカーにおける遺伝子型で 2 つのグループに分けて, これらの 2 つのグループの DNA 混合溶液を鋳型にして DNA の多型を検出する方法である (第 11 図). 2 つのグループの DNA 混合溶液間で, 目的の遺伝子周辺では遺伝子型が異なり, それ以外の領域では 2 つの遺伝子型が混ざり合った状態となる. そのため, 目的の遺伝子周辺に由来する DNA 多型が選択的に検出できる方法である.

材料と方法

解析材料は, 前章で作製した縞系 6 と lk2 交配 F1 由来の半数体倍加系統を供試した. オオムギ縞萎縮病に対して, 抵抗性を示す 10 系統の DNA を等量ずつ混合して最終濃度が $20\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ の DNA 混合溶液を作製した. 一方で, 罹病性を示す 10 系統を DNA を等量ずつ混合して最終濃度が $20\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ の DNA 混合溶液も作製した. これらの DNA 混合溶液間における DNA 多型の検出を, 第 2 章の RAPD 分析に準じて行った. ただし, プライマーは, 第 2 章のものとオペロン社の 10 塩基のランダムプライマーのなかから, 1 種類または 2 種類を混合したのものを PCR 反応に用いた. 2 種類を混合する場合は, プライマーの量を 1 種類の場合の半量ずつとして, 総量は 1 種類の場合と同じ量にした. DNA 多型



- 1) バルク分析は、連鎖地図がなくとも可能である。遺伝解析を行う目的形質の表現型で系統を分けてそれぞれの DNA 混合溶液を作成することで、目的の遺伝子およびその近傍の DNA 多型のみを選択的に検出できる。
- 2) オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym71* とその近傍の遺伝子型がバルク A とバルク B 間で異なり、バルク間で DNA の多型が検出できる領域 (図中の 2))。それ以外の領域では、両親由来の遺伝子型が検出されるため、DNA 多型は検出されない。



M; サイズマーカー (ϕ X174HaeIII).

A; バルク A のオオムギ縞萎縮病抵抗性系統群の混合 DNA 溶液.

B; バルク B のオオムギ縞萎縮病罹病性系統群の混合 DNA 溶液.

プライマーの種類は 2 レーンごとに異なっている.

白い矢印はバルク DNA 間で検出した多型.

第 11 図 バルク分析と多型の検出.

を検出したプライマーは、DNA マーカーの再現性と半数体倍加系統群の遺伝子型を調査し、オオムギ縞萎縮病抵抗性の観察評価と高い精度で一致するか調査を行って、いずれも良好な結果を示したものを選定した。選定した DNA マーカーにおける半数体倍加系統の遺伝子型の分離比が、メンデル分離比になるかカイ二乗検定も行った。

結果

第 14 表にオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* を目標としたバルク分析による多型検出数と検出率を示した。まず、3240 種類のプライマー組合せによる多型検出を行い、再現性があり 22 の半数体倍加系統のオオムギ縞萎縮病抵抗性の表現型と 80 % 以上の一致があった（欠測は除く）4 種類の RAPD マーカーを選定した。これらの RAPD マーカーの検出率は調査したプライマー数に対して 0.12 % であった。さらに DNA 混合溶液にする半数体倍加系統を一部変更して新たなバルクを作製し、768 種類のプライマーを用いて調査を行った。その結果、上記と同様の条件により 3 種類の RAPD マーカーを選定した。これらの RAPD マーカーの検出率は調査したプライマー数に対して 1.43 % であった。これらの 7 つの RAPD マーカーにおける半数体倍加系統群の遺伝子型を調査した結果、すべて 1 : 1 のメンデル分離比になった（第 14 表）。

第 14 表 バルク法による *rym7t* 遺伝子近傍の DNA マーカーの検出。

バルク分析 ¹⁾	調査した プライマー の種類 (a)	多型を検出した プライマー 数 ²⁾ 、頻度%		7H 染色体連鎖地図 上に位置づけできた RAPD マーカー数 ³⁾
I	3240	4	0.09	3
II	768	3	1.43	3
合計 (I + II)	4008	7	0.15	6

1) I と II では、バルク化 (DNA を混合) した系統が異なる。

2) 再現性があり、任意の半数体倍加 22 系統において *rym7t* の表現型と DNA マーカーにおける遺伝子型が 80 % 以上一致（欠測除く）し、*rym7t* 遺伝子との連鎖が期待できるもの。

3) 次節の連鎖解析の結果（第 12 図）。

考察

バルク法は、特定の単一の質的遺伝子の近傍にマーカーを作成する方法で (Michelmore ら 1991)、部分置換系統 (Kubo ら 2002) や準同質遺伝子系統など作出する必要が無く、連鎖地図や塩基配列情報が無くても 1 つの遺伝子由来の分離が認められる集団があればよく、短期間で狙った DNA 領域に DNA マーカーを集中して作成することができる点で優れる方法である。本節では *rym7t* のと連鎖する可能性が高い 7 種類の RAPD マーカーが作出できた。これらの RAPD マーカーと *rym7t* の連鎖解析は次節で行う。また、バルク法では、解析材料の DNA にヘテロ型の領域があると、ヘテロ型を含むグループ側の由来の DNA 多

型のみしか検出できなくなるため多型の検出効率が半分に低下する。本節では前章で作製したホモ接合体の半数体倍加系統を用いたため、パルク化する系統の適切な選定と効率的な DNA 多型の検出ができた。

2. 連鎖地図の作製

本節では、オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* を有する品種を効率的に選抜できる DNA マーカーを開発するため、前節までに得た形態マーカーと DNA マーカーにおける半数体倍加系統の表現型と遺伝子型のデータを基にして組換え価を算出して連鎖地図を作成し、*rym7t* 遺伝子の最も近傍に連鎖する DNA マーカーを明らかにしようとした。

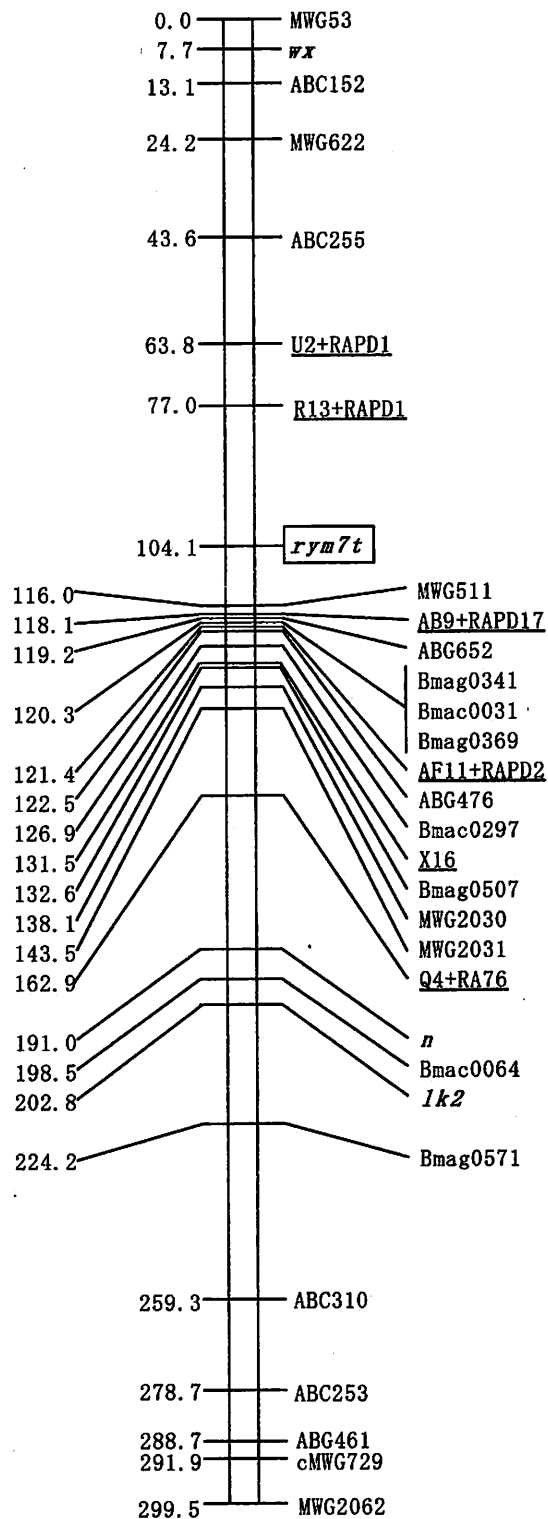
材料と方法

rym7t 遺伝子との連鎖解析は、前節までに得られた 3 つの形態マーカーと 37 の DNA マーカーによる半数体倍加系統群の表現型または遺伝子型を調査したものを用いた。これらのデータを縞系 6 由来の表現型および遺伝子型を 1、1k2 由来のものを 2 として MAPL98 (鶴飼ら 1995) に入力して、連鎖解析を行い連鎖地図の作成を試みた。なお、Bmag0571 と ABC310 の DNA マーカー間は、UKcropnet (<http://ukcrop.net>) や岡山大学資源生物科学研究所 (<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/barley/index.sjis.html>) などホームページに公開されている他の品種を材料にした連鎖地図で、これらの DNA マーカーの座乗位置がいずれも同じ位置関係であったため、これらの DNA マーカー間の組換え価を計算して 1 群に連なった連鎖地図にしようとした。

結果と考察

MAPL98 による連鎖解析と Bmag0571 と ABC310 間の組換え価の算出により、オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t*、3 つの形態マーカーおよび 27 の DNA マーカーによる 299.5cM の連鎖地図を作成できた (第 12 図)。前節のパルク分析によって得た RAPD マーカーは、7 種類のうち 6 種類の RAPD マーカーが 7H 染色体上の *rym7t* 周辺に位置づけできた。特にパルク分析で得た R13+RAPD1 は、*rym7t* の短腕側の最も近傍に位置づけできた。のこり 1 種類の RAPD マーカーが連鎖しなかったのは、前節でオオムギ縞萎縮病に対する表現型との一致程度を調査した半数体倍加系統 22 系統以外において、DNA マーカーにおける遺伝子型が、オオムギ縞萎縮病に対する表現型と一致しないものが多かったためである。連鎖地図において、DNA マーカーが密集する領域が *rym7t* より長腕側の 116.0cM から 143.5cM 間に認められた。この密集した領域では DNA マーカーの連鎖地図上の相対的な位置関係は、一部 UKcropnet (<http://ukcrop.net>) や岡山大学資源生物科学研究所 (<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/barley/index.sjis.html>) など公開されている他の解析材料の連鎖地図とは異なる部分が認められた。しかし、作成した連鎖地図は、全体的にみて既知の連鎖地図の DNA マーカーの位置情報とほぼ一致し、7H 染色体のほとんどをカバーするものであった。

rym7t を有する個体の選抜に利用価値が高い DNA マーカーを開発する目的で、*rym7t* の両側の最も近傍で連鎖する DNA マーカーとして R13+RAPD1 と MWG511 を選定した。R13+RAPD1 は *rym7t* から 7H 染色体短腕側に 27.1cM で連鎖する RAPD マーカーである。MWG511 は *rym7t* から 7H 長腕側に 11.9cM で連鎖する CAPS マーカーである。



第 12 図 オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 (*rym7t*) と DNA マーカーおよび形態マーカーによる 7H 染色体の連鎖地図。

n ; 皮裸性, *lk2* ; 長短芒性, *wx* ; waxy 遺伝子 (モチ・ウルチ).
下線のある DNA マーカーは, バルク分析により得られた RAPD マーカー.

3. DNA マーカーによる選抜の有効性

前節でオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* の両側に最も近傍で連鎖する DNA マーカーの R13+RAPD1 と MWG511 を選定した。これらは、連鎖解析により計算上位置づけされたものである。そこで本節では、これらの DNA マーカーにおける遺伝子型とオオムギ縞萎縮病抵抗性の判定との一致程度を確認しようとした。さらにこれらの DNA マーカーにおける選抜精度と有効性を明らかにしようとした。

材料と方法

解析材料には前章で作製した 94 の半数体倍加系統と、前節で選定したオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* の両側で最も近傍の DNA マーカーの R13+RAPD1 と MWG511 を供試した。*rym7t*, MWG511 と R13+RAPD1 における半数体倍加系統のオオムギ縞萎縮病に対する表現型と遺伝子型のデータベースを作成して分類を行った。その結果から *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病に対する表現型と両側の DNA マーカーにおける遺伝子型との一致程度を確認した。また、これらの DNA マーカーで *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性系統を選抜した場合の選抜精度を算出した。

第 15 表 DNA マーカーにおける遺伝子型とオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* 由来の表現型との一致程度。

各遺伝子座における表現型および遺伝子型 ¹⁾			系統数	系統番号 ²⁾
MWG511	<i>rym7t</i>	R13+RAPD1		
*縞系 6 型	縞系 6 型	*縞系 6 型	41	
*縞系 6 型	縞系 6 型	lk2 型	2	71, 90
lk2 型	縞系 6 型	*縞系 6 型	0	—
lk2 型	縞系 6 型	lk2 型	5	25, 41, 43, 51, 58
縞系 6 型	lk2 型	*lk2 型	0	—
縞系 6 型	lk2 型	縞系 6 型	7	1, 17, 29, 45, 46, 78, 79
*lk2 型	lk2 型	*lk2 型	35	
*lk2 型	lk2 型	縞系 6 型	4	59, 66, 69, 76
MWG511 の遺伝子型と <i>rym7t</i> の表現型が一致した系統数と頻度 (%)			82 (87.2%)	
R13+RAPD1 の遺伝子型と <i>rym7t</i> の表現型が一致した系統数と頻度 (%)			76 (80.8%)	

1) 連鎖地図上の順番で並べた。*は、DNA マーカーの遺伝子型と *rym7t* の表現型が一致していることを示す。

2) 表の遺伝子型に一致する系統の試験番号 (DH21-XX) を示す。組換えが起こっていない系統は省略した。

結果と考察

DNA マーカーの R13+RAPD1, MWG511 および *rym7t* の 3 つのマーカーにおける半数体倍加系統の遺伝子型を第 15 表に示した。MWG511 における遺伝子型と *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病に対する表現型は、94 の半数体倍加系統のうち 82 系統が一致した。この結果、MWG511 における遺伝子型で *rym7t* を有する個体の選抜を行った場合、選抜精度は約 87 %であった。一方で、R13+RAPD1 における遺伝子型と *rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病に対する表現型は、94 の半数体倍加系統のうち 76 系統が一致し、選抜精度は約 81 %であった。いずれも 80 %以上の確立で *rym7t* を有する系統を判別できることが確認できた。また、R13+RAPD1 と MWG511 の両方の遺伝子型が一致した場合で *rym7t* を有する系統を選抜した場合、94 の半数体倍加系統のうち 76 系統が一致し、選抜精度は約 81 %であった。

一方、隣接するマーカー間で遺伝子型が異なる場合、1 回の組換えが起こっていると仮定すると、これら R13+RAPD1 と *rym7t* 間と *rym7t* と MWG511 間で、いずれも組換えが起きているのが 12 系統、いずれかで 1 回起きているのが 7 系統認められた。組換えの位置からみると、R13+RAPD1 と *rym7t* 間が 18 系統、MWG511 と *rym7t* 間が 12 系統であった（第 15 表）。これらの系統は、さらに *rym7t* の近傍に連鎖する DNA マーカーを開発するため、バルク分析や戻し交配による分離集団の作成の材料として利用できる。

以上のことから、DNA マーカー MWG511 と R13+RAPD1 は、オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* に対する表現型と 80 %以上が一致し、精度の高い育種選抜に有効であることを明らかにできた。

まとめ

本章ではオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 (*rym7t*) の染色体上の座乗位置を解析して最も近傍に連鎖する DNA マーカーを選定した。さらにそれらの DNA マーカーによる *rym7t* の選抜効果を明らかにした。解析材料は、*rym7t* 由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性に明らかな差が認められ、形態の違いから第 2 章の国内二条大麦品種間より遺伝的多様性が大きいと考えられる縞系 6 と 1k2 由来の半数体倍加系統群を供試した。そのため、連鎖解析に *rym7t* と同じ 7H 染色体上に座乗する形態マーカーであるモチウルチ性、皮裸性および長短芒性が有効利用できた。また、STS マーカーや SSR マーカーは、公開されている数十程度のプライマーを用いた分析から、高頻度で DNA 多型を検出することができた。また、バルク法により染色体上の位置情報がない RAPD マーカーを *rym7t* 近傍に作出できた。これらのマーカーを用いた連鎖解析により *rym7t* の 7H 染色体上の位置を明らかにし、*rym7t* を有する系統の選抜に利用できる DNA マーカー R13+RAPD1 と MWG511 を選定した。

一方で、*rym7t* と R13+RAPD1 間で組換えが起こっている 18 系統と、*rym7t* と MWG511 間で組換えが起こっている 12 系統を明らかにした。これらの系統は、さらに *rym7t* 近傍に密接に連鎖する DNA マーカー開発のために、バルク分析や戻し交配による分離集団の作成のための材料として利用できる。

今回作出した DNA マーカーは、*rym7t* と条性の連鎖はなく（古庄 未発表）、形態マーカーに用いたモチウルチ性や皮裸性よりも *rym7t* 近傍であるため、これらの連鎖する遺伝子の有無を個々に識別して目的の形質と遺伝子のみを備えた品種を選抜することが可能である。

第6章 その他の有用農業形質に関するQTLの検出

外観品質と麦芽品質がともに優れる品種の育成において、福岡県農業総合試験場麦類育種チームの育種事業では、F4世代の約18000の穂系統をオオムギ縞萎縮病ウイルス（I型）汚染圃場に播種している。その中から早生、短強稈性、オオムギ縞萎縮病、耐湿性（浜地ら1989）およびうどんこ病抵抗性を指標として選抜し、約1900系統を収穫、脱穀後、側面裂皮粒（金谷ら1996）、凸腹粒（馬場ら2001）、剥皮の有無およびちりめんじわの多少を外観で評価し、約370系統を選抜している。このような比較的早期の一世代において、上記の指標により約1/50系統にする強い選抜を行っている。このような強い選抜を行ってきた中からこれまでに、麦芽品質が特に優れる品種ミハルゴールド（吉川ら1997）、ほうしゅん（古庄ら1999a,b）およびしゅんれい（2005年農林登録）などが育成されている。このことは、麦芽品質に関与する有用遺伝子が、選抜指標とした早生、短強稈性、オオムギ縞萎縮病、耐湿性およびうどんこ病抵抗性に関与する有用遺伝子と連鎖しているか、または選抜指標の劣悪な遺伝子と連鎖していないことを示唆している。

上記のような効率的な選抜方法の確立は、交配品種の組合せを含めて、育種家の経験と熟練した技量によるところが大きい。水稻では、良食味でいもち病に強い品種の育成は困難であることが経験的に伝えられていて、食味といもち病に関する遺伝子の劣悪な連鎖が推測されている（櫛淵・山本1989）。食味やいもち病のような農業上重要な形質の多くは、単一の主働遺伝子による支配ではなく、多くの微働遺伝子に関与する量的形質であると考えられ、雑種後代において連続的な変異を示し、メンデルの分離の法則が直接適用ができないために遺伝解析が極めて困難であった。しかし近年、QTL解析（Thoday 1961, Tanksley 1993, 鶴飼 2000）により、このような量的形質に関与する遺伝子を連鎖地図上に大まかに位置付けすることが可能になった。その結果、近年さまざまないもち病抵抗性遺伝子にそれぞれ緊密に連鎖するDNAマーカー（遠山ら1998, Fujiiら2000, Hayashiら2004）が開発される一方で、米の食味に関与する遺伝子領域の解明（和田ら2004）が進められ、いもち病に強い良食味品種の開発が進展している。後者の結果は、DNAマーカー選抜を行うための前提条件である有用形質遺伝子に連鎖するDNAマーカーの開発を促進する（矢野1996）ための貴重な情報となる。また、重要な農業形質に関与する遺伝子の数や染色体上の座乗位置を明らかにすることは、育種計画を立てる際、効率的に遺伝子の集積を行うための交配母本の組合せの選定や、目的の遺伝子型を備えた個体の出現率の統計的な算出による雑種後代の作出数の決定、連鎖する複数の有用な農業形質を1つの指標により効率的に選抜するための貴重な情報になる。

そこで本章では、二条大麦品種において重要な有用農業形質であるうどんこ病抵抗性、斑葉病抵抗性、外観品質および麦芽品質について、きぬゆたかと吉系15由来の半数体倍加系統群を供試して、これらの形質に関与する遺伝子領域を明らかにする目的で、QTL解析を行い、これらの形質に関与する遺伝子領域を推定するとともに、連鎖するDNAマーカー、QTLの相加効果と寄与率を明らかにした。

材料と方法

QTL解析の材料には、二条大麦品種のきぬゆたかと吉系15を交配したF1由来の半数体倍加系統群と55のDNAマーカー（Kaiら2003）および新たに第2章のSSR分析、RAPD

分析および CAPS 分析に準じて作出した 36 を加えた合計 91 の DNA マーカーを用いた。連鎖地図の作製と QTL 解析はコンピュータソフト MAPL98 (鵜飼ら 1995, 鵜飼 1999) により行った。QTL は LOD 値が 2.0 以上のものを連鎖地図上に示した。LOD は、最尤法による組換え価 (r) の推定における対数尤度の最大値と $r = 0.5$ での値の差を表す連鎖検定の指標で、LOD がある一定値 (閾値) を超えたとき、QTL があると判定される。LOD 値は連鎖地図が疎のとき 2.0 以上が妥当である (鵜飼 2000)。検出した QTL の染色体上の位置は、MAPL98 によりインターバルマッピング法で算出した。さらに QTL の効果を検証するため、QTL の最も近傍に位置する DNA マーカーにおける LOD 値、相加効果およびその DNA マーカーにおいて、表現型の変異を QTL で説明できる割合を併せて示した。QTL 解析を行った形質の評価方法は、以下の通りである。

1. うどんこ病

2003 年 12 月に福岡県農業総合試験場内のガラス温室内に 1 系統につき 10 粒ずつ播種し、適宜灌水して栽培した。うどんこ病抵抗性の評価は、2004 年 5 月上旬の罹病程度から行った。罹病程度の評価は、発生無しの 0、葉に小さな病斑が数個認められる 1 から葉全体を病斑が覆う 5 (発生甚) の 6 段階で評価した。

2. 斑葉病

1999 年と 2002 年の 11 月中旬に福岡県農業総合試験場内の畑に 1 系統につき 10 粒ずつ播種した。斑葉病抵抗性の評価は、いずれの年も 5 月上旬の罹病程度から行った。罹病程度の評価は、発生無しの 0、葉に小さな病斑が認められる 1 から全体的に矮化するか枯死する 5 (発生甚) の 6 段階で評価した。

3. 凸腹粒

2000 年と 2002 年の 11 月下旬に福岡県農業総合試験場内のガラス製のハウス内に 1 系統につき 10 株ずつ播種し、登熟期に 1 日に 40 ~ 50mm の人工降雨処理を 2 日間行い、2 日間中断する処理を連続 5 回行った (馬場ら 2001)。収穫物の全粒数と、種子の縦溝が裂けて中身が流出している凸腹粒数を調査した。

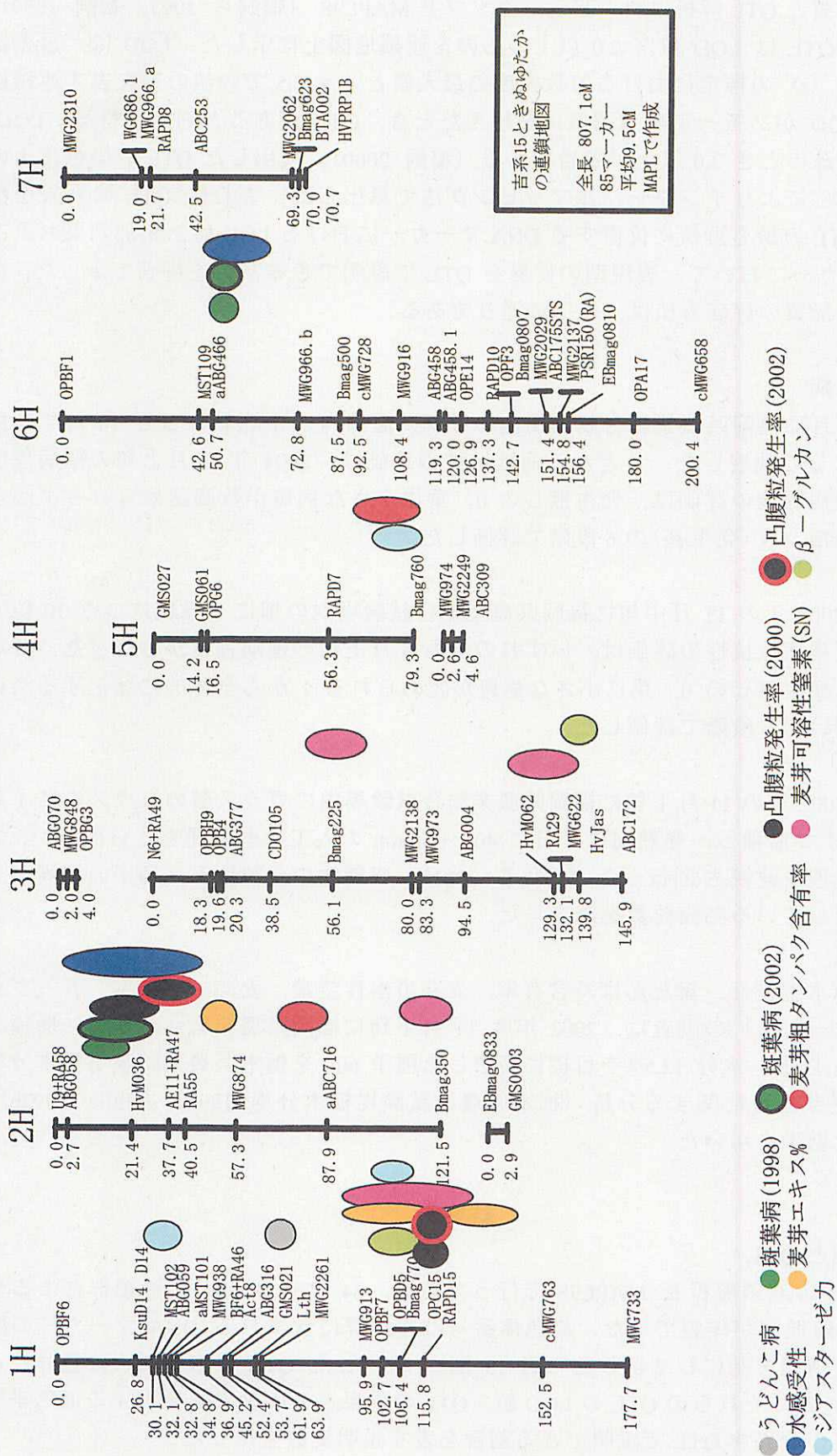
4. 麦芽品質

麦芽品質 (水感受性、粗たんばく含有率、麦芽可溶性窒素、麦芽エキス%, β -グルカン、ジアスターゼ力) の調査は、2002 年度 11 月下旬に福岡県農業総合試験場に播種し、収穫後 2.5mm 以上、水分 12.5% を目標に調整した種子 60g を栃木県農業試験場栃木分場に送付して、麦芽品質に関する分析 (栃木県農業試験場栃木分場 1998, 古庄ら 1992b) を依頼して得た結果を用いた。

結果

1. 連鎖地図と QTL

91 マーカーの連鎖解析を MAPL98 で行った結果、84 マーカーの 9 連鎖群による全長 788.1cM の連鎖地図が作製できた。染色体番号は連鎖群に含まれる DNA マーカーの既知の染色体位置情報を基にして示した (第 13 図)。検出した QTL は形質ごとに色分けして示した。第 16 表にそれらの QTL の LOD 値、QTL の効果とその効果を発現する遺伝子型、分析した形質の変異を QTL で説明できる割合を表す説明変数を示した。



第13図 吉系15ときぬゆたか交配F1由来の半数体倍加系統による麦芽品質、凸腹粒発生率、斑葉病およびうどんこ病に関するQTL。
注) 凡例の () は分析試料の播種年次を示す。

第16表 吉系15ときぬゆたか交配F1由来の半数体倍加系統によるうどんこ病, 斑葉病, 凸腹粒および麦芽品質に関するQTL解析.

形質名	第13図の QTLマーク	QTL		年度	LOD 値	DNA マーカーにおける 遺伝子型と QTL の効果 ¹⁾		説明変数 ²⁾
		座 乗 染色体	近傍の DNA マーカー			遺伝子型	効果	
うどんこ病		1H	GMS021	2003	71.09	吉系15型	-1.76	89.1
斑葉病		6H	aABG466	1999	4.34	吉系15型	-0.47	13.1
		2H	HvM036	1999	3.21	きぬゆたか型	-0.39	10.0
		6H	aABG466	2002	5.25	吉系15型	-0.59	15.4
		2H	HvM036	2002	5.30	きぬゆたか型	-0.60	16.2
凸腹粒		2H	HvM036	2000	3.88	吉系15型	-1.56	12.5
		1H	OPBD5	2000	4.07	きぬゆたか型	-1.62	11.6
		2H	RA55	2002	11.07	吉系15型	-4.79	33.0
		1H	RAPD15	2002	4.27	きぬゆたか型	-3.02	13.0
水感受性		2H 6H	AE11+RA47 aABG466	2002 2002	4.24 4.18	きぬゆたか型 吉系15型	-0.44 -0.42	13.8 12.5
祖タンパク含有率		5H 2H	Bmag760 aABC716	2002 2002	5.27 3.31	きぬゆたか型 吉系15型	0.33 0.26	15.5 9.6
麦芽可溶性窒素		2H	Bmag0350	2002	4.91	吉系15型	0.03	14.6
		3H	HvJas	2002	3.69	きぬゆたか型	0.03	11.5
		3H	Bmag0225	2002	3.70	きぬゆたか型	0.03	11.8
		1H	OPBD5	2002	2.97	きぬゆたか型	0.02	9.1
麦芽エキス%		2H 1H	MWG874 RAPD15	2002 2002	6.98 2.29	きぬゆたか型 きぬゆたか型	0.57 0.33	19.8 6.8
β-グルカン		3H 1H	HvJas OPF7	2002 2002	8.46 3.63	吉系15型 吉系15型	14.2 9.5	24.4 11.0
麦芽全窒素あたりの ジアスターゼ力		1H 5H	MWG938 Bmag760	2002 2002	14.58 2.58	吉系15型 吉系15型	16.29 7.72	36.7 7.9

1) QTL の効果; うどんこ病および斑葉病は観察評価 (0(発生無)~5(発生甚)), 凸腹粒は発生率(%), その他の形質は分析値への相加効果を示す.

2) 説明変数; 表現型の変異を QTL で説明可能な割合.

2. うどんこ病に関する QTL

1H 染色体上に遺伝子型が吉系 15 型でうどんこ病抵抗性が強くなる QTL を検出した (第 13 図). この QTL に最も近傍の DNA マーカー GMS021 の QTL の LOD 値は 71.09 で, 遺伝子型が吉系 15 型で抵抗性が向上し, 観察評価の値が 1.76 向上する効果が認められた (第 16 表).

3. 斑葉病に関する QTL

1999 年と 2002 年のデータをそれぞれ QTL 解析した結果, 2 年とも 2H と 6H 染色体上のほぼ同じ位置にそれぞれ 1 つずつの QTL を検出した (第 13 図). 6H の QTL に最も近傍の DNA マーカー aABG466 の LOD 値は 4.34 (1999 年), 5.25 (2002 年) で, 遺伝子型が吉系 15 型で抵抗性が向上し, 観察による抵抗性評価が 0.47 (1999 年), 0.59 (2002 年) 向上する効果が認められた. 2H の QTL に最も近傍の DNA マーカー HvM036 の QTL の LOD 値は 3.21 (1999 年), 5.30 (2002 年) で, 遺伝子型がきぬゆたか型で抵抗性が向上し, 観察による評価が 0.39 (1999 年), 0.60 (2002 年) 向上する効果が認められた (第 16 表).

4. 凸腹粒

2000 年と 2002 年に試験を実施し, 2 年とも 1H と 2H 染色体上のほぼ同じ位置にそれぞれ 1 つずつの QTL を検出した (第 13 図). 1H の QTL に最も近傍の DNA マーカーは 2000 年は OPBD5 で LOD 値が 4.07, 2002 年は RAPD15 で LOD 値は 4.27 で, いずれも遺伝子型がきぬゆたか型で凸腹粒の発生を軽減する効果が, 1999 年は 1.62 %, 2002 年は 3.02 % 認められた (第 16 表). 2H の QTL に最も近傍の DNA マーカーは 2000 年は HvM036 で LOD 値が 3.88, 2002 年は RA55 で LOD 値は 11.07, いずれも遺伝子型が吉系 15 型で凸腹粒の発生を軽減する効果が 2000 年は 1.56 %, 2002 年は 4.79 % 認められた (第 16 表).

5. 麦芽品質

(1) 水感受性

大麦には過剰の水で発芽が阻害される水感受性という形質があり, 水感受性が低い方が望ましい. 水感受性に関与する QTL は 2H と 6H 染色体上に 1 つずつ検出した (第 13 図). 2H の QTL の最も近傍の DNA マーカー AE11+RA47 における QTL の LOD 値は 4.24 で, 遺伝子型がきぬゆたか型で水感受性の値を 0.44 % 小さくする効果が認められた. 6H の QTL に最も近傍の DNA マーカー aABG466 における QTL の LOD 値は 4.18 で, 遺伝子型が吉系 15 型で水感受性の値を 0.42 % 小さくする効果が認められた (第 16 表).

(2) 粗タンパク質含有率

粗タンパク質含有率に関与する QTL を 5H と 2H 染色体上にそれぞれ 1 つずつ検出した (第 13 図). 5H の QTL に最も近傍の DNA マーカー Bmag760 における QTL の LOD 値は 5.27 で, 遺伝子型がきぬゆたか型で粗タンパク含有率が 0.33 % 増加する効果が認められた. 2H の QTL に最も近傍の DNA マーカー aABC716 の QTL の LOD 値は 3.31 で, 遺伝子型が吉系 15 型で粗タンパク質含有率が 0.26 % 増加する効果が認められた (第 16 表).

(3) 麦芽可溶性窒素

麦芽可溶性窒素に関与する QTL を 2H に 1 つ, 3H に 2 つおよび 1H に 1 つ検出した (第 13 図). 2H の QTL に最も近傍の DNA マーカー Bmag350 における QTL の LOD 値は 4.91 で, 遺伝子型が吉系 15 型で麦芽可溶性窒素が 0.03 % 増加する効果が認められた. 3H の QTL に最も近傍の DNA マーカー Bmag225 と HvJas の QTL の LOD 値は 3.70 と 3.69 で, いずれも遺伝子型がきぬゆたか型で麦芽可溶性窒素が 0.03 % 増加する効果が認められた. 1H の QTL 近傍の DNA マーカー OPBD5 における QTL の LOD 値は 2.97 で, 遺伝子型がきぬゆた

か型で麦芽可溶性窒素が 0.02 % 増加する効果が認められた (第 16 表)。

(4) 麦芽エキス %

麦芽エキスに関与する QTL を 2H と 1H 染色体上にそれぞれ 1 つずつ検出した (第 13 図)。2H の QTL に最も近傍の DNA マーカー MWG874 における QTL の LOD 値は 6.98 で、遺伝子型がきぬゆたか型で麦芽エキスが 0.57 % 増加する効果が認められた。1H の QTL に最も近傍の DNA マーカー RAPD15 における QTL の LOD 値は 2.29 で、遺伝子型がきぬゆたか型で麦芽エキスが 0.33 % 増加する効果が認められた (第 16 表)。

(5) β -グルカン

β -グルカンに関与する QTL を 3H と 1H 染色体上にそれぞれ 1 つずつ検出した (第 13 図)。3H の QTL に最も近傍の DNA マーカー HvJas における QTL の LOD 値は 8.46 で、遺伝子型が吉系 15 型で β -グルカン含有率が 14.2 % 高くなる効果が認められた。1H の QTL に最も近傍の DNA マーカー OPF7 の QTL の LOD 値は 3.63 で、遺伝子型が吉系 15 型で β -グルカン含有率が 11.0 % 高くなる効果が認められた (第 16 表)。

(6) 麦芽全窒素あたりのジアスターゼ力

麦芽全窒素あたりのジアスターゼ力に関与する QTL を 1H と 5H 染色体上にそれぞれ 1 つずつ検出した (第 13 図)。1H の QTL に最も近傍の DNA マーカー MWG938 における QTL の LOD 値は 14.58 で、遺伝子型が吉系 15 型で麦芽全窒素あたりのジアスターゼ力が 16.29 % 高くなる効果が認められた。5H の QTL に最も近傍の DNA マーカー OPF7 の QTL の LOD 値は 3.63 で、遺伝子型が吉系 15 型でジアスターゼ力が 7.72 % 高くなる効果が認められた (第 16 表)。

本節で検出した QTL は、説明変数からみて、調査した形質の変異に対して 24.1 ~ 89.1 % を説明できることを明らかにした (第 16 表)。

考察

前章で染色体座乗位置を明らかにしたオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* は、うどんこ病抵抗性、斑葉病および麦芽品質に関する QTL で同一染色体上の近い位置に座乗するものではなく、これらの遺伝子が集積した品種を育成することは十分可能であることが明らかにできた。

ビール大麦の麦芽品質は極めて重要な農業形質であることから、さまざまな解析材料や栽培条件による QTL 解析が多く報告されている (佐藤ら 1999, 五月女ら 1999, 小山内 1999, 大塚ら 1999, 岩佐ら 1999, 岡田ら 2002)。特にビールの生産量に関わる重要な農業形質である麦芽エキスの QTL は、本論文で 1H と 2H に検出し、佐藤ら (1999) が外国品種の交配由来の 2 種類の半数体倍加系統を北米育成地の様々な場所で栽培した材料を用いて検出した QTL とほぼ同じ位置であった。これらの結果は、麦芽エキスに関する QTL の解明と、育種事業において利用価値の高い DNA マーカーの開発を促進するために有効な情報であると考えられる。

また、本章の QTL の情報は以下のように育種へ寄与できると考えられる。本章で検出した 2H の麦芽エキスに関する効果の大きい QTL は、側面裂皮粒に関する 2H 染色体上の RA55 近傍に検出した QTL (Kai ら 2000) と比較的近傍の連鎖する位置に存在することが明らかになった。そのため、交配親の選定において、側面裂皮粒と麦芽エキスの評価がいずれも優れる品種を交配親にした場合、後代の雑種から側面裂皮粒の少ない系統を強く選

抜すると、選抜した中に側面裂皮粒に関する QTL と連鎖する麦芽エキスの多い系統が残る可能性が高く、裂皮の発生程度の観察評価により効率的な選抜を実施することができる。一方、凸腹粒と斑葉病に関する QTL は、いずれも 2H 染色体上の DNA マーカー HvM0366 近傍に検出された。これらの QTL において有用な効果を示す遺伝子型は、凸腹粒は吉系 15 型、斑葉病抵抗性はきぬゆたか型であった（第 16 表）。そのため、両方の QTL 効果を備えた系統を選抜するためには、吉系 15 ときぬゆたかの交配組合せでは、2H 染色体上の凸腹粒に関する QTL と斑葉病抵抗性に関する QTL との間の極狭い領域で組換えを起こした系統を選抜する必要がある。有望系統の育成は困難であると予想できる。そこで交配計画においてあらかじめ凸腹粒と斑葉病抵抗性の評価が優れる品種の組合せを用いる対策ができる。また、必要性が高いと判断すれば 2H 染色体上の凸腹粒と斑葉病抵抗性の QTL の有無をそれぞれ個々に識別して選抜できる DNA マーカーの開発を行い交配母本を作製して効率的に有望品種を育成することができる。さらに斑葉病抵抗性に関する QTL のように病気に対して抵抗性を示す複数の遺伝子がある場合、それらの遺伝子の集積は罹病程度の観察だけでは困難であるが、それぞれの遺伝子の有無を判別できる DNA マーカーを開発することで、遺伝子が集積した系統を効率的かつ高精度に選抜ができると考えられる。

DNA マーカーは、育種選抜を効率的に行うための極めて有効な手段の 1 つであり（井辺・吉村 1999）、本章の実験結果で明らかにした QTL の座乗位置関係や数の情報は、育種計画の際の交配母本の選定や選抜方法、選抜の際に必要性が高い DNA マーカーの効率的な開発に有効な情報となる。

まとめ

吉系 15 ときぬゆたかの交配 F1 由来の半数体倍加系統群を用いて、85 マーカーの 9 連鎖群による全長 807.1cM の連鎖地図を作製した。この半数体倍加系統を供試して、うどんこ病、斑葉病、麦芽品質に関する QTL 解析を MAPL98 により行った。その結果、うどんこ病抵抗性に関与する QTL を 1H 染色体上に 1 つ検出した。斑葉病抵抗性に関する QTL を 2H と 6H 染色体上にそれぞれ 1 つずつ検出した。凸腹粒に関与する QTL を 1H と 2H にそれぞれ 1 つずつ検出した。麦芽品質に関与する QTL を、1H、2H、3H、5H および 6H に合計 15 検出した。

これらの結果、7H 染色体上に座乗するオオムギ縮萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* に対して、うどんこ病抵抗性、斑葉病および麦芽品質に関与する QTL で同じ 7H 染色体上に検出されたものはなく、これらの遺伝子が集積した品種を育成することは十分可能であることを明らかにした。

第7章 総合考察

品種は農業上重要な役割を果たしている。形態や成分が優れる品種は、他品種とは異なる優れた働きをする遺伝子を備えている。新しい品種を育成するためには、それらの遺伝子の働きを正確に評価して、雑種から効率的かつ精度の高い選抜を行う技術を開発する必要がある。これまでの形質評価は、遺伝子の働きに気象や土壌などの環境が影響を及ぼした結果の形質の観察や成分を分析するものであり、遺伝子の効果を直接評価するのは困難であった。しかし、近年動物や植物で特定の塩基配列の断片を大量に増殖する PCR 法が開発されてからは、品種間の塩基配列の違いをこれまでより簡易に検出できるようになった。これらの品種間の DNA の違いは総称して DNA マーカーと呼ばれる。これらは、精度の高い品種の識別や育種選抜における育成系統の有用遺伝子の有無の判別など多くの場面で利用されるようになり、遺伝解析を行う上で DNA マーカーを効率的に検出することが、目的の遺伝子の同定を行い遺伝子の多様性を解明する上で重要となっている。

本論文では、国内二条大麦品種間において効率的に DNA マーカーを検出する目的で、RAPD 分析、SSR 分析および CAPS 分析による DNA 多型の検出率を比較した。その結果、CAPS 分析が RAPD 分析と SSR 分析に比較して優れ、Kai ら (2003) の結果と一致した。二条大麦品種間の DNA 多型の存在頻度について、南角ら (2002) は SNP (1 塩基置換による DNA 多型) を、国内二条大麦品種のはるな二条と野生大麦の OUH602 間ではあるが、STS プライマーで増幅した DNA 断片の塩基配列を調査し、数百塩基ごとに高頻度で検出している。本論文の CAPS 分析は、認識配列が異なる制限酵素を 16 種類供試したため、このような SNP 部分を多く検出できたと推察された。RAPD 分析と SSR 分析の DNA 多型検出率が劣った原因は、RAPD 分析では再現性が劣ったことであった。SSR 分析では、PCR 増幅産物の分画能力が低いアガロースゲルを用いたため、PCR 増幅産物長の 4bp 以下のわずかな品種間差による DNA 多型を見逃した可能性があったためと考えられた。近年、大麦で開発されている多数の EST マーカー (佐藤 私信) や塩基配列の情報や分子マーカーが最も充実している水稻とのシンテニー (相同性) を利用したさらに詳細な遺伝解析 (栗山ら 2004)、詳細な遺伝解析に利用できる多数の大麦遺伝子断片の BAC ライブラリー (Tomkins ら 2000) など、急速に大麦の遺伝解析に必要なツールが充実しつつある。本論文の結果とこれらのツールを積極的に利用して、育種に利用できるさらに実用的な DNA マーカーを開発することが望まれる。

現在、DNA マーカーを利用した品種識別が様々な作物で開発され利用されるようになった。本論文では、国内二条大麦 22 品種と外国二条大麦 2 品種の合計 24 品種を識別できる CAPS 分析による技術を開発した。CAPS 分析は操作性からみて、RAPD や SSR 分析に比べて制限酵素処理のためのコストと時間がかかるが、本実験では比較的安価な制限酵素を選定した。この品種識別技術は結果の視認性と再現性に重点を置き、原種圃場や採種圃場の品種の純度管理、流通での偽装防止のための抑止力としての効果を想定していることから、コストと手間は現時点では問題ないと判断される。この技術の実用性と信頼性を維持、向上するために、今後育成される新品種について継続的に品種間の DNA の多型情報を最大限蓄積することが重要である。また、実用場面で積極的に活用しながら、さらなる操作の簡易化や低コスト化からみて、制限酵素処理のいらぬ STS マーカー化や、PCR の機械などの設備が不要なコスト面などで優れる Loop-mediated isothermal amplification 法

(水上ら 2004) など、操作や設備など様々な面から技術開発と継続的な改良を行うことが望まれる。

国内二条大麦品種間の近縁の程度を知るために、近縁係数を計算した。その結果、近縁係数は供試した品種間で 0.100 ~ 0.809 の変異が認められた。他の品種との近縁係数の平均値が高かったのは、はるな二条、ミサトゴールドおよびニシノゴールドなどであった。多くの品種がはるな二条など良質品種との近縁度が高く、このことはわが国ビール大麦の遺伝的背景がかなり狭いことを示していた。DNA 多型の検出頻度を基に算出したユークリッド距離に基づくクラスター分析の結果では、交配親にあまぎ二条、きぬゆたか、九州二条 11 号 (ミハルゴールド) や関東二条 25 号などを共通とするグループ、交配親および祖先品種にはるな二条を持つグループ、エビスとアサヒ 19 号の 2 品種と遺伝的相似度が高い品種のグループなどに分類された。この結果は、品種の家系図からみた祖先の共通程度や二条大麦品種の育成の歴史 (増田ら 1993) からみておおむね妥当な結果であった。根井による遺伝的距離 D からみて、他の国内二条大麦と近縁の程度が高い品種は、はるな二条、さきたま二条、ニシノゴールド、ミサトゴールドなどであった。これらの品種は近縁係数でも他の品種との近縁の程度が高く、両者の結果が同様の関係を示した。

品種の家系図から統計的に算出する品種間の近縁係数と、DNA 多型の検出率を基に算出した根井の遺伝的距離 D との間には有意な相関が認められた。従って、近縁係数は、これまで両親から半分ずつの遺伝物質を確率的に受け継ぐとして算出した概念上の値であったが、品種間の DNA 多型検出率を基にした遺伝的相似度からある程度裏付けされた。また一方で、今回用いた DNA マーカーの染色体領域は、品種育成の過程で後代にほぼ均等に分離していったと考えられる。

この理由について以下のように考察した。真核生物においてはタンパク質をコードしない非発現 DNA 領域が、ヒトで 98 % など一般的に多く存在する (Mathews ら 2003)。そのため、今回のように任意に選定した DNA マーカーの近傍の染色体領域は、育種で選抜対象となる重要な農業形質に関与する遺伝子と連鎖している可能性は極めて低く、品種の育成過程での選抜や淘汰による影響が無かったため、後代にほぼ均等に分離していったのであろう。

近縁係数は、全遺伝物質が後代に半分ずつ遺伝するとして確率統計的に算出し、品種間の遺伝的関係を推定する方法であるが、本論文において DNA 多型の検出率を基に算出した遺伝的距離によりある程度裏付けされたこと、現状の遺伝解析では困難なゲノム全体の遺伝的背景がコンピュータで手軽に迅速に算出できる利点があり、常に新しい品種が加わっていく育種現場の状況に対応しやすく、地域に普及する多くの品種間の遺伝的多様性を維持するよう合理的な交配計画を立てる際、有効に利用できると考えられた。

一方で、今後は遺伝解析が進み、有用遺伝子に連鎖して、その遺伝子の有無を判別できる DNA マーカーが数多く作出されるであろう。現在、育種目標となる重要な農業形質である種子感水性 (岩佐ら 1999)、醸造適性 (金谷ら 1998、岡田ら 2002)、凸腹粒や側面裂皮粒 (Kai ら 2003) および木石港 3 由来のオオムギ縮萎縮病抵抗性遺伝子 (Miyazaki ら 2001) などに関与する有用な遺伝子の解析が急速に進んでいる。このような有用遺伝子に連鎖する DNA マーカーで検出される遺伝子型の分離比は、選抜により有用な農業形質を発現する遺伝子型に著しく偏ることが予想される。また、戻し交雑と DNA マーカーを利用した選抜 (矢野 1996) により必要な遺伝子領域のみが導入された品種が多く育成されたとき、両親から半分ずつ遺伝物質を受け継ぐという計算を行う近縁係数と DNA 多型

を基にした遺伝的距離の相関関係はあまり高くないことが予想される。しかしそのときでも、近縁係数は品種の全体的な遺伝的背景や祖先品種の構成を迅速に簡易に把握できる点で利用価値が高いと考えられる。

bulbosum 法による半数体倍加系統の作出は、3年間で、2309の受粉穎花数に対して103系統が得られた。本論文における半数体倍加系統の作出率は、受粉穎花数に対して平均4.5%であった。この結果は稲の蒴培養（大里ら1999）における、全置床蒴数に対して得られた倍化半数体数の割合よりも高い値であり、*bulbosum* 法は優れたものであった。

94の半数体倍加系統におけるオオムギ縞萎縮病抵抗性とその他の形質の分離比は、いずれも1:1のメンデル分離比に適合した。また、DNAマーカーにおいてヘテロ型は全く検出されず、遺伝子型の分離比はメンデル分離比に適合し、歪みは特に認められなかった。これらのことは、*H.bulbosum* との交配親和性、胚培養やコルヒチン処理による倍数化における適性に関する特異的な遺伝子の存在あるいはそれらの遺伝子との連鎖がないことを示しており、本法の有効であることをさらに示すものと考えられる。

半数体倍加系統の遺伝解析への利用は以下の点で優れた。育成して2年目には固定系統として劣性遺伝子によるオオムギ縞萎縮病の抵抗性の評価が可能であったこと、完全なホモ接合体の固定系統であるため増殖が容易で分析試料を十分量確保できたこと、同一遺伝子構成を持つ材料として何度も栽培して形質評価を繰り返すことが可能で、環境変化による形質の変異を小さくして形質評価の信頼性を高め、再現性のあるデータを得ることができた。

本論文では、半数体倍加系統を用いて徳島モチ裸由来の新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* を有する系統を判別する育種に利用価値の高いDNAマーカーの開発を行った。解析材料に用いる品種は、近縁係数が0で形態の違いから遺伝的多様性が大きい縞系6と1k2交配F1由来の半数体倍加系統を用いた。そのため、DNAマーカーを高頻度で作出することができた。さらに、*rym7t* 近傍の領域を狙ったDNAマーカーを作出を目的として、バルク分析を行った。バルク分析は、解析材料のDNAにヘテロ領域がある場合ヘテロを含むグループ側由来のDNA多型しか検出できないため検出効率が半分になるが、本論文では解析材料に完全なホモ接合体である半数体倍加系統群を用いたために効率的に分析ができた。バルク分析により作出したRAPDマーカーは、染色体上の位置情報が無いランダムプライマーであったが、目的の *rym7t* 近傍の領域に6種類が位置づけできた。

連鎖解析の結果、本論文で得た3つの形態マーカー、37カ所のDNAマーカーおよび新たなオオムギ縞萎縮病遺伝子 *rym7t* による全長299.5cMの7H染色体の連鎖地図が作製できた。これは7H染色体のほとんどをカバーするものであった。この結果から、*rym7t* の両側の最も近傍に連鎖するDNAマーカーとして、*rym7t* から短腕側に27.1cMで連鎖するRAPDマーカーのR13+RAPD1と、*rym7t* から長腕側に11.9cMで連鎖するCAPSマーカーMWG511を選定した。これらのDNAマーカーにおける遺伝子型は、オオムギ縞萎縮病に対する表現型と高い精度で一致し、本DNAマーカーが選抜に有効であることを示した。

本実験結果により、*rym7t* の7H染色体上の座乗する領域をかなり特定できた。そのため、今回明らかにした *rym7t* の座乗位置の周辺の塩基配列情報を収集することで、さらに *rym7t* に密接に連鎖するDNAマーカーの開発を行うことができる。また、今回検出したDNAマーカーで *rym7t* を有する縞系6との間に多型が検出されない交配母本品種について、新たなDNAマーカーの開発を効率的に行うことができる。

本論文の結果、新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* は、条性の連鎖はなく、育

種選抜の指標となる 7H 染色体上の形態マーカーであるモチウルチ性や皮裸性については、後者との連鎖が報告されている（古庄ら 1991）。しかし今回作出した DNA マーカーは、それらの形態マーカーよりも *rym7t* 近傍であるため、これらの連鎖している遺伝子をそれぞれ個々に識別して目的の遺伝子のみを有する系統を、本実験で明らかにした DNA マーカーを利用して選抜することが可能である。さらに *rym7t* は、うどんこ病抵抗性、斑葉病、凸腹粒および麦芽品質に関する QTL で同一染色体上の近い位置に座乗するものではなく、これらの有用な遺伝子が集積した品種を育成することは十分可能であることが明らかにできた。

このようにして、本研究では DNA マーカーの効率的な検出方法を検討し、CAPS マーカーによる国内の主要な二条大麦品種の識別技術を開発した。また、品種間の近縁度を簡易にコンピュータで算出できる近縁係数が、DNA 多型の検出率を基に算出した根井の遺伝的距離 D と有意な相関があることを明らかにした。さらに半数体倍加系統を作出し、遺伝解析の材料として、遺伝的にホモ接合体で固定した同一の遺伝子構成の材料として維持、増殖が簡易な点で優れることを明らかにした。これらの材料を利用して遺伝解析を行い、徳島モチ裸由来の新たなオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym7t* の座乗位置を明らかにするとともに、*rym7t* を有する有望品種の育種選抜に利用できる DNA マーカー R13+RAPD1 と MWG511 を明らかにした。これらの成果は、今後の二条大麦の新品種育成に大きく寄与するものと考えられる。

第8章 総合摘要

1. 二条大麦品種の DNA マーカー作出を効率的に行うため、品種間の DNA 多型検出率の比較を、RAPD 分析、SSR 分析および CAPS 分析により得た DNA 断片について、アガロースゲルによる検出で行った。

RAPD 分析、SSR 分析 および CAPS 分析において、DNA 多型検出頻度の平均値は、国内品種間では 2.8 %、0.7 %、18.7 %（上記の分析方法の順）であり、外国品種と国内品種間では 4.8 %、1.7 %、43.3 %（同上）であった。最も効率的に DNA 多型を検出した分析方法は CAPS 分析であった。また CAPS 分析は、PCR 反応による増幅の安定性、DNA 多型の再現性および視認性からみて、RAPD 分析や SSR 分析に比べて優れた。

2. 品種の純度管理、偽装防止を目的とした DNA マーカーによる品種識別法として、CAPS 分析により、国内二条大麦 22 品種と外国二条大麦 2 品種の計 24 品種を識別できる方法を開発した。24 品種は 9 種類のプライマー組合せと 6 種類の制限酵素との組合せで識別が可能であった。

併せて、4つの SSR マーカーによる 24 品種のうち 6 品種の特定と残りの品種を 5 群の 2 品種、3 品種、3 品種、4 品種および 6 品種に識別できた。さらに 6 つの RAPD マーカーにより 24 品種のうち 11 品種の特定と、残りの国内品種 13 品種を 2 品種と 11 品種の 2 群に識別できた。

3. 品種間の遺伝的近縁の程度を把握する目的で、国内二条大麦主要品種間の近縁係数を家系図から統計的に算出した。近縁係数は供試した 22 品種間で 0.100 ~ 0.809 の変異が認められた。

他の 21 品種との近縁係数の平均値が高かったのは、はるな二条の 0.517、ミサトゴールドの 0.483、ニシノゴールドの 0.469 およびみょうぎ二条の 0.454 であった。一方、他の 21 品種との近縁係数の平均値が低かったのは、スカイゴールドの 0.173 であった。多くの主要品種がはるな二条など良質品種との近縁の程度が高く、わが国ビール大麦の遺伝的背景がかなり狭いことを示した。

4. DNA 多型の検出率を基に品種間の遺伝的距離（根井の遺伝的距離 D ）を算出した。遺伝的距離は供試した国内二条大麦 22 品種間で 0.000 ~ 0.639 の変異が認められた。他の品種と遺伝的距離が近い品種は、はるな二条 (0.206)、さきたま二条 (0.206)、ニシノゴールド (0.251)、ミサトゴールド (0.271) などであった。これらの品種は近縁係数（値は近縁の場合に高くなり、遺伝的距離とは逆の関係になる）においても他の国内二条大麦 21 品種との近縁の程度が高かった。平均的な遺伝的距離が高く他の国内二条大麦 21 品種との近縁の程度が低い品種は、きぬゆたか (0.639) であった。スカイゴールドは平均的な遺伝的距離が 0.298 と比較的低い値であり、近縁係数で示した他品種との近縁の程度とは異なる傾向を示した。

5. 家系図から統計的に計算した近縁係数と、DNA マーカーの多次元空間内での距離から計算した遺伝的距離との関係をみた。近縁係数と、遺伝的距離との間には $r = -0.526$ ~

-0.650 の有意な相関が認められた。

従って、近縁係数は、両親から半分ずつの遺伝物質を確率的に受け継ぐとして算出するが、この値は品種間の DNA 多型検出率を基にした遺伝的距離からもある程度裏付けされた。また一方で、今回用いた DNA マーカーで検出した染色体上の領域は、品種育成の過程で後代にほぼ均等に分離していったと考えられる。

6. DNA マーカーを利用して有用遺伝子を効率的に導入する育種法を確立する目的で、遺伝分析の材料として、オオムギ縞萎縮病抵抗性品種と罹病性品種の F1 に野生大麦 *H.bulbosum* を交配して得た胚を培養し、コルヒチン処理をして半数体倍加系統を作出した。半数体倍加系統群の作出率は、*H.bulbosum* を受粉した F1 の穎花数に対して、2.1 ~ 7.2 % イネの蒴培養と比較して高い値であった。

7. 半数体倍加系統群 95 系統のオオムギ縞萎縮病 (I 型) に対する表現型は、抵抗性 47 系統と感受性 48 系統で、期待分離比 1:1 によく一致した。また、連鎖分析に利用するための DNA マーカーにより検出した遺伝子型の分離比も、37 マーカー中 36 マーカーが抵抗性系統型:感受性系統型の 1:1 の期待分離比に適合し、ヘテロ型は全く検出されなかった。

遺伝解析の材料として半数体倍加系統群は、完全なホモ接合体でヘテロ型が判定できない優性マーカーも利用可能で、劣性遺伝子の表現型が観察できて遺伝子型との対応を確認できること、同一の遺伝子構成の材料として維持・増殖が容易で、異なる環境下で形質評価を繰り返し行えるため、遺伝子発現の評価の信頼性を高めることができる点で優れていた。

8. すべてのレースに抵抗性である徳島モチ裸由来のオオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 (*rym7t*) を持つ品種を効率的に選抜できる DNA マーカー開発を目的として、半数体倍加系統群を用いた連鎖解析を行った。その結果、形態マーカー 3, DNA マーカー 27 および *rym7t* 遺伝子の計 31 マーカーによる全長 299.5cM の 7H 染色体の連鎖地図が作製できた。*rym7t* の両側の最も近傍の DNA マーカーとして R13+RAPD1 と MWG511 を選定した。R13+RAPD1 は *rym7t* から 7H 染色体短腕側に 27.1cM で連鎖する RAPD マーカーである。MWG511 は *rym7t* から 7H 長腕側に 11.9cM で連鎖する CAPS マーカーである。

9. *rym7t* の両側の最も近傍の DNA マーカー MWG511 で検出した遺伝子型とオオムギ縞萎縮病に対する抵抗性との一致程度を明らかにし、選抜精度の確認を行った。半数体倍加系統 94 系統中 82 系統 (87%) が、DNA マーカーにおける遺伝子型とオオムギ縞萎縮病に対する表現型の判定と一致した。一方、一致しなかったのこりの 12 系統は、*rym7t* と DNA マーカーとの間で組換えが起こっていると考えられ、これらは今後さらに *rym7t* 近傍の DNA マーカーの探索のための解析材料として利用できる。

10. 効率的に遺伝子を集積して新品種を育成するための遺伝子の染色体上の座乗位置情報を得る目的で、うどんこ病抵抗性、斑葉病抵抗性および麦芽品質に関する形質について、QTL 解析を半数体倍加系統を用いて行った。その結果、うどんこ病抵抗性に関する QTL が 1H 染色体に 1 つ、斑葉病抵抗性に関する QTL が 2H 染色体と 6H 染色体にそれぞれ 1

つ、凸腹粒に関する QTL が 1H 染色体と 2H 染色体にそれぞれ 1 つずつ、麦芽品質に関する QTL が 1H, 2H, 3H, 5H および 6H 染色体に合計 15 検出された。7H に座乗する *rym7t* 近傍には検出されず、これらの遺伝子を全て持った品種の育成に支障はないと考えられた。

11. このようにして、本研究では DNA マーカーの効率的な検出方法を検討し、主要二条大麦品種の識別技術を開発した。また、品種間の近縁係数が、遺伝的距離と有意な相関があることを明らかにした。さらに遺伝的に完全にホモ接合体で固定された遺伝解析の材料として優れる半数体倍加系統を作製し、これを利用して、オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子の座乗位置を明らかにするとともに育種選抜に利用できる DNA マーカーを選定した。これらの成果は、今後の二条大麦の新品種育成技術に大きく寄与するものと考えられる。

引用文献

- 赤木守弘 2000. DNA 多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2: 89 — 96.
- 馬場孝秀・山口修・古庄雅彦 1998. ビール大麦の収量および外観品質における品種×年次交互作用. 日作紀 67: 510 — 515.
- 馬場孝秀・山口修・甲斐浩臣・古庄雅彦 2001. ビール大麦登熟後期の散水処理による凸腹粒耐性検定法. 育種学研究 3: 133 — 137.
- 伴義之・木村鉄也・小曾納雅則 2002. 育成者権保護と先端技術の活用 —登録品種と侵害品種の同一性判定—. 農業および園芸 77: 845 — 852.
- 伴義之 2004. 育成者権保護のためのイグサ DNA 鑑定の実際と課題. 農業および園芸 79: 444 — 456.
- ビッケル, レナード 1975. 飢餓への挑戦—ノーマンボーローグと緑の革命—. 仙名紀訳. TBS 出版, 東京. 1 — 314.
- Blake, T. K, D. Kadqrzhanova, 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.
- Darvasi, A. and M. Soller 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. Theor. Appl. Genet. 89: 351 — 357.
- Devaux, P., T. Adamski and M. Surma 1990. Studies on low crossabilities encountered with the *Hordeum bulbosum* method for haploid production of barley, *Hordeum vulgare* L. Plant Breed. 104: 305 — 311.
- Fujii, K., Y. Hayano-Saito and K. Saito 2000. Identification of a RFLP marker tightly linked to the panicle blast resistance gene, Pb1, in rice. Breeding Science 50: 183 — 188.
- 福岡忠彦・古庄雅彦・牧野徳彦 1991. モチ性大麦品種‘徳島モチ裸’に存在する新しい縞萎縮病抵抗性遺伝子について. 育種 41 (別 2): 388 — 389.
- 古庄雅彦・浜地勇次・伊藤昌光 1987. 半数体利用によるビール大麦の育種方法. 1. 効率的な半数体の作出法. 日作九支報 54: 92 — 94.
- 古庄雅彦・浜地勇次・吉田智彦 1988. 大麦半数体倍加系統の大量作出法と半数体におけるうどんこ病抵抗性の選抜. 育種 38 (別 2): 336 — 337.
- 古庄雅彦・浜地勇次・吉田智彦・中島皐介 1990a. 半数体におけるオオムギ縞萎縮病の選抜. 育種 40 (別 1): 290 — 291.
- Furusho, M., Y. Hamachi and T. Yoshida 1990b. Varietal difference in cross-ability between Japanese two-rowed barley and *Hordeum bulbosum* L. Japan. J. Breed. 40: 411 — 417.
- 古庄雅彦・吉野稔・浜地勇次・吉田智彦 1992a. *Hordeum vulgare* × *H. bulbosum* において *H. bulbosum* 花粉管の伸長と染色体消失が胚形成に及ぼす影響. 育種 42: 115 — 120.
- 古庄雅彦・吉田智彦 1992b. Bulbosum 法により得られたビール大麦の半数体倍加系統の農業形質と麦芽品質. 育種 42a: 631 — 639.
- Furusho, M., M. Yoshino and T. Yoshida 1992c. Selection for spring-habit clones of *Hordeum bulbosum*. Crop Sci. 32: 384 — 385.
- 古庄雅彦・福岡忠彦 1997. オオムギ縞萎縮病抵抗性の遺伝子分析とその利用. 農研センター研報 27: 31 — 71.
- Furusho, M., T. Baba, O. Yamaguchi, T. Yoshida, Y. Hamachi, R. Yoshikawa, K. Mizuta and M.

- Yoshino 1999a. Breeding of a new malting barley cultivar Hoshun by the Bulbosum method. Japan. J. Breed. 49: 281 — 284.
- 古庄雅彦・馬場孝秀・山口修・吉田智彦・浜地勇次・吉川亮・水田一枝・吉野稔 1999b. ビール大麦新品種‘ほうしゅん’の育成. 福岡農総試研報 18: 26 — 31.
- 浜地勇次・古庄雅彦・吉田智彦 1989. ビール大麦の耐湿性の遺伝率. 育種 39: 195 — 202.
- 八田浩一・Jong Chui Park・関昌子・小田俊介・河田尚之・Jung Hyum Nam・田谷省三 2004. 韓国のオオムギ縞萎縮病ウイルス (BaYMV) 系統の判別品種に対する反応. 育種学研究 6 (別 2): 300.
- 早野由里子・齊藤浩二・藤井潔・遠山孝通・辻孝子・杉浦直樹・井澤敏彦・岩崎真人 2000. イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Stvb-i* を検出する SCAR マーカー. 育種研究 2: 67 — 72.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. Theor. Appl. Genet. 108: 1212 — 1220.
- 井辺時雄・吉村淳 1999. イネ育種において DNA マーカーは使えるのか?. 育種学最近の進歩 41: 63 — 66.
- 岩佐友彦・高橋秀和・武田和義 1999. 大麦種子感水性の QTL マッピング. 岡大資生研報 6: 21 — 28.
- 石川吾郎・齋藤美香・中村和弘・伊藤裕之・中村俊樹 2004. パン用コムギ品種の選抜に利用可能な高分子量グルテニンサブユニットの DNA マーカー. 育種学研究 6 (別 1): 211.
- Kai, H., T. Baba, M. Tsukazaki, Y. Uchimura and M. Furusho 2003. The QTL analysis of hull-cracked grain in Japanese malting barley. Breeding Sci. 53: 225 — 230.
- 紙谷元一・竹内徹・楠目俊三 2004. DNA 多型による白インゲンマメ品種「雪手亡」の識別. 育種学研究 6: 29 — 32.
- 金谷良市・呉基日・武田和義 1996. 二条大麦における側面裂皮粒率の品種間差異と家系分析. 育種 46 (別 2): 67 — 71.
- 金谷良市・高橋秀和・武田和義 1998. 春播二条オオムギにおける裂皮歩合の QTL 解析. 岡大資生研報 5: 183 — 191.
- Kasha, K. J. and K. N. Kao 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 874 — 876.
- Kashiwazaki, S., K. Ogawa, T. Usugi, T. Omura and T. Tsuchizaki 1989. Characterization of several strains of Barley Yellow Mosaic Virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 55: 15 — 25.
- 柏崎哲 2000. オオムギ・コムギ縞萎縮病. 農業および園芸 75: 141 — 146.
- Kikuchi, S., S. Taketa, M. Ichii and S. Kawasaki 2003. Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High Efficiency Genome Scanning)/AFLP in barley. Theor. Appl. Genet. 108: 73 — 78.
- 木村鉄也 2004. SSR マーカーを利用した梨の品種識別と親子鑑定. 農業および園芸 79: 146 — 150.
- Klamer, H. H. and B. A. Blander 1961. Orientating linkage maps on the chromosome of barley. Crop Sci. 1: 142 — 143.
- Komatsuda, T., T. W. Lee, H. Sato, T. Annaka, S. Enomoto, M. Kang and S. Oka 1991. A

genetical factors enhancing plant regeneration linked with the V-v locus in *Hordeum vulgare* L. Japan J. Breeding 41: 661 — 664.

小松田隆夫・安中敏男・李文濱・佐藤洋・榎本末男・姜 廷・岡成美 1992. オオムギ植物体再分化能を高める遺伝子のマッピング. 育種 42: 16 — 17.

Konieczny, A. and F.M. Ausubel 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. Plant J. 4: 403 — 410.

小西猛朗・T. M. Choo・吉見良太 1994. オオムギ半数体倍加系統にみられる分離比の歪み. 育種 44: 226.

河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 2000. DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2: 197 — 203.

久保貴彦・尾形武文・吉村淳・松江勇次・岩田伸夫 2000. RAPD 分析による日本型水稻品種の品種識別. 九大農学芸誌 55: 5 — 11.

Kubo, T., Y. Aida, K. Nakamura, H. Tsunematsu, K. Doi and A. Yoshimura 2002. Reciprocal chromosome segment substitution series derived from japonica and indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). Breeding Sci. 52: 319 — 325.

Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. Euphytica 134: 209 — 215.

草場敏彦・遠山明・建部実次 1965. 大麦縞萎縮病に対するビール麦品種の被害抵抗について. 中国農業研究 33: 36 — 38.

櫛渕欽也・山本隆一 1989. 稲の育種・時代を追って. 日本穀物検定協会, 図説・米の品種. 日本穀物検定協会, 東京. 227 — 249.

Lander E. S., P. Green, J. Abrahamson, A. Batlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. Newburg 1987. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174 — 181.

Mano Y., H. Takahashi, K. Sato and K. Takeda 1996. Mapping genes for callus growth and shoot regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.). Breeding Science 46: 137 — 142.

Mano Y., B. E. Sayed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda 1999. Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 98: 937 — 946.

Martin, S. K. St. 1982. Effective population size for the soybean improvement program in maturity groups 00 to IV. Crop Sci. 22: 151 — 152.

丸山恵史 2003. 植物品種育成者の権利保護と DNA 品種識別技術. 育種学研究 5: 127 — 135.

増田澄夫・川口数美・長谷川康一・東修 1993. わが国におけるビール麦育種史. ビール麦育種史を作る会, 東京. 1 — 452.

Mathews, C. K., K. E. van Holde and K. G. Ahern 2003. カラー生化学. 清水孝雄・高木正道・中谷一泰・三浦謹一郎訳. 西村書店, 東京. 822 — 831.

Matsue, Y., Y. Uchimura and H. Sato 2002. Confirmation of the productivity of the stored seeds of wheat and two-rowed barley. Plant Prod. Sci. 5: 187 — 193.

松本晃幸 2004. AFLP 法による食用きのこ「シイタケ」の DNA 品種判別法の開発. 農業および園芸 79: 151 — 156.

松元哲・Shiv Shankhar Kaundun・氏原ともみ 2003. DNA マーカーを用いたチャ品種識別

技術. 農業および園芸 78: 78 — 83.

- Michelmore, R. W., I. Paran, and R. V. Kesseli 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828 — 9832.
- 水上優子・福田至朗・石田朗・加藤恭宏・上田淳一・神戸三智雄 2004. イネ育種選抜 DNA マーカーへの Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の適用. *育種学研究* 6: 225 — 228.
- Miyazaki, C., E. Osanai, K. Saeki, K. Ito, T. Konishi, K. Sato and A. Saito 2001. Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to barley yellow mosaic virus in a Chinese barley landrace Mokusekko 3. *Breeding Sci.* 51: 171 — 177.
- 水田一枝・吉田智彦 1994. ビール大麦交配両親名データベースの構築と解析. *農業情報研究* 3: 65 — 78.
- 水田一枝・佐々木昭博・吉田智彦 1996a. 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の解析への応用. *農業情報研究* 5: 19 — 28.
- 水田一枝・吉田智彦 1996b. 小麦品種の近縁係数およびその品質との関係. *農業研究情報* 5: 57 — 67.
- Mullis, K.B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Reaction., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321 — 4325.
- 南角奈美・矢野健太郎・佐藤和広・武田和義 2002. 大麦の EST に由来する STS 配列の多型性. *育種学研究* 4 (別 2): 268.
- 根井正利 2002. 分子進化遺伝学. 五條堀高・斉藤成也訳. 培風館, 東京. 1 — 433.
- 日本麦類研究会 2002. 麦の品種別出回り状況調査 (平成 13 年産). 食糧庁監修, 麦研叢書 第 202 号: 23 — 24.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局地域研究課 2003. 農林水産省農作物命名登録品種一覧: 27.
- 野澤真 2004. 植物品種保護制度の概要. *農業および園芸* 79: 105 — 110.
- 小笠原博信・高橋砂織 2000. STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別. *日本食品科学工学会誌* 47: 632 — 637.
- 岡田吉弘・木原誠・斉藤渉・河田尚之・伊藤一敏 2002. 日本および北米の優良ビール大麦品種を用いた麦芽品質のゲノム解析. *育種学研究* 4 (別 2): 320.
- 大塚勝・小玉雅晴・石川直幸・加島典子・金子隆史・小山内英一・谷口雅則 1999. 本邦ビールオオムギを用いたゲノム解析研究 3. β -グルカン含量及びその分解酵素活性の QTL 解析. *育種学研究* 1 (別 1): 22.
- 大里久美・吉田智彦 1996. イネ育成系統の近縁係数およびその食味との関係. *育種* 46: 295 — 301.
- 大里久美・浜地勇次・今林惣一郎 1999. 水稻における薬培養法と通常育種法による育成系統の農業形質の比較及び薬培養法による有望系統の育成. *日作紀* 68: 440 — 443.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・布施隆・川崎信二 1999a. RAPD 法による国内産精米の品種判別. *日本食品科学工学会誌* 46: 117 — 122.

- 大坪研一・中村澄子・諸岡宏・藤井剛・布施隆・川崎信二 1999b. RAPD 法による米飯一粒の品種判別. 日本食品科学工学会誌 46: 262 — 267.
- 大坪研一 2004. RAPD 法 (STS-PCR) による米の DNA 品種識別技術. 農業および園芸 79: 157 — 162.
- 小山内英一・竹内敏彦・金子隆史・伊藤一敏・石川直幸・大塚勝・小玉雅春・加島典子・五月女敏範・河田尚之 1999. 本邦ビールオオムギを用いたゲノム解析研究 2. 主要麦芽品質の QTL 解析. 育種学研究 1 (別 1): 21.
- 小曾納雅則・伴義之 2003. DNA マーカー (SSR マーカー) を利用したダイズ品種 (エダメ用) および輸入加工品の品種識別. 農業および園芸 79: 168 — 174.
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K. J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Ganai, W. Powell and R. Waugh 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics 156: 1997 — 2005.
- 齊藤彰 2004. DNA マーカーによるイグサ品種の識別. 農業および園芸 79: 168 — 174.
- 坂紀邦・大谷和彦・朱宮昭男 2000. イネ縞葉枯抵抗性品種育成のための大量検定法. 育種学研究 2: 141 — 145.
- 酒井寛一 1957. 植物育種法に関する理論的研究 V. 自殖性作物の育種における近縁係数の応用. 育種 7: 87 — 92.
- 佐藤和広・P. M. Hayes・武田和義 1999. オオムギの麦芽エキスと穀皮歩合に関する QTL の関係. 育種学研究 1 (別 1): 151.
- Smale, M., M. P. Reynolds, M. Warburton, B. Skovmand, R. Trethowan, R. P. Singh, I. Ortiz-Monasterio and J. Crossa 2002. Dimensions of diversity in modern spring bread wheat in developing countries from 1965. Crop Sci. 42: 1766 — 1779.
- 五月女敏範・河田尚之・石川直幸・金子隆史・小山内英一 1999. 本邦ビールオオムギを用いたゲノム解析 5. 主要農業形質の QTL 解析. 育種学研究 1 (別 1): 24.
- 杉浦直樹・辻孝子・藤井潔・加藤恭宏・坂紀邦・遠山孝通・早野由里子・井澤敏彦 2004. 水稻病害抵抗性付与のための連続戻し交雑育種における DNA マーカー選抜の有効性の実証. 育種学研究 6: 143 — 148.
- 高橋義行 1988. ELISA 法—その特徴と実施上の注意点—. 植物防疫 42: 88 — 92.
- 武田真・櫻井幸恵・天野里子・Asif Javaid・一井眞比古 2004. オオムギ 7H 染色体に座乗する密穂および短芒遺伝子のマッピング. 育種学研究 6 (別 2): 54.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. Annu. Rev. Genet. 27: 205 — 233.
- Thoday, J. M. 1961. Location of polygenes. Nature 191: 368 — 370.
- Thompson, D. M., K. Chalmers, R. Waugh, B. P. Forster, W. T. B. Thomas and P. D. S. Caligari 1991. The inheritance of genetic markers in microspore-driven plants of barley *Hordeum vulgare* L. Theor. Appl. Genet. 81: 487 — 492.
- 栃木県農業試験場栃木分場 1998. 品種改良のためのビール麦品質検定法 第 3 版. 栃木県農業試験場栃木分場. 1 — 60.
- 遠山明・草葉敏彦 1970. オオムギ縞萎縮病の伝染について 第 2 報 *Polymyxa graminis* Led. による媒介. 日植病報 36: 223 — 229.
- 遠山孝通・早野由里子・杉浦直樹・藤井潔・井澤敏彦・中前均 1998. 水稻穂いもち抵抗性遺伝子 *pb1(t)* と連鎖する PCR マーカーの開発. 愛知農総試研報 30: 27 — 34.

- 内村要介・佐藤大和・松江勇次 2000. RAPD 分析による麦類の品種識別. 育種学研究 2 (別 2): 113.
- 内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004a. 国内二条大麦の DNA マーカーによる品種識別. 日作紀 73: 35 — 41.
- 内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004b. 二条大麦品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離との関係. 日作紀 73: 410 — 415.
- 内村要介・古庄雅彦・馬場孝秀・山口修・甲斐浩臣・塚崎守啓・吉田智彦 2005. ビール大麦の有用遺伝子の遺伝解析のための半数体倍加系統の作出. 日作紀 74 (4) 印刷中.
- 氏原和人・藤井敏男・野沢清一・関口忠男 1984. 大麦縞萎縮病とビール大麦品質. 育種 34: 302 — 303.
- 鵜飼保雄・大澤良・斉藤彰・林武司 1995. DNA 多型連鎖地図作成と QTL 解析のためのコンピュータ・プログラム MAPL. 育種 45: 139 — 142.
- 鵜飼保雄 1999. 量的形質と QTL 解析. 日作紀 68: 179 — 186.
- 鵜飼保雄 2000. ゲノムレベルの遺伝解析. 東京大学出版会, 東京. 1 — 345.
- 宇杉富雄・柏崎哲・土崎常男 1985. 大麦縞萎縮病ウイルスの系統について. 関東東山病害虫研報 32: 53 — 55.
- vom Brocke, K. A., E. Christinck, R. Weltzien, T. Presterl and H. H. Geiger 2003. Farmers' seed systems and management practices determine pearl millet genetic diversity patterns in semiarid regions of India. Crop Sci. 43: 1680 — 1689.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407 — 4414.
- 和田卓也・内村要介・尾形武文・坪根正雄・浜地勇次・松江裕次・吉村淳 2004. 日日交雑系統を用いた, 米の理化学的特性に関する QTL 解析. 育種学研究 6 (別 2): 314.
- Walsh, J. 1981. Genetic vulnerability down on the farm. Science 214: 161 — 164.
- Weber, J.K. and P.E. May 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44: 388 — 397.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S.V. Tingey 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531 — 6535.
- 山本俊哉 2004. SSR マーカーによるモモの品種識別と親子鑑定. 農業および園芸 79: 137 — 141.
- 矢野昌裕・清水博之 1993. 制限酵素断片長多型 (RFLP) を利用したイネ日印交雑後代系統の図式遺伝子型の推定. 北陸農試報 35: 63 — 71.
- 矢野昌裕・春島嘉章 1994. 分子マーカーを利用したイネ量的形質の遺伝解析. 育種学最近の進歩 36: 29 — 32.
- 矢野昌裕 1996. 作物育種の新戦略 — DNA マーカーを指標とした選抜法の確立にむけて —. 農業技術 51: 385 — 389.
- 吉田智彦・水田一枝 1996. 近縁係数を利用した良質ビールの交配母本選定. 日作九支報 62: 46 — 47.
- 吉田智彦 1998a. 最近育成の稲麦品種の家系分析. 農業技術 53: 504 — 507.
- 吉田智彦・今林惣一郎 1998b. 水稻良食味育成品種の遺伝的背景. 日作紀 67: 101 — 103.

- 吉田智彦 1999. 作物の種類と品種. 堀江ら著, 作物学総論. 朝倉書店, 東京. 16 — 29.
- 吉川亮・浜地勇次・古庄雅彦・伊藤昌光・吉田智彦・水田一枝・山口修・吉野稔・篠倉正住 1997. ビール大麦新品種「ミハルゴールド」の育成. 福岡農総試研報 16: 17—22.
- 吉村淳・土井一行 2001. グラベリマ稲の遺伝特性の解析—染色体断片導入系統の作成と利用—. 国際農業研究情報 22: 15—21.

Summary
**Studies on the Development and Application of DNA Markers for Breeding of
Malting Barley**

Yosuke Uchimura

The technology of identifying barley cultivars by the DNA markers was established. The purpose is to manage the foundation seeds and to protect the breeder's right and brands from pirated cultivars. The author could identify the 24 cultivars consisted of 22 Japanese cultivars and 2 foreign cultivars by CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) analysis, and detect DNA polymorphisms among 24 cultivars by 9 CAPS markers combined with 9 STS markers and 6 endonuclease, electrophoresed DNA fragments in 1.8% agarose gels. In addition, the author selected 28 CAPS markers, 4 SSR marker and 6 RAPD markers that could detect DNA polymorphisms among 24 cultivars.

Genetic relationships among cultivars were estimated either by coefficient of parentage, which was calculated using the database of cultivars lineage, or from genetic distance, which was calculated based on DNA polymorphism using the molecular markers. In this study, Euclidean distances and Nei's genetic distances among 22 barley cultivars were calculated using molecular markers. The result of cluster analysis based on Euclidean distances was well explained by lineages of respective cultivars. A significant correlation ($-0.526 \sim -0.650$) between the coefficients of parentage and the Nei's genetic distances was found among 22 modern cultivars grown in Japan. Thus, the validity of the coefficients of parentage between two cultivars, which was calculated assuming that cultivars derived from the crossing had half of the genetic materials of each parent, was supported by the genetic distance estimated from DNA polymorphism. On the other hand, the alleles detected by the molecular markers in this study were supposed to be nearly equally distributed to the offspring in the breeding process.

To develop a DNA marker assisted selection system for lines with recessive resistance gene to all races of barley yellow mosaic virus (BaYMV), the author produced doubled haploid lines by the *bulbosum* method in barley. The author used Japanese six-rowed barley cultivar Shimakei6 with a resistance gene to all races of BaYMV and susceptible two-rowed barley cultivar Ik2. Doubled haploid lines were obtained by pollinating the F1 plants with pollen of *H.bulbosum* L.. Ratio of haploid plants obtained to florets pollinated was 1.7 - 4.5 %. Ninety five haploid lines segregated to 47 resistance and 48 susceptible to BaYMV strain I in the infected field by BaYMV. This segregation ratio fitted a theoretical ratio of 1:1. Segregation ratios by molecular markers also fitted a theoretical ratio of 1:1 except one marker. No heterozygous genotype was observed. Doubled haploid lines are useful because fixed lines could be obtained in a short period and doubled haploid lines have complete homogenote phenotype even with recessive genotype. Reliable evaluation of phenotype by many times is possible because they are fixed without segregation by seed multiplication.

To establish a marker assisted selection system, and linkage analysis of BaYMV gene (*rym7t*) descended from Tokushima mochiadaka, doubled haploid lines derived from F1 of Shimakei6 $\times$ Ik2 were developed.

A genetic linkage map was constructed for Shimakei6 $\times$ Ik2 using 94 doubled haploid lines with 3 phenotype markers, 27 DNA markers and *rym7t*. This map covered 252.8cM on 7H chromosome. DNA

markers were selected on the nearest both side of *rym7t*. The DNA marker R13+PAPD1 (RAPD) chained the distance 27.1cM to *rym7t* on the long arm side of 7H. Another DNA marker MWG511 (CAPS) chained the distance 11.9cM to *rym7t* on the other side.

The accuracy was confirmed for the selection of resistance lines to BYMV using the DNA markers (R13+RAPD1, MWG511) chained both nearest side of *rym7t*. 81% of genotypes with these DNA markers corresponded to phenotypes of BaYMV resistance. On the other hand, 12 lines in doubled haploid barley lines had crossover between the marker and *rym7t*.

To obtain information for more efficient breeding, the author detected and presumed the locations of QTLs of resistance to powdery mildew or barley stripe disease, grain ventral swelling and malting quality (water sensitivity, protein content of malt, soluble nitrogen content in wort, malt extract, β -glucan, diastatic power per total nitrogen) using 91 DNA markers with 150 doubled haploid lines originated from Kinuyutaka $\times$ Yoshikei15. QTL for resistance to powdery mildew was detected on 1H. Two QTLs for barley stripe disease were detected on 2H and 6H. 15 QTLs for malting quality were detected on 1H, 2H, 3H, 5H and 6H. No QTL for them was detected in near area of *rym7t*. It shows that the development of lines with all of these genes is promising.

謝辞

本研究を行うにあたり，宇都宮大学農学部 吉田智彦 教授の懇切丁寧なご指導を賜りました。心からお礼申し上げます。

東京農工大農学部 平沢正 教授，茨城大学農学部 松田智明 教授，宇都宮大学農学部 本條均 教授，同 和田義春 助教授には，本論文の御校閲を賜りました。

本研究への着手，遂行においては，福岡県農業総合試験場農産部長の松江勇次博士，同麦類育種チーム長の古庄雅彦博士から終始懇切丁寧な指導と激励を賜りました。同チームの山口修氏，塚崎守啓氏，甲斐浩臣氏（現福岡県農業総合試験場バイオテクノロジー部），馬場孝秀博士（現農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター北陸研究センター）に多大な協力と援助および応援を頂きました。栃木県農業試験場栃木分場ビール麦酒造用品質改善指定試験地の方々には麦芽品質の分析をして頂きました。また，本研究の着手から成果を取りまとめるまでに多くの方からご支援を頂きました。

ここに記して深く感謝いたします。

福岡県農業総合試験場特別報告
第22号

ビール大麦の品種育成におけるDNA
マーカーの開発と利用に関する研究

発行 平成18年3月
福岡県農業総合試験場
(福岡県筑紫野市吉木)

著者 内村 要介

印刷所 株式会社ジェイ・ピー