

オオムギ縞萎縮病抵抗性遺伝子 *ym 3* の DNA マーカーの開発

1. 試験のねらい

ビール麦の最重要病害であるオオムギ縞萎縮病は、近年、病原ウイルスに複数の系統が存在することが判っている。ビール麦の抵抗性育種をすすめるには、各ウイルス系統に対する抵抗性遺伝子の導入、複数の抵抗性遺伝子の集積が急務となっている。抵抗性遺伝子 *ym 5* ではアイソザイム (同位酸素) と多型を選抜のための連鎖マーカーとして利用できるが、効率的な遺伝子の集積には、他の主要な抵抗性遺伝子についても選抜に有効な連鎖マーカーが必須である。そこで、バルク法 (bulked segregant analysis) を用いて高度抵抗性遺伝子 *ym 3* の DNA マーカーの開発を行った。

2. 試験方法

バルク法は F_2 などの分離集団中の各個体を、抵抗性および罹病性などの標的とする形質によりグループ (バルク) 化にすることにより、標的遺伝子の周辺に由来する DNA を、両バルク間で観察される多型として検出する方法である。

本研究では、罹病性二条大麦品種、ダイセンゴールド (+/+) と抵抗性突然変異系統、Ea52 (*ym 3* / *ym 3*) の F_3 分離集団 (187系統) を材料に用い、各系統から全 DNA を CTAB 法で抽出した。縞萎縮病に対する反応は、栃木分場内の I 型系統汚染圃場に栽培し、モザイク病斑の程度により抵抗性および罹病性ホモとヘテロを判定した。抵抗性および罹病性の各 10 系統の DNA を混合し、抵抗性反応を異にする DNA バルクを作成した。これを鋳型とし、10塩基のランダムプライマーを 2 種類ずつ用いて RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA、PCR 法の一変法) 解析を行った。多型を示したプライマー組について、全分離系統の多型バンドの有無と抵抗性反応との連鎖を Mapmaker を用いて解析した。

更に、得られた連鎖マーカー候補について、主要な育種母材における多型バンドの有無を調査し、育種への適用の可否を確認した。

3. 試験結果および考察

3,072通りのプライマー組についてスクリーニングを行い、*ym 3* と連鎖を示す 7 個の多型バンドが得られた (表-1、図-1)。これらの連鎖関係は図-2 に示すように推定され、RA92187 と RA98171 は *ym 3* の両側に位置づけられた。*ym 3* と最も密接に連鎖する RA92187 は組換え価 0.6% で、罹病性およびヘテロ系統にバンドが現れる完全優性の多型であった。他方、抵抗性およびヘテロ系統にバンドが現れるもののなかでは、RA116171 が最も密接な連鎖を示し組換え価 6.5% であった。

これらの連鎖マーカー候補について、表-2 に示す主要な育種母材における多型バンドの有無を確認した。その結果、RA921873、RA124130、RA126147 では、*ym 3* をもつ品種・系統とその他を確実に識別できた。RA98171、RA90152 では、1 ないし 2 系統の例外があるものの、他はよく識別できた。RA116171 では、いくつかの品種で多型バンドとほぼ同等の塩基量のゴーストバンドが現れ、識別が難しかった。

4. 成果の要約

オオムギ縞萎縮病の高度抵抗性品種育成を効率化するために、主要抵抗性遺伝子 *ym 3* の DNA マーカー開発に取り組んだ。その結果、RA92187 というプライマーを用いて RAPD を行うことにより、99% 以上の確率で *ym 3* の有無を見分けることが可能となった。この方法を用いて、特定のウイルス系統汚染ほ場に依存せず、実験室内での幼苗検定によって複数の抵抗性遺伝子の集積が可能となる。

(担当者 栃木分場 早乙女和彦*・河田尚之・五月女敏範) *現 企画経営部

表-1 RAPDの検索経過

供試プライマー数	1次スクリーニング	2次スクリーニング	連鎖バンド数
3,072	108	25	7

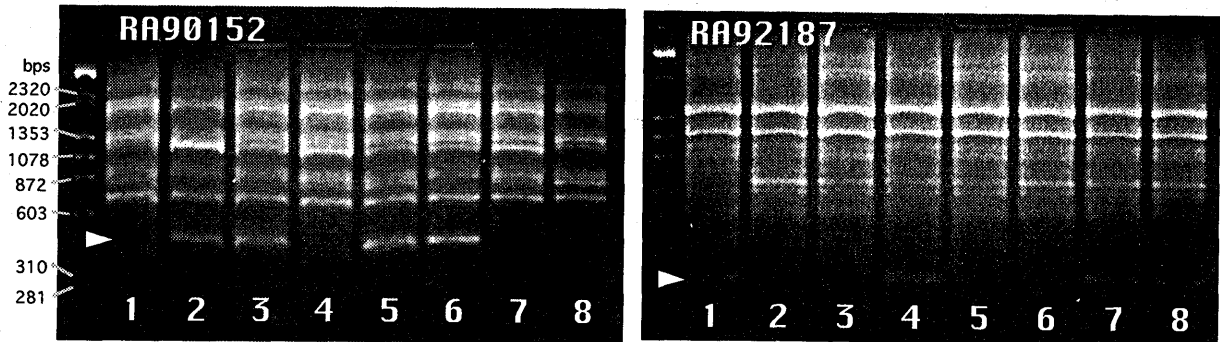


図-1 *ym 3*と連鎖の認められた多型バンドのようす

注) 1; ダイセン (感受性)、2; Ea52 (抵抗性)、3; 抵抗性バルク、4; 感受性バルク、5と6; 抵抗性系統、7と8; 感受性系統

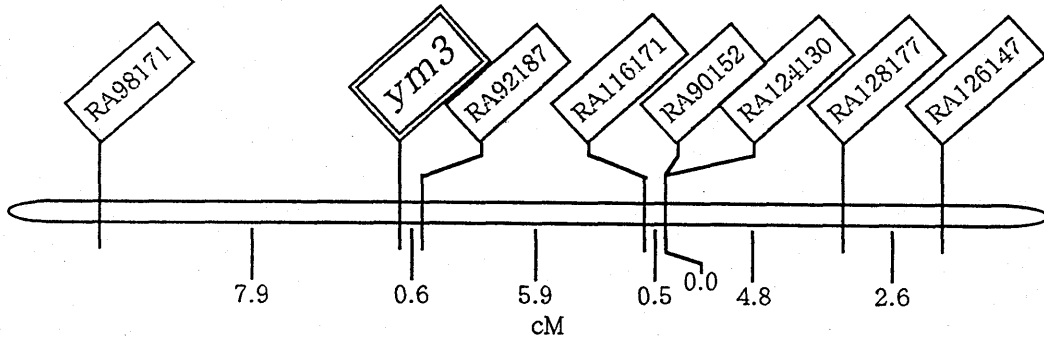


図-2 *ym 3*近傍の連鎖地図

表-2 主要な育種母材における連鎖マーカーの適合性

不一致 判別不可

マーカー名	品名	育種母材																			
		Ea52	イシユクシラズ	はがねむぎ	羽系J-7	会津6号	関東二条29号	Clipper	Harrington	Keg	Spartan	あまぎ二条	はるな二条	ダイセンゴールド	ヤシオゴールド	タカホゴールド	ミカモゴールド	ミサトゴールド	ヤチホゴールド	関東二条25号	新田系1
バンドのタイプ	gene	ym3	ym3	ym3	ym3	ym3	ym3	感受性	感受性	感受性	感受性	感受性	感受性	感受性	ym5	ym5	ym5	ym5	ym5	ym5	
RA98171	S	-	-	-	-	-	不一致	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RA92187	S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RA116171	R	+	+	+	+	+	+	-	判別不可	-	-	判別不可	判別不可	判別不可	-	判別不可	判別不可	判別不可	判別不可	判別不可	-
RA90152	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	不一致	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA124130	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RA126147	R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-